



**Caratterizzazione funzionale del microbiota
intestinale e risposta immune associate in pazienti
con “Malattia Celiaca Potenziale” (MCP)**

**Functional characterization of the gut microbiota and
associated immune response in patients with
“Potential Celiac Disease” (PDC)**



Sommario

Dati amministrativi.....	3
Introduzione.....	6
Razionale.....	8
Scopo dello studio.....	8
Obiettivi dello studio.....	9
Disegno dello studio.....	10
Popolazione in studio.....	11
Endpoint.....	12
Procedure dello studio.....	12
Piano statistico.....	13
Gestione degli eventi avversi.....	16
Aspetti etici e rispetto della confidenzialità.....	17
Proprietà dei dati.....	18
Report finale e pubblicazione dei risultati.....	18
Indipendenza dello studio.....	18
Copertura assicurativa.....	18
Riferimenti bibliografici.....	18



Dati amministrativi

Promotore

Nome Cognome: Antonino Salvatore Calabrò
Indirizzo: Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche "Mario Serio", Largo Brambilla, 3 50134 FIRENZE
Tel: 055 7946017
Fax: 055 7946017
Cell: 329 256 3790
e-mail: antoninosalvatore.calabro@unifi.it

Centro clinico coordinatore

Centro di Riferimento Regionale per la Celiachia nell' adulto
Gastroenterologia Clinica, AOUC Firenze

Sperimentatore principale

Nome Cognome: Antonino Salvatore Calabrò
Indirizzo: Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche Mario Serio
Largo Brambilla, 3 50134 Firenze
Tel: 055 7946017
Fax: 055 7946017
Cell: 329 256 3790
e-mail: antoninosalvatore.calabro@unifi.it

Co-Sperimentatori

Nome Cognome: Amedeo Amedei
Indirizzo: Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Viale Pieraccini, 6 50139 Firenze
Tel: 055 2758330
Fax: 055 2758330
e-mail: amedeo.amedei@unifi.it

Nome Cognome: Daniela Renzi
Indirizzo: Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche Mario Serio
Viale Pieraccini, 6 50139 Firenze
Tel: 055 7946017
e-mail: daniela.renzi@unifi.it



Nome Cognome: Edda Russo

Indirizzo: Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Viale Pieraccini, 6 50139 Firenze

Tel: 055 2758330

Fax: 055 2758330

e-mail: edda.russo@unifi.it

Nome Cognome: Gabriele Lami

Indirizzo: Centro di Riferimento Regionale per la Celiachia nell' adulto Gastroenterologia
Clinica, AOUC Firenze

Tel: 3288424338

e-mail: lele08@virgilio.it

Centri clinici satellite -Sperimentatori principali dei centri clinici satellite

- Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Viale Pieraccini, 6 50139 Firenze –



Dichiarazione dello sperimentatore principale di conformità alla Dichiarazione di Helsinki, alla normativa nazionale ed al protocollo

Io sottoscritto, Prof. Antonino Salvatore Calabrò dichiaro di conoscere il protocollo di studio e di farmi garante perché questo venga condotto secondo quanto descritto ed in conformità a:

- principi dichiarati nella Dichiarazione di Helsinki
- Good Clinical Practice
- direttive comunitarie (Dir EU 200/2001 e seguenti) e prescrizioni normative nazionali di riferimento (DLvo 211/2003, DLvo 200/2007 e seguenti)

Eventuali modifiche alle procedure saranno apportate esclusivamente per tutelare la sicurezza, i diritti ed il benessere dei soggetti coinvolti nello studio.

- Dichiaro di coordinare lo studio assicurando che tutti coloro che collaboreranno alla sua esecuzione saranno a conoscenza del protocollo e degli eventuali emendamenti ed agiranno in piena coscienza dei propri obblighi.

In fede

Firenze, 03/02/2017

Prof. Antonino Salvatore Calabrò

Introduzione

La Malattia Celiaca (MC) è una patologia infiammatoria cronica dell'intestino tenue indotta in individui geneticamente predisposti dall'ingestione di glutine del frumento e di prolamine ad esso correlate presenti nell'orzo e nella segale (Farrell RJ et al, 2002). La prevalenza della malattia in Italia e, più in generale, nei paesi occidentali è approssimativamente dell'1%. Le manifestazioni cliniche della MC sono ampiamente variabili: accanto a quadri clinici classici caratterizzati dai tipici sintomi del malassorbimento intestinale (diarrea, dimagrimento, gonfiore e dolore addominale e, nei bambini in età evolutiva, arresto della crescita staturo-ponderale), sono spesso osservabili, specie nell'adulto, forme cliniche atipiche ad esordio pauci-sintomatico o con sintomi esclusivamente extraintestinali (aftosi recidivante del cavo, orale, artralgie, cefalea, difficoltà di concentrazione, profonda astenia e facile affaticabilità); in parenti di I grado di pazienti celiaci, diagnosticati nell'ambito di screening familiare, sono inoltre osservabili casi del tutto asintomatici, i cosiddetti celiaci silenti (Fasano A., 2005).

Dal punto di vista anatomico-patologico la MC è caratterizzata dalla presenza di un cospicuo infiltrato infiammatorio di natura linfo-plasmacellulare ed eosinofila del chorion mucoso e dalla presenza di atrofia di grado variabile (parziale, subtotale o totale) dei villi intestinali.

Dal punto di vista fisiopatologico, è generalmente accettato che la MC è dovuta ad un alterata risposta immunitaria di tipo linfocitario T nei confronti del glutine presente nel frumento, nell'orzo e nella segale (Ciccocioppo R. et al, 2005). E' stato ampiamente dimostrato che frammenti peptidici derivanti da una incompleta digestione della gliadina, sono in grado di attivare i linfociti CD4+ della lamina propria attraverso una interazione con le molecole HLA di classe II espresse sulle cellule presentanti l'antigene (APC), in particolare gli eterodimeri HLA-DQ2 (DQB1 *02, DQA1 *05) e DQ8 (DQB1 *03:02, DQA1 *03:01) (Qiao and SW et al, 2005).

In particolare, alcuni peptidi della gliadina attivano la risposta infiammatoria Th (T helper) 1 e Th17 della risposta immunitaria adattativa con la produzione di citochine infiammatorie (esempio INF gamma, TNF alfa, IL21) nella mucosa, causando severa infiammazione (Monteleone I.,2010). Ma ad oggi, il ruolo potenziale emergente delle citochine (IL-9 and IL-22) (Ryan AW,2005; Xu H, 2013) e sottoclassi di cellule T (Th9/Th22) in pazienti celiaci floridi (con villi atrofici) o potenziali (con anticorpi positivi ma villi ancora normali) non è stato ancora chiarito.

La diagnosi di MC è ancora basata sui criteri elaborati dalla "European Society for Gastroenterology Hepatology and Nutrition" che prevedono la presenza di specifici anticorpi nel siero dei pazienti (anticorpi anti-endomisio o EMA), il rilievo di atrofia dei villi con iperplasia delle cripte intestinali a dieta libera, cioè con glutine, e la remissione clinica completa dopo un periodo adeguato di dieta aglutinata (Walker-Smith JA, et al. 1990).

Tuttavia, ad oggi l'enteropatia da glutine prevede un'ampia gamma di manifestazioni che vanno da una mucosa istologicamente normale con esclusivo aumento del numero di linfociti intraepiteliali (IELs) ad una atrofia completa dei villi con iperplasia delle cripte (Marsh MN et al. 1992). Nel 1990 Ferguson ha introdotto i termini di CD latente e potenziale (Ferguson A, et al. 1993). In accordo con la definizione proposta da Ferguson, sono definiti

celiaci potenziali (MCP) i pazienti con anticorpi positivi (EMA e anti-transglutaminasi tissutale di classe IgA (tTGA), presenza dei geni HLA di suscettibilità (DQ2 e/o DQ8) ma con mucosa intestinale apparentemente normale (grado 0 di Marsh) o con minime alterazioni: aumento dei IELs, in numero superiore a 25/100 enterociti (Marsh 1) senza o con iperplasia delle cripte intestinali (Marsh 2). Con il termine di celiachia latente (MCL) si definiscono invece i soggetti che a dieta libera, cioè contenente glutine, hanno una mucosa normale (Marsh 0) o minimamente alterata (Marsh 1 o 2), ma che in precedenza abbiano avuto un rilievo istologico-biopsico di atrofia dei villi intestinali. Sul piano strettamente immunopatologico mentre i primi (MCP) sono soggetti che, pur essendo in grado di produrre gli anticorpi specifici della MC (EMA e tTGA), non hanno ancora completamente perso la tolleranza nei confronti del glutine, i secondi (MCP) sono soggetti francamente celiaci nei quali si è verificata una riacquisizione della tolleranza (Troncone R et al. 1996). Recentemente Matysiak-Budnik et al. (Matysiak-Budnik T, et al 2007) hanno effettuato una analisi retrospettiva in una coorte di 61 adulti con CD latente. I pazienti diagnosticati durante l'infanzia, avevano per varie ragioni, ripreso ad assumere glutine: una latenza a lungo termine è stata riscontrata in circa il 20% dei pazienti che, oltre a rimanere asintomatici, erano caratterizzati da una mucosa intestinale apparentemente normale al controllo istologico-biopsico. Per quanto riguarda i pazienti con MCP, sono stati pubblicati studi su casi anedottici e piccole coorti di pazienti (Collin P., et al. 1993; Kaukinen K., et al. 1998), ma la storia naturale di questa condizione rimane ad oggi ancora poco chiara.

Evidenze recenti suggeriscono che, dal punto di vista strettamente fisiopatologico, non è sufficiente l'ingestione di glutine a scatenare la celiachia in soggetti geneticamente predisposti, sottolineando l'importanza di altri fattori nel determinismo della malattia. Tra questi un ruolo di primo piano stanno assumendo le alterazioni nella microecologia del tratto intestinale, suggerendo un ruolo potenziale del microbiota intestinale (Nistal E. et al, 2012).

Tuttavia, la nostra conoscenza del microbiota (l'insieme della flora batterica) intestinale degli adulti con MC è ancora scarsa. Infatti, gli studi che in cui è stato caratterizzato il microbiota intestinale di pazienti celiaci adulti sono iniziati solo a partire dal 2012 (Nistal E., et al 2012; Nistal E., et al 2012; Cheng J. et al, 2013; Wacklin P. et al; 2013). Gli studi pubblicati prima del 2012 sono stati effettuati infatti solo in bambini con MC, riportando squilibri nella composizione del microbiota del duodeno o nella comunità batterica fecale (Sanz Y, et al. 2007, Nadal I., et al 2007; Collado MC, et al 2007; Collado MC, et al 2008; Di Cagno R, et al 2011).

Un altro fattore importante nello sviluppo della MC sembra essere rappresentato da una aumentata permeabilità della mucosa intestinale. Ad oggi non è tuttavia ancora chiaro se l'iperpermeabilità intestinale che caratterizza i soggetti affetti da MC rappresenti una causa o la conseguenza della MC né se essa sia da imputare ad un effetto diretto del glutine mediato dal rilascio di zonulina, ad alterazioni del microbiota o alla combinazione di entrambi i fattori. Un singolo studio effettuato su bambini ed adulti ha riportato leggere differenze nella percentuale dei maggiori Phyla tra i due gruppi di soggetti ed anche un diverso profilo batterico nei campioni di biopsie duodenali dei pazienti adulti (Nistal E, et al. 2012). Questi studi hanno mostrato che i *Firmicutes* sono i batteri più abbondanti in pazienti MC adulti mentre i *Proteobacteria* sono più presenti in bambini. Altri Phyla sono presenti sia

nei bambini MC che adulti come i *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*. E' stato ipotizzato che i batteri Gram-negativi in individui geneticamente suscettibili possano contribuire alla perdita di tolleranza nei confronti del glutine (De Palma et al, 2010).

Razionale

Dati emergenti indicano il coinvolgimento del microbiota intestinale nell'insorgenza della malattia celiaca. In particolare, come prima riportato, i pazienti affetti da MC mostrano una composizione differente del microbiota intestinale, ossia i *Firmicutes* sono più abbondanti dei *Bacteroidetes* negli adulti, mentre i *Proteobacteria* sono presenti principalmente nell'intestino dei bambini (Nistal A, 2012). Non è ancora chiaro se una alterata flora batterica intestinale, possa essere causa o conseguenza del CD e quale sia la correlazione con la risposta immune nelle fasi precoci della patologia. Nello studio noi ci rivolgiamo ai pazienti celiaci potenziali, definiti come riportato in precedenza, come soggetti che non hanno e non abbiano mai avuto atrofia dei villi intestinali, pur essendo caratterizzati da anomalie immunologiche simili a quelle riscontrabili nei pazienti con villi atrofici (EMA e tTGA positivi, presenza di geni di suscettibilità).

L'ipotesi principale dello studio è che le mutue relazioni tra microbiota intestinale e la risposta immune possano svolgere un ruolo chiave nello sviluppo della MC o della persistenza di mucosa normale, descritta nel 15 - 20% dei soggetti con MCP mantenuti a dieta libera.

Scopo dello studio

Con la ricerca che qui presentiamo, si intendono ottenere dati relativi alla possibilità di chiarire l'influenza reciproca tra natura e variazione del microbiota intestinale e le alterazioni della risposta immunitaria correlata. Lo scopo finale di questo nostro studio sarà quello di caratterizzare qualitativamente e quantitativamente il microbiota intestinale e la risposta immunitaria adattativa in biopsie intestinali e campioni fecali, nelle fasi precoci della patologia (MCP) ed in quelle caratterizzata da atrofia conclamata dei villi (MC).

Obiettivi dello studio

Gli obiettivi specifici dello studio sono i seguenti:

Obiettivo 1: Raccolta dei dati clinici (anamnesi familiare, anamnesi personale patologica remota e prossima, valutazione semiquantitativa dei sintomi mediante scala visuale analogica, parametri antropometrici ed informazioni sullo stile di vita), laboratoristici (EMA, tTGA, emocromo, ferritina, colesterolo totale e HDL, acido folico, TSH) e dei campioni organici per le analisi immunologiche e del microbiota intestinale (Timing: 0, 6 ,12 mesi). Sessanta pazienti con MC (30 con MCP e 30 con celiachia florida) e 30 controlli sani verranno arruolati presso il "Centro di riferimento Regionale per la malattia celiaca dell'Adulto" (Responsabile Prof. Antonino Salvatore Calabrò), afferente alla SOD di Gastroenterologia Clinica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi (Responsabile Prof. Stefano Milani).

Obiettivo 2: Caratterizzazione del microbiota intestinale da feci e biopsie di pazienti MC ed MCP e controlli sani (solo campioni fecali): il microbiota intestinale verrà analizzato su

campioni fecali ottenuti mediante evacuazione da pazienti e controlli e da biopsie intestinali di pazienti; le procedure sperimentali verranno eseguite attraverso un approccio "Next-Generation-Sequencing"(NGS). Il DNA totale verrà estratto dai campioni fecali\biopsie, attraverso l'utilizzo di PowerSoil®DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories inc.); tali estratti saranno poi utilizzati per l'amplificazione tramite PCR delle regioni variabili V3-V4 del gene batterico che codifica per l'rRNA16S, sufficienti a garantire l'informazione necessaria per la classificazione tassonomica delle comunità microbiche del microbioma intestinale. I prodotti di amplificazione saranno poi processati per il sequenziamento massivo attraverso la piattaforma NGS Illumina MiSeq (Illumina Inc.) con un approccio di tipo targeted sequencing. L'analisi dei dati sarà effettuata mediante l'utilizzo di software specifici per lo studio di comunità microbiche, che forniscono un'estensiva analisi dei dati, includendo processi di: I) controllo di qualità dei dati di sequenza; II) filtraggio delle sequenze chimeriche; III) clustering in unità tassonomiche (Operational Taxonomic Units, OTUs); IV) classificazione filogenetica.

Obiettivo 3: Caratterizzazione della risposta immune specifica dei pazienti con MC e MCP: verranno isolati i linfociti da campioni di sangue venoso periferico e da campioni biotici. I linfociti estratti verranno clonati tramite la tecnica della diluizione limite ed ogni singolo clone linfocitario ottenuto sarà caratterizzato dal punto di vista fenotipico tramite citofluorimetria a flusso (FACS analysis) e dal punto di vista funzionale tramite l'utilizzo di test immunoenzimatici per identificare le diverse sottopopolazioni linfocitarie.

Obiettivo 4: Correlazione della risposta immune e della composizione del microbiota intestinale con lo stato clinico dei pazienti affetti da MC e MCP con appositi test statistici (vedi piano statistico).

Disegno dello studio

Verrà utilizzato un approccio multidisciplinare per riuscire a realizzare gli specifici obiettivi proposti.

Task1: Caratterizzazione metagenomica del microbiota intestinale.

L'obiettivo di questa task è valutare/caratterizzare il microbiota isolato da tessuto e campioni fecali di tutti i pazienti (MC e MCP) e dei controlli sani (solo campioni fecali). I campioni di feci verranno processati in 3 step temporali: al momento della diagnosi, a 6 e 12 mesi dall'inizio della dieta priva di glutine (T0, T6, T12 mesi), mentre quelli di tessuto intestinale in due step temporali, ossia al momento della diagnosi e 12 mesi dopo l'inizio della dieta priva di glutine (T0, T12 mesi). Per quanto riguarda il trattamento dietetico dei pazienti con MCP, verrà deciso di sottoporli o no a dieta aglutinata secondo la prassi attuale, in funzione della presenza di sintomi o di malattie associate. Saranno utilizzate metodologie di biologia molecolare per effettuare le analisi qualitative e quantitative del microbiota intestinale dei pazienti.

Questa task verrà suddivisa nelle seguenti subtasks:

Subtask A) Arruolamento dei pazienti e volontari sani, follow up clinico dei pazienti e raccolta dei campioni

I pazienti ed i volontari sani partecipanti allo studio saranno arruolati presso il Centro di Riferimento Regionale per la Celiachia dell'adulto dell'Azienda Ospedaliera - Universitaria di Careggi diretto dal Professor Antonino Salvatore Calabrò (Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche "Mario Serio", Università di Firenze). In totale, 90 soggetti adulti parteciperanno allo studio. Per quanto riguarda i pazienti celiaci si cercherà di ottenere due campioni confrontabili per età e sesso: 30 con celiachia florida in fase atrofica (MC) e 30 con celiachia potenziale (MCP). La diagnosi di MC sarà basata sulla presenza di sierologia positiva, in particolare (EMA) e confermata attraverso l'esame istologico-biottico della mucosa intestinale. Il danno mucosale sarà valutato in accordo con la classificazione di Marsh modificata da Oberhuber (Oberhuber G., 1999). Il gruppo di controllo sarà così ripartito: 10 saranno reclutati all'interno dello staff medico dell'Unità di Gastroenterologia ed altri 20 saranno pazienti con sospetto clinico di celiachia ma con EMA e tTGA negativi. Per ragioni etiche, i 10 controlli provenienti dallo staff medico non saranno sottoposti a biopsia intestinale, nei casi rimanenti l'esame endoscopico con prelievi biottici sarà effettuato solo se ritenuto indispensabile ai fini della diagnosi.

Tutti i pazienti saranno arruolati presso il Centro di Riferimento Regionale per la Celiachia dell'adulto dell'Azienda Ospedaliera - Universitaria di Careggi e ad ognuno saranno fornite adeguate informazioni sugli obiettivi dello studio.

Sarà preparato un database in cui, per ogni paziente, saranno registrati la storia familiare, le informazioni sullo stile di vita, il tipo di dieta (se onnivori, vegetariani o vegani), la presenza di eventuali malattie associate (Diabete di tipo 1, tiroidite di Hashimoto; sindrome di Sjögren, artrite reumatoide, osteoporosi...), gli eventuali trattamenti (farmaci antidiabetici, ipocolesterolemizzanti, lassativi...), la presenza di sintomi intestinali (diarrea cronica, meteorismo, dolore addominale), di segni di malassorbimento (perdita di peso, anemia), di sintomi atipici (afte recidivanti del cavo orale, astenia, facile affaticabilità, cefalea, polineuropatia, artralgie, alopecia, infertilità, abortività...).

Per ognuno dei pazienti affetti da malattia celiachia sarà registrata l'entità delle alterazioni della mucosa intestinale, valutata attraverso la classificazione di Marsh.

Subtask B) Estrazione del DNA batterico totale da campioni di feci (pazienti celiaci e soggetti di controllo) e di tessuto (pazienti con MC e MCP) e determinazione delle sequenze nucleotidiche tramite tecnologia NGS.

Il DNA totale verrà estratto dai campioni fecali precedentemente conservati a -80°C nei tempi T0, T1 (6 mesi), T2 (12 mesi) per i campioni fecali e T0, T2 (12 mesi) attraverso il PowerSoil®DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories inc.); il DNA estratto verrà utilizzato per amplificazione tramite PCR della regione variabile del gene 16S V3-V4 che fornirà le necessarie informazioni per la classificazione tassonomica delle comunità batteriche che fanno parte del microbiota intestinale. I prodotti di amplificazione saranno processati attraverso tecnologia Illumina MiSeq NGS platform (Illumina Inc.)

Subtask C) Analisi dei dati

L'analisi dei dati sarà effettuata attraverso specifici software. In un primo step le sequenze generate dalla tecnologia di sequenziamento massivo saranno soggette ad un controllo qualità, eliminando i nucleotidi a bassa qualità. Le sequenze ottenute saranno utilizzate come input per un "clustering algorithm" che assegnerà loro una "Operational Taxonomic Units" (OTUs) basata sul loro livello di identità di sequenza nucleotidica. In parallelo, sarà anche controllata e corretta la presenza di sequenze chimeriche usando due approcci standard: uno non supervisionato basato sul contenuto di sequenze replicate nel campione ed uno supervisionato basato su sequenze di 16S rDNA inserite in database pubblici. L'ultimo step sarà l'identificazione delle annotazioni tassonomiche target più simili di ogni sequenza, mediante comparazione con sequenze di database tassonomici. I dati ottenuti per ogni campione (paziente) saranno comparati tra di loro per determinare possibili differenze nella composizione della flora intestinale. Questo ultimo step coinvolgerà tecniche di statistica multivariata e la creazione di modelli matematici basati sulla composizione batterica ottenuta. Il più comune strumento bioinformatico (ad esempio FastQC <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> and SolexaQA <http://solexaqa.sourceforge.net/>) sarà usato per il controllo di qualità dei dati massivi delle sequenze. Due tipi di algoritmi verranno usati per identificare le principali categorie tassonomiche presenti nei campioni analizzati. Il primo tipo è basato sulla comparazione di sequenze di DNA ottenute da una banca dati batterica che contiene specifiche sequenze tassonomiche. Questo metodo assegnerà una sequenza ad uno specifico organismo con un alto livello di affidabilità e specificità, rendendo possibile generare profili tassonomici ad alta risoluzione (contenenti specie o ceppi). Il secondo metodo che sarà usato è basato su un algoritmo chiamato "Lowest common ancestor" (LCA). Questo approccio è basato sulla comparazione di sequenze metagenomiche con un database di nucleotidi di riferimento, per generare una lista delle possibili annotazioni tassonomiche in forma di struttura gerarchica (albero tassonomico). Da questa lista strutturata sarà possibile assegnare ogni sequenza analizzata ad una singola categoria tassonomica, scalando l'albero tassonomico nella ricerca di un nodo che contiene tutte le sequenze precedentemente identificate. I due metodi permetteranno di avere due diversi panorami tassonomici, uno meno dettagliato ma più esteso che può fornire informazioni sulle categorie batteriche generiche (Phylum, famiglia o classe) ed un altro meno esteso ma più dettagliato con un numero inferiore di assegnazioni il quale invece può fornire dettagli sulla composizione batterica in termini di specie o ceppi. Le due descrizioni ottenute saranno confrontate.

Task 2: Valutazione funzionale e fenotipica della risposta immune adattativa in pazienti con MC/MCP

L'obiettivo di questa task è quello di valutare/caratterizzare la distribuzione delle differenti sottoclassi di popolazioni di cellule T (specialmente le emergenti Th9 e Th22) isolate da tessuto intestinale infiammato di pazienti con MC o MCP.

Subtask A) Valutazione del genotipo del paziente e test anticorpale

A1) Genotipizzazione: i pazienti affetti da Celiachia potenziale saranno analizzati per i geni HLA di suscettibilità, come riportato in precedenza (Bertini, I et al, 2009)

A2) Gli anticorpi anti-transglutaminasi tissutale (tTGA) saranno misurati mediante un Kit commerciale (Eurospital, Trieste, Italia) che utilizza transglutaminasi umana ricombinante come antigene; gli anticorpi anti-endomisio (EMA) saranno determinati mediante immunofluorescenza indiretta, usando sezioni di tessuto di esofago di scimmia, come descritto precedentemente in Matà, S et al, 2006

Subtask B) caratterizzazione fenotipica e funzionale di cellule T isolate da tessuto infiammatorio

I linfociti isolati da campioni bioptici e da sangue periferico saranno clonati tramite la tecnica della diluizione limite. Ogni singolo clone linfocitario T sarà quindi caratterizzato dal punto di vista fenotipico e funzionale, tramite l'utilizzo della citofluorimetria a flusso, test immunoenzimatici.

Task 3: Correlazione tra risposta immune, composizione del microbiota intestinale, quadro clinico-patologico (MC, MCP).

In questo step, comparando i pazienti con MC e MCP tra di loro e con i controlli sani, cercheremo di capire come la composizione della flora intestinale (qualitativa e quantitativa) e la qualità della risposta immune dei pazienti correla con i diversi stadi clinici della malattia celiaca. In altre parole, correlando i dati della risposta immunitaria T ed i dati clinici con la composizione del microbiota presente nello stesso paziente nei diversi campioni biologici analizzati (feci e biopsie intestinali), sarà valutato se l'abbondanza relativa di determinate specie batteriche o la loro assenza possa essere associato allo sviluppo di un tipo specifico di risposta immunitaria in grado di favorire la progressione da MCP a MC conclamata.

Subtask A). Analisi statistica

A questo proposito, verranno utilizzate primariamente tecniche di statistica multivariata come l'analisi delle componenti principali, analisi di correlazioni canoniche, clustering gerarchico. Una volta che la dipendenza statistica tra comunità batteriche e diversa risposta immune sarà stata identificata, sarà possibile analizzare le correlazioni all'interno delle comunità utilizzando network biologici generati attraverso l'uso delle matrici di correlazione come Pearson e Spearman.

Popolazione in studio

Setting clinico:

Come anzi detto, lo studio prevede di arruolare in totale, 90 soggetti adulti, di cui 30 pazienti affetti da celiachia atrofica, 30 da MCP e 30 soggetti di controllo.

Dopo la diagnosi, sia i pazienti celiaci che quelli con MCP saranno sottoposti a dieta priva di glutine. Nei pazienti con MCP la dieta aglutinata sarà però consigliata solo a coloro che presentino sintomi o malattie tipicamente associate alla malattia celiaca (dermatite erpetiforme, tiroidite di Hashimoto, infertilità, poliabortività...):

Criteri d'inclusione

I pazienti saranno arruolati secondo i seguenti criteri:

- Età compresa tra 18 e 70 anni
- Assenza di qualsiasi forma di immunodeficienza, in particolare di deficit selettivo di IgA
- Pazienti residenti in Toscana che, nei passati 5 anni, non abbiano compiuto alcun viaggio in paesi fuori dall'Europa. Questo ultimo criterio è molto rilevante per lo studio della composizione del microbiota intestinale.

Tutti i pazienti reclutati riceveranno adeguate informazioni sullo studio, sugli obiettivi e le modalità con cui dovranno fornire i campioni organici da analizzare. Ad ogni paziente sarà richiesto un consenso informato, firmato e datato.

Criteri d'esclusione

- Trattamento con antibiotici o probiotici durante i precedenti due mesi
- Infezioni acute gastrointestinali nel mese precedente l'arruolamento
- Donne in gravidanza e allattamento (in corso o in programma nelle successive 48 settimane)
- Concomitante presenza di neoplasie maligne accertate
- Concomitante presenza di malattie infiammatorie croniche intestinali (Malattia di Crohn e Rettocolite ulcerosa)
- Pazienti che abbiano fatto uso di farmaci immunosoppressori nei tre mesi precedenti
- Contemporanea partecipazione ad altri studi clinici
- Pazienti che a giudizio dello sperimentatore non siano in grado di completare lo studio

Endpoint

Endpoint primario

- caratterizzazione del microbiota intestinale in pazienti con MC e MCP e soggetti di controllo
- caratterizzazione funzionale della risposta immunitaria adattativa nei pazienti con MC e MCP
- analisi delle correlazioni fra alterazione del microbiota intestinale, tipo di risposta immunitaria e decorso della malattia in pazienti con MCP

Endpoint secondari

- Chiarire l'influenza reciproca tra disbiosi intestinale e risposta immunitaria

- Identificare possibili biomarker in grado di “predire” le disfunzioni immunitarie, il livello infiammazione cronica e l’andamento della progressione della malattia celiaca da MCP a malattia celiaca conclamata

Procedure dello studio

1. modalità di informazione dei pazienti e rilascio da parte degli stessi del consenso informato

I pazienti verranno messi al corrente dello studio durante la prima visita. Il Principal Investigator e gli altri ricercatori designati avranno il compito di informare tutti i soggetti arruolati circa gli obiettivi e le procedure dello studio. Il processo per l’ottenimento del consenso informato sarà conforme a tutte le procedure vigenti.

I ricercatori o i collaboratori designati, ed i soggetti che volontariamente parteciperanno allo studio dovranno firmare e datare il consenso informato prima di iniziare ogni procedura inerente lo studio. I soggetti riceveranno due copie dell’ICF datate e firmate; la copia originale verrà conservata negli archivi dello studio. Né i ricercatori e né il personale designato potranno in qualsiasi modo esercitare coercizione o influenza sul soggetto tale da indurlo/a partecipare o continuare la partecipazione allo studio. La decisione del soggetto di partecipare allo studio sarà completamente volontaria. I ricercatori ed il personale designato dovranno enfatizzare al soggetto che esso/essa potrà cancellare il proprio consenso in qualsiasi momento senza nessuna penalità o perdita di benefici. Le informazioni scritte o orali concernenti lo studio, incluso il consenso informato, non dovranno contenere nessun tipo di linguaggio che forzi il soggetto a rinunciare (anche se solo apparentemente) ai suoi diritti legali o che potrebbe esonerare i ricercatori, le istituzioni o lo sponsor da penalità per negligenza.

2. procedure cliniche previste (n visite, n esami, ...).

Lo studio prevede un numero di visite pari a 3: tempo 0, 6 e 12 mesi dall'inizio dello studio.

Gli esami che verranno eseguiti saranno :

- a) tempo 0 : esami di routine secondo l'attuale *standard of care* per la diagnosi ed il monitoraggio del soggetto celiaco (EMA, tTGA, IgA totali, emocromo, ferritina, colesterolo, totale e HDL, trigliceridi , transaminasi, glicemia, anticorpi anti-nucleari, anti-tiroidei); nei pazienti EMA e tTGA positivi sarà inoltre effettuata esofagogastroduodenoscopia con biopsie multiple (n. 4) nella II porzione duodenale e verranno acquisiti un campione fecale, mediante evacuazione spontanea, per l'analisi del microbiota intestinale e un campione di sangue venoso periferico al fine di valutare la risposta immunitaria.

Nei pazienti che all’esame istologico-bioptico risultino avere un quadro compatibile con MCP (Marsh 0-2), verrà in un secondo momento come previsto dal protocollo nazionale, richiesta analisi genetica HLA di classe II, finalizzata a documentare la presenza di geni di suscettibilità (HLA-DQ2 e/o DQ8), necessaria peraltro ai fini della certificazione

- b) tempo 6 mesi: acquisizione di un campione fecale per l'analisi del microbiota e di un campione di sangue venoso periferico per lo studio della risposta immunitaria; inoltre, controlli ematici standard di laboratorio (EMA, tTGA, emocromo, ferritina, colesterolo totale e HDL, trigliceridi, glicemia)
- c) tempo 12 mesi: acquisizione di un campione fecale per l'analisi del microbiota e di un campione di sangue venoso periferico per lo studio della risposta immunitaria; controlli ematici standard di laboratorio (EMA, tTGA, emocromo, ferritina, colesterolo totale e HDL, trigliceridi, glicemia)

Piano statistico

Il numero di pazienti necessari per eseguire questo studio, è stato determinato sulla base di studi simili precedenti, eseguiti con tecnologie Next Generation Sequencing, così come indicato in Goodrich et al, 2014.

Dal momento che il numero di campioni richiesto per uno studio sul microbiota intestinale dipende dal "size effect", si evidenzia che, nonostante siano stati sviluppati strumenti statistici come "Evident" (<https://github.com/biocore/Evident>), non esiste un modo standardizzato di riportare il "size effect", in quanto non è stato ancora eseguito uno studio pilota di riferimento sul microbiota nella Celiachia Potenziale come quello da noi progettato. Lo studio prende in considerazione una patologia molto rara e multifattoriale quale la Celiachia Potenziale, inoltre non ci sono dati in letteratura che possano darci indicazioni sulla variabilità della composizione batterica che indicativamente potremmo ottenere. Per cui al momento non siamo in grado di riportare accuratamente una descrizione della precisione attesa delle stime ricavabili dai campioni presi in esame (in ottica descrittiva) ovvero dell'entità delle differenze minime evidenziabili fra i sottogruppi (in ottica inferenziale) nonostante tali informazioni avrebbero sicuramente aumentato la comprensione dei dati che si potranno ottenere dal suddetto studio.

Verranno utilizzate parametri di statistica descrittiva per riassumere i dati e metodi della statistica inferenziale per derivare nuove affermazioni dai dati.

I dati riguardanti la composizione del microbiota intestinale saranno analizzati mediante software e tools online dedicati, utilizzando test statistici non parametrici (Test di Kruskal-Wallis, test ANOSIM)

Sequenziamento dei frammenti di DNA batterico tramite tecnologia NGS (Next Generation Sequencing) in modo da determinarne la sequenza nucleotidica. Le sequenze generate tramite tecnologie di sequenziamento massivo (Next Generation Sequencing, NGS) verranno sottoposte ad un accurato controllo volto al miglioramento della qualità di ogni singola sequenza attraverso l'eliminazione dei nucleotidi a bassa qualità (errori dovuti alla tecnologia di sequenziamento). Per il controllo della qualità dei dati di sequenziamento massivo saranno utilizzati i più comuni tool bioinformatici (e.s. FastQC <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> e SolexaQA <http://solexaqa.sourceforge.net/>). Per la rimozione delle porzioni di sequenza sotto la soglia di qualità stabilita (solitamente Phred score 30) si utilizzeranno invece strumenti come

StreamingTrim <https://github.com/GiBacci/StreamingTrim/> o Dynamic Trimming <http://solexaqa.sourceforge.net/>).

Le sequenze controllate verranno quindi sottoposte al processo di gene calling che consentirà di identificare le regioni codificanti. Questo sarà condotto sia con metodi intrinseci che si basano sulla identificazione di motivi che riconducano alla presenza di un gene sul frammento di DNA analizzato (codoni di start e presenza di un frame di lettura valido), sia con metodi estrinseci, ovvero mediante ricerca in banche dati specifiche per l'identificazioni di regioni codificanti.

Le principali firme tassonomiche presenti all'interno dei campioni analizzati saranno individuate mediante l'utilizzo di due tipologie di algoritmi. La prima tipologia si basa sulla comparazione delle sequenze grezze di DNA ottenute con database batterici contenenti sequenze tassonomicamente specifiche. In questo modo è possibile attribuire una sequenza ad un organismo specifico con un alto livello di affidabilità e specificità rendendo possibile generare profili tassonomici ad alta risoluzione (contenenti specie o ceppi batterici). Il secondo metodo che verrà utilizzato si basa invece su di un algoritmo chiamato "Lowest common ancestor" (LCA). Questo approccio si basa sul confronto delle sequenze metagenomiche con database nucleotidici di riferimento, in modo da generare una lista di possibili organismi di provenienza. Da questa lista sarà possibile assegnare ogni sequenza analizzata ad una singola categoria tassonomica risalendo l'albero tassonomico batterico in cerca di un nodo che contenga tutte le possibili specie di origine prima identificate. Le due metodiche consentiranno di avere due diverse overview tassonomiche, una meno dettagliata ma più completa in grado di fornire informazioni sulle categorie batteriche più generali (Phylum, Famiglie o Classi), ed una seconda molto dettagliata ma con un numero inferiore di assegnazioni in grado di fornire dettagli sulla composizione batterica in termini di specie e/o ceppi. Le due descrizioni ottenute verranno comparate in modo da accertarsi che siano concordi e che non vi siano delle discrepanze nel numero e/o nel tipo di assegnazioni trovate.

La fase successiva prevede l'annotazione funzionale delle sequenze geniche identificate. Questa sarà condotta mediante ricerca di similarità (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sui database funzionali più diffusi come COG, Pfam, GeneOntology. In questo modo si giungerà all'assegnazione di una funzione precisa per ciascuno dei geni identificati. Inoltre, l'utilizzo di più banche dati permetterà di controllare che le annotazioni prodotte per ciascuna sequenza siano consistenti attraverso tutti i database utilizzati, evidenziando quindi possibili errori nell'identificazione delle categorie funzionali della flora batterica analizzata.

Una volta determinato il repertorio genico dei microbiomi analizzati si procederà con la determinazione di eventuali arricchimenti in specifici pathway metabolici dei campioni analizzati. I dati ottenuti da pazienti verranno confrontati per portare alla luce eventuali differenze ipoteticamente collegate con l'insorgere o l'acutizzarsi della patologia. Quest'ultimo passaggio comporterà l'utilizzo di tecniche di statistica multivariata e la creazione di modelli matematici e/o metabolici in grado di rappresentare la funzionalità batterica all'interno dell'ospite. I modelli così ottenuti potranno infatti essere combinati ed utilizzati per lo studio mediante tecniche di modellizzazione metabolica (per esempio mediante Flux Balance Analysis) volte alla comprensione degli ipotetici scambi (metabolici)



fra le cellule dell'ospite ed il loro microbioma associato, nonchè alla predizione delle possibili conseguenze di una perturbazione del sistema (es. l'insorgenza di una patologia o lo squilibrio della composizione della flora microbica).

Sicurezza

Gestione degli eventi avversi

Il prof. Antonino Salvatore Calabrò sarà il responsabile della gestione degli eventi avversi.

La segnalazione degli eventi avversi sarà fatta in conformità a quanto riportato nella normativa nazionale di riferimento (D.L.vo 211/2003)

Eventi avversi/Reazioni avverse gravi

Il promotore della sperimentazione garantisce che tutte le informazioni pertinenti relative a sospette reazioni avverse serie inattese fatali o potenzialmente fatali, vengano registrate e notificate al più presto al Ministero della Salute, nonché al/i Comitato/i etico/i interessato/i, e comunque entro 7 giorni di calendario da quando il promotore della sperimentazione è venuto a conoscenza del caso, e che successive informazioni pertinenti siano comunicate entro 8 giorni dalla prima segnalazione

Ogni evento avverso grave deve essere comunicato al Promotore mediante fax ai seguenti contatti: Professor Antonino Salvatore Calabrò, Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche Mario Serio, Largo Brambilla, 3 50134 FIRENZE, Telefono 055 2758425, Fax 39 055 2758411, Email antoninosalvatore.calabro@unifi.it-a.calabro@dfc.unifi.it. Tutte le altre sospette reazioni avverse serie inattese (non fatali né potenzialmente fatali) sono notificate al Ministero della salute e al/i Comitato/i etico/i interessato/i, al più presto e comunque entro 15 giorni dal giorno in cui il promotore della sperimentazione ne è venuto a conoscenza per la prima volta.

Una volta all'anno per tutta la durata della sperimentazione clinica, il promotore della sperimentazione fornisce al Ministero della Salute e ai Comitati etici coinvolti un elenco di tutti i sospetti di reazioni avverse serie osservati nel corso dell'intero periodo ed una relazione sulla sicurezza delle persone sottoposte alla sperimentazione clinica.

Aspetti etici e rispetto della confidenzialità

Gli sperimentatori assicurano che lo studio sarà condotto in piena conformità a quanto stabilito alla normativa internazionale ed al suo recepimento nazionale in merito alla sperimentazione clinica ed ai principi della Dichiarazione di Helsinki allo scopo di assicurare la massima protezione dei soggetti coinvolti. Lo sperimentatore principale si impegna affinché la sperimentazione sia condotta in conformità a quanto scritto in questo protocollo ed alle Good Clinical Practice (GCP). Il promotore dello studio si impegna alla tutela dei dati

personali sensibili, clinici e non, dei soggetti coinvolti nello studio secondo quanto stabilito in materia dalla normativa nazionale [D.Lvo. 196/2003].

Consenso informato

Sarà responsabilità degli sperimentatori, o di soggetti da questi incaricati, l'ottenimento del consenso informato dei pazienti dopo adeguata informazione degli stessi circa gli scopi, i metodi, i benefici attesi ed i rischi prevedibili dello studio. Gli sperimentatori o gli incaricati dovranno altresì informare i partecipanti che la non partecipazione o l'interruzione della stessa non comporteranno pregiudizio o danno nei loro confronti.

Comitato Etico ed Autorità Competenti

Il promotore fornirà al Comitato Etico di riferimento ed alla Autorità Competente il protocollo di studio ed ogni altro documento correlato fornito al paziente (Nota Informativa e Modulo di Consenso Informato). L'approvazione del Comitato Etico e dell'Autorità Competente dovrà essere ottenuta prima dell'inizio di qualunque procedura correlata allo studio e dovrà essere documentata tramite comunicazione ufficiale allo sperimentatore. Qualora nel corso della sperimentazione, si rendessero necessarie variazioni al protocollo il promotore presenterà al Comitato Etico di riferimento adeguata richiesta di emendamento al protocollo, la cui approvazione seguirà le procedure stabilite dal regolamento dello stesso Comitato Etico.

Proprietà dei dati

La proprietà dei dati, trattandosi di studio indipendente ai sensi del D.M. 17 Dicembre 2004, appartiene al Promotore dello Studio (D.M. 17 Dicembre 2004, Art. 1, comma 2, lettera c)

Report finale e pubblicazione dei risultati

In accordo alle ICH-GCP, il responsabile dello Studio si impegna a produrre un report sullo studio, pubblicare tutti i dati raccolti come descritto nel Protocollo e a garantire che i dati siano riportati responsabilmente e coerentemente. In particolare, la pubblicazione dei dati derivanti dal presente studio avverrà indipendentemente dai risultati ottenuti. La trasmissione o diffusione dei dati, per il tramite di pubblicazioni scientifiche e/o di presentazione in congressi, convegni e seminari, partecipazione a studi multicentrici, avverrà esclusivamente a seguito di un'elaborazione meramente statistica degli stessi, o comunque in forma assolutamente anonima. Responsabile dell'intera ricerca e quindi del trattamento dei dati è il Prof. Antonino Salvatore Calabrò, in qualità di responsabile dello studio.

Indipendenza dello studio

Lo Studio presenta tutti i requisiti necessari secondo il D.M. 17 Dicembre 2004 (Art.1, Comma 1 e 2) per la definizione di "sperimentazione clinica finalizzata al miglioramento della pratica clinica quale parte integrante dell'assistenza sanitaria e non a fini industriali".

Copertura assicurativa

Non essendo uno studio interventistico, Il Promotore dello Studio non ha stipulato specifica polizza assicurativa per la copertura dei rischi derivanti dallo studio (D.M. 14 Luglio 2009).

Riferimenti bibliografici

I. Bertini, A. Calabro', V. De Carli, C. Luchinat, S. Nepi, B. Porfirio, D. Renzi, E. Saccenti, L. Tenori, [The metabonomic signature of celiac disease]. J Proteome Res 2009; 8: 170-177. doi: 10.1021/pr800548z;

J. Cheng, M. Kalliomaki, H.G. Heilig, A. Palva, H. Lahteenoja, W.M. de Vos, J. Salojarvi, R. Satokari, [Duodenal microbiota composition and mucosal homeostasis in pediatric celiac disease]. BMC Gastroenterol 2013; 13: 113. doi: 10.1186/1471-230X-13-113;

R. Ciccocioppo, A. Di Sabatino, G.R. Corazza, [The immune recognition of gluten in coeliac disease]. Clin Exp Immunol 2005; 140: 408-416. PMID: 15932501;

M.C. Collado, M. Calabuig, Y. Sanz, [Differences between the Faecal Microbiota of Coeliac Infants and Healthy Controls]. Curr Issues Intest Microbiol 2007; 8: 9-14. PMID: 17489434;

M.C. Collado, C.E. Donat, C. Ribes-Koninckx, M. Calabuig, Y. Sanz, [Specific duodenal and faecal bacterial groups are associated with pediatric celiac disease]. J Clin Pathol 2008; 62: 264-269. doi: 10.1136/jcp.2008.061366;

P. Collin, H. Helin, M. Mäki, O. Hällström, A.L. Karvonen, [Follow-up of patients positive in reticulin and gliadin antibody tests with normal small bowel biopsy findings]. Scand J Gastroenterol 1993; 28: 595-598. PMID: 8362211;

G. De Palma, J. Cinova, R. Stepankova, L. Tuckova, Y. Sanz, [Pivotal Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease]. J Leukoc Biol 2010; 87: 765-78. doi: 10.1189/jlb.0709471;

R. Di Cagno, M. De Angelis, I. De Pasquale, M. Ndagijimana, P. Vernocchi, P. Ricciuti, F. Gagliardi, L. Laghi, C. Crecchio, M.E. Guerzoni, M. Gobetti, R. Francavilla, [Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization]. BMC Microbiol 2011; 11: 219. doi: 10.1186/1471-2180-11-219;

R.J. Farrell, C.P. Kelly, [Celiac sprue]. N Engl J Med 2002; 346: 180-188. PMID: 11796853;

A. Fasano, [Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer]. Physiol Rev 2011; 91: 151-75. doi: 10.1152/physrev.00003.2008;

A. Ferguson, E. Arranz, S. O'Mahony, [Clinical and pathological spectrum of celiac disease]. Gut 1993; 34: 150-151. PMID: 8432463;

Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, Caporaso JG, Knight R, Ley RE. Conducting a microbiome study. Cell. 2014 Jul 17;158(2):250-62. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.037. PMID: 25036628.)

K Kaukinen, P Collin, K Holm, AL Karvonen, P Pikkarainen, M Mäki. Small-bowel mucosal inflammation in reticulín or gliadin antibody-positive patients without villous atrophy. Scand J Gastroenterol. 1998 Sep;33(9):944-9.

M.N. Marsh, [Gluten, major histocompatibility complex and the small intestine. A molecular and immunobiological approach to the spectrum of gluten sensitività]. Gastroenterology 1992; 102: 330-354. PMID: 1727768;

S. Mata', D. Renzi, F. Pinto, A. Calabro', [Anti-tissue transglutaminase IgA antibodies in peripheral neuropathy and motor neuronopathy]. Acta Neurol Scand 2006; 114: 54-58. PMID: 16774628.

T. Matysiak-Budnik, G Malamut, NP de Serre, E Grosdidier, S Segulier, N Brousse, S Caillat-Zucman, N Cerf-Bensussan, J Schmitz, C Cellier. [Long-term follow-up of 61 coeliac patients diagnosed in childhood: evolution toward latency is possible on a normal diet]. Gut. 2007 Oct;56(10):1379-86.

I. Monteleone, M. Sarra, G. Del Vecchio Blanco, O.A. Paoluzi, E. Franzè, D. Fina, A. Fabrizi, T.T. MacDonald, F. Pallone, G. Monteleone, [Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa]. J Immunol. 2010; 184:2211-2218. doi: 10.4049/jimmunol.0901919;

I. Nadal, E. Donant, C. Ribes-Koninckx, M. Calabuig, Y. Sanz, [Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease]. J Med Microbiol 2007; 56: 1669-1674. PMID: 18033837;

E. Nistal, A. Caminero, A.R. Herran, L. Arias, S. Vivas, J.M. Ruiz de Morales, S. Calleja, L.E. Saenz de Miera, P. Arroyo, J. Casqueiro, [Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease]. Inflamm Bowel Dis 2012; 18: 649-656. doi: 10.1002/ibd.21830;

E. Nistal, A. Caminero, S. Vivas, J.M. Ruiz De Morales, L.E. Saenz De Miera, L.B. Rodriguez-Aparicio, J. Casqueiro, [Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients]. Biochimie 2012; 94: 1724-1729. doi: 10.1016/j.biochi.2012.03.025;

G Oberhuber, G Granditsch, H Vogelsang. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Oct;11(10):1185-94. Review.

S.W. Qiao, E. Bergseng, O. Molberg, G. Jung, B. Fleckenstein, L.M. Sollid, [Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine. *J Immunol* 2005; 175: 254-261. PMID: 15972656;

AW Ryan, JM Thornton, K Brophy, JS Daly, RM McLoughlin, C O'Morain, M Abuzakouk, NP Kennedy, FM Stevens, C Feighery, D Kelleher, R McManus.[Chromosome 5q candidate genes in coeliac disease: genetic variation at IL4,IL5, IL9, IL13, IL17B and NR3C1]. *Tissue Antigens* 2005;65(2):150-5;

Y. Sanz, E. Sánchez, M. Marzotto, M. Calabuig, S. Torriani, F. Dellaglio,[Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis]. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 51: 562-568. PMID: 17919298;

R. Troncone, L. Greco, M. Mayer, F. Paparo, N. Caputo, M. Micillo, P. Mugione, S. Auricchio, [Latent and potential coeliac disease]. *Acta Paediatr Suppl* 1996; 412: 10-14. PMID: 8783748;

P Wacklin, K Kaukinen, E Tuovinen, P Collin, K Lindfors, J Partanen, M Mäki, J Mättö. The duodenal microbiota composition of adult celiac disease patients is associated with the clinical manifestation of the disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Apr;19(5):934-41. doi: 10.1097/MIB.0b013e31828029a9.

J.A. Walker-Smith, S. Guandalini, J. Schmitz, et al. [Revised criteria for the diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition]. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909-991 PMID: 2205160;

H Xu, SL Feely, X Wang, DX Liu, JT Borda, J Dufour, W Li, PP Aye, GG Doxiadis, C Khosla, RS Veazey, K Sestak. Gluten-sensitive enteropathy coincides with decreased capability of intestinal T cells to secrete IL-17 and IL-22 in a macaque model for celiac disease. *Clin Immunol*. 2013 Apr;147(1):40-9. doi: 10.1016/j.clim.2013.02.012. Epub 2013 Feb 28.

**Comitato Etico Regionale per la Sperimentazione Clinica della Regione
Toscana**

Sezione: AREA VASTA CENTRO

**ubicato c/o: Nuovo Ingresso Careggi (NIC) - Largo Brambilla, 3 - 50134
Firenze**

E-mail: segrcesf@unifi.it

Firenze, 16 Febbraio 2017

***Al promotore* AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA CAREGGI**

***Allo sperimentatore locale* Calabro' Antonino Salvatore**

***al Direttore Generale della struttura di afferenza del P.I.* Dr.ssa Monica
Calamai**

Oggetto: Comunicazione del **PARERE** relativo allo studio clinico

Titolo: Caratterizzazione funzionale del microbiota intestinale e risposta
immune associata, in pazienti con "Malattia Celiaca Potenziale" (MCP)

In riferimento alla richiesta di cui all'oggetto, si trasmette la decisione del
Comitato Etico Regionale per la Sperimentazione Clinica della Toscana -
sezione Area Vasta Centro, riunitosi in data **14/02/2017**.

Si ricorda che l'inizio della sperimentazione è subordinato alla ricezione dei
seguenti documenti, da parte del promotore:

- autorizzazione Autorità Competente (AIFA e/o Ministero della Salute)
- stipula della convenzione (se applicabile)
- rilascio della disposizione autorizzativa da parte dell'amministrazione aziendale

Il Comitato si riserva la facoltà di verificare il corso della sperimentazione autorizzata.

Firma del Responsabile della STS

Dr.ssa Silvia Benemei



**Il Comitato Etico
in osservanza alle legislazioni vigenti in materia di
studi osservazionali,
ha esaminato la richiesta in oggetto relativa allo studio**

**Titolo: Caratterizzazione funzionale del microbiota intestinale e risposta
immune associata, in pazienti con "Malattia Celiaca Potenziale" (MCP)**

Valutando ed approvando la seguente documentazione:

Documentazione generale

- **Protocollo di studio** (versione 1 del 30/11/2016)
- **Sintesi del protocollo in lingua italiana** (versione 1 del 30/11/2016)
- **Protocollo di studio** (versione 2 del 03/02/2017)

Documentazione centro-specifica

- **Lettera di accettazione dello sperimentatore
locale** (versione 1 del 30/11/2016)
- **Modulo di consenso al trattamento dei dati
personali** (versione 2 del 03/02/2017)

- **Modulo informativo per il paziente/genitore/tutore legale** (versione 1 del 30/11/2016)
- **Modulo di consenso informato/assenso per la partecipazione allo studio** (versione 1 del 30/11/2016)
- **Modulo di consenso al trattamento dei dati personali** (versione 1 del 30/11/2016)
- **Curriculum vitae in formato UE aggiornato dello sperimentatore locale** (versione na del 30/11/2016)
- **Lettera di intenti del promotore per il CE** (versione na del 30/11/2016)

La data di arrivo della documentazione completa è risultata il **07/02/2017**

**HA ESPRESSO IL SEGUENTE PARERE:
PARERE FAVOREVOLE
nella seduta del 14/02/2017**

Numero registro pareri del Comitato Etico: **10443_oss**

Elenco componenti del CE presenti alla discussione e votanti che hanno dichiarato assenza di conflitti di interessi di tipo diretto o indiretto:

Dr.ssa Silvia ASARO, *Esperto in Dispositivi Medici*

Prof.ssa Michela BACCINI, *Biostatistico*

Dr. Alessandro BUSSOTTI, *Medico di Medicina Generale*

Dr.ssa Antonina CHICCOLI, *Pediatra*

Dr.ssa Rossella FORNAINI, *Farmacista SSR*

Dr. Matteo GALLETTI, *Bioeticista*

Dr. Donato Antonio GENZANO, *Medico legale*

Prof. Marco MARCHI, *Biostatistico*

Prof.ssa Daniela MASSI, *Delegato Direzione Sanitaria della AOU Careggi*

Prof. Marco MATUCCI CERINIC, *Clinico*

Dr. Guido MICCINESI, *Delegato Direzione Sanitaria Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica di Firenze*

Avv. Pietro MILAZZO, *Esperto in materia giuridica e assicurativa*

Dr. Marco MITOLA, *Rappresentante del volontariato*

Dr. Alessandro MORETTINI, *Clinico*

Prof. Andrea NOVELLI, *Farmacologo*

Dr. Iacopo OLIVOTTO, *Clinico*

Dr.ssa Elisabetta PELO, *Clinico*

Dr. Pierluigi PERRUCCIO, *Delegato Direzione Sanitaria Azienda USL Toscana Centro*

Dr.ssa Franca PINELLI, *Rappresentante professioni sanitarie*

Prof. Alessandro Maria VANNUCCHI, *Clinico*

Sussistenza numero legale (n. 20 su 25)

I sopraindicati componenti del Comitato dichiarano di astenersi dal pronunciarsi su quelle sperimentazioni per le quali possa sussistere un conflitto di interessi di tipo diretto o indiretto.

Si ricorda con l'occasione che è obbligo del Promotore notificare al Comitato Etico:

- data di inizio arruolamento del primo paziente (se applicabile);
- stato di avanzamento dello studio, con cadenza semestrale e/o annuale, corredato da una relazione scritta;
- eventuali sospette reazioni avverse gravi ed inattese (SUSAR) ed i rapporti periodici di sicurezza (DSUR);
- fine del periodo di arruolamento dei soggetti per la sperimentazione clinica e la conclusione di quest'ultima;
- data di conclusione dello studio presso il centro e in toto;
- risultati della sperimentazione clinica entro un anno dalla conclusione della stessa.

Il Proponente deve ottemperare alle disposizioni legislative vigenti e riferire immediatamente al Comitato relativamente a:

- deviazioni dal protocollo, o modifiche allo stesso, che pertanto non potranno essere avviate senza che il Comitato abbia espresso, per iscritto, parere favorevole ad uno specifico emendamento, eccetto quando ciò sia

necessario per eliminare i rischi immediati per i soggetti o quando le modifica riguardino esclusivamente aspetti logistici o amministrativi dello studio.

- modifiche che aumentino il rischio per i soggetti e/o che incidano significativamente sulla conduzione dello studio (tutte le reazioni avverse serie; nuove informazioni che possano incidere negativamente sulla sicurezza dei soggetti o sulla conduzione dello studi).

Firma Presidente

Prof. Marco Matucci Cerinic

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Cerinic', with a long horizontal stroke extending to the left.