

Comitato Etico di Ateneo
Università della Calabria

PROTOCOLLO DI PRESENTAZIONE DEL PROGETTO DI RICERCA INCLUSIVO DI SCHEDA ETICA (ALL.1)*

A. PRESENTAZIONE DEL PROGETTO

A1. Titolo del progetto

Batteri probiotici per lo stress lavoro-correlato

A2. Responsabile del progetto (curriculum All. 2)

Professor Francesco Puoci, Dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della Nutrizione, Università della Calabria, Via Pietro Bucci, 87036 Arcavacata, Rende CS

A3. Altri ricercatori coinvolti, enti di appartenenza, loro recapito

Vincenzo Nobile, COMPLIFE ITALIA, Via Monsignor Angelini, 21, 27028 S. Martino Siccomario (PV) Italia

A4. Sede/i della ricerca

Università della Calabria

A5. È necessaria l'autorizzazione di altri Enti (ad es., ospedali, scuole, carceri) per l'accesso a dati o il coinvolgimento di partecipanti? Se sì, allegare copia della lettera di autorizzazione

Non necessario

A6. È necessario il consenso di un rappresentante legale (genitore, tutore, titolare della potestà)? Se sì, allegare copia della lettera di consenso (All. 3)

Non necessario

A7. Il responsabile della ricerca ha tempo sufficiente, attrezzature, strutture e personale idonei, per condurre la ricerca? Se sì, allegare dichiarazione, controfirmata dal responsabile della struttura a cui afferisce (All. 5)

Sì, si allega la dichiarazione.

A8. Il responsabile della ricerca si impegna a fornire al CEA relazione finale a conclusione del progetto e comunicazione di proroghe eventuali.

Sì

B. INFORMAZIONI RELATIVE AL PROGETTO

B1. Eventuali Enti finanziatori o Sponsor (indicare contributi)

Nessuno

B2. Data prevista di inizio della ricerca

Gennaio 2021

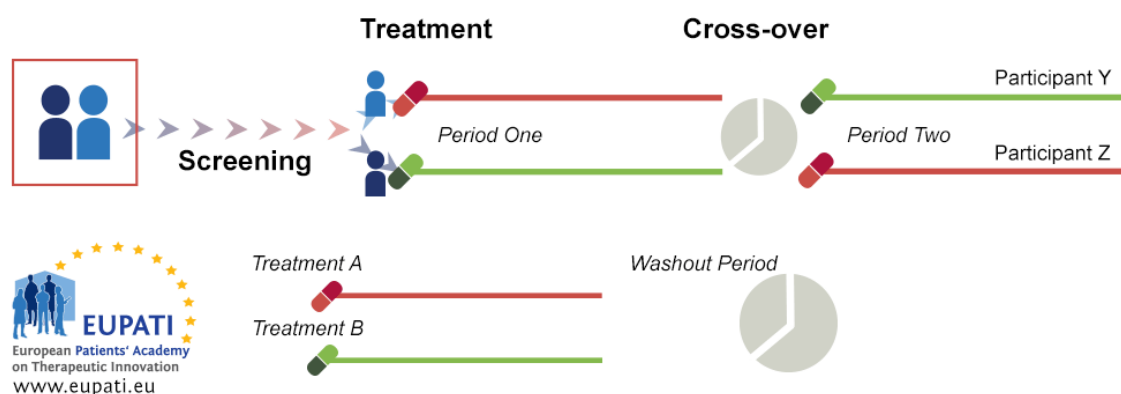
B3. Durata prevista della ricerca (in mesi)

3 (durata dello studio e tempistiche per il processamento dei dati)

B4. Riassunto in italiano e/o in inglese del progetto di ricerca (eventuale rappresentazione schematica del protocollo)

Sarà condotto uno studio clinico in modalità cross-over per valutare l'efficacia della formulazione probiotica composta da *Lactobacillus reuteri* PBS072 e *Bifidobacterium breve* BB077 per via orale nella prevenzione e/o nel controllo dei sintomi da stress lavoro correlato in lavoratori. Lo studio prevede l'assunzione da parte di ogni volontario di una capsula di prodotto, attivo o placebo, al giorno per un periodo di 30 giorni (primo trattamento), seguito da una pausa di 2 settimane (periodo di wash-out). Al termine del periodo di wash-out, ogni volontario assumerà nuovamente una capsula al giorno per 30 giorni del secondo trattamento. I due trattamenti saranno assegnati in maniera randomizzata.

A cross-over clinical study will be carried out to evaluate the efficacy of the probiotic formulation composed by *Lactobacillus reuteri* PBS072 and *Bifidobacterium breve* BB077 in the prevention and / or treatment of work-related stress symptoms in employees through oral intake. During the study, the volunteers will take one capsule of product, active or placebo (first treatment) per day for a period of 30 days, followed by a 2 week of wash-out. At the end of the wash-out period, each volunteer will take one capsule again per day for 30 days of the second treatment. The two treatments will be randomly assigned.



B5. B.5 Parole chiave (almeno 3) identificative del progetto di ricerca

Probiotici, stress lavoro-correlato, stato dell'umore, qualità del sonno

B6. B.6 Descrizione del progetto:**B.6.i B.6.i Base di partenza e giustificazione teorica**

Lo stress nell'ambiente di lavoro può verificarsi quando i dipendenti sentono di non avere il supporto dei supervisori e / o dei colleghi e uno scarso controllo sui processi lavorativi. A volte, lo stress lavoro correlato può essere confuso con la pressione: quando la pressione diventa eccessiva o ingestibile porta allo stress. Questa condizione può influire sulla qualità del lavoro e della vita dei dipendenti. A livello mondiale lo stress lavoro correlato è percepito come un peso: l'80% dei lavoratori americani si sente stressato e ha bisogno di aiuto per capire come gestirlo. La Cina ha il più alto aumento dello stress sul posto di lavoro, i dipendenti australiani sono assenti dal lavoro per una media di 3,2 giorni lavorativi, con un costo per l'economia australiana di circa 14,2 miliardi di dollari. Nel Regno Unito 13,7 milioni di giorni lavorativi vengono persi ogni anno a causa di malattie professionali al costo di 28,3 miliardi di sterline all'anno [1].

L'esistenza di una comunicazione bidirezionale tra cervello e intestino, nota come *gut-brain axis*, è da tempo riconosciuta. Da un lato, il cervello modula il tratto gastrointestinale regolandone la motilità, la secrezione, l'assorbimento dei nutrienti e il flusso sanguigno. Allo stesso tempo, l'intestino può influenzare la funzione e il comportamento del cervello [2]. È stato dimostrato che molti meccanismi sono coinvolti in questa comunicazione bidirezionale che attraverso il nervo vago stimola l'attivazione immunitaria e la produzione di metaboliti microbici e neurometaboliti come acidi grassi a catena corta, vitamine e neurotrasmettitori [3]. La maggior parte dei neurotrasmettitori comuni nel cervello umano come GABA, 5-HT e altre monoamine possono essere prodotti dai batteri intestinali.

Recenti studi hanno dimostrato che il microbiota intestinale è coinvolto nel neurosviluppo e nelle diverse funzioni cerebrali attraverso la regolazione dell'asse intestino-cervello [3]. I sintomi gastrointestinali, come costipazione, diarrea e dolore addominale, sono comorbidità comuni in molte malattie neurologiche. Inoltre, i recenti progressi nel sequenziamento metagenomico hanno rivelato che il disequilibrio nella composizione del microbiota intestinale (disbiosi) è presente in molte malattie neurologiche. Di conseguenza, l'importanza di mantenere una comunità microbica equilibrata nella regolazione dell'asse intestino-cervello è di fondamentale importanza anche nella gestione dello stress [4]. In effetti, il microbiota intestinale può influenzare le funzioni cerebrali e la regolazione del sonno interagendo con le vie neurali, endocrine e immunitarie.

Inoltre, le risposte allo stress e le attività neuroendocrine influenzano la composizione del microbioma intestinale alterando in modo differenziale la crescita delle specie batteriche e la produzione di fattori di virulenza batterica. In particolare, le Enterobacteriaceae, una famiglia che comprende la maggior parte dei patogeni aerobici Gram-negativi, è in grado di sfruttare le risposte allo stress dell'ospite per migliorare la propria crescita e la virulenza [5].

Sulla base di precedenti test in vitro, due ceppi probiotici sono stati selezionati per la loro capacità di ridurre l'infiammazione sistemica e di interagire con l'asse intestino-cervello attraverso la colonizzazione dell'epitelio intestinale e l'espressione di molecole attive. Tali ceppi probiotici sono in grado di contrastare la disbiosi, che è stata correlata a malattie

neurologiche e alterate risposte comportamentali allo stress. Il modello in vitro utilizzato aveva lo scopo di valutare l'influenza dei probiotici su questi percorsi misurando i livelli di espressione di marcatori selezionati dopo aver indotto la risposta allo stress. Combinando i risultati ottenuti, *Lactobacillus reuteri* PBS072 e *Bifidobacterium breve* BB077 sono stati selezionati per il loro utilizzo in un integratore alimentare formulato per la gestione dello stress e dei disturbi del sonno.

B.6.ii Obiettivi

Lo scopo del presente studio sarà quello di valutare se un integratore alimentare contenente probiotici può migliorare i sintomi dello stress lavoro correlato.

B.6.iii Metodi di indagine proposti

Per valutare l'effetto dell'integratore alimentare sullo stress lavoro correlato, i soggetti selezionati verranno invitati a rispondere a due questionari atti a valutare il loro stato emozionale e la qualità del sonno, prima e dopo la somministrazione dell'integratore alimentare.

La valutazione del trattamento sarà determinata dall'output ottenuto nei seguenti questionari:

PITTSBURGH SLEEP QUALITY INDEX (PSQI) – QUALITÀ DEL SONNO

Il PSQI [6] è un questionario a 19 item per valutare la qualità del sonno percepita dal soggetto. Nel questionario vengono valutate le seguenti componenti:

- Qualità soggettiva del sonno;
- Latenza di sonno;
- Durata del sonno;
- Efficacia abituale del sonno;
- Disturbi del sonno;
- Uso di farmaci ipnotici;
- Disturbi durante il giorno;
- Il punteggio globale varia da 0 (nessuna difficoltà) a 21 (grave difficoltà). Verrà considerato come miglioramento una diminuzione del punteggio ottenuto alla fine del trattamento con il prodotto assegnato rispetto al punteggio ottenuto prima dell'assunzione del prodotto stesso.

PROFILE OF MOOD STATES (POMS) - VALUTAZIONE DELLO STATO D'ANIMO

Il POMS [7] è un questionario per identificare e quantificare lo stato dell'umore soggettivo. Misura sei fattori e altrettanti stati dell'umore, dalla tensione ansiosa alla depressione e al senso di disorientamento. Con soggetti considerati normali rappresenta una misura sensibile degli effetti di varie condizioni sperimentali.

Il test consiste di 58 aggettivi che definiscono 6 fattori:

- Tensione - Ansia (fattore T)
- Depressione - Avvilimento (fattore D)
- Aggressività - Rabbia (fattore A)
- Vigore - Attività (fattore V)
- Stanchezza - Indolenza (fattore S)

- Confusione - Sconcerto (fattore C)

I soggetti devono scegliere l'intensità con la quale hanno risentito di quel particolare stato dell'umore nell'ultima settimana, associando un valore che va da 0 a 4 per ogni aggettivo

Il punteggio finale è determinato dalla sommatoria dei valori ottenuti dalle diverse categorie (fattori) la Total Mood Disturbance, secondo la formula:

$$TMD = (Ten + DEP + ANG + FAT + CONF) - VIG$$

Il punteggio totale della TMD va da 0-200. Verrà considerato come miglioramento una diminuzione del punteggio ottenuto alla fine del trattamento con il prodotto assegnato rispetto al punteggio ottenuto prima dell'assunzione del prodotto stesso.

Una volta calcolati i punteggi, i dati ottenuti verranno sottoposti ad un test Anova e successivamente al test di Wilcoxon (Wilcoxon Signed-Rank Test) per determinare le variazioni statisticamente significative inter e intra gruppo.

B.6.iv Disegno dello studio

I soggetti coinvolti nello studio assumeranno alternativamente un integratore alimentare contenente probiotici e un prodotto placebo come controllo per 30 giorni.

Lo studio verrà realizzato in modalità crossover: i soggetti verranno assegnati in modo casuale ai due bracci, ricevendo così ogni prodotto secondo lista di randomizzazione.

I volontari assumeranno uno dei due prodotti per un periodo di 30 giorni, seguito da un periodo di wash-out di 15 giorni. Dopo questa pausa, ogni volontario assumerà l'altro prodotto per 30 giorni.

I prodotti utilizzati nello studio verranno somministrati sotto forma di capsule contenenti probiotici o eccipienti come segue:

- **Integratore alimentare** = 2×10^9 CFU *Lactobacillus reuteri* PBS072, 2×10^9 CFU *Bifidobacterium Breve* BB077, Maltodestrina
- **Prodotto placebo** = Maltodestrina

I soggetti assumeranno una capsula al giorno con un bicchiere d'acqua, lontano dai pasti.

Lo studio verrà condotto su un totale di 30 adulti sani di età compresa tra i 18 e i 65 anni.

I soggetti arruolati verranno scelti in base ai criteri di inclusione/esclusione riportati al punto C3.

Il programma prevede 4 incontri secondo quanto segue:

Colloquio iniziale primo trattamento (T0): dopo lettura e sottoscrizione dei moduli sul consenso informato e spiegazione dettagliata del protocollo di studio da parte dello sperimentatore, i soggetti verranno selezionati secondo quanto previsto al punto C3. Una volta stabilita l'idoneità del soggetto verranno somministrati i questionari da compilare. Una volta avvenuta la compilazione, i questionari verranno ritirati per la loro conservazione e verrà fissato il colloquio successivo. Verrà inoltre consegnato il prodotto assegnato come primo trattamento.

Colloquio finale primo trattamento (T30): verranno di nuovo somministrati i questionari e verranno ritirati eventuali capsule rimanenti. Una volta avvenuta la

compilazione i questionari verranno ritirati per la loro conservazione e verrà fissato il colloquio successivo.

Colloquio iniziale secondo trattamento (T45): dopo quindici giorni di wash-out, il soggetto verrà invitato a compilare di nuovo i questionari. Una volta avvenuta la compilazione i questionari verranno ritirati per la loro conservazione e verrà fissato il colloquio successivo. Verrà inoltre consegnato il prodotto assegnato come secondo trattamento.

Colloquio finale secondo trattamento (T75): verranno di nuovo somministrati i questionari e verranno ritirati eventuali capsule rimanenti. Una volta avvenuta la compilazione i questionari verranno ritirati per la loro conservazione.

La dimensione del campione è stata stimata in base all'effetto sull'esito dello studio, ovvero la percentuale di pazienti che si stima presenteranno un miglioramento delle alterazioni dello stato emozionale e della qualità del sonno rispetto alla condizione iniziale. Sulla base dei dati presenti nella letteratura scientifica di riferimento, lo studio è stato progettato per mostrare una potenza sufficiente (80%) per rilevare una differenza tra i gruppi dopo il trattamento con un livello di significatività di 0,05.

Risultati attesi: ci si aspetta una riduzione dello stress percepito dai soggetti che parteciperanno allo studio misurato in termini di miglioramento del punteggio ottenuto nei due questionari.

B.6.v Riferimenti bibliografici

1. https://www.who.int/occupational_health/topics/stressatwp/en/
2. Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2011). Brain–gut–microbe communication in health and disease. *Frontiers in physiology*, 2, 94.
3. Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). Mood by microbe: towards clinical translation. *Genome medicine*, 8(1), 36.
4. Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A., & Severi, C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, 28(2), 203.
5. Galland, L. (2014). The gut microbiome and the brain. *Journal of medicinal food*, 17(12), 1261-1272.
6. Curcio, G., Tempesta, D., Scarlata, S., Marzano, C., Moroni, F., Rossini, P. M., Ferrara, M., & De Gennaro, L. (2013). Validity of the Italian version of the Pittsburgh sleep quality index (PSQI). *Neurological Sciences*, 34(4), 511-519.
7. Farnè, M., Sebellico, A., Gnugnoli, D., & Corallo, A. (1991). POMS: Profile of Mood States: Manuale Adattamento Italiano. Firenze: GiuntiOS.

B7. Dichiarazione assenza conflitto di interessi (All. 5)

Si allega alla modulistica presentata la dichiarazione di assenza conflitto di interessi

C. INFORMAZIONI RELATIVE AI PARTECIPANTI

C1. Quali tipologie di soggetti prenderanno parte allo studio?

- ☐ Studenti
- ☒ Adulti (età superiore a 18 anni e in grado di esprimere il loro consenso)
- ☐ Bambini e ragazzi di età inferiore a 18 anni
- ☐ Anziani (età superiore ai 65 anni e in grado di esprimere il loro consenso)
- ☐ Soggetti di madrelingua non italiana
- ☐ Soggetti con deficit cognitivo/mentale, NON in grado di esprimere il proprio consenso
- ☐ Altre persone la cui capacità di esprimere consenso possa essere compromessa (indicare per quale motivo)
- ☐ Soggetti con disabilità fisica (specificare di quale tipo)
- ☐ Soggetti istituzionalizzati (ad es., carcerati, pazienti ospedalizzati ecc.)
- ☐ Pazienti e/o clienti segnalati da medici, psicologi o altre categorie di professionisti
- ☐ Non è possibile determinare la tipologia di soggetti (ad es., somministrazione via internet)

C2. È possibile che alcuni dei soggetti si trovino in una posizione di dipendenza nei confronti del ricercatore o di uno dei suoi collaboratori, tale per cui si possa supporre che l'espressione del consenso a partecipare allo studio non sia del tutto libera e priva da ogni tipo di pressione (ad es., studente/professore, paziente/medico, dipendente/datore di lavoro)? Se sì, indicare come si intende provvedere per prevenire la possibilità che il soggetto si senta obbligato a prendere parte alla ricerca

No

C3. Criteri di inclusione/esclusione dei partecipanti alla ricerca:

Criteri di inclusione:

- Adulti di età compresa tra i 18 e i 65 anni in stato di buona salute;
- Disponibilità ad utilizzare solo i prodotti da testare durante tutto il periodo di studio;
- Disponibilità a non utilizzare prodotti simili che potrebbero interferire con il prodotto da testare;
- Disponibilità a non variare la normale routine quotidiana (es. stile di vita, attività fisica, ecc.).

Criteri di esclusione:

- Soggetti con sensibilizzazione nota o sospetta a uno o più ingredienti della formulazione in esame;
- Soggetti non in grado di comunicare o collaborare con lo sperimentatore per problemi legati al linguaggio, disabilità intellettiva o funzionalità cerebrale compromessa;
- Soggetti che soffrono di disturbi psichiatrici come schizofrenia, o disturbi psicotici come disturbo bipolare o disturbo da uso di sostanze;
- Uso di rimedi erboristici o farmaci psicotropi destinati alla depressione assunti nelle ultime 2 settimane prima del basale o durante lo studio;

- Ricevere consulenza o terapie psicologiche all'inizio o durante lo studio;
- Partecipazione a qualsiasi sperimentazione clinica nei 3 mesi precedenti prima del basale;
- Soggetti che prevedono di assumere antibiotici durante il periodo di trattamento.

C4. Come verranno diffusi le informazioni e l'invito a partecipare alla ricerca? (Allegare copia di eventuali locandine o lettere da inviare)

I partecipanti verranno arruolati all'interno degli uffici Universitari e negli spin-off afferenti all'Università della Calabria.

C5. È prevista qualche forma di indennità per il partecipante volontario sano?

Non applicabile

N.B. Lo sperimentatore è tenuto a comunicare eventuali modifiche delle modalità di coinvolgimento

D. RISCHIO E GESTIONE DEL RISCHIO

D1. La ricerca prevede

- ☒ Utilizzo di questionari (allegare una copia)
- ☐ Interviste strutturate o semi-strutturate (allegare copia delle domande che verranno poste; ove questo non sia possibile, indicare gli argomenti che verranno trattati)
- ☐ Interviste in profondità
- ☐ Focus group
- ☐ Narrazioni autobiografiche
- ☐ Raccolta di diari (*diary keeping*)
- ☐ Osservazione del comportamento dei soggetti a loro insaputa
- ☐ Osservazione del comportamento dei soggetti
- ☐ Registrazioni audio o video dei soggetti
- ☐ Somministrazione di stimoli, compiti o procedure e registrazione di risposte comportamentali, opinioni o giudizi
- ☐ Somministrazione di stimoli, compiti o procedure che il soggetto potrebbe trovare fastidiosi, stressanti, fisicamente o psicologicamente dolorosi, sia durante sia successivamente la conduzione dello studio
- ☐ Registrazione di movimenti oculari
- ☐ Utilizzo di TMS (*Transcranial Magnetic Stimulation*, o stimolazione magnetica transcranica)
- ☐ Immersione in ambienti di realtà virtuale
- ☐ Registrazione di potenziali evocati
- ☐ Somministrazione di test, questionari o protocolli sperimentali attraverso internet (web, posta elettronica)
- ☐ Utilizzo di test neuropsicologici
- ☐ Tecniche di neuroimmagine
- ☐ La messa in atto di comportamenti che potrebbero diminuire l'autostima dei soggetti, o indurre imbarazzo, dispiacere o depressione
- ☐ Procedure di inganno dei soggetti
- ☒ La somministrazione di sostanze o agenti (ad es., farmaci, alcol)
- ☐ Raccolta di campioni di tessuto o fluidi umani (ad es., esami del sangue)
- ☐ La partecipazione ad un trial clinico
- ☐ Prelievo materiale genetico
- ☐ Altro (specificare)

D2. Nel caso in cui la ricerca preveda l'uso di procedure che potrebbero risultare stressanti o pericolose per i partecipanti, descrivere la natura dei rischi e le conseguenze ragionevolmente attese delle procedure utilizzate

Non applicabile

D3. È prevista una specifica polizza di assicurazione per responsabilità civile aggiuntiva a quella di Ateneo? Se sì, allegare il contratto di assicurazione in copia integrale

No

D4. Come si prevede di affrontare eventuali complicanze o reazioni avverse

Il prodotto oggetto di studio è costituito da probiotici e da amido di mais come eccipiente, con storia di uso alimentare sicuro. Si esclude quindi la presenza di reazioni avverse a tali sostanze. La miscela probiotica oggetto di studio è già stata utilizzata precedentemente e durante la sua somministrazione non è stato riscontrato nessun effetto avverso. Qualsiasi eventuale reazione avversa, in ogni caso, verrà raccolta e registrata dagli sperimentatori e il partecipante soggetto alla reazione terminerà immediatamente l'assunzione del prodotto.

D5. Si prevede che vi possano essere benefici per chi prende parte alla ricerca? Quali?

L'utilizzo del prodotto testato potrebbe portare benefici temporanei e limitati a qualità del sonno e stress (nel gruppo sperimentale ma non nel gruppo di controllo).

E. INFORMAZIONE E CONSENSO

E1. Sintesi del percorso informativo previsto (colloquio, firma del consenso, restituzione dei risultati...)

Ai partecipanti verrà fornito un modulo informativo in cui verranno spiegati i motivi dello studio e le modalità di sperimentazione. In seguito, lo sperimentatore fornirà a voce alcune informazioni e risponderà ad eventuali domande dei partecipanti. Una volta chiariti tutti i punti della ricerca sarà fornito un questionario di screening per valutare i criteri di esclusione dei partecipanti ed un modulo per il Consenso Informato da firmare. Non è prevista una fase di restituzione dei risultati ma il soggetto potrà richiederli in qualsiasi momento.

E2. Modulo Informativo e della Dichiarazione di Consenso (All. 3)

Si allega una copia del Modulo Informativo e della Dichiarazione di Consenso.

E3. Nel caso si coinvolgano i soggetti non in grado di esprimere il consenso, indicare a chi si chiederà di acconsentire alla partecipazione precisandone il ruolo e i motivi

Non è prevista tale possibilità

E4. Qualora, per la realizzazione dello studio, si ritenesse metodologicamente opportuno non informare i partecipanti, prima dell'inizio della sperimentazione, sull'obiettivo della stessa, specificare quali saranno le modalità del successivo colloquio di chiarificazione

Gli obiettivi dello studio e le finalità dello stesso verranno esaustivamente spiegati nella fase di arruolamento. Ciò nonostante, lo sperimentatore rimarrà a disposizione durante i colloqui intermedi per ribadire tali obiettivi e fornire qualsiasi informazione aggiuntiva richiesta dai soggetti.

**il documento è ispirato a quello in uso presso il Comitato Etico dell'Università degli Studi Milano "Bicocca"*