

Medicina di Segnale

IL MICROBIOTA INTESTINALE, IL SUO STUDIO, CASI CLINICI

DOTT. GUIDO MARINI

GROSSETO

GASTROENTEROLOGO – MEDICO DI SEGNALE

RIMINI 25-26 GENNAIO 2020

THE HUMAN

Bacteria, fungi, and viruses outnumber human cells in the body by a factor of 10 to one. The microbes synthesize key nutrients, fend off pathogens and impact everything from weight gain to perhaps even brain development. The Human Microbiome Project is doing a census of the microbes and sequencing the genomes of many. The total body count is not in, but it's believed over 1,000 different species live in and on the body.

25 SPECIES

in the **stomach** include:

- *Helicobacter pylori*
- *Streptococcus thermophilus*

500-1,000 SPECIES

in the **intestines** include:

- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus reuteri*
- *Lactobacillus gasseri*
- *Escherichia coli*
- *Bacteroides fragilis*
- *Bacteroides thetaetaomicron*
- *Lactobacillus rhamnosus*
- *Clostridium difficile*

MICROBIOME

600+ SPECIES

in the **mouth, pharynx and respiratory system** include:

- *Streptococcus viridans*
- *Neisseria sicca*
- *Candida albicans*
- *Streptococcus salivarius*

1,000 SPECIES

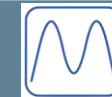
in the **skin** include:

- *Pityrosporum ovale*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Corynebacterium jeikeium*
- *Trichosporon*
- *Staphylococcus haemolyticus*

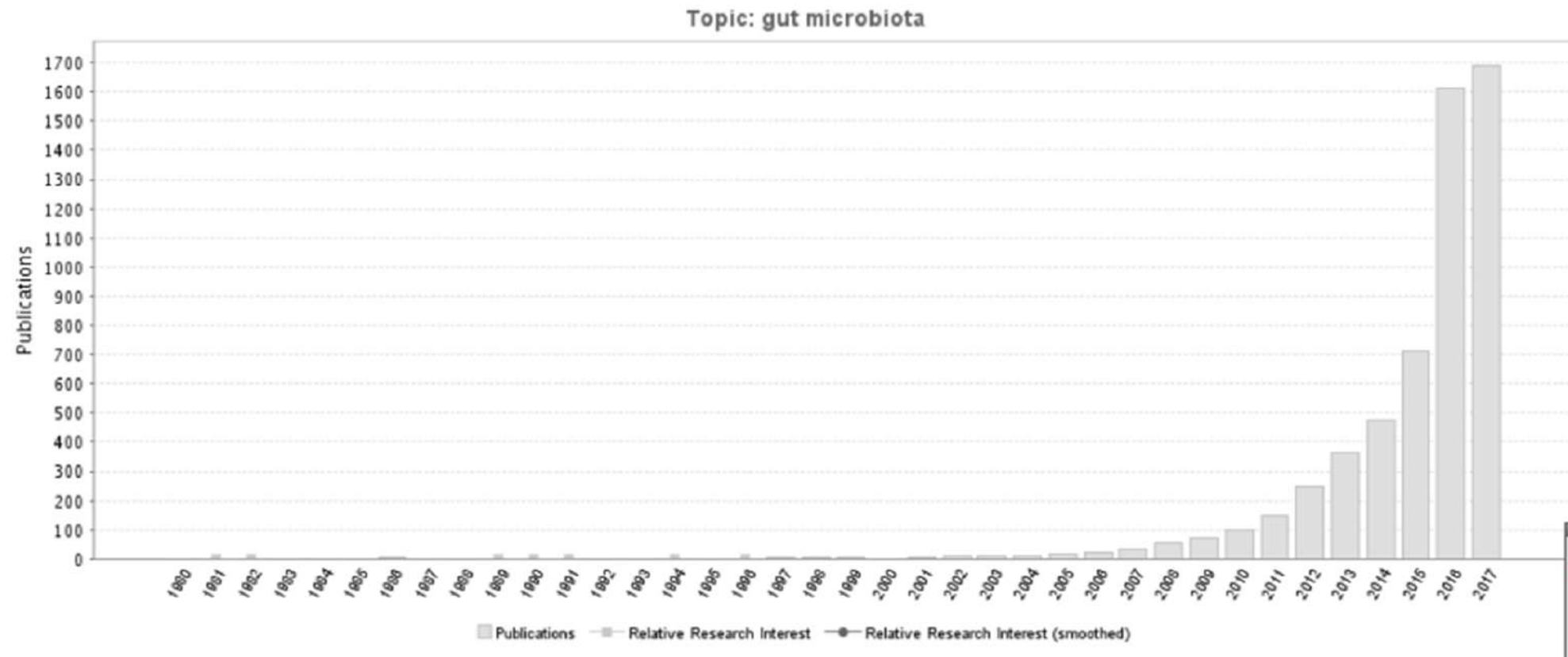
60 SPECIES

in the **urogenital tract** include:

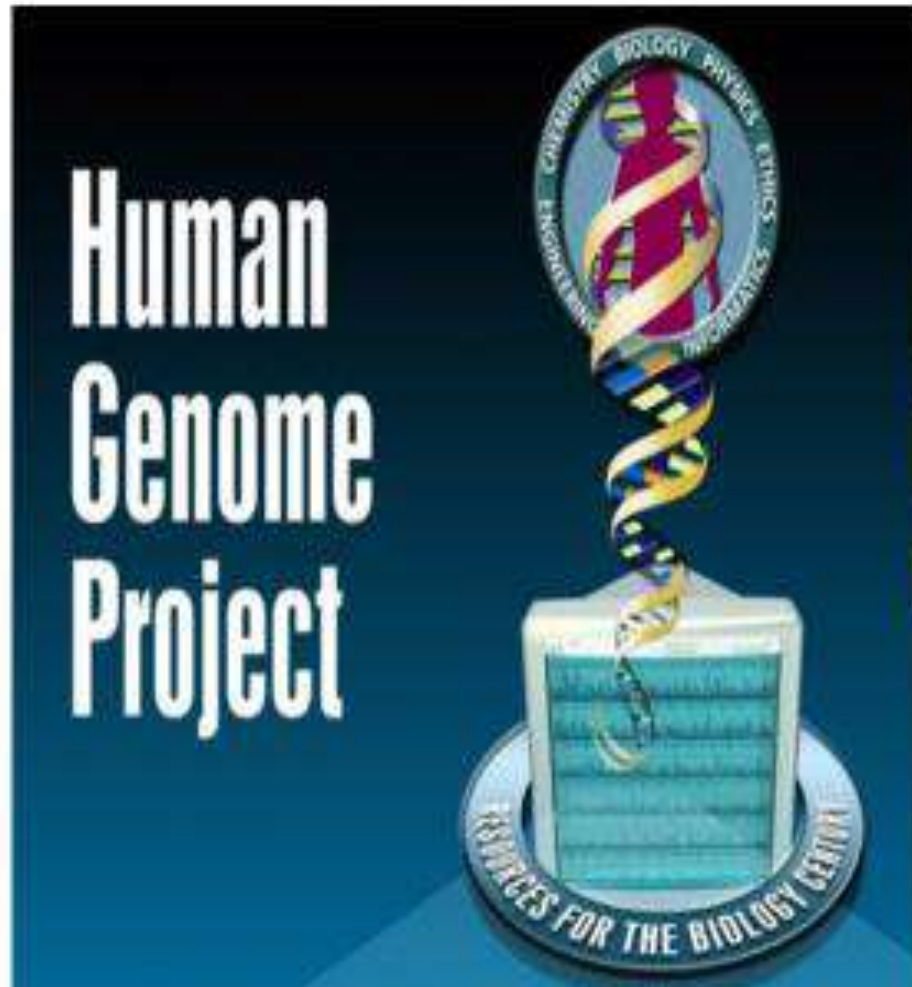
- *Ureaplasma parvum*
- *Corynebacterium aurimucosum*



N° di pubblicazioni/anno su Microbiota intestinale, 1980→2017



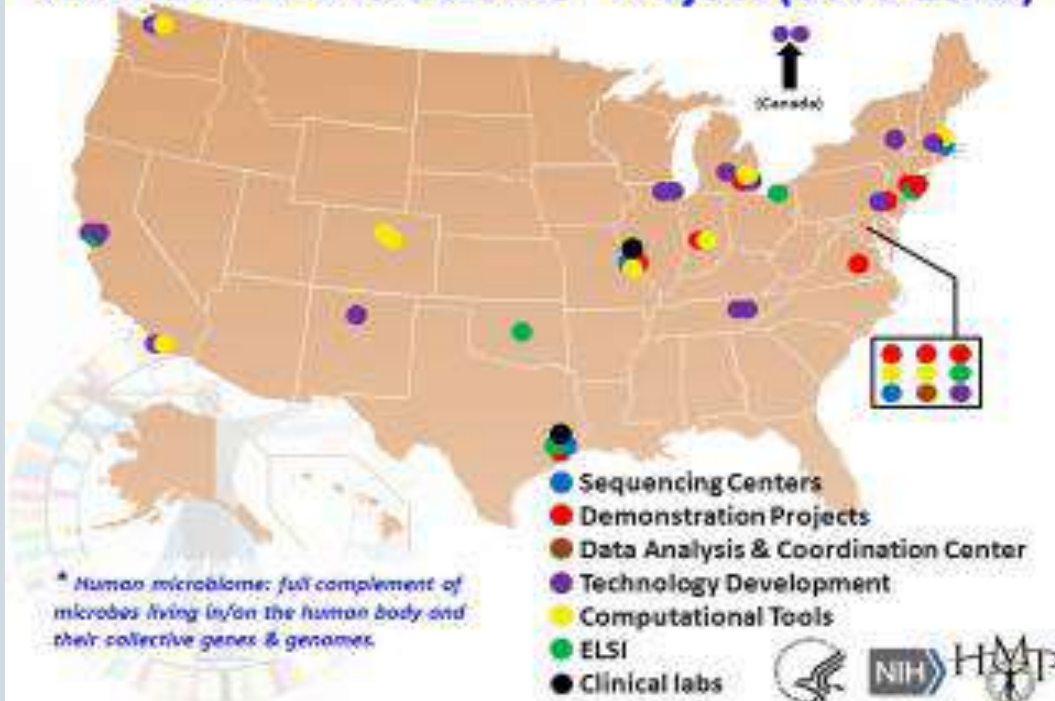
Fine anni novanta



HUMAN MICROBIOME PROJECT

Nel 2005-2006 scoperta Microbioma umano Maryland (USA) e dal 2007 al 2011 nasce un progetto governativo finanziato dal Governo Americano da 173 mil. di dollari (HUMAN MICROBIOME PROJECT

NIH Human Microbiome* Project (2008-2012)



MICROBIOME

By the Numbers



10-100 trillion

Number of symbiotic microbial cells harbored by each person, primarily bacteria in the gut, that make up the human microbiota

90%



Up to 90% of all disease can be traced in some way back to the gut and health of microbiome

>10,000

Number of different microbial species researchers have identified living in the human body

10X



There are 10 times as many microbial organisms as there are human cells in the human body

100 to 1

The genes in our microbiomes outnumber the genes in our genome by about 100 to 1



Human:
10,000-25,000 genes

Gut microbiome:
3.3 million genes

22,000

Approximate number genes in the human gene catalog

3.3 million

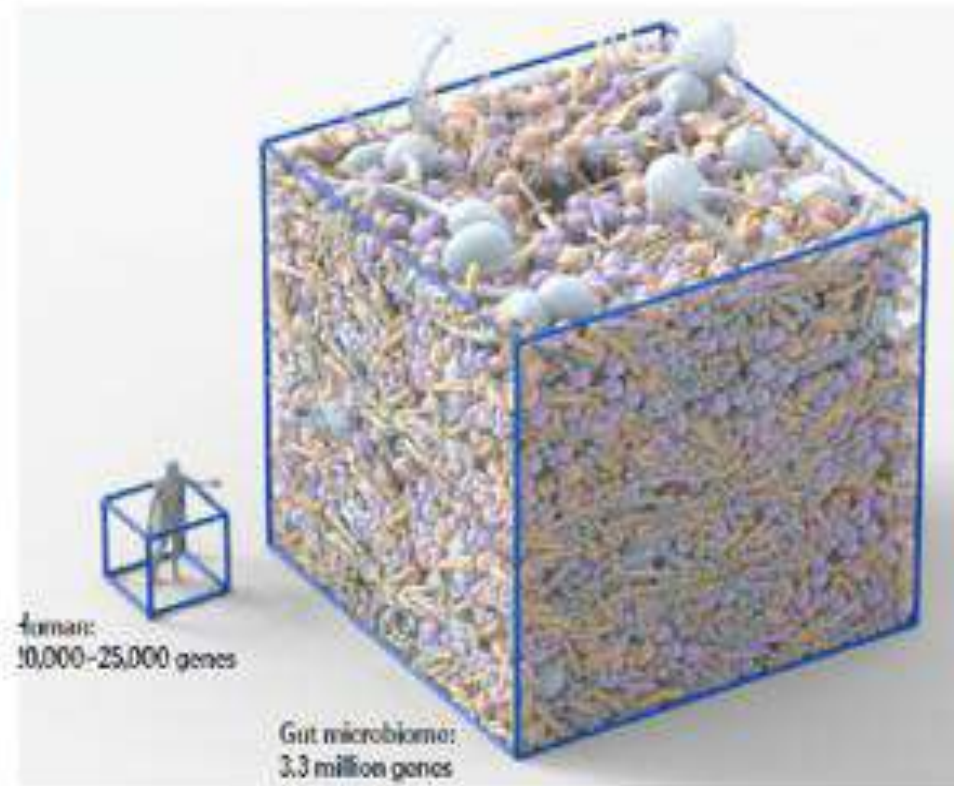
Number of non-redundant genes in the human gut microbiome

99.9%

Percentage individual humans are identical to one another in terms of host genome

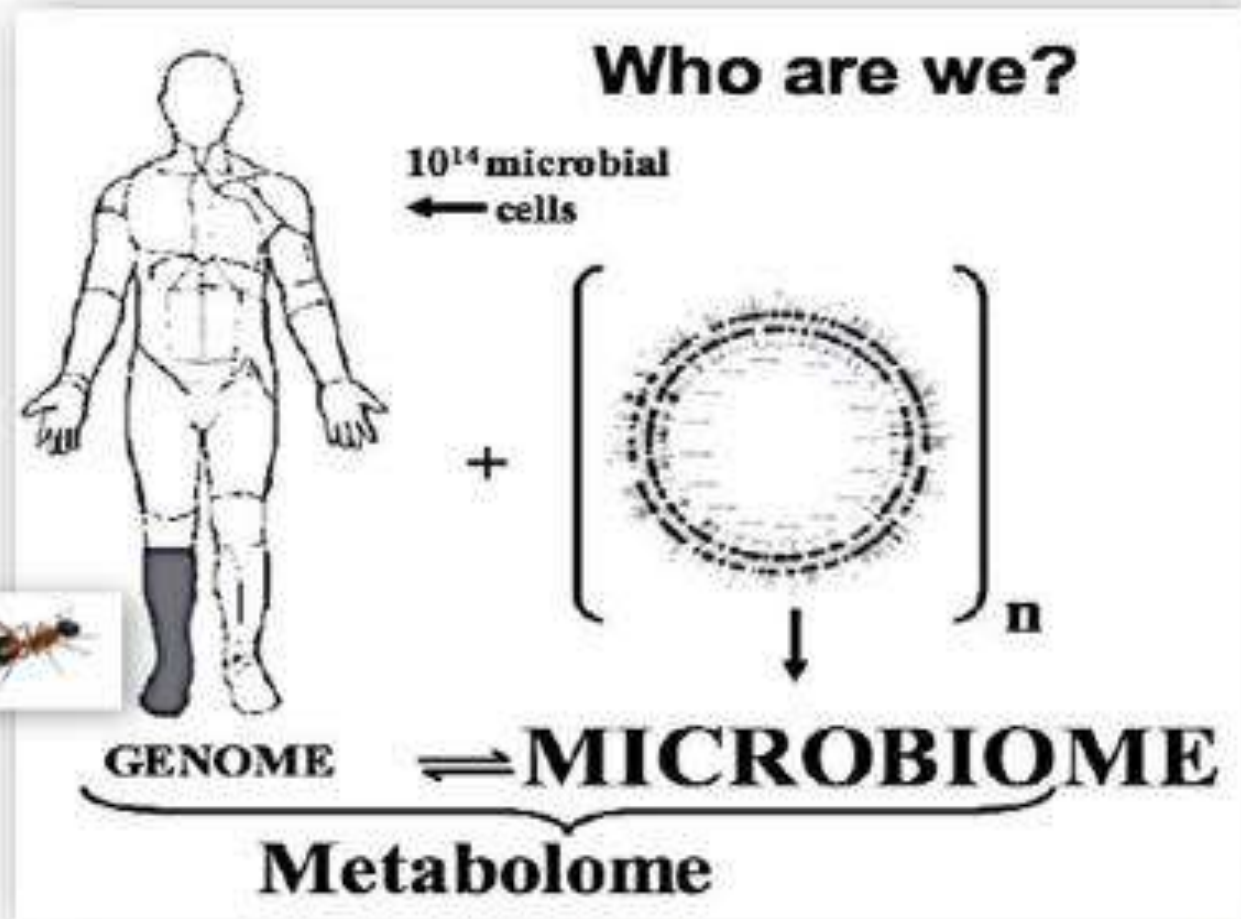
80%- 90%

Percentage individual humans are different from another in terms of the microbiome

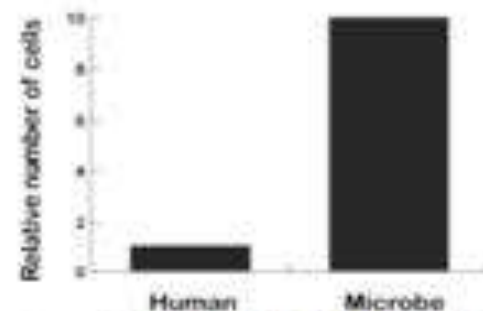


CHI SIAMO?

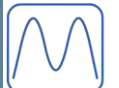
99% GENOMA: BATTERICO



MJ.Blaser, Trans Am Clin Climatol Assoc. 2012



- CELLULE UMANE: 10.000.000.000.000
- CELLULE BATTERICHE: 100.000.000.000.000 (90%)



COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA

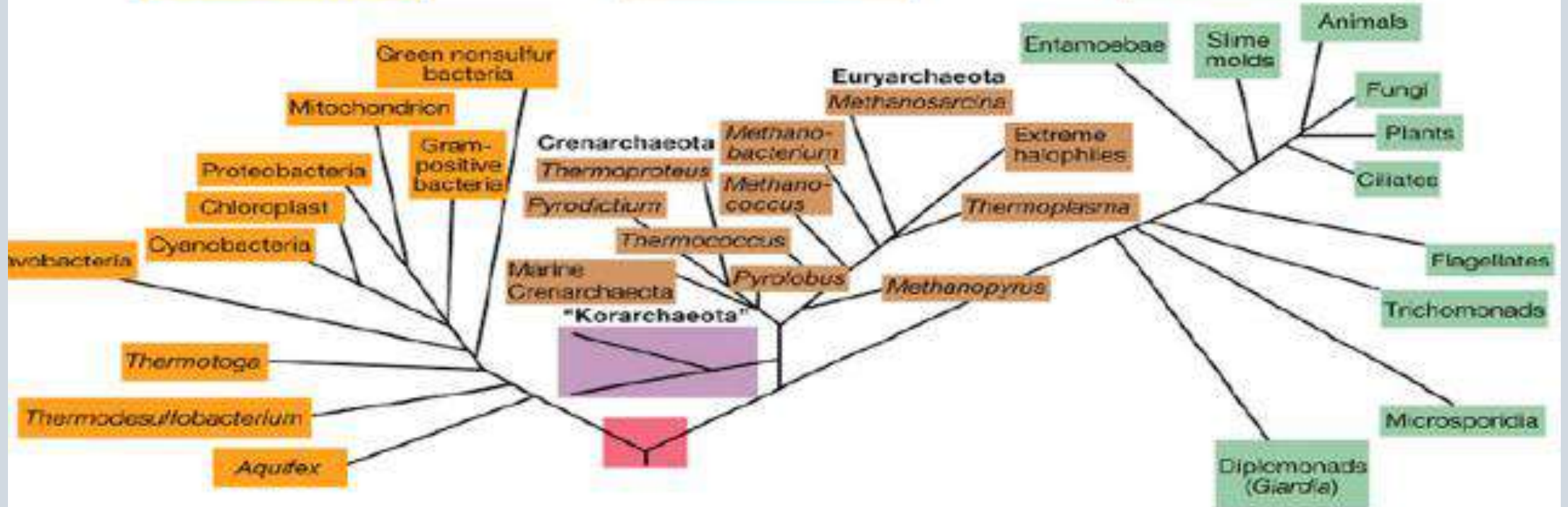
Phylogenetic Tree of Life (Carl Woese et al., 1977)

Virus

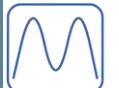
Bacteria

Archaea

Eukarya



Three-Domain System



GUT VIROMA

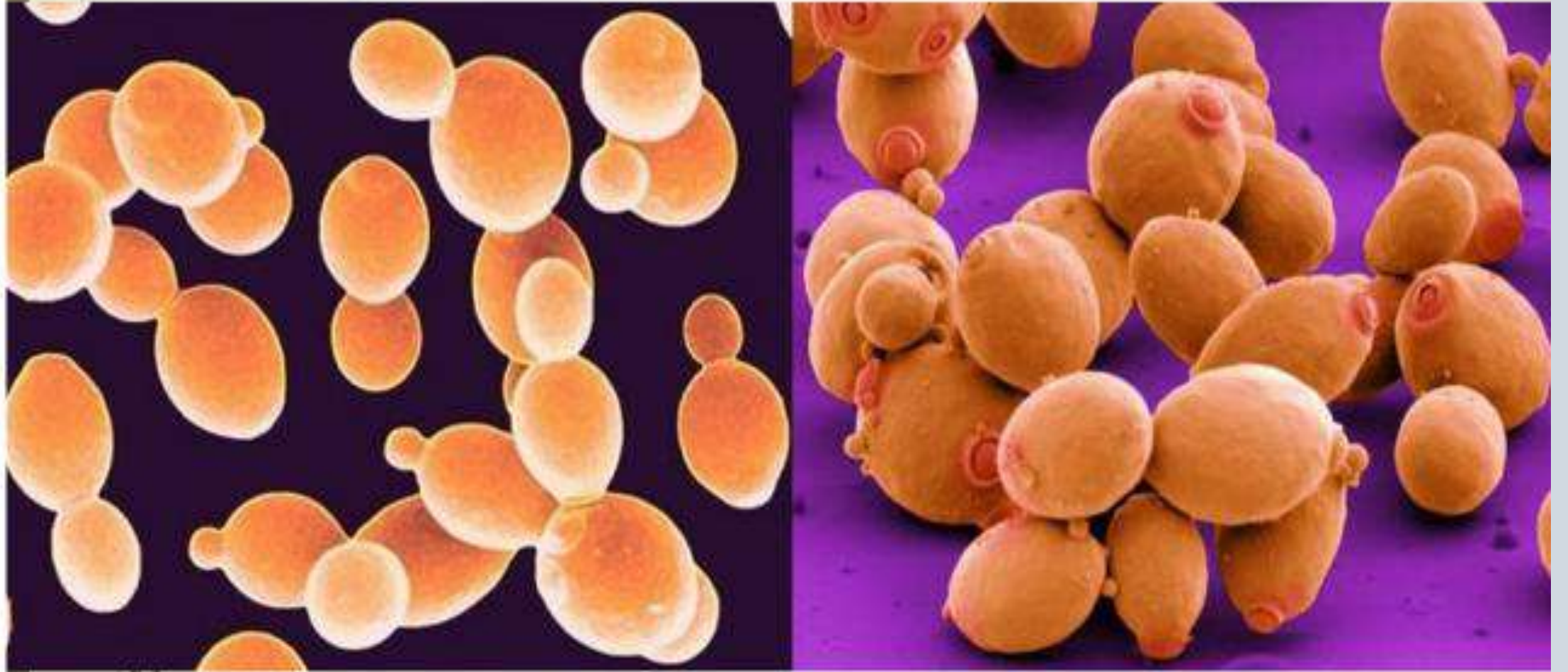
**18000 GENOMI VIRALI CHE
CONTROLLANO LE COMUNITA'**

BATTERICHE

- **FAGI LITICI**
- **PROFAGI**



MICETI (MICROBIOTA)

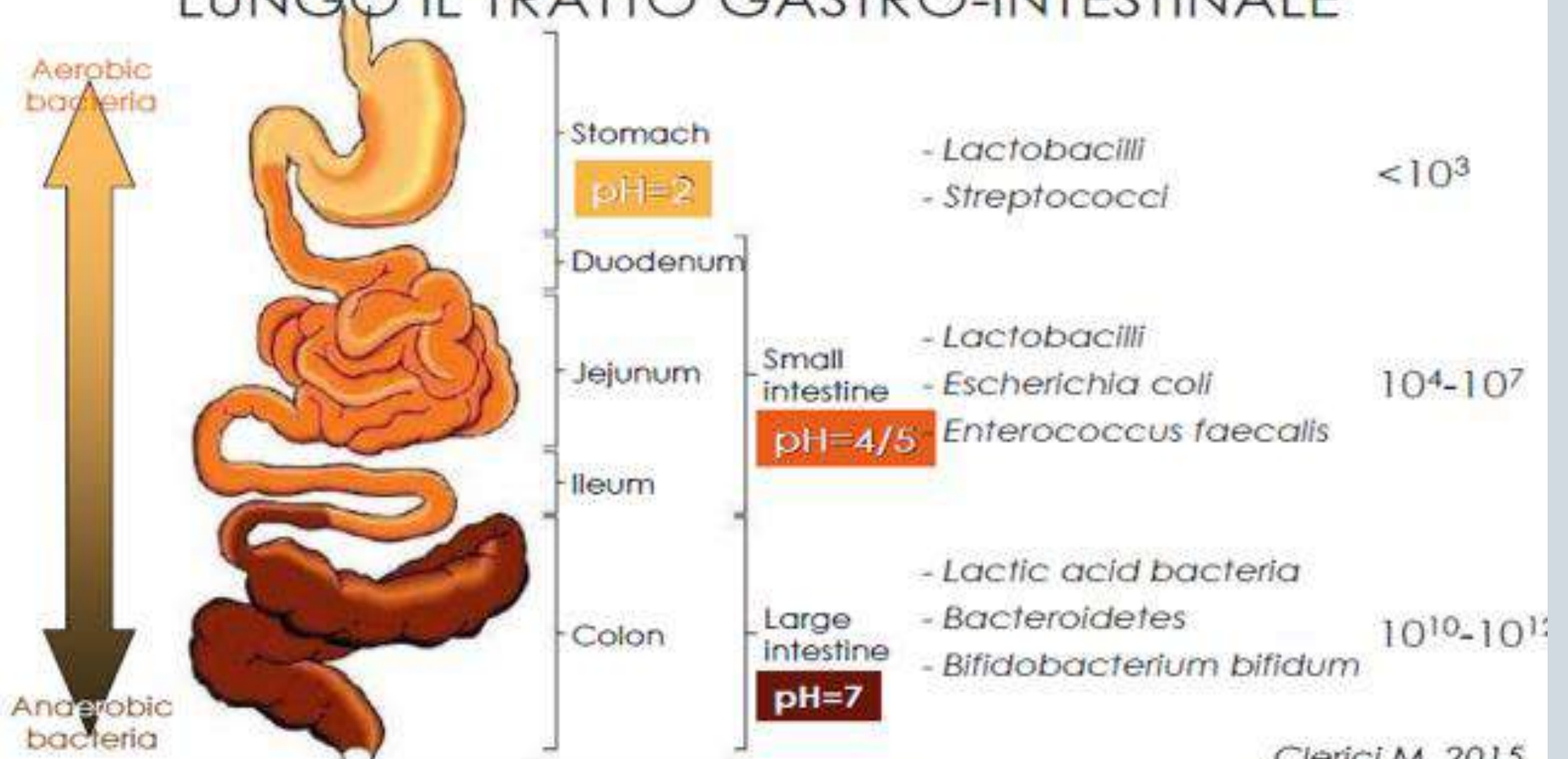


ARCHEA

Non hanno nucleo ed unico filamento DNA
alofili(alti livelli salinità), termoresistenti,
metanogeni . Livello più basso della vita cellulare



DISTRIBUZIONE DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE LUNGO IL TRATTO GASTRO-INTESTINALE



Clerici M, 2015



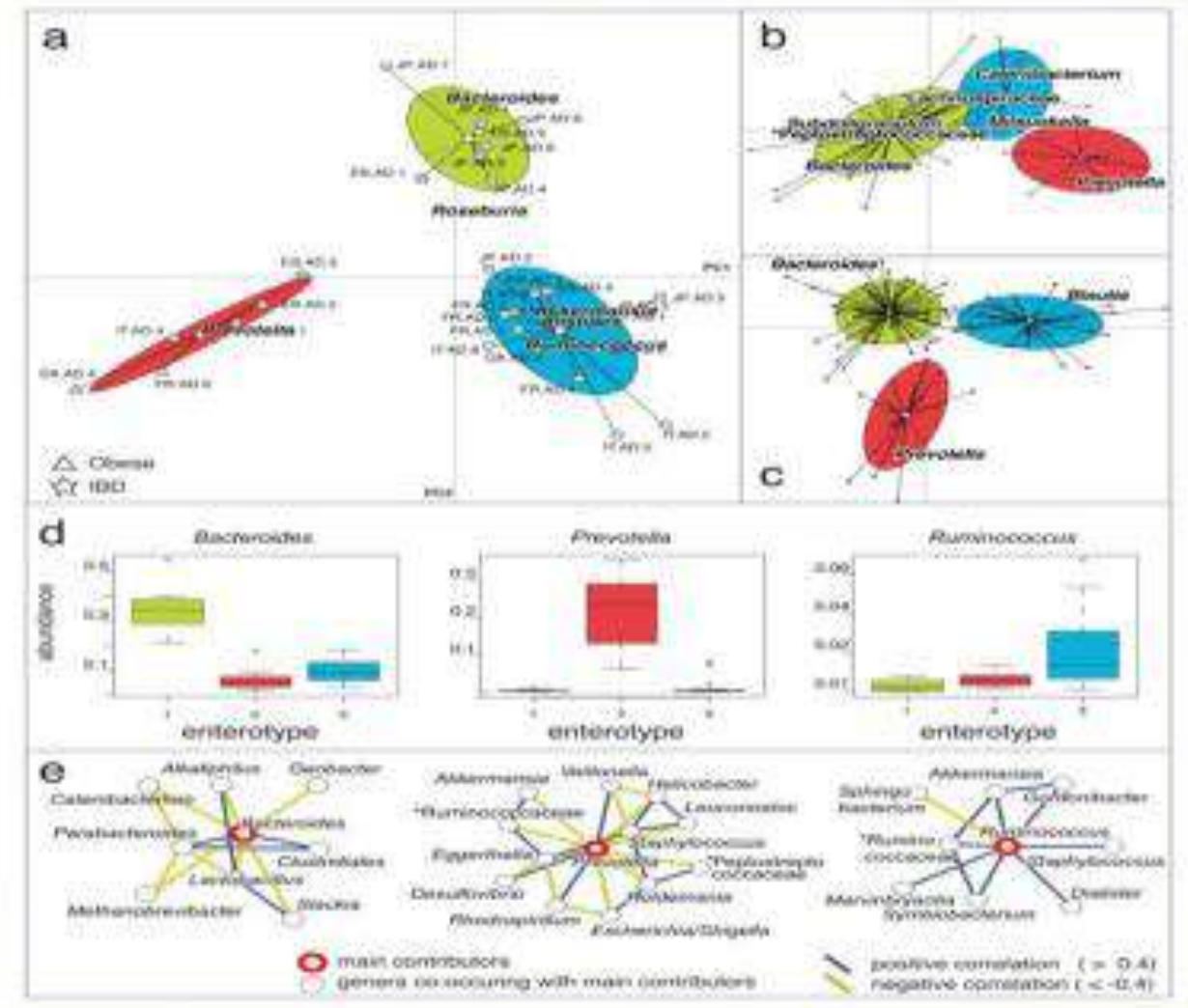
ENTEROTIPI MICROBIOTA INTESTINALE UMANO

ENTEROTIPO 1
Bacteroides

ENTEROTIPO 2
Prevotella

ENTEROTIPO 3
Ruminococcus

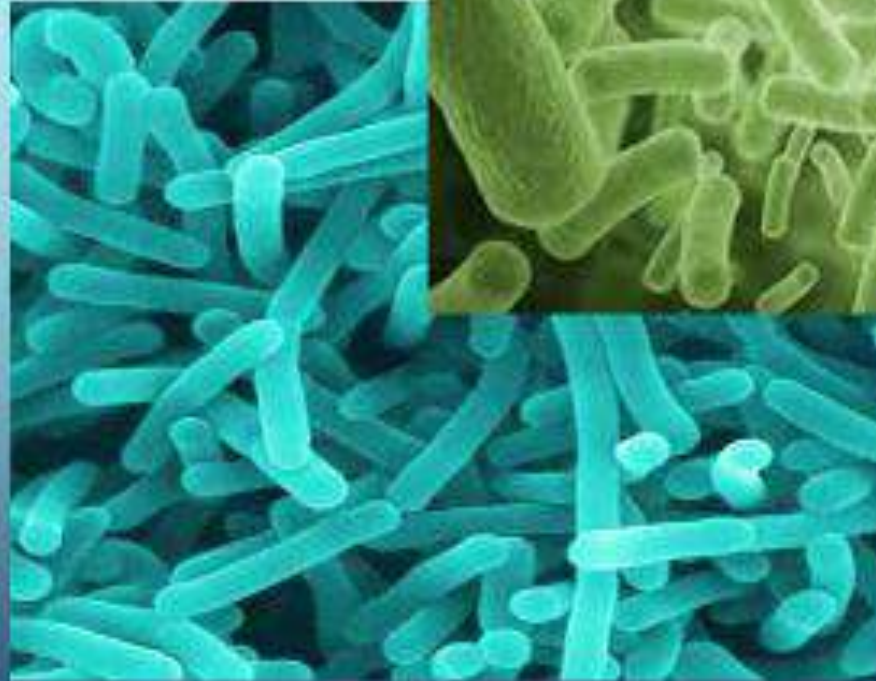
Arumugam, Nature 2011



PHYLA MICROBICI MAGGIORI

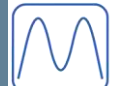
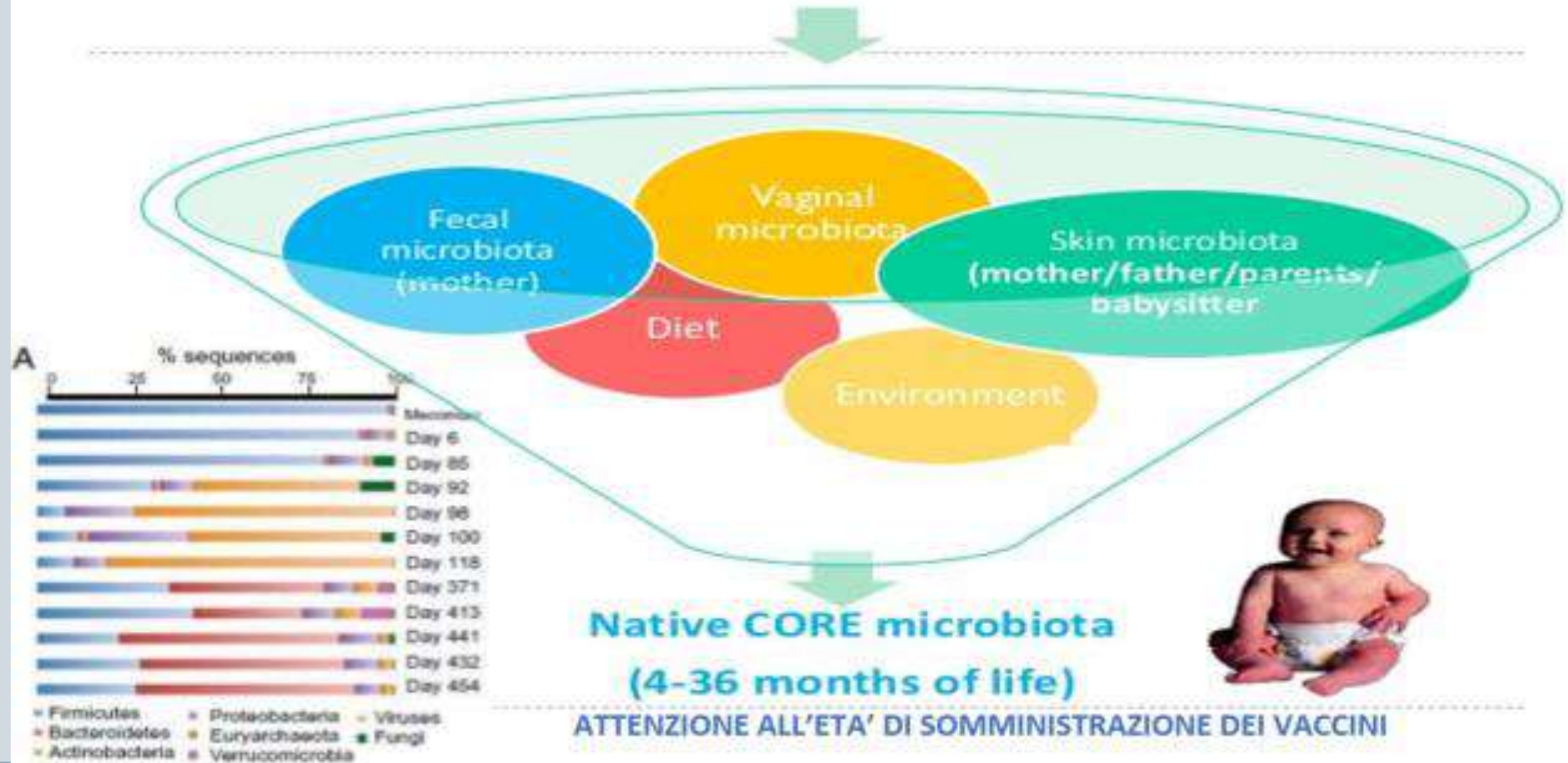
(90% DEL MICROBIOTA UMANO)

1. Firmicutes
2. Proteobacteria
3. Bacteroides
4. Actinobacteria



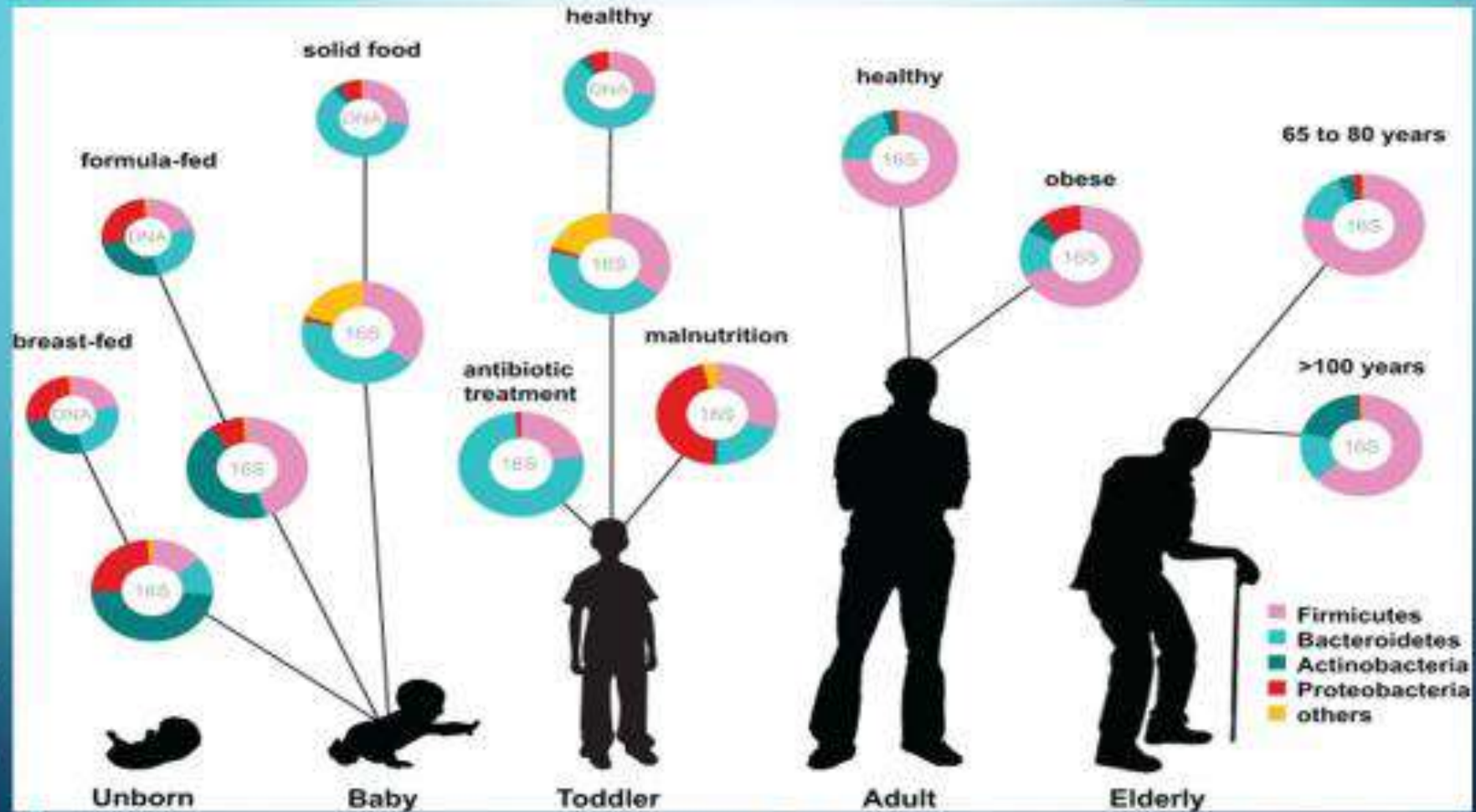
IL MICROBIOTA ALLA NASCITA

Human body is almost sterile at birth

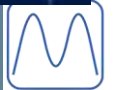


COME CAMBIA IL MICROBIOTA NEL CORSO DELLA VITA

Human microbiota: onset and shaping through life stages and perturbations



Ottman N et al. Front Cell Infect Microb 2012



Funzioni del microbiota

I cattivi batteri...



*Ma non
siamo tutti
cattivi*



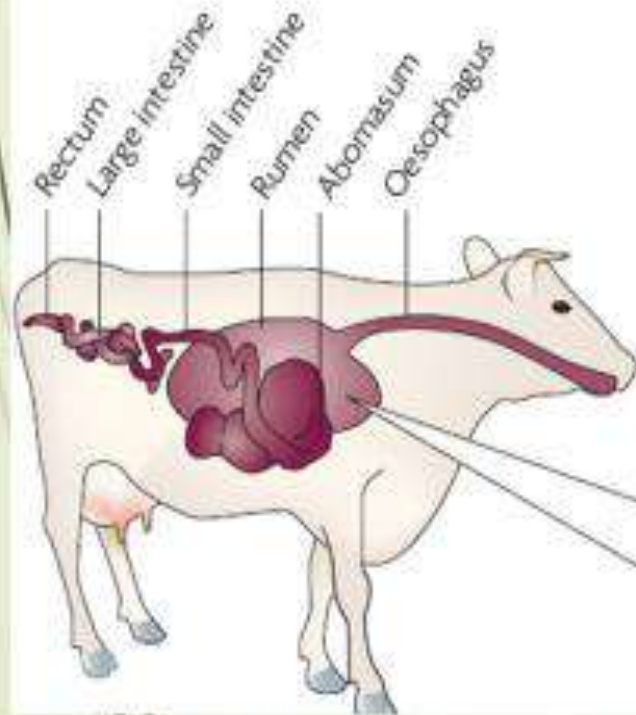
- Funzione metabolica
- Funzione immunitaria

*Vivono nel nostro
apparato digerente*

FUNZIONE METABOLICA

IL MICROBIOTA E' UNO STREPITOSO ORGANO METABOLICO

GUT METABOLOMA



Rumen

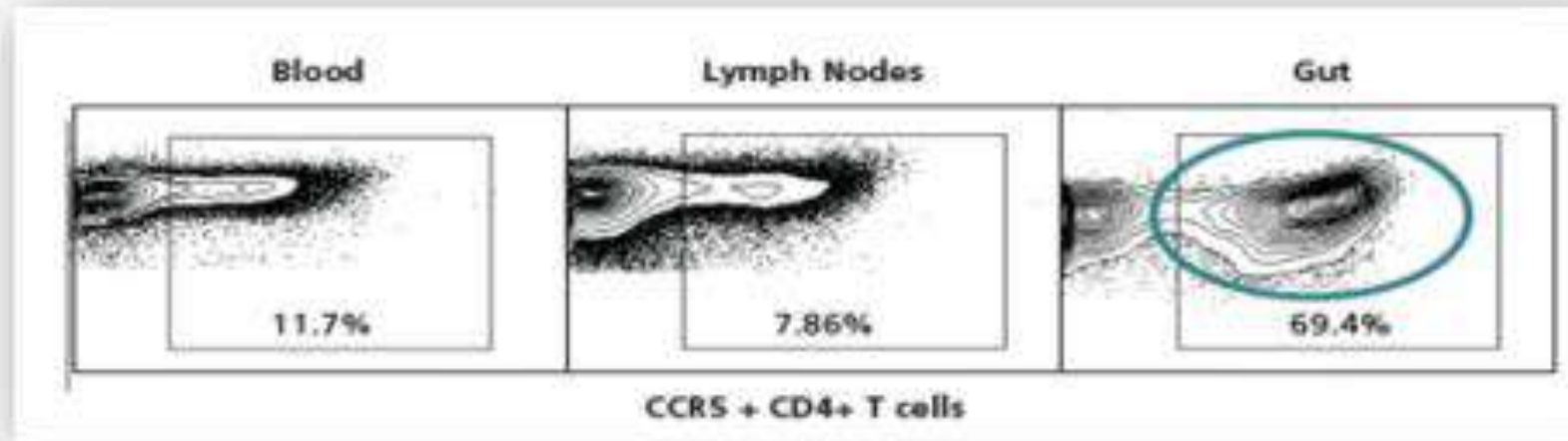
- Bacteroidetes
 - Prevotella ruminicola* (X,S)
 - Prevotella bryantii* (X,S)
- Firmicutes
 - Butyrivibrio fibrisolvens* (X,S)
 - Ruminococcus flavefaciens* (C,X)
 - Ruminococcus albus* (C,X)
 - Eubacterium cellulosolvens* (C,X)
- Fibrobacter
 - Fibrobacter succinogenes* (C)
 - Fibrobacter intestinalis* (C)

GLI ERBIVORI TRAGGONO IL 70% DELLA LORO ENERGIA DALLA DIGESTIONE MICROBICA DEI POLISACCARIDI VEGETALI

© 2008 Annual Review Microbiol 68



INTESTINO E SISTEMA IMMUNITARIO



- tratto gastrointestinale:
70-80% delle cellule immunitarie (GALT)!
- **Interazione continua** cellule immunitarie-microbiota-antigeni alimentari
- Risultato finale: **condizionamento della salute** locale e sistemica

RUOLO PROTETTIVO DEL MICROBIOTA IN CONDIZIONI DI OMEOSTASI

Modulazione del sistema immunitario

- PRODUZIONE DI FATTORI ANTIMICROBICI
(acido lattico, SCFA, bacteriocidine)
- LIMITAZIONE DELLA TRASCRIZIONE DI ALCUNI FATTORI QUALI NF- κ B E
QUINDI DELLA SINTESI DI CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE
- SOSTEGNO AL MANTENIMENTO DELLA BARRIERA INTESTINALE
(METABOLISMO DEI CARBOIDRATI A SCFA)
- CONTRIBUTO A OMEOSTASI DELL'EPITELIO ENTEROCITARIO
(INTERAZIONE CON PRR)



MICROBIOTA E LUOGO DI VITA

L'analisi del microbiota separa gli anziani che vivono:

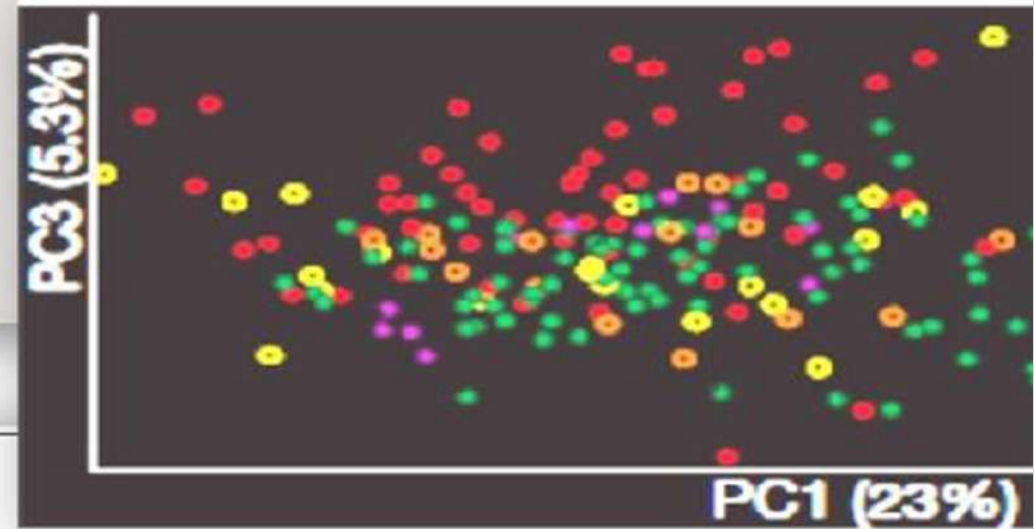
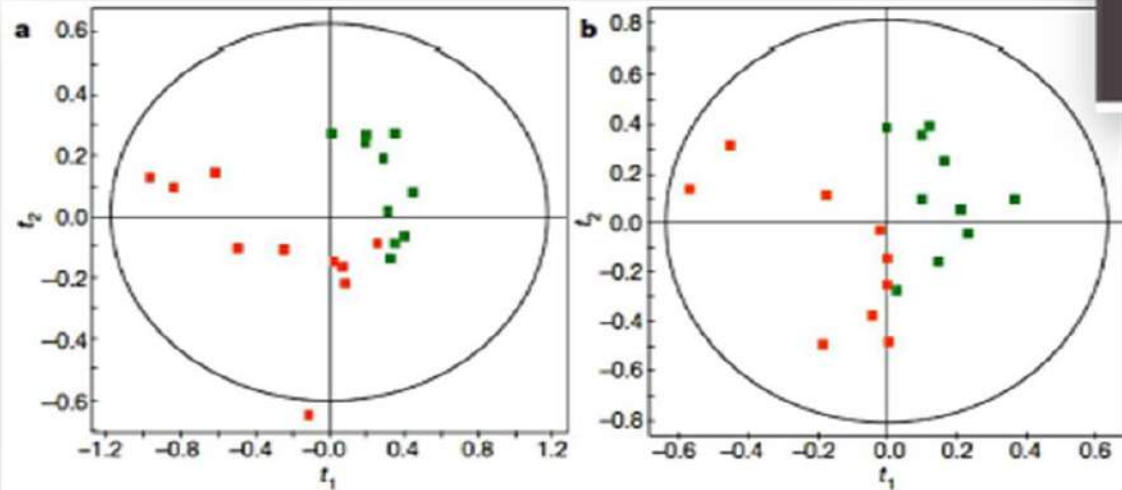
Verde: comunità

Giallo: Day Hospital

Arancio: Riabilitazione

Rosso: Istituzione di lungodegenza

Viola: Giovani

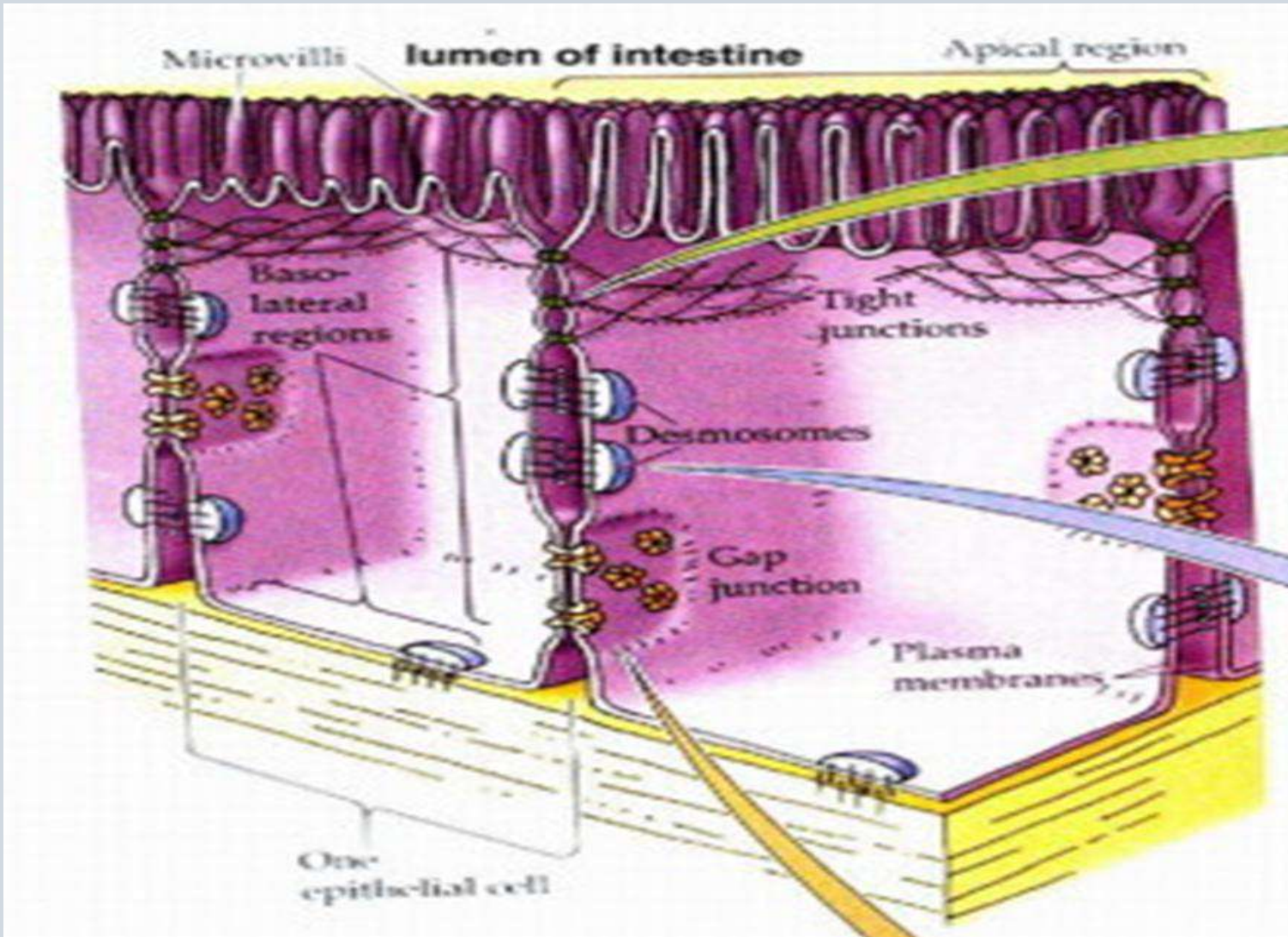


Claesson et al, Nature 2012

Barriera intestinale



LEAKY GUT



•Traslocazione

•Endotossiemia

•Infiammazione

CAUSE DI LEAKY GUT

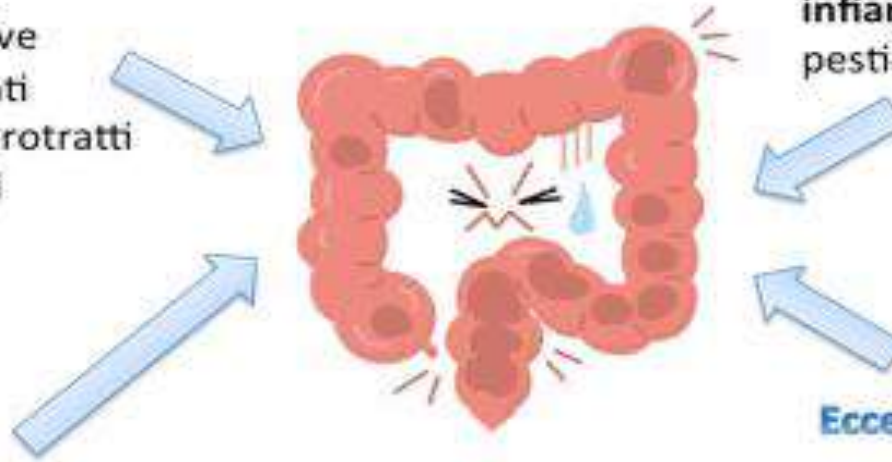
Possibili CAUSE di LEAKY GUT

Dieta

Intolleranze alimentari
Glutine
Alterazioni digestive
Carenze di nutrienti
Errori alimentari protratti
Allergie alimentari

Infezioni

Candida
Parassiti
Batteri patogeni
Virus



Farmaci e sostanze tossiche

**Antibiotici, anti-acidi, anti-
infiammatori, cortisonici,
pesticidi, metalli pesanti**

Eccesso di stress

Traumi psico-fisici
Eccessi sportivi
Stress protratti
Interventi chirurgici



Brain
Depression
Anxiety
ADHD



Sinus and Mouth
Frequent Colds
Food Sensitivities



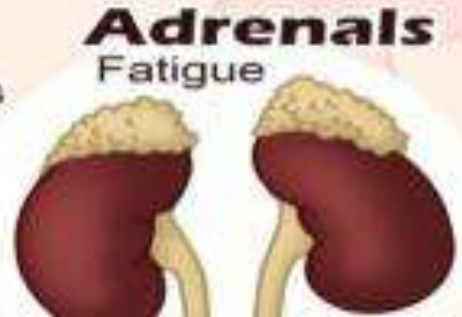
Skin
Acne
Rosacea
Eczema
Psoriasis

Thyroid
Hashimotos
Hypothyroidism
Graves

Leaky Gut
Affects the
Whole Body



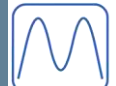
Joints
Rheumatoid Arthritis
Fibromyalgia
Headaches



Adrenals
Fatigue



Colon
Constipation
Diarrhea



ASSE INTESTINO CERVELLO

Microbiota associato a depressione : effetto del suo trapianto in ratti

Il trapianto di microbiota fecale dal paziente depresso al ratto microbiota-depleto induce modificazioni comportamentali simil-depressive, compresa anedonia e ansia, nonché alterazioni nel metabolismo del triptofano



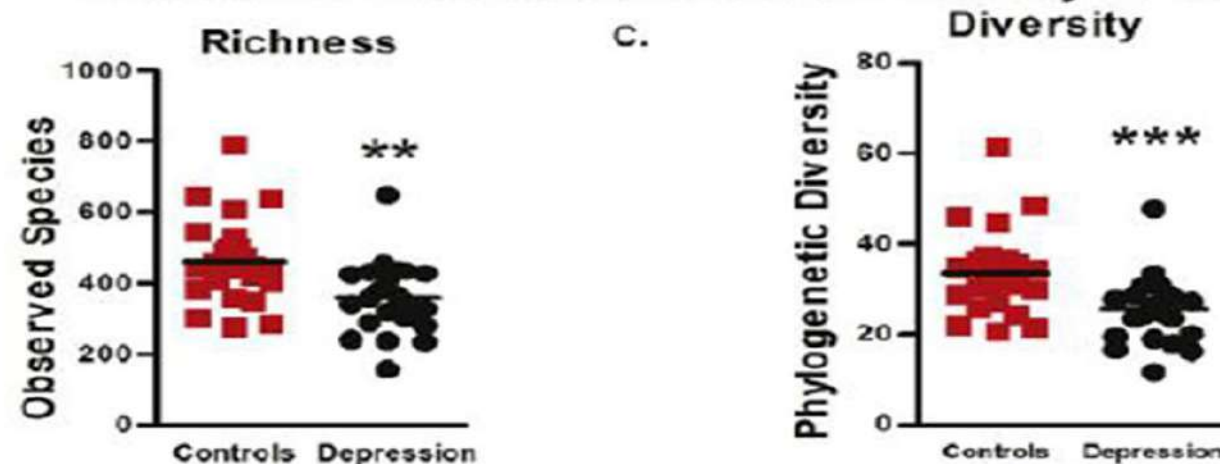
MICROBIOTA ASSOCIATO A DEPRESSIONE ED EFFETTO DEL SUO TRAPIANTO RATTI

Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat



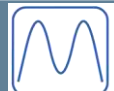
John R. Kelly ^{a,b}, Yuliya Borre ^a, Ciaran O' Brien ^{a,c}, Elaine Patterson ^{a,c}, Sahar El Aidy ^{a,d}, Jennifer Deane ^c, Paul J. Kennedy ^a, Sasja Beers ^a, Karen Scott ^a, Gerard Moloney ^a, Alan E. Hoban ^a, Lucinda Scott ^b, Patrick Fitzgerald ^a, Paul Ross ^c, Catherine Stanton ^c, Gerard Clarke ^{a,b}, John F. Cryan ^{a,c}, Timothy G. Dinan ^{a,b,e}

Altered Microbiota Richness & Diversity in Depression

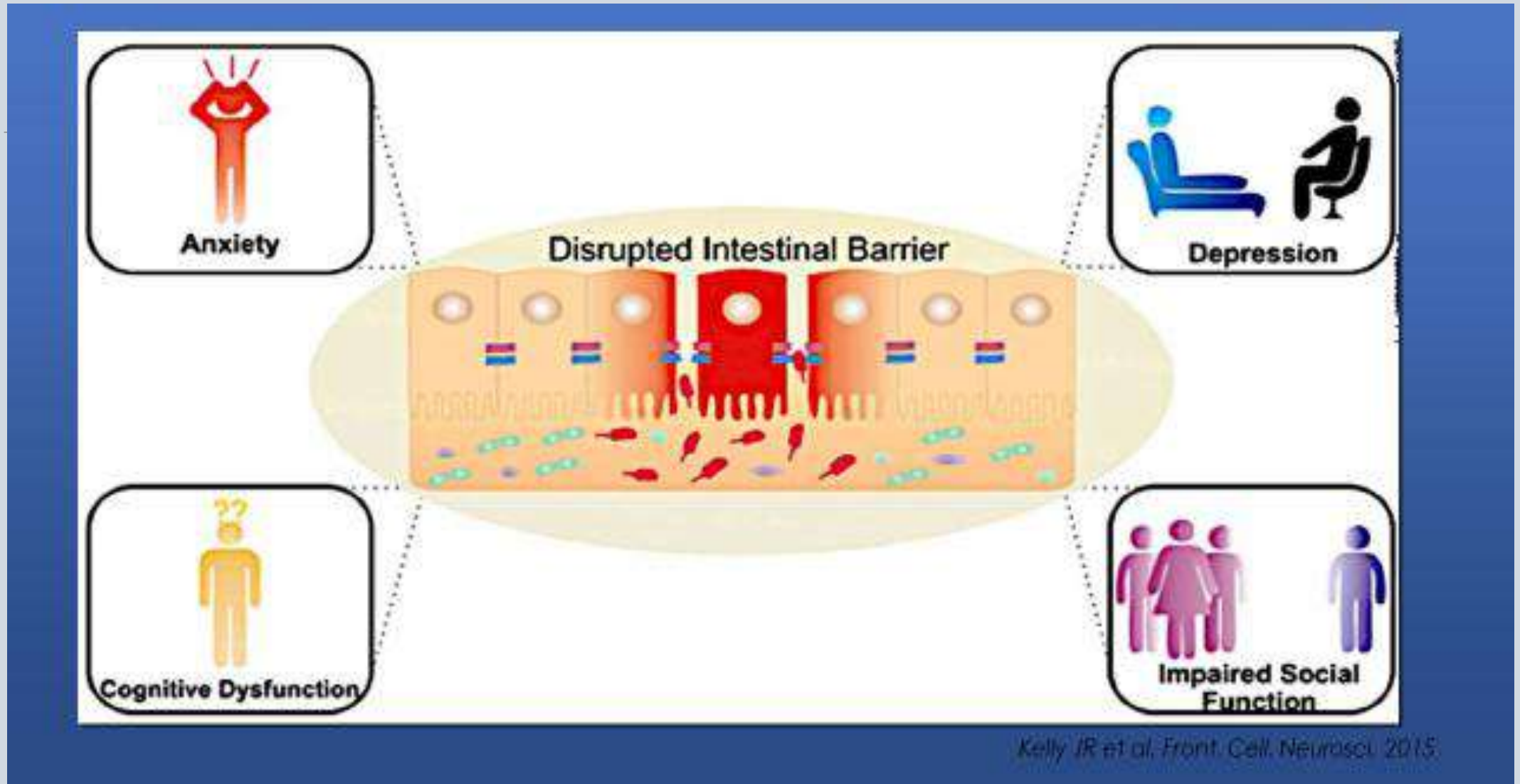


Il trapianto di microbiota fecale dal paziente depresso al ratto microbiota-depleto induce modificazioni comportamentali simil-depressive, compresa anedonia e ansia, nonché alterazioni nel metabolismo del triptofano

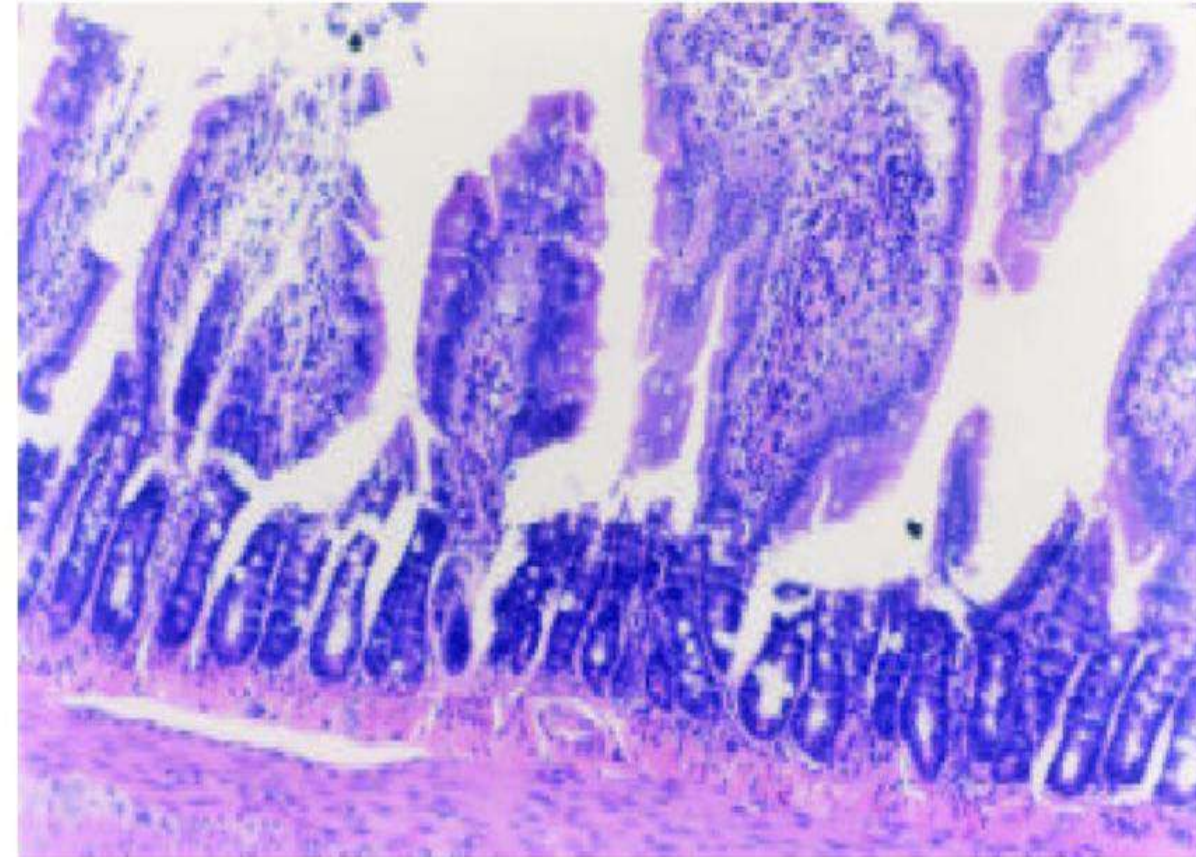
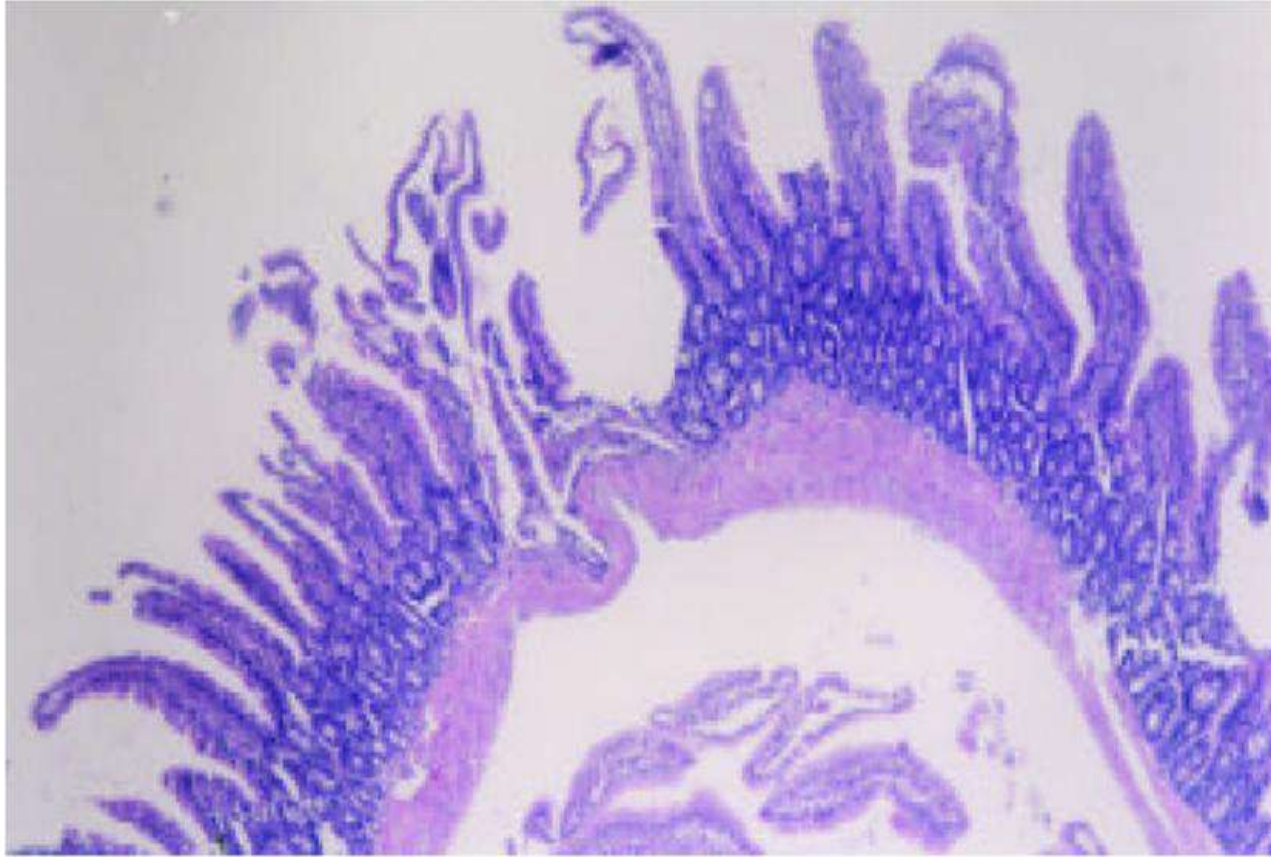
Kelly et al, J Psychiatr Res 2016;82:109-18



Leaky gut e potenziali conseguenze neuropsichiatriche



Trauma cranico e danno intestinale



World J Gastroenterol. 2003 Dec Alterations of intestinal mucosa structure and barrier function following traumatic brain injury in rats Chun-Hua H

I TESTS DIAGNOSTICI PER LO STUDIO DEL MICROBIOTA AD OGGI CI SONO REALMENTE UTILI NELLA CLINICA QUOTIDIANA?

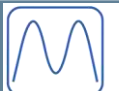


I TESTS DI METAGENOMICA SONO VALIDATI DA UN PUNTO DI VISTA METODOLOGICO MA POCO UTILI NELLA PRATICA CLINICA QUOTIDIANA

DOVREBBERO RIMANERE NELL'AMBITO DI UNA PROGETTUALITA' DI RICERCA AVANZATA.

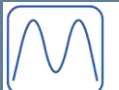
Se trovo troppo poca AKKERMANSIA o PREVOTELLA o FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII (meraviglioso batterio) che cosa faccio con i pochi probiotici a mia disposizione?

C'è il bisogno disperato del medico di avere un esame che lo aiuti ad impostare una terapia ma per l'intestino ad oggi è una pura utopia, abbiamo pochi batteri da utilizzare.



METODICHE A CONFRONTO: TEST DI GENOMICA – TEST DISBIOSI

- ◆ **Ci serve realmente conoscere il nome di 400-500 specie batteriche? Come modularle? Oggi molte mappe metagenomiche non sono validate in futuro sì. Utili in ambito di progettualità e ricerca.**
- ◆ **Lo studio della genomica batterica allo stato dell'arte per la nostra pratica clinica quotidiana è utile?**
- ◆ **La genomica è utile per la ricerca per indagini su molte patologie come Autismo, Sclerosi Multipla(leaky brain syndrome), Artrite Reumatide, IBD ...**
- ◆ **Costi delle metodiche**



OBIETTIVI PROSSIMI FUTURI

- ◆ **Avere uno strumento affidabile e snello per fare verifiche sulle nostre terapie.**
- ◆ **Avere uno strumento che ci sia di aiuto per lavori scientifici di conferma della validità del nostro approccio di Medicina di Segnale**
- ◆ **Avere un valido strumento di aiuto nei casi difficili e complessi**



Disbiosi FecalCandiTest

(DFC-CheckTest™)



Ranfi Diagnostics®

Innovative Molecular Testing For Life

Disbiosi Fecal CandiTest



TEST PER VALUTARE LA DISBIOSI

Disbiosi Fecal-CandiTest (DFC-CheckTest™)

RICERCA Lieviti, Muffe, Funghi, Lattobacilli, Bifidobacterium in campioni Fecali

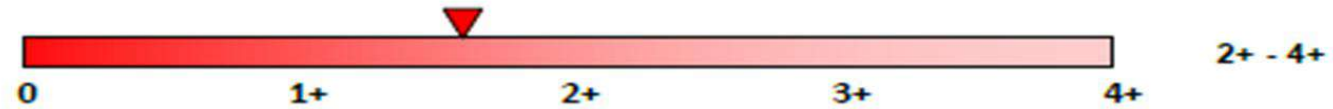
ANALISI RICHIESTA

RISULTATO

V.N. INDEX C.B.

FLORA SAPROFITICA BATTERI BENEFICI Metodo: Colturale

*Lactobacillus species**
(*Firmicutes*)



2+ - 4+

Escherichia coli
(*Proteobacteriae*)



2+ - 4+

Bifidobacterium
(*Actinobacteria*)



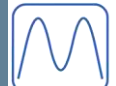
3+ - 4+

Microbiologia

I marcatori in questa sezione riflettono lo stato batteriologico dell'intestino.

Batteri benefici

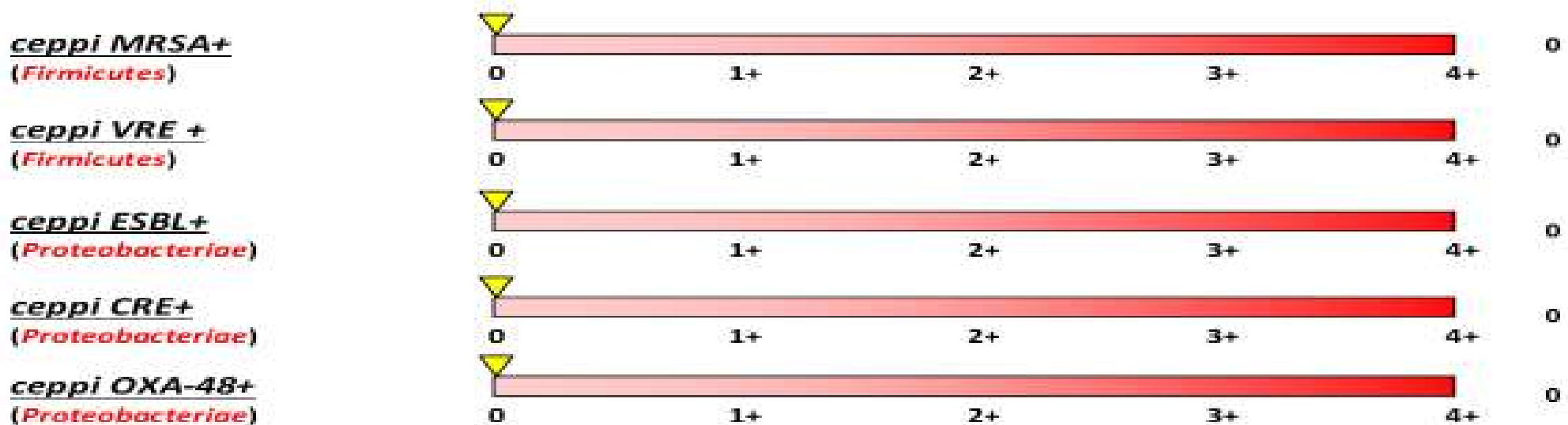
La flora benefica controlla potenzialmente organismi patogeni, influenza la produzione di nutrienti, rimuove tossine dall'intestino e stimola il sistema immunitario intestinale (GALT). La composizione della flora del colon è influenzata da dieta, tempo di transito, pH delle feci, età, interazioni microbiche, colon disponibilità di nutrienti, acidi biliari, solfato e capacità dei microbi per metabolizzare questi substrati. Idealmente, i livelli di Lactobacilli* (*L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. bulgaris*, *L. indicus*, *L. sakei*, *L. lactis*) ed *E. coli* dovrebbero essere 2+ (INDEX crescita colonie) o più. I Bifidobatteri essendo un anaerobo predominante dovrebbe essere recuperato a livelli di 4+.



VALUTAZIONE CEPPI BATTERI ANTIBIOTICO RESISTENTI

INDEX MICROBIOTA RESISTENZA ANTIBIOTICI Metodo: Colturale

V.N. INDEX C.B.



NOTA: L'utilizzo di terreni selettivi permette di individuare ceppi antibiotico resistenti. Utile nel monitorare eventuali abusi o prolungate terapie antibiotiche.

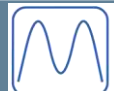
MRSA (ceppo *Stafilococcus aureus* (G+) meticillino/oxacillina-resistente)

VRE (ceppi *Enterococcus* (G+) vancomicina-resistente. In questo caso si identificano *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*)

ESBL (ceppi *Enterobacteriaceae* (G-) β -lattamasi+. In questo caso si identificano ceppi *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*).

CRE (ceppi *Enterobacteriaceae* (G-) carbapenemi-resistenti. In questo caso si identificano ceppi *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*).

OXA-48 (ceppi *Enterobacteriaceae* (G-) produttori di carbapenemasi. In questo caso si identificano ceppi *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*).



Sugar Intestinal Fermentation Test

Test Fermentazione Zuccheri Intestinali
(**SIFT**-Sugar Intestinal Fermentation Test)
CHECK TEST™



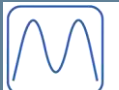
CLASSIFICAZIONE ZUCCHERI

- ◇ **Monosaccaridi**(problema del tenue)
- ◇ **Disaccaridi**(problema del tenue)
- ◇ **Polisaccaridi**
- ◇ **Alditoli** : sono dei [polioli](#) prodotti per [riduzione](#) di [zuccheri](#).

Possono derivare sia [monosaccaridi](#) sia [disaccaridi](#), [aldosi](#) o [chetosi](#), per riduzione del [gruppo aldeidico](#) o [carbonilico](#).

Sono sostanze dotate di sapore dolce e non [tossiche](#). Possono essere estratte da fonti vegetali ([frutti](#) e [bacche](#)) ma industrialmente vengono prodotti per [sintesi](#).

Polioli (zuccheri alcolici)



Presentazione del Test

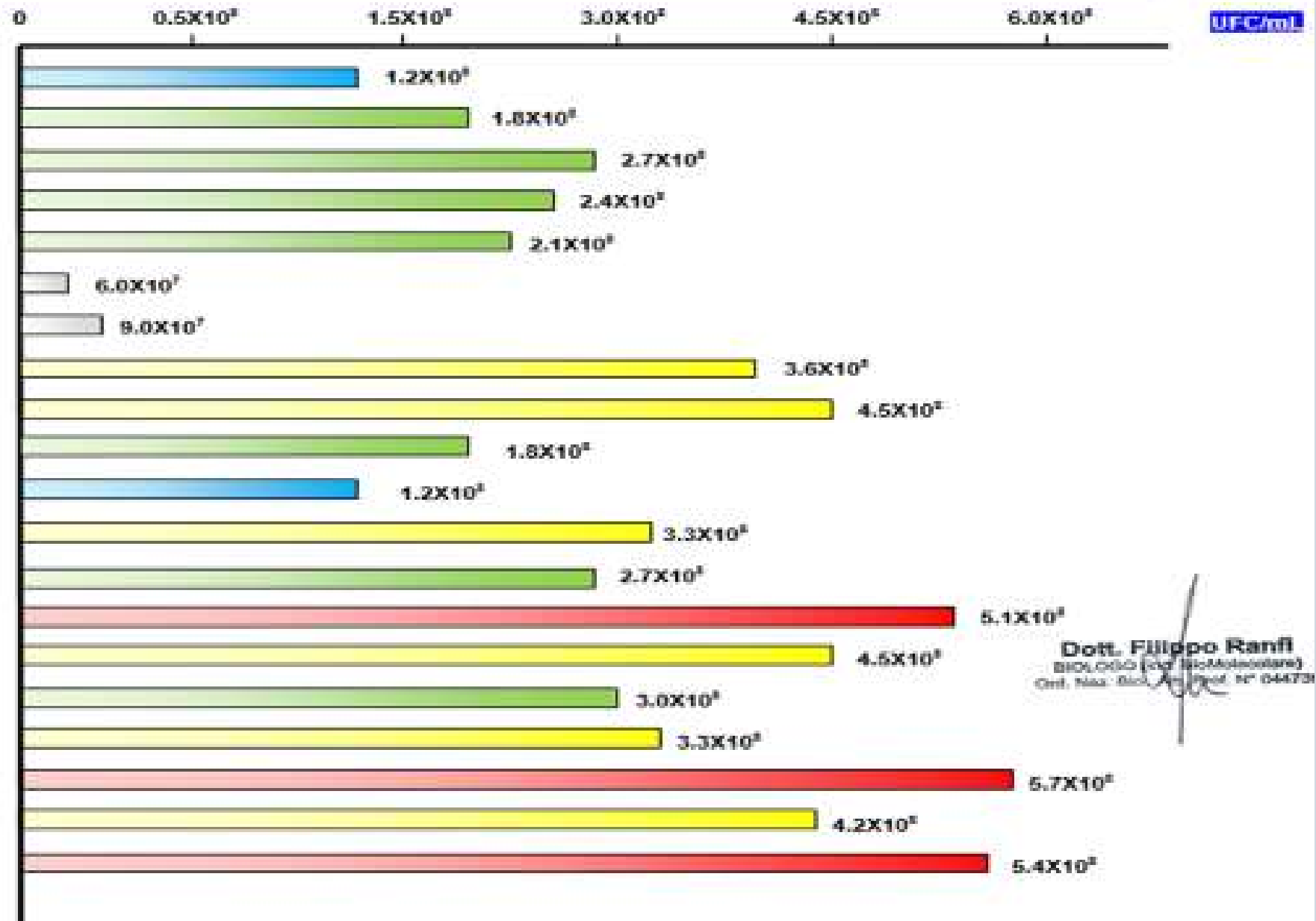
SIFT-Sugar Intestinal Fermentation Test CHECK TEST™ è un test ideato e messo a punto dal Dott. Ranfi Filippo, Biologo Molecolare-Immunologo, che fa parte di una serie di analisi multilevel del ***RD-Gastrointestinal Comprehensive Digestive Stool Analysis CHECK TEST™ (RD-GI-CDSA)***.



In rapporto alla loro complessità vengono classificati in:

| | |
|-----------------------|--|
| Monosaccaridi | Contengono da 3 a 9 atomi di carbonio e sono le strutture più semplici dei glucidi. I monosaccaridi di importanza biologica comprendono il glucosio , il fruttosio ed il galattosio . Il glucosio è scarsamente presente in natura a parte piccolissime quantità nella frutta e nella verdura. Il fruttosio è presente come tale nella frutta e nel miele. |
| Disaccaridi | Si possono considerare come l'unione di due molecole di monosaccaridi legati tra loro da legami glucosidici. I disaccaridi di importanza biologica comprendono il saccarosio, il lattosio e il maltosio. Il saccarosio è composto da glucosio e fruttosio e si trova nella frutta, specialmente nella barbabietola e nella canna, da cui viene estratto per produrre lo zucchero da tavola. Il lattosio è contenuto nel latte ed è formato da glucosio e galattosio. Il maltosio (glucosio e glucosio) deriva dalla fermentazione (o dalla digestione) dell'amido. |
| Oligosaccaridi | Il termine oligosaccaridi è usato generalmente per i composti formati da 3 a 10 monosaccaridi. Esso comprende zuccheri quali il raffinosisio, lo stachiosio ed il verbascosio non digeribili dall'uomo, composti da galattosio, glucosio e fruttosio e contenuti soprattutto nei legumi. La produzione di gas a seguito della fermentazione di questi zuccheri nell'intestino crasso spiega il meteorismo provocato soprattutto in alcuni soggetti dal consumo di prodotti leguminosi. |
| Polisaccaridi | Il termine polisaccaridi è usato generalmente per i composti formati da più di 10 monosaccaridi. |
| L'amido | Costituisce la riserva energetica del mondo vegetale. Le principali sorgenti di amido sono i cereali (pane, pasta, riso) e le patate. E' presente sotto forma di granuli a struttura semicristallina; la cottura dei cibi altera tale struttura (processo di gelatinizzazione), rendendo l'amido digeribile. Il raffreddamento dei cibi, che conduce a parziali fenomeni di ricristallizzazione dell'amido, ne riduce parzialmente la digeribilità. |
| Il glicogeno | E' di origine animale. Negli alimenti (carne, fegato) il suo contenuto tuttavia è privo di significato nutrizionale essendo presente in minime quantità: dopo la morte dell'animale il glicogeno a causa dell'anossia si trasforma in acido lattico. |

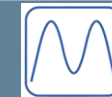
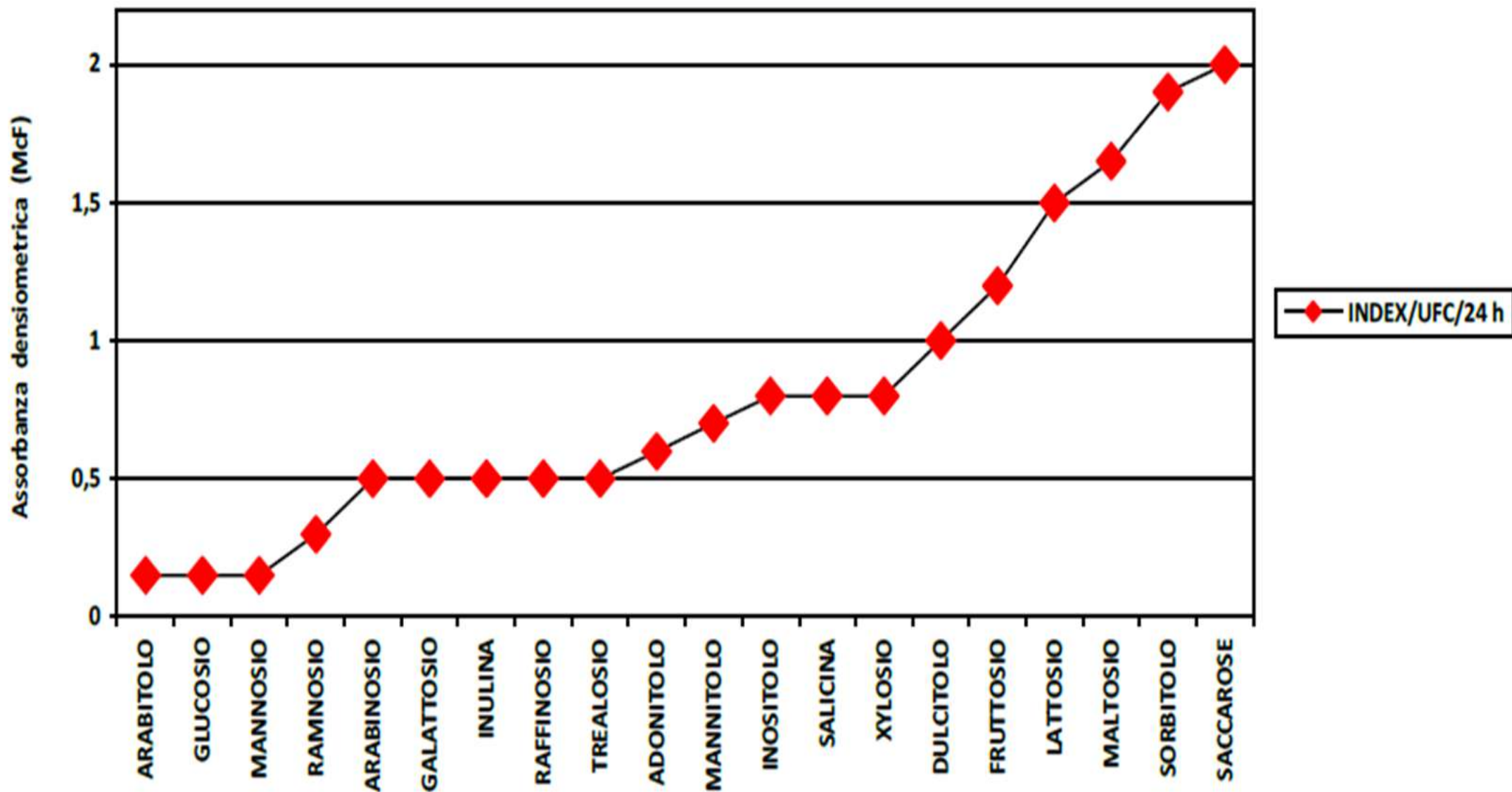
INDEX CRESCITA BATTERICA-FERMENTAZIONE ZUCCHERI



Dott. Filippo Ranfi
BIOLOGO (CDL Bio-Microbiologia)
Ord. Naz. Biol. Ag. (L. 15/01/02) N° 044731



GRAFICO: CINETICA DI CRESCITA BATTERICA



RISULTATI

Lo studio effettuato sulla cinetica di crescita batterica con substrati di zuccheri noti ha evidenziato una maggior fermentazione per **SORBITOL, XYLOSE e RHAMNOSE** (Monosaccaridi). Significativa anche la crescita per il metabolismo a carico del **TREHALOSE, INULIN e INOSITOL** (Disaccaride, Polisaccaride e Poliolo). Questi dati devono essere utilizzati per verificare sul paziente una stima di assunzione di questi zuccheri dalla dieta in corso o da alimenti quotidianamente consumati che li contengono in modo "nascosto". Attraverso una anamnesi accurata verificare e correlare eventualmente lo stato fisiologico del paziente. Nelle pagine seguenti è riportata una guida dove è possibile consultare le tabelle con le caratteristiche di tutti gli zuccheri testati, natura chimica, fonte alimentare ma soprattutto specificità fermentativa batterica.

La carica batterica del campione esaminato è stata stimata a **12×10^{10} batteri/gr. feci** (utile dato per eventuali successivi controlli).

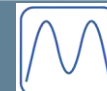
In base alle caratteristiche di questi zuccheri si potrebbe sospettare una **disbiosi di tipo fermentativa**.

Il Direttore
Dott. Filippo Ranfi

Fabrica di Roma 04/03/19

Dott. Filippo Ranfi
BIOLOGO (vcd. BioMolecolare)
Ord. Naz. Ric. Prof. N° 044739

Esame eseguito da
Dott. Filippo Ranfi
BIOLOGO MOLECOLARE-IMMUNOLOGO
Spec. Allergologia e Immunologia Clinica
Diagnostica Clinica di laboratorio



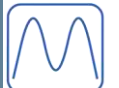
STUDIO MICROBIOTA

RICERCA LIEVITI, FUNGHI, MUFFE E ALGHE PATOGENI Metodo: Colturale

| | | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> * | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Cryptococcus neoformans</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida albicans</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Cryptococcus albidus</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida catenulata</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Cryptococcus laurentii</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida dubliniensis</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Cryptococcus luteolus</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida famata</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Cryptococcus terreus</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida glabrata</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida guilliermondii</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Cryptococcus gastricus</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida kefyr</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Rhodotorula glutinis</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida krusei</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Rhodotorula rubra</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida lambica</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Hansenula anomala</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida lusitanae</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Geotrichum candidum</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida parapsilosis</i> | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Blastoschizomyces capitalus</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Trichosporon capitatum</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida rugosa</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Trichosporon pullulans</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida tropicalis</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Aspergillus niger</i> *** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida stellatoidea</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Aspergillus brasiliensis</i> *** | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <i>Candida zeyanoides</i> ** | <input type="checkbox"/> Negativo | <i>Prototheca wickerhamii</i> ^ | <input type="checkbox"/> Negativo |

(LIEVITO)* - (FUNGHI)** - (MUFFE)*** - (ALGA)^

Dott. Filippo Ranfi
BIOLOGO (nd. BioMolecolare)
Ord. Naz. Biol. Prof. N° 044739



C.albicans



C.glabrata



C.gullierm.



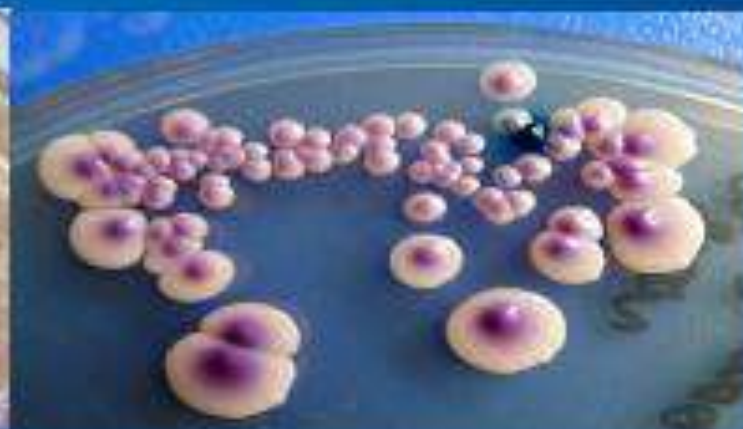
C.krusei



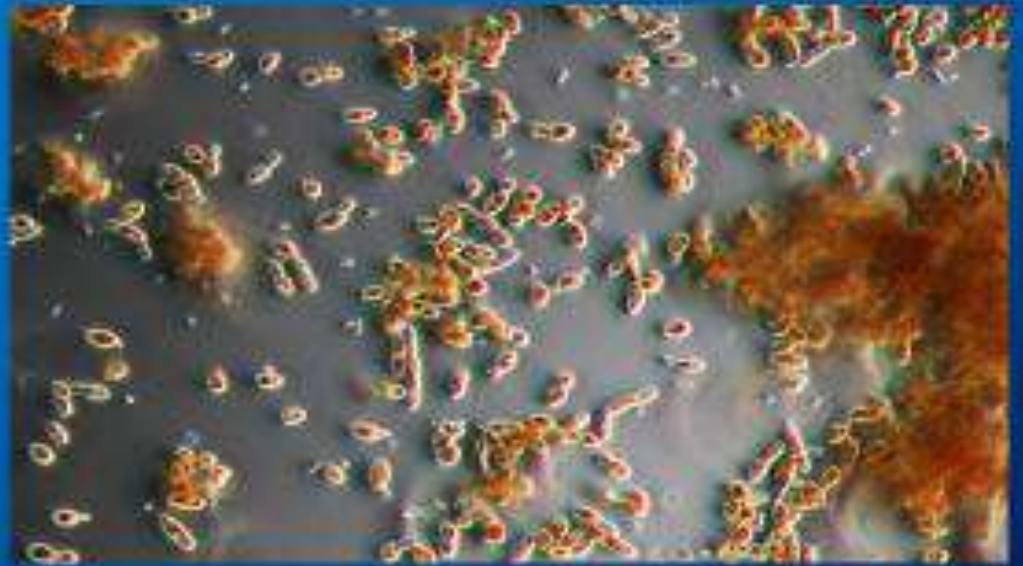
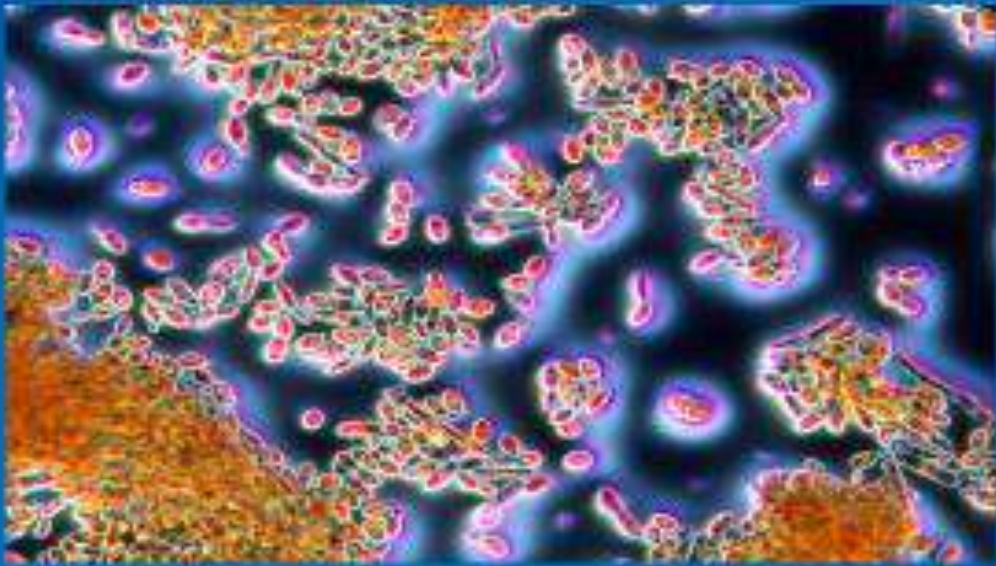
C.tropicalis



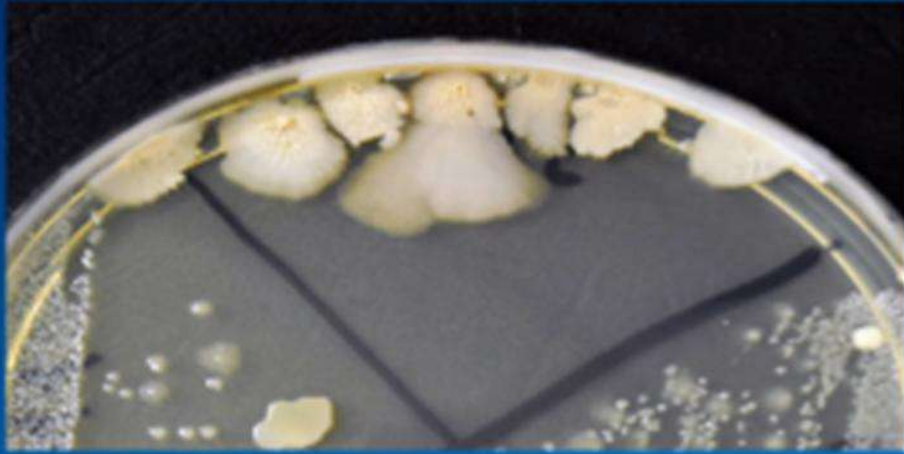
C.lusitaniae



Saccharomyces cerevisiae



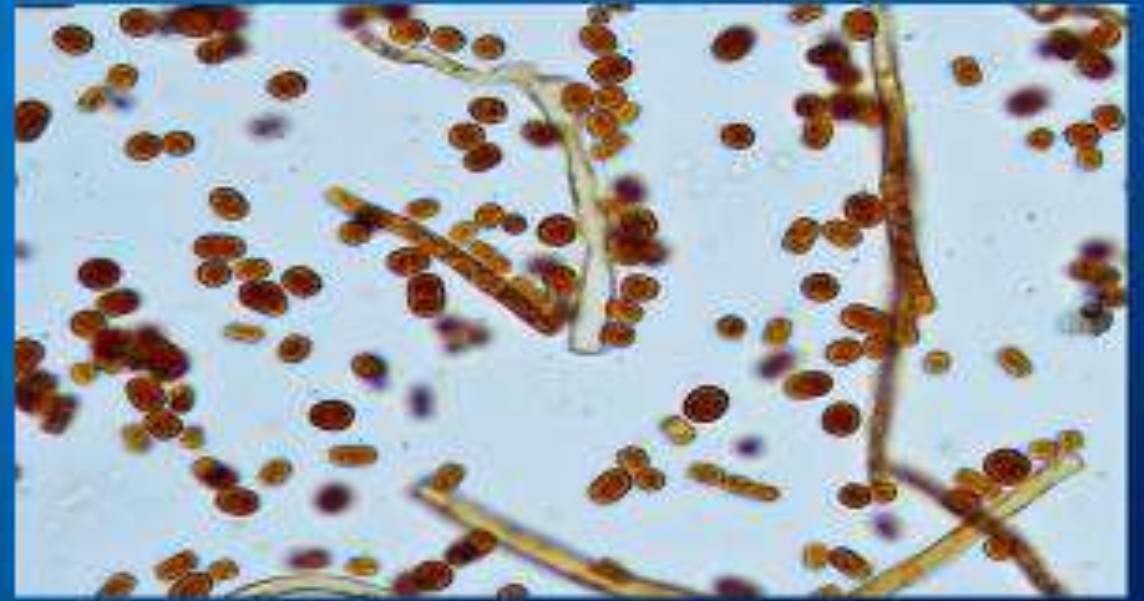
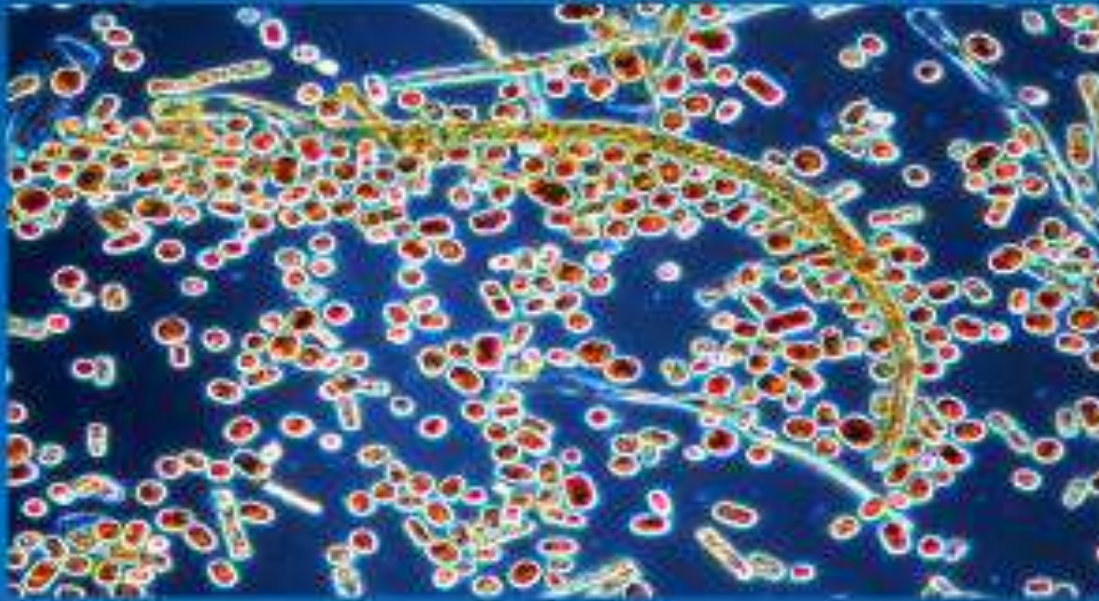
Tricosporon pullulans



Criptococcus terreus



Geotrichum candidum



ANTIMICOGRAMMA

- | | |
|-------------------|------|
| 1. Amphotericin B | S+++ |
| 2. Caspofungin | S++ |
| 3. Clotrimazole | S+ |
| 4. Econazole | S++ |
| 5. Fluconazole | S+ |
| 6. Flucytosine | R |
| 7. Griseofulvin | R |
| 8. Itraconazole | S++ |
| 9. Ketoconazole | S++ |
| 10. Metronidazole | S++ |
| 11. Miconazole | R |
| 12. Nystatin | S++ |
| 13. Posiconazole | S++ |
| 14. Voriconazole | S+++ |

Metodo: Kirby Bauer

Legenda (S=Sensibile, I=Intermedio, R=Resistente)

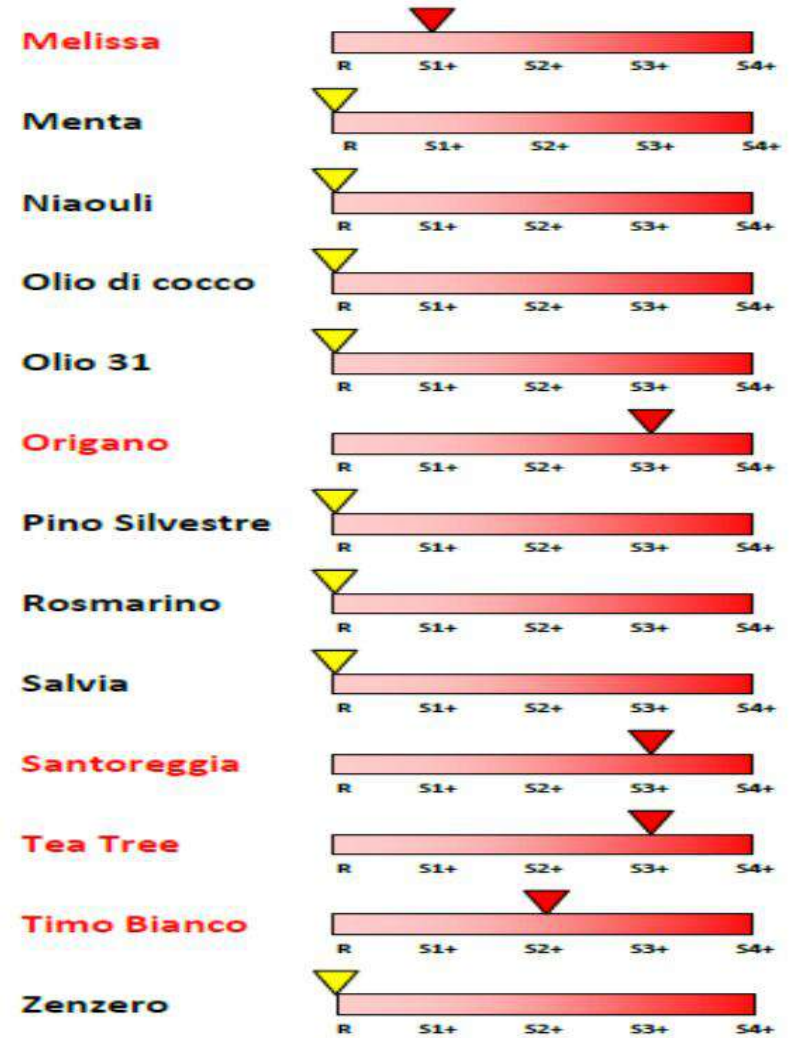
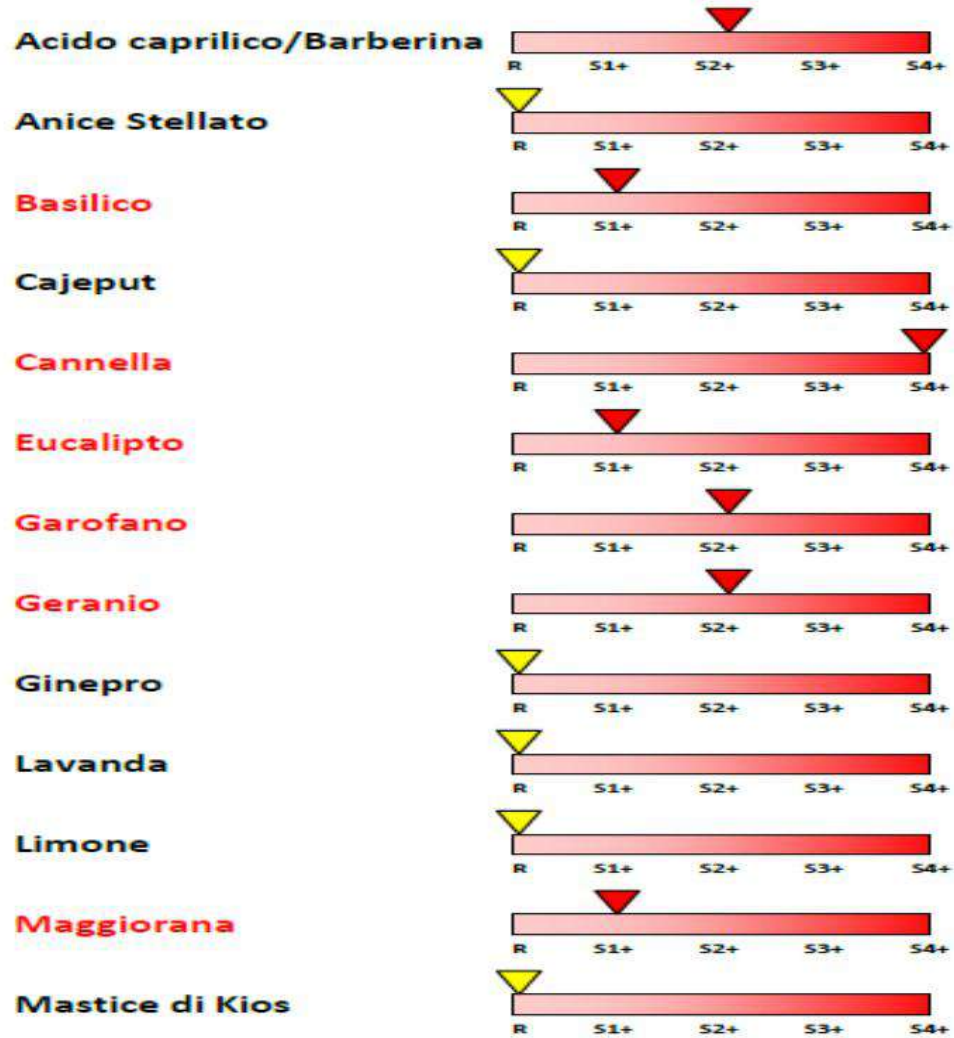


AROMATOGRAMMA

(metodo Kirby Bauer)



Microrganismo isolato e testato: *E.Coli*



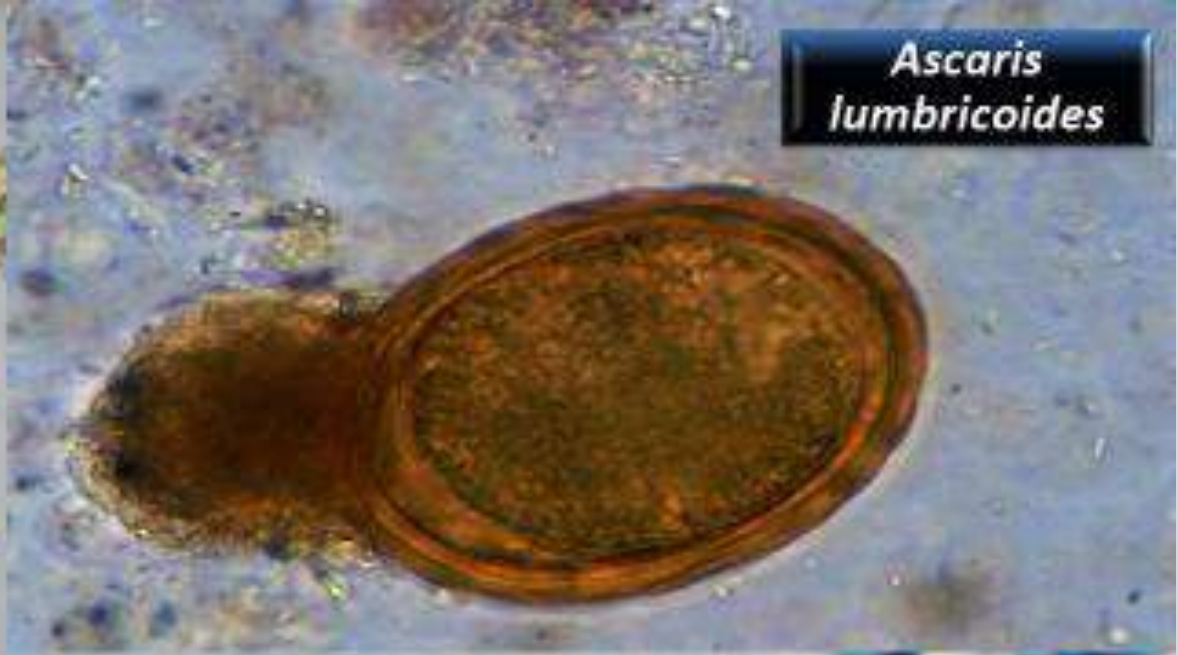
NOTA: L'aromatogramma è un esame effettuato in laboratorio per valutare la sensibilità di una specie batterica verso un determinato olio essenziale. Gli oli essenziali utilizzati in questo sistema sono puri e naturali al 100% e provengono da aziende certificate UNI EN 9001 e 14001 certificate da CERTIQUALITY. Legenda (S=Sensibile, R=Resistente).

Disbiosi-Parassiti Intestinali

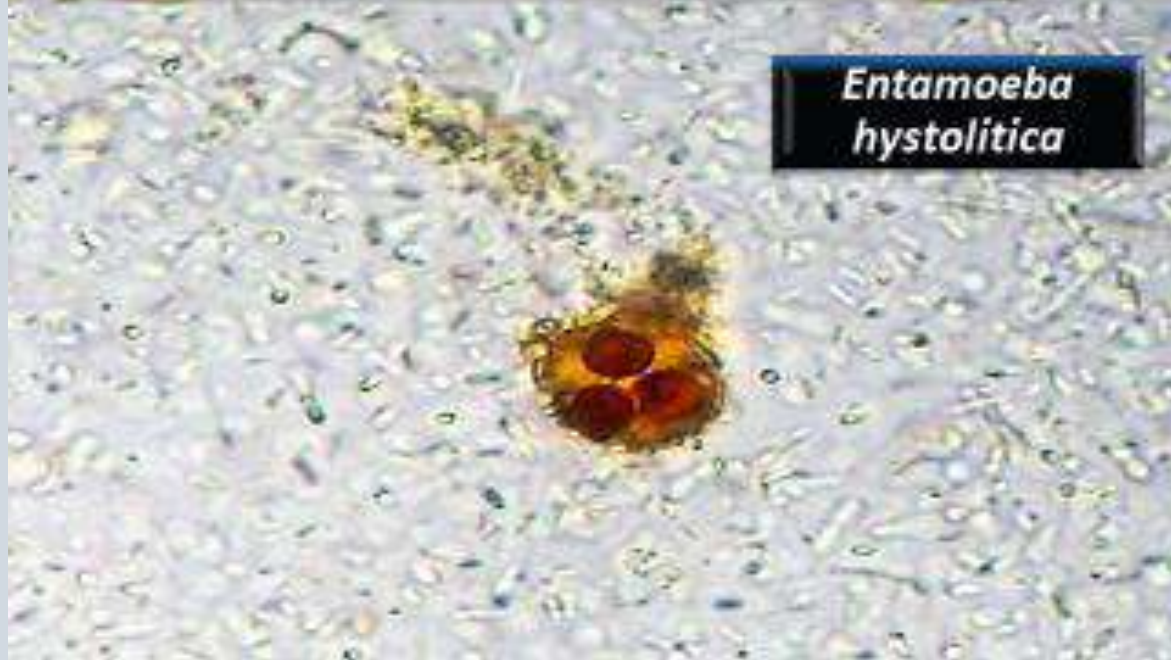




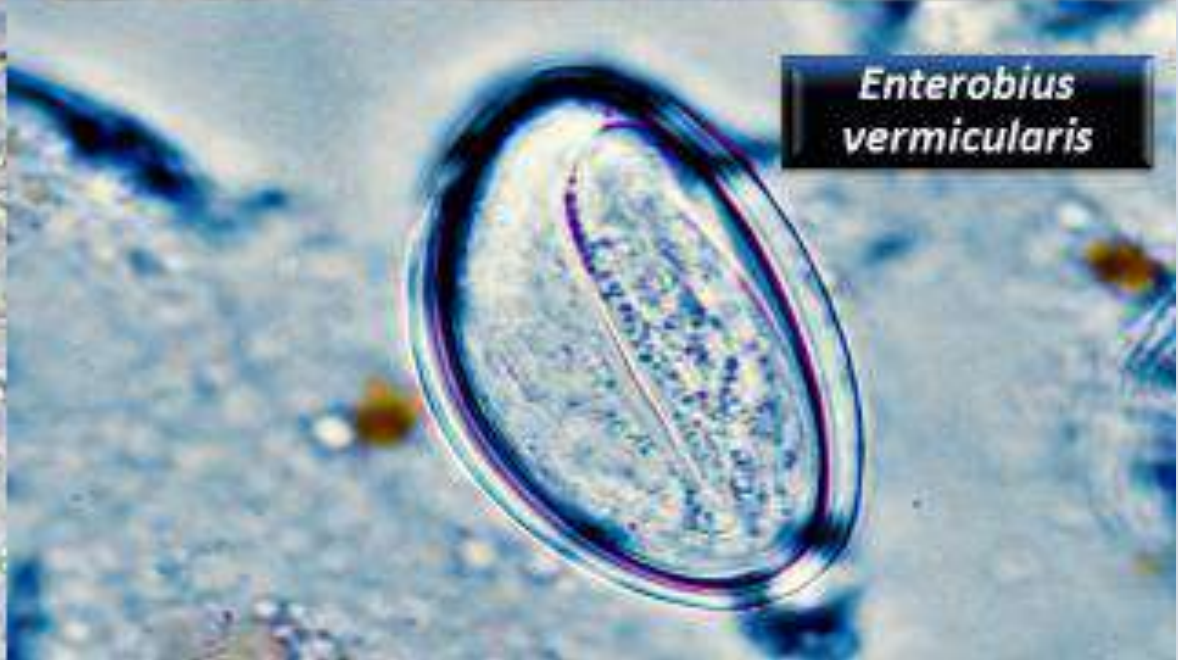
Giardia intestinalis



Ascaris lumbricoides



Entamoeba histolytica



Enterobius vermicularis

TIPI DI DISBIOSI

- ◆ **Disbiosi intestinale fermentativa** con un'accentuata flora batterica del tipo saccarolitico. Si riconosce dai sintomi come gonfiori addominali, flatulenza, diarrea alternata con stitichezza.
- ◆ **Disbiosi intestinale putrefattiva** con un'accentuata flora batterica di tipo proteolitico
- ◆ **Disbiosi intestinale da funghi** con eccessiva presenza di saccaromiceti come la Candida. Si riconosce da diarrea, astenia e prurito anale.
- ◆ In qualsiasi sia il tipo di **Disbiosi intestinale**, l'eccessiva presenza di batteri, induce l'attivazione del **sistema immunitario** che per difendere l'epitelio dell'intestino ne causa **l'infiammazione**.



VALUTAZIONE DISBIOSI INTESTINALE

◇ Lo studio **morfologico-microscopico** degli alimenti iniziato più di venti anni fa, mi ha permesso di comprendere le modalità con cui il corpo umano “**prepara, elabora, digerisce e assorbe gli alimenti**”. In molte **situazioni patologiche** gli alimenti ingeriti durante i pasti e “**mal digeriti**” si presentano con caratteristiche particolari. In questa fase oltre agli **enzimi** sono coinvolti i nostri **batteri**, che costituiscono in chiave moderna il **Microbiota Intestinale**. Utilizzando colorazioni particolari, e terreni di coltura specifici sono riuscito a osservare, caratterizzare e documentare numerose specie batteriche che sono coinvolte con il **metabolismo digestivo energetico**, come la ***Candida albicans, Clostridi, Stafilococchi, Streptococchi, Enterobacteriaceae, Lactobacilli, Bifidobatteri, Bacteroides***.

◇ I **batteri zucchero/saccarolitici** sono in genere i **Bifidobatteri, Lactobacilli, Batteroidi ed Eubatteri**.

◇ Così ho potuto identificare e classificare diversi tipi di **disbiosi intestinale** in base al **tipo di microrganismo** che ha preso il sopravvento sugli altri (**Dott. FILIPPO RANFI**)



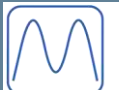
VALUTAZIONE DELLA LEAKY GUT

ZICKY Check'1 est™
Linea Immunology

ZICKY (Zonulina Immuno CytoKines) CHECK TEST™ **Valutazione Permeabilita' Intestinale - Leaky Gut Syndrome (LGS)**

| ANALISI RICHIESTA | RISULTATO | U.M. | VALORI RIFERIMENTO |
|--|-----------|-------|--------------------|
| ZONULINA <small>[quantitativo sierico metodo: ELISA]</small> | --- | ng/mL | <30 |
| TNF-α* <small>[quantitativo sierico metodo: ELISA]</small> | ---- | pg/mL | <40 |
| INF-γ** <small>[quantitativo sierico metodo: ELISA]</small> | ---- | ng/mL | <10 |
| TGF-β1*** <small>[quantitativo sierico metodo: ELISA]</small> | ---- | ng/mL | 20 - 70 |
| Interleuchina-6 (IL-6) <small>[quantitativo sierico metodo: ELISA]</small> | --- | pg/mL | <20 |
| Interleuchina-21 (IL-21) <small>[quantitativo sierico metodo: ELISA]</small> | ---- | pg/mL | <50 |

* (Tumor Necrosis Factor), ** (Interferon gamma), *** (Transforming growth factor-beta1),



VALUTAZIONE PERMEABILITA' INTESTINALE CHECK TEST™

Leaky Gut Syndrome (LGS)

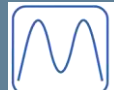
Dosaggio ZONULINA Plasmatica

| ANALISI RICHIESTA | RISULTATO | UNITA' | VALORI NORMALI |
|---|-----------|--------|----------------|
| ZONULINA (ZON) <small>(metodo EIA)</small> | 50 * | ng/ml | < 30 |

Dosaggio OCCLUDINA Plasmatica

| ANALISI RICHIESTA | RISULTATO | UNITA' | VALORI NORMALI |
|--|-----------|--------|----------------|
| OCCLUDINA (OCL) <small>(metodo EIA)</small> | 15.30 * | ng/ml | < 5 |

Dosaggio LPS Batterico



ZONULINA

La **zonulina** è una nuova **proteina umana** analoga alla tossina occludens della Zonula derivata dal *Vibrio cholerae* **che partecipa a giunzioni strette tra le cellule del muro**

del tubo digerente, si lega a un recettore specifico sulla superficie

dell'epitelio intestinale e **innesca una cascata di eventi biochimici che induce il**

disassemblaggio stretto della giunzione e un successivo aumento di permeabilità

dell'epitelio intestinale, permettendo ad alcune sostanze di passare attraverso e attivare le reazioni immunitarie.

Il dott. Fasano e i suoi collaboratori hanno scoperto che il sistema zonulin-zonulin-recettore è più attivo nella

celiachia e nei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1. I pazienti con celiachia attiva hanno mostrato livelli più alti di zonulina rispetto a pazienti non celiaci e pazienti in remissione, che seguivano una dieta priva di glutine. Inoltre, è

stato scoperto che **molte persone che soffrono di celiachia soffrono anche di altri disturbi che innescano altre malattie autoimmuni (es. Tiroidite di Hashimoto).** Molti studi clinici attuali suggeriscono che **l'aumento dei livelli di zonulina sia**

un fattore che contribuisce allo sviluppo della malattia celiaca e altri disordini autoimmuni come diabete insulino-dipendente, sclerosi multipla e artrite reumatoide.



OCCLUDINA

L'epitelio intestinale rappresenta la più ampia area del corpo a contatto con l'ambiente e, oltre a essere responsabile dell'assorbimento dei nutrienti, regola anche l'omeostasi di acqua e ioni e funge da barriera protettiva per impedire ai patogeni, che arrivano nel lume intestinale, di superare la barriera epiteliale e provocare infiammazioni della mucosa. In condizioni normali con lo strato epiteliale intatto, le cellule sono connesse da due principali tipi di giunzioni intercellulari, **le giunzioni serrate (tight junctions, TJ) e le giunzioni aderenti (adherens junctions, AJ)**, che controllano la permeabilità paracellulare attraverso gli spazi intercellulari. **Le TJ sono complessi multi-proteici costituiti da proteine integrali di membrana (claudine, occludine e molecole di adesione giunzionale) e proteine periferiche di membrana (zonula occludens).** Molti batteri alterano lo stato delle TJ probabilmente per favorire la loro crescita, pertanto **i livelli di occludina in circolo sono un indice che consente di avere informazioni circa lo stato funzionale della permeabilità della barriera intestinale.** I livelli plasmatici di Occludina sono indicativi della presenza o meno di alterazioni a livello delle giunzioni serrate (TJ) tra le cellule endoteliali.



LPS

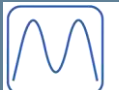
La permeabilità intestinale nei confronti dei Lipopolisaccaridi batterici (LPS), proinfiammatori e stimolanti l'Immunità innata, appare come uno dei trigger maggiori per l'espressione di Leaky Gut Sindrome LGS. **I LPS si trovano nella membrana esterna dei batteri Gram-negativi come i Proteobacteria (es. Escherichia coli) e svolgono il ruolo di endotossina. Nell'anziano si assiste molto di frequente ad una diminuzione di bifidobatteri e ad un aumento di batteri specialmente nel colon presentanti LPS. Questa combinazione si ritiene promuova una sempre maggiore permeabilità intestinale portando ad aumentare in modo considerevole i livelli plasmatici di LPS (costituendo una endotossiemia metabolica).**

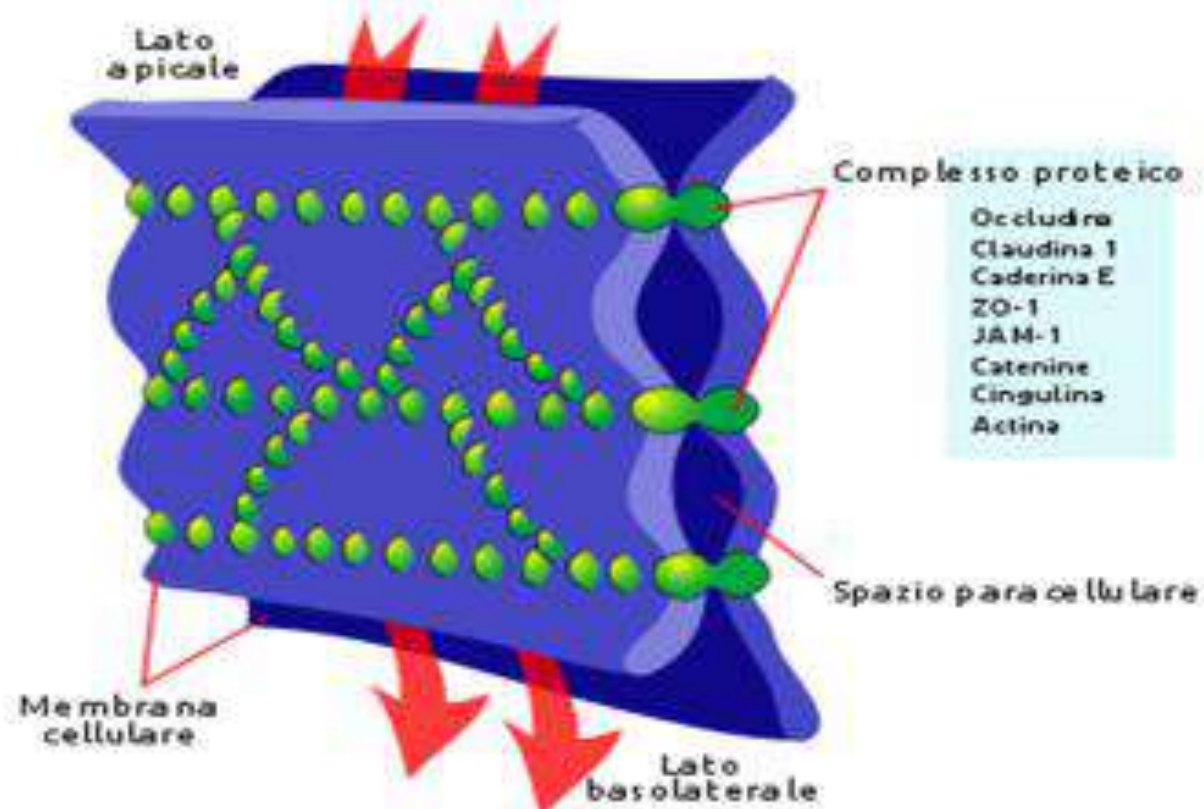
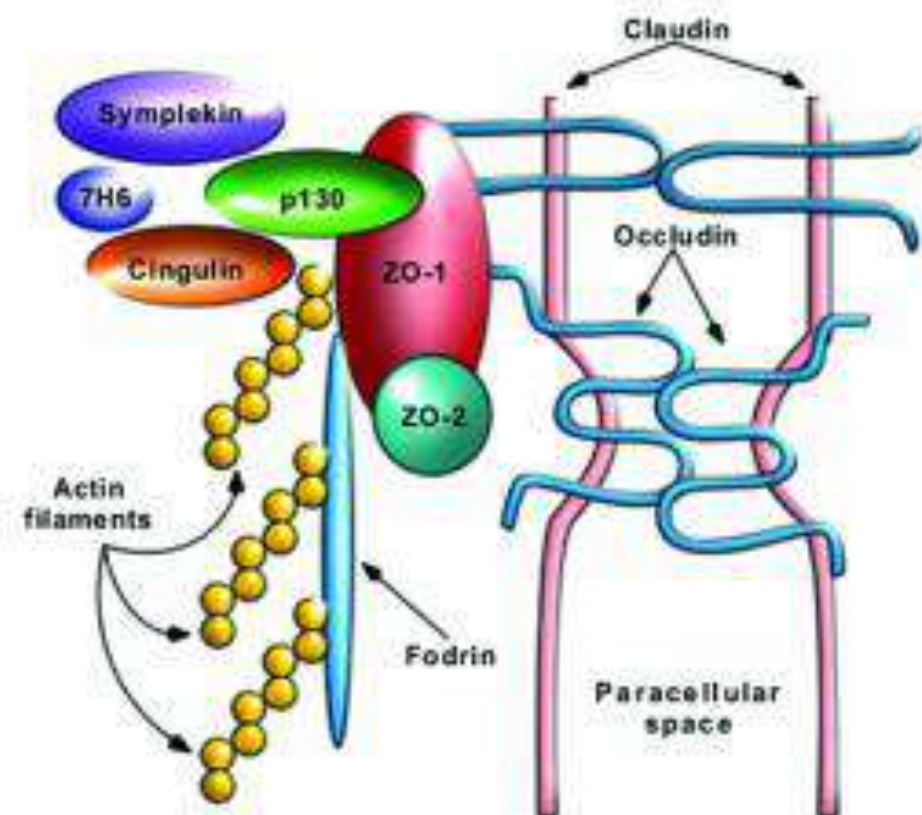
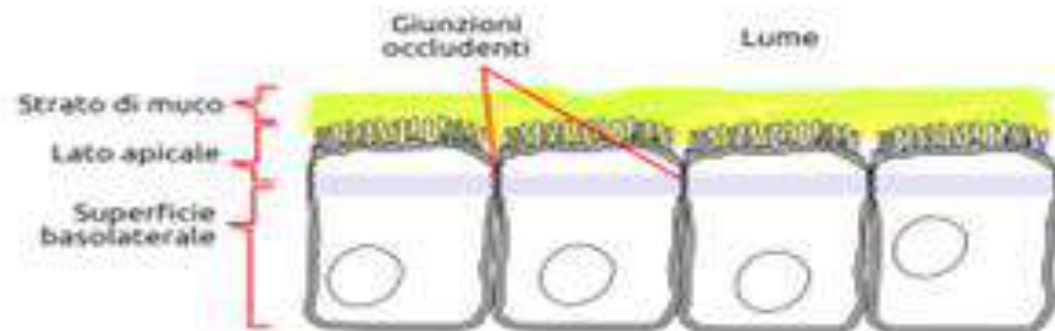
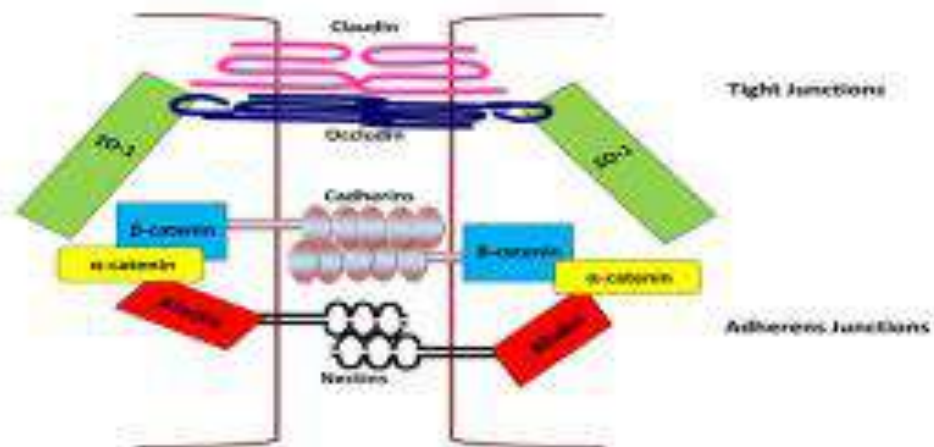


Gli ASCA (Anticorpi anti-Saccharomyces cerevisiae) sono anticorpi presenti e associati a processi infiammatori dell'intestino. Frequenti tra i pazienti affetti da malattia di Crohn (MC), presenti nel 40-70%, mentre sono solo presenti nel 10% dei pazienti con rettocolite ulcerosa (RCU) e in meno del 5% della popolazione di controllo. La specificità di questo test è molto elevata

Anticorpi anti- citoplasmatici dei neutrofili (**ANCA**) rappresentano un gruppo di autoanticorpi diretti verso componenti citoplasmatici del granulocito neutrofilo e monociti.

Si possono riscontrare anticorpi citoplasmatici (**cANCA**) e perinucleari (**pANCA**).







ADVANCED INTESTINAL BARRIER ASSESSMENT

Leaky Gut Syndrome (LGS)



Profilo Analisi Sangue

- Zonulina
- ZO-1
- Occludina
- Claudina-2
- E-Caderina
- F-Actina
- Calprotectina
- LPS

INTERPRETAZIONE ESAMI

ZONULINA : PARTE FUNZIONALE, PLASTICA,
REVERSIBILE

OCCLUDINA : INIZIA DANNO STRUTTURALE

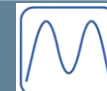
ACTINA : PRESENZA DI GRAVE DANNO STRUTTURALE

LPS : CONFERMA LA PRESENZA DI TRASLOCAZIONE ED
ENTITA' DEL DANNO

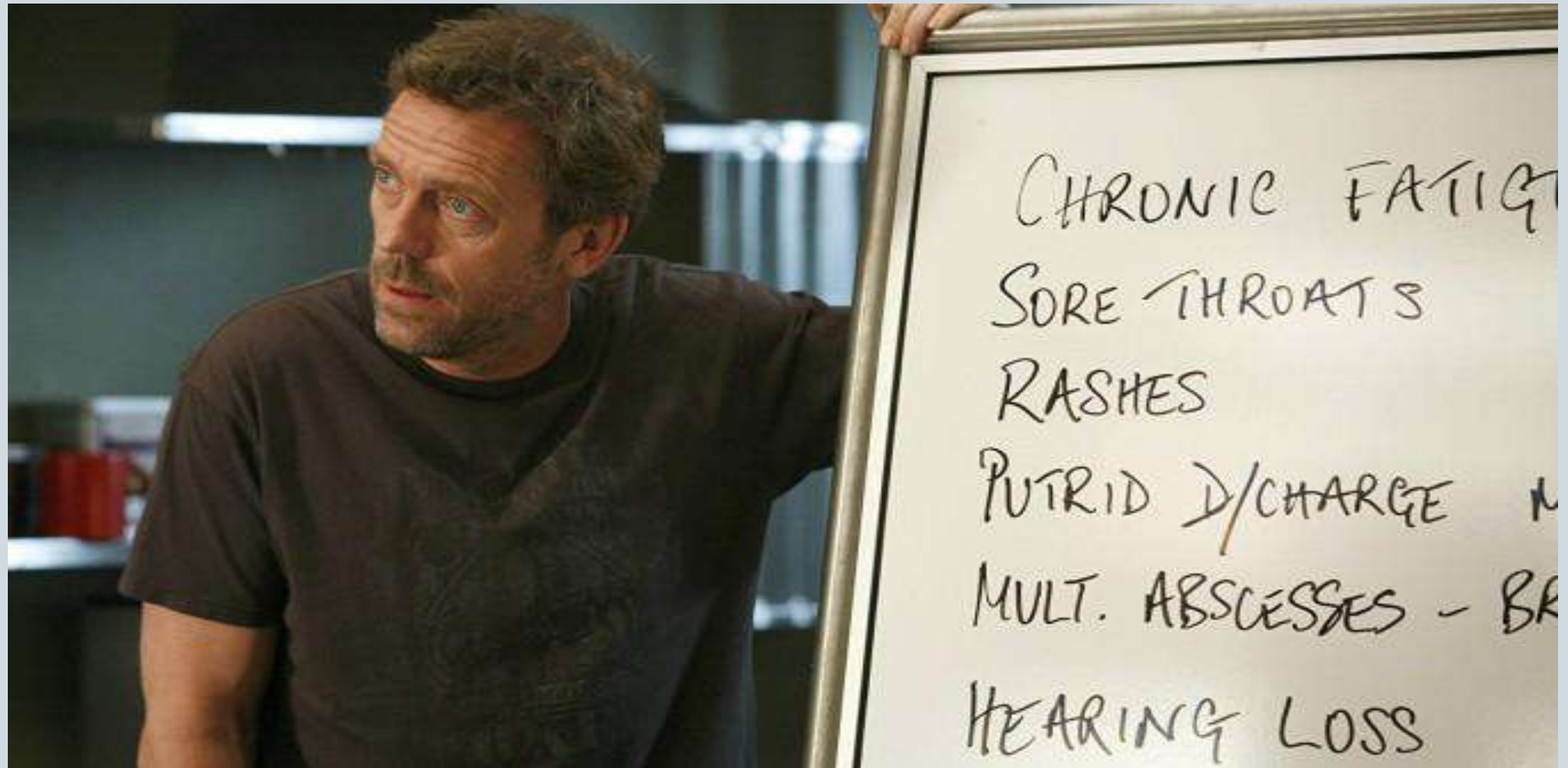


IL NOSTRO OBBIETTIVO

**AVERE UNO STRUMENTO DIAGNOSTICO
AFFIDABILE E DI SEMPLICE LETTURA UTILE NELLA
ATTIVITA' CLINICA QUOTIDIANA E CHE CI
PERMETTA DI CONFRONTARCI CON LA COMUNITA'
SCIENTIFICA CON DATI OBIETTIVABILI A
CONFORTO DELLA CLINICA PER POTER PORTARE
AVANTI LA FILOSOFIA VINCENTE DELLA MEDICINA
DI SEGNALE.**



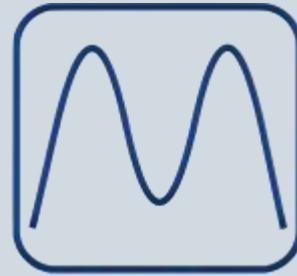
CASI CLINICI



Caso 1 : E.N. anni 25 femmina

- (079.4) INFEZIONI DA PAPPILLOMA VIRUS UMANO IN ALTRE MALATTIE TRATTATA (Attivo)
CON TERAPIA LOCALE E RISOLUZIONE (Nov 2019)
- (528.2) AFTOSI ORALE (Mag 2018) (Attivo)
- (307.51) BULIMIA CON VOMITING (2014) (Attivo)





Medicina di Segnale

Caso 2: G.C. anni 54 femmina

| | |
|---|----------|
| METEORISMO (2016) | (Attivo) |
| LINFOMA MALIGNO, TIPO LINFOPLASMOCITOIDE IMMUNOCITOMA LINFOMA NON HODGKIN EXTRANODUALRE (1988) | (Attivo) |
| BRONCHITE ACUTA (Ott 2018) | (Attivo) |
| CERVICALGIA DA COLPO DI FRUSTA (2016) | (Attivo) |
| BRONCHITE ACUTA (2016) | (Attivo) |
| POLMONITE (2014) | (Attivo) |
| REFLUSSO GASTROESOFAGEO (2014) | (Attivo) |
| MENOPAUSA PRECOCE (2007) | (Attivo) |
| MIOMA UTERINO (2006) | (Attivo) |
| APPENDICITE ACUTA (2006) | (Attivo) |
| METEORISMO (2000) | (Attivo) |
| HERPES ZOSTER (2000) | (Attivo) |
| LOMBOSCIATALGIA (2000) | (Attivo) |

Casi a Confronto

PAZIENTE

1

2

HLA DQ2-DQ8

DQ8+

NEGATIVO

Pannello Leaky Gut

Zonulina (<38 ng/ml)
ZO-1 (<8 ng/ml)
Occludina (<5 ng/ml)
Claudina-2 (<5 ng/ml)
E-Caderina (<10 ng/ml)
F-Actina (<10 ng/ml)
Calprotectina (<30 ng/ml)
LPS (<150 IU/L)

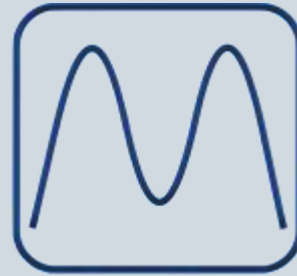
120 *
9,60 *
10,20 *
14,30 *
21,46 *
12,24 *
43,52 *
1143 *

10,61
1,03
2,54
0,60
6,27
0,10
1,50
31,80

Disbiosi Fecal Candi Test

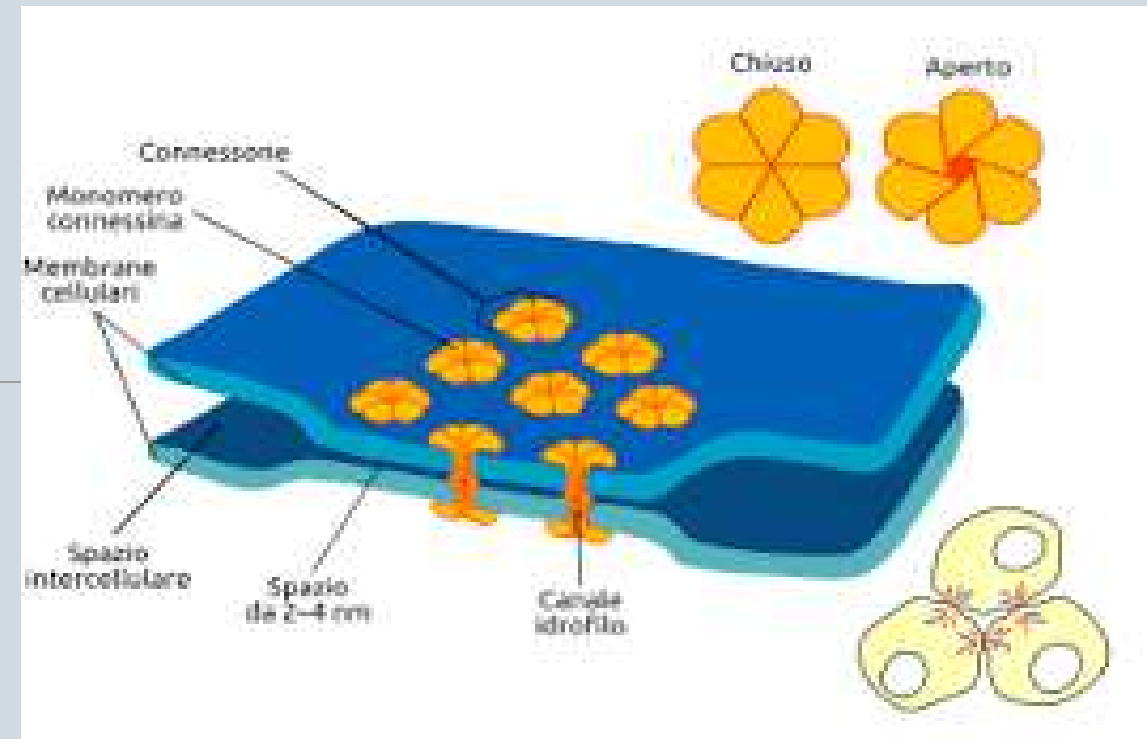
E.coli ↑
Clostridium spp. ↑
Bacteroides spp. ↑
Candida albicans+++
Bastocistis hominis+++

E.coli ↓
Clostridium spp. ↑
Enterococcus spp. ↑



Medicina di Segnale

Leaky gut versus ... «closed gut»



MARKERS FECALI

INFIAMMATORI

Calprotectina
Lactoferrina
PCR-reattiva
Fosfatasi Alcalina

GUT-BRAIN

Triptofano
Serotonina
GABA

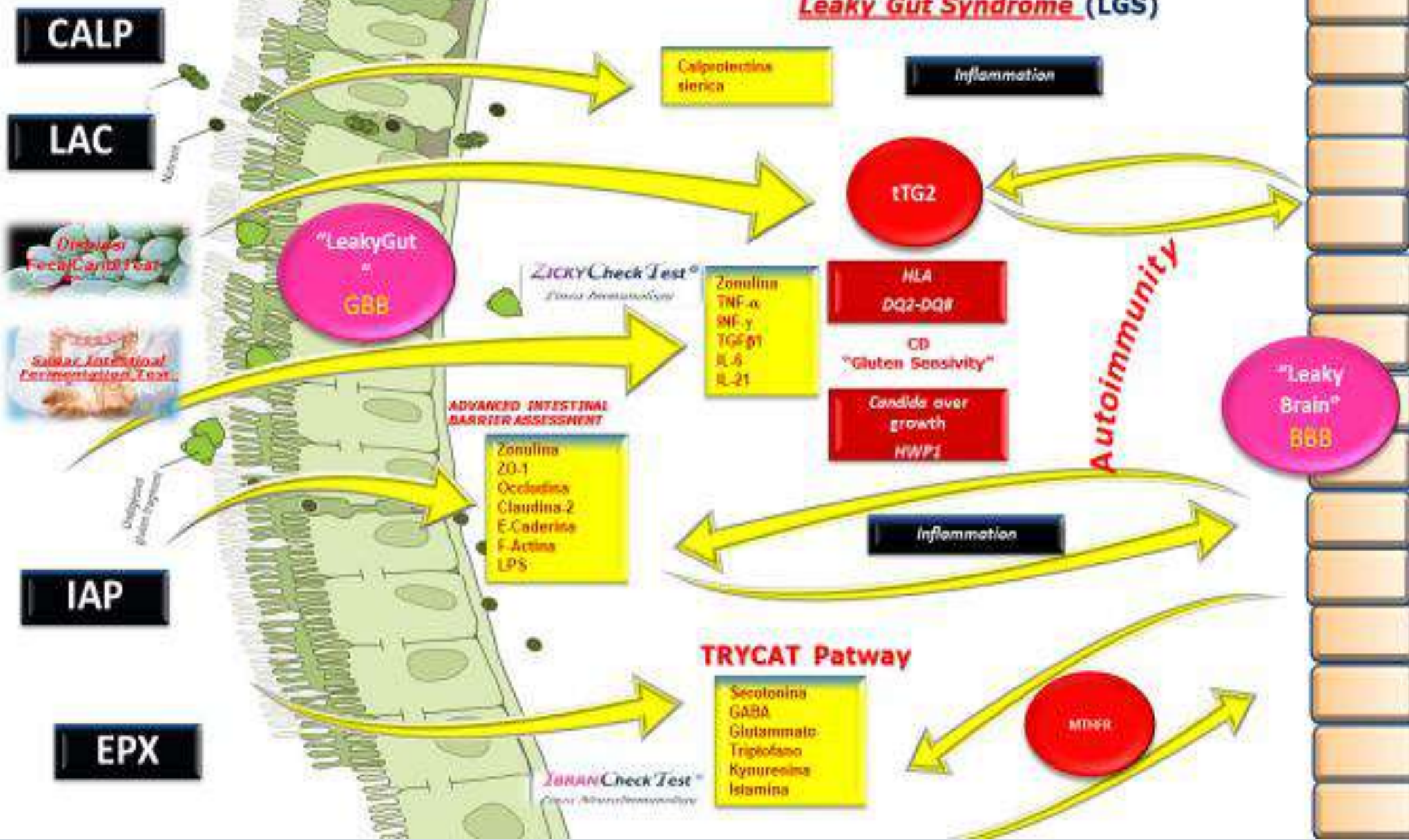
PERMEABILITA'

ZONULINA
Mucina-2 (MUC-2)
IgA secretorie

ALLERGIA

Eosinophil Protein X (EPX)
Istamina

Leaky Gut Syndrome (LGS)



IBRA IS BACK

PIANETA
MILAN.it

Naš test je najbolji
poput Grande Milan

