Il microbiota umano: il buono, il brutto e il cattivo

Iolanda Veneruso[1,2], Rossella Tomaiuolo[3], Federica Cariati[4], Valeria D'Argenio[1,5]
[1]CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Via G. Salvatore 486, Napoli
[2]Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II
[3]Università Vita - Salute, San Raffaele, Milano
[4]Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II
[5]Dipartimento di Promozione delle Scienze Umane e della Qualità della Vita, Università Telematica San Raffaele, Roma

ABSTRACT

Human microbiota: the good, the bad and the ugly.
In recent years, the development and the huge diffusion of Next Generation Sequencing (NGS)-based techniques has allowed the study of microbial communities at a previously unimaginable resolution level. Consequently, the knowledge of the role and functions of the human microbiota in various body sites has increased, identifying several fundamental roles for the microbiota in the development and maintenance of body homeostasis, also in relation to various ages of life. On the other hand, a number of microbiota qualitative and/or quantitative alterations have been associated with several diseases, and the trend is increasing. Since targeted interventions can modify the microbiota, the definition of its composition in physiological and pathological conditions acquires crucial importance for the development of new diagnostic tools and/or therapeutic approaches aimed at manipulating the microbiota.
In this context, the definition of standardized protocols and common guidelines to study the microbiota, and therefore the role of Laboratory Medicine, appears to be fundamental for the diffusion of metagenomic analyses in diagnostic contexts and will acquire greater relevance in the near future.

IL MICROBIOTA UMANO: DEFINIZIONI E GENERALITÀ

Il microbiota umano può essere definito come la comunità di microorganismi (Batteri, Protozoi, Virus, Funghi e Archaea) che vivono sulla superficie e all'interno dell'ospite umano (superficie delle mucose, cute, superficie dei denti, vie respiratorie, intestino, sistema urogenitale) (1,2). Il microbioma, invece, rappresenta il patrimonio genetico di tutti questi microorganismi (vedi Glossario).

Negli ultimi 10 anni, la disponibilità di metodologie ad elevata risoluzione, basate su tecniche di Next Generation Sequencing (NGS, vedi Glossario) (3), ha reso possibile l'analisi quali/quantitativa di intere comunità microbiche; ne è conseguito un notevole impulso alla caratterizzazione del microbioma umano, anche al fine di definirne il ruolo nel mantenimento dello stato di salute dell'uomo, nonché nell'insorgenza di specifiche patologie (2,4).

Sulla base di tali studi, il concetto di "olobionte" o superorganismo, inteso come l'insieme delle cellule umane e microbiche presenti in uno specifico ecosistema, e la cui eterogeneità dipende dalla colonizzazione delle nicchie corporee e dal corredo genetico dell'ospite, è diventato ampiamente utilizzato (2). Il microbiota, in particolare, pur essendo parte del nostro organismo biologico, è un'entità dinamica e in veloce evoluzione, in grado di rispondere rapidamente a perturbazioni esterne e di adattarsi a stimoli ambientali di varia natura (5). Pertanto, lo studio del microbiota umano rappresenta una grande opportunità non solo per chiarire i meccanismi fisiopatologici alla base di specifiche patologie, ma anche per identificare nuovi biomarcatori e/o possibili obiettivi di terapie mirate.

Si stima che il microbiota sia composto da circa 10-100 trilioni di cellule microbiche (circa 10 volte in più rispetto al numero di cellule umane) e che contenga >1000 specie batteriche e 100 volte più geni rispetto al totale dei geni contenuti nel genoma umano (1). Ogni ceppo batterico, infatti, possiede un genoma che contiene numerosi geni, offrendo sostanzialmente una

Corrispondenza a: Valeria D'Argenio, E-mail dargenio@ceinge.unina.it; Tel 081 3737909.

Ricevuto: 14.10.2020 Revisionato: 16.10.2020 Accettato: 21.11.2020

Pubblicato on-line: 23.02.2021 DOI: 10.19186/BC_2020.103

maggiore diversità genetica, e quindi flessibilità, rispetto al genoma umano (6). Recentemente, queste stime sono state ridimensionate ed è stato dimostrato che il numero di cellule batteriche e quello di cellule umane, presenti in ciascun individuo adulto, è in rapporto 1:1, suggerendo, comunque, che siamo composti per metà da batteri (Figura 1) (2).

Il Dominio dei Batteri include 29 *Phyla*, 6 dei quali sono predominanti nel microbiota umano, ossia Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Cyanobacteria, e Fusobacteria. L'abbondanza relativa dei membri di questi *phyla* crea vere e proprie nicchie corporee (1): durante la fase di colonizzazione, infatti, il microbiota umano segue una traiettoria sito-specifica, sviluppando in ogni distretto corporeo una specifica biogeografia (2,4).

Il rapporto tra l'ospite e il microbiota si instaura già nel periodo ante-natale; numerose evidenze suggeriscono, infatti, che la colonizzazione batterica inizi all'interno dell'utero e che la tipologia di parto possa influenzare la composizione microbica (2,4). Si ritiene, in particolare, che i primi anni di vita (dal concepimento fino a 2-3 anni di età) siano cruciali per l'instaurarsi di una corretta colonizzazione microbica. Infatti, benché il ruolo del microbioma in epoca prenatale sia ancora controverso, diversi studi suggeriscono che esso possa influenzare la suscettibilità allo sviluppo di specifiche patologie, anche in età adulta (4). Successivamente, al momento del parto e immediatamente dopo la nascita, i neonati sono esposti ai microbi materni e ambientali; il travaglio e il parto, infatti, rappresentano la prima sostanziale esposizione ad un complesso microbico e rappresentano il meccanismo primordiale del trasferimento intergenerazionale del microbiota nei mammiferi (5). Durante i primi anni di vita, è stato stimato che circa 1013-1 014 microbi/mL, appartenenti a circa 500-1 000 specie, colonizzino il solo tratto gastrointestinale dove si localizza la maggior parte del microbiota umano, anche se molteplici batteri sono stati ormai identificati in pressoché tutto l'organismo, incluse nicchie precedentemente considerate sterili.

In condizioni fisiologiche, il neonato e il microbiota si sviluppano in sintonia sotto l'effetto di stimoli nutrizionali, immunologici, ormonali e prebiotici del latte materno (5). Dopo lo svezzamento, il microbiota

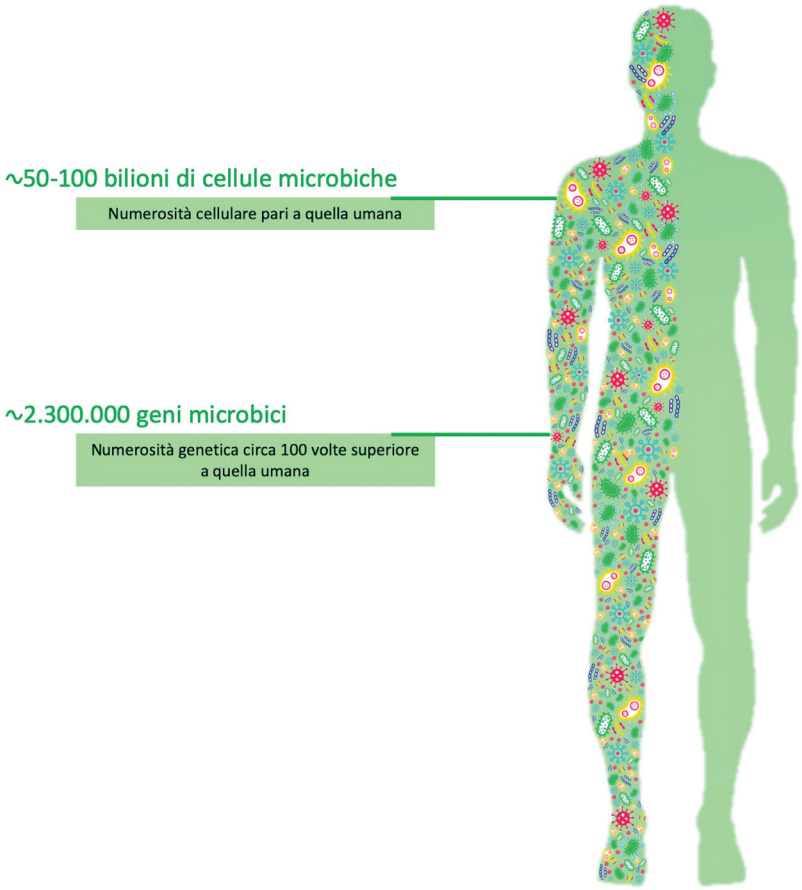

Figura 1
I numeri del microbiota umano. *Si stima che il rapporto tra cellule microbiche e cellule eucariotiche sia di 1:1, suggerendo che un individuo adulto sia costituito per metà da microbi. Tutti questi microrganismi, inoltre, esprimono milioni di geni coinvolti in numerose funzioni essenziali per il mantenimento dell'omeostasi corporea.*

intestinale si stabilizza fino a diventare simile a quello di un individuo adulto e caratterizzato da un *core* microbico che tende a rimanere costante per tutta la durata della vita. Infatti, la caratterizzazione longitudinale (vedi Glossario) del microbioma intestinale umano ha dimostrato che il microbioma di un adulto resta relativamente stabile e unico per ogni individuo, comparato con il drastico cambiamento che avviene durante i primi tre anni di vita (2,4).

Quindi, nonostante il microbioma umano presenti una certa variabilità intra-individuale nel corso del tempo, a causa di una serie di stimoli endogeni ed esogeni, l'estensione della variazione longitudinale è significativamente più bassa rispetto alla variazione osservata tra individui diversi, indicando che il microbioma umano è individuale (1). Questo dato è stato confermato anche da studi effettuati su gemelli omozigoti che sono a malapena simili tra di loro per composizione e struttura del microbioma, suggerendo che l'effetto del genoma umano sull'insediamento della comunità microbica sia limitato e che l'elemento determinante sia rappresentato da fattori ambientali (6).

L'interesse nello studio del microbiota umano risiede nel fatto che questi microorganismi partecipano a numerosi aspetti della fisiologia umana, inclusi lo sviluppo e il rafforzamento del sistema immunitario, il metabolismo energetico, le funzioni endocrine e intestinali. Inoltre, i microrganismi della flora autoctona inibiscono e prevengono l'invasione ad opera di agenti patogeni esogeni e provvedono anche a funzioni essenziali, quali la biosintesi di vitamine del gruppo B e di vitamina K, nonché la degradazione di carboidrati complessi derivanti da fibre vegetali non digeribili (1,6).

Uno squilibrio nella composizione qualitativa e/o quantitativa del microbiota, o disbiosi, indotto da vari fattori, come lo stile di vita, la dieta e l'utilizzo di farmaci antimicrobici, a causa dell'interazione con il sistema immunitario, endocrino e nervoso (2,6), è associato all'insorgenza e/o all'evoluzione di un numero elevato di patologie, quali l'obesità, patologie cardiovascolari, malattie autoimmuni, cancro, infezioni, sindrome da fatica cronica, colite, vaginosi batterica, malattie neurodegenerative, ansia e depressione (1,2,6,7). In particolare, alcuni studi epidemiologici hanno dimostrato che una complessiva riduzione della densità microbica del tratto digestivo sia associata a malattie, quali eczema, asma, malattie infiammatorie, diabete, obesità, allergie, e disordini del tratto digestivo (7).

Nonostante la struttura, la funzione, il dinamismo e l'interazione di questi microorganismi giochino un ruolo essenziale nel metabolismo umano, la loro identificazione, quantificazione e caratterizzazione risulta problematica (7). In particolare, benché numerosi studi abbiano descritto una disbiosi microbica in presenza di diverse patologie, il significato funzionale di tale alterazione non è ancora ben chiaro.

Lo scopo di questa rassegna è descrivere le metodologie attualmente disponibili per lo studio del microbiota umano, con particolare riferimento alle possibili fonti di bias che possono inficiare l'intera procedura analitica, dalla selezione e raccolta dei campioni fino all'analisi dei dati. Verranno, poi, descritte le principali nicchie microbiche presenti nel nostro organismo con riferimento al ruolo del microbiota per il mantenimento dell'omeostasi corporea e la descrizione di specifiche alterazioni associate a determinate patologie.

METODOLOGIA

La ricerca delle fonti bibliografiche è stata effettuata utilizzando PubMed e restringendo la ricerca agli articoli indicizzati pubblicati tra il 2010 e il 2020. Sono state utilizzate le seguenti parole chiave: "human microbiota", "metagenomics", "16S analysis", "metatrascriptomis", "human gut microbiota", "human respiratory microbiota" e "human genito-urinary microbiota", "microbiota and human diseases".

METODI PER LO STUDIO DEL MICROBIOTA UMANO

La metagenomica è quella branca delle scienze "omiche" che studia intere comunità microbiche nel loro ambiente, senza la necessità di ricorrere a tecniche colturali (8). Negli ultimi anni, la metagenomica è stata ampiamente utilizzata per caratterizzare specie e contenuto genico del microbioma umano (2,5-7). Sebbene numerosi studi, basati sulla caratterizzazione del microbioma in specifici siti corporei e/o in associazione a specifiche patologie, abbiano fornito risultati promettenti per applicazioni di tipo clinico, sarebbe necessaria la validazione di un protocollo unico e condiviso perché questi dati abbiano una reale applicabilità. Attualmente, infatti, uno dei principali limiti degli studi di metagenomica è rappresentato dalla presenza di un elevato numero di variabili che rende estremamente difficile, se non impossibile, il confronto dei risultati ottenuti analizzando popolazioni differenti, spesso utilizzando diversi campioni biologici e differenti protocolli analitici. La standardizzazione di tali variabili, al fine di minimizzare le possibili fonti di errore, è fondamentale per la corretta interpretazione dei risultati ottenuti, nonché per valutare la loro possibile trasferibilità in contesti diagnostici e/o terapeutici.

Fase pre-analitica

Come in altri campi della biochimica clinica e della Medicina di Laboratorio in senso lato, la fase pre-analitica, intesa come la scelta della popolazione da analizzare, la definizione dei criteri di inclusione e di esclusione, la scelta del campione biologico da analizzare, nonché le modalità di raccolta, conservazione e invio dei campioni stessi, è fondamentale per assicurare l'accuratezza, la riproducibilità e l'appropriatezza delle indagini effettuate (Figura 2).

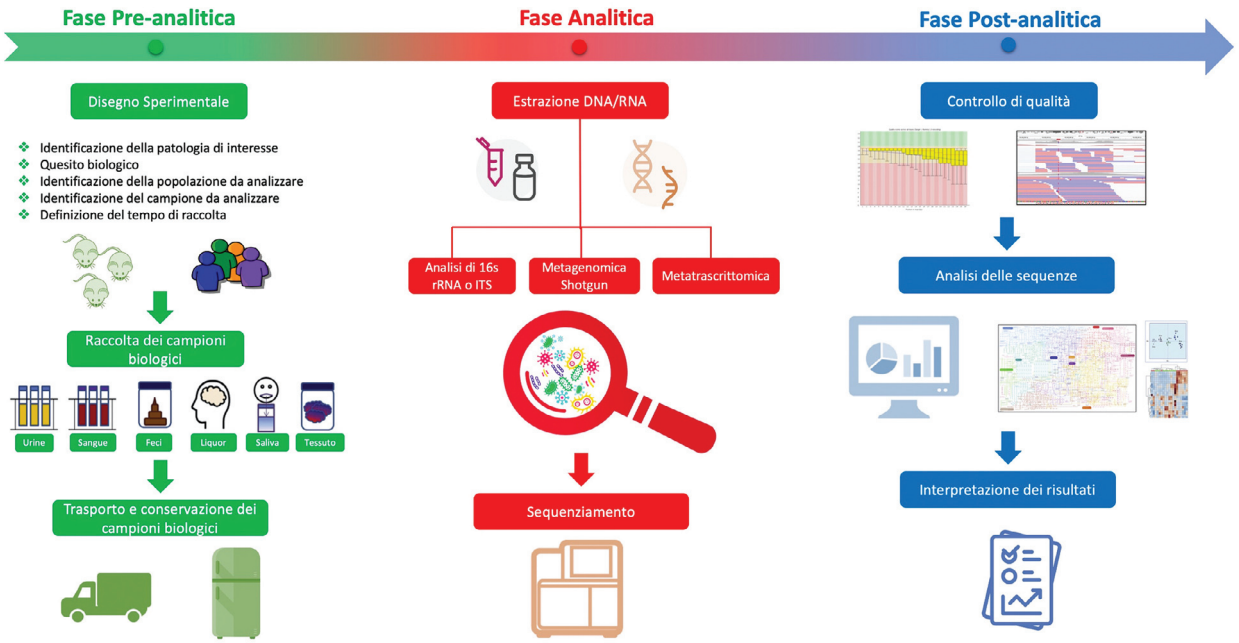

Figura 2
Analisi del microbiota. *Descrizione completa del flusso di lavoro dalla fase pre-analitica a quella post-analitica.*

Scelta della popolazione

Studi del microbioma basati sull'analisi di diverse popolazioni forniscono informazioni sulle associazioni tra un tipo di microbioma e uno specifico fenotipo (2, 5-7, 9-11).

Gli studi del microbioma, infatti, si propongono di stimare la composizione tassonomica e funzionale dei diversi microrganismi in gruppi di campioni attraverso esperimenti trasversali e longitudinali. Lo studio della popolazione può essere svolto identificando gruppi differenti di soggetti che corrispondono a particolari condizioni fisiologiche, etniche, caratteristiche ecologiche e distribuzione geografica. Uno degli obiettivi in questi studi è capire la diversità del microbioma nei vari gruppi di campioni analizzati e identificare biomarcatori in grado di differenziarli. Cambiamenti della composizione microbica all'interno di ognuno di questi gruppi giocano un ruolo importante nella comprensione della struttura delle comunità (9).

Dal momento che la composizione del microbiota può essere influenzata da numerosi fattori fisiologici e ambientali, perché le differenze osservate siano effettivamente legate alla presenza/assenza di un determinato fenotipo, è necessario minimizzare le altre fonti di variabilità. È di particolare importanza, pertanto, stabilire a priori i criteri di inclusione, in modo da confrontare gruppi quanto più possibile omogenei, e soprattutto i criteri di esclusione (assunzione di farmaci e/o integratori ed eventuali patologie concomitanti) in modo da evitare fattori confondenti. È, inoltre, molto utile preparare una scheda anamnestica dettagliata al fine di raccogliere quante più informazioni possibile (tipo di parto, tipo di allattamento, dieta, fumo, assunzione di alcool, e quant'altro) che possano essere utilizzate in fase di analisi per stratificare i soggetti e identificare differenze effettive tra i gruppi analizzati.

Selezione, raccolta e conservazione dei campioni biologici

Le procedure di raccolta e conservazione dei campioni biologici rappresentano una fase cruciale per garantire l'integrità e la stabilità del materiale raccolto (12).

Feci, urine, plasma/siero, saliva, microparticelle di esalazione, fluido cerebrospinale e tessuti da organi bersaglio sono potenziali campioni biologici per lo studio del microbioma. Il tipo di selezione dei campioni dipende da vari fattori, come la disponibilità del campione, i modelli di studi precedenti, il tipo di malattia e il quesito biologico cui si intende rispondere (13). I campioni per l'analisi del microbioma possono essere raccolti utilizzando kit commercialmente disponibili consistenti in un tampone, un tubo e, spesso, una soluzione tampone. La raccolta può essere effettuata da personale sanitario o dall'individuo stesso tramite auto-raccolta. In entrambi i casi, è importante che il campionamento sia quanto più possibile standardizzato, il che implica la necessità di comprendere e rispettare rigorosamente il protocollo di raccolta in modo da impedire la contaminazione (ad esempio da pelle, mani, polvere, indumenti) e preservare la composizione del campione originale (14).

Una volta raccolta, la maggior parte dei campioni viene conservata prima di essere utilizzata per l'analisi; la condizione di stoccaggio ottimale comporta,

generalmente, l'immediato posizionamento in ghiaccio e il successivo congelamento a - 80 °C.

La stabilità del campione merita particolare considerazione in caso di sequenziamento del DNA ma soprattutto dell'RNA, che è vulnerabile alla degradazione da parte degli enzimi RNAsi dell'ospite e dell'ambiente. Pertanto, al momento della raccolta del campione può essere preso in considerazione l'uso di stabilizzanti chimici degli acidi nucleici. Una volta congelati, il DNA e l'RNA rimangono relativamente intatti; tuttavia, fasi multiple di congelamento-scongelamento durante la fase di aliquotazione del campione e la sua lavorazione possono provocare una degradazione dell'acido nucleico dovuta in parte al rilascio di nucleasi endogene (15). Infine, va considerata la possibilità di introdurre contaminazioni da parte degli stessi tamponi di stoccaggio; anche il tempo di posizionamento del campione in ghiaccio, nonché il tempo di conservazione, hanno un impatto sulle analisi finali (14).

Fase analitica

Una volta selezionate le popolazioni di interesse e collezionati i campioni biologici in maniera adeguata, l'analisi del microbioma si basa sull'utilizzo di specifici protocolli di NGS (12), che permettono lo studio della complessità di popolazioni microbiche attraverso tre approcci principali:

- analisi dell'RNA ribosomale 16S (16S rRNA, vedi Glossario) o delle Regioni Trascritte Interne (ITS, vedi Glossario);
- analisi dell'intero metagenoma di un campione (approccio "shotgun", vedi Glossario);
- analisi dell'espressione genica del microbiota e dell'ospite (metatrascrittomica) (Figura 2).

Sebbene il sequenziamento "shotgun" fornisca informazioni più complete sull'intero pool genico di microbi e ospite, l'elevata quantità di dati generata richiede specifiche capacità bioinformatiche nell'assemblaggio delle sequenze, nella mappatura e nell'analisi. Pertanto, in molti studi, sia clinici che ambientali, il sequenziamento di un amplicone del gene del 16S rRNA, che copre le regioni variabili del gene stesso, è il metodo più utilizzato per l'analisi della composizione delle comunità batteriche, fornendo un buon rapporto costo-efficacia e una risoluzione sufficiente. Il sequenziamento permette di identificare i batteri che non possono essere coltivati e associa le caratteristiche microbiche con un particolare stato fisiologico o malattia, dal momento che può essere misurata l'abbondanza relativa di ogni *taxon* (vedi Glossario). Tuttavia, i metodi di sequenziamento non possono discriminare tra batteri vivi e DNA transitorio e, nonostante i recenti progressi, non possono rilevare facilmente le popolazioni poco rappresentate (10).

Recentemente, anche approcci di metabolomica (vedi Glossario) sono stati utilizzati per ottenere dati funzionali relativi alla presenza di uno specifico microbiota.

Analisi del 16S rRNA

Uno degli approcci più utilizzati per studiare il microbioma è basato sull'amplificazione e il sequenziamento di specifiche regioni di interesse, come il gene del 16S rRNA per Archaea e Batteri e le ITS (Spaziatore interno trascritto, vedi Glossario) per i Funghi (1,14,16).

Per ottenere la completa valutazione del microbioma, il punto di partenza essenziale è una buona preparazione del DNA. Esistono diversi protocolli per l'isolamento del DNA, che includono opzioni commerciali oppure i metodi tradizionali di estrazione in fenolo-cloroformio e precipitazione in etanolo. Il passaggio fondamentale è la fase di lisi della parete cellulare che, essendo differente nei vari tipi di microorganismi, deve essere efficace in modo da assicurare che ogni specie sia rappresentata nel campione finale (17). Al momento, tuttavia, non esistono metodi gold standard, ma i singoli gruppi di ricerca ottimizzano strategie di lisi in dipendenza della matrice di partenza che viene utilizzata.

Il gene che codifica per il 16S rRNA, lungo circa 1500 bp, presenta nove regioni iper-variabili (V1-V9) separate da regioni altamente conservate (14), caratteristiche che lo rendono un marcatore ideale per catalogare i microorganismi (1). Le regioni iper-variabili, ciascuna diversa per lunghezza, variabilità genetica e resa filogenetica, contengono la variazione genetica usata per classificare ogni sequenza in una Unità Tassonomica Operativa (OTU). L'elevata presenza di differenze genetiche nella regione variabile assicura una migliore separazione tassonomica delle sequenze, facilitando l'interpretazione dei dati (17). In particolare, le regioni da V4 a V7 hanno la più alta risoluzione filogenetica, mentre le regioni V2 e V9 hanno una risoluzione più povera. Filogeneticamente, la regione V1-V3 determina molte famiglie di batteri, ma permette meno distinzioni tra gli Archaea. Al contrario, la regione V3-V5 fornisce un'elevata specificità in entrambi i regni procarioti, ma non è in grado di risolvere i generi all'interno delle famiglie batteriche Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae, che comprendono importanti patogeni dell'uomo, come *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae e Pseudomonas aeruginosa* (17).

Basandosi sulle regioni conservate è possibile disegnare e utilizzare primers universali per individuare e amplificare il DNA batterico di ogni campione (1). I diversi primers per il gene 16S rRNA, le cui sequenze spesso contengono basi degenerate (per la regione V4, l'11% di basi degenerate per il primer Forward e 15% di basi degenerate per il primer Reverse), sono di assoluta importanza per l'accuratezza dell'analisi, dal momento che le specifiche regioni target influenzano i tipi di batteri che potranno essere identificati dall'analisi (14,17). La selezione delle sequenze dei primers è generalmente basata su gruppi tassonomici e risoluzione desiderata per il tipo di campione, e su compatibilità della dimensione dell'amplicone con la piattaforma di sequenziamento scelta. Le sequenze di primer

ampiamente utilizzate, adattate per il sequenziamento NGS con piattaforma Illumina, sono state progettate dal consorzio "Earth Microbiome Project" (EMP) e amplificano specificamente la regione V4. I protocolli standard per il sequenziamento di ampliconi 16S con questo metodo sono disponibili online sul sito web EMP (https://press.igsb.anl.gov/earthmicrobiome/) e comprendono le sequenze dei primers e le condizioni della Polymerase Chain Reaction (PCR) (17).

Il sequenziamento delle regioni iper-variabili del gene 16S rRNA rappresenta il gold-standard per l'assegnazione tassonomica (10). L'attuale sequenziamento del gene del 16S rRNA e delle ITS si basa sulla lunghezza di sequenziamento consentita dal sequenziatore Miseq (Illumina), spesso sfruttando la lunghezza di sequenziamento 2x300 in modo da coprire un maggior numero di regioni variabili e ottenere la massima precisione possibile (17). Di conseguenza, vi è un notevole interesse verso la possibilità di ottenere la sequenza completa del gene del 16S rRNA e delle ITS utilizzando le piattaforme di sequenziamento di terza generazione, PacBio o Oxford Nanopore, ma la limitata disponibilità di database di riferimento e il tasso di errore ancora elevato di tali tecnologie limitano la diffusione di questi metodi (16).

Attualmente, dunque, l'analisi del 16S rRNA è il metodo più comunemente impiegato per analizzare comunità microbiche e presenta numerosi vantaggi:

- basso costo ed elevata produttività;
- disponibilità di pipeline di analisi validate;
- disponibilità di banche dati di riferimento (18,19).

Tale metodo presenta, tuttavia, alcuni limiti dell'approccio. In primo luogo, il gene del 16S rRNA presenta variazioni nel numero di copie per cellula, caratteristica che può alterare l'analisi, in particolar modo quando bisogna stimare l'abbondanza microbica. In secondo luogo, la fase di amplificazione è suscettibile a distorsioni introdotte dall'efficienza dei primers e dall'amplificazione selettiva di alcuni batteri piuttosto che di altri, che può anche portare ad una rappresentazione sbagliata delle relative abbondanze dei membri della comunità. Inoltre, il gene 16S non fornisce informazioni riguardanti l'intero genoma ed è utile per l'identificazione dei soli Batteri e Archaea (1) (Tabella 1).

In maniera analoga al 16S rRNA per i batteri, è possibile sequenziare le ITS per ottenere informazioni relativamente alla composizione micotica di un campione di interesse. Vantaggi e svantaggi di questo approccio sono sovrapponibili a quelli discussi per l'analisi del 16S; in questo caso, inoltre, la disponibilità di un numero limitato di sequenze genomiche depositate in banche dati rende più difficile l'analisi per l'identificazione univoca delle diverse tipologie di funghi (20) (Tabella 1).

Metagenomica Shotgun

Un altro approccio utilizzato per lo studio delle comunità microbiche è il sequenziamento di tipo shotgun o WGS (Whole Genome Shotgun Sequencing) (19). In questo caso, si effettua il sequenziamento dell'intero pool di DNA estratto direttamente da un campione di interesse che, pertanto, conterrà il genoma dell'ospite e tutti i genomi microbici presenti nel campione stesso (1, 16,19). L'approccio molecolare è simile a quello utilizzato per l'analisi di un singolo genoma ma, in questo caso, si ottengono sequenze relative all'ospite e a tutti i microrganismi, inclusi Batteri, Archaea, Funghi, Virus e Protozoi, presenti nell'ambiente studiato (2,19). Di conseguenza, l'assegnazione tassonomica richiede strumenti di assemblaggio altamente performanti e database costantemente aggiornati (2,16).

Relativamente all'identificazione tassonomica, il sequenziamento WGS non è soggetto ai bias introdotti dalla fase di PCR e non è influenzato dal numero variabile di copie del gene 16S nei vari batteri; inoltre, rispetto al sequenziamento target del 16S rRNA, permette una maggiore risoluzione biologica (fino a livello di specie e ceppi) e fornisce dati significativi sul potenziale funzionale della comunità microbica, come i geni coinvolti nella resistenza agli antimicrobici o codificanti per specifiche molecole biochimiche (1,19). Tuttavia, i maggiori limiti di questo approccio restano il costo elevato e le significative sfide computazionali e analitiche (1). È verosimile, pertanto, che la progressiva riduzione dei costi del sequenziamento, determini il corrispondente aumento della diffusione di studi di metagenomica con approccio shotgun (2) (Tabella 1).

Metatrascrittomica

È l'analisi di tutto il trascrittoma di un determinato campione; pertanto, permette di valutare l'espressione genica del microbiota presente in un organo o tessuto specifico e in una circostanza specifica, nonché l'espressione genica dell'ospite (2). I metodi di metatrascrittomica, in maniera analoga alla metagenomica shotgun, permettono di ottenere informazioni complesse relative all'insieme di tutti i genomi presenti in un campione (16,21). I dati delle analisi di metatrascrittomica, quindi, completano i dati di metagenomica spiegando esattamente quali dei geni che sono stati annotati nell'analisi del genoma sono espressi, e permettendo, così, di dimostrare le funzioni di un potenziale repertorio di microorganismi. In questo tipo di analisi è possibile identificare le vie metaboliche che possono essere associate a particolari condizioni. Pertanto, la metatrascrittomica offre una prospettiva più informativa rispetto alla metagenomica, in quanto può rivelare dettagli sulle popolazioni che sono trascrizionalmente attive e non solo identificare il contenuto genetico delle popolazioni microbiche presenti in un campione di interesse (21).

Solitamente, le analisi di metatrascrittomica prevedono l'isolamento dell'RNA totale dai campioni di interesse (ad esempio, intestino, pelle, cavità orale). Successivamente, è necessario arricchire le frazioni di RNA da sequenziare. Dal momento che, a differenza dell'mRNA eucariotico, l'mRNA procariotico non possiede la coda di poli-A, rendendo inapplicabile la sua

Tabella 1
Confronto delle tecniche di sequenziamento utilizzate per l'analisi del microbiota.

Metodologia analitica	Tipo di approccio	Microrganismi identificabili	Vantaggi	Svantaggi
Sequenziamento del 16Sr RNA[1]	Targettato	Batteri e Archaea	- Rapidità di analisi - Costi relativamente contenuti - Disponibilità di banche dati per l'identificazione tassonomica - Possibilità di analizzare contemporaneamente un numero elevato di campioni - Possibilità di identificare anche microrganismi non coltivabili in laboratorio	- Scarsa risoluzione a livello di specie - Impossibilità di discriminare tra microrganismi vitali e non vitali - Impossibilità di stabilire nessi funzionali
Sequenziamento delle Regioni Trascritte Interne[1]	Targettato	Miceti	- Rapidità di analisi - Costi relativamente contenuti - Possibilità di analizzare contemporaneamente un numero elevato di campioni - Possibilità di identificare anche microrganismi non coltivabili in laboratorio	- Indisponibilità di banche dati aggiornate ed esaustive per l'identificazione tassonomica - Impossibilità di discriminare tra microrganismi vitali e non vitali - Impossibilità di stabilire nessi funzionali
Metagenomica shotgun[1]	Non targettato	Batteri, Archaea, Miceti, Virus, Protozoi e Ospite	- Analisi di tutti i microrganismi presenti in un campione di interesse senza bias di selezione - Elevata risoluzione tassonomica	- Impossibilità di discriminare tra microrganismi vitali e non vitali - Costi elevati - Difficoltà legate all'analisi computazionale - Impossibilità di stabilire nessi funzionali
Metatrascrittomica	Non targettato	Batteri, Archaea, Miceti, Virus, Protozoi e Ospite	- Analisi dell'espressione genica di tutti i microrganismi presenti in un campione di interesse, incluso l'ospite - Possibilità di stabilire nessi funzionali	- Costi elevati - Difficoltà legate all'analisi computazionale

[1]*Vedi Glossario.*

selezione durante la sintesi del cDNA, sono stati sviluppati e implementati vari approcci alternativi (21). Tra questi, la rimozione degli rRNA mediante specifiche biglie magnetiche, rappresenta un'opzione attraente. L'RNA residuo, rappresentativo di geni trascrizionalmente attivi, viene utilizzato per preparare una libreria che viene amplificata e, poi, sequenziata (21).

Oltre agli aspetti tecnici relativi all'estrazione, alla qualità e alla purificazione dei campioni di RNA, va sottolineato che non sono ancora disponibili strumenti bioinformatici completi per l'analisi dei dati di metatrascrittomica (2) (Tabella 1).

Metabolomica

Questo approccio analitico è utilizzato per determinare i profili dei metaboliti (metaboloma) prodotti da un dato ceppo o da un singolo campione. Le piattaforme più comunemente usate per caratterizzare il metaboloma includono la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) e la spettrometria di massa (MS) collegate ad un sistema di separazione di cromatografia liquida (11).

Per gli studi di metabolomica sono necessarie una attenta raccolta dei campioni e appropriate condizioni di conservazione. Ad esempio, i liquidi biologici devono essere separati in aliquote per diminuire il numero di cicli di scongelamento. Quando si raccolgono campioni come plasma/siero, liquido cerebro-spinale e tessuti, devono essere considerati i cambiamenti metabolici indotti da stress, come quelli promossi da catecolammine o da ormoni. L'utilizzo di soluzioni che contengano detergenti o polimeri dovrebbero essere evitati per prevenire interferenze con la spettrometria di massa. Il processo di pretrattamento dei campioni dipende dai metaboliti target, dal tipo di campione e dagli strumenti utilizzati per l'analisi; tra le tecniche più comunemente utilizzate, rientrano l'estrazione con solventi acquosi e solventi con percentuale organica (13).

La metabolomica fornisce informazioni sulla composizione dei metaboliti secreti e modulati dalla comunità microbica, quindi consente una comprensione delle dinamiche funzionali che influenzano le interazioni tra la comunità e l'ospite. Questo approccio, pertanto, può integrare i dati di metagenomica e metatranscrittomica (21).

Fase post-analitica

Indipendentemente dal metodo utilizzato per lo studio del microbioma, i risultati comprenderanno matrici di dati dei campioni rispetto alle caratteristiche microbiche (per esempio specie, taxa, geni e vie metaboliche) (22). Per analizzare il gran numero di dati prodotti dalle analisi di NGS sono disponibili diversi protocolli bioinformatici (serie prescritte di fasi di elaborazione che convertono i dati grezzi in materiale interpretabile) (Figura 2). L'obiettivo di tali protocolli è assegnare ciascuna sequenza di DNA ad un livello tassonomico (dal *phylum* alla specie) per determinare la composizione e l'abbondanza microbica di un campione (14). Nella maggior parte degli studi di metagenomica, l'analisi delle sequenze si prefigge di individuare la diversità microbica differenziale e l'abbondanza dei *taxa* o di componenti funzionali (ad esempio, geni e vie metaboliche) tra i gruppi di confronto (come ad esempio gruppo trattato *versus* gruppo di controllo) (16).

Nonostante i numerosi progressi in questo campo, sono sorti alcuni limiti dell'analisi bioinformatica, legati soprattutto alle differenze nei protocolli molecolari utilizzati dai laboratori. Inoltre, i metodi di NGS sono particolarmente sensibili alla distorsione della profondità del sequenziamento, a causa della difficoltà di individuare microrganismi poco rappresentati. Infine, le diverse metodologie per le analisi bioinformatiche (ad esempio, raggruppamento di OTUs, assegnazione tassonomica o analisi statistica) possono influenzare sostanzialmente i risultati (10).

Il primo passo dell'analisi bioinformatica consiste nella valutazione della qualità dei dati di sequenza utilizzando software come FastQC (23). Successivamente, in base al tipo di approccio molecolare utilizzato, si utilizzeranno specifiche strategie di analisi.

Nel caso del sequenziamento del 16S rRNA, sequenziando le regioni variabili (V1-V9), è possibile raggruppare le sequenze ottenute basandosi su soglie di similarità di sequenza predefinite (1) per classificare i microorganismi in OTU che sono utilizzate per effettuare le analisi filogenetiche (14). La soglia di identità di sequenza è il 94,5% per i generi e l'86,5% per le famiglie (14). Tipicamente, per valori di similarità di sequenza >97%, le sequenze sono clusterizzate in OTU. Recentemente, tale soglia è stata rivalutata a causa della disponibilità di un gran numero di sequenze. È stato suggerito che le soglie di identità ottimali siano aumentate a circa il 99% o più (14). La scelta di questa soglia, tuttavia, è spesso arbitraria in quanto tali tagli non corrispondono a tagli biologicamente rilevanti e possono cambiare in base alla scelta delle regioni variabili sequenziate (16). Indipendentemente dalla soglia utilizzata, le OTU consistono di gruppi di sequenze di DNA utilizzate per classificare gruppi di microrganismi strettamente correlati (1,10). Durante l'assegnazione, tutte le sequenze vengono filtrate in base alla qualità e raggruppate (16). La matrice finale di abbondanza consiste in un valore che corrisponde alla conta di ogni OTU tra i differenti campioni (in dati a selezione incrociata) o in punti nel tempo (dati longitudinali). Le informazioni sui microbi costituenti ogni campione possono essere meglio osservate correlando i dati di abbondanza relativa con informazioni filogenetiche: GraPhlAn e Krona sono due metodi alternativi per ottenere tale rappresentazione (9). Sebbene uno dei principali vantaggi del raggruppamento in OTU sia il tempo di analisi, la loro interpretazione biologica rimane una sfida (10). Poiché le differenze genetiche delle specie raggruppate nelle stesse OTU vengono trascurate, il raggruppamento porta ad una perdita della diversità effettiva. È importante, inoltre, sottolineare che il metodo utilizzato per il raggruppamento delle OTU influenza direttamente i risultati finali (14). I pacchetti software di bioinformatica open source, come Mothur (14) e QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), che integra un approccio combinatorio per il raggruppamento di OTU (2), combinano tutte le fasi di elaborazione delle sequenze, senza applicare una procedura standardizzata e modifiche dei parametri analitici che possono portare ad un eccesso di sovra- o sotto- interpretazione della composizione microbica (14). Le sequenze sono allineate ai database di riferimento per l'assegnazione tassonomica. Di conseguenza, la limitazione di questi approcci è che possono essere identificate solo le specie batteriche annotate nelle banche dati. Pertanto, i batteri sconosciuti, corrispondenti alle sequenze non allineate, non sono identificati. Successivamente, le sequenze non assegnate sono raggruppate in base alla loro similarità di sequenza. In questo modo, l'assegnazione tassonomica è più efficiente e dovrebbe evitare la mancanza di informazioni causata dai limiti di database di genomi batterici (2). Recentemente, è possibile utilizzare strategie alternative, non basate sulle OTU, quali DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2), UNOISE2 e Deblur, che utilizzano metodi statistici per correggere gli errori di sequenza negli ampliconi e permettere una più accurata identificazione tassonomica (2). Dopo l'assegnazione tassonomica, le comunità batteriche vengono confrontate per evidenziare differenze significative fra i gruppi (ad esempio pazienti *versus* sani). Uno degli approcci più utilizzati a questo scopo è il metodo UniFrac che permette il confronto tra gruppi misurando la distanza filogenetica tra insiemi di *taxa* attraverso l'esecuzione di diversi test (2). Infine, il sequenziamento del 16S rRNA permette di predire il profilo funzionale assumendo che sia la somma dei profili funzionali di tutte le specie identificate (24, 25).

Nel caso di analisi di metagenomica shotgun, l'assemblaggio delle sequenze può essere effettuato *de*

novo, basandosi su genomi di riferimento, o un ibrido di entrambi i metodi. Tra i software comunemente utilizzati per l'assemblaggio *de novo* figurano Metavelvet, IDBA-UD, metaSPAdes e MEGAHIT. Gli assemblatori basati sull'allineamento delle sequenze rispetto ad un genoma di riferimento, come MetaCompass, sono limitati dalla disponibilità di genomi di riferimento e dalla qualità dei database (16). Al fine di superare i limiti di entrambi gli approcci, sono stati sviluppati assemblatori specifici per la metagenomica shotgun, quali Soapdenovo, Velvet, Metavelvet, Meta-ibda, Genovo, Bambus2 e Ray-Meta. Attualmente, non esiste un consenso unico sulla migliore strategia di assemblaggio (2). Infatti, mentre quando si assembla un singolo genoma è possibile utilizzare la copertura di sequenziamento per identificare le regioni ripetute e gli errori di sequenziamento, nel caso di un metagenoma la copertura di sequenziamento è una conseguenza dell'abbondanza di ogni genoma all'interno della comunità analizzata. L'assemblatore dovrebbe, quindi, essere in grado di ottenere una buona copertura dei genomi altamente rappresentati, senza perdere quelli poco rappresentati. Va, inoltre, notato che, poiché il DNA umano e batterico dovrebbero essere i più rappresentati nei dati metagenomici, l'assemblaggio di microbi scarsamente rappresentati può risultare molto difficile e può generare una perdita di informazioni. Di conseguenza, è necessaria un'elevata profondità di sequenziamento per essere sicuri di ottenere sequenze informative che rappresentino l'intera comunità (2). Un'altra difficoltà della fase di assemblaggio è rappresentata dalla possibilità di avere nello stesso metagenoma due ceppi della stessa specie batterica, i cui genomi possono differire per pochi nucleotidi; PanPhlAn è un tool open source in grado di garantire una risoluzione a livello di ceppo, compresa l'identificazione di nuovi ceppi, dai dati di metagenomica (2). Gli approcci shotgun, infine, consentono anche un'analisi di tipo funzionale, basata sull'identificazione dei geni per dedurre le loro probabili funzioni. A tal fine, sono stati sviluppati e ottimizzati diversi metodi, quali Fraggenescan, Metagenemark e Glimmer-MG. Una volta identificati i geni, possono essere utilizzate banche dati specifiche per le predizioni funzionali, ad esempio IMG, Metaref, dbCAN e Humann (2).

A differenza dei due precedenti approcci, per gli studi di metatrascrittomica non sono ancora disponibili protocolli di analisi completi. Programmi bioinformatici, come SOAPdenovo, sono stati utilizzati per l'allineamento e l'assemblaggio di dati metatrascrittomici da campioni microbici (16).

COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA UMANO IN CONDIZIONI FISIOLOGICHE E IN ASSOCIAZIONE A SPECIFICHE PATOLOGIE

Apparato digerente

È ormai noto che il microbiota intestinale svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dello stato di salute (2, 26, 27). Il microbiota intestinale, infatti, stabilisce una relazione simbiotica con la mucosa intestinale e conferisce all'individuo sano funzioni sostanziali metaboliche, immunologiche e protettive (28). In particolare, il microbiota intestinale:

- potenzia l'abilità di estrarre energia dagli alimenti;
- modifica lo stimolo dell'appetito;
- partecipa alla sintesi di vitamine (folati, vitamina K, biotina, riboflavina, cobalamina e altre vitamine del gruppo B) e amminoacidi;
- influenza la biotrasformazione degli acidi biliari;
- aumenta la biodisponibilità dei minerali;
- favorisce il metabolismo di alcune molecole (inclusi gli xenobiotici) (2,26,27).

Il microbiota intestinale, inoltre, è coinvolto in alcuni processi biologici di base, inclusi la regolazione dello sviluppo dell'epitelio, la modulazione del fenotipo metabolico e la stimolazione dell'immunità innata. In aggiunta, protegge l'organismo dai patogeni esterni attraverso la colonizzazione competitiva o la produzione di agenti antimicrobici (2,26,27) (Tabella 2).

Si stima che il microbiota intestinale umano sia composto da oltre 35 000 specie batteriche, raggruppate in pochi *phyla* e in grado di esprimere oltre 10 milioni di geni non ridondanti (28,29). I *phyla* dominanti sono: Firmicutes (60-80%, batteri Gram-positivi con più di 200 generi, di cui i più importanti sono: Ruminococcus, Clostridium, Eubacterium, Lactobacillus, Faecalibacterium, Roseburia e Mycoplasma) e Bacteroidetes (20–30%, batteri Gram-negativi a cui appartengono i generi Bactereroides, Prevotella e Xylanibacter). I seguenti *taxa* sono presenti in proporzioni minori: Actinobacteria (<10%, batteri Gram-negativi a cui appartiene il genere Bifidobacterium), Proteobacteria (<1%, batteri Gram-negativi a cui appartengono i generi Escherichia, Desulfovibrio ed Enterobacteriacae) e Verrucomicrobia (<1%, batteri Gram-negativi a cui appartengono i generi Akkermansia, Fusobacteria e Cyanobacteria). La composizione e le concentrazioni luminali del microbiota differiscono nelle varie regioni dell'apparato digerente (27). Più nello specifico, è ormai noto che i *phyla* Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria sono predominanti nello stomaco umano, mentre Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes si trovano frequentemente nel colon (29). I membri del genere Bacteroides, in particolare, partecipano al metabolismo dei carboidrati, determinando la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), come butirrato, acetato e propionato, e gas (27,28,30) (Tabella 2).

Diversi fattori (dieta, farmaci quali antibiotici, inibitori della pompa protonica, antinfiammatori non steroidei, supplementazione marziale, metotrexato, metformina, stress cronico e infezioni del tratto gastrointestinale) possono alterare la composizione del microbiota intestinale determinando una transizione da micorganismi simbiotici a potenziali patogeni (27). In particolare, il rapporto tra Bateroidetes e Firmicutes, e l'abbondanza relativa di alcuni generi considerati "benefici" come Akkermansia e Bifidobacterium rispetto

a anaerobi facoltativi, come *Escherichia coli*, sono stati proposti per la definizione di "enterotipi" microbici associati ad un maggiore o minor rischio di sviluppare specifiche patologie (31).

La disbiosi del microbiota intestinale, infatti, è stata associata a numerose patologie, tra cui malattie autoimmuni, infiammatorie croniche intestinali, metaboliche e cardiovascolari (obesità, diabete e aterosclerosi), patologie epatiche e infezioni batteriche (26,27,32,33) (Tabella 2). In aggiunta, alterazioni del microbiota intestinale sono state associate anche ad alcuni tipi di tumori, disturbi psichiatrici (come disturbi dello spettro autistico, schizofrenia e disturbo depressivo maggiore) e a patologie del sistema nervoso centrale (come la sclerosi multipla, l'Alzheimer e il morbo di Parkinson) (27,34). Infatti, l'asse intestino-cervello consiste nella comunicazione bidirezionale tra il sistema gastrointestinale e il sistema nervoso centrale; questa comunicazione svolge un ruolo nell'omeostasi della segnalazione neurale, ormonale e immunologica. In particolare, il microbiota intestinale induce la produzione di molecole di segnalazione bioattive [acidi grassi a catena corta (SCFA), catecolamine, neurotrasmettitori e neuropeptidi] ed è in grado di attivare il sistema immunitario (27,34). D'altra parte, il sistema nervoso centrale invia all'intestino segnali in grado di regolare le funzioni gastrointestinali, come la motilità, la secrezione e la produzione di mucina (27,34). Pertanto, non deve sorprendere che in un numero crescente di patologie neuropsichiatriche siano presenti alterazioni del microbiota intestinale (Tabella 2).

Apparato respiratorio

Nell'apparato respiratorio la varietà nell'origine embriologica e le caratteristiche strutturali distinte creano microambienti unici per la colonizzazione microbica. La temperatura, il pH, la qualità della mucina, la funzione ciliare, la tensione dell'ossigeno e le risposte immunitarie della mucosa modellano l'ecologia microbica di ciascuno di questi siti. Di conseguenza, le comunità microbiche all'interno delle vie aeree mostrano una variazione biogeografica significativa (35).

È importante sottolineare che lo studio del microbioma del tratto respiratorio inferiore è ostacolato dalla necessità di tecniche di campionamento invasive, come broncoscopie o aspirati tracheali da soggetti intubati. Indubbiamente, i campioni del tratto respiratorio superiore sono di più semplice ottenimento, sebbene sia discutibile quanto tali campioni possano essere rappresentativi delle interazioni ospite/microbi che avvengono nel tratto respiratorio inferiore. L'espettorato indotto è un'altra risorsa per lo studio del microbiota delle basse vie respiratorie; tuttavia, la contaminazione dalla cavità orale, carica di microbi, è un problema da non sottovalutare (36).

Il microbiota polmonare è composto da circa 2000 specie batteriche per cm^2 (37). Il principale contributo alla composizione del microbiota delle vie aeree inferiori sembra essere il microbiota delle vie aeree superiori (35-37). La densità microbica all'interno dei polmoni è bassa; al contrario, la quantità di batteri nel tratto respiratorio superiore è circa 100-10 000 volte più grande che nel tratto respiratorio inferiore (38).

Il microbiota polmonare di individui sani è costituito da sei *phyla* batterici dominanti: Firmicutes (a cui appartengono i generi Streptococcus e Veillonella), Bacteroides (a cui appartiene il genere Prevotella), Proteobacteria, Fusobacteria, Acidobacteria e Actinobacteria (a cui appartiene il Tropheryma whipplei). La cavità nasale, invece, è dominata dai generi Propionibacterium, Corynebacterium, Staphylococcus e Moraxella, e la cavità orale dai generi Prevotella, Veillonella, Streptococcus, Haemophilus, Fusobacterium, Neisseria, e Corynebacterium (38).

In condizioni fisiologiche, il microbiota residente nelle vie aeree superiori e inferiori svolge diversi ruoli importanti per lo sviluppo e il mantenimento dell'omeostasi del tratto respiratorio e dell'intero organismo (38). Infatti, uno squilibrio del microbiota delle vie aeree è stato riscontrato in numerose patologie, tra cui fibrosi cistica, fibrosi polmonare idiopatica, bronchiettasie, asma, sarcoidosi, broncopneumopatia cronica ostruttiva, infezioni virali e rinosinusite cronica (35-38,40,41) (Tabella 2). In particolare, tali patologie sono spesso caratterizzate da un aumento della carica batterica totale e dalla presenza di alcune specie dominanti, come: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus auerus* e *Burkholderia spp*. nella fibrosi cistica; Moraxella, Haemophilus e Neisseria nell'asma; e Haemophilus, Veillonella, Streptococcus e Neisseria nella fibrosi polmonare idiopatica (36).

Cute

La pelle, rappresentando il rivestimento del nostro corpo, costituisce una vera e propria barriera rispetto all'ambiente esterno (42,43): anche se esposta alla colonizzazione ambientale, funge da filtro selettivo, in gran parte inadatto alla colonizzazione permanente da parte di molti microrganismi (44). Ciononostante, un gruppo eterogeneo di batteri, funghi e virus costituisce il microbiota cutaneo, per una presenza stimata di circa un milione di batteri/cm^2 (42).

La composizione quali/quantitativa del microbiota cutaneo è caratterizzata da una grande variabilità inter- e intra-individuale; infatti, diversi fattori, quali umidità, temperatura, pH, presenza di follicoli piliferi e/o le ghiandole sebacee, creano specifici microambienti caratterizzati da una differente flora residente (42,45, 46). È noto che almeno 19 *phyla* fanno parte del microbioma batterico della pelle, di cui i principali sono Actinobacteria (51,8%), Firmicutes (24,4%), Proteobacteria (16,5%) e Bacteroidetes (6,3%) (43,45). Inoltre, è importante sottolineare che le attuali tecniche di rilevamento microbico hanno dimostrato che i batteri non sono presenti solo sulla superficie della pelle, ma si trovano anche negli strati più profondi fino al derma e al tessuto adiposo sottocutaneo (44).

Tabella 2
Principali caratteristiche del microbiota umano nei vari distretti corporei e principali patologie associate ad uno stato di disbiosi.

Distretto corporeo	Biodiversità	Funzioni	Taxa dominanti	Patologie associate
Apparato Digerente	Alta	- Estrazione di energia dagli alimenti - Modulazione dello stimolo dell'appetito - sintesi di vitamine (folati, vitamina K, biotina, riboflavina, cobalamina e altre vitamine del gruppo B) - Sintesi di amminoacidi - Biotrasformazione degli acidi biliari - Aumento della biodisponibilità dei minerali - Metabolismo di specifiche molecole (inclusi gli xenobiotici) - Regolazione dello sviluppo dell'epitelio intestinale - Modulazione del fenotipo metabolico - Stimolazione dell'immunità innata - Protezione dai patogeni esterni	- Firmicutes (60-80%) - Bacteroidetes (20–30%) - Actinobacteria (<10%) - Proteobacteria (<1%) - Verrucomicrobia (<1%)	- Obesità (26,32) - Diabete (26) - Celiachia (33) - Malattie infiammatorie croniche intestinali (Crohn e rettocolite ulcerosa) (53,54) - Malattia da reflusso gastroesofageo (55) - Disturbi dello spettro autistico (26, 56) - Schizofrenia (56) - Disturbo depressivo maggiore (26) - Sclerosi multipla (57) - Alzheimer (3,27) - Morbo di Parkinson (58) - Tumore gastrico (29) - Epatocarcinoma (29) - Adenocarcinoma pancreatico (29) - Cancro del colonretto (29)
Apparato Respiratorio	- Bassa nei polmoni - Alta nelle vie respiratorie superiori	- Protezione dai patogeni esterni - Sviluppo e modulazione del sistema immunitario	- Firmicutes - Bacteroides - Proteobacteria - Fusobacteria - Acidobacteria - Actinobacteria	- Fibrosi cistica (36,38) - Fibrosi polmonare idiopatica (36) - Bronchiettasie (36,38) - Asma (35,37-39) - Sarcoidosi (41) - Broncopneumopatia cronica ostruttiva (38) - Infezioni virali (37,38) - Rinosinusite cronica (39,40)
Cute	Alta	- Protezione dai patogeni esterni - Maturazione e omeostasi dell'immunità cutanea	- Actinobacteria (51,8%) - Firmicutes (24,4%); - Proteobacteria (16,5%) - Bacteroidetes (6,3%)	- Dermatite atopica (42,44-47) - Psoriasi (42,44-47) - Acne vulgaris (42,44-47) - Forfora (42,44-47) - Lesioni a lenta cicatrizzazione (42,44-47) - Idrosadenite suppurativa (42,44-47) - Ferite cutanee croniche (42,44-47)
Apparato Urogenitale	Bassa	- Protezione dai patogeni esterni - Modulazione del sistema immunitario	- Lactobacillus (F) - Gardnerella (F) - Corynebacterium (M) - Staphylococcus (M) - Streptococcus (M)	- Incontinenza urinaria (59) - Cistite (59) - Infezioni croniche delle vie urinarie (52,59) - Cancro della vescica (49) - Carcinoma renale (49) - Endometriosi (51) - Vaginosi (51) - Carcinoma della cervice uterina (51,60) - Carcinoma endometriale (51,60) - Carcinoma ovarico (60) - Infertilità (51,52) - Iperplasia prostatica benigna (48) - Cancro della prostata (48,50)

F, Femmine; M, Maschi

Da un punto di vista funzionale, è noto che i batteri cutanei commensali producono molecole con proprietà antimicrobiche in grado di limitare la crescita dei patogeni cutanei (42). I microbi residenti nella pelle, inoltre, svolgono un ruolo importante nella maturazione e nell'omeostasi dell'immunità cutanea (46).

Alterazioni del microbiota cutaneo sono state descritte in associazione con numerose patologie, incluse dermatite atopica, psoriasi, acne vulgaris, forfora, lesioni a lenta cicatrizzazione, idrosadenite suppurativa (42,44-47). In particolare, la crescita eccessiva dello *Staphylococcus aureus*, e la concomitante riduzione dello *Staphylococcus epidermidis*, è una caratteristica riscontrata in diverse patologie della cute (44).

Infine, oltre alle classiche patologie cutanee, è stato dimostrato che i microrganismi che colonizzano la pelle influenzano anche la guarigione delle ferite croniche prevalenti nelle popolazioni anziane o nei pazienti affetti da diabete e/o obesità (47) (Tabella 2).

Apparato uro-genitale

Storicamente, la vescica era stata considerata sterile; tuttavia, studi recenti hanno rivelato la presenza di microrganismi anche in questo distretto corporeo, aprendo la strada ad ulteriori indagini volte a definire il ruolo del microbiota urinario in condizioni fisiologiche e in associazione a varie patologie (48). Come già discusso anche per le vie aeree inferiori, lo studio del microbiota urinario risente molto della difficoltà di ottenere campioni rappresentativi dei diversi distretti (48). Infatti, dal momento che la maggior parte degli studi è stata eseguita utilizzando urina e/o urina cateterizzata, resta difficile stabilire quali parti del tratto urinario siano colonizzate e quali specie provengano da altri distretti (49). Inoltre, non va sottovalutata la possibilità di contaminazioni da parte del microbiota cutaneo e/o vaginale (49).

Esiste una grande differenza nella composizione del microbiota urogenitale maschile e femminile, quest'ultimo essendo caratterizzato in generale da una minore biodiversità (48). In particolare, il microbiota urogenitale femminile è caratterizzato dalla presenza dei *phyla* Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria e Fusobacteria, ma è largamente predominato dai generi Lactobacillus e Gardnerella; i generi Corynebacterium, Staphylococcus e Streptococcus sono, invece, più abbondanti nel microbiota urogenitale maschile (49,50).

Questi microbi residenti contribuiscono al mantenimento dello stato di salute e le loro alterazioni sono state associate a diverse patologie sia nell'uomo che nella donna (48-52).

Infine, è importante sottolineare che il microbiota del sistema riproduttivo femminile e maschile non solo sono importanti per la salute dell'individuo, ma possono avere un ruolo nella fertilità e influenzare lo sviluppo successivo del microbiota nel nascituro (51, 52) (Tabella 2).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Negli ultimi anni, lo sviluppo e la diffusione delle tecniche di NGS ha permesso lo studio di comunità microbiche con un livello di risoluzione non immaginabile in precedenza. Di conseguenza, le conoscenze relative al ruolo e alle funzioni del microbiota umano in vari distretti corporei sono aumentate, permettendo di assegnare al microbiota ruoli fondamentali nello sviluppo e nel mantenimento dell'omeostasi corporea, anche in relazione a varie fasi della vita. D'altra parte, è ormai ben noto che alterazioni quali/quantitative del microbiota sono state associate a numerose patologie e questa tendenza è in aumento. Dal momento che il microbiota può essere modificato con interventi mirati, la definizione della sua composizione in condizioni fisiologiche e patologiche acquisisce un'importanza cruciale per lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici e/o di approcci terapeutici finalizzati alla manipolazione del microbiota. In questo contesto, la definizione di protocolli standardizzati e di linee guida comuni, e dunque il ruolo della Medicina di Laboratorio, appare fondamentale per la diffusione di analisi di metagenomica in contesti diagnostici e acquisirà una rilevanza maggiore nel prossimo futuro. In particolare, l'analisi del 16S rRNA batterico sta già mostrando la sua potenziale utilità in ambito diagnostico e, attraverso la manipolazione del microbioma, potrà diventare uno strumento prognostico e terapeutico nel prossimo futuro.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Araos R, D'Agata EMC. The human microbiota and infection prevention. Infect Control Hosp Epidemiol 2019;40:585-9.
2. D'Argenio V. Human microbiome acquisition and bioinformatic challenges in metagenomic studies. Int J Mol Sci 2018;19:383.
3. Di Maggio F, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte II: metodologie di biologia molecolare. Biochim Clin 2019;43:435-48.
4. D'Argenio V. The Prenatal Microbiome: A new player for human health. High Throughput 2018;7:38.
5. Dominguez-Bello MG, Godoy-Vitorino F, Knight R, et al. Role of the microbiome in human development. Gut 2019;68:1108-14.
6. Gilbert J, Blaser MJ, Caporaso JG, et al. Current understanding of the human microbiome. Nat Med 2018; 24:392-400.
7. Malla MA, Dubey A, Kumar A, et al. Exploring the human microbiome: the potential future role of next-generation sequencing in disease diagnosis and treatment. Front Immunol 2019;9:2868.

8. D'Argenio V, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte I: termini generali. Biochim Clin 2019;43:90-105.
9. Kuntal BK, Mande SS. Visual exploration of microbiome data. J Biosci 2019;44:119.
10. Lagier JC, Dubourg G, Million M, et al. Culturing the human microbiota and culturomics. Nat Rev Microbiol 2018;16:540-50.
11. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. Microbiome 2015;3:31.
12. Panek M, Čipčić Paljetak H, Barešić A, et al. Methodology challenges in studying human gut microbiota - effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. Sci Rep 2018;8:5143.
13. Chen MX, Wang SY, Kuo CH, et al. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. J Formos Med Assoc 2019;118 Suppl 1:S10-S22.
14. Koedooder R, Mackens S, Budding A, et al. Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. Hum Reprod Update 2019;25:298-325.
15. Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. Annu Rev Pathol 2019;14:319-38.
16. Galloway-Peña J, Hanson B. Tools for analysis of the microbiome. Dig Dis Sci 2020;65:674-85.
17. Davidson RM, Epperson LE. Microbiome sequencing methods for studying human diseases. Methods Mol Biol 2018;1706:77-90.
18. Schriefer AE, Cliften PF, Hibberd MC, et al. A multi-amplicon 16S rRNA sequencing and analysis method for improved taxonomic profiling of bacterial communities. J Microbiol Methods 2018;154:6-13.
19. Ranjan R, Rani A, Metwally A, et al. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. Biochem Biophys Res Commun 2016;469:967-77.
20. Xu J. Fungal DNA barcoding. Genome 2016;59:913-32.
21. Bashiardes S, Zilberman-Schapira G, Elinav E. Use of metatranscriptomics in microbiome research. Bioinform Biol Insights 2016;10:19-25.
22. Quince C, Walker AW, Simpson JT, et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. Nat Biotechnol 2017;35:833-44.
23. Claesson MJ, Clooney AG, O'Toole PW. A clinician's guide to microbiome analysis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017;14:585-95.
24. Laudadio I, Fulci V, Stronati L, et al. Next Generation Metagenomics. Methodological challenges and opportunities. OMICS 2019;23:327-33.
25. D'Argenio V. The High-Throughput analyses era: are we ready for the data struggle? High Throughput 2018;7:8.
26. Altveş S, Yildiz HK, Vural HC. Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases. Biosci Microbiota Food Health 2020;39:23-32.
27. Szablewski L. Human gut microbiota in health and Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis 2018;62:549-60.
28. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, et al. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol 2015;21:8787-803.
29. Meng C, Bai C, Brown TD, et al. Human gut microbiota and gastrointestinal cancer. Genomics Proteomics Bioinformatics 2018;16:33-49.
30. Valdes AM, Walter J, Segal E, et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. BMJ 2018;361:k2179.
31. Hills RD Jr, Pontefract BA, Mishcon HR, et al. Gut microbiome: profound implications for diet and disease. Nutrients 2019;11:1613.
32. Nardelli C, Granata I, D'Argenio V, et al. Characterization of the duodenal mucosal microbiome in obese adult subjects by 16S rRNA sequencing. Microorganisms 2020;8:485.
33. Iaffaldano L, Granata I, Pagliuca C, et al. Oropharyngeal microbiome evaluation highlights Neisseria abundance in active celiac patients. Sci Rep 2018;8:11047.
34. D'Argenio V, Sarnataro D. Microbiome influence in the pathogenesis of prion and Alzheimer's Diseases. Int J Mol Sci 2019;20:4704.
35. Ver Heul A, Planer J, Kau AL. the human microbiota and asthma. Clin Rev Allergy Immunol 2019;57:350-63.
36. Wypych TP, Wickramasinghe LC, Marsland BJ. The influence of the microbiome on respiratory health. Nat Immunol 2019;20:1279-90.
37. Pulvirenti G, Parisi GF, Giallongo A, et al. Lower airway microbiota. Front Pediatr 2019;7:393.
38. Budden KF, Shukla SD, Rehman SF, et al. Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. Lancet Respir Med 2019;7:907-20.
39. Barcik W, Boutin RCT, Sokolowska M, et al. The role of lung and gut microbiota in the pathology of asthma. Immunity 2020;52:241-55.
40. Kumpitsch C, Koskinen K, Schöpf V, et al. The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. BMC Biol 2019;17:87.
41. D'Argenio V, Casaburi G, Precone V, et al. A common microbial signature is present in the lower airways of interstitial lung diseases including sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 2018;35:354-62.
42. Balato A, Cacciapuoti S, Di Caprio R, et al. Human microbiome: composition and role in inflammatory skin diseases. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2019;67:1-18.
43. Cundell AM. Microbial ecology of the human skin. Microb Ecol 2018;76:113-20.
44. Lunjani N, Hlela C, O'Mahony L. Microbiome and skin biology. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2019;19:328-33.
45. Schneider AM, Nelson AM. Skin microbiota: Friend or foe in pediatric skin health and skin disease. Pediatr Dermatol 2019;36:815-22.
46. Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y. Skin microbiota–host interactions. Nature 2018;553:427-36.
47. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. Nat Rev Microbiol 2018;16:143-55.
48. Bajic P, Dornbier RA, Doshi CP, et al. Implications of the genitourinary microbiota in prostatic disease. Curr Urol Rep 2019;20:34.
49. Markowski MC, Boorjian SA, Burton JP, et al. The microbiome and genitourinary cancer: A collaborative review. Eur Urol 2019;75:637-46.
50. Porter CM, Shrestha E, Peiffer LB, et al. The microbiome in prostate inflammation and prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis 2018;21:345-54.
51. Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, et al. Microbiota and human reproduction: the case of female infertility. High Throughput 2020;9:12.
52. Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, et al. Microbiota and human reproduction: the case of male infertility. High Throughput 2020;9:10.
53. D'Argenio V, Precone V, Casaburi G, et al. An altered gut microbiome profile in a child affected by Crohn's disease normalized after nutritional therapy. Am J Gastroenterol 2013;108:851-2.
54. Alshehri D, Saadah O, Mosli M, et al. Dysbiosis of gut microbiota in inflammatory bowel disease: Current therapies and potential for microbiota-modulating therapeutic approaches. Bosn J Basic Med Sci 2020. doi: 10.17305/bjbms.2020.5016.

55. Park CH, Lee SK. Exploring esophageal microbiomes in esophageal diseases: a systematic review. J Neurogastroenterol Motil 2020;26:171-9.
56. Eltokhi A, Janmaat IE, Genedi M, et al. Dysregulation of synaptic pruning as a possible link between intestinal microbiota dysbiosis and neuropsychiatric disorders. J Neurosci Res 2020;98:1335-69.
57. Montgomery TL, Künstner A, Kennedy JJ, et al. Interactions between host genetics and gut microbiota determine susceptibility to CNS autoimmunity. Proc Natl Acad Sci U S A 2020;117:27516-27.
58. Zhang F, Yue L, Fang X, et al. Altered gut microbiota in Parkinson's disease patients/healthy spouses and its association with clinical features. Parkinsonism Relat Disord 2020;81:84-8.
59. Bhide A, Tailor V, Khullar V. Interstitial cystitis/bladder pain syndrome and recurrent urinary tract infection and the potential role of the urinary microbiome. Post Reprod Health 2020;26:87-90.
60. Alizadehmohajer N, Shojaeifar S, Nedaeinia R, et al. Association between the microbiota and women's cancers - Cause or consequences? Biomed Pharmacother 2020;127:110203.

GLOSSARIO

16rRNA	Componente della subunità 30S del ribosoma procariotico. Usato a scopi filogenetici per l'elevata variabilità tra taxa differenti
Metabolomica	Branca delle scienze "omiche" che studia i metaboliti prodotti in determinati processi cellulari
Microbioma	Insieme dei genomi di tutti i microrganismi che costituiscono un determinato microbiota
Next Generation Sequencing (NGS)	Insieme di tecnologie in grado di sequenziare contemporaneamente milioni di sequenze target e caratterizzate, pertanto, da un'elevata produttività in termini di basi nucleotidiche sequenziate/seduta analitica
RegioniTrascritte Interne (ITS)	Tipo di sequenziamento NGS in cui non si effettua una selezione a priori delle regioni genomiche target da sequenziare
Sequenziamento Shotgun	Regione non codificante del DNA ribosomiale usata per studi filogenetici, in quanto caratterizzata da un elevato tasso di mutazioni anche tra specie vicine. Negli eucarioti esistono 2 tipi di ITS chiamate ITS1 e ITS2
Studio longitudinale	Tipologia di studio scientifico in cui un determinato parametro viene valutato nel corso del tempo negli stessi individui
Studio trasversale	Tipologia di studio scientifico descrittivo in cui uno o più parametri vengono valutati in un determinato momento in più individui per effettuare delle successive comparazioni
Taxon (unità tassonomica)	Raggruppamento di organismi associati in base a caratteristiche comuni e che possono essere organizzati in una scala gerarchica in base alla similarità. In biologia, le categorie tassonomiche alle quali vengono associati i diversi *taxa* sono, nell'ordine: Regno, Phylum, Classe, Ordine, Famiglia, Genere, Specie e Sottospecie