

Studio del microbiota intestinale di pazienti sottoposti ad Anastomosi Ileo-Pouch anale (IPAA)

Autori: Prof. Paolo Gionchetti & Dott. Marco Donati Sarti

La proctocolectomia con anastomosi Ileo-Pouch anale (IPAA) è l'intervento chirurgico di elezione nella Colite Ulcerosa (CU) refrattaria alla terapia medica o con riscontro di displasia, nei pazienti con poliposi familiare e in alcuni casi altamente selezionati di pazienti con colite di Crohn (MC) (Melton et al., 2008). L'infiammazione mucosale della pouch (Pouchite) è una complicanza presente nei soli pazienti con malattia infiammatoria. La sua incidenza può arrivare fino al 50% ed è caratterizzata da un aumento della frequenza delle evacuazioni, urgenza e tenesmo, sanguinamento e crampi addominali (Seril et al., 2014). In circa il 30% dei pazienti la pouchite definita come secondaria può essere associata ad episodi infettivi o all'utilizzo di terapie antinfiammatorie, tuttavia nella maggior parte dei pazienti non è possibile identificare l'eziologia di questa complicanza, che viene quindi classificata come idiopatica (McLaughlin et al., 2010). L'incidenza della Pouchite varia nei diversi studi in base al tipo di follow up utilizzato. Gli studi con follow up più aggressivo mostrano una incidenza del 37-40% nei primi 12 mesi dalla ricanalizzazione (Gionchetti et al., 2013, Stahlberg et al., 1996, Simchuk et al., 2000). In base alla risposta alla terapia la pouchite può definirsi sporadica (episodi ben controllati con la terapia antibiotica standard) o refrattaria (scarsa risposta alla terapia antibiotica standard).

La terapia di prima linea della pouchite idiopatica prevede l'utilizzo degli antibiotici, ciprofloxacina e metronidazolo da soli o in associazione tra di loro per le forme refrattarie. La terapia con probiotici (VSL#3) ad alto dosaggio è la terapia di prima linea nella prevenzione dell'esordio di pouchite. Questo suggerisce che la componente microbica potrebbe essere strettamente coinvolta nella sua patogenesi, tuttavia ad oggi non è stata identificata alcuna specie che possa essere ritenuta responsabile in maniera univoca dello sviluppo della Pouchite. La teoria ad oggi più accreditata è che una alterata composizione del microbiota luminale (disbiosi) possa contribuire allo sviluppo dell'infiammazione interagendo con il sistema immunitario innato ed adattativo in soggetti predisposti (Batista et al., 2014, Shen et al., 2012, Landy et al., 2012).

Gli studi condotti fino ad oggi hanno mostrato che esiste una marcata disbiosi nei pazienti con pouchite rispetto ai pazienti con pouch indenne, e che una diminuita biodiversità del microbiota può essere considerata un fattore di rischio per lo sviluppo della pouchite (McLaughlin et al., 2010).

Il microbiota intestinale dei pazienti operati tende a cambiare in maniera significativa già nei primi 2 mesi dall'operazione, con una predominanza di batteri anaerobi tipici del colon ed una diminuzione progressiva di specie prevalentemente ileali tra cui *Enterococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. (Frank et al., 2007, Willing et al., 2010). Uno studio longitudinale condotto su 21 pazienti con CU ha mostrato che la presenza di *Ruminococcus gnavus*, *Bacteroides vulgatus* e *C. perfringens*, e l'assenza di *Blautia* spp. and *Roseburia* spp. nelle feci raccolte prima dell'operazione potrebbe essere predittiva di pouchite (Frank et al., 2007, Tong et al., 2013). La pouchite acuta sembra essere associata ad un aumento di Clostridi, mentre quella cronica ad un aumento di *Staphylococcus aureus*, inoltre una diminuzione di Clostridi è stata associata alla risposta al trattamento farmacologico.

Gli studi condotti finora sui pazienti con IPAA indicano un potenziale coinvolgimento del microbiota luminale nella patogenesi e nella cronicizzazione dell'infiammazione della pouch. La disomogeneità degli studi condotti finora rende di difficile comprensione il processo fisiopatologico, soprattutto al fine di chiarire se esista la possibilità di prevedere e quindi prevenire outcome quali pouchite sporadica e pouchite refrattaria (Segal et al., 2018). Tale obiettivo può essere valutato mediante uno studio longitudinale che fornisca informazioni sull'evoluzione del microbiota

intestinale, a partire dal periodo pre-operatorio e durante il periodo post-operatorio, fino all'eventuale sviluppo di due principali outcome: (i) sporadica (ii) pouchite cronica refrattaria. L'obiettivo primario di questo studio era quello di caratterizzare l'evoluzione del microbiota intestinale di pazienti sottoposti ad intervento di anastomosi Ileo-Pouch anale a partire dall'intervento chirurgico fino al verificarsi di 2 principali outcome clinici: 1) pouchite sporadica, 2) pouchite cronica refrattaria ed identificare eventuali componenti del microbiota intestinale che possano essere utilizzati come fattori predittivi per i 2 outcome clinici. Per questo motivo sono stati arruolati 30 individui di sesso maschile e femminile, di età compresa tra i 18 e i 65 anni, affetti da Colite Ulcerosa sottoposti ad intervento di proctocolectomia con anastomosi Ileo-Pouch anale (IPAA). Ai pazienti è stato chiesto di consegnare un campione di feci a partire dalla prima visita dopo l'intervento chirurgico ed in occasione delle successive visite ambulatoriali che da pratica clinica vengono effettuate a cadenza trimestrale. La raccolta è stata effettuata per un periodo massimo di un anno. Sui campioni raccolti è stata effettuata la caratterizzazione filogenetica del microbiota intestinale mediante next-generation sequencing del gene 16S rRNA. Dei 30 pazienti arruolati, 17 hanno avuto episodi di pouchite sporadica entro i 12 mesi dall'arruolamento e 13 sono andati incontro a pouchite refrattaria. Tutti i pazienti sono riusciti a consegnare un campione di feci al momento dell'arruolamento, dopo tre mesi e sei mesi di follow up, mentre solo 9 pazienti con pouchite refrattaria e 11 con pouchite sporadica hanno consegnato tutti i campioni fecali previsti dallo studio.

Risultati:

Come mostrato in Fig.1, l'analisi del microbiota intestinale dei pazienti mostra un aumento della diversità microbica nel tempo (a 3 mesi) nei pazienti con pouchite sporadica, mentre nel microbiota dei pazienti con pouchite refrattaria non si verifica questo tipo di modifica. Diverse patologie, incluse le Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali, sono caratterizzate da una minore diversità microbica. A livello di famiglia (Fig.2) si riscontra una diminuzione nel tempo di bifidobacteriaceae nel gruppo di pazienti con pouchite refrattaria ed un aumento delle clostridiaceae, mentre nei pazienti con pouchite sporadica questi due taxa rimangono pressochè costanti nel tempo. L'analisi a livello di genere (Fig.3) conferma quanto osservato a livello di famiglia. I bifidobatteri sono considerati protettivi nell'ambito delle Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali, mentre i clostridi sono associati alle forme più gravi di malattia. Sebbene al T0 (basale) non si osservino differenze significative tra i due gruppi, i dati suggeriscono che il monitoraggio del microbiota intestinale nel tempo può essere predittivo di un peggiore outcome e che intervenire sul microbiota intestinale di questi pazienti già dopo 3 mesi dall'intervento potrebbe diminuire la probabilità di sviluppare pouchite refrattaria. Questa ipotesi è alla base di ulteriori studi di tipo interventistico che verranno effettuati presso il nostro centro.

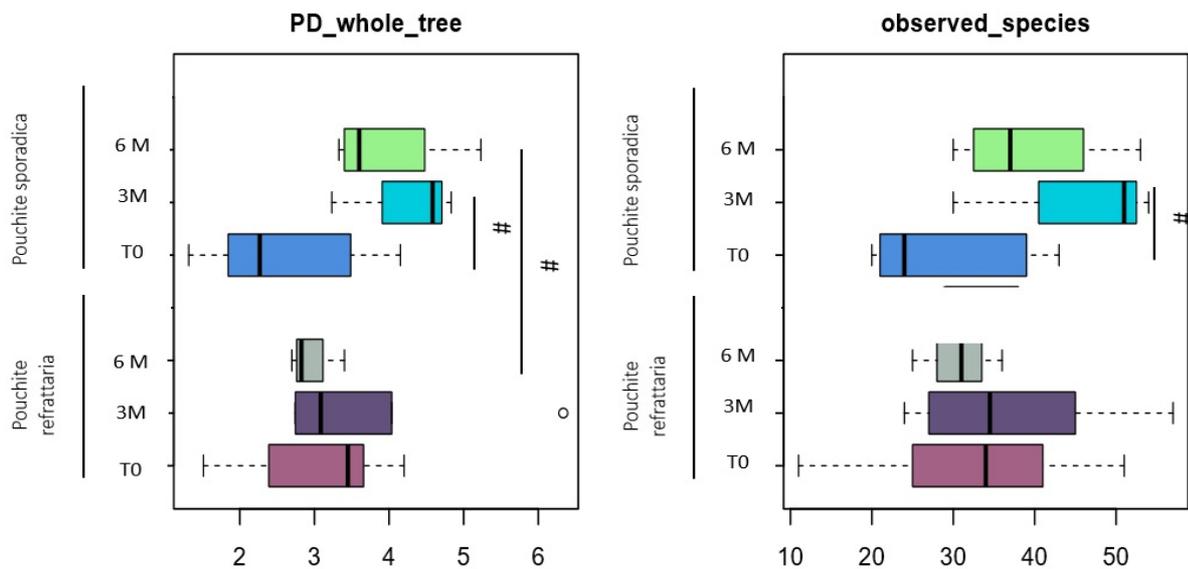


Fig. 1 Alpha diversity al basale (T0) e dopo 3 e 6 mesi dall'intervento chirurgico in pazienti con pouchite sporadica e refrattaria.

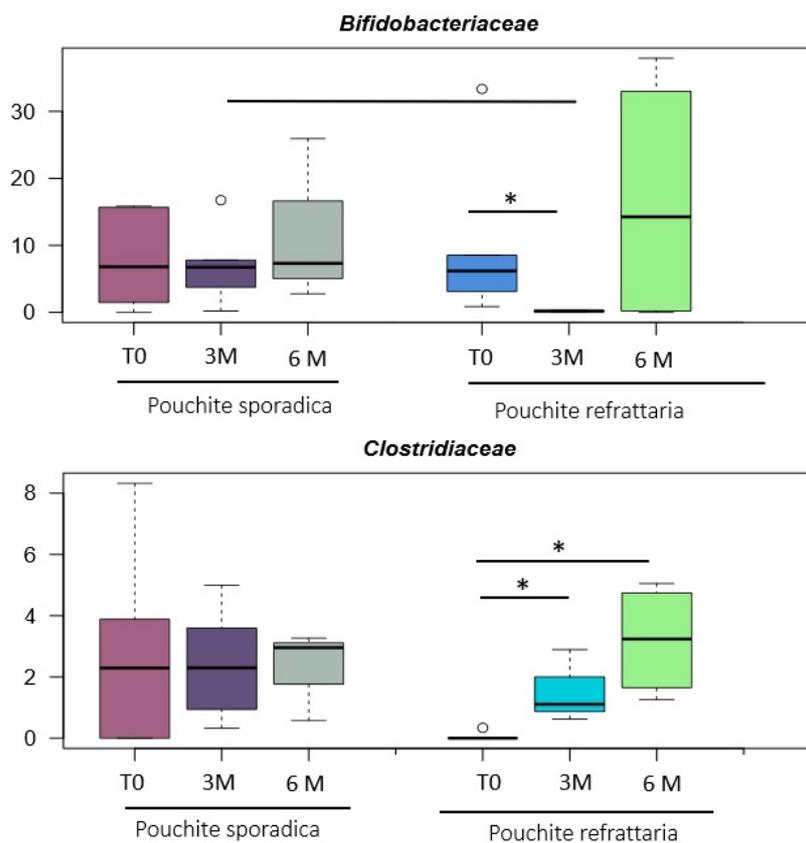


Fig. 2 Andamento temporale di Bifidobacteriaceae e Clostridiaceae al basale (T0) e dopo 3 e 6 mesi dall'intervento chirurgico in pazienti con pouchite sporadica e refrattaria.

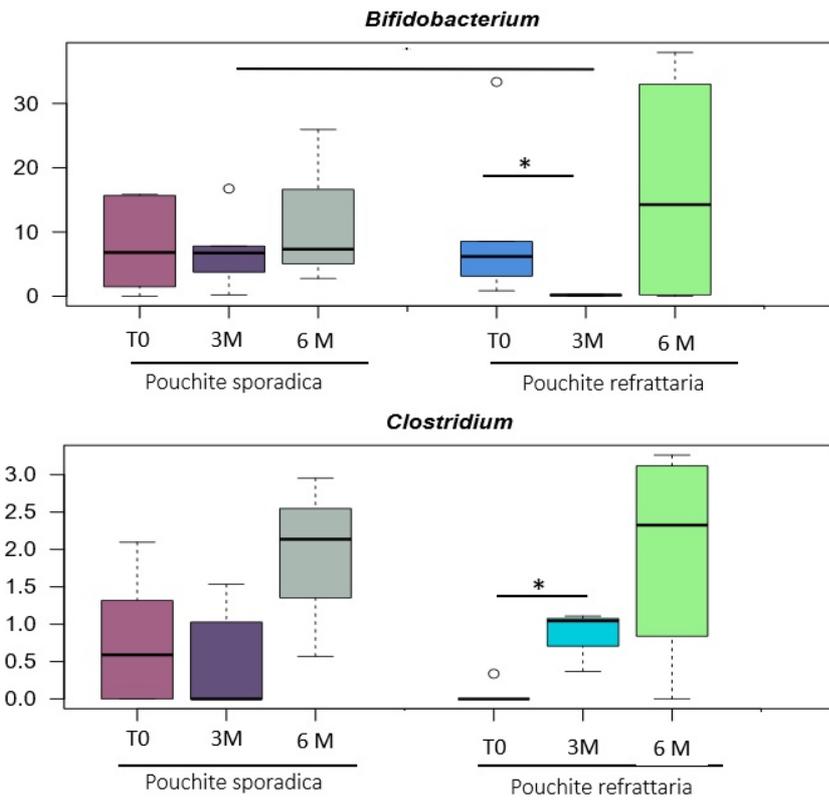


Fig.3 Andamento temporale di Bifidobacterium e Clostridium al basale (T0) e dopo 3 e 6 mesi dall'intervento chirurgico in pazienti con pouchite sporadica e refrattaria.

BIBLIOGRAFIA

Landy J, Al-Hassi HO, McLaughlin SD, Knight SC, Ciclitira PJ, Nicholls RJ, Clark SK, Hart AL. Etiology of pouchitis. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 1146-1155 [PMID: 22021180 DOI: 10.1002/

Barbara G, Scaioli E, Barbaro MR, Biagi E, Laghi L, Cremon C, Marasco G, Colecchia A, Picone G, Salfi N, Capozzi F, Brigidi P, Festi D. Gut microbiota, metabolome and immune signatures in patients with uncomplicated diverticular disease. *Gut*. 2017 Jul;66(7):1252-1261.

Batista D, Raffals L. Role of intestinal bacteria in the pathogenesis of pouchitis. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20: 1481-1486 [PMID: 25046009 DOI: 10.1097/MIB.0000000000000055]

Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, De Vos W. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*. 2010 May 17;5(5):e10667.

Breiman, L. Random Forests. *Mach. Learn.* 2001;45:5-32.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*. 2012 Aug;6(8):1621-4.

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:13780-13785. [PMID: 17219111]

Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2003 May;124(5):1202-9.

McLaughlin SD, Walker AW, Churcher C, Clark SK, Tekkis PP, Johnson MW, Parkhill J, Ciclitira PJ, Dougan G, Nicholls RJ, Petrovska L. The bacteriology of pouchitis: a molecular phylogenetic analysis using 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Ann Surg* 2010; 252: 90-98 [PMID: 20562611 DOI: 10.1097/SLA.0b013e3181e3dc8b]

Melton GB, Fazio VW, Kiran RP, He J, Lavery IC, Shen B, Achkar JP, Church JM, Remzi FH. Long-term outcomes with ileal pouch-anal anastomosis and Crohn's disease: pouch retention and implications of delayed diagnosis. *Ann Surg* 2008; 248: 608-616 [PMID: 18936574 DOI: 10.1097/SLA.0b013e318187ed64]

Rampelli S, Schnorr SL, Consolandi C, Turrone S, Severgnini M, Peano C, Brigidi P, Crittenden AN, Henry AG, Candela M. Metagenome Sequencing of the Hadza Hunter-Gatherer Gut Microbiota. *Curr Biol*. 2015 Jun 29;25(13):1682-93.

- Rampelli S, Soverini M, Turrone S, Quercia S, Biagi E, Brigidi P, Candela M. ViromeScan: a new tool for metagenomic viral community profiling. *BMC Genomics*. 2016 Mar 1;17:165.
- Segal J P,S. Oke G, Hold L, Clark SK, Faiz OD, Hart A L Systematic review: ileoanal pouch microbiota in health and disease *Pharmacol Ther*. 2018;47:466–477
- Seril DN, Yao Q, Shen B. The association between autoimmunity and pouchitis. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20: 378-388 [PMID: 24374879 DOI: 10.1097/01.MIB.0000435761.82705.6a]
- Shen B. Acute and chronic pouchitis-- pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9: 323-333 [PMID: 22508158 DOI: 10.1038/nrgastro.2012.58]
- Simchuk EJ, Thirlby RC.Risk factors and true incidence of pouchitis in patients after ileal pouch-anal anastomoses.*World J Surg*. 2000 Jul;24(7):851-6.
- Ståhlberg D, Gullberg K, Liljeqvist L, Hellers G, Löfberg R.Pouchitis following pelvic pouch operation for ulcerative colitis. Incidence, cumulative risk, and risk factors.*Dis Colon Rectum*. 1996 Sep;39(9):1012-8.
- Tong M, Li X, Wegener Parfrey L, et al. A modular organization of the human intestinal mucosal microbiota and its association with inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*. 2013;8:e80702
- Truong DT, Tett A, Pasoli E, Huttenhower C, Segata N. Microbial strain-level population structure and genetic diversity from metagenomes. *Genome Res*. 2017 Apr;27(4):626-638.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):804-10.