

## Risultati preliminari per la definizione dell'intervallo di riferimento per l'indoxyl solfato (indicano) nelle urine

Claudio Burrini, Beatrice Morrocchi

Istituto Ricerche Cliniche Prof. M Fanfani, Firenze

### ABSTRACT

#### Preliminary results for the definition of a reference interval for urine indoxyl sulfate (indican).

**Introduction:** the term "gut dysbiosis" refers to an alteration in the composition and functions of the microbiota that causes the loss of beneficial microorganisms and species diversity with the potential growth of harmful bacteria. This condition has been related to many pathologies, both intestinals and extraintestinals. One method for evaluating the dysbiosis is the determination of urinary metabolites related to intestinal fermentative processes. Among these different molecules, indoxyl-sulfate (IS) is well studied. In this paper, the IS measurement was performed in a group of subjects in order to establish a reference interval.

**Methods:** the measurement was carried out by HPLC method using a fluorescence detector on early morning urine void. The results were expressed for urine creatinine concentration.

**Results:** in a group of 68 subjects (35 males, 33 females), the mean IS concentration was 22.3  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinine with a standard deviation of 6.8 and a range of 8.2-36.6. The reference interval at 95%, calculated with the "robust method", was 9.0-36.3  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinine. The 90% confidence intervals, calculated with the "bootstrap method", for the lower and upper limit of the reference interval were 6.8-11.5 and 34.0-38.6 respectively.

**Conclusion:** this study is one of the first contributions to the definition of a reference interval for this metabolite in the first morning urine void.

**Parole chiave:** disbiosi, indicano, intervalli di riferimento.

### INTRODUZIONE

Con il termine disbiosi si intende un'alterazione di composizione e funzioni del microbiota intestinale che si manifesta in una perdita di microrganismi benefici e/o diversità di specie con potenziale crescita di batteri dannosi (1-3). Questa condizione è stata associata a molte patologie sia intestinali (4-6) che extraintestinali: diabete, cirrosi epatica, disturbi dello spettro autistico (ASD, autistic spectrum disorder), malattie mentali, nefropatia cronica (CKD, chronic kidney disease), Parkinson (PD, Parkinson's disease), asma (7-13).

La ricerca dei metaboliti dei processi fermentativi intestinali è uno dei metodi utilizzati per la valutazione dei fenomeni di alterata crescita batterica nell'intestino.

Tra le varie sostanze presenti nella matrice urinaria il marcatore di disbiosi più utilizzato è sicuramente l'indoxyl solfato (IS, indicano). IS è una tossina uremica (14) che si forma nel fegato per idrossilazione dell'indolo ad

opera di enzimi appartenenti alla famiglia del citocromo P450 e successiva coniugazione con lo ione solfato ad opera delle sulfotransferasi. Circola legato per il 90% all'albumina sierica e l'eliminazione avviene tramite le urine grazie all'azione degli organic anion transporters 1/3 (OATs) del tubulo contorto prossimale. L'indolo ha origine intestinale e proviene dalla trasformazione del triptofano assunto con la dieta, ad opera di enzimi triptofanasi prodotti da alcune specie batteriche (come *Escherichia coli*) (15).

Presso il Laboratorio analisi dell'Istituto Ricerche Cliniche Prof. M. Fanfani (Firenze) la misura di IS nelle urine viene effettuata per la valutazione di fenomeni di alterata crescita batterica intestinale. In letteratura, sono disponibili numerosi studi su questo analita ma nessuno aveva l'obiettivo di indicarne l'intervallo di riferimento (16,17).

Scopo di questo lavoro è contribuire alla definizione di tale intervallo per lo IS come marcatore di disbiosi intestinale nella popolazione adulta.

Autore di corrispondenza: Claudio Burrini, Istituto Ricerche Cliniche Prof. M Fanfani, piazza della Indipendenza 18/b 50129 Firenze.  
Tel. 05549701, E-mail: claudio.burrini@istitutofanfani.it

Ricevuto: 17.02.2022

Revisionato: 15.03.2022

Accettato: 27.04.2022

Publicato on-line: 18.05.2022

DOI: 10.19186/BC\_2022.032

## METODI

### Partecipanti

I criteri di selezione dei soggetti del gruppo di studio sono stati i seguenti:

- età compresa tra 18 e 60 anni e indice di massa corporea (BMI) compreso tra 18,5 e 29,9;
- non utilizzo di probiotici e di integratori alimentari contenenti triptofano, né dieta vegana (18);
- non assunzione farmacologica di inibitori della pompa protonica, diuretici, né terapia antibiotica negli ultimi tre mesi (19,20).

Sono stati esclusi inoltre i pazienti con patologie a carico del sistema digerente (diarrea, stipsi, meteorismo, intolleranze alimentari) o patologie caratterizzate da un aumento della produzione intestinale dei metaboliti della fermentazione batterica (CKD, ASD, PD, asma, tumori del colon retto, sclerosi multipla).

Sono stati arruolati 70 soggetti (35 maschi e 35 femmine) tra i pazienti sottoposti a check-up presso l'Istituto comprendente l'esame chimico fisico delle urine. Nella Tabella 1 sono presentate delle caratteristiche del gruppo.

Sono stati inoltre arruolati 7 soggetti affetti da patologie correlate a fenomeni disbiotici intestinali come gruppo di verifica (21-23):

- maschio (50 anni, BMI 26), con storia di intervento chirurgico per asportazione di un adenocarcinoma del colon-retto;
- femmina (50 anni, BMI 19,5), con disturbi intestinali dovuti ad intolleranze alimentari;
- maschio (55 anni, BMI 24,5), asmatico in terapia con cortisonici;
- femmina (56 anni, BMI 24,7), affetta da PD;
- femmina (24 anni, BMI 19,4), con problemi di stipsi, meteorismo ed asma allergico;
- femmina (50 anni, BMI 20,4), affetta da sclerosi multipla;
- femmina (53 anni, BMI 19,1), affetta da stipsi.

I risultati ottenuti su questo gruppo sono stati elaborati separatamente da quelli del gruppo di studio e confrontati solo graficamente con questi.

Tutti i partecipanti allo studio hanno letto e sottoscritto

**Tabella 1**

*Caratteristiche della popolazione studiata (70 soggetti)*

Caratteristica	Classe	Numero soggetti	Frequenza %
Sesso	maschi	35	50,0
	femmine	35	50,0
BMI	18,5-24,9	53	75,7
	25,0-29,9	17	24,3
Età	18-29 anni	15	21,4
	30-39 anni	14	20,0
	40-49 anni	16	22,9
	50-60 anni	25	35,7

BMI, indice di massa corporea.

sia il consenso informato, sia la documentazione relativa alla spontanea donazione dei campioni ai fini di ricerca. Lo studio è stato condotto secondo i principi espressi nella dichiarazione di Helsinki e delle successive revisioni (2013).

Tutti i soggetti sono stati arruolati sulla base della anamnesi derivata dall'intervista e le risposte fornite al questionario. Non sono stati valutati altri parametri biochimici.

### Metodi analitici

La determinazione di IS nelle urine è stata effettuata in cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC). È stato utilizzato il kit diagnostico della Ditta ERRECI (Opera, MI). Il kit comprende la colonna cromatografica, la fase mobile, una soluzione diluente ed uno standard di calibrazione liofilizzato in matrice utilizzato per la taratura del sistema. Il cromatografo liquido S1125 dello stesso produttore è collegato ad un detector a fluorescenza Shimadzu RF20A.

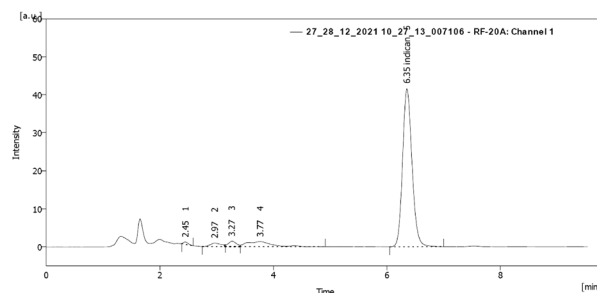
La creatininuria è stata misurata con il metodo di Jaffé (picrato alcalino) su COBAS C501 Roche.

### Procedura

La determinazione di IS è stata effettuata sul mitto intermedio delle prime urine del mattino. Se non analizzati in giornata i campioni venivano conservati a -20 °C. In queste condizioni l'analita è stabile per almeno 2 settimane. La procedura prevede la diluizione con un opportuno reagente e la successiva iniezione in colonna della soluzione ottenuta (Figura 1). Il metodo presenta un CV% analitico del 2,9 (intra-serie) e del 3,7 (tra-serie).

Su tutti i campioni di urine è stata misurata la creatinina; per evitare di esaminare campioni eccessivamente diluiti o concentrati, sono stati esaminati solo campioni con limiti definiti di creatininuria: 40-278 mg/dL per i maschi e 29-226 mg/dL per le femmine. Il CV% analitico del metodo per questa misura è di 1,3 per la ripetibilità intra-serie e di 2,5 per quella tra-serie.

Tutte le sedute analitiche sia dello IS che della creatinina sono state validate tramite l'uso di controlli di qualità in matrice (BioRad per la creatinina ed ERRECI



**Figura 1**

*Cromatogramma ottenuto dalla diluizione di 10 µL di campione con 1 mL di reagente A. Iniezione 10 µL, flusso 0,6 mL/min, temperatura 30 °C, λem 280 nm, λem 390 nm, sensibilità high, gain 4.*

per lo IS) su due livelli di concentrazione. I valori di riferimento e la gestione delle relative carte di controllo seguono le indicazioni del documento SIBioC del 2008 (24).

I risultati sono stati espressi correggendo il valore dell'IS espresso in  $\mu\text{mol/L}$  per la creatinuria espressa in  $\text{mmol/L}$  ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina).

### Analisi statistica

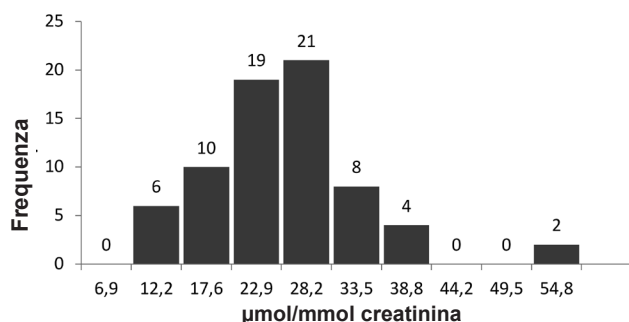
La ricerca degli outliers, eseguita mediante analisi grafica e confermata con il metodo dell'intervallo interquartile, il test di Levene per l'omogeneità della varianza, l'analisi di questa (analysis of variance, ANOVA) ed i test "t bilaterale" sono stati effettuati tramite il programma analisi dati di Excel. Con il software aggiuntivo "reference value advisor" ver. 2.1 del 29 febbraio 2012 è stato elaborato l'intervallo di riferimento al 95% (95% IR) con il metodo robusto e con il bootstrap percentile i relativi limiti di confidenza al 90% (90%IC) (25-26). Il test di verifica della normalità della distribuzione dei dati con il test di Shapiro Wilk ed il test grafico q-q plot sono stati effettuati con il programma "OpenStat" ver. 3 del 29 giugno 2006.

### RISULTATI

I risultati di IS ottenuti nei 70 campioni analizzati erano compresi nell'intervallo tra 8,2-51,0  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina. La distribuzione dei valori presentava una media di 23,2 ed una mediana di 23,1  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina.

L'analisi grafica (Figura 2) ha evidenziato la presenza di due outliers, confermata anche con il metodo dell'intervallo interquartile. Questi erano relativi a concentrazioni di IS 50,4 e 51,0  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina misurate nelle urine di due femmine con BMI ed età rispettivamente di 24,8 e 23,4 e di 52 e 56 anni.

L'eliminazione di questi due dati ha prodotto una nuova distribuzione (68 campioni, 35 maschi e 33 femmine) con intervallo 8,2-36,6, media 22,3, mediana 22,7 ed DS di 6,8  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina. Questa nuova distribuzione di valori è stata sottoposta al test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità della distribuzione ( $W=0,9804$ ,  $p=0,413$ ) e rappresentazione grafica con il



**Figura 2**

Distribuzione dei risultati di indicano nei 70 soggetti.

metodo quantile-quantile plot.

Nella Tabella 2 sono presentati i risultati dei 68 soggetti suddivisi per sesso, età e BMI.

I risultati ottenuti nei sottogruppi maschi/femmine e normopeso/sovrappeso sono stati confrontati con un test "t bilaterale". I risultati (rispettivamente  $p=0,144$ ;  $p=0,620$ ) hanno mostrato che non vi erano differenze statisticamente significative.

I dati suddivisi per classe di età sono stati sottoposti a test di Levene per la verifica dell'omogeneità della varianza ( $p=0,265$ ) e poi a test ANOVA con risultato statisticamente non significativo ( $p=0,314$ ). Le classi di età <30 e >50 sono comunque state sottoposte a test "t bilaterale". Anche questa verifica non ha evidenziato differenze significative ( $p=0,381$ ).

I dati sono stati, quindi, elaborati nel loro insieme per la definizione degli intervalli di riferimento (Tabella 3).

I risultati ottenuti nel gruppo di controllo (persone affette da patologie caratterizzate da squilibri del

**Tabella 2**

Valori ottenuti nei 68 soggetti finali suddivisi per sesso, classe di età e BMI. Tutti i valori sono espressi come  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina

classe	N	media	mediana	DS	intervallo
maschi	35	21,3	21,3	6,6	8,5 - 36,6
femmine	33	23,7	23,7	6,5	8,2 - 36,0
18-29 anni	15	21,1	22,0	6,8	8,6 - 33,5
30-39 anni	14	20,5	21,5	7,7	8,2 - 31,2
40-49 anni	16	24,5	23,0	7,4	13,3 - 36,6
50-60 anni	23	22,8	24,0	5,2	9,0 - 30,0
BMI 18,5-24,9	17	23,2	23,9	7,4	8,6 - 34,4
BMI 25,0-29,9	51	22,2	22,6	7,1	8,2 - 36,6

BMI, indice di massa corporea

**Tabella 3**

Riepilogo dei valori di riferimento ed i loro limiti di confidenza. I limiti inferiore e superiore di riferimento al 95% sono stati calcolati con il "metodo robusto". I rispettivi intervalli di confidenza (IC) al 90% sono calcolati con il metodo "bootstrap percentile" (25,26)

N campioni 68	limite inferiore	90% IC	limite superiore	90% IC
$\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina	9,0	6,8 - 11,5	36,3	34,0 - 38,6

microbiota intestinale) sono stati confrontati graficamente con il limite superiore dell'intervallo di riferimento ed il suo limite di confidenza. Il risultato è illustrato nella Figura 3.

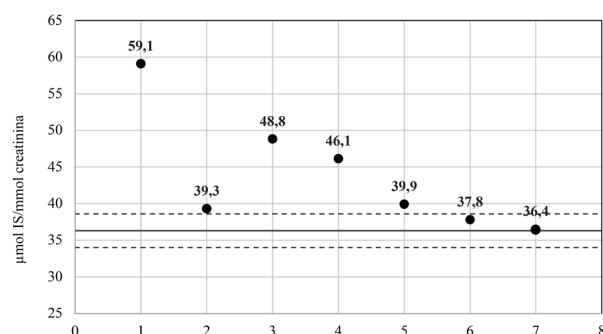
## DISCUSSIONE

La popolazione oggetto dello studio è stata attentamente selezionata eliminando molti dei fattori confondenti conosciuti. Sono stati esclusi infatti tutti i soggetti che presentavano patologie caratterizzate da un aumento dell'escrezione urinaria dello IS, e i pazienti in trattamento con inibitori della pompa protonica, in quanto a rischio di sovracrescita batterica a livello dell'intestino tenue [small intestine bacterial overgrowth (SIBO)] ed in generale tutti i soggetti in terapia cronica farmacologica (27).

L'IS è un metabolita epatico dell'indolo che a sua volta viene prodotto a partire dal triptofano nell'intestino ad opera delle triptofanasi di alcune specie batteriche. L'uso di integratori a base di questo amminoacido è stato quindi un ulteriore motivo di esclusione. L'altra fonte importante di triptofano è l'alimentazione; la dieta priva di proteine animali determina un abbassamento dei livelli di IS nelle urine rispetto alla dieta onnivora e perciò anche i soggetti con dieta vegana sono stati esclusi. I reclutati, tutti soggetti senza restrizioni alimentari, non sono stati ulteriormente classificati in base alla composizione della dieta.

Jumpertz R, et al. (28) hanno dimostrato che, attraverso un sistema di selezione e proliferazione microbica legato all'abbondanza di cibo assunto, il microbiota intestinale possa aumentare l'energia estratta dagli alimenti ingeriti con la dieta e quindi svolgere un ruolo attivo nei fenomeni di elevato aumento ponderale (29). Pertanto nella selezione dei criteri di inclusione sono stati posti i limiti di 18,5 e 29,9 di BMI in modo da eliminare i soggetti sottopeso (BMI <18,5) e quelli obesi (BMI >29,9).

Figura 3



Collocazione rispetto al limite superiore dell'intervallo di riferimento (linea continua) e all'intervallo di confidenza (linee tratteggiate) delle concentrazioni urinarie di indicano ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina) misurati nel gruppo di verifica: 1) uomo, intervento chirurgico per asportazione adenocarcinoma colon-retto; 2) donna, intolleranze alimentari; 3) uomo, asma, 4) donna, malattia di Parkinson. 5) donna, stipsi, meteorismo e asma allergico, 6) donna, sclerosi multipla. 7) donna, stipsi.

Teruya T, et al. (30) hanno segnalato una differenza significativa tra i livelli urinari di IS dei soggetti di più giovane età (24-36 anni) ed anziani (69-81 anni); di conseguenza, tra i criteri di selezione è stato inserito il limite di 60 anni.

I dati raccolti sono stati confrontati con uno studio di metabolomica del 2013 (31), in cui era stato valutato un ampio pannello di sostanze, tra cui l'IS, nella prima urina del mattino. La ricerca è stata condotta su 22 soggetti (14 maschi, 8 femmine di età compresa tra 18 e 67 anni) definite genericamente sane. Gli autori hanno riportato per tutti gli analiti solo i risultati della mediana e l'intervallo di dispersione. Per l'IS le concentrazioni misurate erano comprese in un intervallo di 6,0-64,8 con una mediana di 22,4  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina. I risultati da noi ottenuti (compresi gli outliers) presentano una mediana comparabile (23,1) ma un intervallo più ristretto (8,2-51,0).

L'esistenza di una relazione tra peso, sesso, età e le concentrazioni di IS urinario è stata statisticamente valutata. I valori ottenuti di p hanno indicato che tra le distribuzioni delle varie classi di dati non vi erano differenze statisticamente significative.

Il limite inferiore dell'intervallo di riferimento è stato confrontato con lo studio di Weber D, et al. (32). In questo studio l'IS era stato misurato nelle prime urine del mattino di soggetti sottoposti a terapia antibiotica dopo trapianto di cellule staminali allogeniche. I pazienti che presentavano, nei primi 10 giorni dopo l'operazione, una concentrazione di IS <6,9  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina avevano una più alta probabilità di decesso correlato al trapianto ad un anno dall'intervento rispetto ai pazienti con una concentrazione di IS superiore a questo valore. Gli autori hanno correlato questo risultato alla compromissione quali- e quantitativa della flora batterica intestinale.

Un altro gruppo di ricerca in un lavoro successivo del 2021 (33) ha misurato l'IS urinario in soggetti al momento dell'ammissione e dopo 72 ore dal ricovero in terapia intensiva. Utilizzando il valore decisionale di 6,9  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina è stato osservato che i pazienti che presentavano un valore inferiore erano soggetti a degenze più lunghe ed avevano una più alta probabilità di decesso durante l'anno di monitoraggio rispetto ai pazienti con valori di IS maggiori del valore decisionale.

La concentrazione più bassa misurata sui campioni analizzati nel presente studio è stata di 8,2  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina e l'intervallo di riferimento elaborato dai dati ottenuti ha un limite inferiore di 9,0  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina con un intervallo di confidenza 6,8-11,5  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinina.

Per la verifica del limite superiore dell'intervallo di riferimento è stato costruito un modello grafico di confronto tra questo valore ed i risultati della misura dell'IS nelle urine del gruppo di controllo

Le concentrazioni misurate nel gruppo di verifica, si collocano tutte e sette oltre il limite superiore di riferimento: due di esse dentro l'intervallo di confidenza, le altre cinque oltre l'intervallo (Figura 3).

Il modello qui presentato è ovviamente limitato dalla bassa numerosità dei soggetti utilizzati ma comunque è in grado di fornire un punto di verifica dei dati elaborati.

## CONCLUSIONI

I fenomeni disbiotici sono in generale una condizione molto complessa da valutare; infatti l'attività e la numerosità delle specie presenti nell'intestino sono influenzate da molti fattori (come lo stile di vita, la dieta, i farmaci assunti). Un metodo molto diffuso per la valutazione della alterata crescita microbica nell'intestino è la ricerca nelle urine dei prodotti della fermentazione batterica (34). L'IS è probabilmente il più utilizzato tra questi. Il presente lavoro rappresenta uno dei primi contributi alla definizione di un intervallo di riferimento calcolato nelle prime urine del mattino per questo metabolita, pur con i limiti di una numerosità campionaria non particolarmente rilevante.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontiers. *Gut* 2016;65:330-9.
- Tiffany CR, Baumlér AJ. Dysbiosis: from fiction to function. *Am j Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2019;317:G602-8.
- Veneruso I, Tomaiuolo R, Cariati F, et al. Il microbiota umano: il buono, il brutto ed il cattivo. *Biochim Clin* 2021;45:109-21.
- Nishida A, Inoue R, Inatomi O, et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol* 2018;11:1-10.
- Binfrate L, Tack J, Grattagliano I, et al. Microbiota in health and irritable bowel syndrome: current knowledge, perspectives and therapeutic options. *Scan J of Gastroenter* 2013;48:995-1009.
- Li Y, Xia S, Jiang X, et al. Gut microbiota and diarrhea: an updated review. *Front Cell Infect Microbiol* 2021. doi: 10.3389/fcimb.2021.625210.
- Pircalabioru GG, Corcionivoschi N, Gundogdu O, et al. Dysbiosis in the development of type I diabetes and associated complications: from mechanism to targeted gut microbes manipulation therapies. *Int j Mol Sci* 2021. doi: 10.3390/ijms22052763.
- Tilg H, Grander C, Moschen AR, et al. How does the microbiota affect liver disease. *Clin Liver Dis* 2016;8:123-6.
- Dieme B, Mavel S, Blaco H, et al. Metabolomic study of urine in autism spectrum disorder using a multiplatform analytical methodology. *J Proteome Res* 2015;14:5273-82.
- Roger GB, Keating DJ, Young RL, et al. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanism and pathways. *Mol Psychiatry* 2016;21:738-48.
- Jazani NH. Impact of gut dysbiosis on neurohormonal pathways in chronic kidney disease. *Diseases* 2019;7:21.
- Huang Y, Liao J, Liu X, et al. Review: the role of intestinal dysbiosis in Parkinson's disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:615075.
- Hufnagl K, Pali-Scholl I, Roth-Walter F, et al. Dysbiosis of the gut and lung microbioma has a role in asthma. *Semin Immunopathol* 2020;42:75-93.
- Niwa T. Uremic toxicity of indoxyl sulfate. *Nagoya J Sci Med* 2010; 72:1-11.
- Roager HM, Licht RT. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun* 2018;9:3294.
- Farowski F, Els G, Tsakmaklis A, et al. Assessment of urinary 3-indoxyl sulfate as marker for gut microbiota diversity and abundance of Clostridiales. *Gut Microbes* 2019;10:133-41.
- Olesova D, Galba J, Piestansky J, et al. A novel UHPLC-MS method targeting urinary metabolomic markers for autism spectrum disorder. *Metabolites* 2020;10:443.
- Patel PK, Luo FJG, Plummer NS, et al. The production of p-cresol sulfate and indoxyl sulfate in vegetarians versus omnivores. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:982-8.
- Lombardo L. La SIBO: novità diagnostico terapeutiche. *Rivista Società Italiana Medicina Generale* 2013;1:27-30.
- Ramirez J, Guarner F, Fernandez LB, et al. Antibiotics as major disruptors of gut microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;10:572912.
- Zou S, Fang L, Lee MH. Dysbiosis of microbiota in promoting the development of colorectal cancer. *Gastroenterol Rep* 2018;6:1-12.
- Caminero A, Maisel M, Jabri B, et al. Mechanism by which gut microorganisms influence food sensitivities. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16:7-18.
- Noto D, Miyake S. Gut microbiota and multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2022;235:108380.
- Ottomano C, Ceriotti F, Galeazzi M, et al. Linee guida per la gestione dei programmi di controllo di qualità interno. *Biochim Clin* 2008;32:102-21.
- Ceriotti F. Gli intervalli di riferimento nel nuovo millennio. *Biochim Clin* 2007;31:254-66.
- CLSI. Defining, establishing, and verifying reference interval in the clinical laboratory; approved guidelines-third edition. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2008.
- Jackson MA, Verdi S, Maxan ME, et al. Gut microbiota association with common diseases and prescription medications in a population-based cohort. *Nat Commun* 2018;9:2655.
- Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ. Energy-balance studies reveal association between gut microbes, caloric load, and nutrition absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 2011;94:58-65.
- Amabebe E, Robert FO, Agbalalah T, et al. Microbial dysbiosis induced obesity: role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. *Br j Nutr* 2020;123:1127-37.

30. Teruya T, Goga H, Yanagida M, et al. Aging markers in human urine: a comprehensive, non targeted LC/MS study. *FASEB Bioadv* 2020;12:720-33.
31. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, et al. The human urine metabolome. *PLOS ONE* 2013;8:e73076.
32. Weber D, Oefner PJ, Hiergeist A, et al. Low urinary indoxyl sulfate level early after transplantation reflect a disrupted microbiome and are associated with poor outcome. *Blood* 2015;126:1723-8.
33. Kuo SZ, Dettmer K, Annavajhala MK, et al. Association between urinary 3-indoxyl sulfate, a gut microbiome-derived biomarker, and patient outcomes after intensive care unit admission. *J Critic Care* 2021;63:15-21.
34. Verbeke KA, Boobis AR, Chiodini A, et al. Toward microbial fermentation metabolites as markers for health benefit of probiotics. *Nutr Res Rev* 2015;28:42-66.