



EBOOKECM JOURNAL
N. 6 - MAR 2023

MICROBIOTA INTESTINALE DEL CANE E DEL GATTO

ARTICOLI SELEZIONATI E TRADOTTI DA

mSystems // Frontiers in Microbiology // Scientific Reports // PLoS ONE // Frontiers in Veterinary Science // Animals // Life // Veterinary Sciences // Veterinary Clinical Pathology // iMeta

La presente pubblicazione è accreditata come **corso ECM FAD** solo attraverso apposita registrazione su www.ebookecm.it

EBOOKECM JOURNAL

Titolo: MICROBIOTA INTESTINALE DEL CANE E DEL GATTO

Curatela: Maria Mayer

Traduzioni: Giuditta Spassini

Editing e copertina: Attilio Scullari

Concept copertina: Licia Casula

Direzione editoriale: Alessandra Pontis, Mario Marcello Verona

Supervisione scientifica: Carlo Duò, Alessandra Pontis

Data Pubblicazione: Marzo 2023



Licenza Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

Questa pubblicazione è liberamente scaricabile, copiabile e ridistribuibile su ogni media o in ogni formato, previa citazione completa delle fonti e indicazione delle eventuali modifiche effettuate. Non è possibile invece distribuire la pubblicazione per fini commerciali diretti o indiretti.

[Leggi il testo della licenza integrale.](#)



COLLANA EBOOKECM

EBOOK PER L'EDUCAZIONE CONTINUA IN MEDICINA © 2023

ISBN: 9788831253994

ISSN: 2785-2911

BOOKIA SRL. Servizi di editoria accreditata, Piazza Deffenu 12, 09125 Cagliari.

INDICE

INTRODUZIONE	5
PARTE I. MICROBIOTA DEL CANE E DEL GATTO: DEFINIZIONE, FUNZIONI E METODI DI STUDIO	
1 - Analisi del microbioma intestinale in cani e gatti	10
2 - Il ruolo del microbioma intestinale e del metaboloma canino nella salute e nelle malattie gastrointestinali	33
PARTE II. MICROBIOTA E NUTRIZIONE	
3 - Effetti dell'alimentazione sul microbioma gastrointestinale di cani e gatti: impatto sulla salute e sulla malattia	61
4 - Il consumo di alimenti freschi aumenta la diversità del microbioma e promuove cambiamenti nella composizione dei batteri sulla pelle dei cani da compagnia rispetto agli alimenti secchi	110
PARTE III. MICROBIOTA E PATOLOGIE DEL CANE E DEL GATTO	
5 - Caratterizzazione del microbioma fecale in gatti con malattia infiammatoria intestinale o linfoma alimentare a piccole cellule	130
6 - La disbiosi intestinale e la sua associazione con i metaboliti derivati dal microbiota intestinale nei cani con malattia mixomatosa della valvola mitrale	150
7 - I gatti diabetici presentano una ridotta diversità microbica intestinale e una mancanza di batteri produttori di butirrato	174
PARTE IV. FARMACI E MICROBIOTA	
8 - Impatto delle terapie antibiotiche sulla dinamica dei geni della resistenza e composizione del microbiota intestinale animale	201
9 - Effetti a breve e lungo termine dell'amoxicillina/acido clavulanico o della doxiciclina sul microbioma gastrointestinale dei gatti in crescita	213
10 - La co-occorrenza di geni di resistenza agli antibiotici tra i cani e i loro proprietari nelle famiglie	241

PARTE V. TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE-FMT	262
11 - C'è futuro per il trapianto di microbiota fecale come nuova strategia per la modulazione del microbiota intestinale in medicina umana e veterinaria?	264
12 - Profili microbici e metabolici fecali nei cani con diarrea acuta sottoposti a trapianto di microbiota fecale o a metronidazolo orale	299
13 - Recupero del microbioma fecale e degli acidi biliari nei cani sani dopo la somministrazione di tilosina con e senza trapianto di microbiota fecale	323
Le fonti di questo numero	342

INTRODUZIONE

Pochi studi hanno modificato nel complesso l'approccio alla medicina come quelli che stanno apparendo negli ultimi 10-15 anni sul microbiota o microbioma intestinale, tanto dell'uomo come degli animali. Ma partiamo dalle definizioni.

Si definisce microbiota il consorzio di batteri, virus, protozoi e funghi che convive con noi organismi superiori. Se non si specifica ulteriormente (es. microbiota cutaneo), in generale quando ci riferiamo a microbiota stiamo parlando di quello intestinale, che essendo numericamente più rappresentato è quello maggiormente studiato e dai risvolti più importanti per la salute dell'ospite. Quando si utilizza la parola microbioma invece si fa riferimento anche alla metodica utilizzata per studiare questo microbiota, di tipo genomico appunto (gli anglosassoni amano i sincretismi: microbioma = MICRObiota + genOMA).

Per diversi anni dopo la "scoperta" del microbiota intestinale (ovvero della sua importanza nel determinare salute e patologia dell'ospite), siamo passati da considerare la microflora intestinale come un "complemento", da noi gentilmente ospitato ed eventualmente rieducato a suon di antibiotici in caso i batteri "cattivi prendessero il sopravvento, ad un organo in più del nostro organismo, connesso e inserito nel sistema al pari del cuore o del fegato di quel soggetto. Alcuni paper più recenti vanno oltre questa definizione di "organo in più", di cui studiare fisiologia e patologia, e arrivano a definirci un super-organismo, composto tanto da cellule eucariote come da microbiocche, costantemente interconnesse e interdipendenti, al pari di un alveare.

Fatte le presentazioni, torniamo al punto originale, ovvero come mai gli studi su questo argomento stanno "sconvolgendo" la medicina dalle basi. I risultati degli studi riguardo il microbio-

ta ci stanno, a parere di chi scrive, avvicinando nuovamente ad una visione ippocratica, a volte elusa, a volte dimenticata, ricordandoci che “tutte le malattie nascono nell’intestino”. In questo senso, l’attenzione del medico e del medico veterinario rispettivamente vengono nuovamente spostate anche su aspetti come dieta e stili di vita, dimenticati o comunque considerati meno importanti se rapportati ai farmaci sintetici.

Inoltre, i risultati scientifici riguardo il microbiota intestinale stanno in qualche modo ricucendo quell’iperfrazionamento del corpo umano e animale, utilizzato negli ultimi 100 anni per favorire la comprensione della materia medica. In questo senso il microbiota ha portato alla luce ad esempio una serie di “assi”: l’asse intestino-cervello, l’asse intestino-tiroide, l’asse intestino-cutane etc. in cui il microbiota ricopre sempre un ruolo principale. Scopriamo quindi, anche come medici e medici veterinari laureati da qualche anno, che quella suddivisione in capitoli “sistema nervoso”, “apparato gastro-enterico”, “apparato cardio-circolatorio” etc. era solo funzionale al nostro apprendimento e non una realtà dei fatti. Al contrario, come anche la Psico-Neuro-Endocrino-Immunologia (PNEI, altra disciplina che negli ultimi 30-40 anni sta rivoluzionando la medicina) ci insegna “il corpo è pettegolo” (M. Risi, MD, 2020, personal communication) ovvero tutti i sistemi sono sempre connessi e in comunicazione.

Premesso questo, nell’immaginare quindi un numero dell’EBJ che potesse occuparsi di microbiota, è chiaro quindi anche al lettore che la scelta dei paper da raccogliere è stata pensata soprattutto per dare la sensazione chiara, la magnitudine, di questo cambio in atto.

Partendo quindi dalle basi, rappresentate dalle metodiche di studio e dal ruolo in salute e in malattia del microbiota intestinale del cane e del gatto, questa raccolta si propone di fornire informazioni aggiornate riguardo le correlazioni con la nutrizione, con alcune specifiche patologie di queste specie, con i farmaci e in particolare gli antibiotici e le possibilità terapeutiche definibili all’orizzonte.

Last but not least, ho voluto commentare alcuni punti in particolare, oltre ad aggiungere queste brevi introduzioni, soprattutto per fornire al lettore alcuni spunti di lettura critica dei paper. Vista l'enorme prolificità di questo ramo di pubblicazione infatti il rischio di incappare in lavori non totalmente affidabili è abbastanza alto e avere qualche spunto credo possa essere utile.

PARTE I

MICROBIOTA
DEL CANE E DEL GATTO:
DEFINIZIONE, FUNZIONI E
METODI DI STUDIO

Quando si identifica un nuovo organo, prima di tutto bisogna studiarne la fisiologia, per poi comprendere la sua patologia. Per approfondire però la fisiologia del microbiota intestinale, non possiamo esimerci dal conoscere le metodiche attualmente utilizzate, compresi i loro punti di forza e debolezza, esattamente come quando ci viene spiegata la differenza fra un microscopio e una lente di ingrandimento.

Una volta chiarite le metodiche di studio, possiamo invece, sempre in questa prima parte del Journal, ad approfondire il ruolo ricoperto in salute e in malattia del cane e del gatto da questo sorprendente consorzio di microbi.

Conoscere i nostri limiti, in termini tecnici (performance dei singoli studi) e generali (es. definizione di “microbiota normale” e quindi patologico) aiuta, a mio parere, a mantenere i piedi per terra di fronte a conoscenze che altrimenti rischiano di esaltare in qualche modo il medico (veterinario o non). Per non ricadere in un meccanicismo positivista, dobbiamo mantenere la visione della complessità che il microbiota ci porta, senza cercare (al momento) scorciatoie cliniche. Siamo ancora agli inizi, andiamoci cauti insomma con le nostre conclusioni e i nostri consigli!

Per i più attenti: noterete forse fra gli autori, una ripetizione quasi ossessiva del cognome Suchodolski. Jan Suchodolski rappresenta in effetti al momento uno dei maggiori esperti mondiali di microbiota del cane e del gatto e i suoi lavori presso la Texas University e in collaborazione nel mondo sono non solo numerosissimi, ma nella maggior parte dei casi fondamentali nel delineare il quadro generale.

N.d.C.

1 - ANALISI DEL MICROBIOMA INTESTINALE IN CANI E GATTI

Tratto e tradotto da

Suchodolski, J. *Analysis of the gut microbiome in dogs and cats.*
Vet Clin Pathol. 2022; 50 (Suppl. 1): 6-17.

<https://doi.org/10.1111/vcp.13031>



Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

Il microbioma intestinale è un importante organo immunitario e metabolico. I batteri intestinali producono vari metaboliti che influenzano la salute dell'intestino e di altri organi, tra cui reni, cervello e cuore. Le alterazioni del microbioma in stati di malattia sono definite disbiosi. Il concetto di disbiosi è in continua evoluzione e comprende cambiamenti nella diversità e/o nella struttura del microbioma e cambiamenti funzionali (ad esempio l'alterazione della produzione di metaboliti batterici). Gli strumenti molecolari sono oggi lo standard per l'analisi del microbioma. Il sequenziamento dei geni microbici fornisce informazioni sui batteri presenti e sul loro potenziale funzionale, ma mancano la standardizzazione e la validazione analitica dei metodi e la coerenza nella comunicazione dei risultati. Ciò rende difficile il confronto dei risultati degli studi o dei singoli pazienti clinici. L'indice di disbiosi (DI) è un test certificato di PCR quantitativa per campioni fecali canini, che misura l'abbondanza di sette importanti taxa batterici e riassume i risultati in un unico numero. Sono stati stabiliti degli intervalli di riferimento per i cani e il DI può essere utilizzato per valutare il microbioma dei pazienti clinici nel tempo e in risposta alla terapia (ad esempio, il trapianto di microbiota fecale). L'ibridazione in situ o l'immunostochimica consentono di identificare i batteri aderenti alla mucosa e intracellulari negli animali con malattie intestinali, in particolare la colite granulomatosa. In futuro si dovrebbero misurare i metaboliti batterici nelle feci o nel siero come marca-

tori di una corretta funzionalità del microbioma. Questo articolo riassume i diversi approcci all'analisi del microbiota intestinale e come potrebbero essere applicabili agli studi di ricerca e alla pratica clinica nei cani e nei gatti.

1.1 IMPORTANZA DEL MICROBIOMA INTESTINALE NELLA SALUTE E NELLA MALATTIA

Il tratto gastrointestinale (GI) ospita un complesso ecosistema costituito da vari microbi come batteri, virus, funghi e protozoi. Questo sistema viene definito microbiota quando si fa riferimento alla tassonomia (“chi sono”) e microbioma quando si fa riferimento al contenuto genico e alla funzione (“cosa fanno”). I batteri costituiscono di gran lunga la componente maggiore di questi microrganismi intestinali, dato il valore >98% delle letture di sequenziamento metagenomico da campioni fecali assegnate a batteri, in cani e gatti.[1, 2] Gli organismi fungini sono stati identificati come una componente normale del microbiota nell'intestino tenue e crasso, ma il loro contributo alla salute e alla malattia rimane sconosciuto.[3, 4]

Il microbioma intestinale è costituito principalmente da batteri anaerobi obbligati o facoltativi, soprattutto nell'intestino crasso, molto popolato. I phyla predominanti nei cani e nei gatti sono Firmicutes, Fusobacteria e Bacteroidetes.[5, 6] I batteri intestinali producono o convertono le molecole alimentari o i farmaci in metaboliti di origine batterica; per questo il microbioma intestinale è considerato un importante organo metabolico. Un microbioma intestinale equilibrato influenza positivamente la salute dell'ospite, modulando il sistema immunitario, difendendo contro i patogeni intestinali e apportando vitamine e nutrienti. Ad esempio, i carboidrati alimentari vengono fermentati dai batteri in acidi grassi a catena corta (SCFA [*Short-Chain Fatty Acids*]), che forniscono energia alle cellule epiteliali, regolano la motilità intestinale e hanno proprietà antinfiammatorie.[7] Molti altri metaboliti derivati dai batteri hanno proprietà benefiche,

ad esempio l'indolo,[8] un prodotto di degradazione batterica dell'aminoacido dietetico triptofano, e gli acidi biliari secondari, convertiti dai batteri intestinali a partire dagli acidi biliari primari secreti dal fegato.[9]

Questi effetti microbici vanno oltre il tratto gastrointestinale. Gli studi condotti su cani e gatti dimostrano che le alterazioni del microbioma intestinale e/o della sua funzione non sono presenti solo nelle malattie gastrointestinali,[10, 11] ma si associano anche ad altri disturbi di altri sistemi d'organo, come le malattie renali croniche (CKD [*Chronic Kidney Diseases*]),[12] le malattie cardiache,[13-15] i disturbi neurologici,[16] il diabete mellito,[17] e l'obesità.[18] Sebbene i meccanismi esatti alla base di molti di questi disturbi debbano ancora essere esplorati, sono ormai ben riconosciute alcune vie microbiche che contribuiscono alla salute o alla malattia (Tabella 1); alcune di queste possono anche essere misurate con diversi metodi. Una migliore comprensione del microbiota intestinale e della sua funzione porterà a nuove diagnosi e terapie. Questo articolo riassume i diversi modi in cui viene analizzato il microbiota intestinale e come possono essere applicati alla ricerca e alla pratica clinica.

Fonte	Batteri coinvolti	Metaboliti microbici	Effetti sull'ospite / Benefici quando le concentrazioni sono normali	Effetti sull'ospite / Potenzialmente deleteri se in concentrazione anomala
Carboidrati alimentari	Vari (es. <i>Faecalibacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i>)	Fermentazione in acidi grassi a catena corta	Proprietà antinfiammatorie Migliora la funzione di barriera Regola la motilità intestinale Fornisce energia sistemica e locale	Un rapporto anomalo di SCFA può attivare i fattori di virulenza degli enteropatogeni (es. geni di invasione di <i>Salmonella</i> , motilità di <i>Escherichia coli</i>).

Acidi biliari primari del fegato	Principalmente <i>Clostridium hiranonis</i> in cani e gatti	Trasformazione in acidi biliari secondari (BA [<i>Bile Acids</i>])	Antinfiammatorio I BA secondari sono uno dei principali regolatori del microbioma normale, inibiscono anche la crescita di <i>C difficile</i> , <i>C perfringens</i> , <i>E coli</i> .	L'aumento dei BA primari può portare a diarrea secretoria
Triptofano dalla dieta	Vari	Metaboliti dell'indolo	Antinfiammatorio, mantiene la funzione di barriera intestinale	In concentrazioni elevate, l'indoxil solfato citotossico e putrefattivo agisce come tossina uremica.
Carnitina e collina alimentari	Vari (es. <i>E coli</i>)	N-ossido di trimetilammina (TMAO)	n/a	Alterazioni del metabolismo del colesterolo associate a malattie cardiache

Tabella 1. Contributo dei batteri intestinali alle vie metaboliche che influenzano la salute e la malattia. Abbreviazione: n/a, non applicabile. Fonte: Adattato da: Ziese AL e Suchodolski JS, *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2021

1.2 VALUTAZIONE DEL MICROBIOMA INTESTINALE: CONSIDERAZIONI GENERALI

È importante sottolineare che i batteri intestinali costituiscono solo una parte della relazione complessa tra le cellule epiteliali intestinali, lo strato di muco intestinale, il sistema immunitario dell'ospite e l'ambiente luminale. La composizione del microbiota è parzialmente influenzata dalla dieta, da farmaci come antibiotici e chemioterapici, dall'infiammazione intestinale, da cambiamenti strutturali nell'intestino e da altri fattori.[19-21] Alcuni di questi fattori sono stati esaminati da altri studi degli ultimi anni.[22] In sostanza, gli studi dovrebbero valutare questi meccanismi con metodi complementari (tassonomici e funzionali) per capire come alcuni batteri sono modulati dal microambiente intestinale e in quali situazioni contribuiscono alla salute e alla malattia.

Esistono delle differenze nelle popolazioni batteriche di stomaco, intestino tenue e crasso, dovute principalmente a diffe-

renze nella fisiologia intestinale (differenze nei livelli di ossigeno, pH, composti antimicrobici e motilità intestinale). Lo stomaco canino ospita solo pochi tipi di batteri in grado di sopravvivere all'ambiente acido, prevalentemente *Helicobacter* spp. e, in misura minore, batteri di tipo lattico.[23] L'intestino tenue ospita un misto di batteri aerobi e anaerobi.[24, 25] L'intestino crasso è altamente popolato da batteri prevalentemente anaerobi.[5, 6]

La maggior parte degli studi ha considerato il microbioma fecale, il cui campionamento è più accessibile in contesto clinico. Nonostante ciò l'analisi dei campioni fecali non fornisce informazioni complete sull'eventuale presenza di batteri aderenti alla mucosa o enteroinvasivi o sulla composizione e quantità del microbiota dell'intestino tenue. Esistono differenze tra le popolazioni batteriche luminali e quelle aderenti alla mucosa e, per alcuni disturbi, potrebbe essere utile la valutazione dei batteri aderenti alla mucosa mediante ibridazione fluorescente in situ (FISH)[10, [21, 26] Uno studio recente ha utilizzato la FISH (Figura 1) per descrivere i batteri (*Helicobacter* spp.) presenti in profondità nelle cripte del colon di cani sani; i batteri qui presenti potrebbero avere proprietà immunologiche più importanti per la salute e la malattia rispetto ai batteri luminali. [27] Il microbiota dell'intestino tenue, anche se ha una composizione nella norma, può essere considerato un segno clinico quando c'è una quantità anomala o aumentata di substrato alimentare o di farmaci nel lume intestinale. Questa situazione può essere dovuta all'alimentazione con diete a scarsa digeribilità, a malattie infiammatorie che danneggiano i trasportatori nell'orletto a spazzola,[28, 29] e alla mancanza di enzimi digestivi nei pazienti con insufficienza pancreatica esocrina (EPI [*Exocrine Pancreatic Insufficiency*]).[30] Quindi possono essere patologici non solo i cambiamenti nelle popolazioni batteriche, ma anche la conversione microbica anomala dei substrati luminali da parte del microbiota normale. Sebbene alcune delle alterazioni del microbioma che probabilmente hanno origine nell'intestino tenue possano essere rilevate in campioni fecali, come riportato in cani che ricevono omeprazolo,[23, 31] in cani con EPI,[32] e in cani con enteropatie cro-

niche (CE),[33, 34] le limitazioni di cui sopra devono comunque essere considerate quando si analizzano solo campioni fecali.

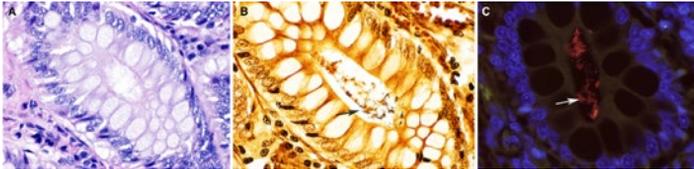


Figura 1

Fotomicrografia della mucosa del colon di un cane sano. I batteri all'interno delle cripte dei cani sani sono poco evidenti alla colorazione di routine con ematossilina ed eosina (A). La colorazione all'argento di Steiner (B) evidenzia batteri abbondanti all'interno delle cripte (indicati dalla freccia). Ibridazione in situ a fluorescenza con la sonda EUB338 che ha come target tutti i batteri presenti nelle cripte. I batteri marcati appaiono in rosso (freccia). L'autofluorescenza della mucosa intestinale risulta verde. I nuclei della mucosa del colon colorati con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) appaiono in blu. Obiettivo $\times 60$. Per gentile concessione della dott.ssa Paula Giarretta, DACVP, Universidade Federal de Minas Gerais, [Brasile27](#).

Il microbiota intestinale presenta un'elevata diversità filogenetica e nonostante i progressi dei metodi molecolari usati per mapparla è ancora difficile descrivere tutti i batteri che lo compongono. Spesso i metodi basati sul sequenziamento del gene 16S ribosomale RNA (rRNA) non hanno una risoluzione sufficiente per identificare tutti i batteri, soprattutto a livello di specie e di ceppo.[35, 36] Inoltre, a seconda del microambiente intestinale (ad esempio, pH, nutrienti, metaboliti specifici), delle specie batteriche simili possono esprimere geni diversi e, quindi, avere funzioni metaboliche diverse. L'espressione dei fattori di virulenza batterica può dipendere dalle concentrazioni di metaboliti nel lume intestinale. Ad esempio, la presenza di norepinefrina nell'intestino (ormone dello stress) modifica i geni di *Salmonella* per indurre l'enterite.[37] Le variazioni dei rapporti tra gli SCFA

butirrato, propionato e acetato influenzano l'espressione dei fattori di virulenza di *Salmonella enterica*. [38] *Escherichia coli* presenta tassi di crescita e motilità diversi nell'ileo rispetto al colon, e ciò dipende dalle differenze nel rapporto di SCFA tra i due siti. [39] Il metabolismo degli acidi biliari è un'altra importante via metabolica di derivazione batterica che, se interrotta, porta alla crescita eccessiva di potenziali enteropatogeni. Un microbiota disturbato può portare a una diminuzione dei batteri intestinali in grado di convertire gli acidi biliari primari in secondari, il che a sua volta consente la crescita eccessiva di *Clostridioides difficile* nel colon. [40]

Questi esempi illustrano che, ai fini della ricerca clinica, l'analisi del microbiota intestinale e delle sue funzioni dovrebbe comprendere approcci complementari, come la valutazione filogenetica dei batteri presenti (ad esempio, il sequenziamento del gene 16S rRNA, PCR per i batteri), i loro geni funzionali (sequenziamento shotgun del DNA, PCR per i geni funzionali) e i metaboliti di derivazione microbica. Inoltre devono essere raccolte delle informazioni dettagliate sul paziente, come l'anamnesi dei farmaci e della dieta, la diagnosi finale e le informazioni sugli esiti clinici a lungo termine. I campioni devono essere valutati nel corso della malattia e tutte le informazioni devono essere correlate con i dati del microbioma per comprendere meglio il contributo di queste vie alla malattia. Un esempio importante di questo approccio completo è l'identificazione del *Clostridium hiranonis* come principale convertitore, nei cani, di acidi biliari primari in secondari; a causa di questa funzione, una diminuzione dell'abbondanza di questo batterio porta a cambiamenti nel microbiota intestinale. [15, 41-45] Un'alterazione del microbioma e una diminuzione del *C. hiranonis* possono essere indotte da antibiotici ad ampio spettro, [42, 43] e sono spesso presenti nelle enteropatie infiammatorie croniche. [11, 29, 41] Diversi studi recenti hanno dimostrato che una diminuzione di questo batterio è altamente associata alla disbiosi (vedere l'indice di disbiosi). [29, 43] La modulazione terapeutica con la dieta o il trapianto di microbiota fecale possono portare alla normalizzazione dell'ab-

bondanza di *C hiranonis*, che è associata alla normalizzazione del microbiota.[41, 44] Un altro importante batterio può essere indotto dagli antibiotici ad ampio spettro,[42] e spesso presente nelle enteropatie infiammatorie croniche, [42, 44]. Un altro batterio importante è *Faecalibacterium prausnitzii*, che produce acidi a catena corta e peptidi antinfiammatori ed è spesso ridotto nelle malattie intestinali canine e feline.[29, 43, 46]

1.3 COLTURA BATTERICA

Come già detto, la maggior parte dei batteri intestinali, soprattutto nell'intestino crasso, sono strettamente anaerobi e la maggior parte di essi necessita di terreni di coltura speciali. Alcuni laboratori di ricerca specializzati sono in grado di coltivare questi microbi combinando vari strumenti molecolari per identificare i batteri in un campione e ottimizzare le condizioni di coltura.[47]

La coltura batterica tradizionale, tuttavia, così come viene eseguita nei laboratori diagnostici veterinari, sottostima ampiamente il numero di batteri intestinali perché vengono utilizzati solo terreni batterici standard e/o metodi anaerobi limitati. Solo una piccola percentuale di specie batteriche può essere isolata dalle feci di pazienti clinici ed è stata segnalata dai laboratori diagnostici commerciali. Purtroppo, poiché questi batteri vengono isolati da pazienti clinici, i medici spesso li considerano erroneamente patogeni (es. *E coli*, *C perfringens*).[48] In uno studio recente, tre aliquote di campioni fecali di cani sani e di cani con diarrea cronica sono state sottoposte in cieco a tre laboratori veterinari di riferimento per la valutazione della disbiosi o la coltura di batteri patogeni. Gli autori hanno ordinato un cosiddetto “profilo colturale batterico fecale”. [48] In tutti i campioni, i risultati delle colture batteriche di tutti e tre i laboratori non hanno rivelato differenze significative di microbiota tra cani sani o con diarrea cronica. È interessante notare che i laboratori hanno segnalato una disbiosi più frequente nei cani sani e non c'è stato

accordo nei risultati delle colture tra i tre laboratori.[48] Gli *E. coli* emolitici sono stati isolati più frequentemente in cani sani che in cani con diarrea. Ciò è in contrasto con l'indice di disbiosi su base molecolare (vedi sotto), che era significativamente più alto, cosa che indicava la disbiosi nei cani con diarrea cronica. [48]

Questi risultati non sorprendono a causa della mancanza di standardizzazione delle colture batteriche tra i laboratori, dei criteri sconosciuti per la definizione di disbiosi del microbiota da parte di ciascun laboratorio e del fatto che la maggior parte dei batteri presenti nell'intestino sono anaerobi e quindi non vengono rilevati. Questi batteri anaerobi, che forniscono vari benefici metabolici all'ospite (Tabella 1), sono tipicamente ridotti nelle malattie intestinali acute e croniche [49, 50]. È probabile che questa riduzione dei batteri benefici e, quindi, della funzione del microbioma sia clinicamente più importante di una crescita eccessiva di singole specie batteriche coltivabili (ad esempio, *C. perfringens*).[51, 52] Vediamo ad esempio la riduzione dei batteri che producono SCFA e peptidi antinfiammatori (ad esempio, *Faecalibacterium*) e dei batteri che convertono gli acidi biliari come *C. hiranonis*, entrambi non coltivabili con tecniche aerobiche standard.[49, 53] È necessario educare i medici alla complessità e alla funzionalità del microbioma intestinale, che non può essere valutato con la coltura. Tuttavia, la coltura batterica rimane importante per testare la sensibilità agli antibiotici di quei pochi organismi coltivabili che sono noti per essere associati alle infezioni intestinali (ad esempio, *Salmonella* spp.). Si raccomanda anche la coltura batterica e il profilo di suscettibilità di *E. coli* invasivi provenienti da biopsie coloniche di cani con colite granulomatosa, poiché alcuni dati recenti hanno dimostrato che questi organismi entero-invasivi sono spesso resistenti a molti degli antimicrobici precedentemente raccomandati (ad esempio, i fluorochinoloni). [54]

1.4 SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS) comprende il sequenziamento dei geni 16S rRNA, il metodo shotgun di sequenziamento del DNA (metagenomica) e la meta-transcrittomica (Tabella 2). Quest’ultimo approccio cerca di valutare l’espressione genica dei microbi intestinali, ma attualmente è un metodo poco usato a causa del costo e della complessità dell’analisi.[55] Quasi tutti gli studi che valutano il microbiota intestinale negli animali da compagnia hanno usato il sequenziamento del gene 16S rRNA e solo pochi il metodo shotgun di sequenziamento del DNA.[1, 2, 56, 57]

Metodo	Scopo	Descrizione	Vantaggi	Svantaggi
Ibridazione fluorescente in situ (FISH)	Identifica, quantifica e visualizza le cellule batteriche nei tessuti	Delle sonde oligonucleotidiche marcate con coloranti fluorescenti vengono ibridate con la sequenza di RNA ribosomiale nelle cellule batteriche	Metodo utile per la quantificazione dei batteri, permette la localizzazione dei batteri nei tessuti	Ci vuole un lavoro intenso, e le sonde FISH devono essere sviluppate per ogni gruppo di interesse
PCR quantitativa in tempo reale	Quantifica i taxa batterici	Gli organismi bersaglio vengono quantificati usando dei primer e/o delle sonde marcati con coloranti fluorescenti	È possibile stabilire RI rapide, riproducibili, poco costose e quantitative	I primer e le sonde devono essere progettati per ogni gruppo di interesse
Sequenziamento del 16S rRNA	Identifica i batteri presenti in un campione, misura l’abbondanza relativa	I batteri vengono amplificati utilizzando primer universali che hanno come target il gene 16S rRNA, gli ampliconi della PCR vengono separati e sequenziati con un sequenziatore ad alto rendimento.	Ha un alto rendimento, è relativamente poco costoso, permette l’identificazione dei batteri, semi-quantitativo, permette di descrivere i cambiamenti all’interno di una comunità	Richiede una bioinformatica avanzata, i cambiamenti nei database tassonomici e nelle pipeline bioinformatiche rendono difficile il confronto dei risultati tra gli studi, non permette di rilevare i cambiamenti nella quantità totale dei batteri
Metagenomica (metodo shotgun di sequenziamento del DNA genomico)	Identificazione dei geni microbici presenti nel campione	Il DNA genomico viene frammentato e poi sequenziato in modo casuale (senza amplificazione PCR) con un sequenziatore ad alta velocità	Non solo fornisce informazioni filogenetiche, ma dice anche quali geni funzionali sono presenti nel campione	È costoso, richiede una bioinformatica avanzata, non permette di rilevare cambiamenti nell’abbondanza totale dei batteri

Tabella 2. Metodi comunemente utilizzati per la caratterizzazione del microbiota intestinale.

1.4.1 METODO SHOTGUN DI SEQUENZIAMENTO DEL DNA (METAGENOMICA)

Il metodo shotgun di sequenziamento profondo del DNA, o metagenomica, mira a sequenziare il DNA estratto in un campione senza una precedente amplificazione mediante PCR.[58] Con questa modalità vengono identificati vari geni, il che consente di valutare la tassonomia e le categorie di geni funzionali (“cosa possono fare”) nel microbioma dei campioni (ad esempio, sintesi di aminoacidi, vitamine, carboidrati). La metagenomica ha una migliore risoluzione a livello di specie e di ceppo rispetto al sequenziamento del gene 16S rRNA, poiché è possibile sequenziare più geni di un organismo e sovrapporre le letture abbozzando un genoma. Questo metodo consente di identificare anche altri membri della comunità intestinale, come archei, funghi e virus a DNA. L’analisi metagenomica di campioni fecali di cani ha rivelato che i batteri costituiscono circa il 98% di tutte le letture di sequenziamento, gli archei l’1% e i funghi e i virus a DNA (soprattutto batteriofagi) il restante 1%.[1] Sono state osservate delle proporzioni simili in campioni fecali di gatti.[56] La metagenomica fornisce anche informazioni più dettagliate sulla presenza di geni di virulenza e di resistenza antimicrobica.[2, 57] Di conseguenza la metagenomica sarebbe il metodo migliore per l’analisi del microbiota intestinale nella ricerca. Purtroppo, questo approccio è utilizzato raramente in medicina veterinaria, soprattutto a causa dei costi molto più elevati rispetto al sequenziamento del gene 16S rRNA, poiché è necessaria una copertura di sequenziamento molto profonda per individuare dei geni funzionali importanti che costituiscono solo una piccola percentuale delle sequenze ottenute. Inoltre, è necessaria una bioinformatica avanzata per integrare tutti i dati usando diverse pipeline e database bioinformatici.[59-61] Pertanto, la metagenomica profonda è spesso proibitiva dal punto di vista dei costi per studi che coinvolgono un gran numero di animali o di punti temporali. Un nuovo approccio, chiamato metodo metagenomico shotgun superficiale, potrebbe essere una potenziale alternativa e richiede una copertura di sequenza inferiore (cioè un numero minore di

letture di sequenziamento).[62] Grazie alla copertura inferiore, i costi sono molto inferiori a quelli della metagenomica profonda e solo leggermente superiori a quelli del sequenziamento del gene 16S rRNA. Questo metodo fornisce dati filogenetici (chi c'è) più accurati a livello di specie rispetto al sequenziamento del gene 16S rRNA, oltre al contenuto genico funzionale. La metagenomica shotgun a bassa profondità è stata usata per valutare il microbioma umano [62] e probabilmente in futuro verrà usata più comunemente negli animali da compagnia. Tuttavia, non è ancora noto se questo approccio di sequenziamento superficiale fornirà informazioni simili al sequenziamento profondo per i membri meno comuni della comunità, come funghi, virus e archei, e per i geni funzionali rari.

Anche la comunità virale è una parte importante dell'ecosistema intestinale. Tuttavia, sono disponibili pochissime informazioni aggiuntive sul virioma, oltre ai virus che sono stati descritti con approcci mirati, come i parvovirus e i coronavirus. Descrivere l'intero virioma è una sfida, in quanto è costituito da virus a DNA e RNA, e sono filogeneticamente disomogenei. Pertanto, è necessario un approccio di sequenziamento profondo che combini l'analisi del DNA e dell'RNA. In medicina veterinaria sono stati condotti solo pochi studi, che hanno identificato vari batteriofagi e nuove famiglie e generi virali in cani sani e diarroici. [63, 64] A causa dei costi associati all'analisi, è stato valutato solo un piccolo numero di cani; pertanto, non è possibile trarre conclusioni definitive sul ruolo di questi nuovi virus nella malattia intestinale. Tuttavia, questi approcci consentono di identificare nuovi membri della comunità intestinale, che possono essere seguiti in una popolazione più ampia di animali utilizzando approcci più mirati (ad esempio, la PCR).

1.4.2 SEQUENZIAMENTO DEL GENE 16S RRNA

La tecnica di sequenziamento più utilizzata per la valutazione dei batteri intestinali nei cani e nei gatti utilizza il sequenziamento del gene 16S rRNA. In breve, il DNA viene estratto da campionature dell'intestino, ad esempio biopsie, contenuto luminale o

campioni fecali. Il gene 16S rRNA è costituito da diverse regioni variabili, ciascuna affiancata da regioni che si conservano. Per amplificare queste regioni che si conservano e la regione variabile intermedia vengono utilizzati dei primer batterici. Poiché le regioni che si conservano sono mirate, in teoria è possibile amplificare il DNA di batteri noti e sconosciuti presenti nel campione e quindi sequenziare le regioni variabili. Questo processo richiede la preparazione di librerie specifiche per le diverse piattaforme di sequenziamento (ad esempio, Illumina MiSeq e Ion Torrent PGM).[65] Le sequenze grezze ottenute vengono poi elaborate con una pipeline bioinformatica, come QIIME 2 o Mothur,[66, 67] per eliminare le sequenze di qualità insufficiente e le letture errate, rimuovere le sequenze chimeriche e confrontare le sequenze finali con le banche dati pubbliche.[60, 68, 69] L'analisi statistica viene eseguita in base al disegno dello studio. L'analisi di base confronta la diversità alfa (la ricchezza e la diversità di un campione, cioè quanti taxa ha un campione), la diversità beta (quanto è simile un campione a un altro in base ai taxa presenti) e i singoli taxa batterici a tutti i livelli filogenetici tra i gruppi e/o i trattamenti.[59] Esistono diverse interfacce web di facile utilizzo che consentono l'analisi statistica e la visualizzazione dei dati del microbioma, come Calypso (<http://cgenome.net/wiki/index.php/Calypso>)[70] o MicrobiomeAnalyst (<https://github.com/xia-lab/MicrobiomeAnalystR>).[71]

Il sequenziamento del gene 16S rRNA è attualmente il metodo standard negli studi sul microbioma e fornisce informazioni utili e approfondite sulla composizione microbica e su come i singoli gruppi batterici o l'intera comunità differiscono tra animali sani e malati o rispondono a interventi dietetici o terapeutici. Questo metodo è utile per rilevare le differenze nella composizione del microbiota, ma non è affidabile per individuare le specie batteriche esatte che causano tali cambiamenti. Inoltre, è importante rendersi conto che i metodi utilizzati variano molto da uno studio all'altro. Inoltre, le piattaforme di sequenziamento, le pipeline bioinformatiche e i database filogenetici disponibili sono in costante evoluzione nel tempo, anche se eseguiti

nello stesso laboratorio. Quindi, come per qualsiasi test sui biomarcatori, il confronto dei dati all'interno dello stesso studio e/o dei metodi è utile e appropriato, ma i risultati devono essere interpretati con attenzione tra gli studi eseguiti con metodi diversi e in periodi diversi.

Negli studi di sequenziamento, l'abbondanza dei taxa batterici viene espressa come proporzione relativa della comunità batterica totale e quindi confrontata statisticamente tra i gruppi di trattamento. Sono diversi i fattori che influenzano le proporzioni relative riportate. Il metodo di estrazione del DNA (ad esempio, battitura delle microsfeere o meno, aggiunta di lisozioma, trattamento con RNase) influisce sulla lisi di alcuni gruppi batterici più di altri. Pertanto, alcuni taxa saranno più o meno abbondanti a seconda del metodo utilizzato (Figura 2).[72] La selezione del primer influisce sulla regione variabile del gene 16S rRNA che viene presa di mira, e questo ha un impatto importante su quali taxa verranno amplificati e, quindi, riportati in proporzioni maggiori.[72] La maggior parte degli studi sul microbiota intestinale ha come target la regione variabile V4, ma non è stato determinato quale sia quella preferibile per cani e gatti.[73] Anche la scelta della piattaforma di sequenziamento, la pipeline bioinformatica scelta e il database di riferimento influiscono sulle proporzioni riportate.[69, 74]

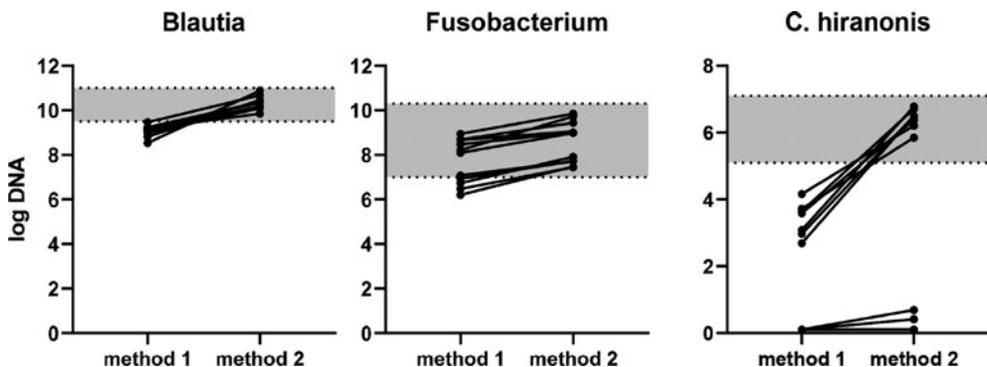


Figura 2

Effetto del metodo di estrazione del DNA sulla quantità dei batteri fecali. Sono stati confrontati due diversi metodi di estrazione del DNA per i campioni fecali canini e i taxa batterici sono stati misurati utilizzando dei campioni di PCR quantitativa (qPCR) identici.[49] Il metodo 1 utilizza la lisi chimica, mentre il metodo 2[49] impiega la battitura delle microsfere in aggiunta alla lisi chimica. Le aree grigie indicano le RI per i batteri target. Le differenze tra i metodi influiscono sull'abbondanza misurata nei dati del sequenziamento del gene 16S rRNA e della qPCR. È possibile stabilire RI per dei taxa specifici, ma i test devono essere convalidati analiticamente ed eseguiti con un adeguato controllo di qualità per valutare in modo riproducibile il microbiota negli studi e in ambito clinico.

Esistono inoltre notevoli differenze nel modo in cui vengono riportati i risultati. Molti autori riportano l'analisi dei taxa batterici solo su alcuni livelli filogenetici, come phylum o famiglia, piuttosto che su tutti i livelli tassonomici. Ciò può essere fuorviante dato che alcuni lignaggi tassonomici possono essere molto diversificati, come recentemente riassunto da Lyu et al. (cfr. https://www.frontiersin.org/files/Articles/556573/fmicb-11-01661-HTML/image_m/fmicb-11-01661-g001.jpg).[75]

Ad esempio, il phylum Firmicutes è molto diversificato e consiste in vari ordini batterici come Clostridiales e Lactobacillales - e questi ultimi sono costituiti da vari generi e specie. Alcuni di questi generi o specie possono aumentare nelle malattie intestinali (ad esempio, *C perfringens*, *Streptococcus*), mentre altri possono diminuire (*C hiranonis*, *Faecalibacterium*).[49, 76] Riportare i risultati solo a livello di phylum potrebbe far perdere informazioni importanti su questi cambiamenti opposti a livelli filogenetici inferiori. Perciò incoraggiamo gli autori a riportare, almeno come informazioni supplementari, i loro dati con le medie e/o le mediane e gli intervalli a tutti i livelli filogenetici, anche per i taxa non alterati significativamente. Esiste anche un elevato grado di somiglianza del gene 16S rRNA tra generi geneticamente strettamente correlati, ad esempio all'interno dei Proteobacteria, come *Escherichia* e *Shigella*. Questo limita l'uso del gene 16S

rRNA per l'identificazione di batteri patogeni opportunistici a livello di specie, e perciò dovrebbe essere utilizzati database più definiti.[77]

Un'altra limitazione degli attuali studi sul microbioma è che gli autori in genere confrontano gli effetti di vari fattori ambientali (ad esempio, dieta, metodi di raccolta e conservazione, influenze dell'etnia, posizione geografica, ecc.) solo con un gruppo di controllo o con la propria linea di base all'interno dello studio e, nella maggior parte dei casi, con un campione di dimensioni ridotte. Pertanto, quando si osservano dei cambiamenti, è difficile capirne l'entità e confrontarli con i molti microbioti normali tratti da un'ampia popolazione di riferimento o con il fenotipo della malattia target, dato che non esistono RI stabiliti per i taxa batterici ottenuti con il sequenziamento di nuova generazione. Inoltre, non è stata riportata una vera e propria validazione analitica del sequenziamento del gene 16S rRNA; perciò non sappiamo nulla sulla riproducibilità del sequenziamento.

In sintesi, non esiste un unico approccio per il sequenziamento del gene 16S rRNA del microbioma, ma bisogna tenere conto di alcune limitazioni, oltre che scegliere dei metodi coerenti e delle tecniche complementari (NGS, PCR quantitativa [qPCR] e metabolomica) che applicate a vari studi possono aiutare a chiarire le domande scientifiche sottostanti. I taxa di interesse identificati possono poi essere validati con un metodo più riproducibile, come la qPCR.

1.5 PCR QUANTITATIVA: L'INDICE DI DISBIOSI

Come già detto, il sequenziamento del gene 16S rRNA riporta i dati come abbondanza relativa dei taxa batterici all'interno di un campione. Pertanto, le variazioni della carica batterica totale o dell'abbondanza di taxa specifici tra un campione e l'altro non sono valutabili utilizzando un metodo di sequenziamento non mirato.[78] Per quantificare i batteri totali o i singoli taxa è utile la qPCR. Si tratta di un metodo rapido (tempi di esecuzione

ne inferiori alle 24 ore), accessibile (costi inferiori per l'apparecchiatura e per il campione) e altamente riproducibile per quantificare taxa specifici, che sono stati identificati come clinicamente rilevanti sulla base di precedenti studi di sequenziamento.[49, 79] La PCR quantitativa ha un'elevata riproducibilità quando si usano gli stessi metodi (cioè, estrazione del DNA o primer qPCR) e ciò consente di sviluppare RI per taxa specifici. Questi saggi riproducibili possono essere utilizzati per confrontare i cambiamenti nell'abbondanza batterica tra gli studi e valutare l'entità dei cambiamenti dovuti a un intervento, poiché i risultati possono essere confrontati con una RI esistente (Figura 3). Lo svantaggio della qPCR è che è necessario stabilire dei campioni individuali per ciascun target di interesse.

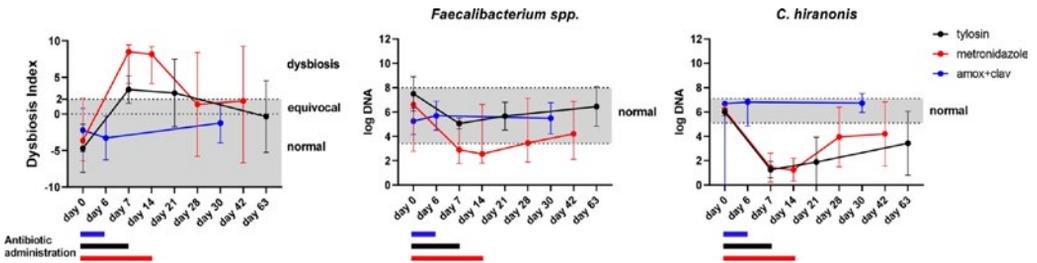


Figura 3

L'effetto di diversi antibiotici sul microbiota fecale canino. I dati sono riassunti da tre diversi studi: cani sottoposti a tilosina (n = 8),[45] metronidazolo (n = 16),[43] e acido amoxicillina-clavulanico (n = 6).[84] I punti indicano i valori mediani, le barre di errore indicano gli intervalli, le aree grigie indicano le RI. Tutti i campioni sono stati analizzati con lo stesso metodo (cioè, estrazione del DNA e saggi di PCR quantitativa),[49] e ciò consente un confronto migliore dei dati tra i diversi studi. Inoltre, i dati possono essere confrontati con i RI esistenti, il che consente di trarre conclusioni sull'entità dei cambiamenti (effetto dimensionale) di un intervento all'interno del microbiota (indice di disbiosi [DI]) o su taxa batterici specifici (ad esempio, *Faecalibacterium* spp. produttore di acidi grassi a catena corta e *C*

hirononis convertitore di acidi biliari). Questi dati mostrano che gli antibiotici ad ampio spettro influenzano l'abbondanza di *C hirononis* (al di sotto dell'RI), mentre l'amoxicillina-acido clavulanico ha un effetto limitato sul DI e su *C hirononis*.

Un esempio di approccio qPCR è il microbiota canino DI.[49] Esso misura l'abbondanza di sette taxa batterici e dei batteri totali e riporta i risultati singolarmente per ciascun gruppo batterico, oltre a combinare le abbondanze in un algoritmo matematico come DI. In diversi studi è stato dimostrato che questi sette target batterici sono alterati nei cani con CE [33, 34, 53, 80] e disbiosi indotta da antibiotici [42, 43, 45, 82] utilizzando il sequenziamento del gene 16S rRNA. Un cut-off superiore a 2 per il DI è attualmente considerato disbiosi e più alto è il DI, più il microbiota diverge dalla normalità.[29, 42] I valori compresi tra 0 e 2 sono equivoci e indicano variazioni minori del microbioma. *Faecalibacterium*, *Fusobacterium*, *C hirononis*, *Blautia* e *Turicibacter* sono tipicamente diminuiti, mentre *Streptococcus* ed *E coli* sono aumentati nella disbiosi. Il DI si correla con i risultati del sequenziamento del gene 16S rRNA e si correla negativamente con la ricchezza di specie (un DI più alto indica una minore diversità microbica).[42, 43, 80, 83] Questo test consente di seguire i cambiamenti del microbiota dopo il trapianto di microbiota fecale o l'uso di antibiotici.[42, 84, 85] Il DI predice, in modo chiaro e preciso, i cambiamenti del microbiota dopo il trapianto di microbiota fecale o l'uso di antibiotici, [84, 85] Il DI predice anche, misurando l'abbondanza del batterio 7alfa-deidrossilante degli acidi biliari, *C hirononis*, la capacità del microbiota intestinale di convertire gli acidi biliari primari in secondari. Diversi studi hanno dimostrato che l'abbondanza di *C hirononis* è correlata alla presenza di una maggiore percentuale di acidi biliari secondari.[11, 15, 29, 44, 86] Il corretto livello fisiologico di acidi biliari secondari nell'intestino è importante per il controllo di potenziali enteropatogeni come *C difficile*, *E coli* e *C perfringens*. [40, 87] Circa il 50%-60% dei cani e il 30% dei gatti affetti da CE presentano una diminuzione dell'abbondanza di *C hirononis* e, di conseguenza, una diminuzione degli acidi biliari secondari.

[48, 80, 88] Nell'uomo, la germinazione delle spore di *C difficile* è favorita da un microbiota disturbato e, di conseguenza, da una riduzione degli acidi biliari secondari e un aumento di quelli primari. Analogamente, quando nei cani è presente una disbiosi, ad esempio a causa di un'inflammatione intestinale o dell'uso di antibiotici,[42, 43, 45] ciò può portare a una carenza di *C hiranonis*, a una mancata conversione da acidi biliari primari a secondari e quindi alla proliferazione di *C difficile*. In una serie di dati non pubblicati del laboratorio dell'autore, circa il 26% (315/1194) dei cani con diarrea cronica è risultato positivo al *C difficile*, e l'80% di questi mancava del batterio che converte gli acidi biliari, il *C hiranonis*. Pertanto, la crescita eccessiva di *C difficile* potrebbe riflettere un ambiente intestinale disbiotico nella CE, come suggerito anche da altri studi.[89, 90]

1.6 IBRIDAZIONE IN SITU E IMMUNOISTOCHEMICA

Per comprendere il ruolo dei batteri nell'inflammatione intestinale è utile localizzare dei batteri. Ciò consente di valutare se i batteri sono all'interno dello strato di muco, attaccati all'epitelio o nello spazio intracellulare. I batteri possono essere visualizzati sui vetrini biotici utilizzando l'ibridazione fluorescente in situ (FISH) [27] o l'immunostochimica (IHC).[91] La FISH è l'approccio più comunemente utilizzato e sono disponibili sonde che hanno come bersaglio tutti i batteri (ad esempio, sonde universali come EUB338) e taxa batterici specifici.[21, 26] Il principale vantaggio della FISH è che consente di visualizzare la localizzazione dei batteri. Gli svantaggi sono che è necessario progettare delle sonde specifiche per i batteri di interesse e che è possibile utilizzare solo poche sonde per ogni vetrino. Ciò rende questo approccio molto laborioso. Inoltre, sono necessari dei microscopi costosi, che limitano la FISH a pochi laboratori specializzati.

Sebbene la FISH venga comunemente eseguita su tessuto fissato in formalina, alcuni dati suggeriscono che la soluzione di

Carnoy potrebbe essere un fissativo migliore per gli studi FISH, in quanto preserva meglio lo strato di muco intestinale, dove si trovano i batteri di interesse.[92] Ciò è particolarmente vero per le biopsie dell'intestino tenue di cani e gatti, in quanto lo strato di muco intestinale più sottile spesso non è ben conservato nei vetrini di tessuto fissati in formalina, il che porta probabilmente a una sottostima dei batteri attaccati.

I batteri possono anche essere enumerati nelle feci utilizzando la FISH ed è stato riportato che i *Bifidobatteri* e i *Bacteroides* diminuiscono e i *Desulfovibrio* aumentano nei gatti con malattie intestinali.[93] Uno studio che ha utilizzato la FISH sul tessuto intestinale ha riportato che i gatti con malattia infiammatoria intestinale (IBD) avevano un numero maggiore di Enterobacteriaceae aderenti alla mucosa duodenale, che erano correlati con i cambiamenti nell'architettura della mucosa.[10] Anche *E coli* e *Clostridium* spp. erano correlati con l'infiammazione intestinale, il che suggerisce che questi batteri contribuiscono alla fisiopatologia delle IBD nei gatti. In un altro studio, i gatti con linfoma intestinale a piccole cellule presentavano un numero maggiore di *Fusobacterium* sp. attaccati alla mucosa nell'ileo; inoltre nel colon, rispetto ai gatti con IBD, *Fusobacterium* sp. correlava anche con un'aumentata espressione di cellule mieloidi CD11b+ e NF- κ B.[21] Questa associazione potrebbe suggerire un contributo dei batteri allo sviluppo del linfoma gastrointestinale a piccole cellule nei gatti, come è stato suggerito nell'uomo,[94] ma ciò richiede l'identificazione della specie di *Fusobacterium* coinvolta e ulteriori studi meccanicistici.

La FISH è stata utilizzata anche per valutare i batteri attaccati alla mucosa nei cani sani e in quelli affetti da CE.[26, 27, 95] I cani sani hanno un microbiota abbondante (cioè *Helicobacter* spp.) nelle cripte del colon (Figura 1), che si riduce nei cani affetti da CE.[27] Ciò suggerisce che i batteri nelle cripte del colon forniscono proprietà immunologiche benefiche. Al contrario, il numero di batteri aderenti alla mucosa è inferiore nei cani sani e aumenta nei cani con CE.[27]

In genere, nei cani con CE non si osserva alcun batterio intracellulare o solo pochi. Questo è in contrasto con la colite granulomatosa associata all'*E coli* invasivo, più comunemente osservata nei cani Boxer e Bulldog francesi.[96, 97] Questi cani rispondono bene alla somministrazione di antibiotici.[54] Per la diagnosi, le biopsie del colon possono essere colorate utilizzando la FISH e la localizzazione dei batteri all'interno del tessuto intestinale può essere confermata. Tuttavia, poiché solo pochi laboratori specializzati eseguono la FISH di routine, è spesso difficile per i medici inviare i campioni e ottenere i risultati in modo tempestivo. Un caso recente ha riportato l'identificazione di *E coli* tramite IHC in un cane con colite ulcerosa istiocitica.[91] Pertanto, l'IHC potrebbe essere un'opzione più disponibile per l'identificazione di *E coli* intracellulari in futuro (Figura 4).

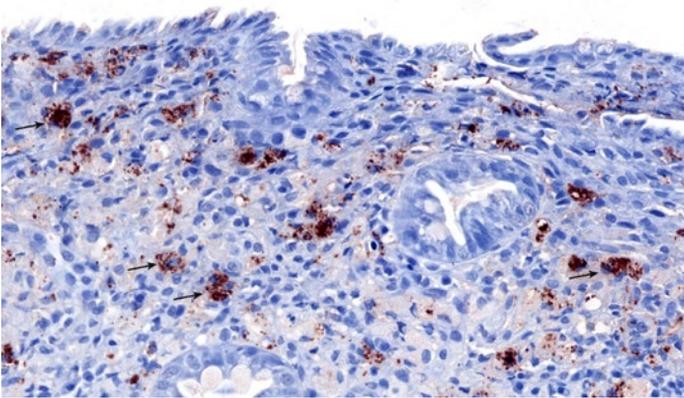


Figura 4

La fotomicrografia di una biopsia intestinale di un cane con colite granulomatosa mostra una forte marcatura immunitaria per l'*Escherichia coli* nel citoplasma dei macrofagi nella lamina propria (frecce). Cromogeno rosso diaminobenzidina e controcolorazione con ematossilina, obiettivo $\times 20$. Per gentile concessione della dott.ssa Patricia Ishii, DVM, Texas A&M University

e della dott.ssa Paula Giaretta, DACVP, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasile.

1.7 METABOLOMICA

La metabolomica è un'area emergente e importante per la valutazione della funzione del microbiota e del suo contributo alla salute e alla malattia. I metaboliti di origine microbica possono essere valutati con campioni mirati e convalidati che misurano le concentrazioni di vie microbiche già ben conosciute (ad esempio, SCFA, indoxil-solfato, acidi biliari fecali) o con campioni non mirati che misurano diverse centinaia di metaboliti diversi e sono finalizzati a scoprirne di nuovi. La maggior parte dei test utilizza piattaforme di spettrometria di massa.[98] In fase di ricerca la misurazione dei metaboliti deve essere combinata con altri strumenti di valutazione filogenetica. Sono già state studiate alcune funzioni del microbiota, come la fermentazione della fibra alimentare in SCFA e la conversione degli acidi biliari primari in secondari da parte di alcuni batteri intestinali. Negli ultimi anni sono state mappate molte nuove vie microbiche che influenzano la funzione intestinale, cardiaca e renale.

L'aminoacido dietetico triptofano viene convertito dai batteri intestinali in vari metaboliti indolici. Questi svolgono un ruolo importante nell'immunoregolazione (ad esempio, nella risposta delle cellule T) all'interno dell'intestino. I metaboliti indolici agiscono come molecole di segnalazione e possono essere antinfiammatori (ad esempio, diminuire l'espressione di IL-8), indurre l'espressione dei geni della mucina e rafforzare la resistenza delle giunzioni strette.[8] Le alterazioni delle vie del triptofano-indolo sono associate all'enteropatia cronica nei cani.[99] L'integrazione dietetica con triptofano ha effetti antinfiammatori nei modelli sperimentali di colite ed è probabilmente una via da indagare in futuro nei cani e nei gatti.[100]

Un aumento della concentrazione sierica di trimetilammina N-ossido (TMAO), un prodotto di derivazione microbica prove-

niente dalla dieta (cioè colina e L-carnitina), è associato all'aterosclerosi e alle malattie cardiovascolari nell'uomo,[101, 102] e all'insufficienza cardiaca cronica nei cani.[13, 103] Analogamente, l'aumento di TMAO è associato a una prognosi peggiore nelle persone affette da CKD, probabilmente a causa del suo contributo alla progressiva fibrosi tubulo-interstiziale renale, come dimostrato nei modelli animali.[101] Anche altri metaboliti uremici di origine intestinale, come gli acidi grassi a catena ramificata, il p-cresolo (degradazione microbica di tirosina e fenilalanina) e l'indoxil-solfato (dal triptofano), sono stati associati alla CKD nei gatti.[12, 104] Sono necessari studi futuri per capire quali taxa batterici sono i principali produttori di questi metaboliti e se la modulazione della dieta (riduzione del substrato) o la modulazione diretta del microbiota (ad esempio, fibre, probiotici) possano essere utilizzate terapeuticamente.

1.8 CONCLUSIONI

Negli ultimi anni sono stati compiuti molti progressi per definire meglio il microbiota intestinale e i suoi contributi metabolici e immunoregolatori alla salute e alla malattia. Sono disponibili diversi strumenti complementari che valutano il microbiota e le vie metaboliche. Comprendendone i limiti e i vantaggi è possibile applicare metodi specifici per la scoperta di trial clinici o studi. I saggi e le RI iniziali sono stati destinati ad applicazioni cliniche specifiche (ad esempio, indice di disbiosi, FISH per *E coli*). Come per altri sistemi di organi, è molto probabile che con il tempo vengano identificate altre vie metaboliche e taxa batterici che forniranno ulteriori biomarcatori microbici.

2 - IL RUOLO DEL MICROBIOMA INTESTINALE E DEL METABOLOMA CANINO NELLA SALUTE E NELLE MALATTIE GASTROINTESTINALI

Tratto e tradotto da

Pilla R and Suchodolski JS (2020) *The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease*. *Front. Vet. Sci.* 6:498.



doi: [10.3389/fvets.2019.00498](https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00498)

Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

Il microbioma intestinale contribuisce al metabolismo dell'ospite, protegge dagli agenti patogeni, educa il sistema immunitario e, attraverso queste funzioni di base, influenza direttamente o indirettamente la maggior parte delle funzioni fisiologiche dell'ospite. Le tecniche molecolari ci hanno permesso di ampliare le nostre conoscenze, svelando un'ampia gamma di batteri non coltivabili che prima erano sconosciuti. La maggior parte delle sequenze batteriche identificate nel tratto gastrointestinale (GI) canino rientra in cinque phyla: Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria. Sebbene esistano variazioni nella composizione del microbioma lungo il tratto GI, la maggior parte degli studi clinici si concentra sul microbiota fecale. L'età, la dieta e molti altri fattori ambientali possono svolgere un ruolo significativo nel mantenimento di un microbioma sano, ma le alterazioni sono comunque molto inferiori rispetto a quelle riscontrate negli animali malati. Le disfunzioni gastrointestinali sono l'associazione più evidente con la disbiosi intestinale. Nel cane l'infiammazione intestinale, sia cronica che acuta, è associata a differenze significative nella composizione del microbiota intestinale. La disbiosi intestinale si verifica quando tali alterazioni determinano cambiamenti funzionali nel trascrittoma, nel proteoma o nel metaboloma microbico. I metaboliti comunemente interessati

includono gli acidi grassi a catena corta e gli aminoacidi, tra cui il triptofano e i suoi cataboliti. È stato recentemente sviluppato un algoritmo basato sulla PCR, denominato “Indice di disbiosi”, che consente ai veterinari di quantificare la disbiosi intestinale; può essere utilizzato per monitorare la progressione della malattia e la risposta al trattamento. Le alterazioni o gli squilibri del microbiota influenzano la funzione immunitaria e la manipolazione del microbioma intestinale può aiutare per le malattie gastrointestinali. L'uso di antibiotici induce una rapida e significativa diminuzione della ricchezza tassonomica, della diversità e dell'uniformità. Per questo motivo si sta manifestando di nuovo dell'interesse per i probiotici, i prebiotici e il trapianto di microbiota fecale (FMT). Sebbene i probiotici non siano in grado di colonizzare l'intestino, i metaboliti che producono durante il transito nel tratto gastrointestinale possono migliorare i segni clinici e modificare la composizione del microbioma. Un altro sviluppo interessante è il FMT, che potrebbe essere uno strumento promettente per favorire il recupero dalla disbiosi, ma sono necessari ulteriori studi per valutarne il potenziale e i limiti.

2.1 INTRODUZIONE

Il microbioma intestinale è composto da batteri, archei, virus e organismi eucarioti che risiedono nel tratto gastrointestinale e che si relazionano con l'ospite in modo simbiotico. Ad esempio, i batteri presenti nell'intestino producono acidi grassi a catena corta (SCFA) che nutrono l'epitelio intestinale, mentre l'epitelio produce muco che alimenta i batteri benefici.

Il microbioma intestinale contribuisce alle funzioni metaboliche, protegge dagli agenti patogeni, educa il sistema immunitario e, attraverso queste funzioni di base, influenza direttamente o indirettamente la maggior parte delle nostre funzioni fisiologiche. La serotonina, un neurotrasmettitore, è prodotta principalmente nell'intestino, il che ha portato a sviluppare il concetto di asse intestino-cervello (1). Un microbioma sano e stabile può agire contemporaneamente come pro- e anti-infiammatorio, mantenendo un equilibrio che impedisce un'inflammatione eccessiva ma che risponde comunque prontamente alle infezioni (2).

2.2 MICROBIOMA DEL CANE SANO

2.2.1 VARIAZIONI LUNGO IL TRATTO GASTROINTESTINALE GI

Gli studi che utilizzano colture batteriche o metodi molecolari sono concordi nel dimostrare che l'abbondanza e la varietà di batteri aumentano lungo il tratto (3). Gli studi iniziali condotti con colture batteriologiche hanno riportato che la carica batterica nell'intestino tenue di cani sani è inferiore a quella del colon, con una carica complessiva che varia lungo il tratto gastrointestinale da 10² a 10¹¹ unità in colonia (CFU, [*Colony Forming Units*]) per grammo di contenuto luminale (4, 5). I metodi molecolari hanno permesso di identificare i batteri non coltivabili presenti nel tratto gastrointestinale canino e le stime della carica microbica totale variano oggi tra 10¹² e 10¹⁴, circa 10 volte il numero di cellule presenti nell'ospite (6).

Le comunità microbiche lungo il tratto variano per riflettere il microambiente e le funzioni fisiologiche di ciascun segmento intestinale. Ad esempio, l'intestino tenue ospita una miscela di batteri aerobi e anaerobi facoltativi, mentre nel colon ci sono quasi esclusivamente anaerobi. Lungo il tratto GI, le sequenze batteriche appartengono tipicamente a uno dei cinque phyla: Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria (3, 7).

Le differenze di abbondanza dei taxa lungo il tratto GI si riflettono nella produzione e nel consumo di diversi metaboliti. Lungo il tratto, la concentrazione della maggior parte dei metaboliti aumenta o diminuisce progressivamente, anche se alcuni diminuiscono bruscamente alla fine dell'ileo o talvolta oscillano lungo il tratto (7). La metabolomica, cioè lo studio dei metaboliti, è un nuovo campo di ricerca che analizza gli scambi metabolici tra ospite e microbioma. I dati della metabolomica possono essere considerati complementari alla metagenomica nello studio del microbioma intestinale e consentono agli scienziati di andare oltre la domanda "quali microrganismi ci sono?" per arrivare alla domanda forse più pressante "cosa stanno facendo?".

Nonostante le variazioni dei taxa lungo il tratto gastrointestinale, è difficile ottenere dei campioni da regioni specifiche del tratto e quindi la maggior parte degli studi clinici si concentra sul microbiota fecale. I campioni fecali canini presentano in modo affidabile la maggior parte dei taxa rilevanti, a differenza dell'uomo, in cui la maggior parte dei taxa significativi è strettamente connessa alla mucosa (8). Questi risultati potrebbero essere correlati all'anatomia del tratto gastrointestinale canino, più breve di quello umano e con un tempo di transito più rapido, e facilitare lo studio del microbioma intestinale dei cani.

Sebbene si osservino variazioni nella composizione tra i diversi studi, è importante notare che, indipendentemente dai metodi utilizzati, le specie batteriche chiave sono costantemente presenti nei campioni fecali di cani sani, indicando la presenza di una comunità batterica fecale centrale. Il microbioma fecale dei cani sani è codominato da tre phyla: Fusobacterium, Bacteroidetes e Firmicutes (9, 10). Esaminando la letteratura, si nota un'ampia variazione nelle percentuali di taxa batterici specifici. È importante ricordare che i metodi di sequenziamento e di analisi dei dati sono in costante evoluzione e molte di queste variazioni possono essere attribuite a diversi metodi di sequenziamento e/o di analisi dei dati. Infatti possono ridurre la somiglianza dei dati anche le diverse profondità di sequenziamento (cioè il numero di sequenze per campione) e i nuovi metodi hanno aumentato in modo significativo il numero di sequenze per campione che possono essere ottenute. Inoltre, esistono variazioni individuali nel profilo del microbioma (11, 12) che devono essere prese in considerazione soprattutto quando si estrapolano dei risultati da campioni piccoli.

All'interno di questo nucleo di comunità batteriche, molti taxa principali appartengono al phylum Firmicutes. La classe batterica Clostridia è costantemente tra i taxa più abbondanti, dominata da tre cluster di *Clostridium*: IV (ad esempio, famiglia Ruminococcaceae, *Faecalibacterium prausnitzii*), XI (ad esempio, famiglia Peptostreptococcaceae) e XIVa (ad esempio, famiglia Lachnospiraceae, *Blautia* spp.) (8, 13, 14). Oltre ai Clostridi, altre classi

prevalenti all'interno del phylum Firmicutes sono i Bacilli e gli Erysipelotrichi. La classe Bacilli è costituita quasi esclusivamente dall'ordine Lactobacillales, dominato dai generi *Streptococcus* e *Lactobacillus*. La classe Erysipelotrichi comprende principalmente i generi *Turicibacter*, *Catenibacterium* e *Coprobacillus* (14, 15).

I bacteroideti sono un altro phylum abbondante nei campioni fecali dei cani e comprendono i generi *Prevotella*, *Bacteroides* e *Megamonas* (10, 14). I generi più abbondanti, *Bacteroides* e *Prevotella*, sono risultati molto variabili in termini di abbondanza tra i cani. È interessante notare che le abbondanze combinate di *Prevotella* e *Bacteroides* sembrano essere inversamente correlate all'abbondanza del phylum Fusobacteria, il che potrebbe indicare che occupano la stessa nicchia (8).

All'interno del phylum Fusobacteria, il genere *Fusobacterium* è associato a cani sani e controllati. È interessante notare che nell'uomo *Fusobacterium* è associato a malattie gastrointestinali, il che indica che *Fusobacterium* svolge un ruolo diverso nel tratto gastrointestinale dei cani (8). L'abbondanza di *Fusobacterium* aumenta nei cani che hanno accesso all'aria aperta (16) e sono stati osservati anche in altre specie di carnivori dei livelli più elevati di *Fusobacterium* (17-19).

Sono di norma identificati anche i Phyla Proteobacteria e Actinobacteria. Questi phyla sono tipicamente colonizzatori dell'intestino tenue e in condizioni fisiologiche si presentano in numero minore nei campioni fecali. Ad esempio, i membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* (ad esempio, *Escherichia coli*) sono anaerobi facoltativi, il che consente loro di sfruttare l'ossigeno disponibile nell'intestino tenue. Il loro aumento nei campioni fecali è associato a molte malattie, come verrà discusso più avanti in questa rassegna. Anche gli attinobatteri sono associati all'intestino tenue e comprendono le famiglie *Corynebacteriaceae* (ad esempio, *Corynebacterium* spp.) e *Coriobacteriaceae* (ad esempio, *Collinsella* spp.) (7).

2.2.2 L'EFFETTO DELLA DIETA

I cani allo stato naturale sono carnivori spazzini, il che significa che si nutrono di una dieta ricca di carne, ma approfittano di qualsiasi cibo disponibile. Nei cani, la maggior parte degli studi sul microbioma si è basata su diete estruse (note anche come crocchette), che rappresentano fino al 95% del mercato degli alimenti secchi per cani. Tradizionalmente, per l'estrusione servono molti carboidrati ed ingredienti vegetali. Tuttavia, di recente si sono affermati dei processi industriali alternativi e una percentuale del mercato degli alimenti per animali domestici comprende oggi crocchette con un ridotto contenuto di carboidrati e un maggiore contenuto di proteine. Sono sempre più diffuse anche le diete crude, congelate o liofilizzate, che sono tipicamente a base di carne e includono percentuali di carboidrati basse o trascurabili.

Diversi studi condotti su specie diverse hanno dimostrato che la composizione della dieta - in particolare le grandi differenze di macronutrienti, come quelle riscontrate nelle diete dei carnivori rispetto a quelle degli erbivori - si riflette in diversi profili del microbioma intestinale. Nelle specie onnivore, compreso l'uomo, che possono tollerare e prosperare in entrambi gli estremi dello spettro, il consumo a breve termine di diete composte interamente da prodotti animali o vegetali è sufficiente ad alterare la struttura della comunità microbica e ad annullare le differenze interindividuali nell'espressione genica microbica (20). Nell'uomo, il consumo di una dieta a base animale aumenta l'abbondanza di microrganismi tolleranti alla bile e diminuisce i livelli di Firmicutes, che comprendono specie note per metabolizzare i polisaccaridi vegetali della dieta. Nel cane, analogamente all'uomo, l'aumento del contenuto di fibre vegetali nelle diete estruse determina un aumento dell'abbondanza complessiva di Firmicutes e una diminuzione di Fusobacteria e Proteobacteria (9, 21).

Tuttavia, per i cani, l'origine animale o vegetale degli ingredienti sembra essere meno importante della composizione complessiva dei macronutrienti. Le diete estruse con contenuti macronutrienti simili, ma preparate esclusivamente con fonti

proteiche vegetali, non sembrano alterare significativamente il microbioma dei cani rispetto alle diete estruse tradizionali (miste animali e vegetali) (22).

Alcuni studi hanno valutato l'impatto delle diete crude a base di carne sul microbioma intestinale di cani sani rispetto a quelli alimentati con crocchette. In uno studio (23), i cani sono stati alimentati con diete *Bones and Raw Food* (BARF) preparate in casa e costituite da una combinazione di carne cruda, organi, ossa carnose e verdure. In generale, rispetto al gruppo di controllo alimentato con crocchette, le diete BARF includevano più proteine e grassi e meno fibre e carboidrati. Un altro studio (19) ha valutato una dieta a base di carne rossa, contenente esclusivamente carne bovina, organi, ossa e un integratore minerale per seguire le linee guida dell'*Association of American Feed Control Officials* (AAFCO). La dieta a base di carne rossa conteneva più proteine, ma meno grassi, fibre e carboidrati rispetto alle crocchette.

Entrambe le diete presentavano differenze significative nel contenuto di macronutrienti rispetto alle diete commerciali a base di crocchette: c'erano meno fibre e carboidrati e più proteine, e hanno comportato cambiamenti simili nella popolazione microbica rispetto ai gruppi di controllo alimentati con crocchette. In entrambi gli studi, i cani alimentati con diete crude hanno registrato una diminuzione generale dell'abbondanza di Firmicutes (23), compresi i generi *Peptostreptococcus* e *Faecalibacterium*, e dei generi *Bacteroides* e *Prevotella* (phylum Bacteroidetes) (19). La maggior parte di questi generi è associata alla digestione delle fibre alimentari e alla produzione di SCFA, indicando una diminuzione della fermentazione di fibre e carboidrati dovuta alla loro minore assunzione. Al contrario, è stato riscontrato un aumento dell'abbondanza di altri taxa batterici, tra cui Proteobacteria e Fusobacteria (genere *Fusobacterium*) e due generi del phylum Firmicutes (*Lactobacillus* e *Clostridium*) (19, 23).

In questi studi, i cani sono stati alimentati con la dieta BARF per almeno 4 settimane (4 settimane-9 anni) (23) e con la dieta a base di carne rossa per 3-9 settimane (19). Uno studio condotto su cani che hanno ricevuto una dieta cruda per almeno

1 anno ha riscontrato un microbioma più ricco e uniforme rispetto ai controlli alimentati con crocchette (24). Hanno anche mostrato una maggiore abbondanza di *Clostridium perfringens* e *Fusobacterium varium* e una minore abbondanza di *Coprobacillus* sp. rispetto ai controlli. Tuttavia, lo studio (24) analizzava solo sei animali e sono necessari studi con coorti più ampie per confermare questi risultati.

In un altro studio (25) dei cani sani sono stati sottoposti a una dieta composta da crocchette mescolate con percentuali crescenti di carne di manzo macinata. A causa della mancanza di una formulazione che soddisfacesse i requisiti nutrizionali, unita al breve periodo di osservazione (solo 1 settimana per ogni combinazione), i risultati devono essere interpretati con cautela. Possiamo comunque dire di aver osservato dei risultati simili: una diminuzione di *Faecalibacterium* e un aumento di due ceppi di *Clostridiaceae*.

È interessante notare che uno dei ceppi di *Clostridiaceae* è stato successivamente identificato come *Clostridium hiranonis*, una specie batterica associata al normale metabolismo degli acidi biliari (BA) (25, 26). Uno studio (23) ha riportato un normale metabolismo dei BA in cani sani alimentati con diete BARF, senza differenze significative rispetto ai controlli alimentati con crocchette. Il metabolismo dei BA è una via importante non solo per la digestione dei lipidi, ma anche per la regolazione dell'infiammazione intestinale ed è comunemente alterato nelle malattie gastrointestinali croniche (26, 27).

Nonostante sia comunemente associato a malattie gastrointestinali (a causa di *Clostridium perfringens* e *Clostridioides difficile*, potenziali agenti patogeni che discuteremo più avanti), è stato suggerito che l'aumento dell'abbondanza dei membri delle *Clostridiaceae* (ad esempio, *Clostridium*) quando vengono somministrate ai cani diete ricche di proteine potrebbe non essere dannoso per la loro salute (19), ma piuttosto associato alla digestione delle proteine. Si riscontra infatti un aumento della famiglia delle *Clostridiaceae* in correlazione al contenuto proteico della dieta (19). Inoltre, che le *Clostridiaceae* sono correlate positivamente

con la digeribilità delle proteine e negativamente con il contenuto proteico fecale (vale a dire che una maggiore quantità di *Clostridiaceae* determina una minore quantità di proteine residue nelle feci). Questi risultati suggeriscono che le *Clostridiaceae* possono avere un ruolo nel metabolismo delle proteine nel tratto intestinale dei cani, a differenza di quello svolto nell'intestino crasso del ratto, dove le *Clostridiaceae* rispondono ai carboidrati della dieta. Inoltre, le *Clostridiaceae* hanno avuto una correlazione positiva con il punteggio di salute fecale (cioè, le feci erano più solide) e una correlazione negativa con la produzione fecale (cioè, meno produzione fecale).

È importante usare cautela quando si cerca di applicare una scoperta sulle specie onnivore ai carnivori. Viene spesso studiato l'impatto della dieta sull'abbondanza di *Bifidobacterium* spp. (*Bifidobacteriaceae*), *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillaceae*) e *Faecalibacterium* spp. (*Ruminococcaceae*); ciò accade perché tali batteri sono considerati benefici negli onnivori (28). Il loro beneficio è attribuito al ruolo che svolgono nella produzione di prodotti di fermentazione dei carboidrati che vengono poi convertiti in butirrato attraverso la via della butirril-CoA:acetato-CoA-transferasi. Il ruolo del butirrato (SCFA) nella salute intestinale è indiscusso, in quanto il butirrato è la fonte energetica preferita dai colonociti (29).

Tuttavia, il butirrato si trova nei campioni fecali di tutti i mammiferi, indipendentemente dalle loro fonti alimentari. Quindi nei mammiferi che consumano pochi o nessun carboidrato deve esserci una produzione di butirrato alternativa. In uno studio condotto su cani alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi e a basso contenuto di amido (integrata con strutto) i livelli di acetato, butirrato e propionato non erano diversi da quelli dei cani alimentati con una dieta a basso contenuto di grassi e ad alto contenuto di amido (integrata con mais e riso spezzato), indicando che la produzione di SCFA nei cani non dipende esclusivamente dal contenuto di carboidrati (30). A sostegno di questa ipotesi, un altro studio (25) ha rilevato che l'aggiunta di carne macinata a una dieta convenzionale a base di

crocchette ha effettivamente portato a un piccolo aumento del butirrato e dell'isovalerato fecali.

Uno studio recente ha evidenziato che nei carnivori le *Clostridiaceae*, e in particolare il *Clostridium perfringens*, sono associate alla via di sintesi del butirrato chinasi, che consente la produzione di butirrato dalle proteine (17). Un altro batterio noto per la produzione di butirrato da fonti proteiche è *Fusobacterium varium* (31), che è risultato più abbondante in un gruppo di cani alimentati con diete crude a base di carne per almeno un anno, suggerendo un adattamento del microbioma alla dieta a lungo termine (24). Inoltre i membri della famiglia delle *Fusobacteriaceae* sono risultati più abbondanti in altre specie di carnivori [gatti: (18, 32), lupi: (33, 34), altri carnivori: (17, 35)] e cani alimentati con diete crude (19, 23, 36)].

Questi risultati mettono in dubbio che i batteri specializzati nella fermentazione dei carboidrati apportino al tratto gastrointestinale dei carnivori gli stessi benefici descritti negli onnivori (19). È possibile che nei carnivori la produzione di butirrato sia almeno in parte realizzata da altre specie batteriche, come i membri delle famiglie delle *Clostridiaceae* e delle *Fusobacteriaceae*, il che potrebbe essere la ragione del loro aumento nei cani alimentati con diete crude.

È stato inoltre riscontrato che le diete BARF aumentano i livelli fecali di acido gamma-aminobutirrico (GABA), un neurotrasmettitore, e del suo precursore acido gamma-idrossibutirrico (GHB) (23). Il GABA e il GHB sono rapidamente assorbiti dal tratto gastrointestinale quando vengono somministrati per via orale (37, 38) e in Giappone sono disponibili alimenti ricchi di batteri produttori di GABA per il trattamento dell'ipertensione (39). La connessione tra l'intestino e il cervello è stata studiata in molte malattie, nel cane e in altre specie, e ha portato allo sviluppo del concetto di asse intestino-cervello (40).

Un altro neurotrasmettitore, la serotonina, è essenziale per la salute dell'intestino. Circa il 90% della serotonina prodotta nell'organismo proviene dall'intestino, dove regola la motilità, la secrezione e il flusso sanguigno attraverso il sistema nervoso

enterico (41). La produzione di serotonina è anche parzialmente controllata dal microbioma, sia attraverso la produzione diretta di serotonina da parte dei batteri (42), sia attraverso il consumo del suo precursore, l'aminoacido triptofano (1). Il microbiota intestinale è essenziale per lo sviluppo del sistema nervoso enterico. I topi privi di germi mostrano un aumento anomalo dell'attività motoria e una riduzione delle risposte all'ansia, che si normalizzano dopo la colonizzazione con microbiota di topi convenzionali (43).

2.2.3 COLONIZZAZIONE, STABILITÀ E DECLINO DEL MICROBIOMA INTESTINALE

Indipendentemente dalla specie, la colonizzazione del tratto gastrointestinale nei mammiferi inizia ancor prima che il neonato esca dal canale del parto. La colonizzazione iniziale varia e riflette il metodo di parto e la nutrizione, e il microbioma che si instaura aumenterà in diversità nel tempo (44). Negli esseri umani, i neonati partoriti per via vaginale acquisiscono popolazioni microbiche dal microbiota vaginale della madre, mentre i neonati partoriti con taglio cesareo acquisiscono popolazioni batteriche dalla pelle della madre (45). Sebbene non siano stati condotti studi su cani nati con taglio cesareo, i cani appena nati sono esposti fin dalla nascita al microbiota vaginale e fecale della madre attraverso la lingua della stessa e quindi l'effetto del metodo di parto è probabilmente meno pronunciato.

Nel cane, analogamente all'uomo, la maturazione del microbioma in una composizione simile a quella dell'adulto coincide con lo svezzamento. In uno studio condotto su cuccioli di età compresa tra 1 settimana e 1 anno (46), i cuccioli presentavano microbiomi significativamente diversi durante le prime settimane di vita, con una predominanza di Proteobacteria. A 9 settimane di età, tuttavia, i Proteobacteria erano significativamente diminuiti e *Faecalibacterium* spp. e *Clostridium hiranonis* erano significativamente aumentati, con valori che rientravano nell'intervallo di riferimento degli adulti sani. Inoltre, è stato riscontrato che i cuccioli adulti presentano una composizione del

microbioma più simile rispetto ai cani non imparentati, il che fa pensare all'importanza della genetica e dell'esposizione nelle prime fasi della vita (10).

L'ambiente, e in particolare gli altri membri della famiglia, possono avere un impatto sul microbioma intestinale. In uno studio che ha messo a confronto i cani e i loro proprietari, è stata riscontrata una significativa condivisione del microbiota cutaneo tra le coppie cane-proprietario rispetto agli altri membri della famiglia e un effetto minore è stato riscontrato anche nel microbiota fecale (16). Sebbene l'impatto complessivo di questa condivisione del microbiota sia probabilmente modesto, occorre tenerlo presente nelle famiglie che includono individui immunocompromessi a causa del potenziale impatto zoonotico (47).

In molte specie, il microbioma intestinale è tipicamente stabile nel tempo negli adulti sani. Nei cani è stata valutata solo la variabilità a breve termine e il microbioma è risultato relativamente stabile nell'arco di 2 settimane (14). In uno studio condotto su esseri umani adulti che non assumevano antibiotici, più del 70% delle specie batteriche fecali all'interno di un individuo era stabile nell'arco di un anno e i calcoli indicano che la maggior parte delle specie era probabilmente stabile per decenni in individui con peso stabile (48). Sebbene non siano disponibili dei dati a lungo termine per i cani, è ragionevole aspettarsi che il microbioma intestinale rimanga stabile negli animali adulti sani anche per tutta la vita. Un sottoinsieme di taxa batterici è stato identificato come fondamentale per la salute gastrointestinale (8) e utilizzato per creare un indice di disbiosi in grado di valutare il microbioma intestinale attraverso una serie di reazioni qPCR (49). L'indice di disbiosi sarà discusso più avanti in questa rassegna.

È stato dimostrato che la diversità microbica gastrointestinale diminuisce con l'età in altre specie e che il declino è associato a una maggiore fragilità e a una riduzione delle funzioni cognitive (50). L'immunosenescenza nei pazienti anziani è associata all'infiammaging, una condizione infiammatoria cronica di basso grado che include squilibri nella composizione del microbioma (51). In uno studio condotto su una specie di pipistrello ecce-

zionalmente longeva, è stato riscontrato che il microbioma dei pipistrelli anziani e sani era molto simile a quello dei pipistrelli giovani, indicando un legame tra invecchiamento sano e microbioma intestinale (52). Il microbioma del cane che invecchia non è stato ancora studiato e sono necessarie ulteriori ricerche per valutare se le strategie per ritardare la perdita di diversità del microbioma negli anziani possano anche ritardare l'insorgenza dell'immunosenescenza e aumentare la longevità.

2.3 IL MICROBIOMA INTESTINALE NELLE MALATTIE

Sebbene l'età, la dieta e i fattori ambientali possano svolgere un ruolo significativo nel mantenimento di un microbioma sano, le alterazioni provocate da queste cause sono molto più evidenti negli animali malati. Molte malattie, sistemiche o localizzate, hanno un impatto o sono influenzate dal microbioma intestinale e sono associate alla disbiosi.

La disbiosi intestinale è definita come un'alterazione della composizione del microbiota intestinale che comporta cambiamenti funzionali nel trascrittoma microbico, nel proteoma o nel metaboloma (53). L'aumento dell'abbondanza di batteri anaerobi facoltativi della famiglia delle *Enterobacteriaceae* è un marcatore comune di disbiosi (54), osservato anche nei cani (8).

È stato ipotizzato che l'ossigeno possa essere responsabile dei cambiamenti nella composizione del microbiota osservati nella disbiosi (55). Questa ipotesi si concentra sulla disponibilità di ossigeno nel lume intestinale, che può aumentare in situazioni di maggiore permeabilità intestinale, come l'infiammazione (54). L'aumento di ossigeno libero che ne consegue ha un impatto negativo sulle popolazioni di anaerobi obbligati e determina un'espansione luminale incontrollata degli anaerobi facoltativi, in particolare della famiglia delle *Enterobacteriaceae* (53). Sapere che l'ossigeno, da solo o in combinazione con altri accettori di elettroni respiratori, controlla l'abbondanza di *Enterobacteriaceae* nell'intestino crasso aiuta molto la comprensione del processo per cui un'alterazione dell'omeostasi intestinale determina la disbiosi.

La composizione del microbiota intestinale ha anche effetti significativi sulla funzione immunitaria e regola la produzione locale di anticorpi. Sebbene i microbi intestinali siano separati dallo strato mucoso interno e dal glicocalice dal contatto diretto con gli enterociti, le cellule dendritiche intestinali possono estendere i loro dendriti nel lume intestinale e campionare il microbiota. La maggior parte di questi batteri viene uccisa dai macrofagi e alcuni vengono sottoposti alle cellule B. Le cellule B producono le IgA, che sono in grado di eliminare i batteri che si trovano nel lume dell'intestino. Le cellule B producono IgA, che vengono secrete nel lume, legandosi ai batteri e attivando una distruzione batterica mirata (2).

I precursori delle cellule T helper (Th) intestinali possono differenziarsi in cellule Treg o Th17 a seconda dei segnali ricevuti dal microbiota (2). In omeostasi, la produzione di cellule Treg è favorita, quella di cellule Th17 è soppressa e si verifica un'inflammatione minima all'interno della parete intestinale. In assenza di cellule Treg, le cellule T effettrici non controllate rispondono agli antigeni microbici e scatenano l'inflammatione (2). Gruppi batterici specifici possono influenzare questo processo: ad esempio, i membri dei gruppi *Clostridium* IV e XIVa hanno dimostrato di stimolare l'induzione di Treg (56), inducendo una risposta antinfiammatoria, mentre i batteri filamentosi segmentati (SFB) hanno dimostrato di indurre Th17 (57), generando segnali proinfiammatori.

L'inflammatione intestinale può essere innescata anche dalla disbiosi intestinale attraverso il dismetabolismo degli acidi biliari, osservato sia nei cani che nell'uomo (26, 27, 58). Gli acidi biliari (BA) sono essenziali per la digestione dei lipidi, ma svolgono anche un ruolo di difesa della mucosa e hanno proprietà antinfiammatorie. I batteri presenti nel lume intestinale sono responsabili della deconiugazione e della deidrossilazione dei BA, pertanto la disbiosi può compromettere la produzione di BA secondari. La malattia intestinale cronica può anche ridurre l'espressione del trasportatore apicale di acidi biliari sodio-dipendente (ASBT [*Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter*]),

che è essenziale per il riassorbimento di BA primario coniugato (27). Nel complesso, questi risultati indicano che la disbiosi e l'infiammazione intestinale possono compromettere in modo significativo il metabolismo dei BA, che a sua volta può stimolare ulteriormente l'infiammazione intestinale.

La disbiosi è presente in molte patologie, sia a livello locale, nel tratto gastrointestinale, sia a livello sistemico (59). Sebbene non rientri nell'ambito di questa rassegna, lavori recenti hanno associato la disbiosi all'obesità (60), alle malattie metaboliche (61), al cancro (62), alle disfunzioni neurologiche (63) e a molte altre patologie, sia nel cane che nell'uomo. Tuttavia, occorre prestare attenzione nell'interpretare questi risultati. Sebbene sia stata dimostrata un'associazione con la disbiosi in queste malattie, spesso l'effetto causale non è ancora stato dimostrato e la disbiosi potrebbe essere un sintomo del processo patologico piuttosto che la sua causa.

2.3.1 MICROBIOMA INTESTINALE E MALATTIE GASTROINTESTINALI

Le disfunzioni gastrointestinali sono l'associazione più evidente con la disbiosi intestinale. È stato riscontrato che il microbioma intestinale è alterato sia in caso di diarrea acuta che cronica. Come per i cani sani, gli studi condotti su cani affetti da malattie gastrointestinali riportano percentuali di abbondanza di taxa diversi, ma la maggior parte dei taxa è aumentata o diminuita all'interno dello stesso fenotipo di malattia in modo costante.

Gran parte dell'apparente discrepanza tra gli studi può essere attribuita alla difficoltà di ottenere campioni da casi clinici ben caratterizzati, senza fattori confondenti come la recente somministrazione di antibiotici. Questa difficoltà, unita alle restrizioni di budget, si traduce in un numero ridotto di campioni studiati, il che limita la potenza statistica. Le nuove tecnologie stanno rendendo più accessibile il sequenziamento del metagenoma e, con l'aumento del numero di campioni per progetto, questi problemi metodologici dovrebbero essere superati più facilmente.

Nella diarrea acuta non complicata (AD), i cani sviluppano una forte disbiosi con una diminuzione dei batteri produttori di

acidi grassi a catena corta (SCFA [*Short-Chain Fatty Acids*]) come *Blautia* spp., *Ruminococcus* spp., *Faecalibacterium praunitzii* e *Turricibacter* spp. (64) e una maggiore abbondanza del genere *Clostridium* (26). La diversità microbica è diminuita e le comunità microbiche differiscono significativamente da quelle dei cani sani.

Nonostante la presentazione clinica sia lieve, la DA è associata a una disbiosi fecale che altera significativamente non solo i profili degli SCFA fecali, ma anche i metaboliti del sangue e delle urine, suggerendo che gli episodi acuti di diarrea hanno un impatto sul profilo metabolico complessivo dell'ospite. Infatti, uno studio (65) ha dimostrato che, mentre l'abbondanza di batteri produttori di SCFA era diminuita nei campioni fecali di cani con AD, quando sono stati misurati gli SCFA solo la concentrazione di propionato era diminuita significativamente. Il butirrato è risultato invece aumentato nei campioni fecali dei cani con AD, una contraddizione che gli autori suggeriscono possa derivare da una diminuzione dell'assorbimento del butirrato o da una sua minore utilizzazione da parte degli enterociti. È interessante notare, però, che hanno anche dimostrato un aumento dell'abbondanza di *Clostridium* sp. che, come già detto, può produrre butirrato dalle proteine utilizzando una via alternativa, il che potrebbe essere un'altra spiegazione per l'aumento del butirrato.

Alterazioni simili sono state rilevate nei cani con sindrome di diarrea emorragica acuta (AHDS [*Acute Hemorrhagic Diarrhea Syndrome*]), nota anche come gastroenterite emorragica (HGE [*Hemorrhagic GastroEnteritis*]) (66). Nonostante la differenza clinica, i cani con AD e AHDS presentano cambiamenti simili nei gruppi batterici (65). Rispetto ai cani sani, sia i cani con AD sia quelli con AHDS presentano una minore abbondanza di *Ruminococcaceae* e *Faecalibacterium* spp. Alcuni studi hanno dimostrato un'associazione tra *Clostridium perfringens* e AHDS (66), tuttavia la sua enterotossina non è stata rilevata nei campioni fecali di AHDS (67). Il gene della tossina netF, scoperta recentemente, è stato individuato nel genoma di *C. perfringens* isolato da biopsie intestinali di cani con AHDS (68). Inoltre, altri studi hanno riscontrato una forte correlazione tra la presenza del gene netF nei

campioni fecali e l'AHDS (69) e la guarigione dall'AHDS è stata accompagnata da una significativa diminuzione del gene netF e dell'abbondanza di *C. perfringens* (70). L'insieme di questi risultati suggerisce che la tossina netF può svolgere un ruolo nelle lesioni necrotizzanti presenti nella AHDS.

Un altro Clostride che ha guadagnato molta attenzione nella medicina umana, il *Clostridioides difficile* (precedentemente noto come *Clostridium difficile*) (71) è un problema contraddittorio nei cani. Mentre le infezioni da *C. difficile* nell'uomo sono ben studiate e associate a terapia antibiotica e ricovero ospedaliero, nel cane il *C. difficile* e le sue tossine sono rilevate in soggetti clinicamente sani e l'infezione non può essere indotta in cani sani nemmeno dopo terapia antibiotica. In effetti, uno studio (72) ha analizzato dei volontari sani in Giappone e ha riportato dei tassi del 29% della malattia in cani e del 35% nei cani di un ospedale veterinario in trattamento per condizioni non correlate alla IG. Tuttavia, altri studi riportano tassi più prudenti, come il 5,5% dei cani da ricovero in Germania positivi al *C. difficile* (73) e nessun caso su 55 cani sani in Canada (74).

I ceppi di *C. difficile* isolati dai cani sono in grado di produrre *in vitro* tossine che compromettono gravemente le giunzioni strette nelle linee cellulari canine e umane (75). Alcuni autori hanno ipotizzato che, analogamente all'uomo, la presenza di batteri deidrossilatori degli acidi biliari, in particolare *Clostridium hiranonis*, possa essere un fattore di protezione nel cane. Anche *Sphingobacterium faecium* è stato suggerito come specie protettiva, il che potrebbe essere associato alle sue capacità di produzione di sfingofosfolipidi (75).

Nei cani sintomatici trovati positivi al *C. difficile* non è noto se i segni clinici siano attribuibili al *C. difficile* o se si tratti di un reperto secondario. In uno studio interessante (76), in cinque cani con diarrea cronica positivi al test per il *C. difficile*, la diarrea si è ripresentata dopo il trattamento con metronidazolo, ma è cessata dopo l'intervento dietetico e il *C. difficile* non è stato più rilevabile. Questi risultati suggeriscono che la *C. difficile* era secondaria a un problema di fondo. Data la frequente identifica-

zione di ribotipi PCR epidemici umani nei cani (72, 77), bisogna potenzialmente considerare *C. difficile* come un agente zoonotico e monitorarlo di conseguenza(78).

Lo sviluppo di enteropatie croniche (CE) è stato documentato nei cani in seguito a episodi di infezione da parvovirus (79) e un modello simile è stato descritto nell'uomo (80, 81). Alcune delle alterazioni presenti nella diarrea acuta, sia nell'uomo che nel cane, si verificano anche nella CE. Ad esempio, la disbiosi e la diminuzione dei batteri che producono SCFA sono state riscontrate nei cani con diarrea acuta e cronica (64, 65, 82). Sono necessari ulteriori studi per valutare l'impatto a lungo termine della diarrea acuta e il suo ruolo nello sviluppo della CE.

Le enteropatie croniche nei cani sono generalmente classificate in base alla loro risposta al trattamento come diarrea da cibo (FRD [*Food-Responsive Diarrhea*]), diarrea responsiva agli antibiotici (ARD [*Antibiotic-Responsive Diarrhea*]) e diarrea responsiva agli immunosoppressori (SRD, nota anche come malattia infiammatoria intestinale idiopatica, IBD). Tutti i cani affetti da enteropatie croniche presentano in qualche misura un'inflammatione intestinale e quindi condividono microbiomi disbiotici simili (83).

Oltre alla disbiosi, i cani con CE presentano anche una diversità batterica significativamente ridotta nelle feci (82, 84). Nei cani con IBD è ridotta l'abbondanza del *phylum Fusobacteria*, insieme al *phylum Bacteroidetes*, in particolare le famiglie *Bacteroidaceae* e *Prevotellaceae* (ad esempio, il genere *Prevotella*) (82, 83). All'interno del *phylum Firmicutes*, nei cani con IBD sono state osservate diminuzioni nelle famiglie *Ruminococcaceae* (genere *Ruminococcus*), *Veillonellaceae* (genere *Megamonas*) e *Lachnospiraceae* (82-84). Dato che parliamo di batteri fondamentali per la produzione di SCFA, la diminuzione simultanea di tutti questi taxa batterici riduce la disponibilità di SCFA, e quindi la principale fonte di energia per i colonociti (82). Inoltre, i Gamma-Proteobatteri (ad esempio, le *Enterobacteriaceae*), un segno distintivo della disbiosi, sono sovrarappresentati nei campioni fecali dei cani con CE (8, 82, 85, 86).

Quando sono stati valutati dei generi specifici nei campioni fecali mediante qPCR, si sono viste abbondanze significativamente ridotte di *Blautia* spp. (classe Clostridia), *Faecalibacterium* spp. (classe Clostridia) e *Turicibacter* spp. (classe Erysipelotrichia) (82, 84). Inoltre, *Fusobacterium* spp. (classe Fusobacteriia) e *Clostridium hiranonis* (classe Clostridia) sono diminuiti e *Streptococcus* spp. (classe Bacilli) ed *E. coli* (classe Gammaproteobacteria) sono aumentati (82). Sulla base delle conoscenze specifiche accumulate da molteplici studi molecolari (8, 87), è stata sviluppata una serie di reazioni qPCR per quantificare la disbiosi intestinale nei campioni fecali canini. Il modello matematico sviluppato (49) quantifica i batteri totali e un insieme di sette gruppi batterici: *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Blautia* spp., *Fusobacterium* spp. e *Clostridium hiranonis* per calcolare l'indice di disbiosi (DI). Valori negativi di DI indicano normobiosi, mentre valori positivi di DI indicano disbiosi. Il DI è il primo strumento che consente di quantificare la disbiosi intestinale e può essere utilizzato per monitorare la disbiosi nel tempo e dopo il trattamento. Altri studi hanno poi confermato che il DI è aumentato nei cani con CE (26, 27, 82).

Oltre agli SCFA, è stato riscontrato che anche le alterazioni di aminoacidi come il triptofano sono significativamente correlate alle enteropatie croniche. Il triptofano è un aminoacido essenziale nei cani e un precursore di composti come la chinurenina, la serotonina, la melatonina e l'indolo. La via della cinurenina comprende almeno il 90% del catabolismo del triptofano ed è limitata dall'enzima indoleammina 2,3, diossigenasi 1 (IDO-1). Negli esseri umani affetti da IBD è stato riscontrato un aumento dell'espressione dell'IDO-1, con conseguente riduzione delle concentrazioni di triptofano nel siero. Risultati simili sono stati osservati nei gatti con CE, dove i livelli sierici di triptofano sono inversamente correlati alla gravità della malattia (88). L'aumento del catabolismo del triptofano limita la produzione di serotonina, un neurotrasmettitore essenziale per la secrezione gastrointestinale, la motilità e la percezione del dolore (89).

La disponibilità di triptofano può anche influenzare direttamente il microbiota intestinale, in quanto il triptofano è il precursore per la produzione di composti indolici. I composti indolici possono essere sintetizzati solo dai batteri e hanno dimostrato di aumentare l'espressione di geni associati al miglioramento dell'omeostasi intestinale, alla riduzione della permeabilità intestinale e all'aumento della produzione di mucina in altre specie (90, 91). Il triptofano è stato l'unico aminoacido che diminuiva nel siero di cani affetti da enteropatia proteico-disperdente (una forma di enteropatia cronica) e la riduzione del triptofano sierico è stata correlata a una riduzione dell'albumina sierica e a esiti peggiori (92). Inoltre, nei cani con IBD, diversi composti indolici sono risultati significativamente ridotti nei campioni fecali (93).

Mentre i cani con FRD o IBD non differiscono in termini di ricchezza globale, diversità o composizione del microbiota prima del trattamento, la loro risposta al trattamento è diversa (94). Dopo il trattamento, sia i cani con FRD che quelli con IBD hanno mostrato un aumento dell'abbondanza di *Bacteroides*, associato a un microbioma sano nel colon. Tuttavia, alcuni taxa batterici specifici hanno presentato abbondanze diverse tra FRD e IBD. I cani con FRD hanno registrato una diminuzione di *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e Proteobacteria (tutti potenziali patogeni) nel duodeno dopo il trattamento. In un altro studio incentrato su cani con FRD (22), dopo un esperimento dietetico di eliminazione con una dieta a base di proteine vegetali, la diversità del microbioma non era più significativamente diversa dai controlli sani e la ricchezza era significativamente aumentata.

A differenza della FRD, tuttavia, nei cani con IBD trattati con terapia immunosoppressiva, con o senza antibiotici o altre misure terapeutiche, il recupero clinico non è sempre accompagnato da un recupero del microbiota. In uno studio (84), sebbene tutti i cani siano guariti dal punto di vista clinico, gli indici di diversità dopo 3 settimane di terapia mostravano una tendenza a un'ulteriore diminuzione. Un altro studio ha valutato il recupero del metabolismo degli acidi biliari e del DI nell'arco di 3 mesi e, mentre il metabolismo del BA è stato ripristinato e *C. hiranonis*

è aumentato in modo significativo, altre specie rilevanti e il DI complessivo erano ancora significativamente alterati (26).

La differenza di risposta al trattamento tra cani con FRD e cani con IBD può essere probabilmente attribuita alle differenze nella patogenesi dell'enteropatia. Mentre i cani con IBD hanno un processo infiammatorio che sembra derivare da una combinazione di predisposizione genetica e fattori ambientali, i cani con FRD hanno un processo infiammatorio guidato dalla presenza costante di un antigene di origine alimentare. Una volta eliminato l'antigene dalla dieta, l'infiammazione regredisce permettendo al microbioma di tornare a uno stato di normobiosi.

2.3.2 STRATEGIE DI TRATTAMENTO E LORO IMPATTO SUL MICROBIOMA

La manipolazione del microbioma è spesso inclusa nel trattamento delle malattie gastrointestinali. Antibiotici, probiotici e trapianti fecali agiscono eliminando i batteri dannosi o introducendo batteri benefici. Tuttavia, la manipolazione di una comunità batterica così complessa non è semplice e spesso produce risultati contrastanti.

Gli antibiotici sono utilizzati nelle malattie gastrointestinali acute e croniche, con l'obiettivo di eliminare i batteri patogeni. Tuttavia, gli antibiotici hanno gravi conseguenze sul microbiota intestinale e spesso non ci sono prove sufficienti a giustificarne l'uso. Nei cani affetti da AHDS, ad esempio, uno studio clinico in doppio cieco su cani non settici non ha rilevato alcuna differenza nel tasso di mortalità, nella durata dell'ospedalizzazione, nella gravità dei segni clinici o nell'esito tra il gruppo antibiotico e il gruppo placebo (95). Anche la diarrea cronica viene spesso trattata con antibiotici, tuttavia uno studio (96) non ha riscontrato differenze nel recupero clinico nei cani che ricevevano metronidazolo e prednisone rispetto a quelli che ricevevano solo prednisone. Pertanto, l'opportunità di prescrivere antibiotici deve essere valutata caso per caso, piuttosto che come trattamento standard per la malattia gastrointestinale. In definitiva, la

decisione di prescrivere antibiotici dipenderà dalla gravità della presentazione clinica, dai risultati degli esami di laboratorio e dall'esperienza del medico.

La tilosina e/o il metronidazolo sono antibiotici comunemente usati per le malattie gastrointestinali e hanno un grave impatto sul microbioma intestinale (97). La somministrazione di antibiotici può indurre disbiosi intestinale: gli antibiotici ad ampio spettro causano cali rapidi e significativi della ricchezza tassonomica, della diversità e dell'uniformità (97). Una volta interrotto il trattamento antibiotico, molte specie batteriche si riprendono, ma raramente si torna all'esatta composizione iniziale (98, 99).

A causa di queste ben note conseguenze dell'uso degli antibiotici si è sviluppato un rinnovato interesse per i probiotici, i prebiotici e i sinbiotici. Mentre i prebiotici sono sostanze alimentari non digeribili, come le fibre, che favoriscono l'espansione dei batteri benefici già presenti nell'ospite, i probiotici forniscono una fonte esogena di batteri vivi all'ospite (100). I sinbiotici sono prodotti che contengono una combinazione di entrambi. Sono disponibili in commercio molte formulazioni diverse, ma non esistono prove scientifiche sufficienti per sostenere una formulazione rispetto alle altre (101).

Nei cani, sono state studiate diverse fibre per le loro proprietà prebiotiche e per indurre cambiamenti specifici nel microbioma. È stato riscontrato che la polpa di barbabietola (9) aumenta il phylum Firmicutes, con una maggiore abbondanza della classe Clostridia e una diminuzione di Erysipelotrichi, e diminuisce il phylum Fusobacteria. La fibra di patata (102) e la buccia di soia (103) agiscono principalmente arricchendo i gruppi batterici Firmicutes che fermentano le fibre, compresi i gruppi *Clostridium* IV (ad esempio, famiglia *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii*) e XIVa (ad esempio, famiglia *Lachnospiraceae*, *Blautia* spp.). Anche i fruttani di tipo inulina hanno aumentato i Firmicutes, ma dalle famiglie *Erysipelotrichaceae* e *Turicibacteraceae* (21). Anche la fibra di patata, la buccia di soia e i fruttani di tipo inulina sono risultati in grado di aumentare gli SCFA, tra cui

acetato, butirrato e propionato. Inoltre, i fruttani di tipo inulina (21) hanno aumentato il totale degli acidi biliari fecali e ridotto i Proteobatteri (ad esempio, le *Enterobacteriaceae*). L'inulina e la parete cellulare del lievito sono state testate in combinazione a una dieta a base di carne cruda (104) e si è riscontrato che l'inulina riduceva le *Enterobacteriaceae* e aumentava i generi *Megamonas* e *Lactobacillus*. La parete cellulare del lievito, invece, ha portato a un aumento del genere *Bifidobacterium*.

I batteri probiotici non sono in genere in grado di colonizzare l'intestino a causa della competizione con il microbiota già consolidato. In uno studio condotto su cani sani (15), l'aumento dell'abbondanza di *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp. indotto dalla somministrazione di un sinbiotico contenente sette specie probiotiche è stato solo transitorio ed è tornato all'abbondanza di base una volta interrotto il trattamento. Un altro studio ha riscontrato solo un piccolo aumento della diversità delle specie con la somministrazione di un simbiotico contenente *Enterococcus faecium* (105).

Tuttavia, i probiotici possono ancora avere effetti benefici attraverso la produzione di metaboliti e peptidi antimicrobici che modificano il microbiota locale e interagiscono con il sistema immunitario dell'ospite (101). In uno studio in doppio cieco controllato con placebo (106), un prodotto a base di latte acido contenente tre specie di *Lactobacillus* spp. di origine canina è stato utilizzato per trattare dei cani affetti da DA. La somministrazione del prodotto a base di latte acido ha accelerato la normalizzazione della consistenza delle feci e ha ridotto l'abbondanza di un ceppo di *Clostridium perfringens* produttore di α -tossine e di *Enterococcus faecium*, entrambi potenziali enteropatogeni. Inoltre, il trattamento ha anche aumentato il benessere dei cani mantenendo loro l'appetito. Nei cani da slitta, che comunemente soffrono di diarrea durante i periodi di esercizio fisico intenso, un simbiotico contenente tre specie probiotiche ha portato a un aumento significativo delle *Lactobacillaceae* fecali dopo 2 settimane di trattamento e ha avuto un effetto protettivo durante

un'epidemia di diarrea contagiosa, pur non avendo un impatto significativo sulla produzione complessiva di SCFA (107).

Nei cani con IBD, i probiotici sono talvolta raccomandati in combinazione con il trattamento immunosoppressivo standard. In uno studio (108), i cani con IBD sono stati randomizzati a ricevere la terapia standard con o senza probiotici. Entrambi i trattamenti hanno modulato il numero di batteri della mucosa dei cani affetti da IBD in modo simile, con un aumento del numero di batteri nel muco aderente, e sono stati associati a una rapida remissione clinica, nonostante non sia diminuita l'infiammazione istopatologica. È interessante notare, tuttavia, che solo i cani che ricevevano il probiotico presentavano un aumento dell'espressione delle proteine in giunzione stretta. Ciò suggerisce che, nonostante la mancanza di colonizzazione, i probiotici possono avere effetti benefici sull'omeostasi della mucosa.

In un altro studio (109), un probiotico a più ceppi è stato un'alternativa efficace al trattamento con un protocollo combinato (prednisone e metronidazolo) in cani con IBD per 60 giorni. I punteggi clinici di entrambi i gruppi sono diminuiti significativamente nel tempo, anche se il segno clinico principale è scomparso più rapidamente nel gruppo che ha ricevuto il trattamento standard. Tuttavia, quando il microbioma intestinale è stato valutato mediante qPCR per specifici taxa 30 giorni dopo la fine del trattamento, solo il gruppo che aveva ricevuto i probiotici ha mostrato una ripresa dell'abbondanza di *Faecalibacterium* spp - un batterio produttore di butirrato che non era tra i ceppi probiotici. Non sono stati osservati cambiamenti significativi per altri gruppi batterici in risposta al trattamento.

Un interessante sviluppo dello studio del microbioma intestinale è il trapianto di microbiota fecale (FMT), che consiste nella somministrazione al paziente di materiale fecale proveniente da un donatore sano, di solito per via endoscopica. Negli esseri umani, i trapianti fecali sono stati utilizzati con successo nel trattamento delle infezioni ricorrenti da *C. difficile* per molti anni, con l'obiettivo di ripristinare il microbioma per inibire la colonizzazione di *C. difficile*. L'FMT è considerato un trattamento più

sicuro ed efficace per le infezioni ricorrenti da *C. difficile* rispetto alla terapia antibiotica standard (110, 111). Abbiamo degli studi sul trattamento di altre malattie con l’FMT, tra cui l’IBD (112). Nell’uomo con IBD, le percentuali di successo variavano dal 22 al 60,5% (113). Nei cani, mancano studi caso-controllo e i *case report* utilizzano una serie di tecniche diverse, rendendo difficile fare confronti o stabilirne l’efficacia (114).

In uno dei pochi studi caso-controllo condotti finora sui cani, i cuccioli infettati da parvovirus trattati con FMT hanno ridotto significativamente il tempo di ospedalizzazione e si sono ripresi più rapidamente rispetto ai cuccioli sottoposti a trattamento standard (115). Tuttavia, quando il FMT orale è stata utilizzata su cuccioli durante lo svezzamento in un contesto di ricerca, non è stato osservato alcun miglioramento nei punteggi fecali e il FMT non ha prevenuto la diarrea associata allo svezzamento (116). Uno studio (117) ha riportato buoni risultati, anche se transitori, in una serie di 16 cani con IBD, con una remissione prolungata osservata quando i cani sono stati mantenuti con un dosaggio orale giornaliero di feci congelate di donatori dopo il FMT. In un altro studio (118) è riportata la guarigione di un gatto con colite ulcerosa dopo due cicli di FMT.

Sebbene promettente, l’uso del FMT per trattare la disbiosi e le malattie ad essa associate richiede ancora ulteriori ricerche per stabilire la metodologia ideale da applicare ai cani. Fattori come la conservazione del campione del donatore (congelamento o additivi), la via di somministrazione (endoscopia gastrointestinale superiore o colonscopia) e il programma di somministrazione (trapianto singolo o somministrazione giornaliera di capsule) possono influenzare in modo significativo i risultati, e i dati provenienti da studi sull’uomo non sempre sono applicabili ai cani a causa delle differenze anatomiche e fisiologiche. Si spera che gli studi futuri consentano ai ricercatori di valutare appieno il potenziale e gli eventuali limiti del FMT nel trattamento delle malattie gastrointestinali.

2.4 CONCLUSIONI

In conclusione, la composizione del microbioma intestinale dei cani è correlata alla salute generale. Il microbioma intestinale è stabile nei cani adulti sani, ma l'età, la dieta e molti altri fattori ambientali possono influenzare il mantenimento di un microbioma sano. Le alterazioni riscontrate negli animali malati, tuttavia, sono marcate e quando hanno un impatto sul trascrittoma, sul proteoma o sul metaboloma vengono definite disbiosi. La disbiosi deve essere sempre presa in considerazione quando sono presenti patologie del tratto gastrointestinale. Il recupero della composizione del microbioma non è necessariamente correlato al recupero clinico e le conseguenze a lungo termine di tali alterazioni persistenti sono finora sconosciute. L'identificazione dei taxa batterici e dei composti derivati dai batteri coinvolti nella patogenesi delle malattie gastrointestinali acute e croniche può contribuire allo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici e terapeutici e va studiata.

PARTE II

MICROBIOTA E NUTRIZIONE

Se è vero che siamo (e sono) quello che mangiamo, questo è ancor più vero considerando che il primo ad interfacciarsi con i nutrienti che ingeriamo sono i componenti del microbiota intestinale. L'alimentazione in questo senso diventa quindi non solo un mezzo diretto per modulare la salute, ma anche indiretto, agendo primariamente sul microbiota intestinale che poi, di rimbalzo per così dire, produce effetti sulla salute dell'ospite.

Ma se l'alimentazione acquisisce importanza oltre alle questioni classicamente considerate in medicina veterinaria come il bilanciamento e la completezza della dieta, come cambiano questi studi il nostro paradigma basato sull'alimentazione commerciale come "migliore" alimentazione per cane e gatto?

Anche se siamo solo ai primi passi di questa microbiota revolution, credo le ricadute nutrizionali siano fra le più importanti da considerare.

N.d.C.

3 - EFFETTI DELL'ALIMENTAZIONE SUL MICROBIOMA GASTROINTESTINALE DI CANI E GATTI: IMPATTO SULLA SALUTE E SULLA MALATTIA

Tratto e tradotto da



Wernimont SM, Radosevich J, Jackson MI, Ephraim E, Badri DV, MacLeay JM, Jewell DE and Suchodolski JS (2020) *The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease*. *Front. Microbiol.* 11:1266.

doi: [10.3389/fmicb.2020.01266](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01266)

Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

Il microbioma gastrointestinale (GI) di cani e gatti è sempre più riconosciuto come un organo metabolicamente attivo e strettamente legato alla salute degli animali domestici. Il cibo funge da substrato per il microbioma gastrointestinale di cani e gatti e svolge un ruolo significativo nel definire la composizione e il metabolismo del microbioma gastrointestinale. Il microbioma, a sua volta, facilita la digestione dei nutrienti da parte dell'ospite e la produzione di postbiotici, composti di origine batterica che possono influenzare la salute degli animali domestici. Di conseguenza, i proprietari di animali domestici hanno un ruolo nel plasmare il microbioma di cani e gatti attraverso il cibo che scelgono per loro. Tuttavia, manca una chiara comprensione dell'impatto che queste scelte alimentari hanno sul microbioma e quindi sulla salute generale dell'animale. Gli alimenti per animali domestici sono formulati in modo da contenere carboidrati, proteine e grassi, ma includono sempre più spesso ingredienti a favore del microbioma, come prebiotici e probiotici. Queste categorie, così come le loro proporzioni relative negli alimenti, possono influenzare la composizione e/o la funzione

del microbioma. Diverse prove suggeriscono che i componenti della dieta possono avere un impatto non solo sulle malattie gastrointestinali, ma anche sulle allergie, sulla salute orale, sulla gestione del peso, sul diabete e sulle malattie renali attraverso cambiamenti nel microbioma gastrointestinale. Fino a poco tempo fa la ricerca sul microbioma si concentrava sulle alterazioni della composizione del microbioma negli stati patologici, e meno su come i cambiamenti nell'alimentazione possano influenzare la salute degli animali domestici modificando la funzione del microbioma. Questa rassegna riassume l'impatto dei componenti nutrizionali degli alimenti per animali domestici sulla composizione e sulla funzione del microbioma e studia il ruolo della nutrizione nella salute dell'ospite attraverso il microbioma in diversi stati patologici. Capire il modo in cui l'alimentazione modula la composizione e la funzione del microbioma gastrointestinale può portare a migliorare la salute e la resistenza di cani e gatti.

3.1 INTRODUZIONE

La definizione tradizionale di “microbioma” è “materiale genetico aggregato di tutti i microrganismi che vivono in, o su, un habitat definito” (Lederberg e McCray, 2001; The NIH HMP Working Group, 2009). Più in generale, il termine “microbioma” si riferisce ora sia alle cellule batteriche stesse che al loro materiale genetico. Dati gli effetti ampi e spesso importanti del microbioma sulla salute degli esseri umani e degli animali domestici, il microbioma gastrointestinale (GI) è ora riconosciuto come un organo (Possemiers et al., 2011) con capacità metaboliche proprie. Il microbioma gastrointestinale è composto da trilioni di cellule che risiedono nel tratto digestivo, che inizia nella cavità orale e prosegue fino al retto (Gibson e Roberfroid, 1995). Sebbene la componente batterica del microbioma sia stata oggetto di molte ricerche e rappresenti il fulcro di questa rassegna, il microbioma è costituito anche da funghi, archei, virus e protozoi.

Lo sviluppo del microbioma inizia prima della nascita (Stinson et al., 2019) e il microbioma influenza molti aspetti della salute dell'ospite, tra cui la fisiologia, l'anatomia, il comportamento, la riproduzione e la forma fisica (Bordenstein e Theis, 2015; Thomas et al., 2017). Ad esempio, il microbioma gastrointestinale facilita la scomposizione del cibo (Figura 1) e la produzione di metaboliti, come gli acidi grassi a catena corta (SCFA), gli acidi biliari secondari, le vitamine (D'Argenio e Salvatore, 2015; Suchodolski, 2016), i nutrienti e altri composti di origine batterica (Mondo et al., 2019). Il microbiota rilascia nutrienti e metaboliti nell'organismo, influenzando le cellule immunitarie e le funzioni infiammatorie (Tizard e Jones, 2017).

In cambio, l'ospite fornisce un'infrastruttura per il microbioma, ne regola la temperatura e i livelli di ossigeno, controlla la peristalsi, fornisce una difesa dagli agenti patogeni e offre l'impalcatura anatomica e la struttura che fanno da habitat al microbioma gastrointestinale. Una barriera epiteliale rivestita di muco consente all'ospite e ai microbi residenti di interfacciarsi tra loro, oltre a promuovere la sorveglianza immunitaria e facilitare l'omeostasi ospite-microbioma.

Le evidenze scientifiche suggeriscono anche che il microbioma gastrointestinale influenza lo sviluppo e la regolazione dei principali sistemi dell'ospite, tra cui il sistema nervoso, renale, digestivo, cutaneo, endocrino, immunitario e respiratorio (Eve-nepoel et al., 2017; Tizard e Jones, 2017; Makki et al., 2018). Ad esempio, i batteri commensali svolgono un ruolo chiave nella funzione del sistema immunitario dell'ospite, che è essenziale per lo sviluppo della struttura fisiologica dell'intestino (Mondo et al., 2019).

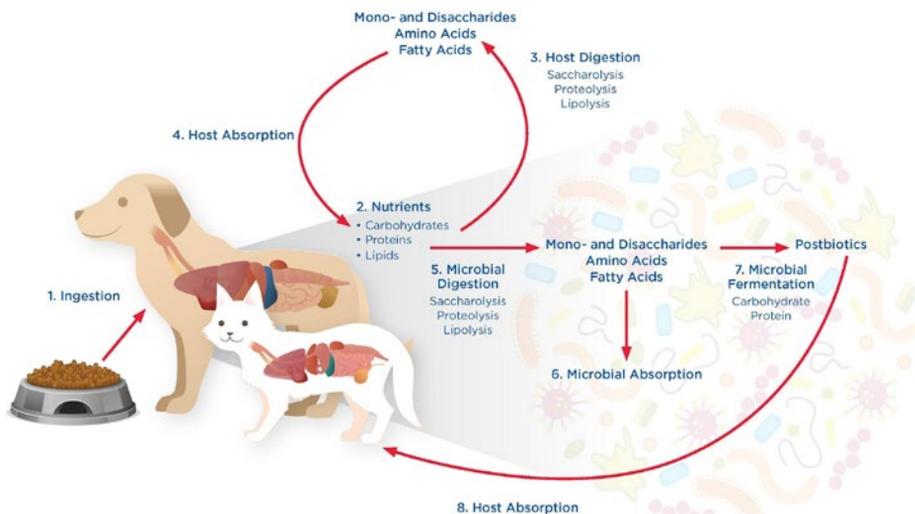


Figura 1. Interazioni tripartite tra alimenti per animali domestici, microbioma gastrointestinale e ospite in 8 fasi. (1) **Ingestione:** Cani e gatti ingeriscono nutrienti come carboidrati, proteine e lipidi, sotto forma di alimenti per animali domestici che vengono loro forniti. (2) **Nutrienti:** I nutrienti degli alimenti per animali domestici entrano nel tratto gastrointestinale dove sono disponibili per la digestione da parte dell'ospite e del microbioma. (3) **Digestione da parte dell'ospite:** La digestione da parte dell'ospite comporta la saccarolisi, la proteolisi e la lipolisi, con rilascio di mono- e disaccaridi, aminoacidi e acidi grassi. (4) **Assorbimento da parte dell'ospite:** I mono- e disaccaridi, gli aminoacidi e gli acidi grassi prodotti dalla digestione dell'ospite possono essere assorbiti e utilizzati dalle cellule dell'ospite. (5) **Digestione microbica:** I nutrienti non digeriti o assorbiti dall'ospite sono disponibili per la digestione da parte del microbioma attraverso la saccarolisi, la proteolisi e la lipolisi, liberando mono- e disaccaridi, aminoacidi e acidi grassi. (6) **Assorbimento microbico:** I mono- e disaccaridi, gli aminoacidi e gli acidi grassi generati dalla digestione microbica possono essere assorbiti e utilizzati dal microbioma. (7) **Fermentazione microbica:** I nutrienti in eccesso rispetto alle capacità di assorbimento dell'ospite e dei microbi vengono passati al tratto gastrointestinale inferiore, dove possono essere sottoposti a fermentazione microbica per produrre postbiotici che possono avere un impatto sulla salute dell'ospite a livello locale nel tratto gastrointestinale. (8) **Assorbimento da parte dell'ospite:** I postbiotici derivati dai microbi possono anche essere assorbiti dall'ospite, con un impatto sulla salute dell'ospite al di fuori del tratto GI.

La composizione del microbioma nel tratto gastrointestinale non è uniforme, in quanto sono state identificate comunità qualitativamente e quantitativamente distinte in ogni nicchia ecologica e anatomica (Alarcón et al., 2017; Proctor e Relman, 2017; Gorkiewicz e Moschen, 2018; Yadav et al., 2018). La ricerca

negli animali domestici e negli esseri umani riconosce ora microbiomi distinti nella cavità orale (Dewhirst et al., 2012, 2015; Davis, 2016), nell'esofago (Corning et al., 2018) e nello stomaco (Bik et al., 2006; Gorkiewicz e Moschen, 2018). Anche all'interno di una singola regione anatomica, i dati raccolti nell'uomo e nel cane suggeriscono che possono esistere sottopopolazioni distinte che variano in base al terreno e alla topografia della regione, nonché ai gradienti di pH, ossigeno e nutrienti (Suchodolski et al., 2008; Segata et al., 2012; Włodarska et al., 2015; Hoffmann et al., 2016; Honneffer et al., 2017; Proctor e Relman, 2017; Gorkiewicz e Moschen, 2018). Inoltre, la biogeografia dei batteri all'interno dell'intestino è modellata da diversi fattori, tra cui la dieta, gli antimicrobici, il muco e il sistema immunitario dell'ospite (Donaldson et al., 2016).

La comunità di microbi nel tratto gastrointestinale è diversa a seconda del microambiente e le funzioni fisiologiche di ciascun segmento intestinale (Pilla e Suchodolski, 2020) e questo è stato dimostrato sia nel cane che nell'uomo. Ad esempio, due studi condotti su cani domestici sani hanno rilevato delle differenze significative tra il microbioma dell'intestino tenue e quello dell'intestino crasso, tra cui una maggiore presenza di *Proteobacteria* nel duodeno rispetto al colon o al retto e un aumento di *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* nell'intestino crasso rispetto all'intestino tenue (Suchodolski et al., 2008; Honneffer et al., 2017). Uno di questi studi ha anche caratterizzato il metaboloma, trovando maggiori concentrazioni di aminoacidi e piruvato nell'intestino tenue e maggiori concentrazioni di composti di acido carbossilico contenenti fenoli nell'intestino crasso (Honneffer et al., 2017). In generale il microbioma più grande, più complesso e meglio studiato del tratto gastrointestinale si trova nel colon. Rispetto al microbioma dell'intestino crasso, quello dell'intestino tenue sembra essere più sensibile ai cambiamenti della dieta; nell'uomo si trovano spesso delle specie che fermentano i carboidrati, dei generi *Streptococcus* e *Veillonella* (El Aidy et al., 2015). L'intestino tenue è popolato per lo più da aerobi e anaerobi facoltativi, mentre le popolazioni primarie nel cieco e nel colon discendente sono

rispettivamente anaerobi facoltativi e anaerobi obbligati, che corrispondono al gradiente di ossigeno decrescente lungo il tratto GI (Yadav et al., 2018; Pilla e Suchodolski, 2020). È stato proposto che il microbiota dell'intestino tenue sia orientato all'utilizzo di carboidrati semplici derivati dalla dieta (El Aidy et al., 2015). Poiché è difficile ottenere campioni di microbiota dal tratto gastrointestinale, gli studi utilizzano in genere campioni fecali. Si ipotizza che i campioni fecali canini forniscano una migliore rappresentazione dei taxa batterici rilevanti per la salute rispetto ai campioni umani, il che può essere dovuto al fatto che i cani hanno un tratto gastrointestinale più corto e un tempo di transito più rapido, ed hanno un minor numero di taxa associati alla mucosa rispetto agli esseri umani (Vázquez-Baeza et al., 2016; Pilla e Suchodolski, 2020). È stato inoltre dimostrato che i phyla batterici predominanti del microbioma intestinale dei cani sani – *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Fusobacteria* – sono simili a quelli dell'uomo (Swanson et al., 2011). Tuttavia, altre analisi hanno rilevato che, nonostante alcuni cambiamenti simili nei taxa batterici, il microbioma intestinale dei cani con IBD è ampiamente distinto da quello degli esseri umani con IBD (Vázquez-Baeza et al., 2016).

A differenza degli esseri umani, cani e gatti non dipendono dal microbiota per ottenere energia (Deng e Swanson, 2015). I gatti domestici richiedono alimenti ad alto contenuto proteico per soddisfare le loro esigenze nutrizionali e utilizzano quantità minori di glucosio (Deng e Swanson, 2015). I cani hanno molte delle stesse caratteristiche anatomiche e metaboliche dei gatti, ma sono in genere più onnivori e possono digerire, assorbire e metabolizzare quantità molto più elevate di carboidrati alimentari (Deng e Swanson, 2015).

In generale, la composizione del microbiota intestinale è simile tra cani e gatti (Hoffmann et al., 2016). *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* sono i phyla microbici dominanti nell'intestino di cani e gatti (Deng e Swanson, 2015; Hoffmann et al., 2016); tuttavia, diversi studi hanno rilevato delle differenze tra le due specie (Handl et al., 2011; Jha et al., 2020). Uno studio recente, che ha confrontato i micro-

biomi intestinali di 46 gatti e 192 cani sulla base di campioni fecali, ha dato risultati relativamente coerenti con quelli sopra citati, ma ha anche rivelato che i gatti presentano una diversità alfa più elevata rispetto ai cani. Rispetto ai gatti, i phyla batterici più elevati nei cani erano *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Megamonas* e *SMB53*, mentre più phyla erano più presenti nei gatti, tra cui *Adlercreutzia*, *Alistipes*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Collinella*, *Coprococcus*, *Desulfovibrio*, *Faecalibacterium*, *Oscillospira*, *Parabacteroides*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Slackia* e *Sutterella* (Jha et al., 2020). Un microbioma gastrointestinale più diversificato nei gatti rispetto ai cani è stato osservato anche in un'analisi precedente, basata su un numero più elevato di unità tassonomiche operative (113 nei gatti contro 85 nei cani); tuttavia, questo stesso studio ha anche rivelato minori differenze interindividuali nell'abbondanza della maggior parte dei batteri nei gatti e un numero maggiore di gatti con gli stessi generi batterici (Handl et al., 2011). Le differenze tra cani e gatti erano evidenti anche nel microbioma fungino: nei cani predominava *Nakaseomyces*, mentre nei gatti erano più abbondanti *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Queste differenze possono essere dovute all'adattamento del microbioma a diete diverse (ad esempio, la maggiore diversità interindividuale tra i cani può essere il prodotto di una dieta onnivora più varia rispetto a quella carnivora dei gatti) (Handl et al., 2011).

Le proporzioni dei phyla possono variare anche tra i singoli animali della stessa specie a causa di fattori quali la razza, la dieta, l'età, l'ambiente di vita e i diversi metodi di analisi tra gli studi (Deng e Swanson, 2015; Jha et al., 2020; Pilla e Suchodolski, 2020). Tuttavia, la maggior parte degli studi ha confrontato solo piccoli numeri di animali e sono necessari degli studi di coorte più ampi per confermare la presenza di effetti ambientali e stimarne le dimensioni.

È inoltre dimostrato che i membri del microbioma di altre porzioni del tratto GI sono importanti riserve per le comunità presenti nell'intestino. Ad esempio, è stato riscontrato che dei membri del microbioma orale colonizzano le porzioni inferiori

del tratto gastrointestinale, dove sono stati associati a delle malattie (Lira-Junior e Bostrom, 2018).

Dato il potenziale impatto del microbioma gastrointestinale sulla salute degli animali domestici, sia direttamente che attraverso il suo impatto sulla risposta alla nutrizione (Suez e Elinav, 2017), nonché la crescente consapevolezza del potenziale diagnostico e terapeutico degli interventi mirati al microbioma gastrointestinale, gli obiettivi di questa revisione sono: (1) discutere i parametri utilizzati per valutare il microbioma di cani e gatti; (2) descrivere l'impatto degli interventi nutrizionali sul microbioma di cani e gatti; (3) considerare le prove attuali del ruolo della nutrizione nella salute di cani e gatti, attraverso i cambiamenti del microbioma gastrointestinale; e (4) analizzare gli studi sulla funzione del microbioma e degli effetti postbiotici sulla salute di cani e gatti.

3.2 METRICHE PER VALUTARE IL MICROBIOMA DI CANI E GATTI

Per valutare la ricerca sul microbioma è importante considerare innanzitutto come viene valutato lo stato del microbioma. In letteratura sono state utilizzate diverse metriche per analizzare il microbioma, alcune delle quali misurano le caratteristiche compositive del microbioma, ma anche quelle funzionali (Backhed et al., 2012). La maggior parte degli studi pubblicati sul microbioma di cani e gatti, per descrivere il microbioma o valutare la relazione tra il microbioma e la salute dell'ospite, usa misure della composizione microbica piuttosto che della funzione. Le misure della composizione del microbioma possono includere l'abbondanza relativa di vari taxa microbici, nonché delle valutazioni della disbiosi, che è stata proposta per descrivere "una composizione alterata del microbiota commensale che è dannosa per l'ospite" (Staley et al., 2018). Inoltre, sono state utilizzate anche misure della diversità alfa o beta, che riflettono la ricchezza e/o l'uniformità della distribuzione dei gruppi batterici all'interno e tra le comunità batteriche (Staley et al., 2018). Anche se diffuse, le misurazioni della composizione microbica

presentano dei limiti, tra cui un grado di variazione più elevato tra gli individui che nel tempo all'interno di un individuo (Schloissnig et al., 2013; Franzosa et al., 2015; Lloyd-Price et al., 2017); questo alto grado di variazione interindividuale complica l'identificazione di composizioni del microbioma che possano caratterizzare in modo affidabile la salute o la malattia e contribuisce a una riproducibilità limitata tra le popolazioni (Schloss, 2018). Infatti, è stato dimostrato che i fattori che variano tra gli individui (e all'interno degli stessi), come la dieta, l'ambiente, l'uso di farmaci, lo stadio di sviluppo, la genetica e lo stato di salute, influenzano in qualche misura la composizione del microbioma (Goodrich et al., 2016; Doestzada et al., 2018; Makki et al., 2018; Yadav et al., 2018), e anche all'interno di individui sani è stato dimostrato che la composizione del microbioma varia ampiamente e continuamente nel tempo (Knights et al., 2014).

La salute del microbioma può essere definita in modo più significativo dal suo funzionamento, piuttosto che dalla sua tassonomia o composizione. La ridondanza funzionale è stata identificata in più taxa di comunità batteriche umane specifiche del sito, e questo suggerisce che la conservazione della capacità funzionale è più importante della composizione della comunità (Lloyd-Price et al., 2017). Le misurazioni della funzione microbica hanno diverse limitazioni, come il costo più elevato e l'analisi più complessa, eppure l'uso di queste metriche per caratterizzare il microbioma è in aumento. Un esempio è la capacità metabolica prevista, che utilizza la composizione genica imputata dei batteri nel campione o i profili dei metaboliti (Langille et al., 2013). Inoltre, un microbioma funzionante produce metaboliti batterici definiti "postbiotici" che possono influenzare direttamente la funzione dell'ospite (Tsilingiri et al., 2012; Ojeda et al., 2016). I postbiotici sono prodotti metabolici dei batteri; in un contesto nutrizionale, i postbiotici sono generati quando il cibo non digerito dall'animale domestico passa al colon per diventare disponibile al microbioma. I postbiotici comprendono non solo i metaboliti dei carboidrati, dei grassi e delle proteine bypassati, ma anche i derivati microbici di altri composti, come i compo-

sti vegetali secondari; questi metaboliti possono avere un effetto benefico o dannoso sull'ospite, a seconda della natura del composto (Tabella 1). Sebbene il microbioma intestinale abbia chiaramente il potenziale di influenzare la salute dell'ospite, sono ancora necessarie delle evidenze che i cambiamenti specifici nella struttura del microbioma siano collegati con i cambiamenti nella funzione dell'ospite (McBurney et al., 2019). Inoltre, sono necessari dei biomarcatori convalidati o altri indicatori surrogati della funzione dell'ospite e dei processi patogeni basati sul microbioma (McBurney et al., 2019).

Predominant Type	Postbiotic	Nutrient substrate (macronutrient class; substrate)	Target organ system	Mechanism of action	References
Saccharolytic; fermentative	SCFA; acetate	Carbohydrate; indigestible polysaccharides	Neuroendocrine; systemic energy availability	Increase satiety; substrate for hepatic lipogenesis	Macfarlane and Macfarlane, 2012; Canfora et al., 2015; Kasubuchi et al., 2016; Koh et al., 2016
Saccharolytic; fermentative	SCFA; propionate	Carbohydrate; indigestible polysaccharides	Neuroendocrine; systemic energy availability	Increase satiety; substrate for hepatic gluconeogenesis	Macfarlane and Macfarlane, 2012; De Vadder et al., 2014; Canfora et al., 2015; Kasubuchi et al., 2015; Koh et al., 2016
Saccharolytic; fermentative	SCFA; butyrate	Carbohydrate; indigestible polysaccharides	Colon	Energy substrate for colonocytes; epigenetic modulation; colon electrolyte balance, motility, blood flow	Wächtershäuser and Stein, 2000; Leonel and Alvarez-Leite, 2012; Macfarlane and Macfarlane, 2012; Canfora et al., 2015; Bullman, 2017
Proteolytic; putrefactive	Indole; indole-3-propionate	Protein; tryptophan	Colon, neuroendocrine	Bind to the arylhydrocarbon receptor; increase epithelial-cell tight-junction resistance and gut barrier integrity; decrease markers of inflammation; improve host-microbiome immune homeostasis; modulate GLP-1 secretion	Macfarlane and Macfarlane, 2012; Agus et al., 2018; Gilbert et al., 2018; Kim, 2018; Zhao et al., 2018
Proteolytic; putrefactive	Polyamines (spermidine, spermine, putrescine, and cadaverine)	Protein; arginine, lysine	Colon	Delay intestinal epithelial senescence; maintenance of intestinal barrier function through promotion of occludin and cadherin expression	Timmons et al., 2012; Kibe et al., 2014; Michael, 2016
Proteolytic; putrefactive	bSCFA; isobutyrate (2-methylpropionate)	Protein; valine	Colon	Source of energy for colonocytes; refeed starved colonocytes with greater efficiency and rapidly than butyrate	Jaskiewicz et al., 1996; Smith and Macfarlane, 1997; Koh et al., 2016
Proteolytic; putrefactive	Hydrogen sulfide	Protein; cyst(e)ine, methionine, taurine	Colon	Inhibition of mitochondrial metalloproteins; reduction in SCFA butyrate oxidation; associated with ulcerative colitis	Pun et al., 2010; De Preter et al., 2012; Macfarlane and Macfarlane, 2012; Stein and Bailey, 2013; Singh and Lin, 2015; Hiddon et al., 2016
Proteolytic; putrefactive	Uremic toxins (Indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate, 4-ethylphenyl sulfate, phenylacetylglutamine)	Protein; tryptophan, phenylalanine, tyrosine	Kidney	Proinflammation, exacerbate decline in kidney function	Lau et al., 2018
Lipolytic	10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid	Fat; Inoleic acid	Oral, Dermis	Increased gingival epithelial barrier integrity; decreased dermal atopy	Kakiri et al., 2017; Yamada et al., 2018

Tabella 1. Esempi di postbiotici che possono avere un impatto sulla salute degli animali domestici.

3.3 IMPATTO DEGLI INTERVENTI NUTRIZIONALI SUL MICROBIOMA DI CANI E GATTI

3.3.1 IL MICROBIOMA ALIMENTARE DEI GATTI E DEI CANI: DIFFERENZE FISILOGICHE ED EVOLUZIONE NUTRIZIONALE

Come già detto, la composizione del microbioma intestinale è generalmente simile tra cani e gatti, con alcune differenze. Esiste una relazione complessa tra il microbioma intestinale e l'ospite, che è certamente influenzata dall'anatomia e dalla fisiologia uniche dei gatti rispetto ai cani. Tuttavia, le prove su come le differenze digestive e fisiologiche tra cani e gatti possano influenzare il microbioma sono limitate. Ciononostante, sono emerse delle opportunità interessanti per studiare come il cibo influenza la salute di ciascuna specie attraverso la produzione di postbiotici microbici. Ad esempio, quando venivano somministrati dei cibi di simile appetibilità, ma con diverso contenuto di macronutrienti, e si è consentito agli animali di scegliere liberamente gli alimenti e di conseguenza i macronutrienti, i postbiotici microbici generati dai gatti al livello proteico scelto erano diversi da quelli generati dai cani (Hall et al., 2018). Questo ha portato a postbiotici significativamente diversi tra le specie; ad esempio, nessuno dei metaboliti microbici plasmatici circolanti è cambiato nei cani dopo il periodo di alimentazione a scelta libera di 28 giorni, mentre 16 delle 38 concentrazioni di metaboliti sono cambiate nei gatti (Hall et al., 2018). Queste differenze tra cani e gatti, sia nell'assunzione dei macronutrienti preferiti sia nella risposta metabolica del microbioma ai macronutrienti selezionati, presentano sfide e vantaggi unici per l'ottimizzazione dell'alimentazione di cani e gatti.

Un esempio dei legami tra microbioma, nutrizione e fisiologia digestiva è la produzione di equolo, un metabolita derivato dagli isoflavoni prodotto attraverso il metabolismo microbico della daidzeina. È noto che la produzione di equolo è potenziata da una dieta ad alto contenuto di carboidrati (Vázquez et al., 2020). Nell'articolo sull'alimentazione a scelta libera descritto in

precedenza, i livelli circolanti di daidzeina solfato erano elevati nei gatti, mentre i livelli di equolo solfato non erano diversi tra cani e gatti (Hall et al., 2018). Gli autori ipotizzano che la dieta mista scelta dai gatti (con rapporti di macronutrienti più alti sia in proteine che in carboidrati rispetto a quelli scelti dai cani) avrebbe probabilmente comportato un aumento dell'assunzione di daidzeina e un'aspettativa di aumento della produzione di equolo da parte del microbioma del gatto. Tuttavia, i livelli di equolo circolante erano simili nei gatti e nei cani, un dato che gli autori hanno interpretato come prova del fatto che il microbioma dei gatti non ha una capacità di produzione di equolo simile a quella dei cani (Hall et al., 2018). I legami tra microbioma, nutrizione e fisiologia digestiva sono stati evidenziati in questo studio non solo per i probiotici antinfiammatori come l'equolo, ma anche per i composti pro-infiammatori come il 4-etilfenil solfato, che era più alto nei cani rispetto ai gatti al basale, e il p-cresolo solfato, che era più alto nei gatti rispetto ai cani al basale (Hall et al., 2018).

3.3.2 INTERVENTI NUTRIZIONALI E MICROBIOMA

Il grado di digeribilità di un alimento determina la misura in cui i diversi nutrienti vengono digeriti e assorbiti dall'ospite. I nutrienti che sfuggono alla digestione e all'assorbimento da parte dell'ospite arrivano al colon e sono quindi disponibili per il metabolismo microbico. L'alta digeribilità di proteine e grassi è importante quando si sceglie il cibo per cani e gatti, per garantire che l'animale sia adeguatamente nutrito. Invece i componenti degli alimenti "bypassati" che vengono digeriti in modo incompleto nel tratto gastrointestinale superiore fungono da fonti di nutrimento per il microbioma gastrointestinale, svolgendo un ruolo significativo nella definizione della sua composizione e delle sue funzioni. Insieme, l'ospite e i microbi gastrointestinali residenti ospitano enzimi digestivi complementari grazie ai quali il cibo ingerito viene scomposto attraverso la saccarolisi, la proteolisi e la lipolisi, nutrendo non solo l'animale domestico ma

anche il microbioma (Figura 1). È stato dimostrato che i cambiamenti del microbioma si verificano rapidamente in risposta agli interventi dietetici (David et al., 2014; Mori et al., 2019). Ad esempio, le variazioni nella quantità di carboidrati, proteine e grassi somministrati a cani e gatti possono avere un impatto significativo sul loro microbiota intestinale (Mori et al., 2019). Ciò è stato dimostrato da un recente studio che ha valutato sul microbioma fecale di sei cani sani l'effetto di quattro diete comuni (Mori et al., 2019). Ogni cane è stato alimentato per 21 giorni con una delle seguenti diete: (1) dieta per la perdita di peso (alte proteine, bassi grassi, bassi carboidrati, alte fibre); (2) dieta a basso contenuto di grassi (bassi grassi, medie proteine, alti carboidrati, basse fibre); (3) dieta renale (basse proteine, alti grassi, alti carboidrati, basse fibre); e (4) dieta allergenica (medie proteine idrolizzate, alti grassi, medi carboidrati, basse fibre). Questo studio ha rivelato diverse differenze significative nel microbioma dei cani alimentati con la dieta dimagrante rispetto a quelli alimentati con la dieta allergenica, tra cui proporzioni significativamente ridotte di *Actinobacteria* e *Firmicutes* e proporzioni significativamente aumentate di *Fusobacteria* (Mori et al., 2019). Tuttavia, non tutti gli interventi nutrizionali determinano una modifica della composizione del microbioma (Bresciani et al., 2018; Pilla et al., 2019). Nelle sezioni seguenti riassumiamo le evidenze per gli interventi nutrizionali comuni con il potenziale di influenzare il microbioma di cani e gatti, tra cui probiotici, prebiotici, carboidrati semplici e complessi, proteine e grassi.

3.3.2.1 Probiotici

Un approccio comunemente usato per migliorare il microbioma intestinale, e quindi la salute, è l'uso di probiotici. I probiotici sono stati definiti come microrganismi vivi che, se consumati in quantità adeguate come parte di un alimento, possono conferire un beneficio alla salute dell'ospite (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura/Organizzazione Mondiale della Sanità, 2002). Molti dei probiotici studiati per la salu-

te degli animali domestici appartengono ai generi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ed *Enterococcus* (Weese e Martin, 2011; Schmitz e Suchodolski, 2016; Jugan et al., 2017; Sanders et al., 2019). I probiotici possono alterare il microbioma attraverso diversi meccanismi, tra cui la stimolazione della crescita dei batteri residenti attraverso interazioni metaboliche, l'alterazione dell'abbondanza dei batteri patogeni o indirettamente attraverso interazioni con l'epitelio e il sistema immunitario epiteliale dell'ospite (Derrien e van Hylckama Vlieg, 2015), ma il successo della colonizzazione del microbioma residente da parte del probiotico non è universale e dipende dalle caratteristiche sia del microbioma residente che dell'ospite (Derrien e van Hylckama Vlieg, 2015; Zmora et al., 2018), compreso il regime alimentare dell'ospite (Derrien e van Hylckama Vlieg, 2015). Alcuni hanno suggerito che le specie batteriche utilizzate in un probiotico dovrebbero idealmente provenire dall'intestino della specie ospite (Grzeskowiak et al., 2015; Suez e Elinav, 2017); tuttavia, ciò non è vero per la maggior parte dei probiotici attualmente commercializzati per cani e gatti (Grzeskowiak et al., 2015) e non esistono studi che confrontino l'efficacia di probiotici derivati da cani o gatti con altri ceppi derivati da altre specie e commercializzati. Una revisione dei probiotici veterinari disponibili in commercio ha rivelato problemi di qualità, tra cui etichette imprecise e scarsa vitalità (Weese e Martin, 2011); altri hanno sollevato preoccupazioni sulla sicurezza, anche se sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere la frequenza e la gravità degli esiti avversi per l'uso di probiotici in cani e gatti (Doron e Snyderman, 2015).

3.3.2.2 Prebiotici

Storicamente il prebiotico è “un ingrediente alimentare non digeribile che altera beneficamente l'ospite stimolando selettivamente la crescita e/o l'attività di uno o di un numero limitato di batteri nel colon, migliorando così la salute dell'ospite” (Gibson e Roberfroid, 1995). Tuttavia, è ormai assodato che qualsiasi sostanza che il microbioma intestinale fermenta, compresi i nu-

trienti bypass che raggiungono il microbioma come carboidrati, proteine, aminoacidi, grassi e polifenoli, può fungere da prebiotico (Gibson et al., 2010). Pertanto, i prebiotici sono ora definiti come “ingredienti selettivamente fermentati che consentono cambiamenti specifici, sia nella composizione e/o nell’attività della microflora gastrointestinale, che migliorano il benessere e la salute dell’ospite” (Gibson et al., 2004, 2010).

3.3.2.3 Carboidrati complessi

I carboidrati complessi sono quelli che includono tre o più zuccheri (cioè oligosaccaridi e polisaccaridi). Sebbene non tutti i carboidrati complessi forniscano fibre, quelli comunemente utilizzati nell’industria degli alimenti per animali domestici includono fonti tradizionali di fibre per cani e gatti, come la polpa di barbabietola, che contiene una miscela di fibre insolubili e solubili e la cellulosa, che è una fibra non fermentabile, insolubile e non viscosa (De Godoy et al., 2013). Altre fonti di fibre utilizzate o valutate negli alimenti per animali domestici sono le fibre di mais, frutta, riso, avena e orzo; queste fibre sono fonti di amidi resistenti e fibre solubili che possono servire come substrati per il microbioma gastrointestinale (De Godoy et al., 2013).

Sebbene siano stati suggeriti diversi sistemi di classificazione delle fibre alimentari (Institute of Medicine, 2001; Tungland e Meyer, 2002), le caratteristiche di solubilità e fermentabilità sono state proposte come le classificazioni più appropriate (Tungland e Meyer, 2002; Dhingra et al., 2012). Sebbene molti ingredienti contengano più tipi di fibre, la Figura 2 evidenzia la gamma di solubilità e fermentabilità che generalmente caratterizza le comuni fonti di fibre utilizzate nell’industria del pet food (Iktor et al., 1989; Naran et al., 2008; Aura et al., 2013; McRorie, 2013; Azad et al., 2014; Chung et al., 2017; Gupta et al., 2018). Le proprietà fisiche e chimiche della fibra, tra cui le dimensioni delle particelle e il volume di massa, le caratteristiche dell’area superficiale e le proprietà di idratazione determinano quanto la fibra può essere oggetto di degradazione microbica, nonché gli effetti fisiologici

della fibra (Dhingra et al., 2012) e quindi il destino metabolico della fibra nel tratto digestivo (Dhingra et al., 2012). La capacità di specifici microbi saccarolitici di convertire la fibra in prodotti finali della fermentazione dipende sia dai legami chimici presenti nella fibra alimentare sia dalle capacità metaboliche di un determinato microbo (Rogowski et al., 2015).

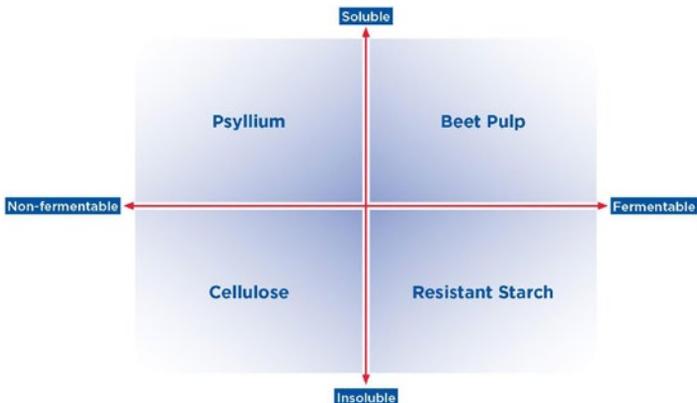


Figura 2. Spettro di solubilità e fermentabilità dei carboidrati complessi e delle fibre. Le fonti di fibre comuni utilizzate nell'industria degli alimenti per animali domestici, come quelle mostrate qui, variano nel loro grado di solubilità e fermentabilità (quadranti superiori: più solubile; quadranti inferiori: meno solubile; quadranti di sinistra: meno fermentabile; quadranti di destra: più fermentabile). Sono mostrati esempi di fibre che generalmente rappresentano ciascuna combinazione di solubilità e fermentabilità (Psyllium: cuticole di psillio; beet pulp: polpa di barbabietola; cellulose: cellulosa; resistant starch: amido resistente).

L'impatto di diversi tipi di carboidrati complessi sulla composizione del microbioma è stato valutato in cani e gatti sani. Ad esempio, nei cani sono stati condotti studi su amidi resistenti, ovvero amidi non digeriti o assorbiti nell'intestino tenue di un animale sano (Yang et al., 2017). Questi studi hanno dimostrato che aumentando le concentrazioni di fibra di patata, che è composta da amido resistente e digeribile, è aumentata la percentuale di *Faecalibacterium* nel microbioma (Panasevich et al., 2015). È stato dimostrato che l'alimentazione con fruttoligosaccaridi (FOS) aumenta le popolazioni potenzialmente benefiche

di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e riduce quelle potenzialmente dannose di *C. perfringens* in uno studio condotto sui cani (Swanson et al., 2002); un secondo studio ha suggerito che i FOS hanno interagito con le proteine della dieta, determinando una diminuzione del *Bifidobacterium* fecale misurato in caso di alimentazione a basso contenuto proteico e un aumento del *Bifidobacterium* fecale misurato in un caso di alimentazione ad alto contenuto proteico (Pinna et al., 2018). Altri studi condotti su cani alimentati con diete integrate con fibra di barbabietola hanno mostrato che quelli alimentati con concentrazioni più elevate di polpa di barbabietola presentavano cambiamenti significativi nella composizione microbica intestinale, contrassegnati in uno studio da una diminuzione dei *Fusobacteria* e da un aumento dei *Firmicutes* (Middelbos et al., 2010) e in un altro da un aumento di *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium coccoides* cluster e *Clostridium leptum* cluster (Kröger et al., 2017), anche se un terzo studio non ha mostrato differenze significative (Maria et al., 2017). Infine, uno studio che ha valutato un mix di fonti di carboidrati (contenente concentrazioni dello 0,07% di pectina di mela, inulina, arabinosilano-oligosaccaridi, amido resistente di tipo III, galattomannano e β -glucano) ha dimostrato che i substrati complessi di carboidrati non digeribili e le miscele di substrati possono avere un impatto significativo sulla composizione e sulla diversità del microbiota intestinale (Chung et al., 2019).

Li et al. (2017) hanno utilizzato la capacità metabolica prevista del microbioma per dimostrare che gli alimenti ricchi di carboidrati sembrano favorire la crescita di batteri arricchiti nelle vie associate alla digestione dell'amido e all'assorbimento dei nutrienti. In questo studio, i cani alimentati con una dieta a basso contenuto proteico/alto contenuto di carboidrati presentavano una sovrabbondanza di vie associate alla digestione/assorbimento dei carboidrati e all'assorbimento dei minerali; ciò potrebbe indicare che queste vie sono arricchite di batteri intestinali che hanno la capacità di fermentare e utilizzare i carboidrati alimentari, il che può aumentare la biodisponibilità dei minerali e promuovere l'assorbimento colonico (Li et al), Inoltre, Jackson

e Jewell hanno osservato i prodotti postbiotici della popolazione microbica in risposta a una miscela di fibre solubili e insolubili aggiunte a due diversi alimenti di base (ricchi di cereali e carne idrolizzata) e hanno notato una produzione postbiotica ampiamente simile, indipendentemente dall'alimento di base (Jackson e Jewell, 2018). Per entrambi gli alimenti, l'inclusione di fibre ha migliorato la qualità delle feci, abbassato il pH delle feci, aumentato i microbi intestinali benefici e modificato i metaboliti microbici, generando un ipotetico miglioramento della salute del colon. Tuttavia l'aggiunta di fibre all'alimento a base di carne idrolizzata ha aumentato i livelli di SCFA (acetato, propionato e butirrato) tipicamente associati alla saccarolisi, mentre l'aggiunta di fibre all'alimento ricco di cereali ha diminuito gli SCFA ramificati (bSCFA; 2-metilpropionato, 2-metilbutirrato e 3-metilbutirrato). Questo studio suggerisce che le fibre causano effetti diversi, che dipendono dalla struttura microbica di base dell'ospite e dalla sua capacità funzionale.

Numerosi studi hanno esaminato l'impatto di altre fonti di fibre sulla composizione del microbioma di cani sani. Uno studio recente ha valutato gli effetti di diete integrate con una miscela di fibre e prebiotici (con e senza saccarina ed eugenolo) somministrate a otto cani adulti femmina per un periodo di 14 giorni (Nogueira et al., 2019). L'aggiunta di fibre e prebiotici non ha influenzato la ricchezza e la diversità del microbiota fecale rispetto a una dieta di controllo. Tuttavia, sono stati osservati dei cambiamenti benefici nei prodotti finali fermentativi fecali che possono mantenere la salute dell'intestino, tra cui un aumento delle concentrazioni di SCFA fecali e una diminuzione delle concentrazioni di fenoli, indoli, bSCFA (isobutirrato e isovalerato) e ammoniaca. Inoltre, la digeribilità totale della fibra alimentare è risultata significativamente maggiore nei cani alimentati con una dieta contenente la miscela fibra-prebiotico con saccarina ed eugenolo (Nogueira et al., 2019). Allo stesso modo è stato dimostrato che il polidestrosio, una fibra insolubile con proprietà prebiotiche, altera in modo benefico il pH fecale e i prodotti finali fermentativi di cani adulti sani, mentre ha un effetto mi-

nimo sulla composizione del microbiota fecale (Beloshapka et al., 2012).

Sebbene la maggior parte dei prebiotici provenga da fibre vegetali, gli esoscheletri chitinosi degli artropodi rappresentano una potenziale nuova fonte di fibre per i cani (Jarett et al., 2019). In uno studio recente, 32 beagle maschi e femmine di età compresa tra 1 e 8 anni sono stati alimentati con una delle quattro diete in cui lo 0, l'8, il 16 o il 24% del contenuto proteico era sostituito da farina di grilli interi. Analogamente agli studi precedenti, questa analisi ha determinato che la quantità di grilli migliorava la diversità e la composizione del microbioma intestinale dei cani, rispetto a una dieta sana standard senza grilli (Jarett et al., 2019). Un'altra fonte di fibra innovativa, la polvere di fagioli marini cotti, non ha avuto alcun impatto significativo sulla composizione del microbioma di cani sani alimentati con una dieta contenente lo 0% o il 25% di fagioli marini per 4 settimane (Kerr et al., 2013).

Un numero molto inferiore di studi ha valutato gli effetti delle fonti di fibre sulla composizione microbica dei gatti sani. Uno studio ha rilevato che il microbioma felino era principalmente invariato in quattro gatti alimentati con tre diete diverse integrate con cellulosa, frutto-oligosaccaridi (FOS) o pectina (Barry et al., 2012). Un'altra analisi ha studiato gli effetti di una dieta integrata con prebiotici sulla digeribilità dei nutrienti, sulle concentrazioni di metaboliti fermentativi e sul microbioma gastrointestinale di otto gatti adulti sani (Kanakupt et al., 2011). Questi gatti sono stati alimentati con diete prive di prebiotici (controllo), con lo 0,5% di FOS a catena corta, con lo 0,5% di galatto-oligosaccaridi (GOS) o con lo 0,5% di FOS a catena corta più lo 0,5% di GOS. Questo studio ha rilevato che le diete integrate con FOS a catena corta, GOS e FOS a catena corta + GOS hanno aumentato significativamente le concentrazioni di *Bifidobacterium* spp. ($P < 0,05$) rispetto alla dieta di controllo (Kanakupt et al., 2011). Inoltre, i gatti alimentati con la dieta integrata con FOS a catena corta più GOS presentavano maggiori concentrazioni fecali di acetato, butirrato, valerato, SCFA

e bSCFA, nonché un pH fecale più basso ($P < 0,05$); non vi era alcuna differenza nei metaboliti proteici fecali tra le quattro diete. Questo studio ha concluso che piccole quantità di questi prebiotici avevano effetti benefici su vari parametri della salute dell'apparato digerente (Kanakupt et al., 2011). Infine, uno studio condotto su cani e gatti sani ha rilevato che un prodotto disponibile in commercio contenente prebiotici (FOS e inulina) non aveva modificato in modo significativo l'abbondanza della maggior parte dei batteri fecali quando veniva somministrato per 16 giorni, anche se la risposta alla somministrazione di prebiotici variava ampiamente tra i singoli cani e gatti (Garcia-Mazcorro et al., 2017).

Le sezioni successive di questo articolo esamineranno l'impatto di una serie di interventi nutrizionali, tra cui fibre, probiotici e sinbiotici, in vari stati patologici di cani e gatti.

3.3.2.4 Carboidrati semplici

Sebbene gli effetti dei carboidrati complessi sul microbioma siano stati ben studiati, anche i carboidrati semplici, come i monosaccaridi e i disaccaridi, possono modificarne la composizione. I carboidrati semplici possono essere presenti nella dieta o generati come prodotto della digestione dei polisaccaridi nell'intestino tenue superiore. Nei ratti, l'esposizione precoce allo zucchero (con rapporti variabili di glucosio e fruttosio) ha ridotto *Prevotella* e *Lachnospiraceae incertae sedis*, ma ha aumentato *Bacteroides*, *Alistipes*, *Lactobacillus*, *Clostridium sensu stricto*, *Bifidobacteriaceae* e *Parasutterella* (Noble et al., 2017). Alcuni di questi aumenti, indipendenti dal rapporto di monosaccaridi, dall'apporto calorico, dal peso corporeo o dall'indice di adiposità, sono stati precedentemente associati a processi di salute e/o malattia, come i disturbi metabolici e cognitivi. Tuttavia, le implicazioni di questi cambiamenti sui disturbi associati al consumo elevato di zuccheri richiedono ulteriori studi nei cani e nei gatti.

3.3.2.5 Proteine

Tradizionalmente, la qualità delle proteine è data dalla loro composizione aminoacidica, dalla digeribilità e dalla biodisponibilità della fonte proteica. La maggior parte degli alimenti per animali domestici utilizza fonti proteiche animali, in quanto contengono in genere più varietà di aminoacidi, però vengono utilizzate anche fonti proteiche vegetali. Indipendentemente dalla fonte, le proteine alimentari devono essere sottoposte a proteolisi, ovvero all'idrolisi delle proteine intatte in singoli aminoacidi, per essere assorbite dall'animale. In molti casi, l'idrolisi delle proteine avviene durante la digestione dell'ospite, anche se alcuni alimenti specializzati utilizzano ingredienti proteici idrolizzati per ridurre il potenziale di risposta allergica e facilitare la digestione. Le diverse fonti proteiche variano non solo nella composizione aminoacidica, ma anche nei micro e macronutrienti, che influenzano il microbioma gastrointestinale (Madsen et al., 2017). I concetti di qualità delle proteine (completezza del profilo aminoacidico e digeribilità), quantità (quantità di proteine per porzione) e quoziente (rapporto tra proteine e altri nutrienti contenenti energia, come i carboidrati) sono fattori importanti sia per il metabolismo dell'ospite che per quello microbico, poiché i nutrienti non digeriti e assorbiti dall'ospite diventano disponibili per il metabolismo da parte del microbioma nel tratto GI inferiore.

Illustrando i concetti di qualità e quoziente, esistono prove che suggeriscono che la fonte di proteine (qualità) e il rapporto tra proteine e carboidrati (quoziente) possono influenzare la composizione del microbioma gastrointestinale (Jackson e Jewell, 2018). Tra i cani sani, il consumo di un alimento con una fonte proteica di carne idrolizzata e senza cereali integrali ha determinato un aumento della diversità e dell'uniformità a livello di genere rispetto al consumo di un alimento ricco di cereali con proteine intatte, sebbene la ricchezza di taxa non differisse (Jackson e Jewell, 2018). Inoltre, l'aggiunta di fibre all'alimento a base di carne idrolizzata ha determinato un maggior numero di cambiamenti significativi nelle unità tassonomiche operative rispetto

all'aggiunta di fibre all'alimento ricco di cereali. Poiché gli autori hanno valutato sia le fonti proteiche intatte sia quelle idrolizzate, i cambiamenti osservati nel microbioma non possono essere attribuiti in modo definitivo alla fonte proteica; probabilmente anche il rapporto tra proteine e carboidrati negli alimenti contribuisce. Altri autori hanno studiato direttamente l'effetto degli alimenti proteici idrolizzati. È stato riscontrato che la somministrazione di un alimento a base di proteine idrolizzate non ha avuto alcun impatto sulla composizione del microbioma né dei cani sani né di quelli affetti da enteropatia cronica sensibile al cibo (Pilla et al., 2019). Altri gruppi hanno valutato l'impatto sul microbioma di alimenti che utilizzano fonti proteiche vegetali e hanno riscontrato che la somministrazione di un alimento privo di proteine animali non ha avuto alcun impatto sul microbioma di cani sani, mentre i cani affetti da enteropatia responsiva agli alimenti presentavano un aumento della ricchezza del microbiota dopo il consumo dell'alimento (Bresciani et al., 2018).

Le diete a base di carne cruda (RMBD) sono diete ad alto contenuto proteico che illustrano i concetti di quantità e quoziente proteico. Tali diete includono ingredienti non cotti derivati da animali (Freeman et al., 2013), come il muscolo scheletrico, il grasso, gli organi interni, la cartilagine e le ossa di animali da allevamento (ruminanti, suini e pollame), cavalli, selvaggina o pesce, così come il latte non pastorizzato e le uova non cotte (Freeman et al., 2013; Fredriksson-Ahomaa et al., 2017); queste diete hanno in genere profili macronutrienti diversi, caratterizzati da un contenuto di proteine e grassi più elevato rispetto agli alimenti per animali domestici prodotti in commercio. Le diete RMBD non sono generalmente raccomandate dalla maggior parte delle principali organizzazioni veterinarie e di salute pubblica per il rischio di contaminazione da patogeni (American Animal Hospital Association, 2011; American Veterinary Medical Association, 2012; Centers for Disease Control and Prevention, 2017; Food and Drug Administration, 2018), eppure sono sempre più popolari. Numerosi studi hanno dimostrato che gli animali alimentati con RMBD hanno una composizione del microbioma gastroin-

testinale e nel metabolismo diversi rispetto a quelli alimentati con cibi estrusi e lavorati a caldo (Kerr et al., 2012, 2014; Herstad et al., 2017; Kim et al., 2017; Sandri et al., 2017; Algya et al., 2018; Schmidt et al., 2018; Butowski et al., 2019). Ad esempio, i cani alimentati con una RMBD hanno mostrato una maggiore diversità e abbondanza di microbi nell'intestino rispetto a quelli alimentati con cibi commerciali; tuttavia, come hanno sottolineato gli autori, i cani alimentati con una RMBD potrebbero avere un rischio maggiore di infezioni opportunistiche rispetto a quelli alimentati con cibi commerciali (Kim et al., 2017). Un altro studio non ha riportato differenze significative nelle misure di diversità alfa tra cani alimentati con RMBD e alimenti commerciali, ma ha riscontrato una differenza significativa nella diversità beta tra i gruppi; ciò potrebbe essere dovuto in parte alle diverse composizioni di macronutrienti dei due tipi di alimenti, con un contenuto di proteine e grassi significativamente più elevato e un contenuto di carboidrati e fibre inferiore in RMBD rispetto agli alimenti commerciali (Schmidt et al., 2018). Infine, uno studio ha confrontato il microbioma di gatti alimentati con RMBD rispetto a una dieta simile con aggiunta di fibre e a crocchette disponibili in commercio (Butowski et al., 2019) e ha rilevato che 31 taxa batterici erano influenzati dalla dieta. *Prevotella* era abbondante nei microbiomi dei gatti alimentati con la dieta a base di crocchette, *Clostridium* e *Fusobacterium* erano abbondanti in RMBD, e *Prevotella* insieme a un gruppo di *Peptostreptococcaceae* non classificate erano abbondanti in RMB con aggiunta di fibre. Sulla base delle prove finora disponibili, la ricerca su RMBD non mostra chiari benefici sul microbioma intestinale e può aumentare il rischio di esposizione ai patogeni.

L'ingestione di quantità moderate di proteine altamente digeribili bilancia i concetti di quantità, qualità e quoziente, ottimizzando l'utilizzo delle proteine da parte dell'animale, mentre l'ingestione di grandi quantità di proteine scarsamente digeribili aumenta l'esposizione delle proteine alimentari alle popolazioni batteriche del colon, dove subiscono la putrefazione. La putrefazione è il processo di decomposizione microbica degli ami-

noacidi in prodotti postbiotici, alcuni dei quali sono implicati nell'inizio e nella progressione di alcune malattie infiammatorie, come l'atopia (Nylund et al., 2015), l'insufficienza renale cronica (Niwa et al., 1997) e l'enterite cronica (Nikolaus et al., 2017; Tabella 1). In breve, sono sia la quantità totale di proteine ingerite (quantità), sia il rapporto tra proteine e altri ingredienti contenenti energia come i carboidrati (quoziente), sia la digeribilità e la composizione aminoacidica delle proteine (qualità) nella dieta a determinare la quantità e la composizione aminoacidica del cibo che bypassa lo stomaco e la conseguente disponibilità di rifiuti azotati (ad esempio, ammoniaca e urea) sottoposti al metabolismo microbico.

3.3.2.6 Grasso

Sul ruolo che la quantità di grassi svolge nell'influenzare il microbioma si sa molto meno rispetto alle proteine e ai carboidrati. La maggior parte delle informazioni disponibili descrive l'impatto di un'alimentazione ricca di grassi sul microbiota dell'uomo o del topo (Shen et al., 2014; Martinez et al., 2017). Questi report mostrano un chiaro legame tra le diete ad alto contenuto di grassi (45-60% dell'apporto calorico giornaliero) e un rapido e drammatico cambiamento del microbiota entro 2-3 giorni dall'inizio del consumo della dieta ad alto contenuto di grassi. Inoltre, negli individui obesi si riscontra una diminuzione degli SCFA postbiotici benefici e un aumento dell'idrogeno solforato (H₂S) dannoso (Martinez et al., 2017), anche se nel contesto della sindrome metabolica è difficile isolare l'effetto specifico dell'assunzione di grassi. Pertanto, la natura pro-infiammatoria dei grassi alimentari può influenzare la composizione del microbioma, forse attraverso l'omeostasi ospite-microbioma immuno-mediata. Sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere meglio i meccanismi alla base di questi effetti.

Gli acidi grassi sono prebiotici sottovalutati, che potrebbero influenzare la salute e la fisiologia attraverso i loro effetti sul microbioma gastrointestinale. Alcune ricerche emergenti han-

no indicato un ruolo del metabolismo microbico intestinale dell'acido linoleico nella produzione di metaboliti postbiotici con effetti favorevoli alla salute. Ad esempio, è stato dimostrato che un metabolita batterico dell'acido linoleico previene la compromissione della barriera epiteliale causata dai batteri parodontopatici (Yamada et al., 2018). La ricerca futura sulla somministrazione mirata di lipidi al colon determinerà se questa è una strategia di successo per influenzare la produzione di postbiotici a base di acidi grassi che possano migliorare la salute degli animali.

3.4 EVIDENZE ATTUALI: IL RUOLO DELL'ALIMENTAZIONE NELLA SALUTE DI CANI E GATTI ATTRAVERSO LE MODIFICHE DEL LORO MICROBIOMA

Il microbioma gastrointestinale influenza direttamente o indirettamente una serie di funzioni fisiologiche e immunologiche, tra cui l'omeostasi energetica e il metabolismo, la segnalazione endocrina, l'inibizione della colonizzazione enteropatogena e la regolazione della funzione immunitaria (Nicholson et al., 2012; Wilson e Nicholson, 2015). Di conseguenza, le alterazioni della composizione del microbioma gastrointestinale possono portare a conseguenze dannose per la salute, tra cui enteropatie infiammatorie (ad esempio, malattie infiammatorie intestinali), allergie, costipazione, malattie orali (ad esempio, malattie parodontali), obesità, diabete e malattie renali (Nicholson et al., 2012). L'alimentazione ha il potenziale di influenzare la patologia direttamente, attraverso l'apporto di sostanze come macro e micronutrienti, ma anche indirettamente, modificando il microbioma, mentre quest'ultimo influenza a sua volta la risposta all'alimentazione (Suez e Elinav, 2017). In questa sede esaminiamo le evidenze attuali del ruolo dell'alimentazione nella salute di cani e gatti attraverso le modifiche del microbioma gastrointestinale.

3.4.1 ENTEROPATIE INFIAMMATORIE

Poiché il microbioma gastrointestinale influenza l'habitat ambientale del tratto gastrointestinale e viceversa, l'incidenza e la progressione delle enteropatie gastrointestinali croniche associate al microbioma, in particolare la malattia infiammatoria intestinale (IBD [*Inflammatory Bowel Disease*]), sono state oggetto di notevoli ricerche. La maggior parte delle ricerche finora condotte sul microbioma di cani e gatti con enteropatie gastrointestinali riguarda i cani, mentre gli studi sui gatti sono relativamente meno numerosi. È stato dimostrato che i cani affetti da enteropatia cronica (CE) presentano concentrazioni inferiori e modelli alterati di SCFA, nonché cambiamenti nel microbiota fecale rispetto ai cani sani (Minamoto et al., 2019). Per quanto riguarda i gatti, è stato dimostrato che il microbiota gastrointestinale nei soggetti con IBD è alterato rispetto ai gatti sani (Garraway et al., 2018). Uno studio ha anche rilevato che *Fusobacterium* spp. è elevato nell'ileo e nel colon di biopsie di gatti con linfoma gastrointestinale a piccole cellule rispetto a quelli con IBD; tuttavia, non è ancora chiaro se questo cambiamento abbia un ruolo nello sviluppo del linfoma gastrointestinale (Garraway et al., 2018). Mentre diverse recensioni precedenti hanno discusso a lungo questo argomento (Heilmann e Allenspach, 2017; Redfern et al., 2017; Roth-Walter et al., 2017; Yogeshpriya et al., 2017; Barko et al., 2018), pochi autori hanno valutato direttamente l'impatto della nutrizione con macronutrienti (nutrizione fornita da carboidrati, proteine e grassi), della digestione e della lavorazione degli alimenti sul microbioma dell'animale domestico e i suoi esiti di salute nelle IBD. La disbiosi, più comune negli animali con IBD rispetto a quelli senza malattia, è caratterizzata da una diminuzione della diversità del microbioma in generale e da una riduzione delle specie che producono SCFA in particolare. Uno studio ha esaminato campioni di microbiota della mucosa ileale e colonica di cani affetti da IBD e ha riscontrato un aumento dei batteri *Enterobacteriaceae* ed *E. coli* attaccati agli epitelii o che invadevano la mucosa intestinale in questi siti di campionamento (Cassmann et al., 2016). Questi

risultati sono coerenti con quelli di un altro studio recente che ha riscontrato un aumento di *E. coli* nella mucosa colonica di cani con CE, oltre a una diminuzione di *Helicobacter* spp. e *Akkermansia* spp. (Giaretta et al., 2020). È interessante notare che una recente revisione della letteratura ha rilevato che, rispetto all'uomo, *Akkermansia* spp. non è abbondante nel tratto gastrointestinale di cani e gatti; ciò suggerisce che questi batteri non hanno un ruolo significativo nella degradazione microbica del muco in questi animali (Garcia-Mazcorro et al., 2020).

Due studi endoscopici hanno esaminato l'impatto dell'intervento dietetico nei cani con diagnosi di IBD (Marchesi, 2017; Kalenyak et al., 2018). Da questi studi è emerso che un intervento con una dieta di eliminazione (cioè una dieta che elimina alimenti/ingredienti sospettati di causare effetti avversi) ha alterato il microbioma gastrointestinale che risiede nello strato mucoso del duodeno e del colon (Kalenyak et al., 2018), mentre le sole modifiche alimentari sono state efficaci nel ridurre i segni di IBD in quasi tutti i cani con malattia lieve (Marchesi, 2017). Sia le nuove proteine che le proteine idrolizzate sono risultate efficaci (Marchesi, 2017; Kalenyak et al., 2018), ma le proteine idrolizzate sono risultate leggermente più efficaci nel ridurre i segni dell'IBD (Marchesi, 2017). Inoltre, lo studio Effect of Nutritional Therapy on Microbiome in Canine Enteropathy (ENTiCE) ha analizzato gli effetti di una dieta a base di proteine idrolizzate (Wang et al., 2019) sul microbioma e sulla salute di 29 cani con CE. I cani studiati sono passati dalla loro dieta attuale a una dieta terapeutica a base di proteine idrolizzate, disponibile in commercio. Dopo 2 settimane di dieta terapeutica, il 69% dei cani ha registrato una rapida remissione della CE, che si è mantenuta per tutte le 6 settimane dello studio. Inoltre, la remissione della CE è stata associata a un miglioramento della struttura del microbiota e a un aumento dei livelli di acidi biliari secondari (Wang et al., 2019).

Un altro studio condotto su cani con IBD alimentati con una dieta di eliminazione ha dimostrato che il microbiota dei cani i cui segni e sintomi dell'IBD si sono risolti differisce da

quello dei cani che non hanno registrato miglioramenti. I cani che hanno risposto alla dieta avevano una predominanza di *Bifidophila* e *Burkholderia* e un arricchimento in *Bacteroides*, mentre quelli che non sono migliorati avevano una maggiore abbondanza di *Neisseriaceae* (Kalenyak et al., 2018). Non è stato dimostrato che *Burkholderiales* sia associato a enteropatie croniche nei cani e *Bacteroides* può essere protettivo o virulento (Kalenyak et al., 2018). Uno studio condotto su cani con CE legata al cibo ha riscontrato un piccolo aumento della ricchezza batterica, come indicato dalla diversità delle specie (diversità alfa), in risposta alla somministrazione di un alimento a base di proteine idrolizzate abbinato a un simbiotico, sebbene non sia stato osservato alcun cambiamento nella composizione microbica (diversità beta) (Pilla et al., 2019).

Diversi studi hanno valutato l'impatto del trattamento probiotico nei cani con diagnosi di IBD. I risultati di queste analisi suggeriscono che i trattamenti probiotici con multicereali hanno facilitato la remissione clinica nei cani con diagnosi di IBD e sono stati associati a diversi altri benefici, tra cui effetti antinfiammatori e antiproliferativi, aumento dell'espressione delle proteine della giunzione stretta e sovraregolazione dei livelli di poliammine (Rossi et al., 2014, 2018; White et al., 2017). Per quanto riguarda la composizione del microbioma, i cani con IBD trattati con probiotici hanno mostrato un aumento significativo di *Faecalibacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. rispetto a quelli che ricevevano trattamenti standard, tuttavia questi risultati non erano coerenti tra gli studi (Rossi et al., 2014; White et al., 2017). Oltre agli effetti benefici nelle IBD, diversi studi in doppio cieco e controllati con placebo hanno dimostrato che la somministrazione di probiotici può anche ridurre la diarrea nei cani e nei gatti (Bybee et al., 2011; Gómez-Gallego et al., 2016).

Sono necessari ulteriori studi ben progettati e controllati per valutare le relazioni tra alimentazione e microbioma nella gestione delle IBD nei cani e nei gatti.

3.4.2 ALLERGIA

Le allergie alimentari che si manifestano con sintomi gastrointestinali negli animali sono spesso scambiate per IBD e viceversa, a causa della sovrapposizione dei sintomi, in particolare la diarrea. Sebbene siano stati condotti pochi studi sugli animali domestici e sull'uomo, è stato riscontrato che nell'uomo adulto le allergie alle arachidi e alle noci sono associate a una maggiore presenza di *Bacteroides* e a una minore presenza di *Clostridiales*, *Prevotella* e *Ruminococcaceae* (Hua et al., 2016). Sebbene le allergie alle noci possano essere meno rilevanti per cani e gatti, questa relazione suggerisce che le alterazioni del microbioma possono essere associate alle malattie allergiche.

Poiché le allergie sono essenzialmente disturbi immunitari e il microbioma gastrointestinale ha dimostrato di avere proprietà sia pro- che anti-infiammatorie a seconda degli organismi colonizzatori, puntare sul microbioma gastrointestinale può rappresentare un approccio logico per il trattamento delle allergie sistemiche (Pascal et al., 2018) e questo è stato oggetto di diversi studi sugli animali (Thorburn et al., 2015; Aoki-Yoshida et al., 2016; Kim et al., 2016; Kumar et al., 2017). Nei cani, è stato riscontrato che l'aggiunta di probiotici determina un aumento delle concentrazioni fecali di acetato e butirrato e una riduzione dell'ammoniaca, oltre a migliorare le risposte immunitarie mediate dalle cellule rendendole una sfida antigenica (Kumar et al., 2017; Pilla et al., 2019). Tuttavia, gli effetti immunomodulanti dei probiotici non sono stati dimostrati in modo coerente in tutti gli studi condotti su cani con CE o diarrea sensibile al cibo (Sauter et al., 2006; Schmitz et al., 2015).

Un modello convalidato di dermatite atopica canina ha rilevato che l'esposizione precoce a probiotici (*Lactobacillus rhamnosus*) ha ridotto significativamente le IgE allergene-specifiche e ha parzialmente prevenuto la dermatite atopica nei primi 6 mesi di vita (Marsella, 2009). Un follow-up di questo studio ha dimostrato che questi effetti persistevano per 3 anni dopo la sospensione del probiotico (Marsella et al., 2012). Uno studio di controllo

randomizzato su cani con dermatite atopica confermata ha dimostrato che la somministrazione di un probiotico (*Lactobacillus sakei*) per 2 mesi ha ridotto significativamente la gravità della malattia atopica in tutti i cani che lo hanno ricevuto (Kim et al., 2015a). Va notato che la maggior parte delle ricerche che valutano l'uso dei probiotici nel trattamento delle allergie sistemiche è stata condotta sull'uomo (Osborn e Sinn, 2007a, b; Bresciani et al., 2018; Pilla et al., 2019).

3.4.3 COSTIPAZIONE

La prevalenza della stipsi nei cani e nei gatti non è ben descritta e la frequenza della defecazione è difficile da quantificare per i proprietari di animali domestici (Davenport et al., 2010). Tuttavia, la stipsi può essere un problema clinico relativamente comune negli animali domestici, soprattutto nei gatti (Chandler, 2013).

Non è ancora stato identificato un chiaro legame tra la stipsi e la composizione del microbioma gastrointestinale o l'abbondanza di specifici gruppi batterici (Mancabelli et al., 2017; Rossi et al., 2017), e i meccanismi precisi con cui il microbiota intestinale può influire sulle funzioni sensoriali e motorie del tratto gastrointestinale non sono chiari (Zhao e Yu, 2016). Tuttavia ci sono delle prove dell'esistenza di un legame, anche se principalmente tratte da studi sull'uomo (Tigchelaar et al., 2016; Vandeputte et al., 2016). Gli studi sugli animali sono più limitati. In uno studio su 20 gatti, non sono state osservate differenze significative nel numero limitato di taxa batterici analizzati mediante PCR tra gatti con e senza stipsi (Rossi et al., 2017).

La relazione meccanicistica tra il microbioma gastrointestinale e la stipsi è ancora meno studiata e l'impatto di specifici taxa batterici sulla motilità gastrointestinale è tutt'altro che definito. Uno studio *in vitro* ha suggerito che la diminuzione dell'abbondanza di *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Desulfovibrio* e *Methyobacterium* possa influenzare la motilità gastrointestinale attraverso un'influenza sul recettore della serotonina, contribuendo allo sviluppo della stipsi cronica (Cao et al., 2017). Anche la produzione di

SCFA da parte dei batteri intestinali, come acetato e butirrato, è stata suggerita come mezzo per alterare la disponibilità di serotonina, influenzando quindi la motilità e la secrezione intestinale (Spohn e Mawe, 2017). Inoltre, è stato dimostrato che alcuni ceppi batterici gastrointestinali producono serotonina dal triptofano (O'Mahony et al., 2015). Questo apre una nuova via di trattamento non solo per la stitichezza, ma anche per altre condizioni influenzate dai livelli di serotonina. Tuttavia, evidenzia anche il potenziale di eventi avversi involontari derivanti da terapie non correlate, come gli inibitori della ricaptazione della serotonina per i disturbi psichiatrici, che possono inavvertitamente influenzare i livelli di serotonina a livello gastrointestinale.

Sono state passate in rassegna anche delle terapie dietetiche per la stipsi (Zhao e Yu, 2016), che si concentrano principalmente su fibre e probiotici. È stato dimostrato che le fibre modulano il microbiota intestinale dei gatti (Pinna et al., 2014), anche se negli studi sulla somministrazione di fibre per la stipsi felina non sono state effettuate delle analisi del microbioma (Freiche et al., 2011). Uno studio di intervento nei gatti con stipsi ha valutato un probiotico (SLAB51) contenente diversi ceppi, tra cui: *Streptococcus thermophilus* DSM32245; *Lactobacillus acidophilus* DSM32241; *Lactobacillus plantarum* DSM32244; *Lactobacillus casei* DSM32243; *Lactobacillus helveticus* DSM32242; *Lactobacillus brevis* DSM27961; *Bifidobacterium lactis* DSM32246 e *B. lactis* DSM32247 (Rossi et al., 2017). Sono state osservate diminuzioni significative di un indice di attività CE, oltre a miglioramenti nei punteggi fecali e nell'istologia della mucosa. Dopo il trattamento, si è registrato un aumento significativo delle popolazioni di *Streptococcus* e *Lactobacillus* e una tendenza all'aumento di *Bifidobacterium* e *Bacteroidetes* (Rossi et al., 2017). L'impatto funzionale dei suddetti cambiamenti nei taxa batterici di questi gatti non è stato definito.

Sebbene vi siano dati limitati nei cani e nei gatti, diverse review hanno riassunto gli studi sull'impatto benefico dei probiotici sulla stipsi nell'uomo (Chmielewska e Szajewska, 2010; Miller e Ouwehand, 2013; Dimidi et al., 2014; Ford et al., 2014;

Korterink et al., 2014). Uno studio più recente ha valutato anche il meccanismo d'azione dei probiotici sulla motilità intestinale (Dimidi et al., 2017); un secondo studio ha valutato l'effetto dei probiotici sui movimenti intestinali spontanei in pazienti stitici (Kim et al., 2015b). Nel complesso, questi studi supportano l'uso di probiotici per la stipsi, riducendo il tempo di transito gastrointestinale, aumentando la frequenza delle feci, migliorandone la consistenza e migliorando i sintomi gastrointestinali (Miller e Ouwehand, 2013; Dimidi et al., 2014; Ford et al., 2014; Kim et al., 2015b). Tuttavia, non tutti gli studi hanno dimostrato l'efficacia dei probiotici nel trattamento della stipsi (Chmielewska e Szajewska, 2010; Korterink et al., 2014). Una revisione sistematica ha concluso che non ci sono prove sufficienti a sostegno dell'uso dei probiotici nella stipsi funzionale (nota anche come stipsi cronica idiopatica) (Chmielewska e Szajewska, 2010) e una meta-analisi ha rilevato che mentre i probiotici possono migliorare il dolore addominale nei bambini con disturbi gastrointestinali funzionali, non si sono dimostrati efficaci nella stipsi infantile (Korterink et al., 2014). I meccanismi di questi effetti potrebbero coinvolgere le interazioni tra l'ambiente luminale intestinale, il sistema immunitario, il sistema nervoso enterico e il sistema nervoso centrale: sono tutti altamente correlati e influenzano la motilità intestinale (Dimidi et al., 2017). Sono necessarie ulteriori ricerche per valutare l'impatto degli interventi nutrizionali sul microbioma di cani e gatti affetti da stipsi.

3.4.4 SALUTE ORALE

Le malattie dentali, che colpiscono il 76% dei cani e il 68% dei gatti, sono le più comuni negli animali domestici (Banfield Animal Hospital, 2016). Le ricerche indicano che 6 phyla batterici dominano costantemente il microbioma orale di cani e gatti clinicamente sani: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Spirochetes* (Davis, 2016). È stato valutato il microbioma orale di cani e gatti con e senza malattia parodontale documentata (Isaiah et al., 2017; Whyte et al., 2017).

Nel complesso, questi studi suggeriscono che la malattia dentale è associata a una sostituzione dei taxa associati alla salute con ceppi più patogeni.

Ad esempio, nei gatti senza malattia parodontale, gli studi hanno dimostrato che i phyla più comuni campionati sono stati costantemente *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* (Sturgeon et al., 2014; Dewhirst et al., 2015; Harris et al., 2015; Adler et al., 2016; Older et al., 2019), mentre nei soggetti affetti da parodontite e/o gengivite è stato riportato un elevato grado di variazione dei batteri patogeni, con scarsa somiglianza tra gli studi (Perez-Salcedo et al., 2013; Harris et al., 2015; Whyte et al., 2017).

D'altra parte, negli studi presi in esame, nei cani senza malattia parodontale i phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* rappresentano i phyla principali (Dewhirst et al., 2012; Davis et al., 2013; Sturgeon et al., 2013; Holcombe et al., 2014; Oh et al., 2015; McDonald et al., 2016; Isaiah et al., 2017), sebbene anche gli *Actinobacteria* siano stati riportati come predominanti in alcuni studi (Davis et al., 2013; Oh et al., 2015). Gli studi su cani affetti da malattia parodontale hanno trovato una composizione del microbioma variabile, a seconda dello stadio della malattia. In uno studio su cani con parodontite e/o gengivite lieve, *Lachnospiraceae*, erano altamente prevalenti *Clostridiales*, *Peptostreptococcaceae*, *Peptococcus* e *Corynebacterium canis* spp. (Davis et al., 2013). Un altro studio ha identificato *Streptococcus sanguis*, *Peptostreptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Proteus Mirabilis*, *Veillonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces* spp. e *Actinomyces viscosus* in cani con stadi avanzati di parodontopatia (Polkowska et al., 2014). È stato dimostrato che la malattia parodontale è associata a malattie sistemiche nei cani (Pereira Dos Santos et al., 2019).

Una distinzione primaria tra le diete commerciali per cani e gatti è se il cibo è secco o umido. Le diete secche sono spesso somministrate per promuovere la salute orale a causa della natura abrasiva delle crocchette secche. Sebbene sia stato dimostrato che questi alimenti riducono la placca e la gengivite, il loro impatto sul microbioma non è stato valutato (Logan et al., 2002). Uno stu-

dio condotto su gatti di comunità alimentati esclusivamente con una dieta a base di alimenti secchi (razioni disidratate altamente raffinate a base di cereali) o umidi (combinazioni di scatolette, bustine e/o carne fresca) ha dimostrato differenze nel microbioma orale nel corso del tempo, ma non si è determinato se queste differenze influissero sul rischio di malattia parodontale perché lo studio non valutava questo aspetto (Adler et al., 2016). In ogni caso i gatti alimentati con la dieta secca presentavano un microbioma orale più diversificato e un arricchimento di batteri associati sia alla salute orale che alla malattia parodontale (maggiori abbondanze di *Porphyromonas* spp. e *Treponema* spp.).

3.4.5 OBESITÀ E GESTIONE DEL PESO

L'obesità negli animali domestici è un problema importante. Secondo un recente rapporto dell'Associazione per la prevenzione dell'obesità negli animali domestici, il 60% dei gatti e il 56% dei cani negli Stati Uniti sono classificati come sovrappeso o obesi (Association for Pet Obesity Prevention, 2019). L'obesità è anche associata a una serie di altri problemi, come il diabete mellito (DM), l'osteoartrite, le malattie cardiovascolari, i disturbi della pelle e la riduzione della durata della vita (German, 2006; Tarkosova et al., 2016; Phillips et al., 2017). Diversi fattori possono predisporre un animale all'obesità, tra cui il microbioma gastrointestinale, la genetica, la castrazione, la diminuzione dei livelli di attività e le diete ad alto contenuto di grassi ed energia (Zeng et al., 2014; Hamper et al., 2016; Davison et al., 2017).

Diversi rapporti hanno rilevato che la composizione del microbioma gastrointestinale differisce tra cani e gatti obesi e magri (Kieler et al., 2016; Forster et al., 2018). In particolare, i batteri appartenenti al phylum *Actinobacteria* e al genere *Roseburia* sono risultati significativamente più abbondanti nei cani obesi rispetto ai cani magri (Handl et al., 2013; Forster et al., 2018). Nei gatti, i gruppi *Clostridium* cluster XIVa, *Bacteroidetes* e *Fusobacteria* erano meno abbondanti nei gatti obesi e in sovrappeso rispetto ai gatti magri, ma l'abbondanza di batteri appartenenti ai gruppi

Enterobacteriaceae e *Clostridium* cluster IV era maggiore nei gatti obesi e in sovrappeso (Kielar et al., 2016). Inoltre, diversi studi hanno rilevato che diete diverse (ad esempio, ad alto contenuto proteico, con un alto rapporto proteine/carboidrati) hanno effetti diversi sul microbioma gastrointestinale negli animali obesi rispetto a quelli magri (Li et al., 2017; Xu et al., 2017; Coelho et al., 2018). Ad esempio, uno studio ha dimostrato che il microbioma dei cani in sovrappeso era più sensibile all'intervento dietetico rispetto a quello dei cani magri (Coelho et al., 2018). In risposta all'alimentazione ad alto contenuto di proteine/basso contenuto di carboidrati per 4 settimane, i cani in sovrappeso hanno registrato un cambiamento significativamente maggiore nella composizione microbica rispetto al basale rispetto ai cani magri/normali, il che è stato guidato da una maggiore variazione nell'abbondanza di *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Streptococcus* e *Turicibacter* (Coelho et al., 2018).

Il microbioma gastrointestinale è stato coinvolto nello sviluppo dell'obesità attraverso i suoi effetti diretti sull'intestino e le sue influenze indirette sugli organi distali (Leong et al., 2017). È stato dimostrato che il microbiota intestinale influenza il metabolismo degli acidi biliari; gli acidi biliari liberi derivanti dal metabolismo batterico possono inibire la crescita di popolazioni batteriche, come i *Lactobacilli* e i *Bifidobatteri*, che si ritiene siano protettive contro l'obesità (Kurdi et al., 2006). Inoltre, diversi batteri (ad esempio, *Clostridium scindens*, *Clostridium hylemonae* e *Clostridium hiranonis*) presenti nell'intestino contengono dei geni implicati nel metabolismo degli acidi biliari (Doden et al., 2018). Poiché si ritiene che gli acidi biliari contribuiscano alla secrezione di ormoni intestinali e al metabolismo del glucosio e dei lipidi, gli effetti del microbioma gastrointestinale sugli acidi biliari possono influenzare anche questi processi (Leong et al., 2017). La barriera della mucosa intestinale è influenzata dal microbioma gastrointestinale, che può portare a un aumento dell'infiammazione, un fattore che contribuisce notoriamente all'aumento di peso (Leong et al., 2017). È stato dimostrato che le alterazioni del microbioma gastrointestinale inibiscono la lipoproteina lipa-

si, il che porta a un eccesso di depositi di trigliceridi nel tessuto adiposo, nel fegato, nel pancreas e nel cuore (Leong et al., 2017).

È stata proposta una “prospettiva unica per la salute” per affrontare il problema dell’obesità sia negli esseri umani che negli animali domestici, a causa delle interdipendenze tra dieta, attività fisica, genetica, metabolismo e microbioma gastrointestinale legate all’aumento di peso (Chandler et al., 2017). Per ridurre il peso sono state proposte numerose modifiche alla dieta, ben documentate in letteratura, tra cui l’eliminazione di alimenti ad alta densità energetica, l’alterazione della composizione dei macronutrienti della dieta (ad esempio, diete ad alto contenuto proteico, ad alto contenuto di grassi e/o ad alto contenuto di fibre) e l’aggiunta di diacilgliceroli alimentari e probiotici (Astrup et al., 2015; Kathrani et al., 2016; Alexander et al., 2017; Vadiveloo et al., 2017). Tuttavia, le attuali linee guida per la gestione del peso di cani e gatti non tengono conto del microbioma gastrointestinale (Brooks et al., 2014). Infatti, è stato riscontrato che circa la metà dei cani e dei gatti obesi riprende peso dopo un programma di dimagrimento, a meno che non continuino a essere alimentati con diete appositamente formulate per la gestione del peso piuttosto che con diete di mantenimento (German et al., 2012; Deagle et al., 2014), il che suggerisce che per il mantenimento della perdita di peso potrebbe essere necessaria la somministrazione continua di diete specificamente formulate.

Alcuni studi hanno analizzato i cambiamenti del microbioma associati alla perdita di peso (Kieler et al., 2017; Salas-Mani et al., 2018). Uno studio ha analizzato 18 cani obesi alimentati con una dieta commerciale restrittiva ad alto contenuto di proteine/alta percentuale di fibre. Otto dei 18 cani erano anche iscritti a un programma di esercizio fisico (Kieler et al., 2017). In entrambi i gruppi è stata riscontrata una perdita di peso comparabile, senza differenze nel microbioma tra i soggetti con esercizio fisico aggiunto e quelli gestiti con la sola dieta. In entrambi i gruppi, l’abbondanza di *Megamonas* è risultata correlata negativamente alla perdita di peso, mentre la riduzione delle popolazioni di *Ruminococcaceae* è stata associata a una perdita di peso più rapida

($\geq 1\%$ a settimana). Inoltre, le concentrazioni di acido acetico e propionico sono diminuite nei cani con una perdita di peso più rapida (Kielar et al., 2017). Poiché *Megamonas* e *Ruminococcaceae* producono questi acidi, questi risultati suggeriscono che un microbioma gastrointestinale che produce questi SCFA può influire negativamente sulla perdita di peso nei cani (Kielar et al., 2017). Un piccolo studio simile ha dimostrato che una dieta ristretta a basso contenuto di grassi/alto contenuto di fibre per 17 settimane ha aumentato significativamente la diversità del microbioma gastrointestinale in 6 beagle obesi (Salas-Mani et al., 2018). Al termine dello studio, i beagle alimentati con questa dieta presentavano anche un aumento di *Allobaculum* e una diminuzione di *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Dorea*. Tuttavia, uno studio che ha valutato l'impatto di una dieta a moderato contenuto proteico/ad alto contenuto di fibre sul peso corporeo e sul microbiota fecale di gatti obesi (Pallotto et al., 2018) ha fornito risultati incoerenti con quelli sopra riportati. Otto gatti domestici maschi adulti sono stati alimentati con una dieta ristretta che mirava a far perdere loro circa l'1,5% del peso corporeo a settimana, per 18 settimane. Alla 18a settimana, il peso corporeo medio è diminuito quasi del 20% rispetto al basale. Sebbene la perdita di peso fosse associata a una maggiore proporzione di *Actinobacteria* e a una minore proporzione di *Bacteroidetes*, non c'era una significativa diversità del microbioma (Pallotto et al., 2018). Inoltre, uno studio simile ha rilevato che una dieta standard per la perdita di peso da 10 settimane ha avuto solo un piccolo impatto sul microbiota batterico fecale in 14 gatti obesi, rispetto a 17 gatti magri (Tal et al., 2019). Pertanto, sono necessari ulteriori studi per comprendere meglio la relazione tra perdita di peso e microbiota fecale nei gatti.

Il meccanismo con cui il microbioma gastrointestinale influisce sulle variazioni di peso non è noto. Tuttavia, è stato riportato che l'indolo modula la secrezione di glucagone-like peptide-1 (prima aumentandola e poi diminuendola nel tempo), il che stimola la secrezione di insulina (Chimerel et al., 2014; Tabella 1) e favorisce la perdita di peso ritardando lo svuotamento gastrico,

inducendo sazietà e limitando l'assunzione di cibo (Woods et al., 2004). Analogamente, è stato riscontrato che le proteine secrete da *E. coli* attivano direttamente le vie della sazietà dell'ospite, stimolando il rilascio di GLP-1; quando queste proteine sono state somministrate per via intraperitoneale ai ratti, questi ultimi hanno mostrato una riduzione dell'assunzione di cibo rispetto ai controlli (Breton et al., 2016).

È stato inoltre dimostrato che i prebiotici sono un potenziale intervento dietetico per promuovere la salute di cani e gatti in sovrappeso o obesi (Alexander et al., 2018). Sebbene molti studi abbiano valutato l'assunzione di fibre in relazione alla perdita di peso, solo pochi hanno fatto delle valutazioni sul microbioma. Uno studio recente ha analizzato gli effetti del prebiotico inulina-fruttani sul microbiota fecale, sui metaboliti e sugli acidi biliari nei cani in sovrappeso (Alexander et al., 2018). In questo studio, nove beagle in sovrappeso sono stati alimentati con la stessa dieta due volte al giorno e sono stati trattati per tre periodi di 14 giorni, separati da un periodo di pausa di 14 giorni, con uno dei seguenti elementi: (1) controllo non prebiotico (cellulosa); (2) prebiotico a basso dosaggio (0,5% della dieta); (3) prebiotico ad alto dosaggio (1% della dieta). Ogni cane ha ricevuto tutti e tre i trattamenti nel corso dello studio. L'area incrementale sotto la curva (IAUC) per il glucosio e l'insulina era più bassa nei cani alimentati con il prebiotico ad alto dosaggio, il che suggerisce un effetto benefico. Tuttavia, la IAUC per il glucosio, l'insulina e il GLP-1 non era statisticamente diversa tra i 3 trattamenti. Sebbene il trattamento prebiotico abbia avuto un impatto minimo sul microbiota e sui metaboliti fecali, si sono verificati alcuni cambiamenti benefici, tra cui una maggiore concentrazione di SCFA fecali. Inoltre, il trattamento prebiotico con inulina ha determinato un aumento dell'abbondanza relativa di alcuni membri del phylum *Firmicutes* e una diminuzione dell'abbondanza relativa di alcuni *Proteobacteria* (Alexander et al., 2018). Sono necessari ulteriori studi nei cani e nei gatti per capire i cambiamenti nel microbioma gastrointestinale e nel pool di acidi biliari (BA) osservati con i prebiotici.

3.4.6 DIABETE

Il diabete mellito (DM) sta aumentando la sua prevalenza nei cani e nei gatti (Banfield Animal Hospital, 2016). Tra il 2006 e il 2015, la prevalenza del DM è aumentata del 79,7% nei cani (da 13,1 a 23,6 per 10.000) e del 18,1% nei gatti (da 57,2 a 67,6 per 10.000) (Banfield Animal Hospital, 2016). Mentre i cani sono quasi esclusivamente affetti da DM di tipo 1, i gatti hanno maggiori probabilità di avere un DM di tipo 2. I progressi nella ricerca sul microbioma in vari modelli indicano che il microbioma gastrointestinale svolge un ruolo nelle malattie non intestinali come il diabete e l'obesità (Blake e Suchodolski, 2016). Un'alterata composizione del microbiota intestinale è stata associata allo sviluppo del DM di tipo 2 nei cani e nei gatti (Jergens et al., 2019; Kieler et al., 2019). Ad esempio, uno studio recente ha dimostrato che i cani con DM di tipo 1 che si manifesta naturalmente presentano disbiosi intestinale e concentrazioni alterate di BA fecali non collegate, con modelli simili a quelli degli esseri umani con DM di tipo 2 (Jergens et al., 2019). Inoltre, è stato dimostrato che i gatti con DM presentano una significativa riduzione della diversità microbica intestinale e una perdita di batteri produttori di butirrato, rispetto ai gatti sani della stessa età (Kieler et al., 2019).

Nell'uomo, è stato dimostrato che la mancanza di un'adeguata maturazione del sistema immunitario dipendente dal microbioma può esacerbare la predisposizione genetica al DM di tipo 1 (Knip e Honkanen, 2017). Se non si sviluppa durante la critica "finestra di opportunità" neonatale un sistema immunitario complementare ospite-microbioma e mutualistico, il microbioma disbiotico risultante predispone gli individui geneticamente suscettibili alla progressione clinica del DM di tipo 1 (Knip e Honkanen, 2017). L'importanza di un'alimentazione selettiva del microbioma (ad esempio, gli oligosaccaridi del latte) per facilitare lo sviluppo della competenza immunitaria è un campo di indagine in crescita (Walker e Iyengar, 2015). Numerose malattie autoimmuni possono essere correlate a un inadeguato sviluppo

del microbioma e della funzione immunitaria dell'ospite, in particolare per quanto riguarda le cellule T-regolatorie e una risposta immunitaria TH1/TH2 equilibrata. La dieta dei primi anni di vita può svolgere un ruolo importante nel fornire substrati prebiotici in grado di facilitare il mutualismo ospite-microbioma.

Non sorprende che i farmaci utilizzati per il trattamento del diabete abbiano dimostrato di influenzare il microbioma gastrointestinale. In uno studio, l'agente antidiabetico metformina ha modificato il microbioma gastrointestinale aumentando significativamente l'abbondanza del phylum *Bacteroidetes* (Lee e Ko, 2014). È stato dimostrato che anche l'efficacia di altri farmaci per il trattamento del diabete, come l'acarbose e la metformina, è mediata dal microbioma (Forslund et al., 2015; Gu et al., 2017). Gli interventi basati sul microbioma potrebbero aver bisogno di essere personalizzati per diventare efficaci contro le malattie legate al metabolismo, come il DM, per tenere conto delle variazioni interindividuali nella composizione e nella funzione del microbioma (Shapiro et al., 2017).

Le prove a sostegno dell'uso di probiotici nel DM suggeriscono che i probiotici possono agire per ridurre le risposte infiammatorie e lo stress ossidativo e aumentare l'espressione delle proteine di adesione all'interno dell'epitelio gastrointestinale per ridurre la permeabilità intestinale (Gomes et al., 2014). Si è ipotizzato che questi meccanismi possano determinare un aumento della sensibilità all'insulina e una riduzione delle risposte autoimmuni. Uno studio condotto su 256 donne ha rilevato che gli interventi probiotici all'inizio della gravidanza hanno ridotto il tasso di diabete gestazionale (Barrett et al., 2014). È stato inoltre dimostrato che un probiotico contenente *Bifidobacterium* migliora la tolleranza al glucosio in un modello di topo diabetico (Stenman et al., 2014). Sebbene non sia possibile valutarlo per cani e gatti, i pazienti con DM di tipo 2 e/o ipertensione che hanno seguito una dieta strettamente vegetariana basata su fonti vegetali ad alto contenuto di carboidrati e fibre hanno registrato riduzioni dell'emoglobina A1c e miglioramenti nel glucosio a digiuno e postprandiale. Questi effetti sono stati accompagnati

anche da una riduzione del rapporto *Bacteroidetes/Firmicutes* nel microbioma gastrointestinale (Kim et al., 2013).

Dato che il profilo dei macronutrienti influisce sulla composizione del microbioma gastrointestinale e gli associati del microbioma hanno un impatto sulla salute dell'ospite, è logico affrontare la gestione del DM nei cani e nei gatti attraverso l'alimentazione. Sebbene i dati siano attualmente limitati, sono in corso diversi studi per approfondire gli effetti dei prebiotici sulle malattie metaboliche. Nel complesso, è evidente la necessità di comprendere meglio come i diversi interventi nutrizionali possano influire sulla composizione e sulla funzione del microbioma gastrointestinale nel DM, in modo da poter sviluppare interventi nutrizionali più efficaci.

3.4.7 MALATTIA RENALE

La malattia renale cronica (CKD) è una delle malattie più comuni nei cani e nei gatti (Polzin, 2007), ma finora sono state pubblicate poche ricerche sul microbioma gastrointestinale e la malattia renale in queste specie. Tuttavia, uno studio recente ha dimostrato che i gatti con CKD presentano una minore ricchezza e diversità del microbioma fecale rispetto ai gatti sani (Summers et al., 2019), il che è coerente con studi precedenti sul microbioma intestinale negli esseri umani con CKD (Hida et al., 1996; Vaziri et al., 2013).

Attualmente si sta ricercando il rapporto di causa ed effetto tra disbiosi e malattia renale. Si ritiene che la composizione microbica di base influisca sulla suscettibilità degli individui alla malattia renale, con prove a sostegno di questo legame riscontrate nei cani e nei gatti. Ad esempio, è stato segnalato un aumento del rischio di malattia renale negli animali con grave malattia parodontale (Glickman et al., 2011; Finch et al., 2016). Sono stati associati alla disbiosi nei pazienti con malattie renali anche fattori come il lento tempo di transito gastrointestinale (Wu et al., 2004), l'alterata assimilazione delle proteine (Bammens et al., 2003) e il ridotto consumo di fibre alimentari (Krishnamurthy et al., 2012).

La nefrolitiasi, o calcoli renali, è una condizione comune nei gatti e nei cani che riduce la durata della vita dei gatti di circa 3 anni in media (Hall et al., 2017). La maggior parte dei calcoli renali e vescicali negli animali è composta da ossalato di calcio o fosfato di magnesio e ammonio (struvite) e lo sviluppo dei calcoli è un processo complesso, che coinvolge fattori genetici e ambientali (Mehta et al., 2016). I risultati degli studi condotti sugli animali e sull'uomo per valutare l'uso dei probiotici per ridurre i calcoli renali sono stati contrastanti (Mehta et al., 2016; Lieske, 2017; Sadaf et al., 2017). Alcuni studi condotti sull'uomo e sugli animali hanno dimostrato che *Oxalobacter* e *Lactobacillus* spp. prevengono la formazione di calcoli attraverso la degradazione dei sali di ossalato (Sadaf et al., 2017). Sono necessarie ulteriori ricerche sull'impatto del microbioma gastrointestinale sulla funzione renale e sulle malattie renali nei cani e nei gatti e sull'impatto dell'alimentazione.

3.5 NUOVE EVIDENZE: IL RUOLO DELLA FUNZIONE DEL MICROBIOMA E GLI EFFETTI POSTBIOTICI SULLA SALUTE DI CANI E GATTI

La maggior parte della letteratura preesistente, descritta in questo articolo, si è concentrata sulle associazioni tra i cambiamenti di composizione del microbioma gastrointestinale e gli effetti negativi sulla salute, compresa la presenza di malattie. Tuttavia, l'accumularsi di ricerche suggerisce che i futuri interventi nutrizionali che producono cambiamenti nella funzione del microbioma, evidenti dai metaboliti postbiotici, possono avere un impatto benefico significativo sulla salute. Gli approcci basati sulla funzione pongono le basi per terapie basate sul microbioma (Suez e Elinav, 2017), un concetto che vede molte interazioni tra l'ospite e il microbioma mediate da un'ampia varietà di metaboliti secreti, degradati o modificati dal microbioma, tra cui acidi grassi, aminoacidi, acidi biliari, vitamine e polisaccaridi (Suez e Elinav, 2017). Questi metaboliti creano una rete di segnalazio-

ne che ha un impatto sull'ospite, sul microbioma e sulle loro funzioni interdipendenti; le terapie basate su questi metaboliti offrono il vantaggio di essere mirate a un punto a valle dei microrganismi, aggirandone così le differenze intrinseche di composizione, nonché le sfide degli interventi mirati a creare cambiamenti di composizione, come la resistenza alla colonizzazione dei probiotici (Suez e Elinav, 2017). Gli interventi nutrizionali che coinvolgono i metaboliti del microbioma possono apportare benefici all'ospite, ripristinando le vie metaboliche o di segnalazione dell'ospite che sono state alterate nelle malattie legate al microbioma, oppure possono cambiare la composizione del microbioma in modo da ridurre la probabilità di sviluppo della malattia (Suez e Elinav, 2017). I paragrafi successivi forniscono una panoramica delle evidenze emergenti su come l'alimentazione influenzi la salute di cani e gatti attraverso le modifiche della funzione del microbioma e i postbiotici (vedi [Tabella 1](#)).

3.5.1 PROTEINE

Sebbene esistano prove sostanziali che la riduzione dell'eccessiva putrefazione delle proteine di bypass possa apportare benefici, sembra che alcuni metaboliti putrefattivi possano contribuire a migliorare la funzione fisiologica dell'ospite. È interessante notare che alcuni prodotti putrefattivi possono apportare benefici alla salute ([Tabella 1](#)). Ad esempio, è stato dimostrato che l'indolo, un prodotto di degradazione dell'aminoacido triptofano, migliora l'omeostasi immunitaria dell'ospite-microbioma (Alexeev et al., 2018), diminuisce i marcatori dell'infiammazione e aumenta la resistenza della giunzione stretta delle cellule epiteliali (Bansal et al., 2010), mentre il metabolita correlato indolo-3-propionato migliora l'integrità della barriera intestinale (Venkatesh et al., 2014). Al contrario, è stato dimostrato che l'indolo è un potente co-carcinogeno nei ratti (Dunning e Curtis, 1958; Sims e Renwick, 1983) e nei criceti (Oyasu et al, 1972) e viene metabolizzato a 3-indossilsolfato, 5-idrossiindolo solfato e 7-idrossiindolo solfato, che stimolano la progressione della ne-

croci glomerulare e dell'insufficienza renale nei pazienti uremici (Niwa et al., 1997; Barreto et al., 2009; Lisowska-Myjak, 2014). Come nell'uomo, l'indoxil solfato è un'importante tossina uremica nei gatti e nei cani che aumenta con la gravità della malattia renale (Wong et al., 2014; Barrios et al., 2015; Cheng et al., 2015). È stato proposto di aumentare la produzione di poliammine per annullare l'impatto negativo dell'invecchiamento sugli epitelii intestinali (Kibe et al., 2014). Infine, i bSCFA derivati dalla putrefazione degli aminoacidi a catena ramificata possono ri-alimentare i colonociti affamati con un'efficienza non osservata con gli SCFA semplici (Jaskiewicz et al., 1996). Quindi il bypass proteico influenza l'equilibrio tra fermentazione saccarolitica e putrefazione nel microbioma intestinale e questo equilibrio può contribuire a determinare l'influenza del microbioma sulla salute dell'animale domestico (Holmes et al., 2017).

Bisogna studiare il giusto equilibrio tra saccarolisi e putrefazione per la salute. Un'ipotesi è che la salute sia promossa dall'apporto di triptofano, aminoacidi a catena ramificata e substrati saccarolitici adeguati in un microbioma intestinale con l'appropriata capacità genetica di trasformare questi substrati in indolo-3-propionato, isobutirrato e SCFA semplici. Di seguito sono riportati alcuni esempi degli effetti dei postbiotici sul microbioma gastrointestinale in diversi stati patologici.

3.5.2 ENTEROPATIE INFIAMMATORIE

Il metabolita postbiotico H₂S, derivato da aminoacidi contenenti zolfo, è una molecola "Giano bifronte", associata sia a effetti tossici che a potenziali benefici per la salute (Zhang et al., 2013). Ad esempio, la produzione endogena di H₂S da parte dell'ospite genera un effetto iperpolarizzante derivato dall'endotelio per promuovere la vasorelazione e favorisce effetti antinfiammatori (Linden et al., 2008; Martin et al., 2010; Zhang et al., 2013). Al contrario, la generazione di H₂S nel colon da parte del microbiota intestinale inibisce l'utilizzo del butirrato SCFA da parte dei colonociti attraverso l'inibizione delle metalloproteine

mitocondriali ed è associata alla colite ulcerosa (Roediger et al., 1997). Questo potrebbe essere un esempio di come la dose e il sito d'azione determinino la generazione di H₂S, quindi limitare l'apporto di aminoacidi contenenti zolfo al colon, aumentando la digeribilità e riducendo i livelli dietetici, può fornire un beneficio al tratto gastrointestinale.

3.5.3 MALATTIA RENALE

Alcuni batteri gastrointestinali producono dei precursori di tossine uremiche attraverso la fermentazione di proteine e aminoacidi. È stato dimostrato che l'indoxil solfato, il p-cresolo solfato e la fenilacetilglutammina sono correlati negativamente con la funzione renale in studi osservazionali (Lin et al., 2011; Barrios et al., 2015; si veda la Tabella 1). Inoltre, il p-cresile, il suo composto madre p-cresolo e l'indoxil-solfato sono noti per contribuire al danno endoteliale e allo stress ossidativo (Dou et al., 2004; Lin et al., 2011; Gryp et al., 2017). Queste tossine contribuiscono in modo importante allo sviluppo di malattie renali nei cani e nei gatti (Chen et al., 2018; Summers et al., 2019), ma i dati sulla rilevanza degli effetti di specifici batteri sui livelli di tossine uremiche non sono coerenti. Mentre molti studi sugli animali hanno dimostrato il beneficio della rimozione dell'indoxil solfato mediante AST-120 (un adsorbente carbonioso orale utilizzato nei pazienti con CKD), negli studi clinici condotti sull'uomo non è stato dimostrato alcun beneficio consistente sugli endpoint renali (Yamaguchi et al., 2017).

Nelle popolazioni con CKD esiste un'associazione più forte tra dieta ad alto contenuto di fibre e minore infiammazione, un'associazione che potrebbe essere correlata a una riduzione della produzione e dell'assorbimento di tossine uremiche mediate dal metabolismo microbico (Krishnamurthy et al., 2012). È stato dimostrato che le fibre prebiotiche, come l'inulina e il mallo di pisello, riducono i livelli di p-cresolo, p-cresolo solfato e urea nel sangue in pazienti con malattie renali (Meijers et al., 2010; Sirich et al., 2014; Salmean et al., 2015). È stato inoltre

dimostrato che l'amido resistente alla digestione riduce l'indoxil solfato e il p-cresol solfato e migliora la funzione renale nei ratti (Vaziri et al., 2014). Queste riduzioni sono state associate a un aumento del rapporto *Bacteroidetes/Firmicutes* e a un incremento dei generi *Ruminococcus*, *Proteobacteria* e *Sutterella* (Kieffer et al., 2016). Inoltre, uno studio condotto sui cani ha dimostrato un aumento della produzione di SCFA dopo il consumo della gomma di guar e della polpa di barbabietola da zucchero (prebiotici). Si ritiene che questi prebiotici facciano risparmiare aminoacidi (Wambacq et al., 2016), un risultato fondamentale per la prevenzione della cachessia nelle malattie renali. Sebbene questo studio sia stato condotto su cani sani, suggerisce la possibilità che i componenti della dieta modifichino i metaboliti rilevanti per una comorbidità comune nella malattia renale.

Le diete ad alto contenuto di fibre fermentabili provenienti da fonti vegetali e di frutta hanno determinato una riduzione significativa del prodotto finale della glicazione avanzata, la piralina, e dei livelli circolanti della tossina postbiotica uremica, il 4-etilfenil solfato, in cani e gatti (Ephraim-Gebreselassie et al., 2017; Ephraim et al., 2020); il 4-etilfenil solfato aumenta in un modello animale di insufficienza renale cronica (Kikuchi et al., 2010). Nei cani alimentati con una dieta ad alto contenuto di fibre fermentabili, la diminuzione della piralina e del 4-etilfenil solfato è stata associata a un aumento delle proporzioni delle popolazioni batteriche fecali presumibilmente benefiche, tra cui *Ruminococcus*, *Oscillospira*, *Dorea* e *Slackia*, rispetto ai cani che consumavano un alimento di controllo (Ephraim-Gebreselassie et al., 2017). Inoltre, nei gatti è stato osservato un miglioramento di vari marcatori della salute dei reni, tra cui creatinina, urea, composti guanidinici e omoarginina, rispetto ai gatti che consumavano un alimento ad alto contenuto di fibre fermentabili (Ephraim-Gebreselassie et al., 2017).

È stato dimostrato che le diete specificamente formulate per cani e gatti con malattie renali aumentano la durata di vita degli animali domestici controllando i segni dell'uremia (Cline, 2016). L'uso di ingredienti come l'olio di pesce, gli antiossidanti, la L-

carnitina e i prodotti botanici ha portato a miglioramenti significativi nei marcatori della salute renale e ha dimostrato di avere effetti benefici anche sul microbioma (Yu et al., 2014; Fukami et al., 2015; Hall et al., 2016a, b). Sebbene non sia stato stabilito un legame definitivo tra dieta, funzione del microbioma e malattie renali nei cani e nei gatti, un gruppo ha riportato una riduzione di diverse tossine uremiche associate agli indoli nei gatti con insufficienza renale dopo la somministrazione di una dieta contenente una combinazione specifica di una fibra fermentabile semplice e di un polisaccaride complesso (Ephraim-Gebreselassie et al., 2018). Risultati come questi suggeriscono la necessità di ulteriori studi sul ruolo dell'alimentazione nel modellare l'effetto del microbioma sulla salute renale nei cani e nei gatti.

3.5.4 ALLERGIA E SALUTE ORALE

I postbiotici emergenti, come l'acido *10-idrossi-cis-12-ottadecenoico*, hanno suscitato interesse per i loro effetti antiallergici e l'attività antinfiammatoria nell'intestino (Miyamoto et al., 2015; Kaikiri et al., 2017; Ikeguchi et al., 2018). Uno studio sui topi ha dimostrato che il consumo di acido *10-idrossi-cis-12-ottadecenoico* ha ridotto i sintomi clinici della malattia allergica, tra cui il grattarsi, l'emorragia, l'edema e la secchezza (Kaikiri et al., 2017), suggerendo che potrebbe avere effetti simili nei gatti e nei cani. Questo componente nutrizionale, che si trova nei grassi polinsaturi di origine alimentare, potrebbe essere utile anche per altre patologie della mucosa, come le malattie orali che derivano da una ridotta integrità della barriera epiteliale (Yamada et al., 2018). Anche se si tratta di ipotesi, bisogna studiare i postbiotici emergenti come questo per capire se possono essere modulati attraverso l'alimentazione in modo da avere un impatto positivo sulla salute di cani e gatti.

3.6 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il ruolo del microbioma gastrointestinale nella salute e nella malattia è un campo di studio sempre più importante per i ricercatori e un'area di interesse clinico per i veterinari. Il microbioma gastrointestinale è ormai riconosciuto come un organo metabolico che svolge un ruolo critico in numerosi processi essenziali per la salute e la forma fisica dell'ospite. Di conseguenza, i disturbi del microbioma possono far insorgere o esacerbare le malattie, mentre gli interventi nutrizionali che ottimizzano la composizione e la funzione del microbioma possono migliorare la salute di cani e gatti.

Di recente, l'attenzione della ricerca sul microbioma si è spostata dal potenziale impatto dei cambiamenti nella composizione alla comprensione di come i cambiamenti funzionali ottenuti attraverso l'alimentazione possano migliorare la salute generale degli animali domestici. Questo panorama di ricerca in evoluzione è in linea con l'attuale prospettiva della sezione nordamericana dell'International Life Sciences Institute, che ha evidenziato la necessità di dimostrare l'associazione tra i cambiamenti strutturali del microbioma e la funzione o i marcatori di salute (McBurney et al., 2019). Inoltre, le prove che si stanno accumulando suggeriscono che gli interventi volti a migliorare la funzione del microbioma possono apportare benefici significativi alla salute di cani e gatti. Un approccio di questo tipo spingerà i ricercatori che studiano gli alimenti per animali domestici a prendere in considerazione la misurazione dei cambiamenti nelle caratteristiche funzionali del microbioma (Backhed et al., 2012), come le misurazioni dei metaboliti stessi o la metatrascrittomica, al fine di sviluppare alimenti che non solo soddisfino le esigenze nutrizionali di cani e gatti, ma che migliorino anche la funzione del loro microbioma gastrointestinale, per sostenere la salute dell'animale in modo olistico.

Le variazioni del microbioma gastrointestinale osservate tra gli animali domestici sani e quelli affetti da varie patologie, come IBD, allergie, malattie orali, sovrappeso, diabete e malattie rena-

li, suggeriscono che i componenti nutrizionali che mirano efficacemente al microbioma possono richiedere un adattamento alle caratteristiche uniche di una determinata condizione di salute. Anche se gli alimenti possono essere formulati con ingredienti generalmente riconosciuti come protettivi contro i disturbi del microbioma, sono necessari ulteriori studi per dimostrare l'impatto di tali cambiamenti sulla malattia nei singoli cani e gatti. Sebbene l'uso di screening sanitari basati sul microbioma (Staley et al., 2018) e la diagnostica del microbioma non siano ancora diffusi, l'uso di biomarcatori derivati dal microbioma per malattie specifiche potrebbe migliorare l'efficacia e l'efficienza della diagnosi, della valutazione della progressione e della prognosi (Bäckhed et al., 2005; Davies, 2018), nonché le decisioni relative alla scelta della terapia nutrizionale. Sempre più evidenze suggeriscono che l'alimentazione influenza la composizione e la funzione del microbioma gastrointestinale e ha un impatto diretto o indiretto sugli organi extra-GI; ciò ha ridisegnato il campo della ricerca sul microbioma connettendolo alla nutrizione personalizzata. Serviranno ulteriori ricerche per quantificare delle misure per caratterizzare il microbioma nel benessere e nella malattia, valutare l'impatto degli interventi nutrizionali e, da ultimo, sviluppare delle raccomandazioni nutrizionali appropriate per la salute del microbioma nei cani e nei gatti.

4 - IL CONSUMO DI ALIMENTI FRESCHI AUMENTA LA DIVERSITÀ DEL MICROBIOMA E PROMUOVE CAMBIAMENTI NELLA COMPOSIZIONE DEI BATTERI SULLA PELLE DEI CANI DA COMPAGNIA RISPETTO AGLI ALIMENTI SECCHI

Tratto e tradotto da

Leverett, K.; Manjarín, R.; Laird, E.; Valtierra, D.; Santiago-Rodriguez, T.M.; Donadelli, R.; Perez-Camargo, G. *Fresh Food Consumption Increases Microbiome Diversity and Promotes Changes in Bacteria Composition on the Skin of Pet Dogs Compared to Dry Foods*. *Animals* 2022, 12, 1881.



<https://doi.org/10.3390/ani12151881>

Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

La pelle è la prima barriera che l'organismo ha per proteggersi dall'ambiente. I batteri che popolano la pelle sono numerosi e la loro composizione può cambiare nel corso della vita del cane a causa di diversi fattori, come i cambiamenti ambientali e le malattie. L'obiettivo di questa ricerca è determinare i cambiamenti del microbioma cutaneo dovuti a una variazione della dieta su cani da compagnia sani. 8 cani sani di proprietà sono stati alimentati con una dieta fresca per 30 giorni e poi con alimenti secchi per altri 30 giorni dopo un periodo di transizione di 4 giorni. Dopo ogni periodo di alimentazione di 30 giorni è stata campionata la popolazione batterica cutanea e confrontata nella diversità del microbioma. La diversità alfa è risultata più elevata quando i cani sono stati alimentati con una dieta fresca rispetto agli alimenti secchi. Inoltre, la somministrazione di alimenti freschi ai cani ha aumentato la percentuale di *Staphylococcus* e diminuito *Porphyromonas* e *Corynebacterium*. In conclusione, il passaggio dalla dieta fresca a quella secca ha diminuito il microbioma cutaneo nei cani da compagnia sani.

Parole chiave: canini; diversità del microbioma; cibo per animali domestici; popolazioni di batteri della pelle

4.1 INTRODUZIONE

La pelle è la prima barriera che gli animali hanno per difendersi. Nei cani la pelle è comunemente colpita e infettata da malattie come prurito, ulcere, pustole e allergie [1,2,3,4,5,6]. Secondo il Veterinary Practice News, nel 2018 i costi medi di trattamento per la dermatite atopica (prima condizione medica più comune nei cani), la neoplasia cutanea benigna (terza più comune) e la piodermite (quarta più comune) sono stati rispettivamente di 255,00 dollari USA, 377,00 dollari USA e 128,00 dollari USA [7]. La percentuale della popolazione di cani che soffre di una patologia cutanea non è nota. Tuttavia, esistono aziende produttrici di alimenti per cani concentrate sulla salute della pelle. Sebbene nella maggior parte dei casi non sia noto il ruolo del microbioma nella gravità di tali patologie, Chermprapai e altri [8] hanno riportato un aumento dell'abbondanza relativa di *Staphylococcus*, *Psychrobacter*, *Trichococcus* e *Brachybacterium* nei cani con dermatite atopica rispetto ai cani sani. Inoltre, DeCandia e collaboratori [9] hanno riportato cambiamenti nel microbioma cutaneo dei canidi (coyote, volpe rossa e volpe grigia) quando infettati da acari (*Sarcoptes scabiei*), oltre a facilitare infezioni batteriche secondarie come *Staphylococcus pseudintermedius* e *Corynebacterium*.

Oltre alle malattie che influenzano il microbioma, la dieta può modificare la composizione del grasso della pelle del cane [10,11,12] e portare a un cambiamento nelle popolazioni batteriche, come proposto da alcune ricerche condotte sull'uomo [13,14]. I nutrienti solitamente presi di mira sono i grassi e gli acidi grassi specifici. Ad esempio, la somministrazione di alti livelli di acido eicosapentaenoico ha migliorato il prurito, l'alopecia e le caratteristiche del mantello rispetto all'olio di mais [15].

Analogamente, quando il rapporto n-6:n-3 del cibo per cani era 1:1, la concentrazione di prostaglandina E3 nel siero (un eicosanoide proinfiammatorio derivante dal metabolismo dell'acido arachidonico) è diminuita rispetto ai livelli di base [16]. Gli autori hanno anche riportato un miglioramento clinico del prurito cutaneo [16]. Inoltre, esistono in commercio alimenti e integratori per animali domestici specifici per la pelle (ad esempio, per la pelle sensibile, per la pelle e il pelo sani, per la cura della pelle e del pelo). Per quanto ne sappiamo però non esistono studi che mettano in relazione questi interventi dietetici e i cambiamenti del microbioma cutaneo.

Al contrario, è ben chiaro come l'alimentazione possa modificare la comunità batterica intestinale [17,18,19], poiché il tratto gastrointestinale (e il suo microbioma) ha accesso ai nutrienti presenti negli alimenti prima di altri organi. Le fibre sono il nutrimento più comunemente interessato, poiché non vengono digerite e assorbite dagli animali. Inoltre, alcune nuove ricerche sull'uomo indicano una relazione tra l'intestino e la pelle [20]. Pertanto, la dieta potrebbe influenzare indirettamente la pelle anche attraverso i cambiamenti del microbioma intestinale. Mentre gli integratori alimentari sono stati valutati in cani con problemi cutanei [15,21], gli effetti degli interventi dietetici sul microbioma di cani sani devono ancora essere studiati. Inoltre, ad oggi non sono stati valutati gli effetti di diversi tipi di alimenti sul microbioma cutaneo dei cani. Sebbene negli Stati Uniti le diete complete e bilanciate debbano essere conformi alle linee guida dell'*Association of American Feed Control Officials* [22], ciò non significa che siano composte dagli stessi ingredienti e prodotte con processi simili. Rispetto agli alimenti secchi comunemente conosciuti, gli alimenti freschi sono lavorati a temperature e pressioni relativamente più basse. Inoltre, presentano una maggiore percentuale di carni fresche, che aumenta le porzioni di proteine e grassi nell'alimento. Infine, gli alimenti freschi devono essere refrigerati dopo la lavorazione per evitare il deterioramento. Al contrario, gli alimenti secchi hanno una maggiore proporzione di carboidrati e un minore contenuto di

grassi. Inoltre, il processo di essiccazione consente a queste diete di rimanere a lungo sugli scaffali. Quindi un alimento secco per animali domestici viene prodotto con ingredienti e processi diversi rispetto a una dieta fresca. Di conseguenza, vi sono differenze nel profilo nutrizionale delle diete e nella disponibilità di nutrienti per l'animale [23], che potrebbero a loro volta influenzare il nutrimento dell'animale.

Negli studi sui cani la pratica più comune è l'uso di cani da canile per controllare la variabilità dell'ambiente e degli animali. Però le condizioni del canile sono diverse da quelle della casa e nei canili c'è un numero limitato di razze. Poiché l'ambiente è uno dei componenti chiave noti per l'impatto sul microbioma [24], la validità ecologica della ricerca sul microbioma che utilizza cani da canile può essere messa in discussione quando si considerano i cani da compagnia. Pertanto, l'obiettivo di questa ricerca è stato quello di determinare gli effetti della dieta fresca rispetto a quella secca sul microbioma cutaneo di cani da compagnia sani. Il passaggio da una dieta fresca a una secca ha ridotto la diversità del microbioma cutaneo dei cani da compagnia sani analizzati in questo lavoro.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 RECLUTAMENTO DEI CANI E LINEE GUIDA GENERALI DELLO STUDIO

[...] Tutti i cani arruolati nello studio erano di proprietà di adulti responsabili. Sono stati reclutati otto cani da compagnia [...]. Il protocollo di ricerca è stato spiegato ai proprietari dei cani e il loro consenso consapevole è stato richiesto sotto forma di e-mail formale a K.L. per l'inclusione dei loro animali nello studio. I proprietari dei cani erano consapevoli di poter rimuovere i loro animali dallo studio in qualsiasi momento, se lo desideravano. La [tabella 1](#) riporta i dati demografici dei cani. Il trattamento con antimicotici o antibiotici sistemici tre mesi prima dell'inizio

dello studio è stato utilizzato come criterio di esclusione. Tutti i cani sono stati castrati. I proprietari dei cani sono stati istruiti a (1) nutrire gli animali secondo le istruzioni del produttore della dieta, (2) regolare l'assunzione di cibo per mantenere il peso corporeo del cane durante lo studio e (3) evitare di dare avanzi di cibo umano o cibo-premio per tutta la durata dello studio. A tutti i partecipanti sono stati forniti croccantini per cani [...] e sono stati istruiti a seguire le linee guida per l'alimentazione come indicato sulla confezione.

ID cane	Razza	Il sesso	Età (anni)
D010	Misto	Maschio	1
D011	Goldendoodle	Maschio	3
D012	Bovaro australiano	Maschio	8
D013	Misto	Femmina	2
D014	Misto	Maschio	0.8
D015	Misto	Maschio	5
D016	Bulldog americano	Maschio	5
D017	Bulldog americano	Femmina	4

Tabella 1. Informazioni demografiche dei cani arruolati nello studio.

4.2.2 PROTOCOLLO DI ALIMENTAZIONE E COMPOSIZIONE DEI NUTRIENTI E DEGLI INGREDIENTI DELLA DIETA

La sperimentazione si è svolta tra settembre e novembre 2020. Tutti i cani sono stati alimentati dai proprietari secondo le istruzioni di E.L. e K.L. Tutti i cani sono stati alimentati con il *Freshpet Select Sensitive Stomach and Skin* (FPS, cotto a vapore per circa 15 minuti a 100 °C) per 30 giorni consecutivi, seguiti dalla loro normale dieta a base di cibo secco (DRY, estruso) per altri 30 giorni consecutivi. Per il cambio di dieta è stato previsto un periodo di

transizione di 4 giorni, durante il quale il 25% di FPS è stato sostituito da DRY ogni giorno. I campioni di cibo FPS e DRY sono stati raccolti da ciascun partecipante e inviati a un laboratorio commerciale [...] per l'analisi di umidità [...], proteine grezze [...], grassi idrolizzati acidi [...], ceneri [...], fibra alimentare totale [...], fibre insolubili e solubili [...], profilo degli acidi grassi [...] e zinco [...]. La composizione dei nutrienti prossimali analizzati è presentata nella Tabella 2, i nutrienti selezionati noti per il loro impatto sulla salute della pelle sono presentati nella Tabella 3, mentre l'elenco degli ingredienti di ciascuna dieta in ordine decrescente di inclusione è riportato nel [Materiale supplementare](#).

Caratteristiche nutrizionali	DRY 1	DRY 2	DRY 3	DRY 4	DRY 5	Media DRY	FPS
Umidità	7.9	9.9	7.6	10.4	6.4	8.5	76.3
Proteine grezze	37.2	33.8	40	26.8	28.4	33.0	43.9
Grassi	20.5	11.8	19.7	15.4	13.2	16.1	21.4
Cenere	10.1	7.8	9.6	7.2	5.7	8.1	7.9
Fibra alimentare totale	12.2	10.9	12.0	8.0	14.2	11.5	11.8
Fibra insolubile	9.8	8.9	9.4	6.6	12.1	9.4	6.3
Fibra solubile	2.4	2.0	2.6	1.5	2.1	2.1	5.5
Estratto senza azoto 1	19.4	35.8	19.8	42.5	38.5	31.2	17.7
Energia metabolizzabile 2, base secca (base umida)	3724 (3429)	3439 (3099)	3768 (3481)	3735 (3346)	3464 (3242)	3616 (3308)	3975 (942)
Zinco	265	289	232	208	222	243	215

Tabella 2. Contenuto di umidità e macronutrienti su base secca delle diete sperimentali (%), dati sull'energia metabolizzabile (kcal/kg di dieta) e zinco (mg/kg di dieta su base secca). 1 Estratto privo di azoto = 100-umidità-proteina grezza-grasso-acido-fibra alimentare totale. 2 Energia metabolizzabile stimata in base ai valori Atwater modificati di 3,5 per la proteina grezza e l'estratto senza azoto e di 8,5 per il grasso, come indicato dall'AAFCO.

Caratteristiche nutrizionali	DRY 1	DRY 2	DRY 3	DRY 4	DRY 5	Media DRY	FPS
Grassi saturi	6.58	2.71	5.78	6.63	3.29	5.00	6.82
Grassi monosaturi	8.41	4.64	8.49	5.84	4.72	6.42	8.85
Grassi polinsaturi	3.94	3.18	3.87	1.28	4.22	3.30	5.21
Acidi grassi ω -6	3.65	2.50	3.20	1.18	3.35	2.78	4.78
Acidi grassi ω -3	0.26	0.67	0.63	0.10	0.85	0.50	0.39
ω -6: ω -3 rapporto 1	14.04	3.73	5.08	11.80	3.94	5.56	12.26
Acido linoleico	3.51	2.38	3.06	1.14	3.26	2.67	4.32
Acido α -linolenico	0.23	0.42	0.44	0.09	0.82	0.40	0.24
Acido arachidonico	0.08	0.06	0.08	0.02	0.04	0.06	0.35
Acido eicosapentaenoico	nd 2	0.07	0.09	nd	nd	0.03 1	0.03
Acido docosaesaenoico	nd	0.14	0.08	nd	nd	0.04 1	0.09

Tabella 3. Contenuto di acidi grassi selezionati (% di sostanza secca) delle diete sperimentali. 1 Rapporto ω -6: ω -3 calcolato come acidi grassi ω -6 diviso per acidi grassi ω -3. 2 nd considerato nel valore medio come zero.

4.2.3 RACCOLTA DI CAMPIONI DI MICROBIOMA CUTANEO

Per misurare i cambiamenti nelle popolazioni batteriche cutanee, sono stati raccolti campioni di tampone dall'orecchio interno, dall'area interdigitale della zampa anteriore e dall'area inguinale di ciascun cane dopo 30 giorni di alimentazione con diete FPS e DRY. Durante entrambi i prelievi erano presenti i proprietari dei cani, che hanno osservato la procedura per tutta

la durata del campionamento. I campioni sono stati prelevati sul lato destro degli animali utilizzando un tampone sterile BBL™ CultureSwab™ [...] strofinando il tampone su ciascun sito di campionamento per 40 volte e ruotando il tampone di un quarto ogni 10 colpi [4]. Subito dopo la raccolta, i campioni sono stati messi sotto ghiaccio e trasportati a Freshpet (Bethlehem, PA, USA), dove sono stati congelati e conservati a -20 °C fino all'estrazione del DNA. Ai proprietari dei cani è stato chiesto di astenersi dal fare il bagno o dal deodorare gli animali a partire da 1 settimana prima di ogni periodo di campionamento. Per ridurre la contaminazione con batteri estranei, la persona che raccoglieva i campioni ispezionava visivamente l'area per assicurarsi che l'area selezionata per il prelievo non fosse stata leccata di recente dal cane o avesse materiale diverso da pelle e peli.

4.2.4 ESTRAZIONE E ANALISI DEL DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata presso la University of Arkansas for Medical Sciences (Little Rock, AR, USA). Il DNA è stato estratto utilizzando DNeasy® PowerSoil® Kit Quick-Start (Qiagen, Hilden, Germania) secondo le istruzioni del produttore. I campioni sono stati amplificati e la regione ipervariabile 4 (V4) del 16S rRNA è stata marcata mediante PCR utilizzando 96 combinazioni uniche di 8 primer forward e 12 primer reverse barcoded, come precedentemente descritto [25]. I cicli di PCR sono stati impostati come segue: [...]. Nanogrammi uguali di ciascuna libreria sono stati raggruppati e gli ampliconi di lunghezza pari a circa 300 nt sono stati selezionati utilizzando le microsfere magnetiche Agencourt AMPure XP [...] Le librerie finali sono state inviate alla Princeton University Genomics Core Facility [...] per il sequenziamento di ampliconi *paired-end* (2 × 150 nt) su una macchina Illumina MiSeq [...].
[...]

4.3 I RISULTATI

Il cane D013 è stato escluso dall'analisi a causa di un intervento chirurgico e di un trattamento antibiotico post-operatorio durante lo studio.

La composizione dei nutrienti sulla base della sostanza secca degli alimenti secchi per animali da compagnia e degli FPS è riportata nelle Tabelle 2 e 3. La dieta FPS aveva un contenuto di umidità maggiore rispetto alla DRY. Inoltre, in media, la dieta FPS aveva un contenuto di proteine e grassi più elevato e una concentrazione di carboidrati inferiore rispetto alla DRY, mentre il contenuto di cenere era simile. Mentre la fibra alimentare totale era simile tra le diete, il contenuto di fibra solubile degli FPS era tra 2,1 e 3,8 volte superiore a quello degli alimenti DRY; di conseguenza, il contenuto di fibra insolubile degli FPS era inferiore a quello delle diete DRY (Tabella 2). Il contenuto di zinco era più elevato negli alimenti secchi rispetto agli FPS; tuttavia, gli FPS presentavano una maggiore concentrazione di acidi linoleico, arachidonico e DHA (Tabella 3). La dieta FPS presentava una maggiore concentrazione di acidi grassi saturi e polinsaturi; tuttavia, la concentrazione di acidi grassi n-3 era in media inferiore a quella degli alimenti secchi (Tabella 3).

L'analisi del 16S rRNA nell'inguine ha identificato un totale di 627 OTU, aggregate in 39 phyla e 421 generi. Analogamente, l'analisi dell'orecchio ha prodotto 663 OTU suddivise in 37 phyla e 435 generi, mentre nella zampa 477 OTU sono state aggregate in 32 phyla e 322 generi. Sono stati costruiti diagrammi a barre della composizione tassonomica per mostrare la variazione complessiva della percentuale relativa di phyla e generi (Figura 1) per ciascun sito corporeo tra FPS e DRY.

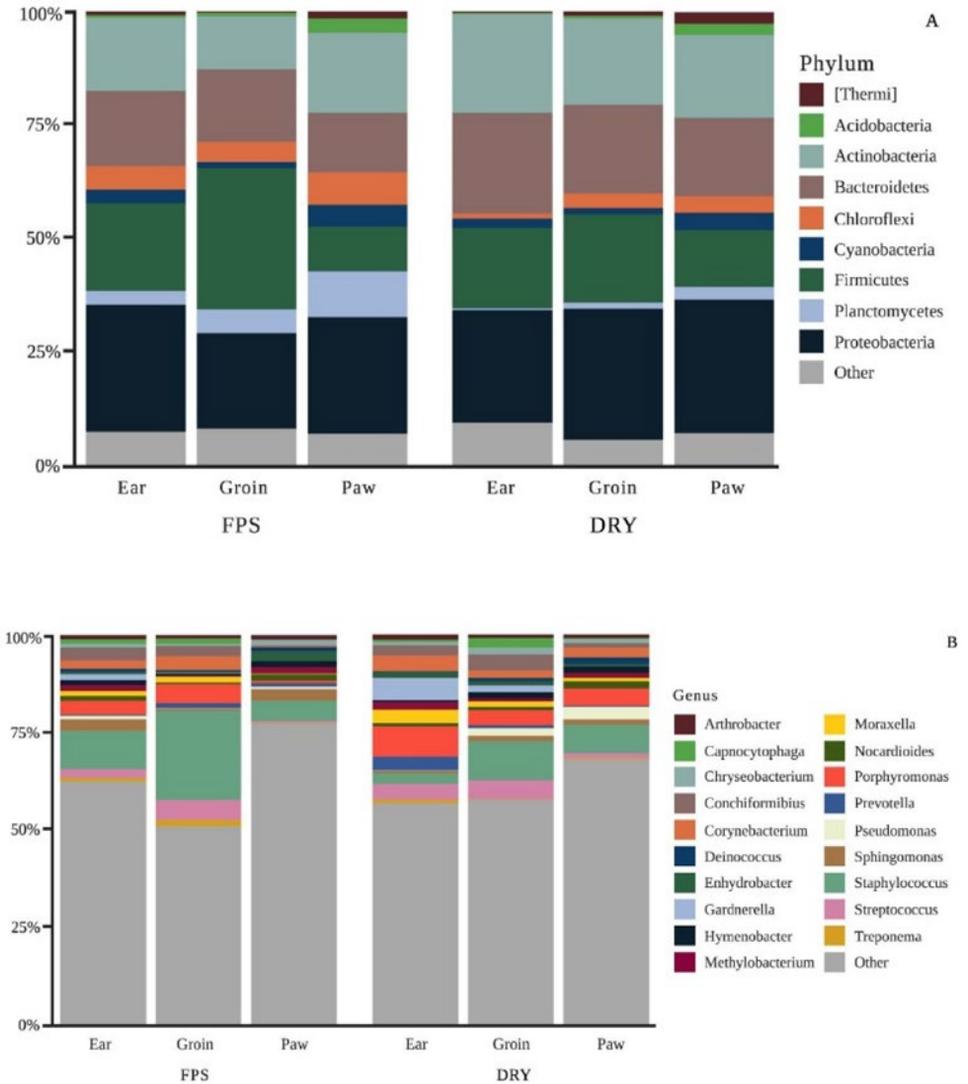


Figura 1. Variazione della composizione tassonomica tra siti corporei e diete. (A) Variazione della composizione tassonomica dei phyla microbici cutanei e (B) dei generi per ciascun sito corporeo tra alimenti freschi (FPS) e secchi (DRY) per cani. Figure create con BioRender.com (Accesso del 15 febbraio 2022). (Ear: orecchio; Groin: inguine; Paw: zampa) [...]

A livello di phyla, la dieta DRY ha aumentato le popolazioni di *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* e diminuito quelle di *Planctomycetes*, *Firmicutes* e *Chloroflexi* rispetto a FPS ($p < 0,05$; Figura 1 A). Considerando i 3 diversi siti cutanei, l'inguine presentava una popolazione più elevata di *Firmicutes* rispetto agli altri siti e la zampa presentava proporzioni più elevate di *Cyanobacteria* e *Planctomycetes* ($p < 0,05$). I generi più comuni tra i diversi siti cutanei e le diete erano *Staphylococcus*, seguito da *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Conchiformibius* (Figura 1B). L'inguine presentava proporzioni più elevate di *Staphylococcus* rispetto all'orecchio e alla zampa ($p < 0,05$).

È stato riscontrato un effetto complessivo della dieta sul microbioma cutaneo indipendentemente dall'area campionata (PERMANOVA $p \leq 0,05$), con una diminuzione significativa dell'indice di diversità alfa Chao1 in DRY rispetto a FPS ($p \leq 0,05$; Figura 2).

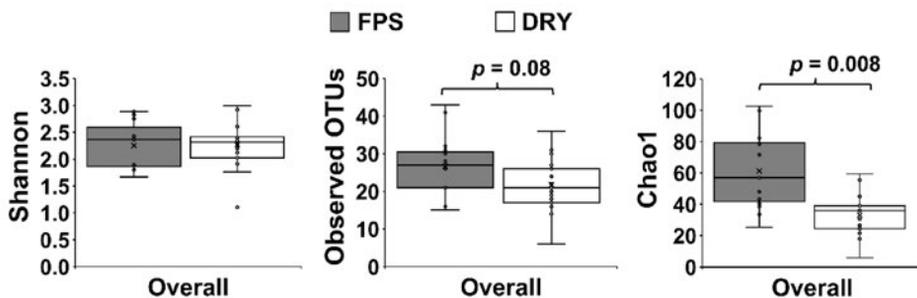


Figura 2. Diversità alfa del microbioma cutaneo di cani da compagnia alimentati con cibo fresco (FPS) o secco (DRY). OTU osservate, indici di Shannon e Chao1 della diversità alfa a livello di genere nei cani alimentati con FPS per 30 giorni consecutivi, seguiti da DRY per altri 30 giorni consecutivi. I valori sono stati calcolati utilizzando lo script `core_diversity_analyses.py` in *Quantitative Insights into Microbial Ecology*. Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante analisi non parametrica permutazionale della varianza con protocollo e tempo come effetti fissi, con un modello ridotto, 9999 permutazioni e somma dei quadrati di tipo III.

I dati provenienti da diverse aree del tampone sono stati combinati per ulteriori analisi. L'analisi SIMPER ha prodotto una dissimilarità media del 60,41% tra FPS e DRY, con 61 generi che hanno contribuito al 70% delle differenze tra FPS e DRY (Figura 3).

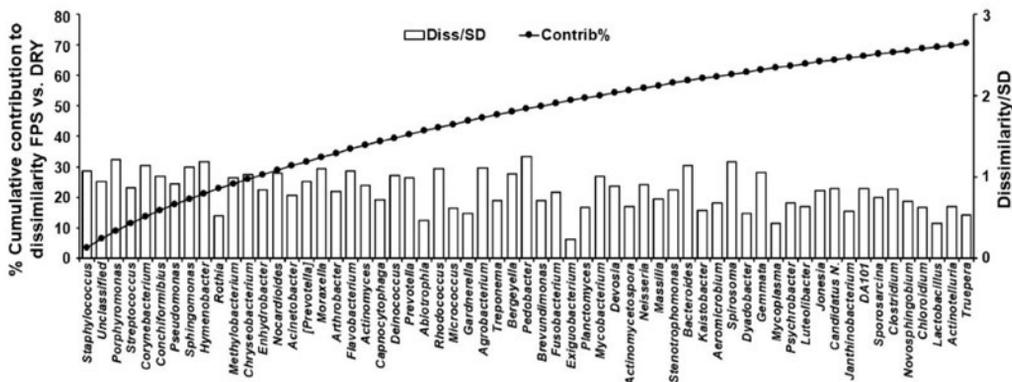


Figura 3. Dissimilarità percentuale cumulativa dei generi del microbioma cutaneo di cani da compagnia alimentati con cibi freschi (FPS) e secchi (DRY). Contributo percentuale cumulativo dei generi alla dissomiglianza tra FPS e DRY (asse Y sinistro) e il corrispondente rapporto tra dissomiglianza media e deviazione standard (asse X destro).

Staphylococcus, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Conchiformibius* e *Pseudomonas* hanno mostrato il maggior contributo percentuale alla dissimilarità tra FPS e DRY, mentre *Pedobacter*, *Porphyromonas*, *Hymenobacter*, *Spirosoma*, *Corynebacterium* e *Bacteroides* sono stati i migliori discriminatori, in quanto il loro rapporto tra dissimilarità media e deviazione standard è stato il più alto (Figura 3). Rispetto a FPS, DRY ha aumentato ($p \leq 0,05$) le percentuali relative medie di *Hymenobacter*, *Acinetobacter*, *Neisseria*, *Stenotrophomonas* e *Janthinobacterium* e ha diminuito ($p \leq 0,05$) *Actinomycetospora*, *Massilia*, *Bacteroides*, *Spirosoma*, *Mycoplasma*, *Jonesia*, *DA101*, *Sporosarcina* e *Actinotelluria* (Figura 4).

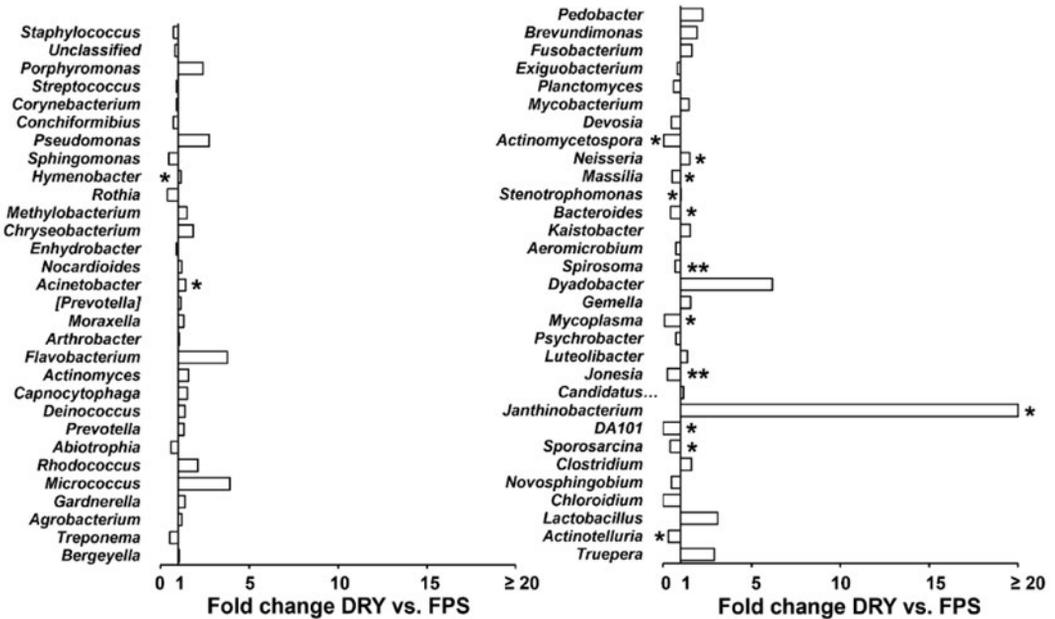


Figura 4. Conteggi relativi medi in percentuale dei generi selezionati da SIMPER espressi come variazione in termini di pieghe. I cani sono stati alimentati con FPS per 30 giorni consecutivi, seguiti da DRY per altri 30 giorni consecutivi. I dati sono stati analizzati con un'ANOVA a una via che includeva la dieta come effetto fisso. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.4 DISCUSSIONE

L'obiettivo di questo studio era quello di verificare se la dieta (cibo fresco o secco) avesse un impatto sul microbioma cutaneo dei cani da compagnia. A causa delle differenze nell'ambiente a cui sono sottoposti i cani da compagnia rispetto a quelli da canile e degli effetti dell'ambiente sul microbioma, i risultati qui presentati sono un tentativo di generare dati che rappresentino le condizioni in cui vive la maggior parte dei cani negli Stati Uniti. Ad esempio, quando è stato analizzato il microbioma nasale e orale di cani da detezione di diverse località, è stata riscontrata

una differenza nella diversità del Chaos1 nasale dei cani ospitati in diversi Stati degli Stati Uniti [33]. Sebbene il numero di animali reclutati sia un limite di questo lavoro, la variabilità degli alimenti secchi consumati dai cani da compagnia selezionati è stata scelta nel tentativo di imitare una situazione reale in cui i proprietari decidono di cambiare gli alimenti per cani. Non sono state eseguite analisi statistiche tra i diversi alimenti secchi per verificare se avessero un'influenza sul microbioma cutaneo, poiché questo non era l'obiettivo della ricerca e non c'erano abbastanza unità sperimentali per tali analisi. Le differenze alimentari vanno oltre la composizione dei nutrienti, ma anche il contenuto degli ingredienti, in particolare le fonti di proteine e grassi delle diete. Queste differenze negli ingredienti e nei metodi di lavorazione hanno probabilmente influenzato la disponibilità di nutrienti delle diete. Ad esempio, la disponibilità di aminoacidi di diverse proteine a base di pollo cambiava a seconda del modo in cui queste proteine venivano lavorate [23]. Per la salute della pelle forse i grassi della dieta potrebbero avere un impatto maggiore rispetto alle proteine, poiché lo strato esterno dell'epidermide, lo strato corneo, è composto principalmente da diversi composti grassi [14]. Complessivamente, gli FPS hanno un contenuto di grassi più elevato rispetto agli alimenti DRY, quindi questo potrebbe aver meglio promosso la salute della pelle. Tra tutti gli acidi grassi, l'acido linoleico ha un ruolo chiave nella formazione dello strato corneo, in quanto si lega agli involucri cornificati per creare un'impalcatura per le ceramidi libere presenti tra i corneociti [14]. La formazione di questi legami è essenziale per la struttura "a mattoni e malta" dello strato corneo e per la corretta funzione di barriera della pelle [34]. Poiché il contenuto di grassi della pelle può selezionare diversi batteri da far crescere sulla superficie della pelle [13,14] e i cambiamenti nella composizione dei grassi della dieta promuovono cambiamenti nella composizione dei grassi della pelle [10,11,12], forse questi due fattori potrebbero promuovere insieme un cambiamento nel microbioma cutaneo.

Ci sono due fattori principali che possono aver sostenuto i cambiamenti nella composizione delle popolazioni batteriche

cutanee in questo studio: il tipo di dieta somministrata e le variazioni delle condizioni meteorologiche. Poiché lo studio è stato condotto da settembre a novembre 2020, si sono verificati cambiamenti stagionali che potrebbero aver influenzato il microbioma cutaneo, dal momento che le condizioni ambientali sono un fattore che notoriamente influisce sul microbioma cutaneo [35,36]. Tuttavia, poiché tutti i cani arruolati nello studio erano cani da interno con accesso limitato all'esterno (passeggiate occasionali e visite al parco per cani), molto probabilmente le condizioni ambientali hanno avuto effetti limitati sui cambiamenti qui riportati, poiché i cani trascorrevano la maggior parte del tempo in casa, in condizioni controllate. Di conseguenza il cambiamento della dieta potrebbe essere la causa principale dei cambiamenti nella diversità microbica, con un ruolo minore delle condizioni ambientali stagionali. In uno studio che ha valutato il microbioma cutaneo di cani sani e allergici [4], la diversità della popolazione batterica è risultata inferiore nei cani allergici rispetto ai cani sani. Tuttavia, non è noto se questo cambiamento sia una causa o un effetto della malattia. Inoltre, è stato riportato che il microbioma cutaneo dei cani con dermatite atopica presenta una minore diversità e concentrazioni relative più elevate di *Staphylococcus* (soprattutto *S. pseudintermedius*) e *Corynebacterium* rispetto ai cani sani [5]. Quindi il miglioramento del microbioma cutaneo potrebbe prevenire o attenuare alcune di queste malattie. In questo studio è stata riscontrata una diminuzione della diversità quando i cani sono stati alimentati con DRY rispetto a FPS. Inoltre, l'abbondanza di *Corynebacterium* era maggiore nei cani alimentati con DRY; tuttavia, l'abbondanza di *Staphylococcus* era inferiore rispetto ai cani alimentati con FPS. Sebbene questi risultati siano contrastanti, è importante determinare la specie dei batteri presenti sulla pelle, poiché alcune specie specifiche sono correlate a determinate condizioni [37]. Ad esempio, anche se l'aumento dell'abbondanza di *Staphylococcus* quando i cani sono stati alimentati con FPS potrebbe essere preoccupante, è necessario indagare ulteriormente su quale specie sia aumentata. Ad esempio, nell'uomo lo *Staphylococcus epidermidis* può preveni-

re la colonizzazione dello *Staphylococcus aureus* [38]. Sebbene ciò non sia stato dimostrato per i cani, sarebbe prudente supporre che l'aumento dell'abbondanza di *Staphylococcus* sia dannoso per la salute del cane. Da ricerche condotte su soggetti umani, è noto che siti cutanei diversi presentano concentrazioni diverse di sebo e popolazioni batteriche [13,39]. La presente ricerca ha riportato differenze nella composizione batterica nei diversi siti analizzati; tuttavia, non è stato valutato il contenuto di sebo della pelle, che dovrebbe essere affrontato in ricerche future.

Sebbene questo studio non sia stato concepito per indagare i componenti specifici della dieta, possiamo dire che le differenze nei nutrienti tra alimenti FPS e DRY potrebbero aver contribuito in parte alle differenze osservate nella popolazione microbica cutanea. È noto che i nutrienti della dieta (come lo zinco, il contenuto di grassi più elevato e gli acidi grassi specifici) hanno un impatto sulla composizione della pelle [11,21]. Lo zinco è coinvolto nelle polimerasi di RNA e DNA e nell'attivazione della delta-6-desaturasi, un enzima che converte l'acido linoleico in acido arachidonico. La concentrazione e la disponibilità di zinco sono di particolare interesse per la salute della pelle, a causa delle continue divisioni cellulari della pelle per reintegrare le cellule perse con la desquamazione. Nelle diete sperimentali sono state utilizzate diverse fonti di zinco, come l'ossido di zinco, il proteinato di zinco e il solfato di zinco. Sebbene tutte queste fonti di zinco siano riconosciute dall'AAFCO, lo zinco proteinato è risultato più biodisponibile dell'ossido e del solfato di zinco [40,41]. Una fonte di zinco più disponibile potrebbe contribuire alla salute della pelle. Come già riportato altrove [41], la dieta con zinco proteinato ha aumentato la lucentezza del pelo in diverse aree del corpo del cane, che gli autori hanno considerato come un manto più sano. Gli stessi autori hanno anche riferito che i cani alimentati con zinco proteinato avevano una risposta immunitaria che persisteva più a lungo rispetto ai cani alimentati con ossido di zinco. Questa risposta immunitaria persistente potrebbe essere utile ai cani per controllare la colonizzazione dei batteri patogeni sulla superficie della pelle.

Un'altra differenza importante tra queste diete è il contenuto di fibre solubili (Tabella 2). È noto che le fibre solubili modificano la composizione del microbioma intestinale [42,43,44]. La fermentazione delle fibre è benefica per l'ospite grazie all'apporto di acidi grassi a catena corta, in particolare il butirrato, che ha dimostrato di regolare alcune fisiologie dell'ospite [45]. Inoltre, nuove ricerche dimostrano una relazione tra l'intestino e la pelle [20,36]. Sebbene i meccanismi alla base dell'asse intestino-pelle non siano ancora ben compresi, il microbioma intestinale può influenzare indirettamente il microbioma cutaneo modulando il sistema immunitario dell'ospite. A causa della novità dell'asse intestino-pelle, anche per la ricerca sull'uomo, qualsiasi associazione con un modello di cane deve essere affrontata con cautela, anche se sarebbe lecito supporre che le proporzioni più elevate di fibre solubili nei FPS stimolino la fermentazione e la crescita batterica nel colon quando i cani sono alimentati con questa dieta. Questo aumento delle popolazioni batteriche e della produzione di prodotti di fermentazione potrebbe stimolare il sistema immunitario e promuovere cambiamenti nel modo in cui la pelle reagisce ai diversi batteri. Tuttavia, né il microbioma intestinale né i prodotti di fermentazione sono stati misurati nelle feci dei cani reclutati nello studio. Poiché i batteri intestinali possono modulare il sistema immunitario, negli studi futuri sarebbe prudente considerare il sistema immunitario.

Infine il contenuto di acqua degli FPS era molto più elevato rispetto agli alimenti DRY. Tuttavia, è noto che i cani regolano l'assunzione di acqua indipendentemente dalla quantità di acqua presente negli alimenti per mantenere il bilancio idrico [46,47]. Inoltre, la valutazione del bilancio idrico non era l'obiettivo di questo studio. Negli esseri umani è stato riportato che bere 1 L in più rispetto all'assunzione di acqua di base [48] migliorava lo stato di idratazione della pelle; tuttavia, il microbioma della pelle non è stato valutato. Inoltre, Mukherjee e collaboratori [49] hanno riportato che esistono differenze nella distribuzione dei batteri sul viso delle donne a seconda del sebo o dell'idratazione della pelle, anche se è necessario menzionare che l'assunzione di

acqua non è stata valutata in quella pubblicazione [49]. Non è noto se ciò sia rilevante per i cani, poiché gli esseri umani possono aumentare volontariamente l'assunzione di acqua fino a un certo livello per soddisfare i protocolli di ricerca, mentre i cani molto probabilmente non berrebbero volontariamente di più.

Come accennato in precedenza, lo studio preimpostato presenta dei limiti. I limiti principali sono il numero ridotto di animali, l'uso di diversi alimenti secchi per animali domestici e il cambiamento delle condizioni ambientali durante lo svolgimento della sperimentazione. Gli studi futuri dovrebbero tenerne conto nella progettazione di nuove sperimentazioni.

4.5 CONCLUSIONI

In conclusione, la modifica della dieta FPS in DRY ha favorito una diminuzione dell'abbondanza relativa del microbioma cutaneo nei cani. Tuttavia, le ricerche future dovrebbero valutare il bilancio idrico, il microbioma del colon e il sistema immunitario quando si analizza il microbioma cutaneo, poiché questi fattori possono avere un impatto sulle popolazioni batteriche cutanee.

PARTE III

MICROBIOTA E PATOLOGIE
DEL CANE E DEL GATTO

Dopo le prime due parti più introduttive, eccoci arrivati a quello che potremmo definire il core, il punto focale, di interesse del medico veterinario clinico. Anche se la ricerca inizia come ricerca pura, ovvero non finalizzata ad applicazioni pratiche, arriva infatti il momento dove ci si comincia a chiedere come queste nuove conoscenze influiscono nella pratica clinica quotidiana.

In questa terza parte quindi abbiamo raccolto, come scelta non conclusiva, ma rappresentativa, alcuni lavori che si focalizzano su specifiche patologie di cani e sulle loro correlazioni con il microbiota intestinale.

Nel leggere questi lavori è importante però tenere ben presente le prime due parti di questo journal, da utilizzare per la lettura critica dei risultati. Presentiamo quindi tre lavori, ciascuno con i suoi punti di forza e le sue limitazioni.

Punti di forza particolari sono certamente alcuni aspetti clinici (es. diagnosi certa di patologia tramite istologia), mentre il punto debole è quasi sempre la bassa numerosità del campione, con cui, per quanto noi medici veterinari siamo abituati a convivere, dobbiamo sempre fare i conti. Interessante inoltre, in uno dei 3 paper riportati, così come in altri in letteratura, la comparazione di diversi parametri di valutazione (es. tassonomici e funzionali), che esce finalmente dalla comparazione di sequenziamenti genomici, metodo che sappiamo essere limitato da molti aspetti tecnici.

N.d.C.

5 - CARATTERIZZAZIONE DEL MICROBIOMA FECALE IN GATTI CON MALATTIA INFIAMMATORIA INTESTINALE O LINFOMA ALIMENTARE A PICCOLE CELLULE

Tratto e tradotto da

Marsilio, S., Pilla, R., Sarawichitr, B. et al. *Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma*. Sci Rep 9, 19208 (2019).



<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55691-w>

Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

L'enteropatia cronica felina (CE) è un disturbo gastrointestinale comune nei gatti e comprende principalmente la malattia infiammatoria intestinale (IBD [*Inflammatory Bowel Disease*]) e il linfoma a piccole cellule (SCL [*Small Cell Lymphoma*]). Sia la IBD che l'SCL nel gatto condividono caratteristiche con enteropatie croniche come la IBD e il linfoma epiteliotropo intestinale monomorfo a cellule T nell'uomo. Lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare il microbioma fecale di 38 gatti sani e 27 gatti con CE (13 gatti con IBD e 14 gatti con SCL). Gli indici di diversità alfa erano significativamente ridotti nei gatti con CE (OTU $p = 0,003$, indice di Shannon $p = 0,008$, diversità filogenetica $p = 0,019$). L'ANOSIM ha mostrato una differenza significativa nelle comunità batteriche, sebbene con un effetto di dimensioni ridotte ($P = 0,023$, $R = 0,073$). L'analisi univariata e il LefSE hanno mostrato una minore abbondanza di taxa anaerobi facoltativi dei phyla *Firmicutes* (famiglie *Ruminococcaceae* e *Turicibacteraceae*), *Actinobacteria* (genere *Bifidobacterium*) e *Bacteroidetes* (ad esempio *Bacteroides plebeius*) nei gatti con CE. I taxa anaerobi facoltativi *Enterobacteriaceae* e *Streptococcaceae* sono aumentati nei gatti con CE. Non

sono state riscontrate differenze significative tra il microbioma dei gatti con IBD e quelli con SCL. I gatti con CE hanno mostrato modelli di disbiosi simili a quelli delle persone affette da IBD.

5.1 INTRODUZIONE

L'enteropatia cronica felina (CE) è comune nei gatti anziani ed è definita come la presenza di segni clinici di malattia gastrointestinale per più di 3 settimane in assenza di malattie infettive intestinali (ad esempio, parassiti) e di cause extraintestinali (ad esempio, malattia renale, ipertiroidismo)¹.

La CE felina comprende principalmente la malattia infiammatoria intestinale (IBD) e il linfoma a piccole cellule (SCL) [2,3,4].

La diagnosi e la differenziazione possono essere difficili, poiché i segni clinici possono essere praticamente gli stessi in entrambe le entità patologiche [2,5]. La diagnosi clinica di IBD nel gatto si basa sulla presenza di segni gastrointestinali cronici di almeno 3 settimane, sull'assenza di enteropatogeni noti o di altre cause di segni di malattia gastrointestinale e sulla conferma istopatologica dell'infiammazione intestinale ⁶. Pertanto, la diagnosi di IBD e la differenziazione dall'SCL richiedono l'esame istopatologico di biopsie di tessuto raccolte in anestesia generale [7,8]. Nei casi in cui i risultati dell'istopatologia sono ambigui, sono indicate ulteriori modalità diagnostiche come l'immunostochimica e i test di clonalità [3,4,9,10]. La diagnosi di IBD e SCL è quindi complessa, costosa, dispendiosa di tempo e risorse, oltre che invasiva. Il trattamento della IBD e dell'SCL si basa solitamente sull'immunosoppressione con vari steroidi e farmaci citotossici come il clorambucile o la ciclosporina [2,6,11]. Pertanto, sarebbe altamente auspicabile l'adozione di modalità diagnostiche e terapeutiche meno invasive.

Il microbioma intestinale svolge un ruolo sostanziale nella modulazione del sistema immunitario dell'ospite all'interno e

all'esterno del tratto gastrointestinale. Studi condotti su persone [12,13,14] e cani [15,16,17] affetti da IBD hanno rilevato alterazioni nella composizione del microbioma intestinale che potrebbero compromettere lo stato di salute dell'ospite. Queste alterazioni sono comunemente definite disbiosi [14]. Nonostante le variazioni tra studi, specie e individui, la disbiosi intestinale ha dei tratti ricorrenti. Sono stati descritti tre principali tratti distintivi della disbiosi in tre specie diverse: la riduzione della diversità batterica complessiva (diversità alfa)[15,18,19,20], la minore stabilità delle comunità microbiche con un tasso di fluttuazione più elevato nel tempo [21], e una riduzione dei taxa anaerobi obbligati dei phyla *Firmicutes* e *Bacteroidetes* a scapito di un aumento degli anaerobi facoltativi, compresi i membri della famiglia Enterobacteriaceae [15,17,18,19,21,22,23,24]. La disbiosi è stata descritta in persone con varie forme di enteropatia, tra cui la colite ulcerosa, il morbo di Crohn e il cancro del colon-retto, e potrebbe essere un fattore scatenante o una conseguenza dell'infiammazione cronica e della trasformazione maligna [25]. Le IBD feline e l'SCL condividono alcune caratteristiche con le enteropatie croniche dell'uomo. Sia le IBD umane che quelle feline sono caratterizzate da alterazioni infiammatorie croniche del tratto gastrointestinale [3,26]. L'SCL felino è caratterizzato da un'infiltrazione monomorfa della mucosa intestinale con linfociti di piccole e medie dimensioni, soprattutto nell'intestino tenue, spesso associata a epiteliotropismo [4]. Questo aspetto istologico assomiglia a quello del linfoma a cellule T intestinale epiteliotropo monomorfo (MEITL [*Monomorphic Epitheliotropic Intestinal T-cell Lymphoma*]) nelle persone, precedentemente noto come linfoma a cellule T associato a enteropatia di tipo 2 (EATL di tipo 2) [27,28]. Mentre l'SCL è abbastanza comune nei gatti, il MEITL è raro nelle persone, e quindi gli studi intersettoriali di grandi dimensioni sono scarsi [28]. Sia la IBD che l'SCL si manifestano spontaneamente e frequentemente nei gatti, che potrebbero quindi essere un modello interessante per la IBD o il MEITL nell'uomo.

Diversi studi hanno caratterizzato il microbioma fecale in gatti con diarrea acuta e cronica [18,29]. Tuttavia, negli studi precedenti i gatti sono stati classificati in base ai segni clinici senza comprendere il processo patologico sottostante. Questo studio si propone di caratterizzare e confrontare il microbioma fecale in gatti sani e in gatti con CE confermata istopatologicamente (IBD o SCL).

5.2 RISULTATI

5.2.1 DATI DEMOGRAFICI DEGLI ANIMALI E INDICE DI ATTIVITÀ CLINICA

In questo studio sono stati reclutati 65 gatti, 38 sani e 27 con enteropatia cronica (13 con IBD e 14 con SCL). In tutti i gatti è stato raccolto un campione fecale. Le caratteristiche demografiche sono riportate nella Tabella 1.

	Sani	CE felino	Valore p
Numero di gatti	38	27	
Età mediana in anni (range)	9 (1-15)	10 (2-16)	0.052
Peso corporeo mediano in kg (range)	5.4 (2.5-8.6)	4.6 (2.9-10.5)	0.035
Punteggio mediano della condizione corporea (range) [Body Condition Score: BCS]	5 (4-9)	4 (1-9)	<0.0001
Sesso	18 FS, 20 MN	11 FS, 16 MN	0.596
Razze	22 DSH, 4 DLH, 2 Maine Coon, 2 Persiani, 1 Bombay, 1 Burmese, 1 DMH, 1 Gatto delle foreste norvegesi, 1 Lince, 1 razza mista, 1 Sfinge	17 DSH, 3 DMH, 3 Siamesi, 2 DLH, 1 ragdoll, 1 razza mista	

Tabella 1. Confronto dei dati demografici tra gatti sani e gatti con enteropatia cronica felina (FCE). Abbreviazioni: FS femmina sterilizzata, MN maschio sterilizzato, DSH domestic shorthair, DLH domestic longhair, DMH domestic medium hair.

L'età non differiva significativamente tra i gatti sani (età mediana: 9 anni, range: 1-15 anni) e i gatti con CE (età mediana: 10 anni, range: 2-16 anni; $P = 0,052$). I gatti con CE avevano un peso corporeo significativamente inferiore (mediana: 4,6 kg, range: 2,9-10,5 kg), come anche il punteggio di condizione corporea (BCS; mediana: 4, range: 1-9), rispetto ai gatti sani (peso corporeo mediano: 5,4 kg, range: 2,5-8,6 kg, BCS mediano: 5, range: 4-9; $P = 0,035$ e $P < 0,001$, rispettivamente). I gatti con SCL erano significativamente più anziani (età mediana: 11,5 anni, range: 7-16 anni) rispetto ai gatti con IBD (età mediana: 8 anni, range: 2-16; $P = 0,028$). I gatti con IBD e quelli con SCL non presentavano differenze statisticamente significative per quanto riguarda il sesso ($p = 0,816$), il peso corporeo ($p = 0,454$) e il BCS ($p = 0,529$). I gatti con CE avevano un punteggio mediano di 5 nell'indice di attività dell'enteropatia cronica felina (FCEAI) 1 (range: 2-11). Il FCEAI non differiva tra i gatti con IBD (mediana: 6, range: 3-11) e i gatti con SCL (mediana: 5, range: 2-10; $p = 0,838$).

5.2.2 ANALISI DELLE SEQUENZE E RAREFAZIONE

In totale, l'analisi delle sequenze dei 65 campioni fecali ha prodotto 2.837.900 sequenze di qualità (mediana per campione: 73.741; range: 43.660-145.373).

La diversità alfa a una profondità di 43.660 sequenze, descritta dalle OTU osservate, dall'indice di diversità di Shannon e dall'indice di diversità filogenetica di Faith, era significativamente più bassa nei gatti con CE rispetto a quelli sani ($P = 0,003$, $P = 0,008$ e $P = 0,019$, rispettivamente; Fig. 1). Inoltre, la diversità alfa sembrava diminuire continuamente dai gatti sani, passando per i gatti con IBD fino ai gatti con SCL (risultati dell'ANOVA di Kruskal Wallis: OTU osservate $P = 0,015$, indice di Shannon $P = 0,030$, indice di diversità filogenetica $P = 0,049$). Tuttavia, gli

indici di diversità alfa non differivano significativamente tra gatti con IBD e gatti con SCL. I risultati dettagliati per gli indici di diversità alfa sono riportati nella Tabella supplementare 1.

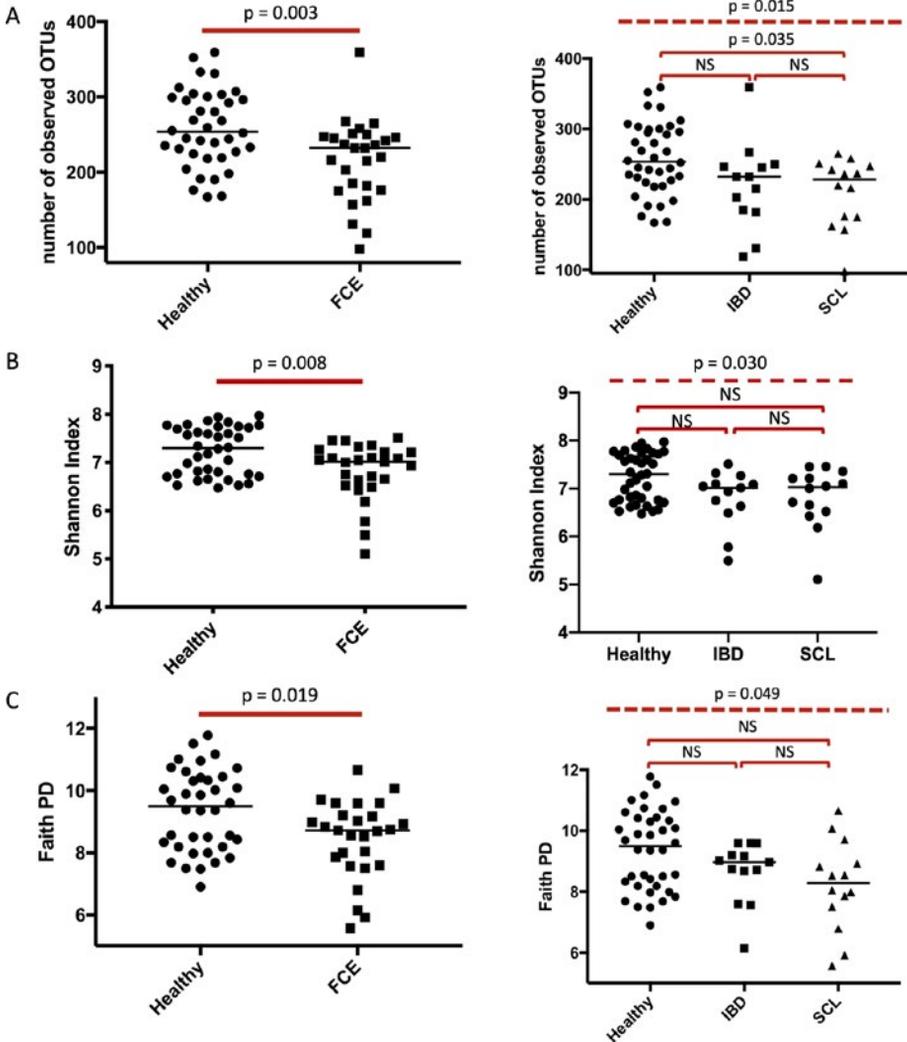


Figura 1. Indici di diversità alfa a una profondità di 43.660 sequenze. (A) OTU osservate. (B) Indice di diversità di Shannon. (C) Indice di diversità filogenetica di Faith. Le figure a sinistra mostrano il confronto tra gatti sani e gatti con enteropatia cronica (FCE). Le figure a destra mostrano il confronto tra diversi sottogruppi di CE, malattia infiammatoria intestinale (IBD) e linfoma a piccole cellule (SCL). La linea tratteggiata in alto rappresenta il confronto ANOVA di Kruskal Wallis, le parentesi piene rappresentano confronti multipli post hoc utilizzando il test di Dunn.

5.2.3 COMUNITÀ MICROBICHE

Sebbene i gatti affetti da CE non abbiano mostrato alcun raggruppamento visibile sull'analisi delle componenti principali (PCoA) rispetto ai gatti sani, è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi in base all'ANOSIM delle distanze Unifrac non ponderate ($P = 0,023$, $R = 0,073$; Fig. 2A). I singoli gruppi batterici sono stati analizzati con il test di Kruskal Wallis. I taxa che sono risultati significativamente diversi prima della correzione per il tasso di falsa scoperta (FDR) sono elencati nella Tabella 2. All'interno del phylum *Firmicutes*, i taxa batterici appartenenti alla famiglia *Ruminococcaceae* (specie non classificate del genere *Oscillospira*) e i membri del genere *Turicibacter* (classe *Bacilli*, ordine *Turicibacterales*, famiglia *Turicibacteraceae*) erano significativamente meno abbondanti nei gatti con CE rispetto ai gatti sani. Inoltre, i gatti con CE avevano popolazioni batteriche significativamente ridotte appartenenti ai phyla *Bacteroidetes* (una specie indeterminata e *Bacteroides plebeius*) e *Actinobacteria* (genere *Bifidobacterium*). Al contrario, i membri delle famiglie *Enterobacteriaceae* e *Streptococcaceae* erano significativamente più abbondanti nelle feci dei gatti con CE. Tuttavia, sebbene siano state rilevate delle tendenze, non sono state riscontrate delle differenze statisticamente significative dopo la correzione per FDR. La Figura 2B-F mostra i risultati dell'analisi statistica per alcuni taxa selezionati.

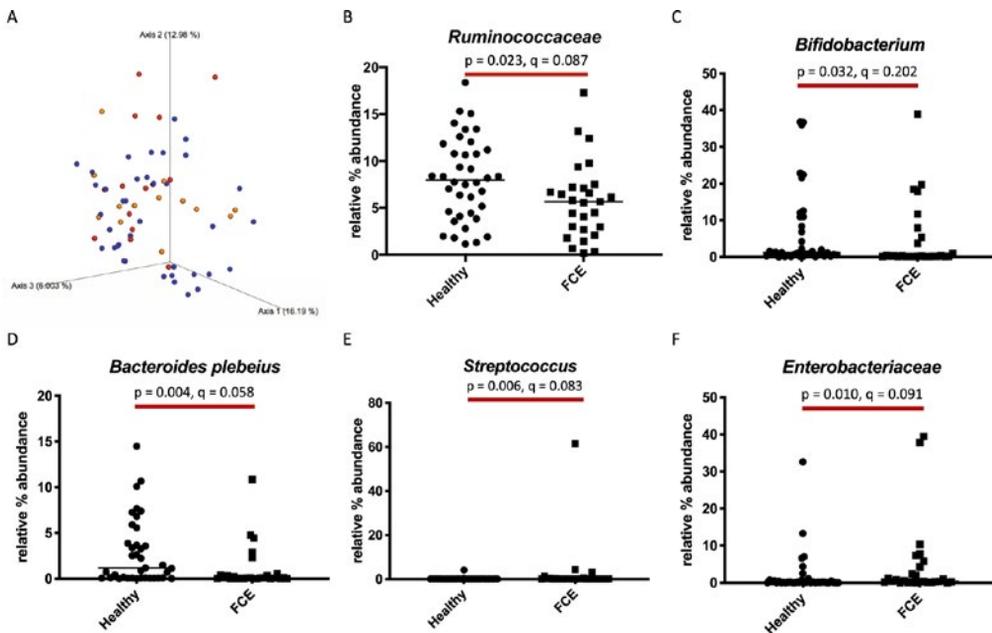


Figura 2. (A) Diversità beta. Analisi delle coordinate principali (PCoA) delle distanze Uni-Frac non ponderate dei geni 16S rRNA. L'analisi della somiglianza (ANOSIM) ha rivelato una differenza significativa tra gatti sani e gatti con enteropatia cronica ($P = 0,023$, $R = 0,073$), anche se con un effetto di piccole dimensioni e senza clustering visibile. I gatti sani sono rappresentati in blu, i gatti con malattia infiammatoria intestinale (IBD) in giallo e i gatti con linfoma a piccole cellule (SCL) in rosso. (B-F) Analisi univariata dell'abbondanza percentuale relativa di taxa selezionati. I membri della famiglia Ruminococcaceae, del genere Bifidobacterium e della specie Bacteroides plebeius sono risultati più bassi nei gatti con enteropatia cronica (CE) rispetto ai gatti sani. I membri del genere Streptococcus e della famiglia Enterobacteriaceae sono risultati più alti nei gatti con CE rispetto ai gatti sani.

Gruppo batterico	Sani		FCE		Sani vs. FCE	
	Mediano	Gamma	Mediano	Gamma	Valore P	Valore Q
Classe						
Actinobatteri	1.2	0-36.8	0.2	0.1-38.9	0.0466	0.2563
Bacteroidia	25.3	1.2-56.4	16.6	0.7-55.3	0.0458	0.2563
Ordine						
Bifidobacteriales	1.2	0-36.8	0.2	0.1-38.9	0.0316	0.14885
Bacteroidales	25.3	1.2-56.4	16.6	0.7-55.3	0.0458	0.14885
Turicibacteriales	0	0-23.7	0	0-5.8	0.0344	0.14885
Enterobacteriales	0.1	0-32.6	0.4	0-39.4	0.0098	0.1274

Famiglia						
Bifidobacteriaceae	1.2	0-36.8	0.2	0.1-38.9	0.0316	0.16053333
Prevotellaceae	1.1	0-21.7	0.5	0-22.5	0.0519	0.1827
Odoribacteraceae	0	0-2.8	0.1	0-1.4	0.0522	0.1827
Paraprevotellaceae	0	0-18.5	0	0-5.6	0.0022	0.0616
Streptococcaceae	0	0-4.1	0.1	0-61.4	0.0059	0.0826
Turicibacteraceae	0	0-23.7	0	0-5.8	0.0344	0.16053333
Ruminococcaceae	8	1.2-18.4	5.7	0.2-17.3	0.0228	0.1596
Enterobacteriaceae	0.1	0-32.6	0.4	0-39.4	0.0098	0.09146667
Genere						
Bifidobacterium	1.2	0-36.8	0.2	0.1-38.9	0.0316	0.2021
Prevotella	0	0-18.5	0	0-5.6	0.0182	0.17108
Streptococco	0	0-4.1	0.1	0-61.4	0.0037	0.08695
Turicibacter	0	0-23.7	0	0-5.8	0.0344	0.2021
Genere indeterminato, Peptostreptococ- caceae	0.3	0-16.6	0.1	0-5.9	0.04	0.2088889
Genere indeterminato, Ruminococcaceae	0.1	0-0.9	0	0-0.5	0.0033	0.08695
Oscillospira	1.1	0.1-3.5	0.7	0-2.2	0.0181	0.17108
Genere indeterminato, Erysipelotrichaceae	0.1	0-0.9	0	0-0.8	0.0241	0.18878333
Genere indeterminato, Enterobacteriaceae	0.1	0-32.6	0.4	0-39.4	0.0081	0.1269
Specie						
Specie indeterminata, Bifidobacterium	1.1	0-35.2	0.2	0-38.6	0.0234	0.13737
Specie indeterminata, Bacteroides	0.1	0-2.3	0	0-0.8	0.0041	0.058425
Specie indeterminata, Bacteroides	10.8	0.3-51	6.5	0.3-47.4	0.3514	0.5271
Bacteroides plebeius	1.2	0-14.5	0.1	0-10.9	0.0039	0.058425
Specie indeterminata, Prevotella	0	0-18.5	0	0-5.6	0.0182	0.129675
Specie indeterminata, Enterococcaceae	0.1	0-5	0	0-1.7	0.1968	0.37791
Specie indeterminata, Streptococco	0	0-4.1	0.1	0-61.4	0.0109	0.10355
Specie indeterminata, Turicibacter	0	0-23.7	0	0-5.8	0.0344	0.1691
Specie indeterminata, Clostridium	0.2	0-10.8	0.9	0.1-20.3	0.0022	0.058425
Specie indeterminata, Ruminococcus	0	0-3.2	0.6	0-2.5	0.0356	0.1691
Specie indeterminata, Peptostreptococ- caceae	0.3	0-16.6	0.1	0-5.9	0.04	0.17538462
Specie indeterminata, Ruminococcaceae	0.1	0-0.9	0	0-0.5	0.0033	0.058425
Specie indeterminata, Oscillospira	1.1	0.1-3.5	0.7	0-2.2	0.0181	0.129675
Specie indeterminata, Erysipelotrichaceae	0.1	0-0.9	0	0-0.8	0.0241	0.13737
Specie indeterminata, Enterobacteriaceae	0.1	0-32.6	0.4	0-39.4	0.0081	0.09234

Tabella 2. Taxa trovati significativamente diversi (valore p) tra gatti sani e gatti con enteropatia cronica (FCE) prima della correzione per la falsa scoperta (valore q). I numeri rappresentano le percentuali relative.

Al contrario, in base all'analisi discriminante lineare (LEfSe), i batteri delle famiglie *Bifidobacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Turicibacteriaceae* e *Paraprevotellaceae* sono stati associati alle feci dei gatti sani, mentre *Enterobacteriaceae* e *Streptococcaceae* sono stati associati a quelle dei gatti con CE. Un riepilogo dettagliato dei risultati di LEfSe è riportato nella Tabella 3.

Livello	Taxa selezionati	Gruppo associato	Punteggio LDA	Sottogruppo associato	Punteggio LDA
Phylum	Bacteroideti	Sano	4.797	Nessuno	NA
Classe	Actinobatteri	Sano	4.562	Sano	4.662
	Bacteroida	Sano	4.74	Nessuno	NA
Ordine	Bifidobacteriales	Sano	4.196	Sano	4.659
	Turicibacterales	Sano	4.356	Nessuno	NA
	Enterobacteriales	FCE	4.302	Nessuno	NA
	Bacteroidales	Sano	4.549	Nessuno	NA
Famiglia	Streptococcaceae	FCE	4.229	SCL	4.425
	Ruminococcaceae	Sano	4.204	Nessuno	NA
	Bifidobacteriaceae	Sano	4.227	Sano	4.394
	Enterobacteriaceae	FCE	4.256	Nessuno	NA
	Paraprevotellaceae	Sano	4.009	Sano	4.116
	Turicibacteraceae	Sano	4.04	Nessuno	NA
	Odoribacteraceae	Nessuno	NA	SCL	4.289
	Prevotellaceae	Nessuno	NA	Sano	3.851
Genere	Erysipelotrichaceae	Sano	3.672	Nessuno	NA
	Oscillospira	Sano	3.534	Nessuno	NA
	Peptostreptococcaceae (non classificate)	Sano	3.594	Nessuno	NA
	Bifidobacterium	Sano	4.293	Sano	4.496
	Turicibacter	Sano	3.632	Nessuno	NA
	Streptococco	FCE	4.119	SCL	4.511
	Paraprevotella	Sano	3.789	Nessuno	NA
	Enterobacteriaceae (non classificato)	FCE	4.226	Nessuno	NA
	Prevotella	Sano	4.109	Sano	4.304
	Coriobacteriaceae (non classificato)	Nessuno	NA	IBD	4.187

Specie	Turicibacter (non classificato)	Sano	3.578	Nessuno	NA
	Streptococco (non classificato)	FCE	4.092	SCL	4.494
	Oscillospira (non classificata)	Sano	3.509	Nessuno	NA
	Bacteroides plebeius	Sano	4.069	Sano	4.285
	Enterobacteriaceae (non classificato)	FCE	4.255	Nessuno	NA
	Paraprevotella (non classificato)	Sano	3.465	Nessuno	NA
	Peptostreptococcaceae (non classificato)	Sano	3.652	Nessuno	NA
	Bifidobacterium (non classificato)	Sano	3.972	Nessuno	NA
	Erysipelotrichaceae (non classificato)	Sano	3.626	Nessuno	NA
	Prevotella copri	Nessuno	NA	Sano	4.258
	Coriobacteriaceae (non classificato)	Nessuno	NA	SCL	4.169

Tabella 3. Analisi lineare dell'effetto dell'analisi discriminante (LEfSE) delle sequenze del gene 16S rRNA.

Il LEfSE è stato calcolato per i gatti sani confrontandolo con quello dei gatti con enteropatia cronica (FCE) e in una seconda fase per i sottogruppi di FCE, malattia infiammatoria intestinale (IBD) e linfoma a piccole cellule (SCL). Il punteggio dell'Analisi Discriminante Lineare (LDA) è espresso in log 10. Sono mostrati solo i taxa che soddisfano un valore soglia significativo di LDA >2.

5.2.4 EFFETTO DEL SOTTOTIPO DI MALATTIA SUL MICROBIOTA FECALE FELINO

Analogamente all'alfa-diversità, la beta-diversità ha mostrato cambiamenti continui nel confronto tra gatti sani, gatti con IBD e gatti con SCL, con aumenti o diminuzioni sequenziali delle percentuali relative tra i gruppi. Secondo i test di Kruskal Wallis, l'abbondanza di membri del genere *Bifidobacterium* (classe *Actinobacteria*) differiva significativamente tra i tre gruppi, con numeri più alti nei gatti sani e più bassi nei gatti con SCL. Al contrario, i batteri delle famiglie *Enterobacteriaceae* (phylum *Proteobacteria*) e *Streptococcaceae* (phylum *Firmicutes*) sono aumentati in serie dai gatti sani, ai gatti con IBD e ai gatti con SCL. Tuttavia, dopo la correzione per il tasso di falsa scoperta (FDR [*False Discovery Rate*]), nessuna delle differenze è rimasta statisticamente significativa. Inoltre, non sono state osservate differenze significative

nelle comunità microbiche tra gatti con IBD e gatti con SCL. Un riepilogo dettagliato delle percentuali relative dei gruppi batterici più abbondanti è riportato nella Tabella 2 supplementare.

5.3 DISCUSSIONE

A nostra conoscenza, questo è il primo studio che confronta il microbioma fecale di una coorte di gatti con CE spontanea confermata istopatologicamente con quello di gatti clinicamente sani, utilizzando analisi di sequenziamento Illumina non mirate. La diversità alfa è risultata significativamente più bassa nei gatti con CE rispetto ai gatti sani. In particolare, i gatti con CE tendevano a mostrare una minore abbondanza di membri anaerobi obbligati dei phyla Firmicutes (famiglia *Ruminococcaceae* e *Turicibacteraceae*), Bacteroidetes (ad esempio *Bacteroides plebeius* e specie non classificate) e Actinobacteria (genere *Bifidobacterium*). Al contrario, gli anaerobi facoltativi come le *Enterobacteriaceae* e le *Streptococcaceae* tendevano a essere più abbondanti nei gatti con CE rispetto ai gatti sani. Tuttavia, sebbene abbiamo riscontrato differenze nell'abbondanza di vari taxa batterici tra i diversi gruppi di gatti, non ci sono state differenze statisticamente significative dopo la correzione per FDR. Tuttavia, le tendenze riscontrate nella nostra coorte di gatti rispecchiano i modelli comuni di disbiosi fecale e mucosale descritti in altre specie, come gli esseri umani [19,21,22,23,24] e i cani [15,17,30], ossia una diminuzione della diversità batterica, una diminuzione dei membri degli anaerobi obbligati (*Firmicutes* e *Bacteroidetes*) e un aumento degli anaerobi facoltativi (soprattutto della famiglia delle *Enterobacteriaceae*). La disbiosi è stata documentata nell'uomo con varie enteropatie, come IBD (colite ulcerosa e morbo di Crohn), diarrea associata ad antibiotici, enterocolite necrotizzante e cancro del colon-retto [14,31] e anche nei cani con enteropatie croniche [16,30,32]. I pattern disbiotici sembrano essere simili tra le diverse forme di enteropatia; tuttavia, data la rarità della malattia, non sono stati pubblicati studi sul microbioma delle

persone affette da MEITL. Un recente studio che ha analizzato il microbioma delle feci di cani con IBD o linfoma intestinale e di cani sani ha rilevato che la disbiosi è associata a entrambe le patologie [32]. Come nello studio attuale, gli autori hanno utilizzato un approccio di sequenziamento Illumina non mirato per caratterizzare il microbioma fecale. Gli autori hanno riportato una maggiore abbondanza di *Coprococcus*, *Oscillospira* ed *Eubacteria* nei cani con linfoma intestinale rispetto ai cani sani. Questi risultati potrebbero indicare differenze di specie nel fenotipo e nell'eziopatogenesi della malattia.

Un'attività che tutto il microbioma intestinale svolge è il metabolismo e la fermentazione dei carboidrati in acidi grassi a catena corta, come acetato, butirrato e propionato. I membri del phylum *Firmicutes* sono per lo più anaerobi e hanno dimostrato di esercitare effetti antinfiammatori e immunomodulatori indiretti producendo acidi grassi a catena corta, in particolare butirrato [14]. Il butirrato è la principale fonte di energia dei colonociti [33] e contribuisce alla proliferazione e alla riparazione delle cellule epiteliali e all'integrità della barriera intestinale [34]. Inoltre, è dimostrato che il butirrato può avere proprietà antinfiammatorie e anticancerogene [35,36]. I principali batteri produttori di butirrato nel colon umano appartengono alle famiglie *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* (phylum *Firmicutes*) e la loro abbondanza fecale nelle persone è spesso ridotta negli stati disbiotici, tra cui UC e CD [21,37]. Il nostro report sembra essere il primo a mostrare una deplezione di batteri produttori di butirrato nei gatti con CE. La determinazione dell'associazione tra l'abbondanza fecale di *Ruminococcaceae* e la concentrazione di butirrato nei gatti con CE potrebbe chiarire ulteriormente la funzione di questo taxon nei gatti con CE.

Un altro importante segno distintivo della disbiosi coinvolge i membri del phylum *Bacteroides*. I *Bacteroides* sono molto abbondanti nel microbioma sano, ma sono ridotti nel microbioma mucosale o fecale di esseri umani e cani con varie forme di enteropatia [17,19,22]. È interessante notare che *Bacteroides plebeius* è stato trovato fortemente associato alla remissione nelle persone

con CD 38. Nella nostra coorte, i *Bacteroidetes* e in particolare *Bacteroides plebeius* tendevano a diminuire nei gatti con CE. L'analisi dell'associazione tra esito della malattia e abbondanza di *Bacteroides plebeius* potrebbe essere interessante per studi futuri sui gatti con CE.

Il nostro studio ha mostrato una tendenza alla diminuzione dell'abbondanza di Bifidobatteri nei gatti con IBD e SCL. I Bifidobatteri sono comunemente ridotti anche nei campioni fecali e di mucosa di pazienti umani affetti da IBD [14,39]. È stato dimostrato che diversi ceppi di Bifidobatteri esercitano proprietà antinfiammatorie regolando le cellule immunitarie e le reti di citochine [40] e migliorando direttamente e indirettamente la funzione della barriera intestinale [41,42]. Ad esempio, è stato dimostrato che i ceppi di *Bifidobacterium* inducono le cellule T regolatorie produttrici di IL-10 [43,44] ed esercitano effetti immunoinibitori interagendo con il recettore Toll-like-2 [45]. Pertanto, i *bifidobatteri* sono diventati un interessante bersaglio terapeutico e sono spesso utilizzati nelle formulazioni probiotiche [46]. Il nostro studio conferma i risultati di uno studio precedente che utilizzava l'ibridazione *in situ* a fluorescenza, in cui era stata segnalata una diminuzione delle *Bifidobacteriaceae* nei campioni fecali dei gatti con IBD. Per quanto ne sappiamo tale diminuzione non è stata documentata nei cani. Ciò evidenzia la differenza tra le specie e potrebbe indicare i *Bifidobatteri* come potenziali bersagli terapeutici nei gatti con CE.

Oltre a una diminuzione dei batteri anaerobi obbligati, la disbiosi è comunemente caratterizzata da un aumento dei batteri anaerobi facoltativi, in particolare dei membri della famiglia delle Enterobacteriaceae [14,47,48]. Questo fenomeno potrebbe essere spiegato dal modello del gradiente di ossigeno [49,50]. In questo modello si ipotizza che, durante uno stato stazionario, il microbioma mucosale sia controllato dalle risposte immunitarie della mucosa, dalla barriera intestinale e dalla competizione con i batteri luminali. La mucosa intestinale presenta un gradiente di ossigeno in cui l'interfaccia mucosale è prevalentemente aerobica mentre il lume è prevalentemente anaerobico. Si ritiene che

durante l'infiammazione la barriera intestinale si rompe, aumentando così la tensione di ossigeno luminale. Questo porta alla traslocazione e all'espansione dei taxa aerotolleranti, solitamente localizzati vicino alla mucosa, in modo centripeto nel lume e centrifugo attraverso la barriera epiteliale nella lamina propria, contribuendo alla risposta infiammatoria [49,50]. La nostra coorte di gatti ha seguito questo schema, con una tendenza a una maggiore abbondanza di taxa anaerobi facoltativi, in particolare *Enterobacteriaceae* e *Streptococcaceae*. Entrambi i taxa sono tipicamente costituiti da membri anaerobi facoltativi e quindi potrebbero prosperare con una maggiore tensione di ossigeno luminale. Una maggiore abbondanza di *Streptococcaceae* è stata precedentemente documentata nelle feci di persone e cani affetti da IBD [51,52].

Il nostro studio presenta diverse limitazioni. Per quanto riguarda i criteri di reclutamento, dei 38 gatti di controllo reclutati in questo studio, 22 sono stati sottoposti a un esame fisico e a test di laboratorio per verificare il loro stato di salute, mentre 16 sono stati classificati come sani solo in base alle risposte del proprietario a un questionario. Inoltre, la diagnosi clinica di IBD si è basata sulla presenza di problemi gastrointestinali cronici da almeno 3 settimane, sull'assenza di enteropatogeni noti o di altre cause di segni di malattia gastrointestinale e sulla conferma istopatologica dell'infiammazione intestinale [6]. In nessuno dei gatti è stata esclusa un'enteropatia sensibile al cibo. Tuttavia, molti pazienti umani con IBD mostrano risposte complete o parziali agli interventi dietetici senza essere riclassificati come affetti da enteropatia che risponde al cibo [53,54,55,56]. Il nostro studio mirava a caratterizzare le differenze clinicamente rilevanti tra il microbioma fecale dei gatti con CE rispetto ai gatti sani di controllo. Abbiamo controllato le caratteristiche demografiche come l'età, il sesso e la razza. I fattori ambientali, come l'alloggio, la dieta, precedenti infezioni parassitarie o sistemiche, ecc. non sono stati controllati in questo studio perché avrebbero influenzato la rilevanza clinica dei risultati. Questo concetto è supportato da studi recenti che hanno dimostrato come la standardizzazione

sia una delle principali fonti di scarsa riproducibilità degli studi preclinici [57,58].

Per quanto riguarda i risultati di questo studio, è necessario riconoscere le seguenti limitazioni. Sebbene siano state riscontrate differenze nell'abbondanza di vari taxa batterici tra i diversi gruppi di gatti, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative dopo la correzione per FDR, e quindi le differenze non sembrano essere così forti come sono state riportate per gli esseri umani e i cani. Questo fenomeno potrebbe essere spiegato dai diversi fenotipi della malattia. Mentre la diarrea è il segno clinico predominante dell'enteropatia cronica nell'uomo [59] e nel cane [60,61], essa è meno comune nei gatti, nei quali la perdita di peso, l'iporessia e il vomito sono i segni clinici dominanti della CE [1,2]. Nella nostra coorte di gatti, solo 5 gatti su 27 hanno avuto la diarrea. La ragione dei diversi fenotipi di malattia nell'uomo, nel cane e nel gatto non è del tutto chiara, ma i fattori possono includere una diversa localizzazione della malattia (cioè piccolo o grande intestino) e una diversa fisiopatologia della malattia. Nei gatti è spesso coinvolto il tratto intestinale tenue [1,2,4], ma il microbioma fecale rappresenta prevalentemente comunità batteriche presenti nella parte distale del tratto intestinale [62]. Inoltre, il microbioma fecale potrebbe non rappresentare accuratamente il microbioma associato alla mucosa [62]. Pertanto, l'analisi del contenuto luminale dell'intestino tenue o del microbioma della mucosa potrebbe rivelare differenze più evidenti nelle comunità microbiche dei gatti rispetto a questo studio sui campioni fecali. Tuttavia, un recente studio che ha confrontato il microbioma fecale e quello mucosale di pazienti umani con e senza IBD ha rilevato ampie sovrapposizioni tra i due habitat microbici in ciascun gruppo [49]. Anche se è importante sottolineare che le IBD nell'uomo sono prevalentemente una malattia dell'intestino crasso. Uno studio recente, che ha confrontato il microbioma associato alla mucosa nei gatti con CE utilizzando un'analisi mirata mediante ibridazione *in situ* a fluorescenza, ha riscontrato un numero significativamente maggiore di *Bacteroides spp.* nelle biopsie ileali di gatti con SCL rispetto alle biopsie

di gatti con IBD [63]. Questi risultati sottolineano ulteriormente le possibili differenze tra i compartimenti intestinali (piccolo o grande intestino) e i mezzi di comunicazione (ad esempio, microbioma fecale o associato alla mucosa). Non possiamo inoltre escludere che un campione di dimensioni maggiori avrebbe rivelato differenze statisticamente significative dopo la correzione FDR. Infine, le modalità e la velocità di raccolta e trattamento delle feci erano leggermente diverse tra i gruppi e gli individui e potrebbero aver influito sui nostri risultati.

La differenziazione tra IBD e SCL nel gatto può essere difficile, poiché i segni clinici e le alterazioni della mucosa intestinale possono essere sovrapposti [3]. Inoltre, le alterazioni della mucosa possono avere una distribuzione non uniforme, l'infiammazione e le lesioni neoplastiche possono coesistere e si è ipotizzato che le lesioni infiammatorie possano progredire nel tempo verso il linfoma [3,4]. Pertanto, ogni classificazione in gruppi di IBD e SCL è associata a un certo grado di incertezza. Tuttavia, tutti i gatti del gruppo CE sono stati sottoposti a gastroduodenoscopia e ileoscopia. Inoltre, sono stati applicati l'immunoistochimica e il test di clonalità, dove indicato, per garantire la massima accuratezza nell'assegnazione delle classi.

Oggi l'istopatologia, l'immunoistochimica e i test di clonalità su campioni intestinali sono considerati la procedura standard per differenziare le lesioni infiammatorie da quelle neoplastiche [10]. Tuttavia, l'esame istopatologico delle biopsie di tessuto intestinale di cani e gatti varia molto da un osservatore all'altro [64]. Inoltre, uno studio recente ha dimostrato che anche i gatti anziani e sani possono presentare reperti istopatologici anomali senza alcun apparente significato clinico [65]. Pertanto, sarebbero auspicabili metodi alternativi per la diagnosi e la differenziazione delle IBD felina e dell'SCL. Non abbiamo trovato alcun taxa batterico la cui abbondanza differisse significativamente tra gatti con IBD e SCL. Tuttavia, molti taxa batterici sembravano aumentare (ad esempio, *Enterobacteriaceae*) o diminuire (ad esempio, *Actinobacteria*, *Bifidobacteria*, *Prevotella*) nel confronto tra gatti sani, gatti con IBD e gatti con SCL. Analogamente, da tempo

si sospetta la progressione di IBD verso SCL nell'arco di mesi o anni e le lesioni infiammatorie spesso coesistono con SCL [4,9]. I nostri risultati potrebbero avvalorare l'ipotesi che IBD e SCL non siano due malattie diverse, ma piuttosto un continuum.

In sintesi, abbiamo scoperto che i gatti con CE mostrano modelli di disbiosi precedentemente descritti nelle persone con IBD. I taxa anaerobi obbligati nei phyla Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria erano ridotti nei gatti con CE, mentre gli anaerobi facoltativi come le *Enterobacteriaceae* e le *Streptococcaceae* erano più abbondanti. *Bacteroides plebeius*, una specie che si è dimostrata associata a un esito positivo nelle persone affette da MC, era diminuita nella nostra coorte di gatti.

5.4 METODI

5.4.1 ANIMALI

[...]

Lo stato di salute dei gatti del gruppo considerato sano è stato verificato tramite un questionario per il proprietario sulla salute generale e gastrointestinale. Il questionario riguardava le seguenti aree: atteggiamento/attività, appetito, bere, minzione, malattie croniche, perdita di peso, vomito, diarrea e trattamento con antibiotici, antiacidi, farmaci antinfiammatori o steroidi. In 22 gatti, l'esame fisico è stato eseguito da un singolo internista certificato (SM). Il punteggio della condizione corporea è stato valutato utilizzando un sistema di punteggio a nove punti precedentemente stabilito [66]. Il sangue è stato prelevato da una vena periferica o dalla vena giugulare e sono stati eseguiti i seguenti esami: emocromo completo, profilo chimico sierico, T4 totale, cobalamina, folati, immunoreattività alla lipasi pancreatica felina (fPLI) e immunoreattività alla tripsina felina (fTLI). Sono stati esclusi i gatti con segni gastrointestinali (perdita di peso, ipopressia, vomito per più di 2 volte al mese, diarrea) nei 6 mesi precedenti allo studio. Inoltre, sono stati esclusi i gatti con malattie sistemiche, malat-

tie croniche o anomalie di laboratorio clinicamente significative. Infine, sono stati esclusi i gatti che avevano assunto antibiotici, antiacidi, antinfiammatori o corticosteroidi negli ultimi 6 mesi.

I gatti con segni clinici di enteropatia cronica (perdita di peso, iporessia, vomito, diarrea) di almeno 3 settimane potevano stare nel gruppo CE. I gatti di questo gruppo sono stati presentati al Small Animal Hospital della Texas A&M University, College Station, Texas, o al Veterinary Specialty Hospital, San Diego, California. Sono state escluse le malattie non gastrointestinali e le possibili malattie infettive intestinali sulla base dell'emocromo completo, del profilo chimico del siero, del T4 totale e dell'esame fecale. Tutti i gatti di questo gruppo sono stati sottoposti a gastro-duodenoscopia e ileo-colonscopia a scopo diagnostico. L'esame istopatologico di sezioni di tessuto endoscopico fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), colorato con H&E, è stato eseguito da patologi certificati (MA o JSE) ed era in cieco rispetto allo stato clinico dei gatti.

I casi con diagnosi istopatologica di SCL o in cui il patologo sospettava una SCL sottostante sono stati sottoposti a ulteriori test diagnostici con immunoistochimica e PCR per il riarrangiamento del recettore dell'antigene per la conferma diagnostica. La diagnosi finale di IBD o SCL è stata raggiunta integrando i risultati dell'istopatologia, dell'immunoistochimica e della PARR sulla base delle attuali linee guida EuroClonality/BIO-MED-2 per l'interpretazione e la refertazione dei test di clonalità Ig/TCR nelle linfoproliferazioni sospette [10,67,68]. I gatti che avevano ricevuto antibiotici entro 4 settimane o corticosteroidi nelle ultime 2 settimane prima del campionamento fecale sono stati esclusi dallo studio.

I campioni fecali provenienti da gatti sani sono stati raccolti spontaneamente, refrigerati e spediti al Texas A&M Gastrointestinal Laboratory entro 24 ore dalla raccolta. I campioni fecali di gatti affetti da CE sono stati raccolti dopo lo svuotamento spontaneo o manuale mentre il gatto era sotto anestesia per l'endoscopia. Tutti i campioni sono stati spediti in confezioni fredde o con ghiaccio secco. All'arrivo, i campioni fecali sono

stati immediatamente trasferiti in un tampone di lisi ed è stato estratto il DNA utilizzando il kit Mobio Power Soil DNA Extraction (MoBio Laboratories, Inc., CA) seguendo le istruzioni del produttore.

L'amplificazione e il sequenziamento della regione variabile V4 del gene 16 S rRNA sono stati eseguiti utilizzando la piattaforma Illumina MiSeq Sequencing.[...]

6 - LA DISBIOSI INTESTINALE E LA SUA ASSOCIAZIONE CON I METABOLITI DERIVATI DAL MICROBIOTA INTESTINALE NEI CANI CON MALATTIA MIXOMATOSA DELLA VALVOLA MITRALE

Tratto e tradotto da

Li Q, Larouche-Lebel E, Loughran KA, Huh TP, Suchodolski

JS, Oyama MA. 2021. *Gut dysbiosis and its associations with gut microbiota-derived metabolites in dogs with myxomatous mitral valve disease*. *mSystems* 6: e00111-21.



<https://doi.org/10.1128/mSystems.00111-21>

Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

La disbiosi intestinale e i metaboliti derivati dal microbiota intestinale, tra cui gli acidi biliari (BA), gli acidi grassi a catena corta e l'*N*-ossido di trimetilammina (TMAO), sono associati alle malattie cardiovascolari. La malattia mixomatosa della valvola mitrale (MMVD [*Myxomatous Mitral Valve Disease*]) dei canini è un modello per la MMVD umana. Lo scopo dello studio è valutare la disbiosi microbica intestinale e la sua relazione con i metaboliti prodotti dall'intestino dei cani con MMVD. Sono stati analizzati mediante sequenziamento del 16S rRNA i campioni fecali di 92 cani di proprietà privata, tra cui 17 cani sani, 23 e 27 cani MMVD asintomatici senza ingrandimento cardiaco secondario (stadio B1) e con ingrandimento (stadio B2) e 25 cani MMVD con storia di insufficienza cardiaca congestizia (stadio C o D). Le diversità alfa e beta erano diverse tra i cani sani e quelli con MMVD ($P < 0,05$ aggiustato). Gli indici medi di disbiosi erano -1,48, -0,6, 0,01 e 1,47 rispettivamente per i cani sani, B1, B2 e C/D ($P = 0,07$). L'indice di disbiosi era correlato negativamente con *Clostridium hiranonis* ($P < 0,0001$, $r = -0,79$).

L'*Escherichia coli*, in grado di produrre trimetilammina nell'intestino, aveva un'abbondanza maggiore ($P < 0,05$ aggiustato) e potrebbe essere responsabile dell'aumento dei livelli circolanti di TMAO nei cani MMVD di stadio B2 e C/D. I BA primari e secondari hanno mostrato associazioni opposte con *C. hiranonis*, un importante convertitore di BA ($P < 0,0001$ per entrambi, $r = -0,94$ e $0,95$, rispettivamente). I BA secondari sembrano promuovere la crescita di *Fusobacterium* e *Faecalibacterium* ma inibiscono quella di *E. coli*. L'analisi multivariata ha rivelato associazioni significative ma deboli tra il microbiota intestinale e diversi metaboliti circolanti, tra cui acilcarnitine a catena corta e TMAO.

IMPORTANZA: Il nostro studio amplia l'attuale "ipotesi intestinale" includendo la disbiosi intestinale in fase preclinica, prima dell'insorgenza dell'insufficienza cardiaca. L'indice di disbiosi intestinale aumenta in proporzione alla gravità della malattia mixomatosa della valvola mitrale (MMVD) ed è inversamente associato al *Clostridium hiranonis*, un importante convertitore di acidi biliari (BA) nell'intestino. I BA secondari sembrano promuovere la crescita di batteri benefici ma inibire quella di batteri dannosi. È implicata un'intricata interazione tra il microbiota intestinale, i metaboliti prodotti dal microbiota intestinale e la progressione fisiopatologica della MMVD.

6.1 INTRODUZIONE

La malattia mixomatosa della valvola mitrale (MMVD) nei cani è una comune patologia cardiaca naturale caratterizzata da una progressiva degenerazione mixomatosa della valvola mitrale (1, 2). I cani affetti da MMVD hanno in genere un lungo periodo preclinico prima di progredire allo stadio clinico e rivelare segni clinici evidenti di insufficienza cardiaca congestizia (CHF). Secondo la linea guida di consenso dell'*American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)*, i cani allo stadio preclinico con MMVD asintomatica un ingrossamento cardiaco assente o lieve sono identificati come stadio B1, mentre quelli con rimodellamento cardiaco avanzato e rigurgito mitralico grave sono classi-

ficati come stadio B2. I cani con MMVD e segni clinici di CHF sono classificati come stadio C o D (3). La MMVD canina è considerata un modello per la MMVD umana perché condivide con questa molte somiglianze molecolari e fisiopatologiche (4, 5). I fattori che contribuiscono alla patogenesi e alla progressione della MMVD rimangono poco chiari.

Recentemente, due gruppi indipendenti hanno riportato concentrazioni in circolo più elevate di *N-ossido di trimetilammina* (TMAO) e dei suoi precursori nutritivi nei cani con MMVD e CHF, se confrontati con cani preclinici o sani (6, 7). Anche nei cani preclinici è stato osservato un aumento delle concentrazioni di TMAO e dei suoi precursori in circolazione rispetto ai cani sani (7). Tuttavia, non è chiaro se questi aumenti siano la causa o la conseguenza della MMVD o dell'insufficienza cardiaca nei cani.

Dal primo studio che ha messo in relazione le malattie cardiovascolari con la TMAO e i suoi precursori nutrizionali (8), molteplici vie dipendenti dal microbiota intestinale, tra cui la via della trimetilammina (TMA)/TMAO, la via degli acidi grassi a catena corta (SCFA) e le vie primarie e secondarie degli acidi biliari (BA), sono state implicate nello sviluppo e nella progressione delle malattie cardiovascolari (9-11). Il microbiota intestinale metabolizza dei nutrienti dietetici come l-carnitina, fosfatidilcolina e colina per produrre TMA, che entra nella circolazione dell'ospite dove un ulteriore metabolismo da parte di enzimi epatici produce TMAO (8, 9, 12). L'ipotesi del "leaky gut", relativa all'insufficienza cardiaca, sostiene che l'edema della parete intestinale e l'alterata funzione della barriera intestinale portino alla traslocazione di metaboliti batterici intestinali nel flusso sanguigno dell'ospite, con conseguente aumento dell'infiammazione sistemica (9). L'osservazione di un'elevata concentrazione di TMAO in circolo nei cani con MMVD asintomatica suggerisce che il "leaky gut" inizia prima dell'insorgenza dell'insufficienza cardiaca (7). Un altro gruppo di metaboliti che ha ricevuto una notevole attenzione nelle malattie cardiovascolari è quello dei BA, che facilitano l'assorbimento intestinale dei grassi alimentari e di altre molecole liposolubili. I BA primari, come l'acido co-

lico (CA) e l'acido chenodeossicolico (CDCA), sono sintetizzati dal colesterolo nel fegato (13). La maggior parte dei BA primari viene riassorbita nell'ileo tramite trasporto attivo, mentre una piccola quantità viene riciclata nell'intestino superiore tramite diffusione passiva (14). I rimanenti BA primari non riciclati vengono ulteriormente metabolizzati per produrre BA secondari, tra cui l'acido desossicolico (DCA), l'acido litocolico (LCA) e l'acido ursodesossicolico (UDCA) dal microbiota intestinale nel colon (15, 16). Questo pool di BA chimicamente diversificati regola il metabolismo energetico e altri processi fisiologici attraverso molteplici vie di segnalazione mediate dai recettori che rispondono ai BA, tra cui il recettore di membrana accoppiato a proteine G 5 (TGR5) e il recettore nucleare farnesoide (FXR) (13, 17). Inoltre, il microbiota intestinale può produrre grandi quantità di SCFA attraverso la fermentazione anaerobica. Una parte significativa degli SCFA derivati dall'intestino viene assorbita in circolo per regolare vari processi biologici attraverso vie di segnalazione mediate da recettori accoppiati a proteine G. Recentemente, è stato dimostrato che gli SCFA modulano la pressione sanguigna e prevengono lo sviluppo di insufficienza cardiaca in modelli di roditori (18, 19). Mentre sono stati compiuti molti progressi nella comprensione del ruolo della disbiosi microbica intestinale sulle malattie cardiache negli esseri umani e nei modelli di roditori, sono state condotte poche ricerche nei cani.

Un recente studio ha confrontato i cambiamenti del microbiota intestinale tra 15 cani di controllo sani e 35 cani con CHF, rivelando cambiamenti nella composizione microbica (20). In questo studio abbiamo analizzato la relazione tra la disbiosi microbica intestinale e i metaboliti circolanti, nonché i metaboliti derivati dall'intestino, come i BA e gli SCFA, in cani sani, cani con MMVD preclinica e cani con CHF secondaria a MMVD. Abbiamo testato le nostre ipotesi che i cambiamenti nel microbiota intestinale si verificano precocemente durante la progressione della MMVD e che questi cambiamenti siano associati a metaboliti dipendenti dal microbiota intestinale.

6.2 RISULTATI

Il sequenziamento del gene 16S rRNA è stato eseguito sul DNA genomico fecale di 92 cani di proprietà privata (Tabella 1). Tra questi vi erano 17 cani sani (gruppo A), 23 cani di stadio B1 e 27 di stadio B2 con MMVD asintomatica (gruppi B1 e B2, rispettivamente) e 25 cani con MMVD e storia di CHF (gruppo C/D). Non è stata riscontrata alcuna differenza di età, tranne che tra il gruppo A e il gruppo C/D ($P < 0,05$). Non sono state osservate differenze di peso corporeo, punteggio di condizione corporea (BCS) o sesso. Sono state ottenute 12,6 milioni di sequenze a *paired-end*. La lunghezza mediana della sequenza dopo il taglio e il filtraggio era di 443 nucleotidi, con un intervallo interquartile (IQR) compreso tra 440 e 461 nucleotidi.

Caratteristica	Fase ACVIM ^a				Valore P ^b
	A	B1	B2	C/D	
Dimensione del campione (N = 92)	17	23	27	25	
Sesso (maschio/femmina)	8/9	17/6	16/11	15/10	0.39
Età (anni)	8.9 ± 0.5	10.3 ± 0.4	10.2 ± 0.4	11.5 ± 0.3	<0.001
Peso corporeo (kg)	10.4 ± 1.0	9.2 ± 0.8	8.1 ± 0.6	7.8 ± 0.8	0.14
BCS (1-9) ^c	5.1 ± 0.1	5.5 ± 0.2	5.6 ± 0.2	5.1 ± 0.2	0.28
Farmaci cardiaci (n) ^d					
Pimobendan	0	4	19	23	
Furosemide (Lasix)	0	1	2	21	
ACE inibitori	0	0	5	18	
Spironolattone	0	0	1	13	
Ecocardiografia					
nLVIDd (cm)	1.43 ± 0.03	1.50 ± 0.04	1.84 ± 0.05	2.11 ± 0.08	<0.001
nLVIDs (cm)	0.87 ± 0.04	0.86 ± 0.03	0.90 ± 0.04	1.00 ± 0.06	0.12
nLAD (cm)	0.98 ± 0.03	1.02 ± 0.03	1.32 ± 0.05	1.52 ± 0.07	<0.001
LA/Ao	1.38 ± 0.04	1.40 ± 0.05	1.77 ± 0.08	2.27 ± 0.1	<0.001

Tabella 1. Caratteristiche fisiche, ecocardiografia e farmaci cardiaci comuni dei cani.

^a - ACVIM, American College of Veterinary Internal Medicine. Le variabili continue sono riportate come medie ± errori standard.

b – I valori *P* derivano da test ANOVA.

c – BCS: Punteggio di condizione corporea [Body Condition Score].

d – Undici cani del gruppo A, 9 cani del gruppo B1 e 1 cane del gruppo C/D non disponevano di informazioni sui farmaci cardiaci. ACE: enzima di conversione dell'angiotensina.

e – Tre cani del gruppo A non disponevano di dati ecocardiografici. nLVIDd, diametro interno del ventricolo sinistro normalizzato alla fine della diastole; nLVIDs, diametro interno del ventricolo sinistro normalizzato alla fine della sistole; nLAD, diametro atriale sinistro normalizzato; LA/Ao, rapporto tra diametro atriale sinistro e diametro della radice aortica.

Sono state identificate 528 unità tassonomiche operative (OTU) con classificazioni tassonomiche note e sono state calcolate le loro abbondanze (vedi [Tabella S1](#), scheda 1, nel materiale supplementare). Sulla base delle abbondanze delle OTU sono state calcolate anche le abbondanze dei taxa in base a phylum, classe, ordine e famiglia ([Tabella S1](#), scheda 2).

6.2.1 DIVERSITÀ ALFA E BETA

Sono stati calcolati gli indici di diversità alfa basati sulla metrica della diversità filogenetica (PD) di Faith e il numero di specie distinte ([Fig. 1A e B](#) e [Tabella S1](#), scheda 3). Sono state osservate differenze significative in entrambi gli indici tra il gruppo A e i tre gruppi MMVD ($P < 0,05$ aggiustato in tutti i casi).

Sono stati osservati cambiamenti significativi nelle distanze di Bray-Curtis (BC) tra i gruppi utilizzando il test di analisi multivariata permutazionale della varianza (PERMANOVA) ($P = 0,008$) ([Fig. 2A](#); [Tabella S1](#), scheda 4). Sono state osservate differenze tra il gruppo A e il gruppo B2 e tra il gruppo C/D (PERMANOVA, $P = 0,013$ e $0,005$, rispettivamente). Ma la differenza tra il gruppo A e il gruppo B1 non ha raggiunto la significatività statistica ($P = 0,06$). Sulla coordinata principale 1 (PC1), che rappresentava il 22,1% della varianza dei dati, è stata osservata una differenza tra il gruppo A e il gruppo C/D ($P = 0,038$) ([Fig. 2B](#)). Non è stata riscontrata alcuna differenza sulla PC2.

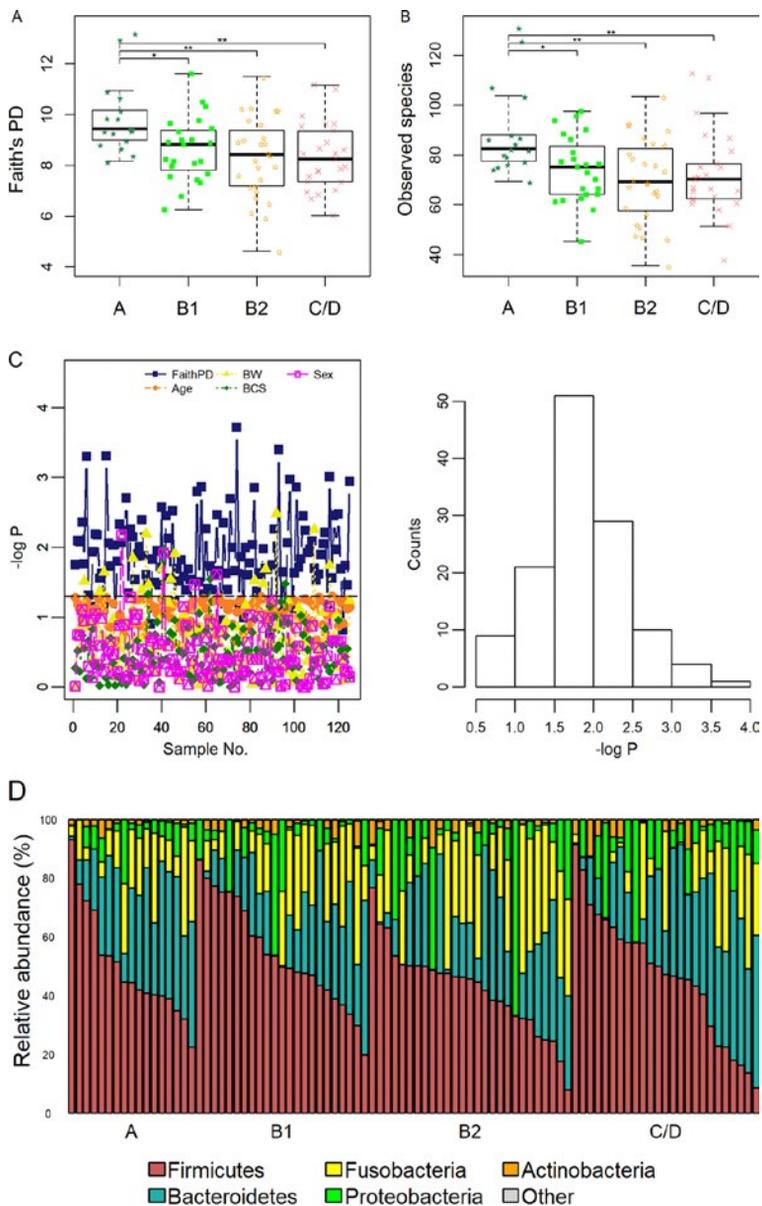


Figura 1. Indice di diversità filogenetica (PD) di Faith (A) e numero di specie batteriche uniche (B). I valori di P derivano dai test post hoc di Tukey dopo l'ANOVA. (C) Tenta-

tivi di bootstrap. Sono mostrati solo i sottocampioni senza differenze di età. Distribuzioni dei valori P dell'indice PD di Faith, del peso corporeo (BW), dell'età, del punteggio di condizione corporea (BCS) e del sesso da uno studio bootstrap (sinistra) e istogramma dei valori P dell'indice PD di Faith (destra). I valori P sono espressi come $-\log_{10} P$. (D) Grafici a barre dei cinque phyla predominanti. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

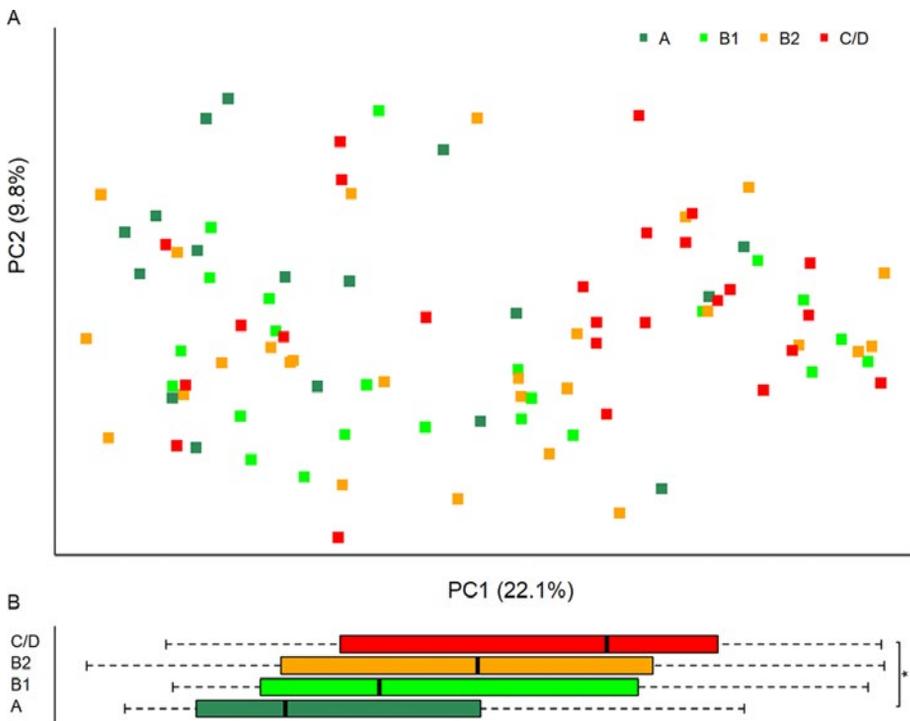


Figura 2. (A) Analisi delle coordinate principali sulla distanza Bray-Curtis dei quattro gruppi. Sono mostrate le prime due coordinate principali (PC), PC1 e PC2. Gli assi x e y indicano le varianze dei dati catturate rispettivamente da PC1 e PC2. (B) Box plots di PC1 per gruppi. L'ANOVA e i test di Tukey hanno rilevato differenze nella PC1. Non sono state riscontrate differenze nella PC2. Valore P aggiustato: ***, $P < 0.05$. Non è stata osservata alcuna differenza nella diversità alfa o beta tra i gruppi B1, B2 e C/D.

6.2.2 EFFETTO DELL'ETÀ SULLA DIVERSITÀ ALFA

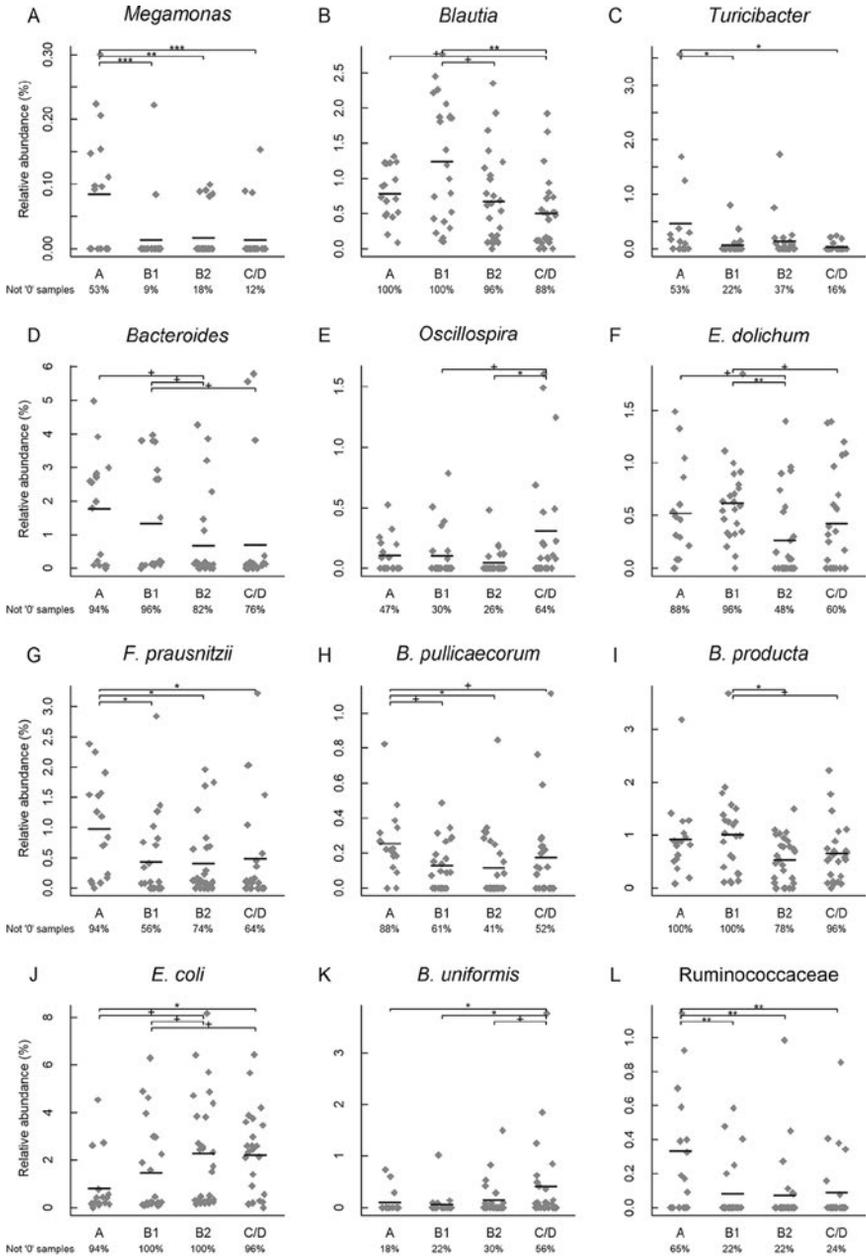
Per verificare l'ipotesi che le differenze di diversità osservate fossero indipendenti dalla differenza di età, è stato eseguito un

sottocampionamento bootstrap. In una simulazione sono stati identificati 125 sottocampioni bootstrap senza differenze di età (pagina > 0,05). Qui sono stati osservati dei cambiamenti significativi nella PD di Faith nell'85,6% (107/125) dei set di dati bootstrap ($P < 0,05$ in tutti i casi) (Tabella S1, scheda 5), con un valore P mediano di 0,018 (IQR, da 0,007 a 0,031) (Fig. 1C).

6.2.3 DIFFERENZE TASSONOMICHE

In primo luogo, abbiamo esaminato le variazioni complessive dei taxa. Non sono stati osservati cambiamenti significativi nell'abbondanza in nessun rango tassonomico (Tabella S1, scheda 6 e Fig. S1). I cinque phyla predominanti, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, rappresentavano più del 99% dei batteri totali (Fig. 1D; Fig. S1A). I *Fusobacteria* sono aumentati nei gruppi B1 e B2, ma sono diminuiti nei gruppi C/D rispetto al gruppo A. Tuttavia, questi cambiamenti non hanno raggiunto la significatività statistica. A livello di famiglia, le *Paraprevotellaceae* sono diminuite mentre le *Actinomycetaceae* sono aumentate (tasso di scoperta falsa [FDR] = 0,07 in entrambi i casi) (Fig. S1B).

In secondo luogo, abbiamo esaminato le singole OTU. Sono state identificate quindici OTU significative ($P < 0,05$, $q < 0,20$ in tutti i casi) (Tabella S1, scheda 7). Tra queste vi sono sei specie, cinque generi e tre famiglie. Le abbondanze di *Megamonas*, *Blautia*, *Bacteroides* e *Turcibacter* sono diminuite nei cani MMVD rispetto a quelle dei cani sani, mentre *Oscillospira* è aumentata (Fig. 3A-E). A livello di specie, *Eubacterium dolichum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Blautia producta* e *Butyricoccus pullicaecorum* avevano abbondanze ridotte, mentre *Escherichia coli* e *Bacteroides uniformis* erano aumentati nei cani MMVD rispetto a quelli sani (Fig. 3F-K). L'abbondanza di *Ruminococcaceae* è aumentata, mentre quelle di *Bacteroidaceae* ed *Erysipelotrichaceae* sono diminuite (Fig. 3L-O).



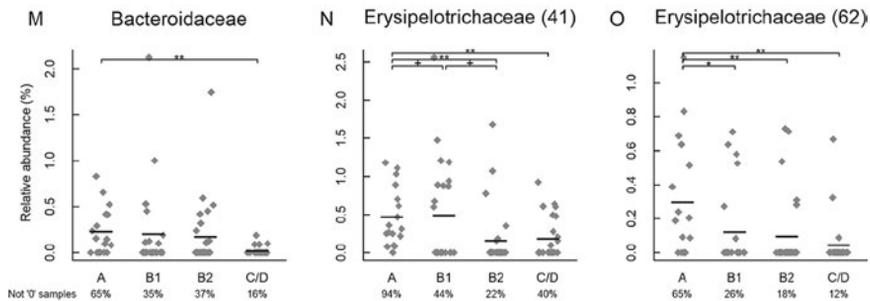


Figura 3. Unità tassonomiche operative (OTU) significative. I batteri che condividevano almeno il 97% di similarità di sequenza nei loro geni marcatori 16S sono stati considerati con la stessa OTU. Il grado tassonomico più basso nella caratterizzazione OTU è mostrato in parentesi come OTU (ID). Queste OTU rappresentavano cinque generi, *Megamonas*, *Blautia*, *Turicibacter*, *Bacteroides* e *Oscillospira* (da A a E), sei specie, *E. dolichum*, *F. prausnitzii*, *B. pullicaecorum*, *B. producta*, *E. coli* e *E. uniformis* (da F a K) e tre famiglie, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae* e *Erysipelotrichaceae* (da L a O). N e O erano due OTU diverse. Le linee orizzontali indicano le medie. La percentuale di campioni non nulli è indicata sotto ogni gruppo. Su ciascuna OTU è stato condotto il test non parametrico di Kruskal-Wallis. Le OTU significative sono state sottoposte a test di Dunn post hoc con correzioni per il tasso di falsa scoperta (FDR). +, FDR < 0,1; *, FDR < 0,05; FDR < 0,01; *, FDR < 0,001.

6.2.4 DI, BA E SCFA FECALI

I campioni fecali di 121 cani, compresi 85 (85/92) dello studio di sequenziamento del 16S, sono stati inclusi per l'analisi della disbiosi (DI) basata sulla PCR quantitativa (qPCR) (Fig. 4; Tabella S1, tab. 8). Le DI medie dei gruppi A, B1, B2 e C/D erano rispettivamente -1,48, -0,6, 0,01 e 1,47 (test di Kruskal-Wallis, PK-W = 0,07) (Fig. 4A). La differenza tra il gruppo A e il gruppo C/D era significativa ($P = 0,034$). Analogamente ai dati del sequenziamento del 16S rRNA, le abbondanze di *Turicibacter* ed *E. coli* erano diverse (PK-W = 0,007 e 0,025, rispettivamente). Il *Turicibacter* era più abbondante nel gruppo A che nei gruppi B1 o C/D (P aggiustato = 0,035 e 0,002, rispettivamente) (Fig. 4D), mentre l'abbondanza di *E. coli* era maggiore nel gruppo C/D che nel gruppo A o B1 e maggiore nel gruppo B2 che nel gruppo B1 (P aggiustato = 0,032, 0,026 e 0,043, rispettivamente) (Fig. 4F). Le abbondanze di batteri totali sembravano essere uguali tra i gruppi (Fig. 4B).

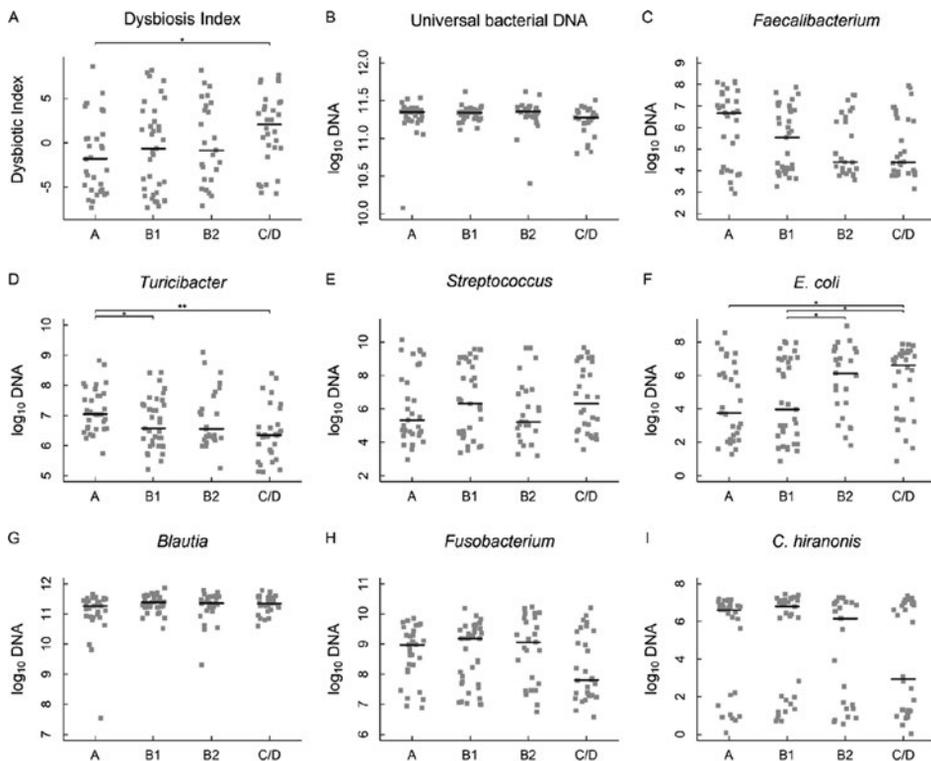


Figura 4. Indice di disbiosi fecale basato sulla PCR utilizzando un insieme di batteri intestinali. Indice di disbiosi (A), batteri totali (B) e sette generi e specie batteriche, *Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *Streptococcus*, *E. coli*, *Blautia*, *Fusobacterium* e *C. hiranonis* (da C a I) in cani con MMVD. Le abbondanze batteriche sono state misurate mediante PCR quantitativa. Le linee orizzontali indicano le mediane. Valori P aggiustati: *, $P < 0,05$, **, $P < 0,01$.

Non è stata osservata alcuna differenza nei BA fecali, ad eccezione del glicocloro-CA ($PK-W = 0,008$) (Tabella S1, scheda 9). Il gruppo B2 presentava una quantità maggiore di glicol-CA rispetto al gruppo A o al gruppo B1 (P aggiustato = 0,002 e 0,024, rispettivamente). Non sono state riscontrate differenze negli SCFA fecali (Tabella S1, scheda 10).

L'indice PD di Faith ha mostrato una correlazione negativa con DI ma positiva con *Clostridium hiranonis* ($P = 0,0006$ e $6e-6$;

$r = -0,37$ e $0,47$, rispettivamente) (Fig. 5A e B). I grafici basati sulla distanza BC hanno mostrato un raggruppamento visibile dei campioni lungo la PC1 in base all'abbondanza di DI o *C. hiranonis* ($P = 1,9e-14$ e $8,5e-14$, rispettivamente) (Fig. 5C e D). Non è stata osservata alcuna differenza su PC2 ($P > 0,7$).

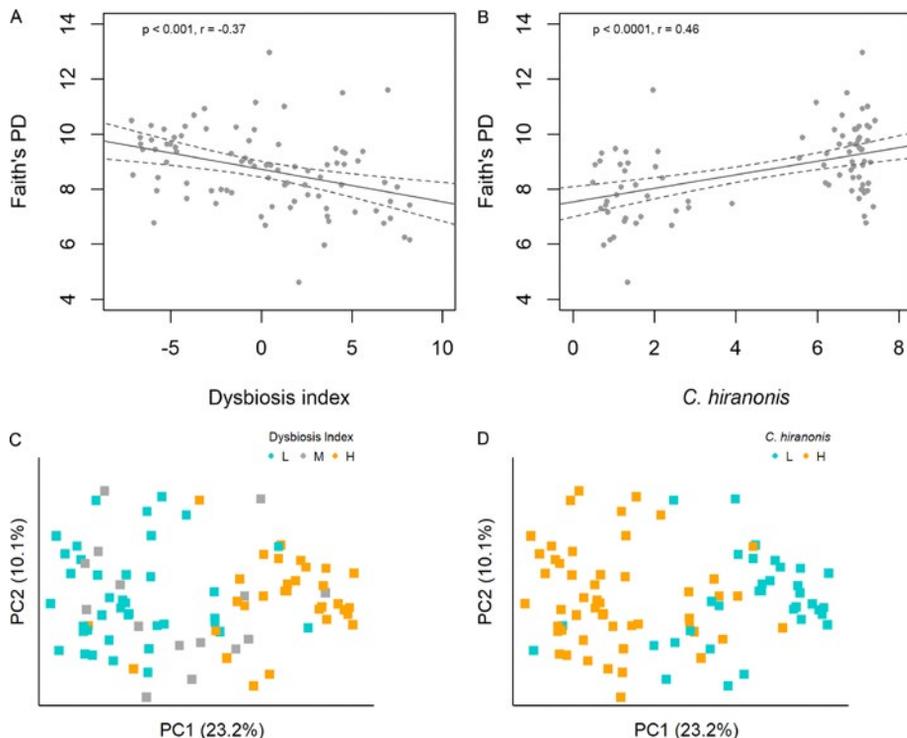


Figura 5. Analisi della diversità alfa e beta su DI e *C. hiranonis* utilizzando i dati del sequenziamento 16S. Correlazioni di Pearson tra l'indice PD di Faith e DI (A) e *C. hiranonis* (B). Analisi delle coordinate principali utilizzando le distanze di Bray-Curtis su DI (C) e *C. hiranonis* (D). I campioni sono stati colorati in base a DI, ciano (L, $DI \leq 0$), grigio (M, $0 < DI < 2$), o arancione (H, $DI \geq 2$) (C), e all'abbondanza di *C. hiranonis*, ciano (L, $\log_{10} DNA < 4,5$) o arancione (H, $\log_{10} DNA \geq 4,5$) (D). Le prime due coordinate principali, PC1 e PC2, sono visualizzate con le percentuali di variazione dei dati indicate rispettivamente sugli assi x e y. (A e B) Sono incluse le linee di regressione lineare adattate con intervalli di confidenza del 95%. Il raggruppamento dei campioni lungo PC1 è stato evidenziato nei pannelli C ($P = 1,9e-14$) e D ($P = 8,5e-14$). DI, indice di disbiosi.

6.2.5 CORRELAZIONI TRA DI, BA E ABBONDANZE BATTERICHE

La DI era associata positivamente con *Streptococcus* ed *E. coli* ma negativamente con *Faecalibacterium*, *Fusobacterium* e *C. hiranonis* ($|\text{r}| > 0,6$, $P < 1\text{e-}6$ in tutti i casi) (Fig. S2A a E e Tabella S1, tab 11).

Il DI fecale era positivamente associato a due BA primari, CA e CDCA, ($P < 1,5\text{e-}10$ in entrambi i casi; $\text{r} = 0,75$ e $0,56$, rispettivamente) (Fig. 6A e B, e Tabella S1, scheda 12). Il DI era correlato negativamente con due BA secondari, DCA e LCA ($P < 3,4\text{e-}13$ in entrambi i casi; $\text{r} = -0,62$ e $-0,75$, rispettivamente) (Fig. 6C e D), ma positivamente con UDCA ($P = 7,8\text{e-}5$, $\text{r} = 0,36$) (Fig. 6E). Il rapporto tra BA primario e BA secondario ($1^\circ/2^\circ$) aveva un'associazione positiva con DI ($P = 8,8\text{e-}10$; $\text{r} = 0,54$) (Fig. 6F).

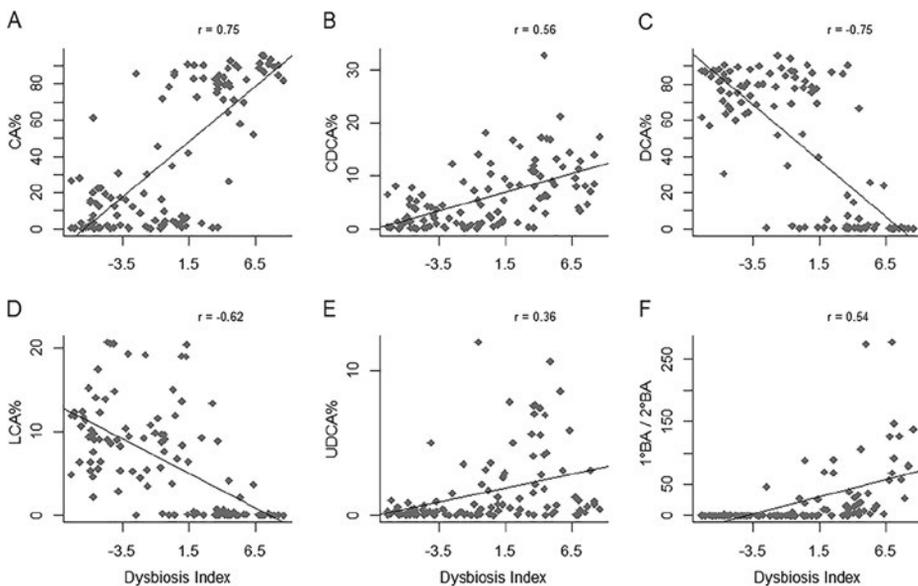
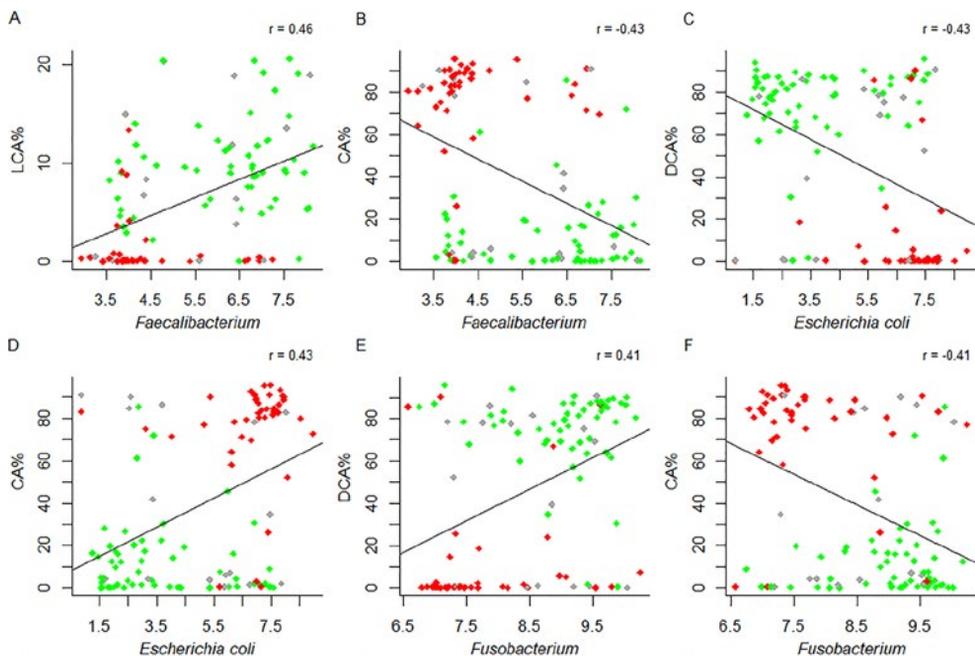


Figura 6. Correlazioni di Pearson tra acidi biliari (BA) fecali e indice di disbiosi. CA, acido colico; CDCA, acido chenodesossicolico; DCA, acido desossicolico; LCA, acido litocolico; UDCA, acido ursodesossicolico; 1° BA/ 2° BA, rapporto tra BA primari e secondari. La percentuale di ciascun BA è stata calcolata come rapporto tra il BA e la somma dei BA primari e secondari. Sono stati considerati solo i BA non coniugati. I coefficienti di correlazione (r) sono stati indicati in alto a destra. $P < 1\text{e-}4$ in tutti i casi.

Faecalibacterium, *E. coli* e *Fusobacterium* hanno mostrato associazioni da modeste a moderate con i BA ($P < 0,0001$ in tutti i casi) (Fig. da 7A a F, verde per $DI \leq 0$, rosso per $DI \geq 2$, grigio per $0 < DI < 2$; Tabella S1, scheda 12). Mentre *E. coli* era associato positivamente con il BA primario ma negativamente con il BA secondario, il contrario è stato osservato per *Faecalibacterium* e *Fusobacterium*. Sono state osservate delle forti associazioni tra *C. hiranonis* e le BA. Mentre sono state osservate associazioni positive con gli acidi biliari secondari DCA e LCA ($P = 2,2e-16$ in entrambi i casi) (Fig. 7G e H), *C. hiranonis* è risultato inversamente correlato con gli acidi biliari primari CA e CDCA, l'acido biliare secondario UDCA e $1^\circ/2^\circ$ ($P < 5,4e-10$ in tutti i casi) (Fig. 7I a L). In particolare, quando l'abbondanza \log_{10} di *C. hiranonis* era inferiore alla soglia di 4,5, si verificava una scarsa conversione da BA primari a BA secondari (Fig. 7G a L).



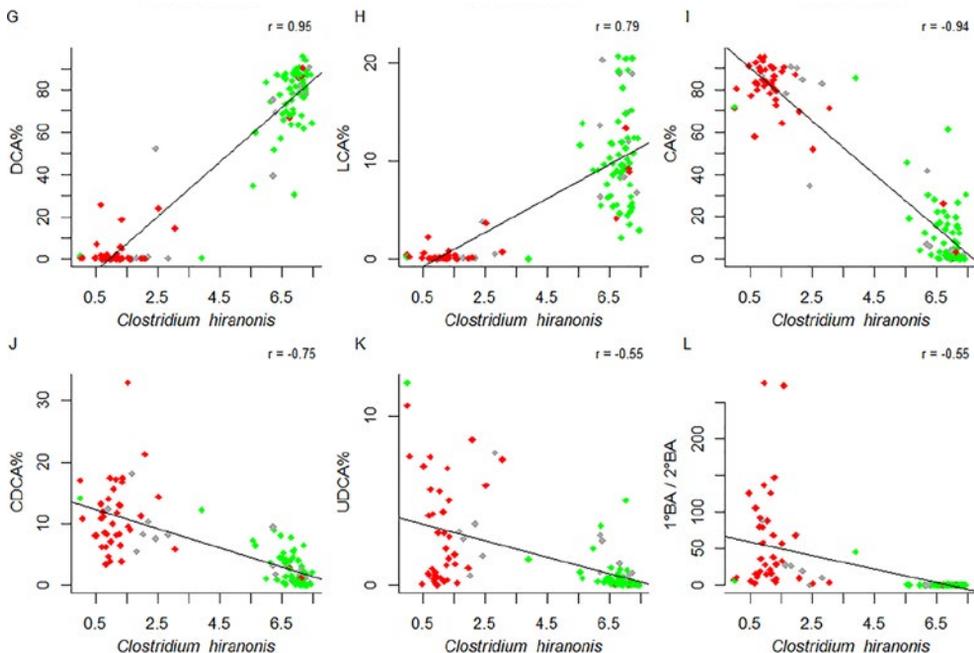


Figura 7. Correlazioni di Pearson tra acidi biliari (BA) fecali e microbi intestinali. CA, acido colico; LCA, acido litocolico; DCA, acido desossicolico; CDCA, acido chenodesossicolico; UDCA, acido ursodesossicolico; 1° BA/2° BA, rapporto tra BA primari e secondari; r , coefficiente di correlazione. (A-L) La percentuale di ciascun BA è stata calcolata come rapporto tra BA e somma di BA primari e secondari (asse y). L'abbondanza batterica è stata espressa come \log_{10} di abbondanza di DNA (asse x). Sono stati considerati solo i BA non coniugati tra loro. I campioni sono stati colorati in base all'indice di disbiosi (DI): verde per $DI \leq 0$, rosso per $DI \geq 2$, grigio per gli altri. $P < 1e-5$ in tutti i casi.

6.2.6 CORRELAZIONI TRA OTU, METABOLITI SIERICI E VARIABILI ECO

Cinquanta cani avevano campioni di siero corrispondenti nello studio di metabolomica pubblicato in precedenza (Tabella S1, scheda 13) (7). I modelli lineari generalizzati hanno identificato diverse correlazioni significative ma deboli tra le OTU e i metaboliti ($|r| \geq 0,2$, $FDR \leq 0,05$) (Tabella 2; Tabella S1, scheda 14). In particolare, *Megamonas* ha mostrato associazioni positive con 7 acilcarnitine a catena corta e con la carnitina, mentre *Lac*-

tobacillus è risultato positivamente correlato con 6 acilcarnitine a catena corta. È stata osservata una correlazione negativa tra *Erysipelotrichaceae* e TMAO.

metabolites \ microbes	<i>Megamonas</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>
trimethylamine N-oxide			-0.24
carnitine	0.28		
acetylcarnitine	0.29	0.29	
propionylcarnitine	0.26	0.29	
butyrylcarnitine	0.30	0.30	
isobutyrylcarnitine	0.22	0.30	
3-hydroxybutyrylcarnitine	0.22	0.30	
tiglylcarnitine	0.20		
adipoylcarnitine (C6-DC)	0.21	0.29	

Tabella 2. Correlazioni tra microbi intestinali e carnitina circolante e acilcarnitine a catena corta (da C2 a C6)^a

a – Il colore verde indica una correlazione positiva, mentre il colore arancione indica una correlazione negativa tra i microbi e i metaboliti corrispondenti. Tutte le correlazioni avevano valori *P* aggiustati di $\leq 0,05$ e valori assoluti del coefficiente di correlazione di $\geq 0,2$. L'analisi è stata eseguita usando il quadro statistico multivariato implementato nel pacchetto R *MaAsLin2*.

Non è stata trovata alcuna correlazione tra le OTU e le tre variabili importanti per l'eco dopo l'aggiustamento per gli errori dovuti ai test multipli ($FDR > 0,05$ in tutti i casi) (Tabella S1, scheda 15).

6.2.7 BA SIERICI

Nessun BA soddisfaceva i rigorosi criteri di selezione nello studio di profilazione metabolomica del siero (7). Le concentrazioni medie (in quantificazione relativa) di CDCA erano 1,04, 0,77, 0,95 e 1,39 per i gruppi A, B1, B2 e C/D, rispettivamente ($P = 0,07$) (Tabella S1, scheda 16), ed erano più elevate nel gruppo C/D rispetto al gruppo B1 ($P = 0,046$ aggiustato).

6.3 DISCUSSIONE

Un numero limitato di studi ha esaminato il ruolo del microbiota intestinale nell'insufficienza cardiaca (HF) nell'uomo e nei modelli animali (20-25). Diverse evidenze collegano il microbiota intestinale alla malattia aterosclerotica, ma tra i batteri intestinali e l'HF sono state riscontrate solo delle associazioni (26). Per quanto ne sappiamo nessuno studio ha documentato i cambiamenti del microbiota intestinale nelle fasi precliniche che portano all'HF. In questo studio abbiamo confrontato i profili del microbioma intestinale dei cani MMVD negli stadi preclinici B1 e B2 e di quelli con una storia di CHF con quelli dei cani sani. La diversità alfa, che descrive il numero (ricchezza) o la distribuzione (uniformità) di diverse specie batteriche nell'intestino, è risultata maggiore nei cani sani rispetto a quelli con MMVD, ma non è stata riscontrata alcuna differenza tra i tre gruppi MMVD. Finora, due studi hanno riportato una ridotta diversità alfa in pazienti umani con HF e in un modello di roditore con HF indotta (24, 25), ma gli altri studi non hanno rilevato cambiamenti nella diversità alfa tra soggetti con HF e controlli sani nell'uomo o nel cane (20-23). Abbiamo anche osservato delle differenze nominali nella diversità beta, che misura la somiglianza tra diversi gruppi microbici. È difficile comprendere appieno i cambiamenti e valutare le discrepanze, dato il numero esiguo di studi sul microbioma dell'HF, però i nostri risultati hanno mostrato chiaramente che i cambiamenti nel microbiota intestinale sono iniziati nelle primissime fasi precliniche, quando i cani avevano poche o nessuna evidenza di rimodellamento cardiaco. Inizialmente ci aspettavamo di vedere delle differenze nella diversità microbica intestinale tra i tre gruppi di MMVD. Sebbene entrambi i cani allo stadio B1 e B2 siano asintomatici per quanto riguarda l'insufficienza cardiaca, i cani allo stadio B2 presentano prove di una malattia più avanzata con un rigurgito della valvola mitrale emodinamicamente significativo, come evidenziato dai risultati radiografici ed ecocardiografici della cardiomegalia. I cani di stadio C sono caratterizzati da segni clinici passati o attuali di

insufficienza cardiaca secondaria a MMVD. L'attuale ipotesi del "leaky gut" ipotizza l'edema della parete intestinale e l'alterazione della funzione di barriera intestinale a causa dell'insufficienza cardiaca (9). Ad oggi, non sono disponibili delle relazioni sul microbiota intestinale in pazienti preclinici prima dell'insorgenza dell'HF. Recentemente è stato riportato che i livelli di tossine uremiche circolanti, tra cui TMAO e altri rifiuti azotati, sono aumentati nei cani con MMVD preclinica rispetto a quelli dei cani sani (7). Si amplia quindi l'ipotesi attuale, secondo la quale le alterazioni del microbiota intestinale in fase preclinica potrebbero aver già compromesso l'integrità della funzione di barriera intestinale al punto che i metaboliti intestinali "fuoriusciti" innescano una risposta infiammatoria iniziale, portando a un progressivo peggioramento della MMVD.

Nell'analisi dei dati ad alta dimensionalità si fa un compromesso tra sensibilità e specificità. Se da un lato è importante regolare i test multipli, dall'altro una soglia rigorosa del valore P può aumentare i falsi negativi. In un recente studio di metabolomica non mirata che ha messo in relazione il metabolismo della flora intestinale e le malattie cardiovascolari, la l-carnitina non era tra i primi metaboliti che soddisfacevano la soglia rigida del valore P , ma è stata successivamente identificata con criteri meno rigorosi (8, 12). Essendo uno studio guidato dalle ipotesi, abbiamo deciso di diminuire la soglia del valore P aggiustato (valore q) a 0,20. Abbiamo identificato cambiamenti in cinque generi e sei specie, tra cui *E. coli* e *Turicibacter* ($P < 0,05$, $q = 0,16$ in entrambi i casi), entrambi confermati dalla qPCR ($P = 0,025$ e $0,007$, rispettivamente). *Turicibacter*, un genere del phylum *Firmicutes*, si trova comunemente nel tratto gastrointestinale (GI) degli animali. Questo batterio influenza i processi fisiologici dell'ospite modulando alcuni ormoni dipendenti dal microbioma intestinale (27-29). In particolare *Turicibacter sanguinis*, uno dei microbi intestinali che formano spore e che segnalano alle cellule intestinali di aumentare la produzione di serotonina (5-HT), esprime una proteina omologa al trasportatore 5-HT dei mammiferi ed è in grado di importare 5-HT nella cellula (28, 29). Sono state ripor-

tate anche delle interazioni genetiche tra *Turicibacter* sp. e acidi biliari (27). La via di segnalazione della 5-HT è stata implicata nello sviluppo e nella progressione della MMVD canina (30). Studi precedenti rivelano un'associazione tra la concentrazione sierica di 5-HT e lo stato della malattia: i cani ad alto rischio di MMVD e quelli nelle fasi iniziali della MMVD presentano un aumento della 5-HT sierica, mentre i cani con MMVD in fase terminale presentano una diminuzione della 5-HT sierica (31, 32). La potenziale associazione tra *Turicibacter*, segnalazione della 5-HT e patogenesi della MMVD merita ulteriori indagini. *Bacteroides*, *Blautia* e *Megamonas* esprimono tutti enzimi per le vie di produzione del propionato e sono normalmente presenti nell'intestino dei carnivori sani (33-37). *Oscillospira*, un genere di batteri commensali che produce butirrato e che si trova comunemente nell'intestino di persone sane, sembra conferire protezione contro l'aterosclerosi e ridurre le dimensioni della placca in uno studio sui topi (38-41). *F. prausnitzii* e *B. pullicaecorum*, entrambi membri della famiglia delle *Ruminococcaceae* e del cluster IV dei clostridi, producono un alto livello di butirrato e sono potenzialmente probiotici (35, 36). Anche *E. dolichum* della famiglia delle *Erysipelotrichaceae* produce butirrato e acetato (40). Il butirrato e il propionato possiedono noti effetti antinfiammatori (42). Le ridotte abbondanze di questi generi e specie batteriche nei cani con MMVD suggeriscono una diminuzione netta della produzione di SCFA nell'intestino e una ridotta protezione contro l'infiammazione. Inoltre, gli SCFA sono importanti molecole di segnalazione che regolano diversi processi biologici, comprese le malattie cardiovascolari (9, 11, 19). Tuttavia, nel nostro studio non è stata osservata alcuna differenza negli SCFA fecali. È stato riportato che il 90%-95% degli SCFA prodotti nel colon viene riassorbito dalla mucosa intestinale (43). Pertanto, le concentrazioni di SCFA fecali potrebbero non riflettere accuratamente quelle prodotte dal microbiota intestinale. Sono necessari ulteriori studi per verificare se le variazioni di questi batteri produttori di SCFA abbiano un effetto sui livelli di SCFA in circolo.

Una ricerca di geni produttori di TMA nei metagenomi microbici ha mostrato che il genoma di *E. coli* presentava un'identità del 99% con il gene della carnitina ossigenasi (*cntA*), il gene chiave della principale via di sintesi del TMA (44). Studi precedenti hanno anche riportato un aumento delle abbondanze di *E. coli* nei pazienti umani e canini affetti da HF rispetto ai controlli sani (20, 24). Le concentrazioni di TMAO in circolo erano aumentate nei cani con MMVD e CHF allo stadio B2 (6, 7) e l'abbondanza di *E. coli* era maggiore nei cani B2 e CHF rispetto ai cani B1 o sani; ciò ha segnalato un potenziale coinvolgimento di *E. coli* nella produzione di TMAO.

L'indice di disbiosi è uno strumento basato sulla PCR che consente di quantificare la disbiosi intestinale utilizzando un pannello di otto gruppi batterici selezionati (45). Alcuni studi recenti hanno dimostrato che il DI è aumentato nei cani con malattie infiammatorie intestinali (IBD) (46-48). Abbiamo testato l'ipotesi che la DI aumentasse con la gravità della MMVD. In effetti, i nostri dati hanno mostrato che il DI medio è aumentato progressivamente da -1,48 nel gruppo A, a -0,6, 0,01 e 1,47 nei gruppi B1, B2 e C/D, rispettivamente, e che la differenza tra i gruppi A e C/D ha raggiunto la significatività statistica ($P < 0,05$ aggiustato). In particolare, sono state riscontrate notevoli variazioni all'interno del gruppo. È possibile che un campione di dimensioni maggiori possa migliorare ulteriormente la potenza statistica. Tuttavia, questo strumento DI basato sulla PCR promette di monitorare l'insorgenza e la progressione della MMVD e offre l'opportunità di migliorare la sensibilità e la specificità con la selezione di un gruppo batterico specifico per il cuore. I risultati della qPCR hanno convalidato le differenze significative osservate per *Turicibacter* ed *E. coli*, e una tendenza simile per *F. prausnitzii* ma non per *Blautia*, dal sequenziamento del gene 16S rRNA. Quattro batteri hanno mostrato correlazioni da moderate a forti con l'ID: *Streptococcus* ed *E. coli* hanno avuto associazioni positive, mentre *Fusobacterium* e *C. hiranonis* negative ($P < 1e-10$, $|\tau| \geq 0,6$ in tutti i casi). I nostri risultati hanno dimostrato un aumento progressivo della disbiosi del microbiota intestinale nei cani MMVD.

Il microbiota intestinale influenza il metabolismo e la fisiologia dell'ospite generando numerosi metaboliti. Da parte loro, questi metaboliti rimodellano la struttura e la composizione del microbiota intestinale (49). Abbiamo studiato ulteriormente le relazioni tra BA, DI e microbi intestinali. Gli acidi biliari hanno ricevuto di recente una notevole attenzione per la loro capacità di regolare molti processi fisiologici come molecole di segnalazione. I BA primari sono convertiti in BA secondari dai batteri intestinali i cui genomi contengono gli operoni BA-inducibili (*bai*) con attività $7\alpha/\beta$ -deidrossilasi (50). Si ritiene che i BA secondari proteggano dalla crescita di diversi patogeni, tra cui *Clostridium difficile*, *E. coli* e *Clostridium perfringens* (51-53). L'acido desossicolico, un BA secondario, riduce l'accumulo di mediatori infiammatori nell'ileo e l'integrazione di DCA nella dieta ha ridotto l'effetto infiammatorio grave indotto da *C. perfringens* e la perdita di peso corporeo nei polli (54). È interessante notare che uno studio recente ha riportato un aumento del rapporto tra BA secondario e primario nel plasma di 142 pazienti affetti da HF cronica rispetto a quello di 20 soggetti sani di controllo (55), ma è difficile trarre conclusioni significative da questa sola osservazione. *C. hiranonis*, uno dei *Clostridium* spp. che possiedono la capacità di 7α -idrossilazione (56), era uno dei batteri del pannello DI. Va notato che quando l'abbondanza di *C. hiranonis* (in \log_{10}) era $>4,5$, essenzialmente tutti i BA primari sono stati convertiti in BA secondari ($1^\circ \text{ BA}/2^\circ \text{ BA} \approx 0$) (Fig. 7L), e ciò suggerisce che quando *C. hiranonis* è abbondante, è sufficiente a convertire la maggior parte, se non tutti, i BA primari in BA secondari. Inoltre, i nostri dati suggeriscono che i BA secondari inibiscono la crescita di *E. coli* ma favoriscono quella di *Fusobacterium* e *Faecalibacterium* (Fig. 7A-F).

Sono state trovate delle correlazioni positive tra le acilcarnitine a catena corta circolanti e i batteri intestinali, *Lactobacillus* e *Megamonas*. L'abbondanza di *Megamonas* era ridotta nei cani MMVD rispetto a quella dei cani sani. Le acilcarnitine, intermedi chiave del trasporto e dell'ossidazione degli AF a catena lunga, si accumulano in circolo come risultato di un'ossidazione

incompleta o inefficiente degli acidi grassi e sono state utilizzate come marcatori diagnostici di disturbi nei processi di ossidazione perossisomiale o mitocondriale (57-59). Nei pazienti umani affetti da HF è stato documentato un aumento delle acilcarnitine a catena lunga in circolazione rispetto ai pazienti non affetti (60, 61). Si ritiene che l'accumulo di acilcarnitine a catena lunga contribuisca all'HF stimolando la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e rilasciando mediatori infiammatori circolanti (61). Nei cani, la gravità della MMVD è stata correlata con le concentrazioni di acilcarnitine a catena corta e lunga (7), alcune delle quali sono state ridotte in risposta all'intervento dietetico con benefici clinici dimostrati (62, 63). Inoltre, è stata osservata un'associazione negativa della TMAO con la famiglia delle *Erysipelotrichaceae*, la cui abbondanza era ridotta nei cani con MMVD. Nonostante la significatività ($FDR < 0,05$ in tutti i casi), le associazioni tra questi batteri intestinali e i metaboliti circolanti erano deboli. È importante notare che solo 50 campioni disponevano di dati di sequenziamento del gene rRNA fecale e di metabolomica sierica e che c'erano solo 6 cani (6/50) nel gruppo di controllo sano. Tuttavia, questo esperimento pilota può offrire un'opportunità per studi futuri.

Abbiamo esplorato, per la prima volta, le relazioni tra microbioma intestinale e metaboliti derivati dall'intestino in cani con tutti gli stadi della MMVD. Poiché questi cani erano di proprietà privata, non siamo stati in grado di escludere potenziali effetti concomitanti di dieta e razza. Inoltre, tutti i cani C/D e la maggior parte dei cani B2 assumevano uno o più farmaci cardiaci comuni al momento dello studio. Sebbene lo studio di bootstrapping abbia supportato l'ipotesi che i cambiamenti non fossero dovuti alla differenza di età, non siamo stati in grado di escludere completamente la possibilità di un piccolo effetto confondente dovuto all'età. Va notato che il nostro studio amplia l'attuale "ipotesi intestinale" includendo la disbiosi intestinale nelle fasi precliniche, quando le prove di rimodellamento cardiaco sono scarse o assenti, e pone le basi per future ricerche sul microbioma nella MMVD canina e umana.

6.4 MATERIALI E METODI

6.4.1 ANIMALI E APPROVAZIONE DELLO STUDIO

Il protocollo di studio è stato esaminato e approvato dal Comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali dell'Università della Pennsylvania ed è stato ottenuto il consenso informato del proprietario. Come gruppo di controllo (gruppo A) sono stati reclutati dei cani clinicamente sani di età pari o superiore a 7 anni, senza soffio al cuore e senza malattie sistemiche concomitanti. Questo gruppo di cani era costituito principalmente da cani sani di proprietà di studenti e personale dell'ospedale. È stata presa in esame una coorte di cani di età pari o superiore a 7 anni che presentava un soffio sistolico apicale sinistro e una diagnosi ecocardiografica (eco) di foglietto/i della valvola mitrale ispessito e prolassato con rigurgito mitralico, nonché storia clinica ed esame fisico coerenti con lo stadio B1, B2, C o D della MMVD; questi sono stati considerati come gruppi B1, B2 e C/D (3). Sono stati esclusi tutti i cani con gravi malattie sistemiche concomitanti, tra cui diabete mellito, cancro o insufficienza renale, o quelli con malattie cardiache congenite. Sono stati esclusi anche i cani con segni di malattie gastrointestinali come vomito o diarrea e quelli che avevano ricevuto antibiotici entro 30 giorni.

6.4.2 ECOCARDIOGRAFIA

Gli studi ecografici [...] sono stati eseguiti senza sedazione. [...]

6.4.3 SEQUENZIAMENTO DEL GENE 16S RRNA FECALE

I proprietari dei cani sono stati istruiti a raccogliere un campione fecale fresco il giorno dell'appuntamento. Il campione è stato suddiviso in aliquote e congelato a -80°C fino al momento dell'analisi. [...]

7 - I GATTI DIABETICI PRESENTANO UNA RIDOTTA DIVERSITÀ MICROBICA INTESTINALE E UNA MANCANZA DI BATTERI PRODUTTORI DI BUTIRRATO

Tratto e tradotto da

Kieler, I.N., Osto, M., Hugentobler, L. et al. *Diabetic cats have decreased gut microbial diversity and a lack of butyrate producing bacteria*. *Sci Rep* 9, 4822 (2019).



<https://doi.org/10.1038/s41598-019-41195-0>

Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

L'obesità e l'inattività sono i principali fattori di rischio del diabete mellito felino (FDM) e del diabete mellito umano di tipo II (T2DM). Negli ultimi anni è stato suggerito che le alterazioni del microbiota intestinale potrebbero contribuire al T2DM [diabete mellito di tipo 2]. Non è ancora noto se la composizione del microbiota intestinale (GM [Gut Microbiome]) abbia un ruolo nel FDM. Lo scopo del presente studio è stato innanzitutto un confronto trasversale del GM di gatti diabetici con quello di gatti magri e obesi/sovrappeso non diabetici di età simile. In particolare, i campioni fecali di 82 gatti di proprietà privata provenienti da Danimarca e Svizzera sono stati sequenziati mediante metabarcoding con ampliconi del gene 16S rRNA. In secondo luogo, sono stati generati dei dati relativi all'intervento dietetico, ottenendo campioni aggiuntivi da un sottoinsieme di gatti dopo averli sottoposti a una dieta ad alto contenuto proteico per quattro settimane. La diversità GM dei gatti diabetici è risultata inferiore a quella dei gatti magri nello studio trasversale e più bassa rispetto ai gatti magri e a quelli sovrappeso/obesi dopo l'intervento dietetico. I gatti diabetici presentavano anche un minor numero di *Anaerotruncus*, *Dialister* e *Ruminococcaceae* sconosciute rispetto ai gatti magri. I livelli sierici di fruttosamina erano correlati

negativamente con l'abbondanza di Prevotellaceae e positivamente con l'abbondanza di Enterobacteriaceae. In sintesi, il microbiota intestinale dei gatti diabetici è stato caratterizzato da una riduzione della diversità GM e dalla perdita di generi batterici produttori di butirrato.

7.1 INTRODUZIONE

Il diabete mellito felino (FDM) condivide alcune caratteristiche fisiopatologiche e cliniche con il diabete mellito umano di tipo 2 (T2DM) ed è stato quindi proposto come modello animale per il T2DM [1]. Le somiglianze con il T2DM includono l'età di insorgenza (il FDM è più comune nei gatti di mezza età o anziani), l'associazione con l'obesità, l'alterata secrezione di insulina, l'insulino-resistenza periferica, la perdita di cellule beta e lo sviluppo di depositi di amiloide nelle isole di Langerhans del pancreas, nonché complicazioni come la polineuropatia e la retinopatia [1]. Analogamente al T2DM, l'incidenza del FDM è aumentata negli ultimi anni, forse in relazione alla crescente incidenza dell'obesità felina [2]. Tuttavia, nonostante le somiglianze tra T2DM e FDM, il FDM viene spesso diagnosticato in una fase tardiva in cui la terapia insulinica è necessaria per raggiungere il controllo glicemico ed evitare possibili complicanze fatali [3]. Inoltre, i meccanismi alla base dell'insulino-resistenza e della disfunzione delle beta-cellule, che portano in ultima analisi a un FDM conclamato, sono ancora sconosciuti. Le alterazioni della composizione e della funzione microbica gastrointestinale sono state proposte come importante causa o conseguenza - o entrambi - nel T2DM umano [4,5,6].

Sempre più evidenze indicano la presenza di disbiosi nel GM dei pazienti con T2DM [4,5,6]. Tuttavia, tra gli studi esistono delle incongruenze relative alla natura della disbiosi, che potrebbero essere correlate alle differenze etniche, dietetiche o terapeutiche che hanno dimostrato di influenzare direttamente il microbiota intestinale [6]. In questi studi, nei pazienti affetti da T2DM è

stata riscontrata una diminuzione della proporzione di batteri (come *Roseburia* species e *Faecalibacterium prausnitzii*) noti per produrre l'acido grasso a catena corta (SCFA) butirrato rispetto ai controlli [4,5,6]. Gli SCFA (butirrato, acetato e propionato) sono prodotti nell'intestino crasso da alcuni microbi intestinali attraverso la fermentazione di polisaccaridi complessi e sono noti per influenzare positivamente il metabolismo del glucosio e dell'energia [7,8], nonché la funzione immunitaria locale [9]. Il butirrato fornisce energia alle cellule epiteliali del colon e può aumentare la sensibilità all'insulina e il dispendio energetico [7]. L'acetato e il propionato sono utilizzati perlopiù come substrati rispettivamente per la lipogenesi e la gluconeogenesi nel fegato. Un recente studio sui topi ha rilevato che il butirrato e il propionato (attraverso meccanismi diversi) attivano l'espressione genica della gluconeogenesi intestinale, mentre il propionato agisce direttamente come substrato per la gluconeogenesi intestinale [8]. Ciò può sembrare contro-intuitivo, in quanto un aumento dei substrati gluconeogenici dovrebbe associarsi a un minor controllo glicemico. Tuttavia, questo non sembra essere il caso della gluconeogenesi intestinale, dove il glucosio rilasciato viene rilevato nella vena porta con conseguenti segnali nervosi inviati al cervello che portano a effetti benefici sull'assunzione di cibo e sul metabolismo del glucosio [10]. Il metabolismo del glucosio dell'ospite può quindi essere influenzato dalla produzione di SCFA attraverso la gluconeogenesi intestinale.

In modelli di roditori con obesità è stato riscontrato che i batteri gram-negativi come l'*Escherichia coli* aumentano la permeabilità intestinale e i livelli circolanti di lipopolisaccaride batterico (LPS), determinando in ultima analisi un'inflammatione sistemica di basso grado, caratteristica importante dell'obesità e del T2DM [11]. Anche negli esseri umani con T2DM sono stati riscontrati livelli più elevati di *E. coli* rispetto ai controlli [4]. Si ritiene che l'inflammatione sistemica di basso grado associata all'obesità sia implicata nello sviluppo dell'insulino-resistenza e potrebbe quindi essere importante per lo sviluppo del T2DM. Questo è stato proposto come un altro meccanismo attraverso

il quale il microbiota intestinale può interagire con il metabolismo dell'ospite, portando all'insulino-resistenza e al T2DM. In accordo con i risultati ottenuti nei ratti e nell'uomo, la somministrazione subacuta di LPS – che imita un'inflammatione di basso grado nei gatti – compromette la sensibilità all'insulina ma non la funzione delle cellule β pancreatiche [12].

Una diminuzione della ricchezza genica del microbioma intestinale (un marcatore di diversità) è stata associata nell'uomo a un rischio più elevato di comorbidità legate all'obesità, come determinato dai marcatori metabolici circolanti [13]. Tuttavia, nessuno studio che abbia analizzato la composizione genetica dei pazienti con T2D ha riscontrato una riduzione della diversità microbica [14].

Uno studio ha rilevato che, sebbene le comunità microbiche di 27 gatti sovrappeso/obesi differissero da quelle di 49 gatti magri, non sono stati rilevati cambiamenti significativi tra le due coorti nei taxa specifici [15]. In un secondo studio non sono state riscontrate differenze significative quando 10 gatti diabetici sono stati confrontati con 20 gatti di controllo, dove 10 dei controlli erano abbinati per età/sesso [16]. Una spiegazione potrebbero essere le grandi differenze interindividuali nella composizione del GM; potrebbe essere necessario un campione di dimensioni maggiori per documentare gli effetti.

Oltre al trattamento insulinico, è solitamente raccomandata come strategia terapeutica per i gatti diabetici una dieta ad alto contenuto proteico e a basso contenuto di carboidrati [3]. È stato dimostrato che i gatti diabetici mantengono la regolazione gluconeogenica epatica meglio degli esseri umani diabetici [17] e che si ottengono un migliore controllo glicemico e un maggiore tasso di remissione quando i gatti sono alimentati con diete ad alto contenuto di proteine/basso contenuto di carboidrati [18,19]. Poiché la composizione del GM è influenzata dalla dieta, è possibile che gli effetti metabolici esercitati dal cambiamento di dieta avvengano attraverso alterazioni del GM, quando si passa da una dieta a moderato contenuto di carboidrati e proteine a una dieta a basso contenuto di carboidrati e ad alto contenuto di proteine nei gatti

diabetici. Alla luce di ciò, ci siamo posti l'obiettivo di (1) caratterizzare le differenze nella composizione del GM tra gatti diabetici, gatti sani magri e gatti sani sovrappeso/obesi di età simile, e poi (2) esplorare i cambiamenti nella composizione del GM di un sottogruppo di questi gatti dopo un mese di alimentazione con una dieta in commercio, ad alto contenuto di proteine/basso contenuto di carboidrati, creata specificamente per il diabete felino.

7.2 RISULTATI

Sono stati sequenziati 121 campioni di DNA microbico purificati dalle feci di 82 gatti; di questi, dopo la rarefazione a 9000 letture per campione (9018-48350 letture), 23 campioni avevano meno di 9000 letture e quindi non sono stati inclusi nell'analisi statistica. Le analisi statistiche sono state eseguite sui campioni rimanenti, che comprendevano 62 gatti (23 DM, 15 OB e 24 LN) dello studio trasversale e 36 gatti (11 DM, 13 OB e 12 LN) dell'intervento dietetico (Fig. S1 supplementare).

Per facilitare la raccolta delle feci da parte dei proprietari, i gatti studiati vivevano per lo più in casa, anche se quattro gatti del gruppo DM, due gatti del gruppo LN e due gatti del gruppo OB avevano un accesso limitato all'esterno. I gatti con DM erano trattati con Levemir (Detemir, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danimarca, n = 11), Lantus (Glargine, Sanofi, Parigi, Francia, n = 6), Prozinc (insulina protamina zinco, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germania, n = 3) o Caninsulin (insulina suina, MSD, Kenilworth, NJ, USA, n = 1). Uno dei gatti con DM è stato diagnosticato di recente e il trattamento insulinico non era stato iniziato al momento dell'inclusione; per un gatto, inoltre, il tipo di insulina era sconosciuto. Per i dettagli su età, punteggio di condizione corporea, peso corporeo, punteggio fecale e sesso, si veda la Tabella supplementare S1. Per i dettagli su emocromo completo, biochimica, tiroxina e SAA, si veda la Tabella supplementare S2.

Non sono state osservate delle differenze significative tra gatti svizzeri e danesi, per nessuno dei gruppi (DM, LN o OB) in rela-

zione alla diversità alfa o beta. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nelle proporzioni dei diversi taxa a qualsiasi livello tassonomico tra i gatti svizzeri e danesi all'interno dei tre gruppi (DM, OB o LN). Pertanto, i dati dei gatti svizzeri e danesi sono stati raggruppati per l'analisi dello studio trasversale.

7.2.1 DIVERSITÀ E COMUNITÀ MICROBICHE

7.2.1.1 Studio trasversale

I gatti DM avevano una ricchezza GM osservata inferiore (tasso di scoperta falsa, FDR = 0,04) e Chao 1 (FDR = 0,03) rispetto ai gatti LN (Fig. 1A). L'emoglobina e il livello di volume delle cellule impaccate si sono correlati positivamente con la ricchezza di GM ($R_2 = 0,48$, FDR = 0,01; $R_2 = 0,41$, FDR = 0,01, rispettivamente) e Chao 1 ($R_2 = 0,52$, FDR = 0,01; $R_2 = 0,44$, FDR = 0,01, rispettivamente). È stata rilevata una correlazione negativa tra la ricchezza GM osservata ($R_2 = -0,44$, FDR = 0,03) e Chao 1 ($R_2 = 0,44$, FDR = 0,03) con i livelli sierici di acidi biliari. La fruttosamina e il glucosio sierici si sono correlati negativamente con l'indice di Simpson ($R_2 = -0,23$, FDR = 0,04; $R_2 = -0,32$, FDR = 0,04, rispettivamente). Per ulteriori dettagli, vedere la Fig. S4.

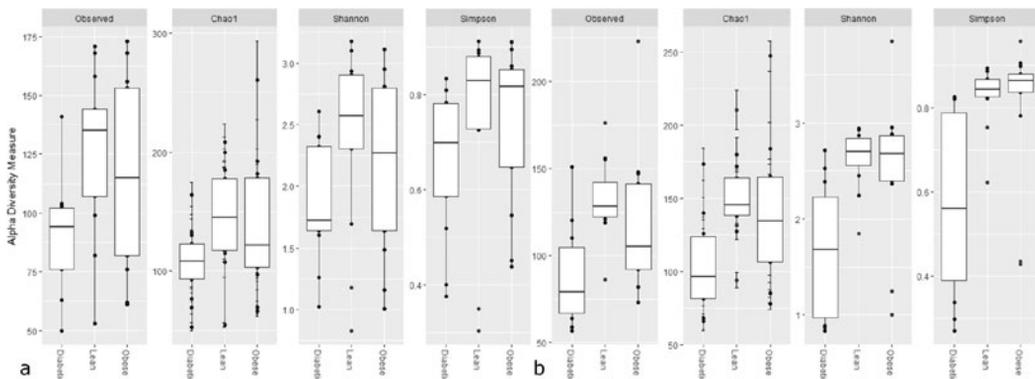


Figura 1. Boxplot che mostra la diversità alfa. In particolare, la ricchezza osservata (Observed), la diversità Chao 1, Shannon e Simpson tra diabetici (Diabetic, n = 23), sovrappeso/obesi (Obese, n = 15) e magri (Lean, n = 24), in uno studio trasversale (1A) e dopo un intervento dietetico (1B) per (Diabetic, n = 11), sovrappeso/obesi (Obese, n = 13) e magri (Lean, n = 12).

7.2.1.2 Studio di intervento

Dopo l'intervento dietetico, il gruppo DM ha mantenuto una ricchezza GM inferiore (FDR = 0,01) e Chao 1 (FDR = 0,03) rispetto al gruppo LN. Inoltre, è stata osservata una minore diversità nei gatti DM rispetto ai gruppi LN (indice di Shannon, FDR = 0,003, indice di Simpson, FDR = 0,002) o OB (indice di Shannon, FDR = 0,01, indice di Simpson, FDR = 0,003, Fig. 1B).

Sia nello studio trasversale che in quello di intervento è stata rilevata una piccola separazione delle comunità microbiche tra i tre gruppi, indipendentemente dalla misura di dissimilarità utilizzata (Bray Curtis (Bray), UniFrac non ponderato o ponderato) (studio trasversale Bray, R = 0,08 e FDR = 0,01; studio di intervento Bray, R = 0,17 e FDR = 0,002; studio trasversale non ponderato, R = 0,10 e FDR = 0,001; studio di intervento non ponderato, R = 0,10 e FDR = 0,001.01; studio di intervento Bray, R = 0,17 e FDR = 0,002; studio trasversale non ponderato, R = 0,10 e FDR = 0,001; studio di intervento non ponderato, R = 0,11 e FDR = 0,02; studio trasversale ponderato R = 0,11 e FDR = 0,004; studio di intervento ponderato, R = 0,11 e FDR = 0,02). I risultati dei confronti a coppie di ciascun gruppo (DM, LN e OB) per lo studio trasversale e per lo studio di intervento dietetico sono riportati nella Tabella 1.

		Dissimilarità	ANOSIM (R)	FDR
Sezione trasversale	DM vs. LN	Bray Curtis	0.018	0.2
	DM vs. LN	UniFrac non ponderato	0.2	0.003
	DM vs. LN	UniFrac ponderato	0.021	0.2
	DM contro OB	Bray Curtis	0.084	0.03
	DM contro OB	UniFrac non ponderato	0.17	0.008
	DM contro OB	UniFrac ponderato	0.12	0.03
	OB vs. LN	Bray Curtis	0.03	0.2
	OB vs. LN	UniFrac non ponderato	0.09	0.05
	OB vs. LN	UniFrac ponderato	0.03	0.2

Intervento dietetico	DM vs. LN	Bray Curtis	0.17	0.01
	DM vs. LN	UniFrac non ponderato	0.29	0.006
	DM vs. LN	UniFrac ponderato	0.16	0.02
	DM contro OB	Bray Curtis	0.19	0.02
	DM contro OB	UniFrac non ponderato	0.14	0.03
	DM contro OB	UniFrac ponderato	0.1	0.06
	OB vs. LN	Bray Curtis	0.02	0.3
	OB vs. LN	UniFrac non ponderato	-0.03	0.7
	OB vs. LN	UniFrac ponderato	-0.02	0.6

Tabella 1. Confronto a coppie (analisi di similarità, ANOSIM) delle comunità microbiche dei gatti nello studio trasversale sui diabetici (DM), (n = 23), sui magri (LN), (n = 24) e sui sovrappeso/obesi (OB) (n = 15), nonché nello studio di intervento dietetico (DM, n = 11; LN, n = 12; OB, n = 13) con tre diverse misure di dissimilarità: Bray Curtis, UniFrac non ponderato e ponderato.

Non vi è stato alcun effetto della razza, del sesso o dell'età sulle comunità microbiche. Per chiarire i generi più importanti per la diversità beta, i generi più comuni sono stati adattati come vettori per la prima e la seconda coordinata principale della dissimilarità di Bray Curtis, e i generi che sembrano avere un effetto significativo sulla varianza sono stati tracciati per illustrare il loro effetto sulla variazione (vedi Fig. S2 supplementare).

7.2.2 DIFFERENZE NELLA COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA TRA I GRUPPI NEGLI STUDI TRASVERSALI E DI INTERVENTO SULLA DIETA

Sono state riscontrate molteplici differenze specifiche nelle proporzioni dell'abbondanza relativa di vari taxa dal livello di *phylum* a quello di genere nel confronto tra i gatti DM, OB e LN (cfr. Fig. 2). Di conseguenza in questa sede vengono menzionate solo le differenze selezionate, mentre i risultati di questa analisi, comprese le dimensioni dell'effetto delle differenze e l'errore standard delle dimensioni dell'effetto nella loro entità, sono riportati nella Tabella 2. Confrontando i gatti DM con i gatti LN e OB, i gatti DM avevano una percentuale minore di *Bacteroidetes*, *Bacteroida*, *Bacteroidales*, *Prevotellaceae* e *Prevotella*. Allo stesso modo, i gatti DM avevano una percentuale ridotta del genere *Anaerotruncus*, del *phylum Firmicutes*. Rispetto ai gatti DM, i gatti LN presentavano

una percentuale maggiore del *phylum* e della classe *Fusobacteria*, *Fusobacteriales* e *Fusobacteriaceae*. Mentre i gatti OB, rispetto ai gatti DM, presentavano una percentuale minore del *phylum* e della classe *Fusobacteria*, *Fusobacteriales*, *Fusobacteriaceae* e *Fusobacterium*. I gatti OB presentavano una percentuale maggiore di *phylum* *Actinobacteria* e classe *Bifidobacteriales*, *Bifidobacteriaceae* e *Bifidobacterium* rispetto ai gatti LN. Dopo l'intervento dietetico di 4 settimane, l'unica differenza significativa tra i gruppi a livelli tassonomici superiori ai generi è stata una percentuale significativamente ridotta della classe *Coriobacteriia* e dell'ordine *Coriobacteriales* nei gatti OB rispetto ai gatti LN. I gatti DM avevano una proporzione ridotta del genere *Dialister* e una proporzione aumentata di un genere sconosciuto di *Lachnospiraceae* rispetto ai gatti LN. Anche il genere *Dialister* è diminuito nei gatti DM rispetto a quelli OB, mentre il genere *Peptostreptococcaceae Incertae Sedis* è aumentato nei gatti DM rispetto a quelli OB. Ulteriori dettagli sono riportati nella Tabella 3.

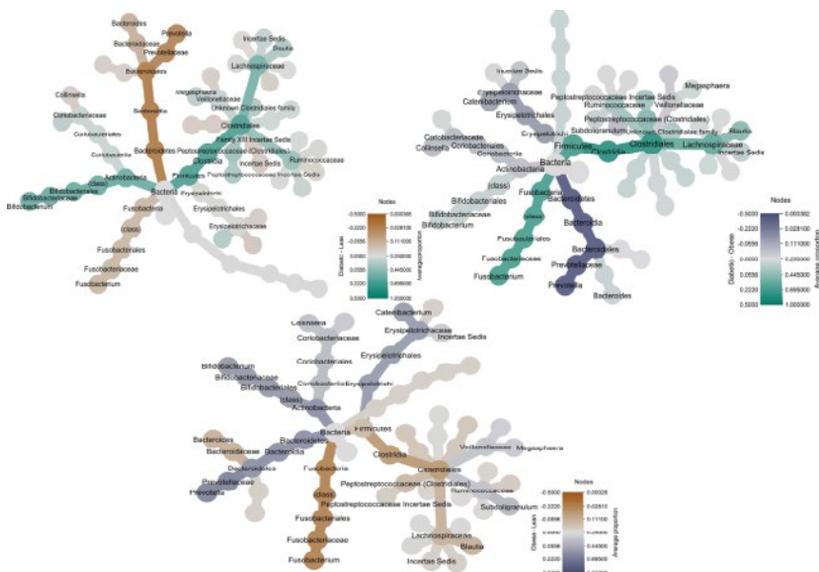


Figura 2. Albero filogenetico con una panoramica delle differenze di abbondanza di microbiota intestinale tra i gruppi. Si vedono le proporzioni di batteri dal *phylum* al genere nei gatti diabetici ($n = 23$) e magri ($n = 24$) e nei gatti sovrappeso/obesi (obesi) ($n = 15$) nello studio trasversale.

	DM vs. LN			DM contro OB			OB vs. LN		
	E	SE	FDR	E	SE	FDR	E	SE	FDR
Phylum									
Actinobatteri	1.7	0.9	0.09	-1.5	1.0	0.2	3.2	1	0.004
Bacteroideti	-4.6	0.8	1.8E-07	-6.8	0.9	2.2E-12	2.2	0.9	0.02
Firmicutes	0	0	1	3.5	1.1	0.004	0	0	1
Fusobatteri	-3.8	1	3.0E-10	-9.8E-10	0.01	1.0	-7.2	1.1	6.4E-10
Classe									
Erysipelotrichi	-1.2	0.8	0.2	-3.0	0.9	0.002	1.8	0.9	0.06
Coriobacteriia	-0.2	0.9	1	-3.6	1.0	0.002	3.4	1	0.002
Actinobacteria (classe)	7.4	1.2	1.9E-09	-0.3	1.3	1.0	7.6	1.3	1.8E-08
Bacteroidia	-4.6	0.8	1.3E-07	-6.8	0.9	2.7E-12	2.2	0.9	0.03
Fusobatteri (classe)	-3.7	1	5.0 E-04	3.5	1.1	0.004	-7.2	1.1	2.5E-09
Clostridi	0	0	1	-9.2E-10	0.01	1.0	0	0	1
Ordine									
Erysipelotrichales	-1.2	0.8	0.2	-3.0	0.9	0.0	1.8	0.9	0.06
Coriobacteriales	-0.2	0.9	1	-3.6	1.0	0.0	3.4	1	0.002
Bifidobacteriales	7.4	1.2	1.9E-09	-0.3	1.3	1.0	7.6	1.3	1.8E-08
Bacteroidales	-4.6	0.8	1.3E-07	-6.8	0.9	2.7E-12	2.2	0.9	0.03
Fusobacteriales	-3.7	1	5.0E-04	3.5	1.1	0.004	-7.2	1.1	2.5E-09
Clostridiales	0	0	1	0.0	0.0	1.0	0	0	1
Famiglia									
Famiglia XIII Incertae Sedis	-1.4	0.8	0.2	-0.5	1.0	0.7	-0.9	1	0.5
Peptococcaceae	-0.8	0.7	0.4	0.02	0.8	1.0	-0.8	0.8	0.5
Clostridiaceae	-1.8	1.2	0.2	-1.2	1.4	0.6	-0.6	1.4	0.8
Veillonellaceae	-2.2	1.2	0.2	-5.3	1.3	3.0 E-04	3.2	1.3	0.05

Erysipelotrichaceae	-0.3	0.8	0.8	-3.1	0.9	0.002	2.8	0.9	0.007
Coriobacteriaceae	-0.2	0.9	0.8	-1.8	1.0	0.2	1.7	1	0.2
Bifidobacteriaceae	8.3	1.2	4.4E-11	-0.7	1.3	0.7	9.0	1.3	2.2E-10
Bacteroidaceae	-1.9	0.7	0.04	-0.8	0.8	0.6	-1.1	0.8	0.3
Prevotellaceae	-5.6	1	10.0E-08	-7.5	1.1	0.0	1.9	1.1	0.2
Porphyromonada- ceae	-1.4	1	0.2	0.2	1.1	0.9	-1.6	1.1	0.2
Ruminococcaceae	0.9	0.5	0.2	-0.7	0.6	0.5	1.6	0.6	0.03
Sconosciuto Erysi- pelotrichales	-1.2	1.1	0.4	-3.5	1.2	0.01	2.2	1.2	0.1
Fusobacteriaceae	-2.9	1	0.02	3.3	1.1	0.01	-6.2	1.1	3.9E-07
Sconosciuto Clo- stridiales	0.5	0.4	0.4	0.6	0.5	0.5	0	0.5	1
Peptostreptococca- ceae (Clostridiales)	0.2	0.5	0.8	0.2	0.5	0.8	0	0.5	1
Lachnospiraceae	-0.1	0.3	0.8	-0.3	0.4	0.6	0.2	0.4	0.7
Genere									
<i>Roseburia</i>	-1.1	1	0.5	0.3	1.2	0.9	-1.4	1.2	0.4
<i>Lachnospira</i>	1.3	1.2	0.5	-1.1	1.3	0.6	2.4	1.3	0.2
Famiglia XIII Incertae Sedis	0.2	0.9	0.9	1.2	1.0	0.5	-1	1	0.5
<i>Lachnospiraceae</i> <i>Incertae Sedis</i>	-8E-09	0	1	-8E-09	0.1	1.0	2.0E-16	0.1	1
<i>Peptococco</i>	-1	0.7	0.4	-0.2	0.8	0.9	-0.7	0.8	0.5
<i>Clostridium (Clostri- diaceae)</i>	-1.9	1.2	0.4	0.3	1.4	0.9	-2.1	1.4	0.3
<i>Megasphaera</i>	-2.7	1.2	0.1	-5.9	1.3	6.9E-05	3.2	1.3	0.04
<i>Dialister</i>	1.3	1.5	0.6	-3.2	1.7	0.2	4.5	1.7	0.04
<i>Peptostreptococcaceae</i> <i>Incertae Sedis</i>	0.9	0.7	0.4	0.3	0.8	0.8	0.6	0.8	0.6

<i>Catenibacterium</i>	0.7	1	0.6	-5.0	1.1	6.9E-05	5.7	1.1	3.9E-06
<i>Erysipelotrichaceae Incertae Sedis</i>	-0.9	0.8	0.5	-2.1	0.9	0.1	1.2	0.9	0.4
<i>Solobacterium</i>	-1.9	1.5	0.4	-1.8	1.6	0.5	-0.1	1.6	1
<i>Collinsella</i>	-0.1	1	1	-0.5	1.1	0.8	0.4	1.1	0.8
Sconosciuto Coriobacteriaceae	3.5	1.1	0.01	1.1	1.2	0.6	2.4	1.2	0.1
<i>Bifidobacterium</i>	8	1.2	1.4E-10	1.2	1.3	0.5	6.7	1.3	2.3E-06
<i>Bacteroides</i>	-1.4	0.8	0.3	0.9	0.9	0.5	-2.3	0.9	0.04
<i>Prevotella</i>	-4.7	1	3.6E-05	-6.5	1.1	1.2E-07	1.9	1.1	0.2
<i>Parabacteroides</i>	-1.8	0.9	0.2	1.2	1.1	0.5	-3	1.1	0.03
<i>Sottodoligranulo</i>	0.9	0.9	0.5	-2.7	1	0.04	3.6	1	0.003
<i>Fecalibacterium</i>	-0.7	0.8	0.6	0.3	0.9	0.8	-1	0.9	0.4
<i>Anaerotruncus</i>	-2.8	0.8	0.01	-2.7	0.9	0.02	-0.1	0.9	1
<i>Fusobacterium</i>	-1.6	1.1	0.4	5.5	1.2	5.2E-05	-7.1	1.2	8.1E-08
Sconosciuto Lachnospiraceae	0.3	0.6	0.7	0.4	0.7	0.8	-0.1	0.7	1
Sconosciuto Ruminococcaceae	0.6	0.9	0.7	1.4	1.1	0.5	-0.9	1.1	0.6
<i>Coprococcus</i>	0.5	0.6	0.6	1.0	0.7	0.4	-0.5	0.7	0.6
<i>Blautia</i>	0	0.5	1	0.7	0.5	0.5	-0.6	0.5	0.4

Tabella 2. Differenze nell'abbondanza relativa rarefatta del microbiota intestinale più comune a livello di phylum e di genere, tra gatti diabetici (DM), (n = 23), magri (LN), (n = 24) e sovrappeso/obesi (OB), (n = 15). Le differenze sono illustrate come dimensione dell'effetto (E) espressa come differenza tra i gruppi in termini di logaritmo binario (2n), compreso l'errore standard (SE) della dimensione dell'effetto e il valore p aggiustato per il tasso di falsa scoperta (FDR), considerato significativo con FDR < 0,05 (in grassetto).

	DM vs. LN			DM contro OB			OB vs. LN		
	E	SE	FDR	E	SE	FDR	E	SE	FDR
Phylum									
Actinobatteri	-1.3	1.3	0.6	0.2	1.3	1.0	-1.5	1.3	0.3
Bacteroideti	-1.5	1.2	0.6	-3.4	1.2	0.02	1.9	1.2	0.3

Fusobatteri	0.8	1.5	0.8	-1.1	1.4	0.9	1.9	1.4	0.3
Firmicutes	0	0	1	-8E-15	0.02	1.0	0	0	1
Classe									
Erysipelotrichi	-0.5	1.2	0.8	-0.6	1.2	0.7	0.1	1.2	1
Coriobacteriia	-1.4	1.4	0.8	2.5	1.3	0.2	-3.8	1.3	0.02
Actinobatteri	-1.1	1.7	0.8	-0.8	1.7	0.7	-0.3	1.6	1
Bacteroidia	-1.5	1.2	0.8	-3.4	1.2	0.0	1.9	1.2	0.3
Fusobatteri	0.8	1.5	0.8	-1.1	1.5	0.7	1.8	1.4	0.4
Clostridi	-4E-15	0.02	1	-3E-15	0.02	1.0	-1E-15	0.02	1
Ordine									
Erysipelotrichales	-0.5	1.2	0.8	-0.6	1.2	0.7	0.1	1.2	1
Coriobacteriales	-1.4	1.4	0.8	2.5	1.3	0.2	-3.8	1.3	0.02
Bifidobacteriales	-1.1	1.7	0.8	-0.8	1.7	0.7	-0.3	1.6	1
Bacteroidales	-1.5	1.2	0.8	-3.4	1.2	0.0	1.9	1.2	0.3
Fusobacteriales	0.8	1.5	0.8	-1.1	1.5	0.7	1.8	1.4	0.4
Clostridiales	-4E-15	0.02	1	-3E-15	0.02	1.0	-1E-15	0.02	1
Famiglia									
Famiglia XIII Incertae Sedis	-1.3	1.3	0.6	0.7	1.2	0.8	-2.0	1.2	0.3
Peptococcaceae	-0.2	1.1	0.9	0.2	1.0	0.9	-0.4	1.0	0.8
Clostridiaceae	-2.9	1.9	0.6	-5.6	1.8	0.01	2.7	1.7	0.3
Veillonellaceae	-1.5	1.7	0.7	-3.2	1.7	0.1	1.8	1.6	0.5
Erysipelotrichaceae	-0.3	1.2	0.9	-0.3	1.1	0.9	0.03	1.1	1.0
Coriobacteriaceae	-2.4	1.3	0.6	1.8	1.3	0.3	-4.2	1.3	0.01
Bifidobacteriaceae	-0.1	1.8	1.0	-0.1	1.7	0.9	0.1	1.6	1.0
Bacteroidaceae	-1.2	1.1	0.6	-2.1	1.0	0.1	0.9	1.0	0.6
Prevotellaceae	-0.3	1.4	0.9	0.2	1.4	0.9	-0.5	1.4	0.8
Porphyromonadaceae	-0.4	1.5	0.9	-1.3	1.4	0.6	0.9	1.3	0.7
Ruminococcaceae	-0.2	0.8	0.9	-1.7	0.8	0.1	1.4	0.8	0.2
Sconosciuto Erysipelotrichales	-1.8	1.5	0.6	-1.0	1.5	0.8	-0.9	1.4	0.7
Fusobacteriaceae	1.6	1.5	0.6	-0.1	1.4	0.9	1.7	1.4	0.4
Sconosciuto Clostridiales	0.2	0.7	0.9	1.4	0.6	0.1	-1.2	0.6	0.2
Peptostreptococcaceae (Clostridiales)	1.9	0.7	0.1	2.9	0.6	5.0E-05	-1.0	0.6	0.3
Lachnospiraceae	-0.6	0.5	0.6	-2.2	0.5	5.0E-05	1.5	0.5	0.01

Genere									
<i>Roseburia</i>	-1.5	1.6	0.7	-4.1	1.6	0.1	2.6	1.4	0.4
<i>Lachnospira</i>	-1.3	1.7	0.8	-3.7	1.6	0.1	2.3	1.5	0.5
Famiglia XIII Incertae Sedis	-0.3	1.4	1	1.3	1.3	0.6	-1.6	1.3	0.6
<i>Lachnospiraceae Incertae Sedis</i>	0	0.1	1	0.0	0.1	1	0	0.1	1
<i>Peptococco</i>	1.2	1.1	0.6	1.3	1.1	0.5	-0.1	1	1
<i>Clostridium (Clostridiaceae)</i>	-3	1.9	0.4	-4.6	1.8	0.1	1.6	1.7	0.6
<i>Megasphaera</i>	0.6	1.7	1	-0.9	1.7	0.9	1.5	1.6	0.6
<i>Dialister</i>	-6.8	2.3	0.04	-10.8	2.2	3.0E-05	4	2.1	0.4
<i>Peptostreptococcaceae Incertae Sedis</i>	1.6	1	0.4	3.3	1.0	0.008	-1.7	1	0.4
<i>Catenibacterium</i>	0.4	1.5	1	0.6	1.4	0.9	-0.3	1.4	1
<i>Erysipelotrichaceae Incertae Sedis</i>	-1.6	1.2	0.5	-1.1	1.2	0.6	-0.5	1.2	0.9
<i>Solobacterium</i>	-0.2	2.1	1	0.5	2.1	0.9	-0.8	2	0.9
<i>Collinsella</i>	-1	1.5	0.8	3.0	1.4	0.1	-4	1.4	0.1
Sconosciuto <i>Coriobacteriaceae</i>	0.6	1.7	1	2.4	1.6	0.4	-1.8	1.6	0.6
<i>Bifidobacterium</i>	0.1	1.7	1	0.7	1.7	0.9	-0.6	1.6	0.9
<i>Bacteroides</i>	0.5	1.2	1	0.4	1.1	0.9	0.2	1.1	1
<i>Prevotella</i>	-1.5	1.5	0.6	-1.4	1.4	0.6	-0.2	1.4	1
<i>Parabacteroides</i>	0.4	1.4	1	-0.2	1.4	1.0	0.5	1.3	0.9
<i>Sottodoligranulo</i>	-2.7	1.3	0.2	-4.1	1.3	0.01	1.5	1.2	0.6
<i>Fecalibacterium</i>	1.8	1.2	0.4	-0.2	1.1	1.0	2.1	1.1	0.4
<i>Anaerotruncus</i>	2.4	1.2	0.2	1.2	1.1	0.6	1.1	1.1	0.6
<i>Fusobacterium</i>	0.1	1.6	1	-1.2	1.5	0.7	1.3	1.5	0.6
Sconosciuto <i>Lachnospiraceae</i>	2.7	0.9	0.04	1.7	0.8	0.1	1	0.8	0.6
Sconosciuto <i>Ruminococcaceae</i>	3.7	1.4	0.1	1.8	1.3	0.4	1.9	1.3	0.5
<i>Coprococcus</i>	-0.6	0.8	0.8	-0.1	0.8	1.0	-0.5	0.8	0.8
<i>Blautia</i>	-0.9	0.7	0.5	-0.5	0.7	0.7	-0.4	0.7	0.8

Tabella 3. Differenze nell'abbondanza relativa rarefatta del microbiota intestinale più comune a livello di phylum e di genere, tra gatti diabetici (DM), (n = 11) e magri (LN), (n = 12) e gatti sovrappeso/obesi (OB), (n = 13) dopo l'intervento dietetico. Le differenze sono illustrate come dimensione dell'effetto espressa come differenza tra i gruppi in termini

ni di logaritmo binario ($2n$), compreso l'errore standard (SE) della dimensione dell'effetto (E) e il valore di p aggiustato per il tasso di scoperta falsa (FDR [False Discovery Rate]), che è stato considerato significativo con $FDR < 0,05$ (in grassetto).

7.2.3 ANALISI DI CORRELAZIONE E ANALISI DELLE CORRISPONDENZE CANONICHE (CCA)

La correlazione dei dati sul microbiota più abbondante a livello di famiglia con il punteggio di condizione corporea, il peso corporeo (BW) e i livelli sierici di fruttosamina e SAA ha rivelato correlazioni significative con diverse famiglie microbiche intestinali (si veda la Fig. 3 per i dettagli). I livelli sierici di fruttosamina si correlavano positivamente con le *Enterobacteriaceae* ($R2 = 0,47$, $FDR < 0,01$), mentre vi era una correlazione negativa con le *Prevotellaceae* ($R2 = -0,43$, $FDR < 0,05$). I livelli di SAA erano correlati negativamente con l'abbondanza relativa delle *Ruminococcaceae* ($R2 = -0,43$, $FDR < 0,05$). Inoltre, il peso corporeo ha mostrato una correlazione negativa con la Famiglia XIII *Incertae Sedis* ($R2 = -0,38$, $FDR < 0,05$).

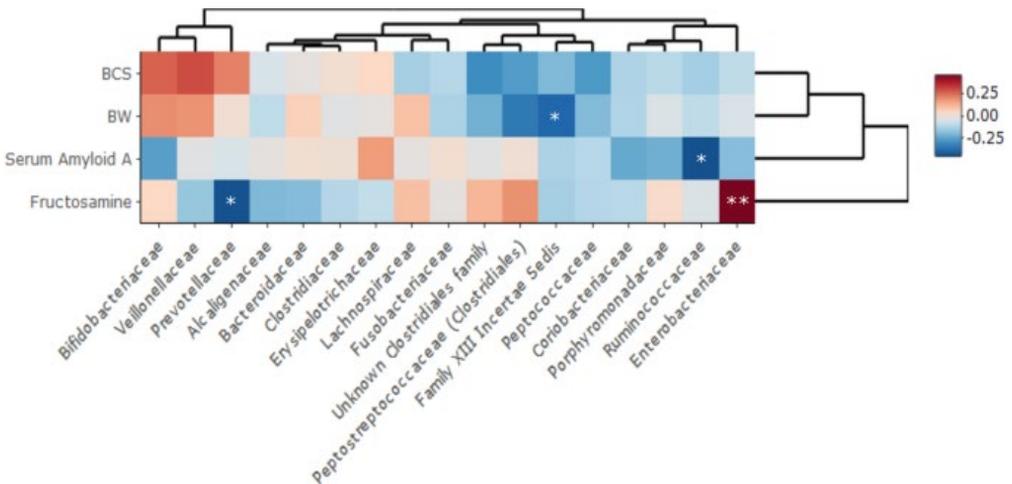


Figura 3. Heatmap della correlazione tra l'abbondanza relativa del microbiota intestinale e specifici parametri clinici. È stata eseguita una correlazione Spearman a coppie tra i dati di abbondanza relativa del microbiota più abbondante a livello familiare e il peso corporeo, il punteggio di condizione corporea, l'amiloide A sierica (SAA) e i livelli di

fruttosamina di tutti i gatti (diabetici (n = 23), magri (n = 24) e sovrappeso/obesi (n = 15)) dello studio trasversale. I valori di P sono stati aggiustati utilizzando la FDR e sono stati considerati significativi quando la FDR < 0,05. *FDR < 0,05, **FDR < 0,01.

A livello di OTU, l'83% della variazione nel GM è stata spiegata dall'emocromo completo, dai valori biochimici, dal gruppo (LN, OB e DM), dal Paese, dal peso corporeo, dal punteggio di condizione corporea, dall'età, dal sesso, dalla castrazione e dal punteggio fecale (Fig. S3 supplementare). Di queste variabili analizzate, dieci hanno avuto un effetto significativo sulla variazione microbica a livello di OTU dopo gli aggiustamenti FDR, tra cui l'appartenenza al gruppo LN o OB, i livelli di emoglobina e i livelli sierici di creatinina, bilirubina, fosfatasi alcalina, magnesio, fosforo, glucosio e fruttosamina (Fig. S3 supplementare).

7.2.4 PROFILI FUNZIONALI PREVISTI

L'indice medio dei taxon più vicini sequenziati (NSTI [*Nearest Sequenced Taxon Index*]) e la deviazione standard sono stati di $0,07 \pm 0,02$. I punteggi NSTI bassi, vicini a 0,06, indicano che PICRUST è stato in grado di prevedere le funzioni dei microbi dell'intestino felino. Per ulteriori dettagli si veda la Tabella supplementare S3.

7.3 DISCUSSIONE

In questo studio su gatti campionati in due diversi Paesi europei abbiamo dimostrato che i gatti diabetici presentano una ricchezza complessiva del GM significativamente ridotta rispetto ai gatti sani magri. In seguito a un intervento dietetico di 4 settimane con una dieta ad alto contenuto proteico in commercio, formulata per gatti diabetici, i gatti DM hanno mostrato una riduzione della ricchezza e dell'uniformità rispetto ai gatti LN, la comunità microbica GM dei gatti DM differiva da quella dei gatti LN e OB e si è osservata una riduzione dell'uniformità anche nei gatti DM rispetto ai gatti OB. Lo studio trasversale ha anche rivelato delle differenze nelle comunità microbiche (esprese

come beta-diversità) dei gatti DM, rispetto a quelli LN e OB. È interessante notare che non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nella comunità microbica tra gatti LN e OB, né nello studio trasversale né in quello di intervento. È stata inoltre rilevata una correlazione tra la diminuzione della diversità, la fruttosamina sierica e i livelli circolanti di glucosio e acidi biliari nello studio trasversale. La correlazione con la fruttosamina e il glucosio non è sorprendente se si considerano le differenze di ricchezza e diversità tra i gatti DM e i gatti LN. Anche la correlazione tra i livelli sierici di acidi biliari e la diminuzione della diversità microbica intestinale è interessante, considerando che la produzione di acidi biliari secondari da parte dei GM è probabilmente un meccanismo dei GM per influenzare il metabolismo del glucosio dell'ospite [20]. L'aumento della diversità, d'altra parte, è stato correlato con l'emoglobina e il volume delle cellule impacchettate nello studio trasversale, e una correlazione tra la composizione del GM e l'emoglobina è stata notata anche nell'uomo, dove è stata suggerita una connessione con un maggior numero di microbi dipendenti dall'ossigeno [21]. È possibile che i gatti con un GM più diversificato avessero anche livelli più elevati di batteri più dipendenti dall'ossigeno [22].

La diminuzione della ricchezza e della diversità dei gatti DM si riflette ulteriormente nel fatto che quasi tutte le differenze osservate tra gatti diabetici e magri, indipendentemente dal livello tassonomico, derivano da una diminuzione dei taxa specifici nel GM dei gatti DM. Le differenze nella composizione del microbiota tra gatti DM e gatti sani LN e OB si sono tradotte in differenze nelle funzioni metaboliche previste dei batteri intestinali. Dopo aver somministrato una dieta diabetica a una parte dei gatti per quattro settimane, sono state osservate meno differenze tra i taxa microbici dei gatti diabetici rispetto a quelli magri e tra quelli OB e LN. La ragione di una GM più simile nei tre gruppi dopo l'intervento potrebbe essere il risultato della riduzione degli effetti confondenti della dieta, ma anche la dimensione ridotta del campione potrebbe contribuire alla mancanza di differenze significative.

La riduzione della diversità microbica intestinale è una caratteristica comune a diverse malattie umane [23,24,25]. La riduzione della diversità, una caratteristica della disbiosi, è stata trovata nei cani con diverse malattie acute e croniche, come l'insufficienza pancreatica esocrina [26], la diarrea acuta [27], la malattia infiammatoria intestinale idiopatica [28] e l'obesità [29]. Nei gatti, la riduzione della diversità batterica è stata associata a diarrea acuta e cronica [30]. Tuttavia, la diminuzione della diversità microbica non è stata segnalata come una caratteristica del microbiota intestinale del T2DM umano [14], né è stata riportata in uno studio precedente che confrontava la composizione del GM di gatti diabetici e sani [16]. È interessante notare che in questo studio la diversità dopo la dieta in gatti DM e gatti sani LN era molto più tendente all'aumento (vedi Fig. 1B).

Nell'intestino umano, la percentuale di Fusobacteria (e in particolare di *F.nucleatum*) aumenta in caso di cancro del colon-retto [31]. Questi batteri sono più prevalenti nei carnivori (aviani [32], rettili, mammiferi marini [33,34], cani e gatti [35]) che nell'uomo. Attualmente mancano le conoscenze sul ruolo dei Fusobacteria nel microbiota dei carnivori. Negli avvoltoi, *Fusobacterium* sembra essere innocuo o addirittura benefico per l'ospite [32], ed è quindi possibile che lo stesso valga per cani e gatti. Nel nostro studio, la proporzione di Fusobacteria e Fusobacteriaceae è diminuita nei gatti DM, ma non è stata osservata alcuna variazione significativa in nessun genere di *Fusobacterium*. Si ipotizza che la diminuzione della percentuale di Fusobacteria nei gatti con DM rispetto a quelli con LN possa essere semplicemente la conseguenza della ridotta diversità batterica riscontrata nel gruppo diabetico. Tuttavia, l'implicazione della diminuzione dei Fusobacteria nei gatti DM e OB rispetto ai gatti LN è attualmente sconosciuta e la relazione con la diminuzione della diversità non spiega la percentuale più bassa nei gatti OB.

Nei gatti con DM la diminuzione della percentuale del genere *Prevotella* è particolarmente interessante, perché è stata osservata una correlazione negativa tra la famiglia delle Prevotellaceae e i livelli di fruttosamina nel siero. La fruttosamina sierica viene

monitorata per controllare la glicemia e per diagnosticare il diabete nei gatti, dato che è un marcatore dei livelli di glucosio nel sangue a lungo termine (2-3 settimane), come l'emoglobina A1c (HbA1c) nell'uomo [36]. È interessante notare che un intervento dietetico di 3 giorni a base di chicchi d'orzo in esseri umani sani ha migliorato la risposta al glucosio e all'insulina, ma solo quando è stato osservato un aumento concomitante dell'abbondanza di *Prevotella copri* [37]. Inoltre, nello stesso studio, i topi privi di germi hanno mostrato una migliore tolleranza al glucosio e un maggiore accumulo di glicogeno epatico rispetto ai topi di controllo quando hanno ricevuto un gavage giornaliero con *P. copri* viva isolata dalle feci umane [37]. In generale, le diete ricche di carboidrati e fibre sono associate a un aumento del genere *Prevotella* nell'intestino. Analogamente, uno studio condotto su gattini in crescita ha rivelato che una dieta a moderato contenuto proteico e moderato contenuto di carboidrati ha portato a un aumento della percentuale di *Prevotella*, mentre una dieta ad alto contenuto proteico e basso contenuto di carboidrati ha portato a un aumento di *Bacteroides* [38]. Ciò potrebbe indicare che anche nei gatti i livelli di *Prevotella* sono correlati ai carboidrati della dieta, mentre i *Bacteroides* sono correlati alle proteine animali. Tuttavia, la presenza del genere *Prevotella* nel GM degli esseri umani è stata associata anche a delle malattie [39,40].

Il genere *Prevotella* presenta un'ampia variabilità genetica tra specie e ceppi diversi [41]. Ciò può essere una spiegazione per questi risultati contrastanti sul fatto che la presenza di *Prevotella* nell'intestino debba essere vista semplicemente come un riflesso della composizione della dieta, e/o se la sua presenza sia benefica o dannosa per l'ospite. Comprendere la funzione delle diverse specie e ceppi di *Prevotella* attraverso la caratterizzazione metagenomica completa e la coltura dei ceppi isolati sembra quindi un primo passo essenziale per capire se e come questi possano essere utilizzati per trattare o prevenire le malattie nell'uomo e negli animali.

L'aumento dei livelli di *E. coli*, membri delle *Enterobacteriaceae*, nell'intestino è stato associato a malattie, come quelle ri-

scontrate nei pazienti con T2DM, nonché a malattie infiammatorie acute (ad esempio la pancreatite acuta nell'uomo) [42]. In modelli roditori di obesità e insulino-resistenza, l'aumento dei livelli di *E. coli* nell'intestino ha aumentato la permeabilità intestinale e i livelli di endotossine circolanti, portando a un'inflammatione sistemica di basso grado [11,43]. In questo studio, i livelli di fruttosamina si correlavano positivamente con la presenza di *Enterobacteriaceae* nel GM. L'inflammatione di basso grado è uno dei meccanismi proposti attraverso i quali il microbiota intestinale può causare insulino-resistenza e T2DM. In altri modelli di roditori, l'inflammatione dell'ospite, causata da un'infezione, da un attacco chimico o da una predisposizione genetica, porta a un aumento della crescita della famiglia delle *Enterobacteriaceae* [44], e ciò indica che l'inflammatione dell'ospite, indipendentemente dalla causa, può esserne l'innescò.

Il *Bifidobacterium* può essere associato al punteggio della condizione corporea nei gatti, come indicano alcuni dei risultati di questo studio. I gatti DM presentavano una proporzione maggiore di *Actinobacteria* (classe) rispetto ai gatti LN, che a livelli tassonomici più bassi sono stati visti come una proporzione maggiore di *Bifidobacterium* e, in misura minore, di un genere sconosciuto delle *Coriobacteriaceae*. Inoltre, i gatti OB presentavano una percentuale maggiore di *Actinobacteria* rispetto ai gatti LN e una percentuale maggiore di *Bifidobacterium* a livello di genere. I gatti DM erano più pesanti dei gatti LN, con un punteggio di condizione corporea mediano di 6/9. Una possibile spiegazione è quindi che la maggiore percentuale di *Bifidobacterium* sia associata alle condizioni corporee dei gatti.

Dialister, *Anaerotruncus* e alcuni membri della famiglia delle *Ruminococcaceae* sono batteri produttori di butirrato e/o propionato. Nello studio trasversale è stata osservata una percentuale significativamente inferiore di *Anaerotruncus* nei gatti diabetici e una percentuale significativamente inferiore di *Dialister* e di un genere sconosciuto di *Ruminococcaceae* nei gatti con DM rispetto a quelli con LN dopo l'intervento dietetico. Nei bambini con T1D sono stati osservati livelli ridotti di *Anaerotruncus* rispet-

to ai controlli 45. Inoltre, *Dialister* era completamente assente nei bambini geneticamente predisposti al T1D e che hanno sviluppato la malattia più tardi nella vita 46. Un recente studio metagenomico di grandi dimensioni ha rilevato che i pazienti con T2DM non trattati con metformina presentavano una diminuzione dei generi contenenti produttori noti di butirrato 6. Nel presente studio, le *Ruminococcaceae* sono risultate negativamente correlate al marcatore di infiammazione acuta SAA. Il butirrato aumenta la sensibilità all'insulina e il dispendio energetico nei topi. Inoltre, il butirrato può avere effetti immunomodulanti 9. *In vivo*, i topi alimentati con una dieta ricca di fibre solubili hanno mostrato un aumento del recettore agonista dell'interleuchina 1 (IL-1RA) nel cervello, una citochina nota per inibire le citochine infiammatorie dopo l'esposizione all'LPS. Gli autori hanno proposto che questo effetto avvenga attraverso la produzione di butirrato [47]. Il butirrato può quindi regolare le risposte immunitarie non solo nell'intestino, ma può avere un effetto più diffuso sulla risposta infiammatoria dell'ospite. Pertanto, la mancanza di batteri con la capacità di produrre butirrato potrebbe essere una caratteristica importante del GM dei gatti diabetici.

Dopo l'intervento dietetico, la diversità era ancora significativamente più bassa nei gatti DM, non solo rispetto al gruppo LN ma anche rispetto al gruppo OB. Questo risultato indica che un intervento dietetico con una dieta commerciale ad alto contenuto proteico può aumentare la diversità batterica intestinale di un gatto sano in sovrappeso o obeso, ma probabilmente non di un gatto diabetico. La dieta di intervento era una dieta commerciale prodotta per supportare i gatti diabetici nel metabolismo, passando da un assorbimento meno diretto del glucosio dai carboidrati alimentari a una gluconeogenesi epatica più controllata dagli aminoacidi. Sebbene la dieta non sia stata formulata con lo scopo di aumentare la diversità microbica intestinale, è possibile che la dieta da sola non sia in grado di aumentare la diversità microbica nell'intestino dei gatti diabetici. Bisogna verificare se sono utili altre misure, come l'integrazione di probiotici o il trapianto fecale,

da sole o in combinazione con una dieta studiata appositamente per promuovere i batteri produttori di butirrato, ad esempio.

Due dei percorsi funzionali previsti che differivano tra i gatti DM e LN erano di particolare interesse. Nello studio trasversale è stata riscontrata una diminuzione significativa della via “Biosintesi dell’ubichinone e di altri terpenoidi-chinoni” nei gatti con DM rispetto a quelli con LN. Come per gli esseri umani, la vitamina K è una vitamina essenziale per i gatti. È una vitamina liposolubile che, tra le altre funzioni, è necessaria per l’emostasi. La vitamina K si presenta in due forme naturali: il fillochinone (vitamina K1) e il menachinone (vitamina K2). Il fillochinone viene convertito in menachinone dai batteri intestinali attraverso la via della “biosintesi dell’ubichinone e di altri terpenoidi-chinoni” [48]. È stato dimostrato che l’integrazione di vitamina K in pazienti anziani maschi con T2DM aumenta la sensibilità all’insulina [49]. È possibile che i gatti diabetici traggano beneficio dall’integrazione di vitamina K, ma questo aspetto deve essere ulteriormente studiato. Va sottolineato che questi risultati sono stati generati utilizzando un algoritmo (PICRUST) che predice i geni batterici in base alla previsione delle OTU basate sul 16S rRNA. I percorsi funzionali proposti devono quindi essere interpretati con cautela. Inoltre, la caratterizzazione del microbiota intestinale con il sequenziamento del 16S rRNA è di per sé distorta a causa di diversi fattori associati al sequenziamento dei geni ampliconi in generale [50,51]. La profondità di sequenziamento di 9000 letture utilizzata potrebbe non essere stata sufficiente a coprire i batteri intestinali più rari nel microbiota felino e questo potrebbe aver influenzato le differenze riscontrate nella diversità microbica intestinale. Tuttavia, uno studio precedente sui cambiamenti a lungo termine del GM negli esseri umani ha rilevato che il sequenziamento oltre una profondità di 10.000 letture non ha aumentato sostanzialmente l’individuazione di specie rare [52] e i gatti, in quanto carnivori, hanno probabilmente una composizione del GM meno diversificata rispetto agli esseri umani [53].

Una delle limitazioni del disegno dello studio è che, anche se la dieta è stata controllata per un breve periodo in un sot-

toinsieme di gatti, i gatti sono stati ospitati in case diverse dove diversi fattori ambientali possono aver influenzato in modo diverso il loro microbiota intestinale. Un'altra limitazione è che lo studio di intervento sulla dieta è stato condotto solo su 34 dei 40 gatti danesi, a causa delle indicazioni del proprietario o di altre considerazioni. Poiché la dieta a breve termine è stata esclusa come fattore di confondimento delle differenze tra i gruppi, ciò potrebbe aver parzialmente compensato la minore dimensione del campione. Tuttavia, l'inclusione dell'intervento dietetico descritto per almeno un sottogruppo di gatti è ancora un punto di forza, poiché abbiamo potuto concludere che le differenze nel microbiota intestinale rilevate tra i gruppi non sembrano essere dovute solo a differenze nei regimi alimentari. Un altro punto di forza dello studio è stato il fatto che sono stati inclusi gatti provenienti da due Paesi diversi, poiché ciò indica che i risultati possono essere applicati ai gatti in generale. Ciò potrebbe essere parzialmente dovuto alle multinazionali di cibo per animali domestici, che fanno sì che i gatti siano alimentati in modo più simile tra loro nei diversi Paesi rispetto agli esseri umani. Infine, è stato un punto di forza il fatto che nel protocollo di studio siano stati inclusi due gruppi di controllo, sia magri che obesi, tutti compresi nell'intervallo di età dei gatti diabetici: ciò indica che le differenze rilevate nel gruppo diabetico non sembrano essere legate solo all'età o alla condizione corporea.

In conclusione, i nostri dati indicano che il GM dei gatti diabetici presenta una diversità ridotta rispetto ai gatti sani magri e a quelli sovrappeso/obesi. La variazione di diversità rispetto al gruppo sovrappeso/obeso è stata più evidente dopo un intervento di quattro settimane con una dieta ad alto contenuto di proteine/basso contenuto di carboidrati. Molti dei generi batterici che erano diminuiti nei gatti diabetici rispetto ai gatti sani e magri sono noti per essere produttori di butirrato SCFA. I livelli di fruttosamina nel siero erano correlati positivamente con la famiglia delle Enterobacteriaceae, notoriamente associata a infiammazione sistemica di basso grado. Invece, dato che alcune specie di *Prevotellaceae* sono associate a una migliore tolleranza al

glucosio, qui correlavano negativamente con i livelli di fruttosamina nel siero. Infine, la previsione dei genomi batterici funzionali ha indicato che il microbiota intestinale dei gatti diabetici può essere meno capace di produrre vitamina K rispetto ai gatti sani e magri. Inoltre, sono state rilevate alcune differenze inedite nei *Fusobacteria*, *Fusobacteriaceae* e *Bifidobacterium* che potrebbero essere correlate alle condizioni fisiche dei gatti, mentre un genere sconosciuto di *Lachnospiraceae* e *Peptostreptococcaceae Incertae Sedis* era più frequente nei gatti diabetici. Tuttavia, poiché questi taxa non sono associati in modo chiaro all'obesità o al diabete nella stessa o in altre specie ospiti, la loro importanza deve essere interpretata con cautela.

Questi risultati dovrebbero essere ulteriormente valutati e caratterizzati attraverso il sequenziamento metagenomico *shotgun* per consentire la caratterizzazione di specifiche specie batteriche e delle loro potenzialità funzionali che potrebbero essere importanti per ottenere una migliore sensibilità all'insulina nei gatti. Tali iniziative potrebbero identificare possibili bersagli nel microbiota intestinale dei gatti diabetici da perseguire per future opzioni di trattamento o prevenzione della FDM, fungendo eventualmente da modello per opzioni terapeutiche simili nei pazienti umani affetti da T2DM.

7.4 METODI

7.4.1 GATTI

In questo studio prospettico multicentrico, i gatti sono stati reclutati in due sedi: Copenhagen, Danimarca e Zurigo, Svizzera. I gatti erano di proprietà privata, chiusi in casa e di età superiore ai 6 anni. Il reclutamento dei gatti danesi sani, magri e in sovrappeso/obesi è stato effettuato principalmente attraverso annunci pubblicitari negli ambulatori di animali da compagnia locali, nei negozi di animali e sui social media. I gatti diabetici e i gatti svizzeri sani, magri e sovrappeso/obesi sono stati re-

clutati principalmente tra i pazienti dell'Ospedale Universitario per Animali da Compagnia di Copenhagen e della Clinica di Medicina Interna dei Piccoli Animali dell'Università di Zurigo, rispettivamente. Il reclutamento è stato effettuato da dicembre 2014 a dicembre 2016. I gatti reclutati sono stati suddivisi in tre gruppi: il gruppo diabetico (DM), il gruppo sano sovrappeso/obeso (OB) e il gruppo sano magro (LN). La categorizzazione si è basata su alcuni criteri di inclusione ed esclusione che elenchiamo qui di seguito.

Tutti i gatti dovevano avere più di 6 anni e non aver ricevuto alcun trattamento antibiotico negli ultimi quattro mesi, né probiotici o additivi alimentari come i prebiotici nelle ultime due settimane. Inoltre, i gatti di controllo sani (LN e OB) sono stati esclusi se presentavano anomalie superiori o inferiori al 10% dell'intervallo di riferimento all'emocromo completo, all'analisi biochimica o delle urine, o anomalie rilevate durante l'esame fisico. In più i gatti inclusi nei gruppi LN e OB non avevano un'anamnesi recente di malattia, né prove di malattia cronica, né ricevevano alcun tipo di farmaco. I gatti del gruppo OB avevano un punteggio di condizione corporea [54] di 7-9/9, mentre i gatti del gruppo LN avevano un punteggio di condizione corporea di 4-5/9, al momento dell'inclusione. I gatti con un punteggio di condizione corporea di 6/9 sono stati esclusi per ridurre al minimo la sovrapposizione delle percentuali di grasso effettivo tra i gruppi e per garantire una corretta separazione tra gatti magri e gatti sovrappeso/obesi [55].

Tutti i gatti diabetici inclusi nello studio sono stati (i) diagnosticati con diabete mellito il giorno dell'inclusione in base all'anamnesi della malattia (PU/PD, perdita di peso, polifagia, anoressia eventualmente combinata con una posizione plantigrada) e/o alle anomalie del sangue e delle urine (glucosio nel sangue ≥ 14 mmol/L e glucosuria e iperfruttosemia), oppure (ii) sono stati precedentemente diagnosticati con la malattia e stavano ricevendo un trattamento con insulina il giorno dell'inclusione. [...]

PARTE IV

FARMACI E MICROBIOTA

Anche se non sono gli unici farmaci che influiscono, in generale in senso negativo, sul microbiota intestinale, gli antibiotici sono certamente i più distruttivi. In questa sezione quindi riportiamo una breve raccolta di lavori finalizzati ad approfondire questa tematica.

La lettura di questi paper, come sempre rappresentativi di una ampia letteratura in merito, vuole portare soprattutto il medico veterinario clinico a riconsiderare il suo approccio a molte patologie e spesso alla profilassi di queste. Se infatti abbiamo la percezione di quanto danno possa fare il farmaco che stiamo andando a segnare in ricetta e conosciamo i dati, ad esempio, sull'outcome clinico di alcune patologie anche in assenza di antibiotici, potremmo essere più motivati a fare un uso parsimonioso.

L'utilizzo razionale degli antibiotici d'altra parte è finalizzato fra l'altro, in un'ottica One Health, alla riduzione dell'antibiotico resistenza non solo nelle specie da compagnia, ma anche negli esseri umani conviventi. Anche per questo, a chiudere questa sezione, abbiamo inserito un paper sull'argomento, in grado di (speriamo) di darci diverse buone ragioni per "fermare la nostra penna".

N.d.C.

8 - IMPATTO DELLE TERAPIE ANTIBIOTICHE SULLA DINAMICA DEI GENI DELLA RESISTENZA E COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA INTESTINALE ANIMALE

Tratto e tradotto da

Rochegüe, T.; Haenni, M.; Mondot, S.; Astruc, C.; Cazeau, G.; Ferry, T.; Madec, J.-Y.; Lupo, A. *Impact of Antibiotic Therapies on Resistance Genes Dynamic and Composition of the Animal Gut Microbiota*. *Animals* 2021, 11, 3280.



<https://doi.org/10.3390/ani11113280>

Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

Gli antibiotici modificano profondamente il microbiota gastrointestinale, impoverendo le specie batteriche benefiche per la salute dell'ospite e favorendo l'emergere di potenziali patogeni. Inoltre, l'intestino è un sito di resistenza agli antibiotici e la presenza di antibiotici porta a più batteri resistenti che possono diffondersi nell'ambiente e propagarsi ad altri ospiti. Abbiamo guardato agli studi condotti sugli animali che analizzano l'effetto degli antibiotici sul microbiota intestinale e la resistenza agli antibiotici, concentrandoci sui principali animali da produzione alimentare e da compagnia. Indipendentemente dalle classi di antibiotici e dagli ospiti animali, il dosaggio terapeutico ha ridotto la diversità e la ricchezza delle specie, favorendo lo sviluppo di potenziali enteropatogeni e di resistenza agli antibiotici. Questi effetti negativi delle terapie antibiotiche sembrano ineluttabili, ma spesso sono stati attenuati quando l'antibiotico è stato somministrato per via parenterale. I dosaggi sub-terapeutici hanno causato un aumento dei taxa coinvolti nel metabolismo degli zuccheri, suggerendo un legame con l'aumento di peso. Questo risultato non deve essere interpretato positivamente, con-

siderando che raramente sono state riportate informazioni parallele sullo sviluppo della resistenza agli antibiotici e che come sappiamo questa avviene anche a basse concentrazioni di antibiotici. Tuttavia, gli studi sull'effetto degli antibiotici come promotori della crescita pongono le basi per comprendere la composizione e la funzione del microbiota intestinale in questa situazione. Queste conoscenze potrebbero ispirare strategie alternative agli antibiotici, come i probiotici, per migliorare le prestazioni degli animali. Questa rassegna comprende l'analisi dei principali ospiti animali e di tutte le classi di antibiotici, evidenziando le sfide future e le lacune di conoscenza che dovrebbero essere colmate. Sono necessari ulteriori studi per chiarire la farmacodinamica negli animali, al fine di migliorare la durata della terapia, i dosaggi degli antibiotici e le vie di somministrazione per mitigare gli effetti negativi delle terapie antibiotiche. Inoltre, questa revisione evidenzia che gli studi sugli aminoglicosidi sono quasi inesistenti e dovrebbero essere incrementati, considerando che gli aminoglicosidi sono la famiglia di antibiotici più comunemente utilizzata negli animali da compagnia. In questo campo di ricerca è necessario armonizzare le procedure sperimentali. Infatti, gli studi attuali si basano su diversi *setup* sperimentali che variano per il dosaggio degli antibiotici, il regime, la somministrazione e l'analisi del microbiota a valle. In futuro, la metagenomica *shotgun* accoppiata al sequenziamento *long reads* dovrebbe diventare un approccio sperimentale standard per ottenere delle conoscenze complete sul GIM [*GastroIntestinal Microbiota*] e sugli ARG [*Antibiotic Resistance Genes*] in termini di composizione e funzioni tassonomiche. La decodifica del GIM negli animali svelerà strategie rivoluzionarie per la cura e il miglioramento dello stato di salute degli animali, con conseguenze positive sulla salute globale.

8.1 INTRODUZIONE

La consapevolezza dell'effetto delle terapie antibiotiche sulla composizione del microbiota gastrointestinale (GIM) e sulla selezione della resistenza antimicrobica (AMR) è in continuo aumento. Gli antibiotici sono considerati i principali perturbatori del GIM, in quanto impoveriscono le specie produttrici di butirrato

benefiche per la salute dell'ospite e favoriscono l'emergere di potenziali patogeni, dando luogo alla cosiddetta "disbiosi". Questo effetto negativo delle terapie antibiotiche si osserva nell'uomo [1,2,3] e negli animali [4,5,6,7]. La presenza di antibiotici nell'intestino aggrava la selezione di batteri resistenti che possono diffondersi nell'ambiente e propagarsi ad altri ospiti [8,9,10,11,12]. Questo problema è di particolare importanza negli animali da produzione alimentare, che possono espellere nell'ambiente batteri resistenti, che a loro volta possono ulteriormente propagarsi ad altri ospiti attraverso l'ambiente o la catena alimentare [13,14].

Tutte le classi di antibiotici oggi clinicamente utilizzabili non esercitano la stessa pressione selettiva su GIM e AMR e la stessa molecola ha effetti diversi a seconda della via di somministrazione [15,16]. Negli animali, gli antibiotici sono comunemente somministrati per via orale. Secondo il quinto rapporto dell'Organizzazione Mondiale per la Salute Animale (OIE), le tetracicline sono state gli antibiotici più utilizzati negli animali terrestri da produzione alimentare, seguite da macrolidi e penicilline. Negli animali da compagnia, nel 2017 gli aminoglicosidi sono stati gli antibiotici più utilizzati, seguiti da penicilline e cefalosporine [17]. I dati riportati da 31 Paesi europei dall'ESVAC (*European Surveillance of Veterinary Antibiotic Consumption*) si sono concentrati sugli animali da produzione alimentare nel 2018 e hanno indicato la tetraciclina come l'antibiotico più venduto (in mg/PCU), seguita da penicilline e sulfonamidi [18]. Questi antibiotici sono utilizzati per trattare diverse infezioni, tra cui quelle gastrointestinali, respiratorie e cutanee. Nonostante tutte le misure adottate per regolamentare il consumo di antibiotici negli animali da produzione alimentare e contrastare lo sviluppo della resistenza antimicrobica, il 26% dei Paesi (n = 42/160) che hanno partecipato all'indagine condotta dall'OIE ha usato degli antibiotici come promotori della crescita. La maggior parte di questi Paesi si trova nelle Americhe, in Africa, Asia, Estremo Oriente e Oceania. Bacitracina, flavomicina e avilamicina sono stati i primi tre antibiotici più comunemente usati per questo scopo. Nei Paesi in cui gli antibiotici vengono usati come promo-

tori della crescita spesso manca una regolamentazione. Tuttavia, anche in questi Paesi sono in corso azioni per scoraggiare l'uso di antibiotici come promotori della crescita [17]. Inoltre, sono in aumento gli studi per comprendere l'impatto dei promotori della crescita sul GIM e sulla selezione dei geni di resistenza agli antibiotici (ARG).

La maggior parte degli studi sul GIM si concentra sull'intestino crasso, utilizzando le feci, rappresentative e non invasive come campionamento [19,20]. Prima degli anni '90, gli studi sul GIM si basavano per lo più sulla coltivazione batterica per isolamento [21].

Il miglioramento delle tecniche di biologia molecolare e delle piattaforme di sequenziamento ha aperto nuove possibilità di studiare il GIM, consentendo un accesso più profondo alla diversità della popolazione microbica. Il sequenziamento mirato ai geni e il sequenziamento *shotgun* sono attualmente gli approcci standard nella ricerca sul microbiota [22]. I primi approcci molecolari consistevano nel sequenziamento di una delle regioni ipervariabili (V1-V9) dell'operone 16S rRNA (rDNA) [23,24,25]. Al giorno d'oggi, gli studi sul microbioma che riguardano il gene 16S rDNA stanno perlopiù sequenziando la quasi totalità dell'operone, combinando sequenze corte e lunghe [26,27]. In generale, le sequenze ottenute e assemblate vengono assegnate alle cosiddette "Unità Tassonomiche Operative" (OTU); ognuna di queste includerà sequenze con il 97% di identità nucleotidica tra loro e, a loro volta, mostreranno somiglianza con le sequenze note di 16S rDNA. Più recentemente, per l'analisi del microbiota sono state implementate le varianti di sequenziamento degli ampliconi (ASV) o le varianti di sequenziamento dei ribosomi (RSV) [28].

I parametri spesso utilizzati per descrivere il GIM sono la ricchezza, che consiste nel numero assoluto di OTU in ogni campione e la diversità. La diversità intrinseca al campione è definita alfa-diversità, spesso stimata dall'indice di Shannon, mentre la diversità tra i campioni è trattata come beta-diversità, spesso stimata dall'indice di Bray-Curtis [29].

La prima analisi metagenomica *shotgun* è stata realizzata nel 2006 [30]. Questo approccio fornisce informazioni sulla compo-

sizione complessiva del GIM, con la possibilità di prevedere in modo affidabile le funzioni dei diversi *taxa* batterici. Il metodo *shotgun* richiede comunque sforzi bioinformatici e computazionali più complessi rispetto all'approccio 16S rDNA.

Gli studi sul GIM sono spesso associati ad approcci di PCR quantitativa (qPCR), progettati per rilevare e quantificare i geni di interesse. Questo metodo raggiunge una maggiore specificità e sensibilità rispetto al 16S rDNA e al sequenziamento *shotgun*. È relativamente poco costoso e non richiede sofisticate competenze bioinformatiche [31].

Indipendentemente dall'approccio di biologia molecolare, negli studi GIM delle grandi distorsioni possono derivare dal campionamento e dalla conservazione. Una cattiva conservazione delle feci (temperatura, +/- tampone) può indurre la degradazione del DNA e quindi ridurre la qualità delle analisi a valle. Altre importanti distorsioni possono essere introdotte durante l'estrazione del DNA dalle feci. Gli inibitori della PCR nel DNA estratto dalle feci degli animali sono particolarmente difficili da rimuovere. Per tutti questi motivi, il Consorzio internazionale del microbioma umano ha fornito standard per la raccolta dei campioni, la conservazione e le procedure di estrazione del DNA [32,33,34,35,36,37]. Queste norme dovrebbero essere adattate anche agli studi GIM negli animali per migliorare l'armonizzazione delle metodologie e consentire il confronto tra gli studi.

Infine, alcuni studi che analizzano gli effetti degli antibiotici sul GIM hanno sfruttato dei modelli animali [38] e anche bioreattori che riproducono il GIM [39]. Questo metodo quantifica in modo controllato gli antibiotici a cui i batteri sono esposti, ma spesso si basa su una semplificazione della comunità batterica, cosa che compromette le conclusioni ecologiche dell'azione degli antibiotici sul GIM.

Le attuali conoscenze sulle interazioni tra GIM e antibiotici negli animali sono alterate dalla diversità della posologia, delle vie di somministrazione e delle metodologie d'analisi. Inoltre, la farmacodinamica di ciascun antibiotico varia a seconda dell'ospite animale [40], rendendo il quadro più complesso rispetto all'uomo [41].

In questa revisione sono stati analizzati gli studi condotti sugli animali, concentrandosi sui principali animali da produzione alimentare e da compagnia. Sono stati riassunti i principali risultati relativi all'azione degli antibiotici sulla selezione degli ARG, ma anche sulla composizione del GIM degli animali. L'analisi comprende diverse classi di antibiotici, evidenziando le differenze a seconda della molecola, della via di somministrazione e della metodologia applicata per l'analisi AMR e GIM. La ricerca di articoli di ricerca originali nella biblioteca PubMed, consultata nel periodo luglio-agosto 2021, è stata condotta utilizzando le parole chiave "antibiotici [ospite animale] microbiota". L'ospite animale era costituito da vitelli, bovini, suini, pollame, ovini, conigli, cavalli, cani e gatti. Non sono stati trovati studi su ovini e conigli. Sono stati considerati settantuno articoli come rilevanti, in quanto sono stati condotti studi relativi all'analisi del GIM e degli ARG prima e dopo la terapia antibiotica. Sono stati inclusi anche gli studi che comprendevano l'analisi degli effetti degli antibiotici su una specie o un genere, o su un ARG.

La sintesi degli studi riporta: (i) se gli animali erano ospitati in allevamenti sperimentali o commerciali per la produzione di alimenti; (ii) la via di somministrazione e la posologia degli antibiotici; (iii) la metodologia applicata per analizzare la composizione della GIM e degli ARG; e (iv) i principali effetti osservati.

Nei paragrafi successivi, i contenuti sono organizzati in base all'ospite animale e, se pertinente, per ogni ospite in base alla classe di antibiotici. [...]

8.7 CANI E GATTI

È disponibile un catalogo del GIM dei cani che ha rivelato un'ampia somiglianza con quella degli esseri umani con *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Fusobacteria* come *phyla* principali [118].

Pilla et al. [119] hanno analizzato gli effetti del metronidazolo, un antibiotico ad ampio spettro e un antiparassitario utilizzato per il trattamento della diarrea, nel GIM di cani sani di

età compresa tra 1 e 10 anni di diverse razze e, parallelamente, l'effetto della modifica della dieta. Il metronidazolo ha causato una diminuzione di *Bacteroidetes* e *Fusobacteria* e un aumento di *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. La quantità di *Firmicutes* è rimasta costante, ma la composizione è cambiata con una diminuzione di *Clostridiales* e un aumento di *Lactobacillales*. A 42 giorni dalla sospensione dell'antibiotico, la composizione del GIM è tornata ai valori di base, tranne che per l'abbondanza di *Fusobacteria*. Questo *phylum* nei cani è associato a un buono stato di salute. Risultati simili per *Fusobacteria* e somministrazione di metronidazolo sono stati riscontrati da Igarashi et al. [120], che hanno anche riportato un aumento di *Actinobacteria*. Quando il metronidazolo combinato con la spiramicina è stato somministrato a cani diarroici, non è stata riscontrata alcuna differenza nella quantità di alcuni generi nel GIM rispetto ai cani a cui è stato somministrato un composto nutraceutico [121].

Un altro antibiotico comunemente somministrato per curare la diarrea dei cani è la tilosina. Manchester et al. [122] hanno osservato una diminuzione delle *Fusobacteriaceae* e delle *Veillonellaceae* e *Bacteroidaceae*, insieme a un aumento delle *Enterococcaceae*, dopo il trattamento con la tilosina. Alla sospensione della tilosina, il ritorno al valore di base era dipendente dall'individuo. Analogamente, Suchodolsky et al. [123] hanno riportato una modifica di lunga durata del GIM dei cani in seguito al trattamento con tilosina, con una diminuzione di *Fusobacteria*, *Bacteroidales* e *Moraxella*, parallelamente a un aumento di enterococchi, *Pasteurella* spp. e *Dietzia* spp.

Grønvold et al. [124] hanno analizzato gli effetti dell'amoxicillina sul GIM dei cani, che presentava più *Enterobacterales*, con isolati di *E. coli* che mostravano un tasso di resistenza più elevato rispetto agli isolati recuperati al campionamento pre-trattamento. Una selezione simile di isolati di *E. coli* resistenti è stata riscontrata da Werner et al. [125] in cani diarroici trattati con amoxicillina-acido clavulanico. L'amoxicillina e la combinazione amoxicillina-acido clavulanico hanno influenzato in modo simile la diversità e la ricchezza di specie dei cani trattati. Inoltre,

l'amoxicillina-acido clavulanico ha ridotto i *taxa* intestinali commensali, come *Roseburia*, *Oscillospira*, *Dialister* e *Lachnospiraceae*, mentre è aumentato l'*E. coli*. Questa combinazione di farmaci ha selezionato *E. coli* ed enterococchi resistenti all'ampicillina [126].

Mancano studi longitudinali che riportino gli effetti degli antibiotici sul GIM dei gatti. Per quanto ne sappiamo, un rapporto ha descritto l'effetto della clindamicina e ha mostrato, nei gatti trattati con clindamicina, una diminuzione di *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Ruminococcaceae*, *Veillonellaceae* ed *Erysipelotrichaceae* e un aumento di *Clostridiaceae* e *Proteobacteria* [127] (Tabella 4).

Ospite	Antibiotico	Coltivazione	Amministrazione	Dose (mg/kg di animale)	Durata (giorni)	Metodo	Effetto su GIM	Effetto sugli ARG	Riferimento
Cavalli	Penicillina	ND	IMI	20.000 UI/kg	5	16S rDNA (V4)	Diversità, ricchezza, Verrucomicrobia ↓	ND	[7]
	Ceftiofur			2.2					
	Trimetoprim/sulfadiazina		O	30					
	Benzil-penicillina	ND	IMI	20.000 UI/kg	5	Coltivazione, DGGE-16S rDNA (V3)	Bacteroidetes, Clostridioites, Enterococcaceae ↑	Nessuno	[113]
	Trimetoprim/sulfadiazina	ND	O	30	7	Coltivazione	Lactobacillaceae, batteri cellulolitici ↓ Salmonella, C. difficile ↑	ND	[114]
	Ceftiofur		IMI	2.2					
	Eritromicina Rifampicina	ND	O	30	14	16S rDNA (V4), shotgun, coltivazione	Diversità, abbondanza, Rhodococcus equi ↓	ARGs macrolidi, rifampicina, doxiciclina ↑	[115]
	Metronidazolo	ND	O	30	3	16S rDNA (V4)	Diversità ↓	ND	[116]
	Multiplo	ND	ND	Multiplo	2-14	16S rDNA (V4)	Fusobacteria ↓ Tenericutes ↓ WPS-2 * ↓	ND	[117]

Cani	Metronidazolo	ND	O	30	14	16S rDNA (V4), qPCR	Diversità, ricchezza, Bacteroidetes, Fusobacteria, Clostridiales ↓ Proteobacteria, Actinobacteria, Lactobacillales ↑	ND	[119]
	Metronidazolo, prednisolone	Esplosione	O	25/1	14	16S rDNA (V4)	Diversità, ricchezza, Fusobatteri Clostridiales ↓ Actinobacteria, Bacilli ↑	ND	[120]
	Metronidazolo/spiramicina	ND	O	12,5/7,500 UI/kg	6	qPCR	Nessuno	ND	[121]
	Tilosina	ND	O	40	14	16S rDNA (V4), qPCR	Enterococcaceae ↑ Fusobacteriaceae, Veillonellaceae, Bacteroidaceae ↓	ND	[122]
	Tilosina	Exp	ND	20-22	14	16S rDNA (V4-V5)	Diversità, ricchezza, Fusobacteria, Bacteroidales, Moraxella ↓ Enterococchi, Pasteurella spp., Dietzia spp. ↑	ND	[123]
	Amoxicillina	Exp	O	20	7	DGGE-16S rDNA (V3), qPCR	Enterobacteriales ↑	E. coli resistente all'AMX ↑	[124]
	Amoxicillina/acido clavulamico	ND	O	25-50	7	Coltivazione, qPCR	Nessuno	E. coli resistente all'AMX ↑	[125]
	Amoxicillina	ND	O	10-20	5-13	Coltivazione, 16S rDNA (V3-V4)	Diversità, ricchezza, Firmicutes ↓ Proteobacteria ↑	Enterococchi ed E. coli resistenti all'AMX ↑	[126]
	Amoxicillina/acido clavulamico				5-14		Dialister, Oscillospira, Roseburia, Lachnospiraceae ↓		

Gatti	Clindamicina	Exp	O	12.1-22.7	21	16S rDNA (V4), qPCR	Actinobacteria, Bacteroidetes, Ruminococcaceae, Veillonellaceae, Erysipelotrichaceae, Clostridiaceae, Proteobacteria ↑	ND	[127]
-------	--------------	-----	---	-----------	----	---------------------	--	----	-------

Tabella 4. Sintesi degli studi che indagano l'impatto degli antibiotici sul microbiota intestinale degli animali da compagnia e sui relativi geni di resistenza agli antibiotici.

Nota. GIM: microbiota gastro-intestinale; *ARGs*: geni di resistenza agli antibiotici; ND: non determinato; IMI: iniezione intra-muscolare; DGGE: Elettroforesi su gel a gradiente denaturante; O: orale; *: phylum candidato (*Eremiobacterota*); Exp: sperimentale; AMX: amoxicillina.

8.8 CONCLUSIONI

Complessivamente in tutti gli ospiti animali e indipendentemente dalle classi di antibiotici, è stata registrata una diminuzione della diversità e della ricchezza di specie dopo il trattamento. Nella maggior parte dei casi la composizione del GIM si è dimostrata resiliente, tornando alle condizioni di base per la composizione e la quantità di ARG dopo la sospensione dei trattamenti. Il tempo necessario per il ritorno alla condizione di base variava tra gli studi.

A dosi sub-terapeutiche, alcuni generi appartenenti al *phylum Firmicutes* e coinvolti nel metabolismo degli zuccheri sono aumentati negli animali che ricevevano antibiotici tramite il cibo, cosa che suggerisce un legame con l'aumento di peso. Questo risultato non può essere considerato incoraggiante, perché l'uso di antibiotici anche a basse concentrazioni è legato all'aumento degli ARG nell'intestino per selezione e all'innesco di eventi di trasferimento genetico con conseguenze negative per la salute globale. Il miglioramento delle prestazioni degli animali da produzione alimentare ottenuto utilizzando gli antibiotici come promotori della crescita potrebbe essere ottenuto sostituendo gli antibiotici con dei probiotici che modulino il GIM, ad esempio.

Per questo motivo, è necessario incrementare gli studi sul campo, al fine di trovare non solo la composizione del GIM, ma anche i processi metabolici dei taxa arricchiti durante la somministrazione di antibiotici.

Alle dosi terapeutiche è stata segnalata una presenza ricorrente di generi che ospitano potenziali patogeni. Il rischio di questo effetto negativo delle terapie antibiotiche è inevitabile. Inoltre, la durata della terapia e il dosaggio potrebbero modulare l'intensità di questo effetto collaterale. Parallelamente alla disbiosi si verifica anche una selezione degli ARG. In generale, l'azione selettiva e le conseguenze sulla composizione del GIM erano minori per la somministrazione parenterale, ma c'erano comunque degli effetti. Infatti i farmaci con metabolismo epatico possono raggiungere l'intestino non metabolizzati, insieme ai loro metaboliti, attraverso la secrezione biliare [128]. Tali effetti, oltre a essere farmaco-dipendenti, dipendono anche da parametri farmacodinamici propri di ciascuna specie animale [129]. Sono necessari ulteriori studi per chiarire questi aspetti al fine di migliorare la durata della terapia, i dosaggi degli antibiotici e le vie di somministrazione, nel tentativo di mitigare gli effetti negativi delle terapie antibiotiche. Inoltre questa revisione evidenzia che gli studi sugli aminoglicosidi sono quasi inesistenti; si tratta di una grave lacuna che dovrebbe essere colmata considerando che gli aminoglicosidi sono gli antibiotici più comunemente utilizzati negli animali da compagnia in tutto il mondo.

Sulla base delle conoscenze attuali è difficile scegliere un antibiotico, o una classe di antibiotici, che possa avere meno effetti negativi rispetto ad altri e nel frattempo costituire un trattamento efficace. Il confronto tra gli studi è ostacolato dalle variazioni nel disegno sperimentale, tra cui la concentrazione del farmaco, la combinazione di antibiotici, il regime terapeutico e la durata del trattamento. Anche l'armonizzazione delle procedure sperimentali è fondamentale. Infatti, gli studi che analizzano il GIM animale sono spesso condotti sequenziando la regione V3-V4 del 16S rDNA, ma non sempre. Ogni regione ipervariabile è più specifica per determinati *taxa*, quindi gli studi basati su regioni

ipervariabili diverse sono difficili da confrontare. L'avvento del sequenziamento a lettura lunga potrebbe superare queste difficoltà. Il sequenziamento a lettura lunga molto probabilmente migliorerà anche i risultati generati dal sequenziamento *shotgun*, migliorando l'assemblaggio e la previsione della funzione genica nell'analisi tassonomica. La metagenomica *shotgun* dovrebbe essere preferita per le indagini future per raccogliere conoscenze complete sul GIM e sulle ARG con i loro elementi genetici, considerando che negli attuali studi longitudinali che analizzano l'effetto degli antibiotici sulla GIM, l'analisi delle ARG è stata ampiamente trascurata.

Questa rassegna, che comprende i principali ospiti animali e tutte le classi di antibiotici, fornisce spunti per indagini future ed evidenzia le principali lacune che devono essere colmate per migliorare l'uso degli antibiotici e mitigare gli effetti negativi di questi farmaci. Decifrare la composizione e la funzione del GIM svelerà delle nuove strategie per la cura e il miglioramento dello stato di salute degli animali, con conseguenze positive sulla salute globale.

9 - EFFETTI A BREVE E LUNGO TERMINE DELL'AMOXICILLINA/ACIDO CLAVULANICO O DELLA DOXICICLINA SUL MICROBIOMA GASTROINTESTINALE DEI GATTI IN CRESCITA

Tratto e tradotto da

Stavroulaki EM, Suchodolski JS, Pilla R, Fosgate GT, Sung

C-H, Lidbury JA, et al. (2021) *Short- and long-term effects of amoxicillin/
clavulanic acid or doxycycline on the gastrointestinal microbiome of growing cats.*

PLoS ONE 16(12): e0253031.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031>



Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

Il trattamento antibiotico nei primi anni di vita influenza la composizione e la funzione microbica gastrointestinale (GI). Nell'uomo, la disbiosi intestinale che ne deriva è associata a un aumento del rischio di alcune malattie in età avanzata. L'obiettivo di questo studio è stato quello di determinare gli effetti temporali del trattamento antibiotico sul microbioma gastrointestinale dei gatti giovani. Sono stati raccolti dei campioni fecali di gatti selezionati casualmente per la somministrazione di amoxicillina/acido clavulanico (20 mg/kg q12h) per 20 giorni (gruppo AMC; 15 gatti) o doxyciclina (10 mg/kg q24h) per 28 giorni (gruppo DOX; 15 gatti) come parte del trattamento standard dell'infezione del tratto respiratorio superiore. Inoltre, sono state raccolte le feci di gatti di controllo sani (gruppo CON; 15 gatti). Tutti i gatti avevano circa due mesi di età al momento dell'arruolamento. I campioni sono stati raccolti nei giorni 0 (basale), 20 o 28 (AMC e DOX, rispettivamente; ultimo giorno di trattamento), 60, 120 e 300. Il DNA è stato estratto e sequenziato. Il DNA è stato estratto e sono stati eseguiti il sequenziamento del gene 16S rRNA e dei campioni di qPCR. La composizione microbica

fecale era diversa l'ultimo giorno di trattamento per i gatti AMC e 1 mese dopo la fine del trattamento antibiotico per i gatti DOX, rispetto ai gatti CON. La ricchezza di specie era significativamente maggiore nei gatti DOX rispetto ai gatti CON l'ultimo giorno di trattamento. L'abbondanza di *Enterobacteriales* è aumentata e quella di *Erysipelotrichia* è diminuita nei gatti del gruppo AMC l'ultimo giorno di trattamento rispetto ai gatti CON. L'abbondanza del *phylum Proteobacteria* è aumentata nei gatti del gruppo DOX nei giorni 60 e 120 rispetto ai gatti del gruppo CON. Al giorno 300 erano presenti solo differenze minime nelle abbondanze tra i gruppi di trattamento e il gruppo di controllo. Entrambi gli antibiotici sembrano ritardare la progressione dello sviluppo del microbioma e questo effetto è più profondo durante il trattamento con amoxicillina/acido clavulanico e un mese dopo il trattamento con doxiciclina. Sono necessari studi futuri per determinare se questi cambiamenti influenzano la funzione del microbioma e se hanno possibili effetti sulla suscettibilità alle malattie nei gatti.

9.1 INTRODUZIONE

La scoperta degli antibiotici rappresenta una delle conquiste più importanti nella storia della medicina [1]. Tuttavia, l'uso eccessivo di antibiotici ne compromette i benefici per la salute a causa dello sviluppo e della diffusione di geni resistenti agli antibiotici e del loro impatto sul microbioma gastrointestinale [2,3]. La misura in cui il microbioma è influenzato dagli antibiotici è diventata evidente con le scienze omiche, che consentono di valutare intere comunità microbiche e le loro funzioni [4]. Il microbioma gastrointestinale è una comunità di microrganismi ed è stato definito "organo nascosto" [5]. Questa comunità di microrganismi è responsabile del mantenimento della resistenza alla colonizzazione e produce sostanze che hanno un impatto sul metabolismo dell'ospite, sullo sviluppo e sulla risposta del sistema immunitario e sembra partecipare alla comunicazione tra i diversi organi nonché alla manifestazione e alla progressione delle malattie [6-14]. Il termine "disbiosi gastrointestinale" è utilizzato

per descrivere le alterazioni compositive e funzionali del microbioma gastrointestinale in risposta a fattori esogeni e/o allo stato di salute dell'ospite [15]. La disbiosi indotta dagli antibiotici è caratterizzata da una diminuzione dei batteri benefici per l'ospite ("batteri associati alla salute"), il che consente una crescita eccessiva di batteri potenzialmente patogeni e uno spostamento dei prodotti metabolici derivati dai microbi [15,16]. Gli spostamenti microbici indotti dagli antibiotici possono persistere a lungo termine e le abbondanze di alcuni taxa batterici potrebbero non tornare mai allo stato iniziale. Anche altri membri del microbioma, tra cui il micobioma e il viroma, sono influenzati dagli antibiotici, cosa che evidenzia uno squilibrio globale tra i microrganismi non inibiti direttamente dagli antibiotici [17]. La disbiosi indotta dagli antibiotici dipende dallo spettro di attività antibatterica, dal tipo, dalla durata, dal dosaggio e dalla via di somministrazione, oltre che dalle caratteristiche individuali dell'ospite [18,19].

Il microbioma gastrointestinale sembra essere più sensibile agli antibiotici somministrati nelle prime fasi della vita [20]. In questo periodo, la maturazione del sistema immunitario avviene in concomitanza con la maturazione del microbioma. Gli antibiotici comportano l'esposizione dell'ospite a un numero ridotto di microbi nell'intestino, con conseguenti cambiamenti nei metaboliti prodotti dai microbi a cui l'ospite è esposto [21]. La deplezione di batteri noti per la fermentazione di fibre e carboidrati in acidi grassi a catena corta (SCFA) (*Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Blautia* spp., *Bacteroides* spp.) o la conversione di acidi biliari primari in secondari (*Clostridium hiranonis*) è un effetto comune della terapia antibiotica nei cani [8,22-24]. Inoltre, i batteri che sono stati associati a malattie gastrointestinali (*Proteobacteria* spp., *Fusobacterium* spp., *Escherichia coli*) o i batteri produttori di acido lattico (*Streptococcus* spp.) erano sovraregolati nei cani e nei gatti dopo la terapia antibiotica [8,23-28]. Nell'uomo, gli antibiotici somministrati nelle prime fasi della vita sembrano ritardare la progressione del microbioma verso uno stato simile a quello degli adulti [29,30]. Alcuni studi precedenti hanno dimostrato che i bambini esposti agli antibiotici avevano maggiori pro-

babilità di sviluppare malattie infiammatorie intestinali [31,32], obesità [33,34] o asma [35,36] durante l'infanzia. Attualmente sono disponibili dei dati limitati per i gatti. In uno studio, tutti i gatti precedentemente trattati con amoxicillina/acido clavulanico e pradofloxacin hanno sviluppato diarrea dopo un'infezione sperimentale con *E.coli* enteropatogeno, a differenza dei gatti non trattati, nessuno dei quali ha avuto manifestazioni cliniche [37]. Questo studio evidenzia che, analogamente all'uomo, la disbiosi indotta dagli antibiotici probabilmente riduce nei gatti la resistenza alla colonizzazione.

La malattia delle vie respiratorie superiori (URTD) dei felini è una condizione di eziologia prevalentemente virale e i segni clinici possono variare in gravità. L'URTD acuta può manifestarsi con congiuntivite, secrezione oculare o nasale e starnuti. In alcuni casi, possono comparire segni di coinvolgimento di altri sistemi o di malattia sistemica [38]. Le linee guida pubblicate suggeriscono l'uso di amoxicillina (con o senza acido clavulanico) o doxiciclina come prima linea di trattamento per la forma acuta di URTD [39]. L'amoxicillina è una penicillina semisintetica attiva contro alcuni batteri gram-positivi non produttori di beta-lattamasi e pochi batteri gram-negativi. L'aggiunta di un inibitore delle beta-lattamasi, come l'acido clavulanico, aumenta lo spettro di attività dell'amoxicillina [40]. Dal punto di vista del microbioma, l'amoxicillina, con o senza acido clavulanico, aumenta comunemente le abbondanze fecali dei membri dei *Proteobacteria* e diminuisce quelle dei *Firmicutes* e degli *Actinobacteria* nell'uomo e negli animali gnotobiotici [41-44]. Sono stati riportati dei risultati discordanti nei membri del *phylum Bacteroides*, con alcuni studi che riportano un aumento [20,41,43] e altri una diminuzione [44-46] dei membri di questo *phylum*. Alcuni studi suggeriscono che i cambiamenti microbici indotti dall'amoxicillina sono solo temporanei e si attenuano entro 2-4 settimane dalla sua sospensione [42]. Altri studi suggeriscono cambiamenti a lungo termine, tra cui una riduzione persistente delle *Lachnospiraceae* 6 mesi dopo la sospensione dell'amoxicillina [44]. La doxiciclina appartiene alle tetracicline, una classe di antibiotici

batteriostatici con attività ad ampio spettro contro batteri, *rickettsiae* e organismi protozoari. [47]. La somministrazione di doxiciclina nell'uomo e nei roditori è stata associata a una riduzione dell'abbondanza fecale del *phylum Firmicutes* e a un aumento o a una riduzione dell'abbondanza del *phylum Bacteroidetes* [48-50]. Nei topi trattati con doxiciclina sono stati rilevati spostamenti microbici anche un mese dopo la sospensione della doxiciclina [49], ma nessuno studio pubblicato presenta risultati per un periodo di follow-up più lungo.

Alcuni studi molecolari precedenti sugli effetti degli antibiotici sul microbioma gastrointestinale felino hanno reclutato dei gatti sani in condizioni controllate di laboratorio. In questi studi, i gatti erano adulti, ma appartenevano a varie fasce d'età ed erano alimentati con la stessa dieta per la durata di ogni studio [25,26,51]. Nell'uomo, gli antibiotici con uno spettro di attività anaerobica, come l'amoxicillina e la clindamicina, sembrano avere un effetto più profondo e prolungato sul microbioma intestinale, dato che il 95% dei batteri gastrointestinali sono anaerobi [52]. Nei gatti, la somministrazione di clindamicina ha influenzato il microbioma e il metaboloma a lungo termine, con una riduzione persistente delle famiglie *Prevotellaceae*, *Veillonellaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Porphyromonadaceae* e dell'acido desossicolico, un acido biliare secondario, per almeno 2 anni dopo la sospensione dell'antibiotico [25]. In un altro studio condotto sui gatti, l'amoxicillina-clavulanico ha provocato un aumento di *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus* spp. e questi cambiamenti sono stati rilevati ancora 7 giorni dopo la sospensione dell'antibiotico [51]. Ad oggi, nessuno studio ha analizzato l'effetto della doxiciclina e del trattamento antibiotico in generale sul microbioma gastrointestinale dei gatti giovani fino alla maturità.

Lo scopo di questo studio era quello di descrivere e confrontare il microbioma fecale di gatti che ricevevano amoxicillina/acido clavulanico o doxiciclina e di gatti di controllo che non ricevevano antibiotici, seguendoli per un periodo di 10 mesi. Un secondo obiettivo era quello di descrivere i normali cambiamenti del microbioma felino legati all'età durante lo sviluppo.

9.2 MATERIALI E METODI

9.2.1 POPOLAZIONE IN STUDIO

[...]

Un totale di 72 gatti domestici a pelo corto (DSH [*Domestic ShortHair*]) di otto settimane sono stati reclutati nello studio. A quarantaquattro dei 72 gatti è stata diagnosticata una malattia delle vie respiratorie superiori (URTD [*Upper Respiratory Tract Disease*]) prima dell'inclusione nello studio. La diagnosi si basava su una presentazione clinica tipica, comprendente congiuntivite, blefarospasmo, scariche oculari o nasali, congestione nasale, starnuti e tosse. I gatti sono stati trattati con degli antibiotici (vedi Trattamento), che erano parte del trattamento standard. Inoltre, 26 gatti clinicamente sani o con URTD molto lieve che non richiedevano un trattamento antibiotico sono stati usati come controlli.

I gatti sono stati ospitati in case di accoglienza o in gabbie individuali presso la Clinica di Medicina della Facoltà di Veterinaria dell'Università della Tessaglia. Alla fine dello studio, tutti i gatti sono stati adottati in case private e i proprietari hanno firmato un modulo di consenso informato. In fase iniziale i gatti sono stati tenuti in osservazione per alcuni giorni nel caso in cui avessero sviluppato segni clinici di malattia gastrointestinale. È stato eseguito un esame fisico e somministrato un trattamento antiparassitario (*Broadline*, *Boehringer Ingelheim*) a ciascun gatto prima dell'inclusione nello studio. Sono stati registrati i dati relativi a sesso, peso corporeo, punteggio di condizione corporea (BCS [*Body Condition Score*]), presenza di diarrea e vomito, temperatura e frequenza cardiaca (Tabella S1). La valutazione del BCS e del punteggio fecale (FS) si è basata su punteggi pubblicati in precedenza [53,54]. Sono state registrate le condizioni di salute concomitanti e i gatti sono stati esclusi se erano abbastanza gravi da richiedere l'ospedalizzazione. Tutti i gatti hanno seguito la stessa dieta (*GEMON Cat Breeder Kitten*) per tutta la durata dello studio, per garantire che l'alimentazione non influenzasse i risultati. Nello stesso gruppo di trattamento non sono stati inclusi

più di due gatti imparentati, per garantire che la parentela non influenzasse i risultati. Tutti i gatti sono stati vaccinati secondo le recenti linee guida sulle vaccinazioni [55] e i dati clinici sono stati raccolti per tutto il periodo dello studio (Tabella S1).

9.2.2 TRATTAMENTI

I gatti con URTD sono stati assegnati in modo casuale a ricevere amoxicillina/clavulanato a 20 mg/kg q 12 h per 20 giorni (n = 23, gruppo AMC) o doxiciclina a 10 mg/kg q 24 h per 28 giorni (n = 21, gruppo DOX). Questi antibiotici sono stati scelti perché sono trattamenti di prima linea per l'URTD nei gatti [39]. Inoltre, 26 gatti clinicamente sani sono stati reclutati come controlli e non hanno ricevuto alcun antibiotico durante il periodo di studio (n = 26, gruppo CON).

9.2.3 RACCOLTA DEI CAMPIONI E PERIODO DI FOLLOW-UP

I campioni fecali sono stati raccolti da ciascun gatto nei giorni: 0 (tutti i gruppi; un giorno dopo la presentazione iniziale e il trattamento antiparassitario), 20 (gruppo AMC; ultimo giorno di trattamento antibiotico per il gruppo AMC), 28 (gruppi DOX e CON, ultimo giorno di trattamento antibiotico per il gruppo DOX), 60 (tutti i gruppi), 120 (tutti i gruppi) e 300 (tutti i gruppi). I campioni di feci espulse naturalmente sono stati raccolti dalla lettiera e messi in provette Eppendorf. Per i gatti adottati, i proprietari sono stati istruiti a raccogliere i campioni fecali dalla lettiera, congelarli durante la notte e portarli in clinica o spedirli imballati con ghiaccio tramite corriere notturno. Nel caso in cui nella stessa casa vivessero altri animali, i proprietari sono stati invitati a isolare adeguatamente il gatto prima della raccolta dei campioni. Una volta ricevuti, i campioni sono stati immediatamente conservati a -80°C in attesa dell'analisi. In ogni giorno di campionamento, i gatti sono stati sottoposti a un esame fisico e sono stati raccolti gli stessi dati della presentazione iniziale per tutti i gatti.

[...]

9.3 RISULTATI

9.3.1 DATI CLINICI

Ventisette gatti sono stati esclusi dallo studio a causa della non conformità del proprietario (7/72), del decesso (9/72; 2 a causa di incidenti, 1 a causa di peritonite infettiva felina, 1 a causa di insufficienza cardiaca, mentre 5 avevano una causa di morte sconosciuta), della necessità di un secondo ciclo di antibiotici (5/72), di trattamenti antimicotici (3/72) o della fuga da casa (3/72). Quindici gatti in ciascun gruppo di trattamento (45 gatti in totale) hanno completato lo studio. Si trattava di 25 maschi e 20 femmine. Sono state eseguite l'analisi del microbioma e la valutazione dei dati clinici solo per i gatti che hanno completato lo studio (Tabella S1).

Il giorno 0, i gatti del gruppo AMC avevano un peso corporeo (BW [*Body Weight*]) significativamente inferiore (mediana 0,61 kg, range 0,37-0,95 kg) rispetto ai gatti CON (mediana 0,74 kg, range 0,52-1,4 kg) ($p = 0,026$; Tabella 1). Non sono state identificate altre differenze di BW o BCS tra i gruppi. Il giorno 0, i gatti appartenenti al gruppo DOX avevano un punteggio fecale (FS) significativamente più alto (mediana 4/7, intervallo 2/7-7/7), cioè avevano più spesso una consistenza fecale anormale, rispetto ai gatti CON (mediana 2/7, intervallo 1/7-6/7) ($p = 0,045$). Nei giorni 20/28 e 60, i gatti AMC avevano una FS significativamente più alta (giorno 20, mediana 4/7, range 1/7-6/7; giorno 60, mediana 3/7, range 1/7-6/7) rispetto ai gatti CON (giorni 28 e 60, mediana 2/7, range 1/7-3/7) ($p < 0,05$).

	Body weight (kg)						P value
	AMC		DOX		CON		
	Median	Range	Median	Range	Median	Range	
Day 0	0.61	0.37–0.95	0.68	0.39–1.20	0.74	0.52–1.40	0.026
Day 20/28	1.00	0.80–1.56	1.18	0.87–1.73	1.26	0.77–1.60	0.217
Day 60	1.70	1.36–1.80	1.70	1.25–2.00	1.92	1.15–2.50	0.120
Day 120	2.50	1.98–3.79	2.62	1.99–3.05	2.80	1.69–3.80	0.746
Day 300	4.10	2.70–5.75	4.19	3.33–5.80	4.00	2.30–6.00	0.797
	Body condition score (1 to 9)						P value
	AMC		DOX		CON		
	Median	Range	Median	Range	Median	Range	
Day 0	4	2–6	4	3–5	4	3–5	0.107
Day 20/28	4	4–5	4	4–5	4	4–5	0.717
Day 60	4	4–6	4	4–5	4	3–5	0.651
Day 120	4	4–6	4	4–6	4	4–6	0.935
Day 300	4	3–7	5	4–6	5	3–6	0.281
	Fecal score (1 to 7)						P value
	AMC		DOX		CON		
	Median	Range	Median	Range	Median	Range	
Day 0	3	2–6	4	2–7	2	1–6	0.045
Day 20/28	4	1–6	3	2–5	2	1–3	<0.001
Day 60	3	1–6	3	1–5	2	1–3	0.035
Day 120	2	1–5	2	1–5	2	1–4	0.221
Day 300	2	1–5	2	1–3	2	1–3	0.195

AMC, cats treated with amoxicillin/clavulanic acid for 20 days; DOX, cats treated with doxycycline for 28 days; CON, healthy cats that did not receive antibiotics. Bolded p-values indicate a statistically significant difference between groups.

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei gatti inclusi nello studio. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.t001>

9.3.1.1 Effetto dell'invecchiamento sul microbioma dei gatti non trattati

A) *Analisi delle sequenze – diversità alfa e beta.* In tutti i gruppi sono state osservate delle variazioni interindividuali elevate nelle abbondanze batteriche al giorno 0 e all'interno del gruppo CON si sono verificati cambiamenti significativi nel tempo. Questi cambiamenti sono stati attribuiti al processo di maturazione microbica, pertanto i risultati di questo gruppo sono discussi separatamente. In totale, l'analisi delle sequenze dei 225 campioni fecali ha prodotto 1.861.875 sequenze di qualità. Non sono state riscontrate differenze significative in nessuno degli indici di ricchezza e uniformità delle specie nel tempo nei gatti di controllo (Fig. 1, Tabella S2). Tuttavia, la struttura della comunità filoge-

netica si è raggruppata in modo diverso nel tempo ($p < 0,05$) ed è risultata sempre più distinta con l'avanzare dell'età dei gatti, in base all'aumento della dimensione dell'effetto ANOSIM delle distanze UniFrac non ponderate e ponderate (Fig. 2, Tabella S3). Anche l'analisi PERMANOVA ha mostrato una composizione microbica distinta nel tempo nei gatti del gruppo CON (Fig. 2, Tabella S4).

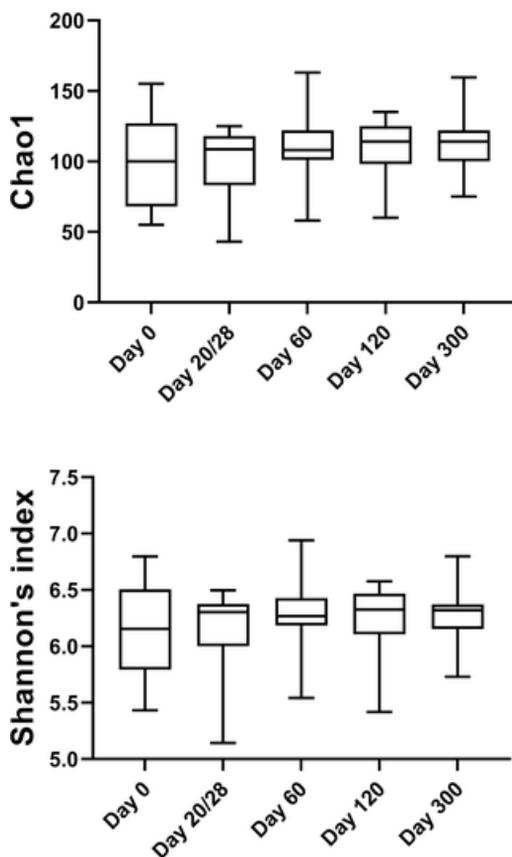


Figura 1. Differenze nella diversità alfa nei gatti di controllo nel tempo. Le medie con i valori minimi e massimi sono visualizzate per ogni giorno di campionamento. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.g001>

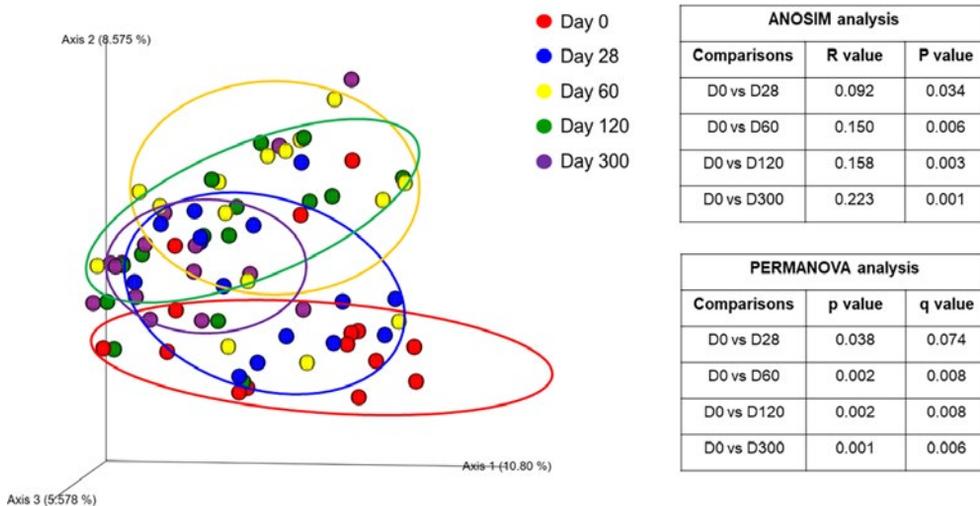


Figura 2. Analisi delle coordinate principali delle distanze UniFrac non ponderate dei geni 16S rRNA che rappresentano le differenze nella composizione della comunità microbica all'interno del gruppo di controllo al giorno 0 (cerchi rossi), al giorno 28 (cerchi blu), al giorno 60 (cerchi gialli), al giorno 120 (cerchi verdi) e al giorno 300 (cerchi viola). Vengono visualizzati i valori R e i valori P calcolati con ANOSIM e PERMANOVA p e q. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.g002>

B) *Analisi delle sequenze - abbondanza di singoli taxa batterici.* A 2 mesi di età (giorno 0) il *phylum* prevalente (indipendentemente dal gruppo) era *Firmicutes* (63,5%), seguito da *Actinobacteria* (13,9%), *Bacteroidetes* (11,6%), *Proteobacteria* (6,0%) e *Fusobacteria* (4,9%). L'abbondanza di *Proteobacteria* era significativamente ridotta a meno dell'1% ($p = 0,009$) all'età di 4 mesi nei gatti di controllo (Fig. 3). La *tabella S5* contiene statistiche riassuntive per tutte le classificazioni tassonomiche (*phylum*, classe, ordine, famiglia, genere e specie).

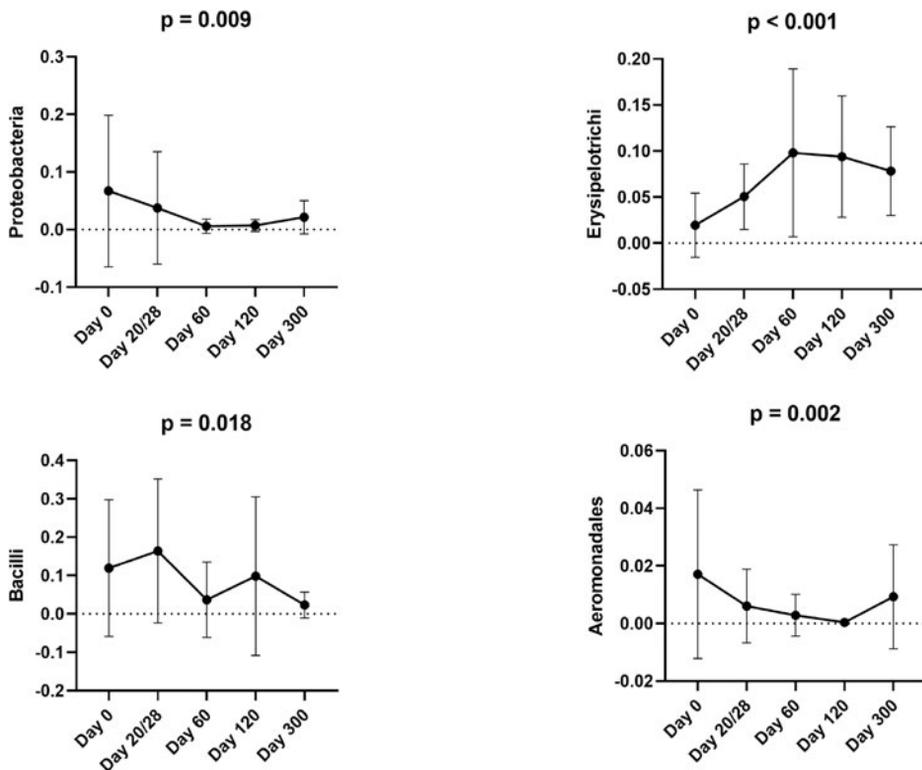


Figura 3. Gruppi batterici che sono cambiati significativamente nel tempo all'interno del gruppo di controllo in base all'analisi delle sequenze. Vengono visualizzate le medie e le deviazioni standard. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.g003>

Clostridi, *Clostridiales* e *Lachnospiraceae* sono stati rispettivamente la classe, l'ordine e la famiglia più presenti nei campioni fecali dei gatti di controllo durante il primo anno di età. Inoltre, *Blautia* spp., *Collinsella* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. e *Lachnospiraceae* non classificati costituivano i generi predominanti.

La maggior parte delle differenze nelle abbondanze di batteri nei gatti di controllo si è verificata tra i 2 e i 6 mesi di età. L'abbondanza di *Gamma*proteobacteria è diminuita significativamente

dal 5,5% a 2 mesi al 3,2% a 3 mesi di età ($p = 0,007$) e quella di *Enterobacteriales* dal 3,7% a meno dello 0,5% ($p = 0,009$) durante lo stesso periodo. L'abbondanza di *Erysipelotrichia* è aumentata dall'1,9% a 2 mesi al 5% a 3 mesi di età ($p = 0,030$) (Fig. 3). L'abbondanza di bacilli si è ridotta dal 16,4% a 3 mesi al 3,7% a 4 mesi di età ($p = 0,018$). Gli unici cambiamenti osservati dopo i 6 mesi di età comprendevano un aumento dell'abbondanza di *Aeromonadales* ($p = 0,002$) (Fig. 3).

C) *Reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR) per gruppi batterici selezionati.* Nel gruppo CON, *E.coli* è diminuito ($p < 0,001$) e *Faecalibacterium spp.* è aumentato ($p = 0,032$) dai 2 ai 3 mesi di età (Fig. 4). Non sono state identificate altre differenze significative nei batteri quantificati con la PCR nei gatti CON. La tabella S6 contiene un riepilogo di tutti i taxa batterici analizzati mediante qPCR.

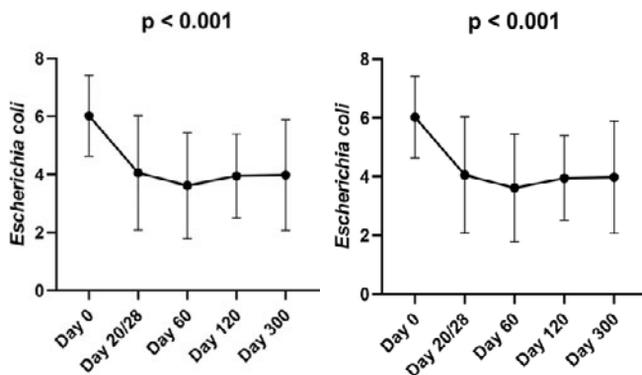


Figura 4. Gruppi batterici che sono cambiati significativamente nel tempo all'interno del gruppo di controllo, in base all'analisi qPCR. Sono visualizzate le medie e le deviazioni standard. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.g004>

9.3.1.2 Effetto degli antibiotici sul microbioma gastrointestinale

La visualizzazione dei dati ha suggerito un'elevata variazione interindividuale delle abbondanze batteriche in tutti i gruppi il giorno 0. Gli indici di diversità alfa (Tabella S2), l'ANOSIM e la PERMANOVA delle distanze UniFrac non ponderate e ponderate (Fig. S1, Tabelle S3 e S4) e le abbondanze batteriche (Tabelle S5 e S6) non differivano significativamente tra i gruppi il giorno 0.

Gruppo Amoxicillina/Acido clavulanico

A) *Analisi delle sequenze – diversità alfa e beta.* Il gruppo AMC presentava una minore uniformità nell'ultimo giorno di trattamento (giorno 20) rispetto ai gruppi DOX e CON, ma questa diminuzione non ha raggiunto la significatività statistica (indice di Shannon, $p = 0,061$) (Fig. 5, Tabella S2). Gli indici di diversità alfa non sono variati nel tempo nei gatti AMC (Tabella S2). La composizione della comunità microbica nell'ultimo giorno di trattamento (giorno 20) era diversa nei gatti AMC rispetto ai gatti DOX (ANOSIM $R = 0,109$, $p = 0,011$; PERMANOVA $p = 0,008$, $q = 0,022$) e CON (ANOSIM $R = 0,188$, $p = 0,001$; PERMANOVA $p = 0,001$, $q = 0,006$) in base all'analisi non ponderata (Fig. 6, Tabelle S3 e S4). Nei giorni 60 e 300, si è osservato un raggruppamento meno netto del microbioma nei gatti AMC rispetto ai gatti CON (in base alla dimensione dell'effetto ANOSIM decrescente), come dimostrato dall'analisi non ponderata (giorno 60, ANOSIM $R = 0,056$, $p = 0,075$; PERMANOVA $p = 0,086$, $q = 0,006$).¹⁴³ e giorno 300, ANOSIM $R = 0,077$, $p = 0,058$; PERMANOVA $p = 0,056$, $q = 0,100$) e distanze ponderate (giorno 300, ANOSIM $R = 0,057$, $p = 0,074$; PERMANOVA $p = 0,127$, $q = 0,238$), ma questa differenza non ha raggiunto la significatività statistica (S1 Fig).

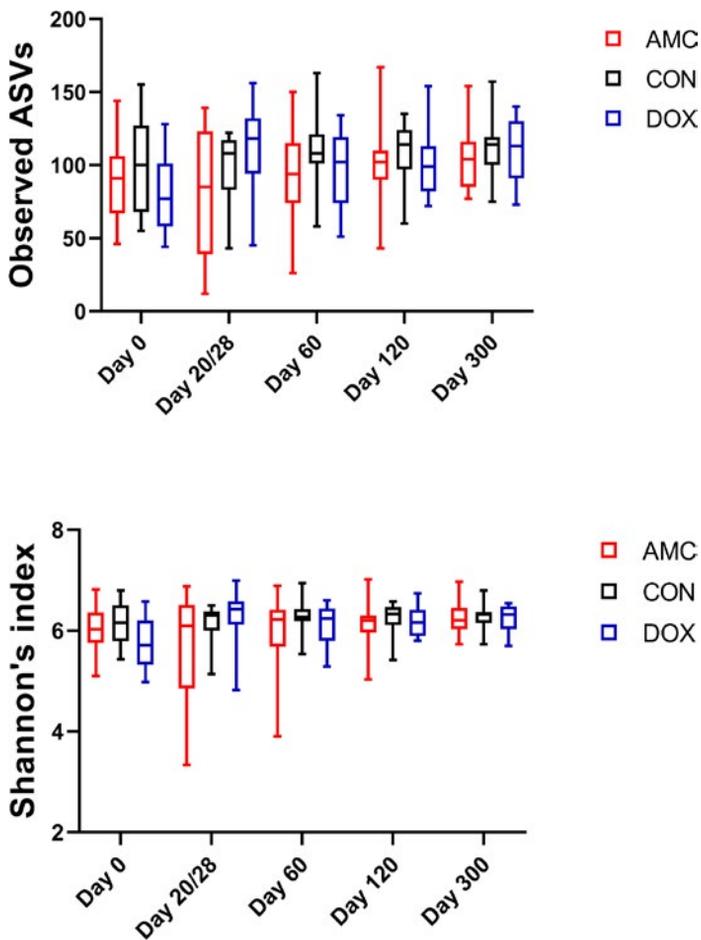


Figura 5. Differenze di diversità alfa tra gatti trattati con amoxicillina/acido clavulanico (nero), gatti trattati con doxiciclina (blu) e gatti di controllo sani (rosso). Sono visualizzate le medie e le deviazioni standard all'interno di ciascun gruppo. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.g005>

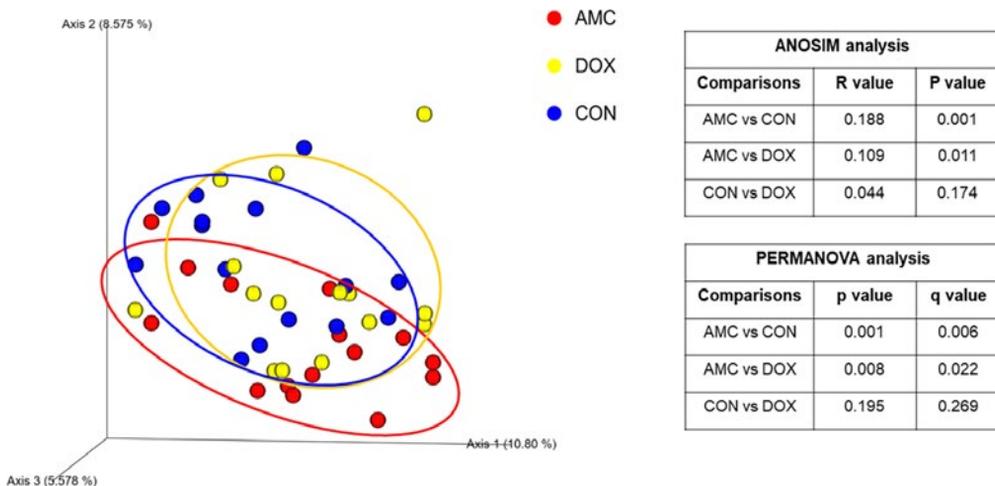


Fig. 6. Grafico dell'analisi delle coordinate principali (PCoA) della distanza *Unifrac* non ponderata nei gatti trattati con amoxicillina e acido clavulanico (rosso = AMC), nei gatti trattati con doxiciclina (giallo = DOX) e nei gatti di controllo (blu = CON) al giorno 20/28. Vengono visualizzati i valori R e i valori P calcolati con ANOSIM e PERMANOVA p e q. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.g006>

B) *Analisi delle sequenze – abbondanza di singoli taxa batterici.*

L'amoxicillina/acido clavulanico ha avuto un impatto significativo sul microbioma gastrointestinale. Infatti, i normali cambiamenti del microbioma legati all'età osservati nei gatti CON non sono stati osservati in questo gruppo. *Erysipelotrichia* ($p = 0,008$), *Catenibacterium* spp. ($p = 0,045$) e *Lachnospiraceae* non classificate ($p = 0,002$) sono stati rilevati in abbondanze significativamente inferiori, mentre *Enterobacteriales* ($p = 0,010$) è stato trovato in abbondanze significativamente più elevate nelle feci dei gatti AMC rispetto ai gatti CON nell'ultimo giorno di trattamento (giorno 20/28) (Figg. 6 e 7). 3 (giorno 120) e 9 mesi (giorno 300) dopo la sospensione dell'amoxicillina/acido clavulanico, i gatti AMC presentavano abbondanze significativamente più elevate di *Collinsella* spp. non classificata rispetto ai gatti CON (Fig. 8).

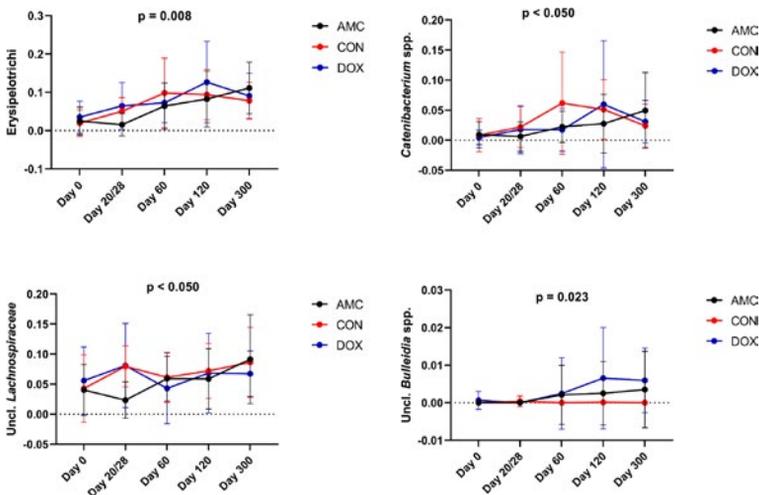


Fig. 7. Gruppi batterici che hanno mostrato un'abbondanza significativamente ridotta dopo il trattamento antibiotico (gruppo AMC e DOX) rispetto al gruppo di controllo (gruppo CON). Vengono visualizzate le medie e le deviazioni standard all'interno di ciascun gruppo. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.g007>

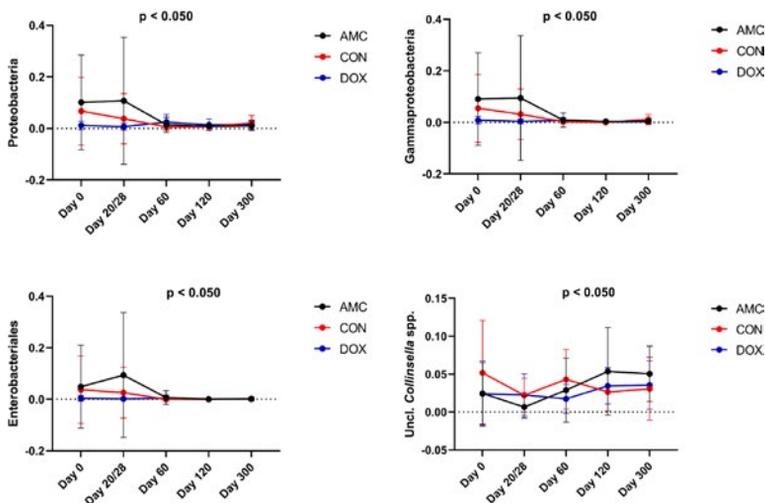


Fig. 8. Gruppi batterici che hanno mostrato un aumento significativo dell'abbondanza dopo il trattamento antibiotico (gruppi AMC e DOX) rispetto al gruppo di controllo (gruppo CON). Vengono visualizzate le medie e le deviazioni standard all'interno di ciascun gruppo. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.g008>

La maggior parte delle differenze nelle abbondanze batteriche tra i gruppi AMC e CON sono state riscontrate durante il trattamento (dai 2 ai 3 mesi di età), mentre dopo questo periodo sono state osservate solo variazioni minori. Nei gatti AMC, le abbondanze di *Gammaproteobacteria* sono rimaste invariate durante il trattamento (da 2 a 3 mesi), rappresentando circa il 9% delle sequenze totali, mentre nei gatti CON sono diminuite nello stesso periodo, rappresentando il 3% delle sequenze totali ($p = 0,009$). A 1 mese dalla sospensione dell'antibiotico (4 mesi di età), i *Gammaproteobacteria* sono diminuiti a <1% nei gatti AMC ($p = 0,030$), raggiungendo livelli simili a quelli dei gatti CON a questa età (Fig. 8). Le abbondanze di *Erysipelotrichia* rappresentavano il 2,5% delle sequenze totali nei gatti AMC prima del trattamento e sono diminuite a meno del 2% dopo il trattamento, mentre nei gatti CON le abbondanze di *Erysipelotrichia* sono aumentate a questa età. Al 60° giorno, entrambi i gruppi presentavano abbondanze simili di questo batterio (Fig. 7).

C) *qPCR per gruppi batterici selezionati*. L'ultimo giorno di trattamento nelle feci dei gatti AMC sono state rilevate conte totali di batteri più basse ($p = 0,003$) e abbondanze più elevate di *E. coli* ($p = 0,002$) rispetto ai gatti CON (Fig. 9).

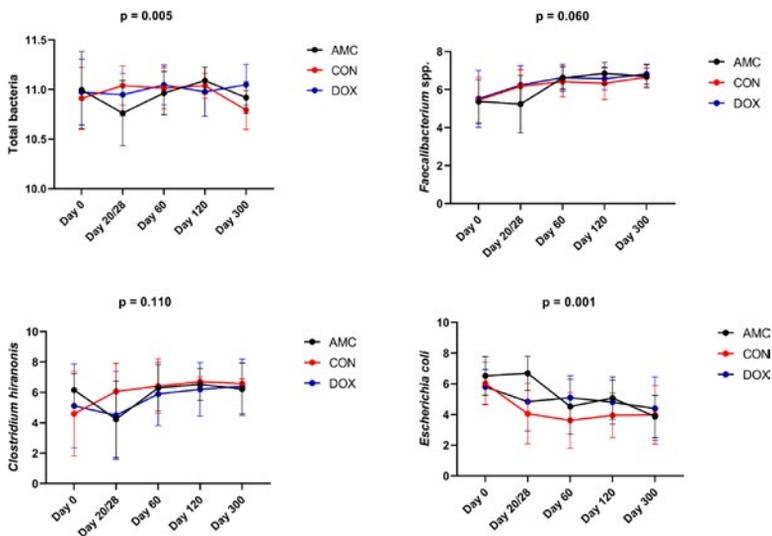


Figura 9. Abbondanze fecali di taxa batterici selezionati tra gatti trattati con amoxicillina/acido clavulanico (AMC), gatti trattati con doxiciclina (DOX) e gatti sani (CON) analizzati con qPCR. Sono visualizzate le medie e le deviazioni standard all'interno di ciascun gruppo. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.g009> Le abbondanze batteriche nel gruppo AMC hanno mostrato un andamento diverso rispetto al gruppo CON. Nel gruppo AMC, le abbondanze di *E. coli* non sono cambiate tra i 2 e i 3 mesi di età (cioè durante il trattamento), per poi diminuire significativamente a 4 mesi di età ($p = 0,012$) (Fig. 9).

Gruppo Doxiciclina

A) *Analisi delle sequenze – diversità alfa e beta.* I gatti DOX presentavano una ricchezza di specie significativamente più elevata (ASV osservati, $p = 0,025$; Chao1, $p = 0,029$) (Fig 5, Tabella S2) nell'ultimo giorno di trattamento e un diverso raggruppamento del microbioma 1 mese dopo il trattamento (giorno 60) rispetto ai gatti CON (ANOSIM $R = 0,100$, $p = 0,021$; PERMANOVA $p = 0,033$, $q = 0,144$) (Fig 10, Tabelle S3 e S4). Anche gli indici di ricchezza e di uniformità delle specie erano significativamente più alti nei gatti DOX il giorno 300 rispetto al giorno 0 (ASV osservati; Chao1; Shannon $p = 0,010$).

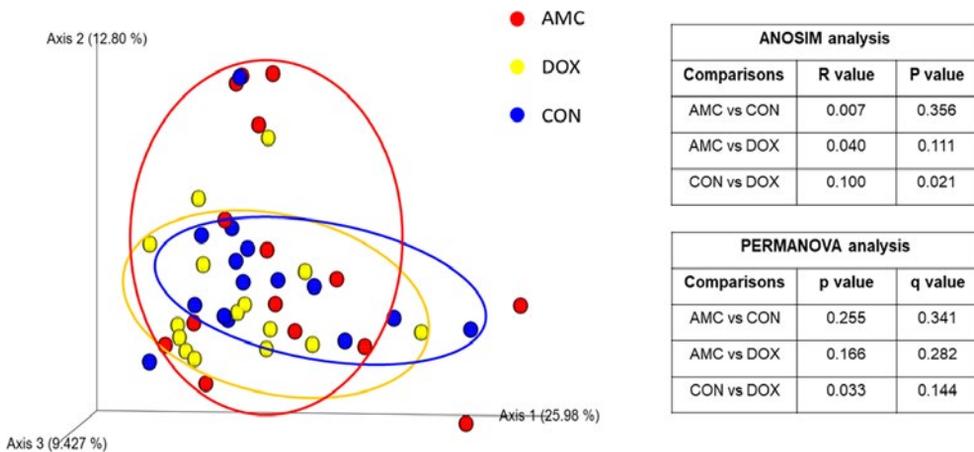


Fig. 10. Grafico dell'analisi delle coordinate principali (PCoA) delle distanze Unifrac ponderate nei gatti trattati con amoxicillina/acido clavulanico (rosso = AMC), nei gatti trattati con doxiciclina (giallo = DOX) e nei gatti di controllo (blu = CON) al 60° giorno. Vengono visualizzati i valori R e i valori P calcolati con ANOSIM e PERMANOVA p e q. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.g010>

B) Analisi delle sequenze – abbondanza di singoli taxa batterici.

La doxiciclina ha causato cambiamenti pronunciati nelle abbondanze delle comunità batteriche, ma i suoi effetti sono comparsi 1 mese dopo la sua interruzione. *Catenibacterim* spp. e *Lachnospiraceae* spp. non classificate (entrambe $p = 0,039$) sono state rilevate ad abbondanze significativamente inferiori, mentre *Proteobacteria* ($p = 0,001$) ed *Enterobacteriales* ($p = 0,018$) ad abbondanze significativamente superiori nelle feci dei gatti DOX rispetto ai gatti CON al 60° giorno (Figg. 7 e 8). L'aumento dell'abbondanza di *Proteobacteria* è persistito per 3 mesi dopo la sospensione dell'antibiotico ($p = 0,026$). Inoltre, a 3 e 9 mesi dalla sospensione dell'antibiotico, l'abbondanza di *Collinsella* spp. non classificata era significativamente più alta nei gatti del gruppo DOX rispetto ai gatti del gruppo CON ($p = 0,025$) (Fig. 8). La *Bulleidia* spp. non classificata è stata rilevata con abbondanze maggiori ($p = 0,023$) nei gatti DOX 9 mesi dopo la sua interruzione (Fig. 7). La Fig. 11 mostra un grafico percentuale delle abbondanze batteriche a livello di classe tra i gruppi.

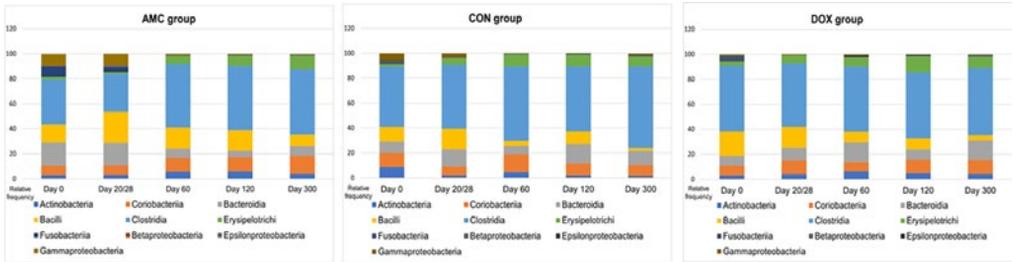


Figura 11. Abbondanza relativa dei taxa batterici a livello di classe tra i gruppi. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031.g011>

C) *qPCR per gruppi batterici selezionati.* Al 60° giorno, sono state riscontrate abbondanze di *E. coli* più elevate ($p = 0,035$) nei gatti DOX rispetto ai gatti CON (Fig. 9).

9.4 DISCUSSIONE

Il nostro obiettivo era descrivere gli effetti del trattamento con amoxicillina/acido clavulanico o doxiciclina sul microbioma gastrointestinale dei gatti giovani e il recupero microbico dopo l'esposizione agli antibiotici all'inizio della vita. Il nostro studio ha mostrato cambiamenti sostanziali nel microbioma gastrointestinale dai 2 mesi a un anno di età nei gatti, con un impatto differenziato degli antibiotici sul microbioma gastrointestinale in via di sviluppo. L'amoxicillina/acido clavulanico ha causato effetti pronunciati durante il trattamento, mentre gli effetti della doxiciclina sono comparsi 1 mese dopo la sua sospensione. Entrambi gli antibiotici hanno colpito principalmente i membri dei *Firmicutes* e dei *Proteobacteria* e hanno provocato un ritardo nella progressione dello sviluppo del microbioma rispetto al modello di cambiamenti microbici osservati nel tempo nei gatti non trattati con antibiotici.

È importante notare che nei gatti a 2 mesi di età (prima dell'esposizione agli antibiotici) è stata osservata un'elevata variazione interindividuale nelle abbondanze batteriche. Nell'uomo e nel cane, durante la fase di maturazione del microbiota, si verificano

elevate differenze interindividuali nelle abbondanze batteriche [63-65], pertanto la grande variazione osservata nel nostro studio rappresenta probabilmente un microbioma immaturo nei gatti a 2 mesi di età. Inoltre, le maggiori modifiche del microbiota gastrointestinale nei gatti di controllo si sono verificate tra i 2 e i 6 mesi di età, suggerendo che il normale microbioma gastrointestinale si evolve nei gattini e raggiunge la maturità intorno ai 6 mesi di età. Esistono delle prove contrastanti sul fatto che il microbioma raggiunga uno stato simile a quello di un adulto alla fine del periodo di svezzamento nei cani e nei gatti [8,66,67], eppure in un precedente studio canino i cuccioli di 2 mesi presentavano ancora un microbioma significativamente diverso rispetto ai cani adulti [63].

Nell'uomo adulto, le abbondanze di circa il 70% dei membri della flora batterica gastrointestinale sono relativamente stabili per almeno 12 mesi [8]. Pertanto, a differenza dei gatti adulti, la durata degli effetti degli antibiotici sul microbioma gastrointestinale in via di sviluppo può essere studiata solo valutando un gruppo di controllo per aggiustare i cambiamenti legati all'età. Il fatto che ci fosse una grande variazione nella composizione della comunità microbica al basale tra i gatti ha probabilmente portato a risposte individuali agli antibiotici. Il microbioma è considerato individuale, come l'impronta digitale [68] e durante il periodo di maturazione potrebbero verificarsi cambiamenti imprevedibili che non sono stati adeguatamente descritti nei gatti. Nonostante l'elevata variabilità, i *taxa* batterici principali nei gatti del nostro studio erano *Firmicutes* e *Actinobacteria* da 2 mesi a 1 anno di età. Ciò è in accordo con studi precedenti che hanno esaminato gli effetti della composizione dei nutrienti della dieta [66,69,70], del genere e dello stato sessuale [67] sul microbioma fecale dei gatti giovani.

Le conoscenze attuali suggeriscono che i primi microbi che colonizzano il tratto gastrointestinale sono principalmente batteri anaerobi facoltativi, che riducono le concentrazioni di ossigeno nell'intestino e permettono la colonizzazione dei batteri anaerobi obbligati [71]. Il *phylum Proteobacteria*, che comprende

batteri anaerobi facoltativi e obbligati, è tra i primi colonizzatori del tratto gastrointestinale nell'uomo [71,72]. Nel periodo dello svezzamento e dopo l'introduzione di una dieta solida (cioè intorno ai 5-6 mesi di età), l'abbondanza di *Proteobacteria* diminuisce gradualmente [73]. La nostra scoperta di una diminuzione dipendente dall'età dei *taxa* batterici appartenenti ai *Proteobacteria* (cioè *Enterobacteriales*, *Escherichia coli*) osservata tra i 2 e i 4 mesi di età nei gatti di controllo in questo studio è in accordo con quella umana. Inoltre, nello stesso periodo si è verificato un contemporaneo aumento dell'abbondanza di *taxa* appartenenti alle *Firmicutes* (ad esempio, *Erysipelotrichales*) nello stesso gruppo, che è stato riportato anche da un altro studio in gatti di età simile e riflette l'introduzione di macronutrienti alimentari che vengono utilizzati da questi batteri [69].

Il trattamento con amoxicillina/acido clavulanico ha portato a una riduzione della ricchezza e dell'uniformità delle specie, sebbene questa variasse tra i gatti e non raggiungesse la significatività statistica, mentre la doxiciclina ha permesso un aumento significativo della ricchezza di specie. Gli antibiotici, tra cui l'amoxicillina e la doxiciclina, hanno dato prova di ridurre [41,43,50,74,75] o non avere alcun effetto sulla ricchezza di specie [76]. Solo alcuni studi hanno riportato un aumento degli indici di ricchezza di specie [46,77]. Nei gatti adulti da laboratorio, la somministrazione di amoxicillina/acido clavulanico per 7 giorni ha ridotto il numero di specie diverse osservate e questo effetto è continuato per 7 giorni dopo la sospensione dell'antibiotico [51]. Nel nostro studio, gli indici di ricchezza di specie erano indistinguibili da quelli dei gatti non trattati entro 1 mese dalla sospensione dell'amoxicillina/acido clavulanico. La doxiciclina non ha avuto alcun effetto sulle abbondanze batteriche e sulla composizione della comunità nell'ultimo giorno del periodo di trattamento (giorno 28). In alternativa, la mancanza di un effetto della doxiciclina sui generi batterici che ci si aspettava diminuissero come mostrato nei gatti di controllo, potrebbe essere responsabile dell'aumento della ricchezza di specie osservato nei gatti trattati con doxiciclina. La fioritura di questi generi potreb-

be essere attribuita alla resistenza alle tetracicline o alla contemporanea diminuzione di alcuni batteri che producono peptidi antimicrobici, il che permetterebbe a questi generi di rimanere a livelli elevati [78].

La composizione della comunità microbica era diversa nei gatti trattati con amoxicillina/acido clavulanico e indistinguibile nei gatti trattati con doxiciclina rispetto ai gatti di controllo, l'ultimo giorno di trattamento. È interessante notare che l'effetto della doxiciclina non era evidente fino a 1 mese dopo la sospensione del farmaco. Sono stati trovati dei risultati simili in un solo studio sui topi: qui i cambiamenti più profondi nella composizione della comunità microbica sono iniziati 1 mese dopo l'interruzione della doxiciclina [49]. Inoltre, nel nostro studio abbiamo osservato una tendenza a differenze significative nella composizione della comunità microbica nei gatti trattati con amoxicillina/acido clavulanico 3 e 9 mesi dopo la sospensione dell'antibiotico. In letteratura i risultati sono contraddittori, con esseri umani, animali da laboratorio e studi in vitro, che parlano di elevati effetti interindividuali [79], nessun effetto [44,80], solo effetti a breve termine [41,46] o effetti sia a breve che a lungo termine sulla composizione microbica [20,45,75] dopo la somministrazione di amoxicillina con o senza acido clavulanico. In uno studio sui ratti, un ciclo di 7 giorni di amoxicillina durante il periodo dello svezzamento ha causato alterazioni transitorie della composizione microbica che si sono risolte entro 20 giorni dalla sua interruzione [43]. In un altro studio condotto su neonati, un ciclo di 5-8 giorni di amoxicillina ha causato alterazioni a lungo termine nella composizione microbica, che sono persistite per 6 mesi dopo la sospensione del trattamento [20].

Mentre l'abbondanza totale del *phylum Firmicutes* non è stata significativamente alterata, alcuni membri batterici di questo *phylum* hanno mostrato cambiamenti significativi in risposta agli antibiotici. La somministrazione di amoxicillina/acido clavulanico e doxiciclina ha causato una diminuzione transitoria dell'abbondanza dell'ordine *Erysipelotrichales* e dei suoi sottogruppi *Erysipelotrichaceae* e *Catenibacterium* spp. La famiglia *Erysipelotri-*

chaceae contiene dei geni per l'idrolasi dei sali biliari (BSH) e questo enzima è responsabile della deconiugazione degli acidi biliari primari [81,82]. Pertanto, la diminuzione osservata potrebbe portare a un aumento delle concentrazioni di acidi biliari primari deconiugati nell'intestino. Oltre al potenziale dismetabolismo degli acidi biliari nei gatti trattati con antibiotici, uno dei principali convertitori degli acidi biliari primari in acidi biliari secondari nei cani e nei gatti è *Clostridium hiranonis*, che in risposta a entrambi gli antibiotici nel nostro studio ha mostrato una diminuzione dell'abbondanza, anche se questo cambiamento non ha raggiunto la significatività statistica per nessuno dei due trattamenti [83]. Le famiglie appartenenti alle *Clostridiales* sono state influenzate dagli antibiotici con una diminuzione significativa delle *Lachnospiraceae* non classificate. Le *Lachnospiraceae* sono state la famiglia predominante presente in tutti i punti temporali e in tutti i gruppi. I membri di questa famiglia fermentano i carboidrati e producono butirrato [84]. Il butirrato è uno dei principali acidi grassi a catena corta (SCFA) nell'intestino e ha proprietà antinfiammatorie; è una delle principali fonti di energia per i colonociti e la sua assenza provoca l'autofagia delle cellule epiteliali intestinali in topi privi di germi [85,86]. Di conseguenza, gli SCFA potrebbero essere un'altra classe metabolica principale influenzata dal trattamento antibiotico. I meccanismi con cui gli antibiotici influenzano l'abbondanza dei batteri e l'impatto di questa riduzione sui metaboliti microbici potrebbero essere svelati applicando le scienze omiche, tra cui l'analisi resistomica e metabolomica, in studi futuri.

Tra gli Actinobatteri, l'abbondanza di *Collinsella* spp. non classificata era maggiore in entrambi i gruppi trattati con antibiotici rispetto ai controlli a 3 mesi dalla sospensione del trattamento. Questo effetto è persistito nel gruppo amoxicillina-acido clavulanico per 9 mesi. La colonizzazione precoce con *Collinsella* spp. entro i primi 6 mesi di vita è associata a un aumento dell'adiposità nell'uomo [73] e una sua maggiore abbondanza è riportata anche nei gatti con diarrea.

Sulla base del sequenziamento e dell'analisi qPCR, i taxa batterici appartenenti ai *Proteobacteria* (*Gammaproteobacteria*, ordine *Enterobacteriales*, famiglia *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*) sono stati trovati in abbondanze significativamente più elevate l'ultimo giorno di trattamento (20 giorni) per l'amoxicillina/acido clavulanico e a 3 mesi dall'interruzione della doxiciclina, dopodiché sono diminuite tornando simili a quelle dei gatti di controllo. La famiglia delle *Enterobacteriaceae* è il membro microbico più comune la cui abbondanza aumenta dopo il trattamento antibiotico nell'uomo, indipendentemente dalla classe antibiotica [89]. Nel cane, il metronidazolo [27] e l'amoxicillina [24], ma non la tilosina [23,28], aumentano l'abbondanza di *Enterobacteriaceae*. Nei gatti, questo effetto è stato osservato per l'amoxicillina [51] e la clindamicina [25,26]; quest'ultima ha portato a un aumento persistente di *Enterobacteriaceae* per 2 mesi [26]. Il *phylum Proteobacteria* comprende alcuni dei patogeni più noti [72] e i membri di questo *phylum* sono comunemente aumentati nei cani [90-95] e nei gatti con malattie gastrointestinali [87,88,96-98], nonché durante il consumo di diete ad alto contenuto proteico, in scatola e crude [66,69,70,99]. Entrambi i gruppi trattati con antibiotici presentavano punteggi fecali più elevati durante il trattamento rispetto ai gatti sani, quindi gli episodi di diarrea possono essere associati a un aumento delle abbondanze di *Proteobacteria*.

Alcuni studi precedenti sull'uomo hanno dimostrato che gli antibiotici ritardano lo sviluppo del microbioma verso uno stato simile all'adulto [29,30]. In accordo con questi risultati, rispetto ai gatti non trattati abbiamo osservato un ritardo nella maturazione in entrambi i gruppi sottoposti ad antibiotici. Questo ritardo è stato caratterizzato da una riduzione delle abbondanze dei *taxa* appartenenti ai *Firmicutes* e da un aumento delle abbondanze dei *taxa* appartenenti ai *Proteobacteria*. Il ritardo più profondo si è verificato tra i 2 e i 3 mesi di età nei gatti trattati con amoxicillina/acido clavulanico e tra i 3 e i 6 mesi di età nei gatti trattati con doxiciclina.

Il trattamento antibiotico prenatale o durante i primi anni di vita nell'uomo è stato associato all'aumento di peso e all'obesità [33,34,100]. Sia le penicilline che le tetracicline sono state utilizzate nel bestiame per facilitare l'aumento di peso e la crescita [48,101]. La facilità dell'aumento di peso è stata osservata anche in bambini gravemente malnutriti, dopo gli antibiotici [35]. Nel nostro studio non sono state osservate differenze nell'aumento di peso e nei punteggi delle condizioni corporee in nessun gruppo, anche se potrebbe essere necessario un campione di dimensioni maggiori per indagare tali effetti.

Il nostro studio presenta alcune limitazioni. Un numero maggiore di animali avrebbe potuto minimizzare le differenze interindividuali nella composizione del microbioma. Tuttavia, degli studi precedenti sugli effetti degli antibiotici hanno avuto un numero simile di partecipanti animali. Tutti i gatti erano randagi all'inizio dello studio; pertanto, la loro data di nascita esatta era sconosciuta e anche delle lievi differenze d'età avrebbero potuto influenzare la composizione del microbiota, come anche le differenze di ambiente [102]. Alcuni gatti erano malnutriti e la malnutrizione è stata associata a un microbioma costantemente immaturo nei cuccioli [103]. Inoltre, alcuni gatti erano d'età molto giovane e hanno richiesto l'alimentazione artificiale, che nei cuccioli ha un impatto sulla colonizzazione del microbioma rispetto all'allattamento al seno [104]. Anche la dieta materna dei gatti ha un impatto sul microbioma della prole fino alla 17esima settimana di età [105] e nel nostro studio lo stato alimentare materno era sconosciuto. Sebbene questi fattori siano stati studiati nell'uomo, non esistono studi del loro impatto sul microbiota felino. Infine, i gatti trattati con doxiciclina avevano un punteggio fecale significativamente più alto al basale, che potrebbe anche aver influenzato l'abbondanza di alcuni taxa batterici.

9.5 CONCLUSIONE

Nel complesso, i nostri risultati indicano che il microbioma gastrointestinale dei gatti cambia dopo i 2 mesi di età e raggiunge uno stato simile a quello degli adulti intorno ai 6 mesi di età. Il trattamento con amoxicillina/acido clavulanico e doxiciclina all'inizio della vita ha influenzato significativamente la ricchezza e la composizione del microbioma del gatto. L'abbondanza dei *Firmicutes* è diminuita e quella dei *Proteobacteria* è aumentata dopo 20 giorni di trattamento con amoxicillina/acido clavulanico e 1 mese dopo un ciclo di 28 giorni di doxiciclina. Sono stati osservati solo cambiamenti minori 9 mesi dopo l'interruzione del trattamento con amoxicillina/acido clavulanico o doxiciclina, con un aumento dell'abbondanza di *Collinsella* spp. non classificata e *Bulleidia* spp. non classificata, rispettivamente. I nostri risultati suggeriscono che la doxiciclina ha avuto un impatto ritardato, mentre l'amoxicillina/acido clavulanico ha avuto un impatto più immediato sulla composizione della comunità batterica e solo cambiamenti minori sono persistiti 9 mesi dopo la sospensione di uno dei due antibiotici. Sarebbero utili studi futuri che utilizzino altri approcci per comprendere meglio i cambiamenti funzionali microbici causati dagli antibiotici.

10 - LA CO-OCCORRENZA DI GENI DI RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI TRA I CANI E I LORO PROPRIETARI NELLE FAMIGLIE

Tratto e tradotto da

Zhao, Ruonan, Hao, Jie, Yang, Jintao, Tong, Cuihong, Xie, Longfei, Xiao, Danyu, Zeng, Zhenling, and Xiong, Wenguang. 2022. *The Co-Occurrence of Antibiotic Resistance Genes Between Dogs and their Owners in Families*. iMeta 1, e21.



<https://doi.org/10.1002/imt2.21>

Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

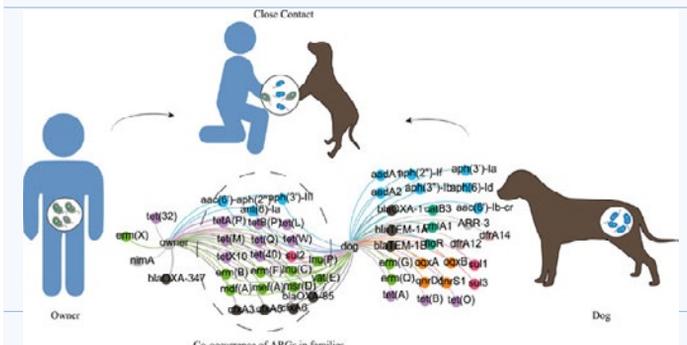
Abstract

Il rapporto stretto tra uomo e animali da compagnia dà luogo nell'uomo a una situazione di resistenza antimicrobica unica e interessante. Manca però un'analisi congiunta della resistenza antimicrobica negli animali da compagnia e nei loro proprietari. Qui abbiamo scelto 13 cani di proprietà e 16 proprietari, oltre a 22 cani da canile, per analizzare l'effetto di questo rapporto stretto tra cani di proprietà e proprietari sul loro microbioma intestinale, sui geni di resistenza agli antibiotici (ARGs) e sugli elementi genetici mobili (MGEs) e studiare la correlazione della resistenza antimicrobica tra cani e proprietari nelle famiglie mediante la metagenomica. Il microbiota intestinale dei cani presentava una maggiore abbondanza e diversità di ARG, mentre i proprietari presentavano una maggiore diversità tassonomica. Nella comunità microbica intestinale del cane di proprietà, le composizioni di ARG e MGE erano significativamente più simili al microbiota intestinale del proprietario rispetto a quelle degli altri. Dal punto di vista delle famiglie è stata riscontrata una forte correlazione tra i geni di resistenza ai macrolidi tra i cani e i loro proprietari. In conclusione, il nostro studio ha dimostrato la correlazione degli ARG tra cani e proprietari a livello di comunità. Questi risultati possono scoraggiare l'uso di antibiotici negli animali da compagnia,

dato che potrebbero dar luogo a resistenza antimicrobica e minacciare la salute pubblica.

Abstract grafico

La maggiore abbondanza di Gammaproteobatteri ha contribuito a un carico di resistenza più elevato nei cani. Il rapporto stretto ha influenzato la comunità microbica intestinale dei cani e dei loro proprietari. La comunità batterica condivisa ha causato la co-occorrenza di geni di resistenza agli antibiotici nelle famiglie.



Punti salienti

- La maggiore abbondanza di *Gammaproteobacteria* ha contribuito a un carico di resistenza più elevato nei cani.
- Il rapporto stretto ha influenzato la comunità microbica intestinale dei cani e dei loro proprietari.
- La comunità batterica condivisa ha causato la co-occorrenza di geni di resistenza agli antibiotici nelle famiglie.

10.1 INTRODUZIONE

La resistenza antimicrobica (AMR) è una “preoccupazione pubblica globale” considerata tale da numerose organizzazioni note, come l’Organizzazione Mondiale della Sanità e i Centri per il Controllo e la Prevenzione delle Malattie [1]. L’AMR e le infe-

zioni causate da patogeni resistenti agli antimicrobici rappresentano una seria minaccia globale di crescente preoccupazione per la salute umana, animale e ambientale [2]. I patogeni che causano queste infezioni possono acquisire geni di resistenza agli antibiotici (ARG) in un processo definito trasferimento genico orizzontale (HGT). L'HGT mediato da elementi genetici mobili (MGE) è un importante fattore di diffusione degli ARG, che ne facilita la trasmissione agli ospiti riceventi e quindi genera nuovi batteri resistenti agli antimicrobici [3, 4]. Gli MGE, come i plasmidi, gli elementi integrativi e coniugativi (ICE [*Integrative and Conjugative Elements*]), i trasposoni e gli integroni, possono spostarsi all'interno o tra le molecole di DNA e trasferirsi tra le cellule batteriche [5].

Nelle società industrializzate, un numero crescente di specie di animali da compagnia è tenuto a stretto contatto con gli esseri umani. Le cifre variano notevolmente da un Paese all'altro, e i proprietari considerano gli animali da compagnia come parte integrante della famiglia [6]. I proprietari possono trarre significativi miglioramenti in termini di salute e benessere dal possesso di animali da compagnia o dall'interazione con essi [7]. Inoltre, negli ultimi 10 anni si è visto il valore degli animali da compagnia per i pazienti oncologici e nell'ambito dello sviluppo e dell'ottimizzazione dei farmaci per l'uomo [8]. Ciononostante, gli animali da compagnia sono stati descritti come potenziali veicoli di AMR. È noto che i proprietari spesso condividono lo stesso ambiente con i loro animali da compagnia, che possono essere portatori di microrganismi resistenti agli antibiotici (ARM [*Antibiotic Resistance Microorganisms*]). Soprattutto in una prospettiva One Health, gli animali da compagnia potrebbero essere una fonte di trasmissione di geni di resistenza e/o di batteri resistenti ai loro proprietari [9, 10]. I principali ARM provenienti da animali da compagnia che possono causare direttamente o indirettamente effetti avversi sulla salute dell'uomo sono le *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi, i batteri Gram-negativi a beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL), lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) e gli enterococchi resistenti alla vancomicina [11]. L'MRSA potrebbe essere trasmesso tra animali

da compagnia e proprietari [12, 13]. La diffusione di *Enterobatteri* ESBL rappresenta una sfida per gli ambienti sanitari umani e veterinari in tutto il mondo e una minaccia per la salute pubblica [14]. L'Agenzia europea per i medicinali si è già occupata della mancanza di conoscenze sui fattori e sulle vie di trasmissione dell'AMR tra gli animali da compagnia e i loro proprietari [15].

L'intestino ospita diversi fattori che determinano AMR, che sono stati definiti collettivamente “resistoma intestinale” [16]. Attualmente esiste solo un numero limitato di studi che caratterizzano il microbioma intestinale degli animali da compagnia [17]. Attraverso l'analisi metagenomica, il microbioma intestinale dei cani è risultato simile a quello degli esseri umani per quanto riguarda il contenuto genico e la risposta alla dieta rispetto agli altri mammiferi [18]. Gli studi precedenti sulla resistenza antimicrobica tra gli animali da compagnia e i loro proprietari si basavano principalmente su un metodo dipendente dalla coltura [19]. Tuttavia, gli studi basati sulle colture per caratterizzare in modo completo gli ARM negli animali da compagnia e nell'intestino umano devono ancora essere migliorati. Belas ha scoperto che il resistoma degli animali da compagnia è simile a quello degli esseri umani che vivono a stretto contatto utilizzando un approccio genomico [20]. Tuttavia, si è concentrato solo sugli ARG associati a batteri clinicamente importanti ed è stato limitato nella reazione a catena della polimerasi per rilevare gli ARG, dato che le sequenze non sono complementari ai primer e alle sonde. Recentemente, diversi studi hanno utilizzato metodi di assemblaggio metagenomico e di binning¹ per rivelare nuove conoscenze sul legame tra AMR e comunità microbica [21, 22]. In questo caso, utilizziamo metodi di assemblaggio e binning metagenomico per studiare l'effetto dello stretto contatto tra cani di proprietà e proprietari sul loro resistoma intestinale e decifrare la prevalenza e la potenziale mobilità delle ARG tra di loro. La pipeline della ricerca è illustrata nella Figura 1.

¹ In metagenomica si intende con il termine *binning* il processo di raggruppamento di letture.

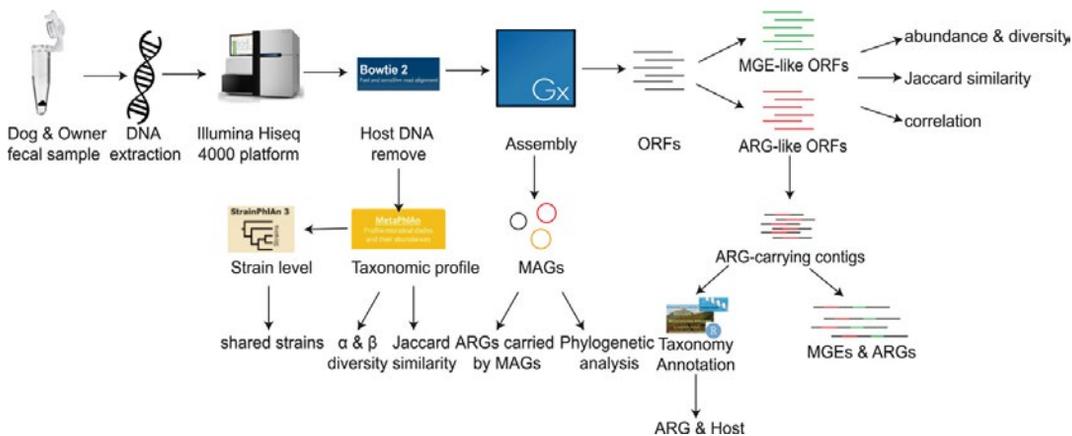


Figura 1. Analisi di questo studio. Sequenziamento metagenomico dei campioni fecali di 16 proprietari, 13 cani di proprietà e 22 cani da canile. Insieme alla sequenza metagenomica di 22 Hadza scaricata online, tutta la sequenza metagenomica è stata rimossa dal DNA dell'ospite per l'assemblaggio e l'analisi della comunità microbica. Le ORF sono state ricercate in resfinder e in un database MGE personalizzato per identificare ARG e MGE. Gli ARG e gli MGE sono stati usati per analizzare la somma delle abbondanze, le diversità, la somiglianza di Jaccard e la correlazione tra i diversi gruppi. Inoltre, abbiamo mappato l'ospite batterico degli ARG e annotato gli MGE circostanti. ARG, gene di resistenza agli antibiotici; MAG, genoma assemblato di metagenoma; MGE, elemento genetico mobile; ORF, struttura di lettura aperta [Open Reading Frame].

10.2 RISULTATI

10.2.1 L'INTESTINO DEL CANE PRESENTAVA ALTI LIVELLI DI ARG

Abbiamo confrontato la composizione di ARG, MGE e tassonomia tra quattro gruppi: cani di proprietà, cani da canile, proprietari e gli Hadza per scoprire le loro differenze in questi tre aspetti [gli Hadza sono, come riportato più avanti: “una popolazione con scarsa esposizione agli antibiotici e quasi nessun contatto con i cani”]. Il microbioma intestinale dei cani di proprietà e dei cani da canile presentava una maggiore abbondanza di ARG rispetto al microbioma intestinale dei proprietari e degli Hadza. In ogni caso, l'abbondanza di MGE non differiva significativamente tra

cani di proprietà, cani da canile e proprietari (Figura 2A,B). La stessa situazione è stata evidenziata anche nella diversità di ARG e MGE. Tuttavia, la diversità tassonomica era significativamente inferiore nei cani rispetto ai proprietari (Figure 2C,D e S1A). Gli Hadza non solo avevano l'abbondanza più bassa di ARG e MGE, ma anche la diversità Shannon di tutti gli aspetti, compresi ARG, MGE e tassonomia, era la più bassa.

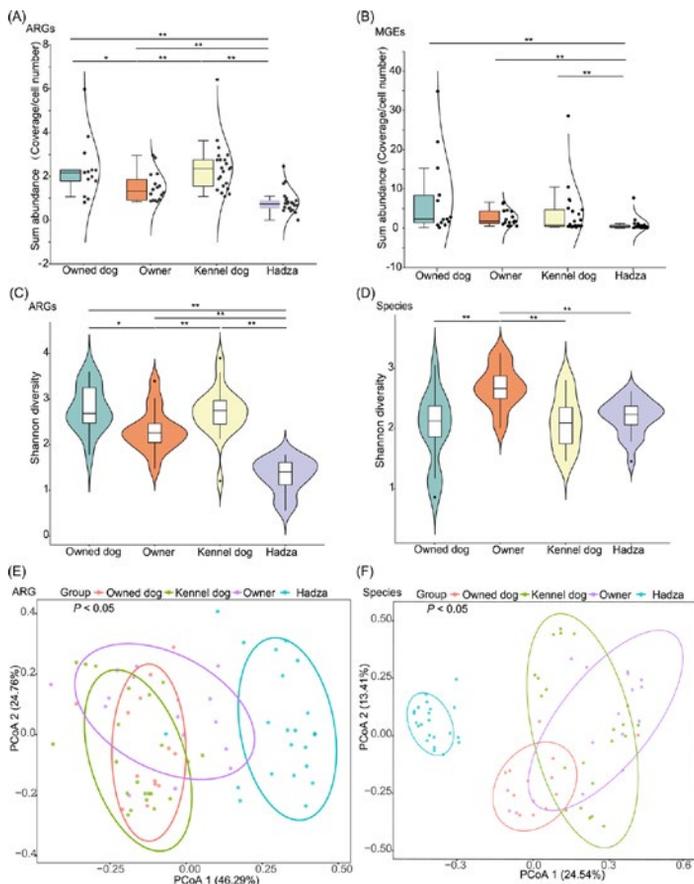


Figura 2. Somma delle abbondanze relative e diversità di ARG e MGE nei cani di proprietà, nei cani da canile, nei proprietari e negli Hadza. (A) Somma delle abbondanze relative delle ARG. (B) Somma delle abbondanze relative delle MGE. (C) Diversità

Shannon delle ARG. (D) Diversità Shannon dei taxa microbici. (E) PCoA degli ARG intestinali. (F) PCoA del microbioma intestinale. Cani di proprietà (n = 13), proprietari (n = 16), cani da canile (n = 22), Hadza (n = 22). ARG, gene di resistenza agli antibiotici; MGE, elemento genetico mobile; PCoA, analisi delle coordinate principali. $p^* < 0,05$, $*p^* < 0,01$

L'analisi delle coordinate principali è stata eseguita per raggruppare i campioni in base all'abbondanza relativa del microbioma intestinale, ARG e MGE. Abbiamo osservato che i campioni di cani di proprietà e di proprietari possono essere raggruppati in un unico gruppo non solo nella loro composizione ARG ma anche in quella MGE ($p > 0,05$, Adonis), mentre nella loro comunità microbica erano separati ($p < 0,05$, Adonis) (Figure 2E,F e S1B). La situazione è stata evidenziata anche nei campioni di cani di proprietà e di cani da canile. I campioni di cani da canile e di proprietari presentavano differenze non solo nella composizione ARG, ma anche nella composizione della comunità microbica ($p < 0,05$, Adonis). Gli Hadza presentavano una comunità microbica, un profilo ARG e un profilo MGE diversi da quelli dei cani da canile, dei cani di proprietà e dei proprietari ($p < 0,05$, Adonis).

10.2.2 IL RESISTOMA E IL MICROBIOTA DEI CANI DI PROPRIETÀ ASSOMIGLIANO A QUELLI DEI LORO PADRONI

Abbiamo contato gli ARG, gli MGE e le specie condivise e abbiamo approfondito la somiglianza della comunità microbica intestinale e la composizione di ARG e MGE utilizzando l'indice di Jaccard tra i quattro gruppi. I cani di proprietà condividevano il 70% di ARG e l'82% di MGE con i loro proprietari e il rapporto tra ARG e MGE condivisi era rispettivamente del 72% e dell'82% nei proprietari. I cani da canile presentavano la più alta diversità di ARG e MGE. Tuttavia, i cani da canile condividevano solo il 57% degli ARG con i cani di proprietà e gli ARG condivisi tra cani da canile e proprietari rappresentavano solo il 52% degli ARG totali. Anche la percentuale di MGE condivisi dai cani da canile con i cani di proprietà e con i proprietari era inferiore rispetto agli MGE condivisi tra i cani di

10.2.3 IL CONFRONTO TRA CANI E PADRONI NELLE FAMIGLIE

Abbiamo poi scelto 12 coppie cane-proprietario dal punto di vista della famiglia per confrontare la loro comunità microbica intestinale e le composizioni di ARG e MGE. Abbiamo anche scoperto che i cani avevano un'abbondanza totale e una diversità Shannon più elevata di ARG, con una diversità tassonomica inferiore rispetto ai loro proprietari. Nel frattempo, l'abbondanza e la diversità Shannon delle MGE non hanno mostrato una differenza significativa tra i due gruppi. Tuttavia, abbiamo osservato una differenza con il risultato precedente per quanto riguarda l'aspetto della diversità beta: i cani e i loro proprietari presentavano differenze non solo nella comunità microbica, ma anche nella composizione degli ARG ($p < 0,05$, Adonis; Figura 4A,B), mentre per quanto riguarda la composizione degli MGE, non vi era alcuna differenza significativa tra loro ($p > 0,05$, Adonis; Figura S2A). Le differenze nella composizione di ARG e MGE tra cani e proprietari sono state osservate anche nei tipi di ARG e MGE (Figura S2B,C). In termini di tipi di ARG, i primi quattro tipi di ARG sia nei cani che nei proprietari erano aminoglicosidi, beta-lattamici, macrolidi e tetracicline. La loro abbondanza rappresentava l'83% e il 95% del totale degli ARG identificati rispettivamente nei cani e nei proprietari. Il tipo di resistenza più abbondante sia nei cani che nei proprietari era il macrolide e la sua abbondanza era maggiore nei cani che nei proprietari. Inoltre, anche i geni resistenti agli aminoglicosidi e al trimetoprim erano più numerosi nei cani che nei proprietari. A livello di MGE, le trasposasi costituivano i tipi di MGE più comuni in tutti i campioni, mentre le integrasi associate a integroni e qacE-delta erano significativamente più elevate nei cani rispetto ai proprietari (Figura 4C). A livello di classe, i *Gammaproteobacteria* e gli *Epsilonproteobacteria* erano più comuni nei cani, mentre i proprietari avevano più *Clostridia* e *Deltaproteobacteria* (Figura S2D). A livello di famiglia, le *Bacteroidaceae* erano le più abbondanti nei campioni fecali e la loro abbondanza era maggiore nei proprietari rispetto nei cani. I cani avevano una maggiore abbondanza

di *Enterobacteriaceae* e *Peptostreptococcaceae* (Figura 4D). Inoltre, abbiamo caratterizzato la differenza di microbiota fecale tra i gruppi e scoperto generi indicatori ($p < 0,05$) utilizzando l'analisi discriminante lineare dell'effetto (Figura S3).

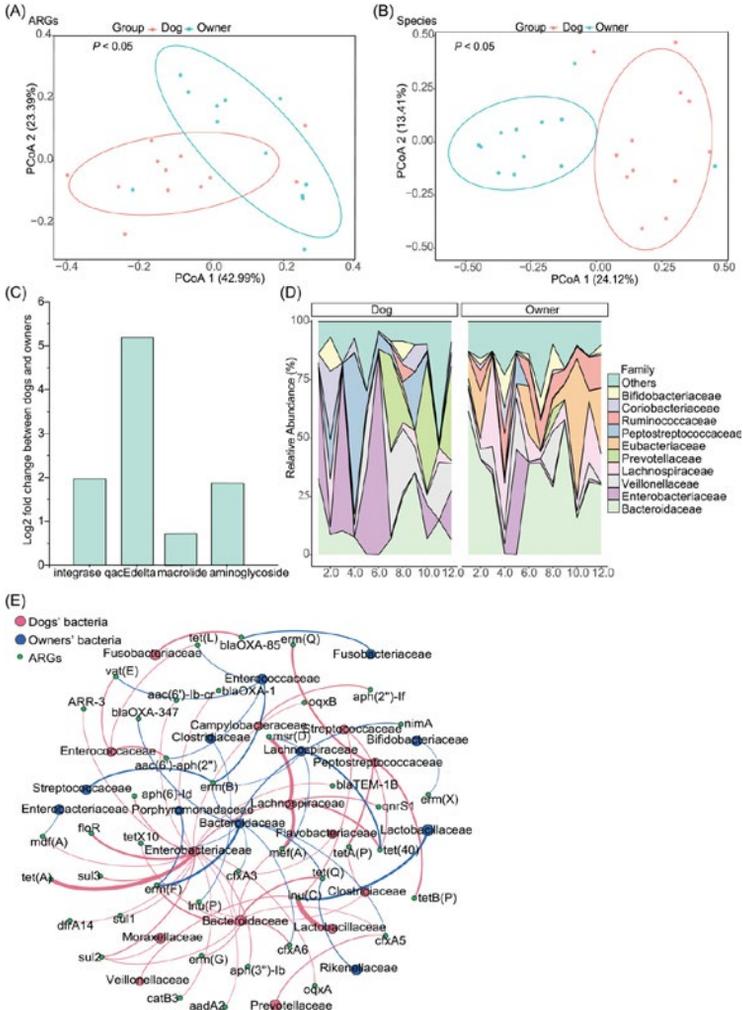


Figura 4. Confronto della composizione di ARG, MGE e microbiota tra cani e proprietari in famiglie. (A) PCoA degli ARG intestinali. (B) PCoA del microbioma intestinale.

(C) Differenze nell'abbondanza relativa dei tipi di ARG e MGE. (D) Le 10 famiglie principali. Le altre famiglie sono state indicate come "altre". (E) ARG e i loro ospiti batterici a livello di famiglia. Sono state mostrate solo le ARG con un'abbondanza relativa superiore a 0,01. I nodi sono stati colorati in base alla classe di modularità. La dimensione delle curve rappresenta l'abbondanza di ARG trasportati dai loro ospiti. Cane (n = 12) e proprietario (n = 12). ARG, gene di resistenza agli antibiotici; MGE, elemento genetico mobile; PCoA, analisi delle coordinate principali.

10.2.4 IL RESISTOMA INTESTINALE ERA LEGATO ALLA COMPOSIZIONE DEL MICROBIOMA

Abbiamo esplorato il legame tra ARG intestinale, MGE e composizione del microbioma attraverso l'analisi di Procuste. Il risultato dell'analisi di Procuste ha indicato che l'ARG, l'MGE e la composizione del microbioma erano significativamente correlati tra loro, suggerendo che la composizione della comunità microbica ha strutturato la composizione nell'intestino di ARG e MGE nel microbioma fecale di cani e proprietari (Figura S4). Abbiamo verificato e riassunto quali *taxa* microbici (osservati in meno di cinque campioni) erano correlati con l'abbondanza di ARG e MGE nei cani e nei proprietari analizzando la loro correlazione di Pearson (Tabella S2). D'altra parte, sono state osservate forti correlazioni tra *taxa*, come *Escherichia coli*, *Escherichia*, *Enterobacteriaceae* e *Gammaproteobacteria*, e l'abbondanza totale di ARG e MGE sia nei cani che nei proprietari.

Nel frattempo, abbiamo decifrato l'ospite batterico delle ARG mediante l'annotazione tassonomica delle ORF portatrici di ARG. A livello di famiglia, le *Enterobacteriaceae* erano l'ospite batterico predominante e ospitavano la maggior parte degli ARG, compresa la maggior parte dei tipi di ARG nei cani, mentre le *Bacteroidaceae* erano l'ospite batterico predominante nei proprietari (Figura 4E). A livello di classe, i *Gammaproteobacteria* hanno ospitato la maggior parte degli ARG diversi nei cani, mentre gli ARG dei proprietari sono stati trasportati principalmente dai *Bacteroidia* (Figura S5).

10.2.5 LA CO-OCCORRENZA DI ARG E CEPPI NELLE FAMIGLIE

Abbiamo analizzato la correlazione degli ARG e dei ceppi condivisi tra i cani e i loro proprietari e riassunto gli MGE che circondano gli ARG negli stessi *contig2* per esplorare la possibilità di trasmissione degli ARG nelle famiglie. Un totale di 118 e 89 sottotipi di ARG sono stati rilevati rispettivamente nei cani e nei proprietari. Più della metà degli ARG rilevati (61 ARG) erano condivisi da cani e proprietari. Questi ARG condivisi erano molto diffusi nell'ambiente familiare e rappresentavano rispettivamente l'88% e il 96% degli ARG rilevati nei campioni di cani e proprietari sotto il profilo dell'abbondanza totale. Abbiamo anche scoperto che l'abbondanza di ARG condivisi era correlata positivamente in modo significativo con la loro somma totale di abbondanza ($r = 0,988$ per i proprietari e $r = 0,925$ per i cani, $p < 0,01$). È stata adottata un'analisi di rete bipartita per presentare gli ARG condivisi tra i cani e i loro proprietari e quelle uniche in ciascun gruppo (Figura 5A). La maggior parte degli ARG condivisi erano geni di resistenza di antibiotici comunemente usati come beta-lattamici, aminoglicosidi, tetracicline e macrolidi. Tra gli ARG condivisi, i geni di *tet(Q)*, *tet(A)*, *lnu(C)*, *mef(A)*, *erm(F)* e *erm(B)* (resistenti alla tetraciclina e al macrolide) rappresentavano la percentuale maggiore sia nei cani che nei proprietari. Le relazioni tra la comunità batterica condivisa (a livello di classe), gli MGE e gli ARG condivisi sono stati studiati con l'analisi della ridondanza (Figura S5B). Per determinare il contributo della comunità batterica e degli MGE condivisi sugli ARG condivisi è stata eseguita l'analisi di partizione delle variazioni (VPA) e abbiamo riscontrato che i fattori selezionati spiegavano l'87,52% delle variazioni nel profilo degli ARG condivisi. L'interazione tra comunità batterica e MGE condivisi ha contribuito per il 28,36% al profilo ARG condiviso e la singola comunità batterica condivisa ha spiegato il 45,40%

² In genomica il termine *contig* rappresenta un insieme di segmenti o sequenze di DNA che si sovrappongono in modo da fornire una rappresentazione contigua di una data regione.

della varianza, più di quella degli MGE condivisi (13,76%) (Figura 5B). Abbiamo anche utilizzato StrainPhlAn3 per studiare se i cani e i loro proprietari condividessero i ceppi e abbiamo trovato 12 sequenze simili di *E. coli* tra tutti i 24 campioni fecali, tra cui due coppie provenienti dalle stesse famiglie (Figura 5C). Inoltre è stato possibile costruire quattro sequenze simili di *Klebsiella pneumoniae* (Figura S6A). In più abbiamo analizzato la correlazione di Pearson degli ARG tra cani e proprietari. Sebbene l'abbondanza totale degli ARG non abbia mostrato correlazione ($p > 0,05$), abbiamo riscontrato un'elevata correlazione dei geni di resistenza ai macrolidi ($r = 0,92$, $p < 0,01$) tra i cani e i loro proprietari. La correlazione è stata riscontrata anche nei sottotipi di ARG, come *mdf(A)* e *tet(L)* (Figure 5D e S6B).

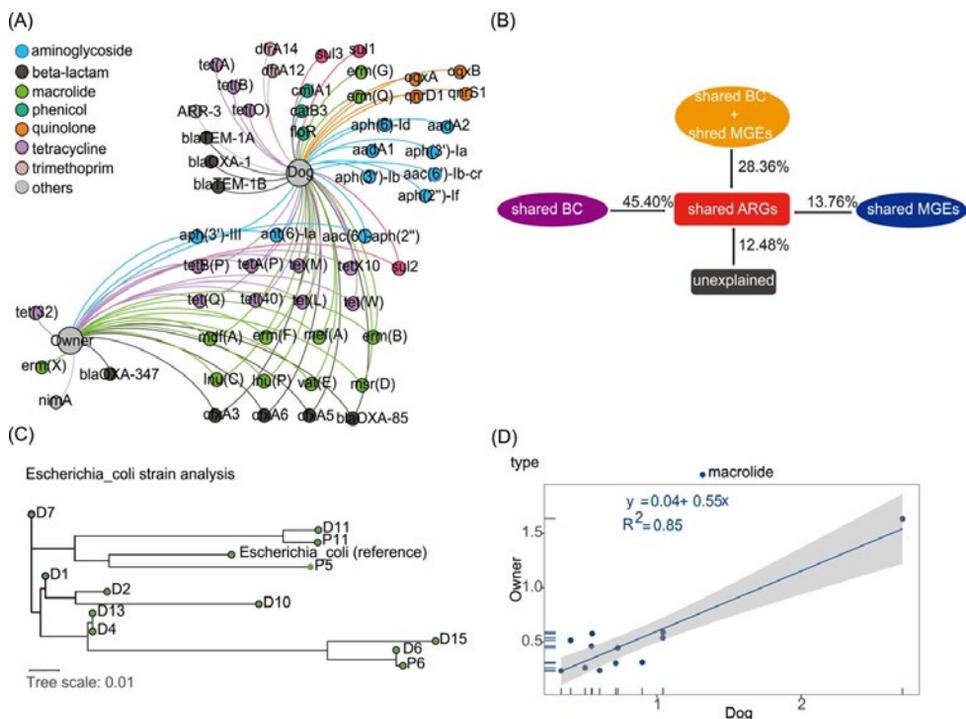


Figura 5. Analisi degli ARG e dei ceppi condivisi tra cani e proprietari. (A) Analisi della rete bipartita che illustra gli ARG condivisi tra cani e proprietari. Sono mostrati solo gli

ARG con un'abbondanza relativa superiore a 0,01. I nodi sono stati colorati in base alla classe di modularità e la dimensione delle curve indica il numero di campioni con ARG. (B) L'analisi della partizione delle variazioni differenzia gli effetti della comunità batterica e degli MGE condivisi sugli ARG condivisi. (C) Albero filogenetico di *Escherichia coli* a livello di ceppo utilizzando StrainPhlAn 3. Il riquadro rosso indica cane e padrone della stessa famiglia. Il genoma di riferimento di *E. coli* proviene da *E. coli* str. K12 substr. MG1655 (D) Correlazione dei tipi di ARG tra cani e proprietari. ARG, gene per la resistenza agli antibiotici; MGE, elemento genetico mobile.

Gli ARG erano anche significativamente correlati con le MGE (Figura S4). È stata inoltre analizzata la presenza di MGE che circondano ARG condivisi tra coppie cane-proprietario. Dal campione sono stati assemblati 104 *contig* contenenti almeno un ARG e un MGE (Tabella S3). Di questi 104 *contig*, 6 con la stessa disposizione dei geni sono stati condivisi tra una coppia di animali domestici e proprietari correlati e 35 *contig* sono stati condivisi tra cani e proprietari; il *contig* più comune era il *tnpA* con un gene di resistenza *cfxA3*. È emerso inoltre che molti dei *contig* contenenti ARG hanno avuto il loro miglior riscontro tassonomico in *E. coli*.

10.2.6 I GENOMI ASSEMBLATI DEL METAGENOMA RIVELANO LE COMUNITÀ BATTERICHE RAPPRESENTATIVE E I LORO ARG

Il binning del genoma indipendente dalla composizione della sequenza è stata condotta anche per analizzare i batteri rappresentativi e gli ARG trasportati. Da 24 campioni di 12 famiglie, i genomi batterici sono stati costruiti con l'assemblaggio combinato delle letture filtrate. Dopo aver filtrato il genoma assemblato del metagenoma (MAG) di bassa qualità, è stato ottenuto un totale di 326 MAG nei proprietari e 215 MAG nei cani. Abbiamo combinato insieme tutti i MAG dei proprietari e dei cani per condurre le analisi filogenetiche. L'albero filogenetico ha rivelato l'appartenenza a sei *phyla* batterici, tra cui *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* e *Proteobacteria* (Figura 6A). Settanta MAG sono stati classificati per specie, 58 sono stati classificati per genere, 224 sono stati classificati per famiglia, 124 sono stati classificati per ordine, 6 sono stati classificati per classe, 29 sono stati classificati per *phylum* e i restanti 20 sono stati identificati solo come batteri a causa della limitazione dei genomi di riferimento disponibili.

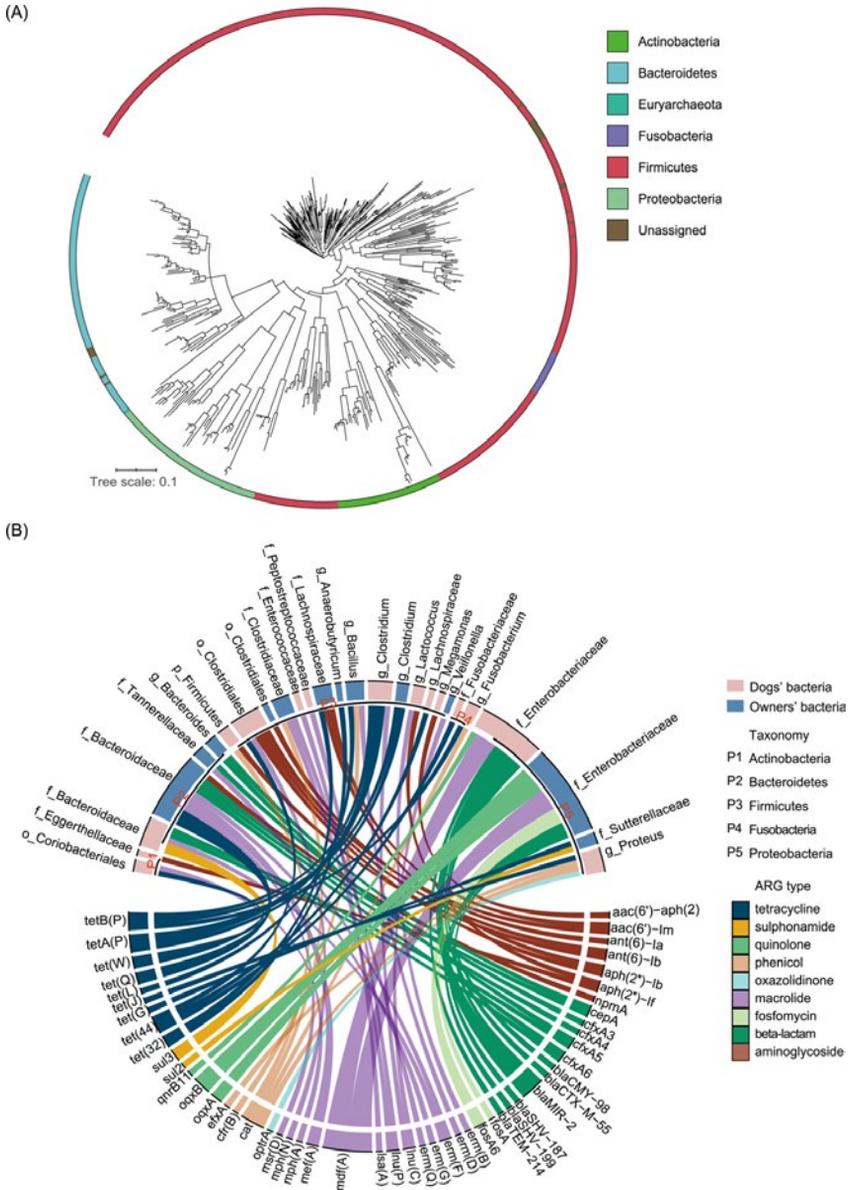


Figura 6. L'analisi dei MAG. (A) Assegnazione filogenetica dei MAG. Gli organismi sono colorati in base ai phyla. (B) La relazione di mappa-tura tra i 58 MAG portatori di

ARG e gli ARG trasportati. La lunghezza delle barre sull'anello interno rappresenta il numero totale di ARG e MAG, rispettivamente. ARG, gene di resistenza agli antibiotici; MAG, genoma assemblato del metagenoma.

Tra i 541 MAG recuperati, un totale di 58 MAG (30 nei cani e 28 nei proprietari) sono stati identificati come portatori di ARG ($n = 108$). Gli ospiti batterici degli ARG appartenevano per lo più alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* sia nei cani che nei proprietari (Figura 6B). I 58 MAG erano portatori di nove tipi di ARG e i quattro tipi di ARG più frequentemente rilevati erano macrolidi, tetracicline, beta-lattamici e aminoglicosidi. Inoltre, 21 MAG (11 nei cani e 10 nei proprietari) presentavano almeno due ARG. Due MAG annotati come famiglia *Enterobacteriaceae* nei proprietari ospitavano cinque ARG che conferivano resistenza a beta-lattamici (*blaSHV-187*, *blaSHV-199*), fosfomicina (*fosA*, *fosA6*), macrolidi (*mdf(A)*) e chinoloni (*oqxA*, *oqxB*). Inoltre, un totale di 13 MAG (quattro nei cani e nove nei proprietari) assegnati alla famiglia delle *Bacteroidaceae* erano resistenti alla maggior parte dei tipi di ARG, tra cui aminoglicoside, beta-lattamico, macrolide, sulfonamide e tetraciclina.

Abbiamo inoltre previsto gli ICE e gli elementi integrativi e mobilizzabili (IME) nei MAG portatori di ARG per stimare ulteriormente la trasferibilità degli ARG (Tabella S4). Un totale di 13 ICE di tipo T4SS e 30 IME sono stati identificati in 22 MAG portatori di ARG, di cui sei MAG contenevano sia regioni ICE che IME. Per quanto riguarda gli altri componenti, è stato riscontrato che sette IME in cinque MAG contengono una regione oriT, una breve sequenza di DNA fondamentale per la coniugazione. Inoltre, sono stati osservati i siti di attacco (*attL* e *attR*) che sono vicini alla maggior parte delle regioni ICE e IME, cosa che suggerirebbe un loro ruolo negli eventi di ricombinazione specifici del sito.

10.3 DISCUSSIONE

Il contatto stretto tra gli animali da compagnia e i loro proprietari è un fattore di rischio per il trasferimento di AMR. In particolare, gli ARM che risiedono sulla cute e sulle mucose del cane potrebbero essere facilmente trasferiti ai proprietari. Inoltre, alcuni livelli di resistenza sono preoccupanti, come la possibile trasmissione da un animale da compagnia all'uomo di *mcr-1*, resistente alla colistina [23].

In questo studio, abbiamo riportato il confronto degli ARG intestinali, degli MGE e del microbiota tra i cani di proprietà e i loro proprietari, nonché tra i cani da canile e gli Hadza. Gli studi attuali hanno utilizzato principalmente dei metodi tradizionali di coltura batterica per esplorare l'AMR dei cani e degli esseri umani. Tuttavia, tali metodi impongono delle restrizioni a livello di comunità [24]. Utilizzando un approccio di assemblaggio e binning metagenomico abbiamo fornito una visione completa dell'associazione di AMR tra cani di proprietà e proprietari. L'intestino del cane presentava livelli più elevati di ARG, mentre i proprietari presentavano livelli più elevati di diversità microbica e non differivano significativamente nelle MGE. La maggiore abbondanza di ARG nei cani di proprietà e nei canili può essere spiegata dall'uso di antibiotici. Gli antimicrobici sono strumenti utili per la terapia delle malattie batteriche infettive negli animali da compagnia; tuttavia, non sono state individuate delle linee guida specifiche per un uso prudente degli antibiotici negli animali da compagnia [25]. L'uso di antimicrobici nei piccoli animali è stato identificato come uno dei fattori di rischio per la colonizzazione o l'infezione da ARM [26]. Inoltre, i batteri resistenti agli antibiotici e le ARG possono provenire dal loro cibo [27]. Per i cani da canile un'altra possibile causa è la sistemazione in gruppo.

Alcuni studi recenti hanno suggerito che il passaggio da uno stile di vita naturale e non addomesticato alla convivenza con l'uomo ha modificato la comunità microbica intestinale dei cani domestici [28, 29]. Rispetto ad altri mammiferi, il microbioma intestinale del cane e quello dell'uomo presentano molte somi-

glianze [18]. Abbiamo riscontrato che i cani di proprietà erano più simili ai proprietari non solo per il microbioma intestinale, ma anche per ARG e MGE. Degli studi precedenti hanno evidenziato il ruolo importante dell'ambiente nel microbioma intestinale, in quanto hanno riscontrato che gli esseri umani imparentati hanno una composizione del microbioma più simile rispetto agli esseri umani non imparentati [30, 31]. Allo stesso tempo il microbioma intestinale dei cani geneticamente imparentati sembra essere più simile tra loro rispetto a quelli dei cani non imparentati [32]. Inoltre, i cani che vivono in famiglia hanno una composizione del microbioma intestinale diversa da quella dei cani che vivono nei rifugi, il che dimostra che l'ambiente di vita ha probabilmente un'influenza importante [17]. Inoltre, la stretta relazione tra animali domestici e proprietari ha influenzato la comunità microbica associata al proprietario. La presenza di un cane all'interno di una famiglia porta generalmente a una maggiore biodiversità microbica della pelle del proprietario rispetto agli esseri umani senza animali domestici [33]. I nostri risultati hanno rafforzato l'idea che la convivenza e la stretta relazione tra animali domestici e proprietari svolgano un ruolo importante nella modulazione del microbiota intestinale con ripercussioni sulla salute di entrambe le parti [34].

Considerando la stretta relazione e l'aumento della frequenza di batteri resistenti agli antibiotici rilevati nell'uomo e negli animali da compagnia, si creano nuove opportunità per il trasferimento interspecie di AMR [35]. Abbiamo studiato la correlazione dell'AMR tra i cani e i loro proprietari nelle famiglie. Dal punto di vista delle famiglie, i cani e i loro proprietari presentavano somiglianze anche nei profili ARG e MGE. Il macrolide, il tipo di ARG più elevato nei cani e nei proprietari, è una delle tre classi di antibiotici più prescritte in medicina umana [36]. Un totale di 18 geni di resistenza alle tetracicline, tra cui *tetX*, che sono gli ARG più diffusi e dominanti e tipici del microbioma intestinale, sono stati rilevati con elevata abbondanza nei cani e nei proprietari. La loro prevalenza nei cani può essere dovuta al fatto che i medici che si occupano di animali da compagnia

preferiscono gli antibiotici per uso umano per la loro migliore qualità e facile disponibilità [37]. Negli animali da compagnia è stato riscontrato un elevato uso di antimicrobici ad ampio spettro e di antimicrobici importanti per la medicina umana [9, 38].

Il microbioma intestinale è un'ampia fonte di ARG e potenziale fonte di batteri patogeni sempre più resistenti [35]. Le ARG possono essere trasferite tra ambienti diversi attraverso batteri specifici; abbiamo utilizzato l'analisi di Procuste per verificare la frequenza di HGT tra le popolazioni batteriche e abbiamo scoperto che gli ARG, gli MGE e le comunità microbiche erano significativamente correlate tra loro. Degli studi precedenti hanno utilizzato principalmente l'analisi di rete per esplorare i potenziali ospiti degli ARG [39]. Tuttavia, questi risultati basati su statistiche matematiche hanno rivelato solo un numero limitato di ospiti di ARG e devono essere ulteriormente convalidati. Recentemente, diversi studi hanno analizzato le ORF degli ARG nei *contig* assemblati [40]. In questa sede, abbiamo individuato i *taxa* microbici significativamente correlati con l'abbondanza della somma di ARG e MGE attraverso l'analisi di correlazione e abbiamo esplorato i potenziali ospiti degli ARG specifici mediante l'annotazione dei *contig* portatori di ARG. Abbiamo scoperto che i *Gamma*proteobacteria e le *Enterobacteriaceae* hanno contribuito a un elevato carico di resistenza e molto probabilmente ospitano la maggior parte degli ARG più abbondanti. Ciò si spiegherebbe con la teoria secondo cui *Gamma*proteobacteria ed *Enterobacteriaceae* sono i motori principali della diffusione di importanti meccanismi di resistenza [11, 41]. I cani, rispetto ai proprietari, presentavano un maggior numero di *Gamma*proteobacteria, comprese le *Enterobacteriaceae*; ciò suggerisce che nell'intestino del cane potrebbero esserci tassi elevati di trasferimento genico con una maggiore abbondanza di questi batteri, in quanto potrebbero promuovere la diffusione degli ARG. In considerazione di ciò, il ruolo dei cani in famiglia come ricettacolo di batteri resistenti è preoccupante.

Gli ARG condivisi hanno rappresentato la maggior parte dell'abbondanza totale di ARG e le categorie che si riferiscono agli ARG condivisi sono preoccupanti a causa della loro preva-

lenza. I nostri risultati suggeriscono che la comunità batterica condivisa ha svolto un ruolo importante nella comparsa di ARG nelle famiglie. Tramite StrainPhlAn3 abbiamo scoperto che *E. coli* era il ceppo condiviso tra i cani e i loro proprietari. Per quanto riguarda gli ARG abbiamo riscontrato che i geni resistenti ai macrolidi e alcuni sottotipi specifici di ARG mostravano una forte correlazione tra cani e proprietari. Diverse classi antimicrobiche utilizzate nell'uomo e negli animali da compagnia sono le stesse, il che porta a una sovrapposizione degli ARG rilevati [42]. L'indagine dei *contig* contenenti ARG e MGE ha rilevato che gli stessi adattamenti erano condivisi da cani e proprietari; ciò suggerisce che questi ARG sono solitamente associati a MGE, importanti per il trasferimento di AMR tra cani e proprietari. I nostri risultati ipotizzano anche la diffusione di ARG e MGE tra cani e proprietari nelle famiglie. I *contig* contenenti ARG hanno avuto il miglior riscontro tassonomico con *E. coli*, indicando che molti ARG trasportati dal ceppo nell'intestino del cane e del proprietario sono mobili. Questo è in linea con la forte correlazione di *E. coli* con la somma totale dell'abbondanza di ARG e MGE. Tuttavia, dato che assemblare delle letture brevi di geni a bassa abbondanza è una sfida tecnica, l'analisi basata sulle annotazioni geniche non può distinguere tra le varianti a livello nucleotidico degli elementi genetici [43-45].

Il *binning* metagenomico consentirà una migliore comprensione della resistenza antimicrobica e fornirà importanti indicazioni sulla mobilitazione degli ARG [22]. Abbiamo anche esplorato l'ospite e la mobilità degli ARG da parte dei MAG recuperati. La famiglia delle *Enterobacteriaceae* ha ospitato la maggior parte degli ARG, il che è coerente con la precedente identificazione dell'ospite batterico degli ARG. Per quanto riguarda la mobilità degli ARG, è stato ampiamente riportato che gli ICE svolgono un ruolo importante come veicoli per il trasferimento di AMR tra specie e generi batterici diversi [46, 47]. Oltre agli ICE, in alcuni MAG portatori di ARG sono stati trovati anche IME trasportati dal cromosoma. In una revisione, gli IME sono stati considerati un probabile serbatoio di ARG [48]. Le MAG

portatrici di più tipi di ARG e di ICE devono destare grande preoccupazione perché possono aumentare la mobilità e il rischio di ARG. Sono necessari ulteriori studi per determinare la causalità e la direzionalità dell'AMR tra i proprietari e questi ultimi. Per prevenire la diffusione dell'AMR all'interno delle famiglie e stabilire una misura efficace per controllare la resistenza è necessario l'impegno congiunto di tutti i settori della società.

10.4 CONCLUSIONE

Per prima cosa abbiamo utilizzato un approccio di assemblaggio e *binning* metagenomico per esplorare la prevalenza e la relazione di ARG e microbioma tra i cani e i loro proprietari. La maggiore abbondanza di *Gammaproteobacteria* ed *Enterobacteriaceae* nei cani può contribuire a una resistenza più elevata nei cani. L'intima relazione tra i cani di proprietà e i loro proprietari ha giocato un ruolo chiave nella modulazione del microbioma e del resistoma intestinale, con ripercussioni sulla salute di entrambe le parti. Dal punto di vista delle famiglie, la comunità batterica condivisa può essere la causa principale della co-occorrenza di ARG nelle famiglie.

10.5 METODI

10.5.1 RACCOLTA DI CAMPIONI

Sono stati raccolti 13 e 16 campioni fecali di cani di proprietà e proprietari da 15 famiglie; il proprietario della famiglia 10 è stato campionato due volte. Per verificare l'impatto del contatto stretto tra cani di proprietà e proprietari sul loro resistoma e microbioma intestinale, abbiamo raccolto 22 campioni fecali di cani da canile, raramente a contatto con l'uomo, da tre canili diversi e 22 dati di sequenza metagenomica di Hadza, una popolazione con scarsa esposizione agli antibiotici e quasi nessun contatto con i cani [49].

[...]

PARTE V

TRAPIANTO DI MICROBIOTA
FECAL-FMT

Una delle tecniche più innovative e più discusse di cambiare il microbiota intestinale è il trapianto fecale o trapianto di microbiota (FMT). Quando infatti gli studi ci hanno iniziato ad illustrare l'enorme ventaglio di famiglie microbiche incluse nel microbiota, ci si è resi conto che un probiotico, per quanto multiceppo, non potrà mai arrivare a coprire una tale variabilità.

Eppure anche per il FMT, non è tutto oro quel che luccica, tanto che in medicina umana al momento i quesiti etici sono spesso montagne insormontabili poste davanti al clinico. La medicina veterinaria in questo senso potrebbe fungere da apripista, avendo meno limitazioni burocratiche e di medicina difensiva, oppure anche per cane e gatto le preoccupazioni sono tali da farci cercare alternative? Questa sezione non cerca di rispondere a questa domanda, ma vuole piuttosto dare gli strumenti ad ogni professionista della salute che nella clinica venga chiamato ad esprimere un parere in merito.

N.d.C.

11 - C'È FUTURO PER IL TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE COME NUOVA STRATEGIA PER LA MODULAZIONE DEL MICROBIOTA INTESTINALE IN MEDICINA UMANA E VETERINARIA?

Tratto e tradotto da

Takáčová, M.; Bomba, A.; Tóthová, C.; Michálová, A.;

Turčína, H. *Any Future for Faecal Microbiota Transplantation as a Novel Strategy for Gut Microbiota Modulation in Human and Veterinary Medicine?* *Life* 2022, 12, 723.



<https://doi.org/10.3390/life12050723>

Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

Le alterazioni nella composizione del microbioma intestinale, note anche come disbiosi, sono il risultato di molti fattori come la dieta, gli antibiotici, lo stress, le malattie, ecc. Attualmente esistono diverse strategie per modulare il microbioma intestinale, come la dieta, l'uso di antimicrobici, prebiotici, probiotici, postbiotici e sinbiotici. Il trapianto di microbiota fecale (FMT) rappresenta un nuovo metodo di modulazione del microbiota intestinale nell'uomo con l'obiettivo di ricostruire il microbioma intestinale del ricevente. In medicina umana, questa forma di batterioterapia è utilizzata con successo nei casi di infezione ricorrente da *Clostridium difficile* (CDI). Il FMT è noto da diversi anni nella medicina dei grandi animali. Nella medicina dei piccoli animali, l'uso del FMT non è una pratica comune.

11.1 INTRODUZIONE

Il trapianto di microbiota fecale descrive un metodo di trasferimento di feci da un individuo sano all'intestino di un ricevente malato tramite clistere, endoscopia, sondino nasogastrico o capsule orali indigeste [1,2,3]. L'obiettivo della terapia è modulare e ripristinare la composizione intestinale del ricevente. Attualmente, questa forma di batterioterapia nell'uomo si attua principalmente in caso di CDI ricorrente che non risponde al trattamento antibiotico [4]. Esistono altre malattie gastrointestinali e non, strettamente correlate alla disbiosi, in cui l'uso del FMT ha un effetto benefico. Nella medicina dei grandi animali, la trasmissione terapeutica del contenuto del ruminante nota come transfaunazione è stata descritta nel XVII secolo [5,6].

Attualmente esistono pochissimi report che descrivono gli effetti benefici del FMT nelle malattie acute e croniche nei piccoli animali, pertanto sono necessarie ulteriori ricerche per mettere in pratica questo metodo.

Lo scopo principale di questa rassegna è quello di riassumere le conoscenze note sul trapianto fecale nella medicina dei piccoli animali, nonché di citare le somiglianze e le differenze con la medicina umana e di evidenziarne i vantaggi, le alternative e il possibile utilizzo in futuro nella gastroenterologia dei piccoli animali.

11.2 MICROBIOMA INTESTINALE

Il tratto gastrointestinale di ogni individuo è popolato da un gran numero di batteri, virus, funghi e protozoi. La comunità di tutti i microrganismi presenti nel tratto digestivo viene definita microbiota, mentre il microbioma intestinale è il genoma collettivo degli organismi [7].

11.2.1 DIVERSITÀ MICROBICA NELLA SALUTE

I batteri hanno una rappresentazione dominante in tutti gli organismi che ospitano il tratto gastrointestinale. La loro abbondanza aumenta man mano che si procede dallo stomaco al colon

[8]. Nello stomaco di un cane sano, la concentrazione batterica varia da 10^1 a 10^6 unità formanti colonie (UFC) per grammo [9]. Nell'intestino tenue, il microbiota intestinale comprende anaerobi, aerobi e anaerobi facoltativi e la concentrazione microbica è di circa 10^2 - 10^6 UFC per grammo. Il colon è occupato principalmente da anaerobi, con una densità batterica di circa 10^{11} UFC per grammo [9,10].

Tuttavia, ogni individuo presenta una composizione microbica individuale; i *phyla* predominanti nel tratto gastrointestinale (GIT) di cani e gatti sani sono *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* [10,11]. Molte specie significative di questa comunità batterica appartengono al phylum *Firmicutes*. I *clostridi* sono la classe batterica più diffusa, con tre cluster di *clostridi*, IV, XI e XIV, che dominano. Oltre ai *Clostridi*, i *Bacilli* e gli *Erysipelotrichi* sono le classi principali all'interno del phylum *Firmicutes* [12,13,14,15]. Nel cane, il phylum *Fusobacteria* è associato a un microbioma canino sano, mentre nell'uomo la presenza di questo phylum è associata a malattie gastrointestinali. Questo fatto indica che *Fusobacterium* ha un ruolo diverso negli animali rispetto agli esseri umani [12,13]. È stato riscontrato che l'abbondanza di *Fusobacterium* aumenta nei cani che vivono all'aperto e in altre specie di carnivori [12,16,17,18,19]. La diversità del microbiota intestinale nei cani sani è presentata nella [Figura 1](#).

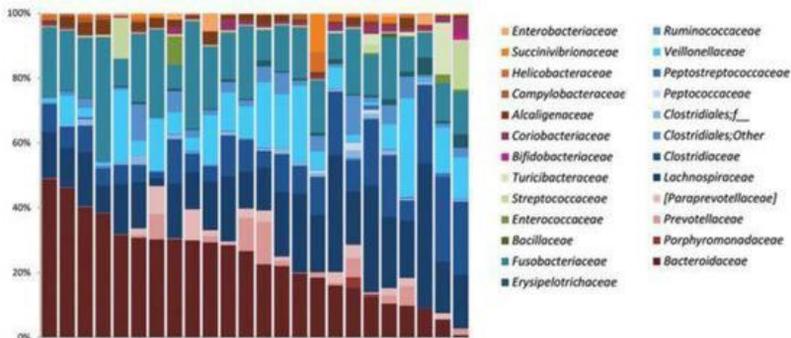


Figura 1. La diversità del microbiota intestinale nei cani sani [14,20]. Ogni colonna rappresenta la composizione del microbiota in un cane sano. Ristampato con il permesso di Suchodolski J [14].

Il microbiota di un individuo umano contiene 10-100 trilioni di cellule microbiche. Sono state identificate più di 1100 specie batteriche e almeno 160 specie per individuo [20,21]. È stato riscontrato che la composizione del microbioma dipende dal sesso, dall'etnia, dall'età, dalla dieta e dalla posizione del tratto gastrointestinale [20,21,22,23,24,25]. I phyla microbici dominanti sono *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*; i due phyla *Firmicutes* e *Bacteroidetes* rappresentano il 90% del microbiota intestinale [26]. Il phylum *Firmicutes* comprende più di 200 generi diversi, come i batteri lattici (LAB), *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Ruminococcus*.

I *Bacteroidetes* comprendono alcuni generi predominanti come *Bacteroidetes* e *Prvotella*. Il phylum degli *Actinobacteria* è meno numeroso ed è rappresentato prevalentemente dal genere *Bifidobacterium* [12,27].

11.2.2 LA FUNZIONE DEL MICROBIOMA INTESTINALE

Il microbioma intestinale svolge un gran numero di ruoli nel mantenimento della salute, ma anche nella patogenesi di molte malattie. Tra tutte le sue funzioni, le più importanti sono la protezione dell'ospite dagli agenti infettivi, il potenziamento della funzione di barriera intestinale attraverso la formazione di giunzioni strette, l'apporto di nutrienti all'ospite e la modulazione del sistema immunitario attraverso l'interazione cellula-cellula (cellule dendritiche, recettori Toll-like) e la produzione di metaboliti microbici come acidi grassi a catena corta (SCFA), acidi biliari (Bas), metaboliti del triptofano e vitamine [28,29]. Alcuni batteri producono anche sostanze antimicrobiche che uccidono direttamente gli enteropatogeni [30]. Grazie alla trasmissione sistemica di questi prodotti e delle cellule generate nell'intestino, gli effetti positivi del microbiota intestinale possono essere rilevati sia localmente che negli organi circostanti. Questo fenomeno viene definito asse intestino-organo, e comprende gli assi intestino-cervello, intestino-pelle e intestino-polmoni [31].

Il microbioma intestinale, un organo a sé stante, partecipa a diverse vie metaboliche [32]. Queste vie metaboliche del microbioma intestinale e i loro effetti sull'ospite sono descritti nella [Tabella 1](#). Un microbioma equilibrato ha un impatto benefico sulla salute dell'ospite. Gli squilibri in alcune di queste vie hanno un effetto dannoso. Le vie più importanti sono i BA, gli SCFA e la via indolica [32].

Nel cane, *Clostridium hiranonis* è la principale specie batterica che converte i BA [33,34]. Questi batteri convertono i BA in BA secondari nel colon del cane (ad esempio, acidi litocolico e desossicolico). Nel colon, i BA secondari hanno diverse funzioni. Agiscono come molecole di segnalazione legandosi ai recettori naturali *G protein-coupled bile acid receptor 1* (GPBAR-1) e mantengono la normale concentrazione di glucosio attraverso il recettore farnesoide X [35]. Inoltre, inibiscono la germinazione delle spore di *Clostridium difficile*, mentre un aumento degli acidi biliari primari (effetto della disbiosi) favorisce la germinazione delle spore batteriche [32]. Una diminuzione degli acidi biliari secondari nel colon si osserva nei cani con enteropatie croniche o dopo trattamento antibiotico [34,36,37]. È causata da una diminuzione di *C. hiranonis*, che porta a un aumento della concentrazione di BA primari, l'eziologia principale della diarrea secretoria [32]. In questi casi, la FMT può ripristinare la *C. hiranonis*, portando a una corretta conversione da BA primario a secondario [34].

Batteri come *Faecalibacterium*, *Turicibacter* e *Ruminococcus* fermentano i carboidrati alimentari in SCFA (butirrato, acetato, propionato) [38]. Questi SCFA rappresentano una fonte significativa di energia e di fattori di crescita per le cellule epiteliali intestinali, agiscono come nutrienti che regolano la motilità intestinale e creano un ambiente inadatto agli enteropatogeni sensibili al pH [39,40]. Gli SCFA hanno anche effetti immunomodulatori. Ad esempio, il butirrato induce le cellule T immunoregolatrici e l'acetato modula efficacemente la permeabilità intestinale [32].

L'indolo, una sostanza formata dalla metabolizzazione dell'aminoacido triptofano, migliora la permeabilità intestinale e au-

menta la produzione di mucina [41]. È stato inoltre dimostrato che l'indolo diminuisce la manifestazione dell'interleuchina 8, rafforza la funzione di barriera intestinale e migliora l'enteropatia indotta da farmaci antinfiammatori non steroidei nei topi [42].

Conseguenze per l'ospite				
Fonte	Gruppo batterico coinvolto	Metaboliti derivati	Conseguenza vantaggiosa	Conseguenza nociva
Carboidrati alimentari	<i>Faecalibacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Blautia</i> [32].	Fermentazione a SCFA (acetato, butirrato, propionato) [38].	Effetto antinfiammatorio. Mantenimento della funzione di barriera intestinale. Regolazione della motilità. Fonte di energia per le cellule epiteliali [38,39].	Fattori di virulenza dell'attivazione degli enteropatogeni (ad esempio, il sistema di secrezione di tipo III di Salmonella) [32].
Acidi biliari primari	Nei piccoli animali, soprattutto <i>C. hiranonis</i> [34].	Trasformazione in BA secondarie nel colon [34].	Effetto antinfiammatorio. Inibizione della crescita (<i>C. difficile</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Escherichia coli</i>). Modulazione della secrezione di glucosio/insulina [35].	Diarrea secretoria causata dalla mancanza di <i>C. hiranonis</i> (ad esempio, enteropatie croniche). Nell'uomo una dieta ricca di grassi, a causa dell'aumento dei BA secondari, rappresenta un rischio elevato di cancro al colon [34,36,37].
Grassi alimentari	<i>C. perfringens</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Propiobacterium</i>) [32].	Conversione in acidi idrossisterarici [32].	Nessuno [32].	Diarrea da acidi grassi [32].
Aminoacido dietetico triptofano	Vari [32].	Metaboliti dell'indolo [43].	Effetto antinfiammatorio. Mantenimento della funzione intestinale [43].	L'indoxil solfato agisce come tossina uremica [32].
Aminoacidi alimentari tirosina e fenilalanina	Vari [32].	P-cresolo [32].	Nessuno [32].	Progressione della malattia renale cronica simile alla tossina uremica [32].
Farmaco micofenolato mofetile	Vari [32].	MPA (acidi del micofenil) e acil glucuronide [32].	Nessuno [32].	Produzione di citochine proinfiammatorie che causano diarrea [32].

Tabella 1. Le vie metaboliche benefiche e dannose del microbiota intestinale e il loro impatto sull'ospite.

11.3 DISBIOSI

La disbiosi intestinale è definita come uno squilibrio nella struttura del microbiota intestinale che può portare ad alterazioni funzionali del proteoma microbico, del trascrittoma o del metaboloma [44]. La disbiosi si manifesta in diverse patologie, sia a livello sistemico che locale, nel tratto gastrointestinale [45]. Diversi fattori influenzano la composizione del microbiota a partire dalla nascita di un individuo, tra cui il tipo e la qualità della dieta consumata dalla madre, la composizione del microbiota intestinale materno, lo stress e l'uso di antibiotici [46]. Oltre a questi fattori, esistono diverse patologie sistemiche o localizzate che hanno un impatto sul microbioma intestinale e sono associate alla disbiosi [46]. La **Tabella 2** descrive le condizioni più comuni che portano alla disbiosi intestinale.

Insufficienza pancreatica esocrina (EPI)	Anomalie anatomiche
La diminuzione della produzione di fattori antimicrobici pancreatici. L'accumulo di substrato non digerito nel lume che porta alla SIBO (crescita batterica dell'intestino tenue) [20,32].	Anelli ciechi Stenosi dell'intestino tenue*Resezione chirurgica della valvola ileo-colica Neoplasia Organismi stranieri [20,32]
Enteropatie croniche	Disturbi della motilità
L'infiammazione intestinale mantiene condizioni aerobiche e variazioni di pH nella mucosa. La riduzione dello strato di muco permette ai batteri di attaccarsi alla mucosa [20,32].	Ipotiroidismo Neuropatia autonoma diabetica Sclerodermia Complessi motori migratori anomali [20,32]
Varie	Diminuzione della produzione di acido gastrico
Diminuzione dell'immunità mucosale ° Antibiotici indotti (ad esempio, tilosina, metronidazolo). Diete ricche di proteine e grassi e povere di fibre (aumentano il <i>C. perfringens</i> e l' <i>E. coli</i>) [20,32].	Gastrite atrofica ° Somministrazione di farmaci antiacidi (H2-bloccanti, omeprazolo) [20, 32]

Tabella 2. Condizioni che possono causare disbiosi intestinale.

Gli individui con disbiosi intestinale mostrano cambiamenti nella diversità delle specie batteriche, nelle loro quantità e anche nella loro funzione, rispetto agli individui sani [32]. Tali cambiamenti nel microbiota portano alla distruzione della barriera intestinale, cosa che aumenta la possibilità di traslocazione di agenti patogeni e lo sviluppo di disturbi. Può venire attivato anche il sistema immunitario, e ciò promuove delle reazioni infiammatorie. Altre conseguenze della disbiosi sono i cambiamenti nella concentrazione dei metaboliti batterici [47]. Ciò significa che il microbioma disbiotico può avere conseguenze negative per l'ospite. Le possibili conseguenze dei principali tipi di disbiosi sono descritte nella [Tabella 3](#). È inoltre dimostrato che la disbiosi è associata all'insorgenza di condizioni attuali come l'obesità, la sindrome metabolica o il diabete mellito (DM) [48]. Sono stati riscontrati cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale non solo negli esseri umani obesi, ma anche negli animali con disturbi endocrini [49,50,51,52,53]. Alcuni studi hanno dimostrato che, nelle persone obese, si verifica una modifica del rapporto tra *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, nonché un aumento delle concentrazioni plasmatiche di batteri e dei loro metaboliti [54,55]. Gli SCFA (compreso il butirrato) prodotti da ceppi di *Clostridiales* (*Roseburia* e *Faecalibacterium prausnitzii*) sono diminuiti nelle persone con diabete di tipo 2, mentre i *Clostridiales* non produttori di butirrato sono aumentati [56]. Oltre alle malattie metaboliche, lo squilibrio microbico è associato anche a diverse altre patologie, come l'asma e le disfunzioni neurologiche [57,58,59,60,61,62].

Tipi di disbiosi	Conseguenze
Immagazzinamento di un substrato anomalo nel lume intestinale (nutrienti non digeriti, farmaci) [32].	Aumento delle specie batteriche, che causano diarrea osmotica/secretoria (conversione degli acidi grassi in acidi idrossistearici, metaboliti del micofenolato motefil) [32].
Interruzione della corretta funzione del microbioma causata dalla mancanza di batteri commensali (<i>C. hiranonis</i>) [47].	Sovracrescita batterica (<i>C. difficile</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>E. coli</i>) causata dalla mancata conversione dei BA primari in secondari. Mancanza di metaboliti microbici antinfiammatori [63].
Aumento del numero totale di batteri, soprattutto nell'intestino tenue [32].	Aumento della produzione di metaboliti microbici con conseguente diarrea osmotica/secretoria. Attivazione di reazioni infiammatorie [32].
Aumento dei batteri aderenti alla mucosa [32].	L'aumento dell'adesione dei batteri alla mucosa intestinale provoca un aumento delle reazioni infiammatorie [32].

Tabella 3. Conseguenze della disbiosi intestinale.

11.3.1 DISBIOSI NEI DISTURBI GASTROINTESTINALI CANINI

La disbiosi intestinale è associata in modo più evidente alle disfunzioni gastrointestinali. La maggior parte dei cani e dei gatti con disturbi gastrointestinali presenta una disbiosi intestinale concomitante [47,64]. Il microbioma intestinale tende a essere alterato sia in condizioni acute che croniche.

Problemi gastrointestinali acuti come la diarrea emorragica acuta (AHDS) e la diarrea acuta non complicata (AD) portano a forti alterazioni della composizione microbica canina con una diminuzione dei batteri produttori di SCFA, come *Firmicutes* e *Actinobacteria*, e un aumento dell'abbondanza di *C. perfringens*, *E. coli* e *Sutterella* [65,66]. Il *C. perfringens* è un commensale dell'intestino e quindi può essere identificato in individui sani [67].

Le IBD (malattie infiammatorie intestinali) sono tra le più comuni malattie croniche dell'intestino associate alla disbiosi intestinale. In questa malattia cronica è stato riscontrato un aumento dei generi aderenti alla mucosa all'interno dei *Proteobacteria* (*E. coli*), mentre *Bacteriodaceae*, *Prevotellaceae*, *Fusobacteria* e *Clostridiales* sono diminuiti [68]. Nello studio che ha descritto la disbiosi luminale canina nelle IBD, si è osservata una diminuzione del numero di *Bacteriodetes* e *Firmicutes* e una maggiore abbondanza di *Actinobabacteria* e *Proteobacteria* [69].

11.3.2 INDICE DI DISBIOSI

Un nuovo approccio, l'indice di disbiosi (DI), è stato stabilito per valutare il microbiota fecale canino [42]. Il saggio qPCR quantifica le abbondanze di sette gruppi batterici: *Faecalibacterium* spp., *E. coli*, *Turibacter* spp., *Fusobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Blautia* spp. e *C. hiranonis* [61], insieme alla conta batterica totale, e li riassume in un unico numero (DI) [42]. Un modello matematico di calcolo del DI è stato descritto da AlShawaqfeh et al. [42]. Gli intervalli di riferimento di questi gruppi batterici sono descritti nella Tabella 4.

	Abbondanza normale	Cambiamenti osservati nei cani con disbiosi
<i>Fecalibacterium</i>	3.4-8.0	diminuito
<i>Turicibacter</i>	4.6-8.1	diminuito
<i>Streptococco</i>	1.9-8.0	aumentato
<i>E. coli</i>	0.9-8.0	aumentato
<i>Blautia</i>	9.5-11.0	diminuito
<i>Fusobacterium</i>	7.0-10.3	diminuito
<i>C. hiranonis</i>	5.1-7.1	diminuito
Indice di disbiosi	<0 normale 0-2 equivoco >2 disbiosi	[42,64]

Tabella 4. Intervalli di riferimento delle abbondanze dei 7 gruppi batterici e del DI finale. Nota: i dati sono espressi in logDNA/grammo di feci.

Il DI deve essere sempre interpretato insieme all'abbondanza dei singoli taxa. Un DI inferiore a 0 rappresenta un microbiota normale. Un DI compreso tra 0 e 2 è equivoco e indica un cambiamento minore nel microbiota. In questi casi, la valutazione dei campioni di *follow-up* può essere effettuata a distanza di qualche settimana. Un DI > 2 indica una disbiosi del microbiota. La maggior parte di questi cani presenta una diminuzione dell'abbondanza di batteri sani di *C. hiranoni*, come risultato della conversione anomala degli acidi biliari primari in secondari. La perdita di acidi biliari secondari è un fattore scatenante significativo per lo sviluppo della disbiosi nei cani [64].

Un aumento del DI, insieme a una diminuzione di *C. hiranonis*, è stato notato nei cani trattati con antibiotici (metronidazolo, tilosina), in modo simile ai cani con EPI e enteropatie croniche [33,34,64], mentre i cani che assumono inibitori della pompa protonica (omeprazolo) o diete a base di cibi crudi (BARF) presentano un aumento del DI con un'abbondanza di *C. hiranonis* che risulta normale [70,71]. Oltre a determinare quale microbiota è normale, il DI può essere utilizzato per analizzare i cambiamenti nella composizione microbica nel tempo o in risposta a trattamenti come l'FMT (Figura 2).

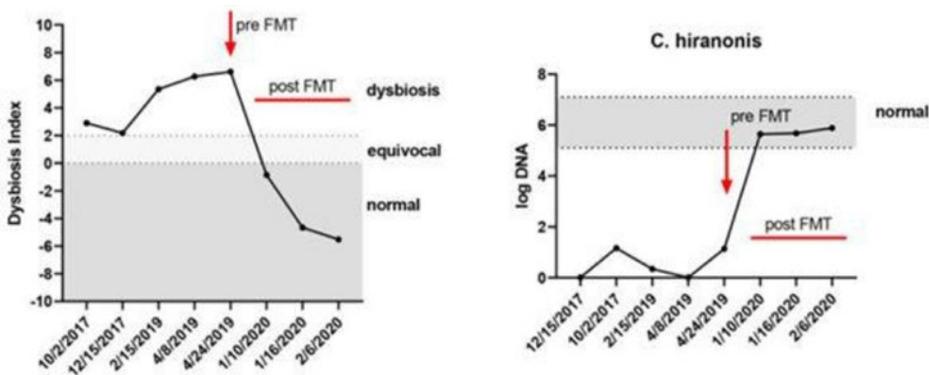


Figura 2. Un cane con disbiosi persistente e infezione ricorrente da *C. difficile*. Dopo l'FMT, l'indice di disbiosi si è normalizzato e l'abbondanza di *C. hiranonis* è aumentata. Il cane è risultato successivamente negativo per il *C. difficile* [32] Da articolo con licenza CC BY-NC-ND, non sono state apportate modifiche.

11.4 MODULAZIONE DEL MICROBIOMA

Se la disbiosi è un fattore chiave nella patogenesi di molte malattie gastrointestinali e sistemiche, il recupero della composizione del microbiota intestinale è un obiettivo terapeutico cruciale. Al momento esistono diverse possibilità tramite cui può essere modificato il microbioma intestinale, quali dieta, antimicrobici, prebiotici, probiotici, postbiotici, sinbiotici o FMT. Ognuna

di queste forme ha un diverso meccanismo d'azione con effetti benefici e possibili effetti collaterali [32]. La **Tabella 5** presenta i tipi più comuni di modulazione del microbiota intestinale nel cane e nell'uomo.

Tipo di modulazione	Meccanismo	Effetti collaterali
Dieta	Una dieta altamente digeribile riduce l'accumulo di substrato non digeribile nel lume intestinale [72,73].	Solo in caso di ipersensibilità alimentare o di alimenti difficilmente digeribili [32].
Prebiotici	Produzione di SCFA per la crescita di batteri benefici, legame di metaboliti batterici deleteri (ad esempio, lo psillio ha proprietà leganti il BA) [39,70].	A volte flatulenza, diarrea [32].
Probiotici	Miglioramento della funzione di barriera, effetto immunomodulante e antimicrobico [74].	Raro [32].
Sinbiotici	Prodotti che contengono probiotici e prebiotici.	
Antibiotici	Riduzione della carica batterica totale, soppressione della stimolazione immunitaria e conversione dei metaboliti tossici [66,67].	Cambiamenti a lungo termine nella composizione del microbiota Rischio di resistenza antimicrobica [32].
Postbiotici	Effetti immunomodulatori, antinfiammatori, antiossidanti e antitumorali [30].	Raro [30].
FMT	Ricostruzione della composizione microbica e di alcuni metaboliti di origine microbica [32].	Diarrea, flatulenza, gonfiore, febbre, vomito [2,3].

Tabella 5. Tipi di modulazione del microbiota intestinale.

11.4.1 REGOLAZIONE ALIMENTARE

La regolazione della dieta dovrebbe essere sempre prevista per la modulazione del microbiota intestinale. L'effetto si basa sulla capacità di una dieta altamente digeribile di ridurre la quantità di substrato non digerito nel lume intestinale che porta alla crescita batterica. Inoltre, la sostituzione della dieta con una nuova proteina o con una proteina idrolizzata determina una riduzione della risposta infiammatoria [72,73].

Sonnenburg et al. hanno scoperto che, nell'uomo, una dieta moderna a basso contenuto di fibre porta alla perdita della diversità microbica nel corso delle generazioni [75,76,77]. Nel corso dei decenni, le persone hanno cambiato le loro abitudini

alimentari. Il cibo raccolto è stato trasformato in cibo agricolo, per poi passare al consumo di massa di alimenti trasformati. Ogni cambiamento nella dieta ha portato a cambiamenti nel microbiota [77,78]. Questi cambiamenti portano a un aumento di disturbi come IBD, IBS (sindrome dell'intestino irritabile), malattie cardiovascolari e disturbi metabolici come obesità, insulino-resistenza, diabete di tipo 2 e malattia del fegato grasso non alcolica (NAFLD) [77].

Dominika et al. hanno indicato che vari componenti della dieta influenzano la diversità del microbiota. Ad esempio, il consumo di siero di latte riduce i batteri patogeni *C. perfringens* e *Bacteroides fragilis*, mentre gli estratti proteici di siero di latte e pisello determinano un aumento del genere commensale dei batteri lattici e del *Bifidobacterium* [79,80].

È stato riscontrato che il consumo di una dieta ad alto contenuto di grassi aumenta la percentuale di *F. prausnitzii*, mentre è stato dimostrato che una dieta a basso contenuto di grassi aumenta l'abbondanza fecale di *Bifidobacterium* [81].

Gli acidi grassi polinsaturi omega-3 (omega-3 PUFA), come l'acido docosaesaenoico (DHA), l'acido eicosapentaenoico (EPA), l'acido alfa-linolenico (ALA) e l'acido docosapentaenoico (DPA), non possono essere sintetizzati dal corpo umano e devono quindi essere assunti con la dieta [82]. Una dieta ricca di PUFA omega-3, come frutti di mare, pesci d'alto mare (salmon, sgombro, sardine), noci e semi, ha diversi effetti benefici sul microbiota intestinale [83]. Il consumo di una dieta di questo tipo porta a una diminuzione della crescita degli *Enterobatteri* e a un aumento della crescita dei *Bifidobatteri* [84,85]. Inoltre, il consumo di omega-3 PUFA porta a un aumento della produzione di mediatori antinfiammatori e all'inibizione di quelli pro-infiammatori, con un effetto positivo sulla modulazione del microbioma [82]. L'effetto positivo dei PUFA omega-3 è dovuto anche all'aumento della produzione di SCFA come il butirrato, una fonte di energia essenziale per i colonociti [86]. Non va dimenticato che un rapporto inadeguato tra omega-3 e omega-6

determina un aumento del rapporto tra *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, con conseguente sviluppo di obesità e NAFLD [81].

11.4.2 PREBIOTICI

I prebiotici sono definiti come “ingredienti alimentari non digeribili” (fibre alimentari o carboidrati) che influiscono positivamente sull’ospite stimolando selettivamente la crescita e/o l’attività di una o di un numero limitato di specie batteriche [42,87].

Possiamo dividere i prebiotici in fermentabili e non fermentabili. Il primo gruppo è costituito da quei prebiotici che possono essere fermentati dai batteri del colon in SCFA, con una serie di benefici per la salute [39,88]. I prebiotici fermentabili, tra cui lo psillio, la pectina, il guar e i frutto-oligosaccaridi, promuovono anche la crescita di batteri specifici (ad esempio, *lactobacilli* e *bifidobatteri*) [39,87]. Anche lo psillio, una fibra alimentare solubile e fermentabile, contribuisce al metabolismo dei BA legandoli al lume intestinale [88]. La dose per i cani varia da 0,5 a 1 g/kg di peso corporeo [32].

11.4.3 I PROBIOTICI

L’Organizzazione Mondiale della Sanità definisce i probiotici come “microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio alla salute dell’ospite” [89,90]. Possono essere regolamentati come integratori alimentari, alimenti medici o farmaci.

Esistono diversi meccanismi importanti alla base degli effetti antagonisti dei probiotici su vari microrganismi, tra cui i seguenti:

- Potenziamento della barriera epiteliale;
- Aumento dell’adesione alla mucosa intestinale;
- Inibizione dell’adesione dei patogeni;
- Esclusione competitiva di microrganismi patogeni;
- Produzione di sostanze anti-microrganismi come acidi organici, defensine [41,61,62] o tossine specifiche per i patogeni [66];
- Modulazione del sistema immunitario [91].

Nell'uomo, i probiotici sono principalmente batteri lattici e *Bifidobacterium* e comprendono molti ceppi diversi come *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium animalis* [79,92]. Stanno diventando sempre più popolari le miscele tra questi ceppi, dato che i ricercatori stanno approfondendo la comprensione dell'aumento dell'efficacia attraverso possibili effetti additivi o sinergici [93].

Alcuni studi su modelli umani e animali dimostrano il potenziale clinico dei probiotici contro molte malattie [94]. È stato riportato che i probiotici sopprimono la diarrea [89,95], alleviano l'intolleranza al lattosio [96] e le complicazioni post-operatorie [97], mostrano attività antimicrobiche [98] e anti-cancro del colon [99,100], riducono i sintomi dell'intestino irritabile [101] e prevencono le malattie infiammatorie intestinali [89,102]. Inoltre, i *bifidobatteri* e i *lattobacilli* sono stati utilizzati con successo per la prevenzione profilattica della diarrea del viaggiatore [103]. I probiotici hanno dato buoni risultati nel ridurre l'infiammazione e nel regolare l'immunità innata e le relative vie di segnalazione [94].

Con i piccoli animali i probiotici sono utilizzati in caso di malattie acute e croniche del sistema gastrointestinale. Uno studio riporta un significativo miglioramento clinico e una riduzione della mortalità nei cani affetti da enterite parvovirale in cui è stata utilizzata una miscela di LAB (batteri lattici) disponibile in commercio con la formulazione "de Simone" (*Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaris*), *acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* spp. *thermophilus*) viene aggiunta per via orale al trattamento standard rispetto al solo trattamento standard [104,105]. Nella sindrome di diarrea emorragica acuta associata a sovracrescita di *C. perfringens*, la miscela probiotica LAB "de Simone" ha ridotto la gravità clinica e aumentato l'abbondanza fecale di marcatori batterici intestinali (ad es. *Faecalibacterium* sp.), mentre i *C.*

perfringens sono stati ridotti [106]. Nei cani con gastroenterite acuta idiopatica è stata riportata una durata più breve della diarrea e un migliore punteggio fecale dopo 1-3 settimane di trattamento in seguito all'applicazione orale di *B. animalis*.

I benefici dei probiotici o dei sinbiotici sono stati studiati anche nelle condizioni croniche del tratto gastrointestinale di cani e gatti. In uno studio, la miscela di LAB "de Simone" è stata somministrata a cani con IBD (che erano refrattari al trattamento dietetico e antibiotico). Questo studio ha confermato che, per ridurre i segni clinici e le cellule infiammatorie nei biopati duodenali, il trattamento probiotico non era inferiore al trattamento standard, costituito da una combinazione di metronidazolo e prednisolone, [107,108,109,110].

Nei gatti, i probiotici sono stati utilizzati in caso di *Tritrichomonas fetus* cronico e costipazione cronica [107,111,112]. Nel caso dell'infezione da *Tritrichomonas*, non è stato osservato alcun miglioramento clinico, ma ha ridotto significativamente le ricadute [107]. È stato anche dimostrato che l'uso di probiotici LAB nella stipsi cronica felina e nel megacolon idiopatico porta a un miglioramento clinico [111].

Attualmente sono sempre più numerosi i report che mettono in dubbio l'efficacia e la sicurezza dei probiotici, soprattutto nei pazienti ad alto rischio. Per questo motivo cresce l'interesse per un nuovo gruppo di preparati: i postbiotici [113,114,115].

11.4.4 POSTBIOTICI

Postbiotici è un termine relativamente nuovo che è stato creato per indicare i prodotti metabolici non vitali dei probiotici che agiscono sull'attività biologica dell'ospite. Alcuni ricercatori ritengono che i postbiotici siano responsabili di molti degli effetti benefici dei probiotici [116]. Secondo Tsilingiri et al., i postbiotici comprendono qualsiasi sostanza prodotta dall'attività metabolica del microrganismo che apporta benefici diretti o indiretti all'ospite [117]. Sebbene i postbiotici non includano microrganismi vivi, mostrano delle proprietà benefiche attraverso percorsi

simili a quelli osservati nei probiotici, ma con un rischio minore di effetti collaterali. Al momento le classi di postbiotici disponibili comprendono molti costituenti diversi, tra cui metaboliti, SCFA, frazioni di cellule microbiche, proteine funzionali, polisaccaridi extracellulari (EPS), lisati cellulari, acido teicoico, muuropeptidi derivati da peptidoglicani e strutture di tipo pili [46].

Il meccanismo d'azione dei postbiotici si basa sull'effetto pleiotropico, che comprende proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, immunomodulanti e antitumorali [30]. Grazie a queste qualità, i postbiotici possono essere utilizzati nel trattamento o nella profilassi di molte patologie, comprese quelle per le quali non è ancora stato trovato un trattamento efficace (ad esempio, IBD, malattia di Alzheimer o sclerosi multipla) [117].

Attualmente si parla dell'uso di postbiotici nella prevenzione e nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2, poiché la struttura e l'attività metabolica del microbioma intestinale possono essere correlate alla comparsa di biomarcatori che predicono il decorso della malattia da coronavirus grave (COVID-19) [118].

11.4.5 ANTIBIOTICI

L'uso di antibiotici (ad esempio, metronidazolo, tilosina) nelle malattie gastrointestinali croniche porta alla soppressione dei sintomi clinici. La ricaduta dopo la fine del trattamento può essere spiegata dal fatto che gli antibiotici riducono la carica batterica e migliorano i sintomi clinici [119]. Dopo un ciclo di antibiotici, i batteri ricrescono, il che porta a una ricaduta dei sintomi clinici [76,120]. L'interruzione del trattamento antibiotico causa anche cambiamenti nella composizione del microbiota che durano mesi. Nei cani, l'uso di metronidazolo porta a un aumento di *E. coli* e alla riduzione dei batteri benefici, mentre nei gatti l'uso di amoxicillina-acido clavulanico causa una diminuzione della diversità delle specie microbiche [34,64,121]. A causa di questi effetti collaterali negativi, il trattamento antibiotico dovrebbe essere raccomandato solo nei casi cronici, quando le prove antinfiammatorie e dietetiche hanno fallito [32].

Dato che la resistenza agli antimicrobici sta diventando un problema sempre più comune in medicina umana, in medicina veterinaria si è registrata una tendenza crescente a promuovere un uso appropriato e attento degli antibiotici [122,123,124]. Gli antibiotici utilizzati per via orale possono provocare lo sviluppo di ceppi resistenti nel tratto gastrointestinale, nonché la resistenza incrociata ad altri farmaci antimicrobici [125]. Secondo Gongora et al., il trattamento orale con amoxicillina o amoxicillina/acido clavulanico determina un aumento della percentuale di *E. coli* resistenti all'ampicillina durante il trattamento e un aumento della presenza e della percentuale di *Enterococchi* resistenti all'ampicillina durante e dopo il trattamento [126]. A causa della crescente resistenza antimicrobica, l'uso del metronidazolo per trattare l'infezione protozoaria da giardiasi non è più efficace come in passato [127,128]. A causa di questi effetti collaterali negativi, il trattamento antibiotico dovrebbe essere raccomandato solo nei casi cronici, quando gli antinfiammatori e le diete hanno fallito [32].

11.5 FMT

Uno dei nuovi metodi di modulazione del microbiota intestinale è il “trapianto di microbiota fecale”. Per FMT si intende la somministrazione di una soluzione di materia fecale da un donatore nel tratto intestinale o nel ricevente principalmente per modificare la composizione microbica del ricevente [129,130]. Questa procedura può essere eseguita mediante duodenoscopia, sondino nasogastrico/naso-giunale, colonscopia, clistere o ingestione di capsule orali [1,2].

11.5.1 LA STORIA

Il trasferimento di materiale gastrointestinale non è un metodo nuovo in medicina veterinaria. Nel regno animale il consumo di feci, chiamato coprofagia, è osservato in molte specie [131,132,133]. Grazie a questo processo, il tratto gastrointestinale si sviluppa, aumenta la resistenza alla colonizzazione degli agenti

patogeni e migliora l'assorbimento della nutrizione [4]. Il trasferimento terapeutico del contenuto del ruminale (transfaunazione) è stato descritto in Europa nel XVII secolo [5,6]. L'indicazione per questo processo terapeutico era l'acidosi ruminale nei bovini e negli ovini e la diarrea cronica nei cavalli. È stata utilizzata anche per aumentare la resistenza dei pulcini appena nati agli agenti patogeni enterici [134,135,136].

Nell'uomo, il metodo del FMT è noto in Cina fin dal IV secolo d.C. [3]. La medicina cinese comprende varie forme di FMT, tra cui prodotti freschi, essiccati, fermentati e prodotti per l'infanzia che sono stati utilizzati per molti disturbi gastrointestinali [64]. In Europa, il medico tedesco Franz Christian Paullini osservò che, da quando il letame era usato come fertilizzante, il consumo di feci era comune nell'uomo e negli animali. Nel 1696, pubblicò anche il libro *Hailsame Dreck Apotheke (Farmacia della sporcizia salutare)*, in cui descriveva gli usi medici delle feci umane e animali [137].

Nel 1958, l'équipe di Ben Eiseman ha presentato un report che descriveva il successo del trattamento di quattro pazienti con colite pseudomembranosa causata da *C. difficile* mediante clisteri fecali. In questo studio, questa condizione era dovuta all'uso di antibiotici, cosa che portava alla soppressione della popolazione microbica nativa che fornisce protezione contro gli agenti patogeni [138]. I ricercatori si aspettavano che la procedura venisse standardizzata e testata in studi clinici. Tuttavia, l'efficacia della vancomicina per il trattamento della colite pseudomembranosa è stata presto confermata [138,139].

In medicina umana non ci sono dubbi sull'effetto benefico nei pazienti con CDI, ma cosa sappiamo dei suoi effetti e del suo potenziale utilizzo in medicina veterinaria?

11.5.2 MECCANISMO D'AZIONE DEL FMT

Il meccanismo d'azione nel microbiota intestinale non è ancora stato chiaramente identificato. I benefici cruciali del FMT nei pazienti con CDI includono un aumento della diversità delle

specie batteriche e un cambiamento dei profili microbici verso quelli dei donatori sani [137,140].

È noto che i pazienti con CDI presentano una disbiosi intestinale caratterizzata da livelli più elevati di specie di *Proteobacteria* e livelli più bassi di specie di *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. La somministrazione di FMT può favorire le comunità di *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e ridurre i *Proteobacteria* [141].

Oltre a creare condizioni meno favorevoli alla crescita di *C. difficile* fornendo batteriocine, la somministrazione di materiale fecale innesca un meccanismo noto come esclusione competitiva dei patogeni [137]. Questo meccanismo vede il ripristino della prevalenza degli acidi biliari secondari su quelli primari nelle feci [137,140]. È stato dimostrato che gli acidi biliari primari stimolano la germinazione delle spore, mentre gli acidi biliari secondari sono potenti inibitori della germinazione delle spore [20]. Un'elevata concentrazione di acidi biliari secondari porta alla competizione del *C. difficile* per i nutrienti e a un ambiente sfavorevole alla sua crescita [137]. Vale la pena ricordare che la modulazione del microbiota intestinale da parte delle feci trapiantate porta a un aumento dell'utilizzo dell'acido sialico da parte dei batteri commensali. Tale utilizzo determina una carenza della fonte energetica di carboidrati per *C. difficile* [142].

Grazie alla secrezione di mucina, il materiale fecale trapiantato contribuisce a ristabilire l'integrità della barriera intestinale [140]. Inoltre, la somministrazione di materiale fecale è utile per modulare la risposta immunitaria della mucosa e ridurre la risposta infiammatoria dovuta alla produzione di specie batteriche produttrici di butirato [140,143,144]. È anche probabile che gli effetti favorevoli siano sostenuti dai batteriofagi presenti nelle feci del donatore [144].

11.5.3 FORME DI APPLICAZIONE

Esistono diverse vie di somministrazione di FMT, come la colonscopia, l'infusione naso-gastrica, duodenale e digiunale, il clistere o l'ingestione di capsule orali [145,146,147]. Ognuno di

questi metodi presenta alcune limitazioni, ad esempio il rischio di vomito e polmonite da aspirazione durante la somministrazione del sondino naso-gastrico, la difficoltà di trattenere la sospensione somministrata per il clistere o il rischio di perforazione dei tessuti per l'infusione digiunale e la colonscopia [148].

Le capsule orali sono state introdotte per colmare le limitazioni e le lacune riscontrate in precedenza in altri metodi di somministrazione del FMT. Non sono invasive, sono le più economiche e sono la modalità di somministrazione più facile da conservare. L'utilizzo di questa forma di FMT elimina diversi rischi procedurali riscontrati in altre vie di trattamento. Kao et al. hanno dimostrato che le capsule orali sono un approccio efficace nel trattamento della rCDI (infezione refrattaria da *Clostridioides difficile*) come colonscopia [2]. La somministrazione di queste capsule è associata a effetti collaterali, tra cui vomito, aspirazione e mancato raggiungimento del bersaglio intestinale [147,149].

Il FMT può essere di due tipi. Il primo è il trapianto autologo che utilizza le feci del paziente stesso, raccolte prima di qualsiasi trattamento. Questa forma di trasferimento delle feci viene utilizzata con successo per ripristinare la composizione del microbiota distrutto dall'uso di antibiotici durante il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche [149,150]. Il secondo tipo prevede il FMT allogenico, ovvero l'uso di un campione fecale di un donatore sano correlato o non correlato [151]. Il trapianto allogenico è risultato molto efficace in caso di rCDI [152].

11.5.4 RACCOMANDAZIONI PER L'USO DEL TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE NELL'UOMO E NEL CANE

11.5.4.1 Selezione del donatore nell'uomo

Con il crescente successo del FMT nel trattamento di varie malattie, è aumentata la richiesta di standardizzare la preparazione del materiale fecale, utilizzando standard accettati per la consegna, garantendo la sicurezza per il donatore e il ricevente.

In medicina umana, i donatori fecali sono volontari sani sottoposti a procedure di screening molto rigorose per evitare la diffusione di malattie infettive o di altro tipo e per garantire il trapianto di un microbioma fecale e di un metaboloma desiderabili [153]. Le feci dei donatori provengono da due fonti: donatori diretti dai pazienti e donatori universali attraverso le banche delle feci [154,155]. I donatori diretti dal paziente sono identificati dai riceventi e comprendono familiari o amici. L'uso di donatori universali è emerso come il metodo più utilizzato negli Stati Uniti d'America. I donatori universali sono volontari sani, giovani e con un indice di massa corporea normale, in grado di fornire le feci dopo un esame [148].

Il colloquio preliminare e gli esami di laboratorio sono due fasi cruciali nello screening dei potenziali donatori [156]. La prima serie di domande esamina una serie di variabili di rischio per ridurre la probabilità di trasmettere patogeni infettivi o specie batteriche avverse [157]. Ai potenziali donatori vengono chieste le abitudini alimentari, la storia dell'uso recente di farmaci (antimicrobici, corticosteroidi, inibitori della pompa protonica, farmaci chemioterapici) e la storia di malattie (diabete, cancro, obesità, allergie, disturbi gastrointestinali, autoimmuni, cardiovascolari o psichiatrici) [157,158]. Il donatore ottimale corrisponde a un individuo giovane (preferibilmente con meno di 50 anni).

I donatori con una buona anamnesi devono essere sottoposti a esami del sangue e delle feci per escludere malattie infettive che possono essere trasmesse con le feci [156]. Ogni candidato viene sottoposto all'analisi di un emocromo completo, che comprende un pannello ematologico e biochimico, e alla sierologia per malattie infettive come il virus dell'epatite e dell'immunodeficienza umana [1,157]. L'esame delle feci comprende i comuni patogeni enterici come il *C. difficile*, i parassiti fecali e l'antigene dell'*Helicobacter pylori* (quest'ultimo esame solo per la via superiore dell'FMT) [157].

A causa dell'emergere della pandemia di COVID-19, un gruppo di esperti mondiali ha proposto di aggiungere il test SARS-CoV-2 utilizzando tamponi nasofaringei o la rilevazione

dell'RNA delle feci [159]. Infine, il candidato viene accettato come donatore di feci se i test ematici e fecali sono negativi [157].

11.5.4.2 Selezione dei donatori nei cani

In medicina canina non esistono molti studi sui protocolli di screening per i donatori canini. Chaitman e Gaschen hanno introdotto criteri generali di screening per garantire che le feci utilizzate per il FMT fossero sicure e di qualità ottimale per il ricevente [153]. Questi criteri di selezione sono riassunti nella **Tabella 6**.

Anamnesi ed esame fisico
Età compresa tra 1 e 10 anni;
Nessun precedente di viaggio al di fuori dell'area locale;
Nessuna storia di malattie gastrointestinali croniche, cancro, allergie o malattie autoimmuni;
Stato di buona salute negli ultimi 6-12 mesi;
Nessun antibiotico negli ultimi 12 mesi;
Peso ottimale (non sovrappeso o sottopeso);
Alimentazione equilibrata;
Consistenza fecale normale;
Si raccomanda di somministrare ai donatori canini una dieta idrolizzata per diverse settimane prima e durante il prelievo [153,160].
Screening di laboratorio
Nessun cambiamento significativo nel profilo ematologico e biochimico;
Valore normale di enzimi pancreatici, immunoreattività pancreatica e immunoreattività tripsina-simile);
Concentrazione sierica ottimale di cobalamina e folati (= test delle funzioni intestinali);
Nessuna presenza di endocrinopatia (concentrazioni sieriche di cortisolo, tiroxina e TSH);
Negativo per i parassiti fecali;
Negativo per i patogeni fecali (<i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp., ecc.) [153,160].
Valutazione del microbiota fecale
Indice di disbiosi fecale inferiore a 0 [42].

Tabella 6. Criteri di selezione raccomandati per i donatori di feci canine.

11.5.4.3 Preparazione e somministrazione della soluzione fecale

In medicina umana, si raccomanda di utilizzare un campione di feci fresche entro sei ore dalla defecazione. Le feci devono essere mantenute a temperatura ambiente durante questo periodo. Per proteggere i microrganismi anaerobi, la preparazione deve essere effettuata il prima possibile. Il materiale fecale (50 g) viene mescolato con una soluzione salina sterile (0,9%) (250 mL) con un frullatore o a mano, quindi omogeneizzato e filtrato per evitare l'intasamento della siringa di infusione [160]. In alcuni studi, l'acqua è stata utilizzata con successo come solvente per il materiale fecale [161,162,163]. Secondo alcuni studi hanno un'efficacia simile per il trattamento di rCDI gli FMT eseguiti con campioni fecali freschi e congelati [163,164].

Prima del congelamento si aggiunge del glicerolo come crioprotettore alla concentrazione finale del 10%. La soluzione fecale finale deve essere conservata a -80°C. Per i trapianti individuali nelle persone sono stati utilizzati vari volumi (~ 300-700 mL) di infusioni fecali. Il giorno dell'infusione fecale, la sospensione fecale deve essere scongelata a bagnomaria (37 °C). Dopo lo scongelamento, si può aggiungere una soluzione salina per ottenere il volume di sospensione desiderato. Il materiale fecale scongelato deve essere infuso entro 6 ore dallo scongelamento [165].

Negli studi sull'uomo, sono state utilizzate con successo delle capsule contenenti le feci di donatori per fornire il microbiota desiderato per persona. Questa potrebbe essere una via di somministrazione alternativa per i veterinari [160].

In medicina veterinaria, esistono protocolli molto simili. Per la procedura di FMT si utilizzano in genere da venti a cento grammi di feci del donatore, entro 6-12 ore dalla defecazione. Quindi, 1 volume di feci viene mescolato con 4 volumi di NaCl allo 0,9% e filtrato. Si aggiunge quindi glicerolo alla concentrazione finale del 10% e si conserva a -80 °C [1,2].

11.5.5 USI RECENTI DEL FMT NEI PICCOLI ANIMALI

Non ci sono molti report che descrivono l'effetto del FMT nella medicina dei piccoli animali [153]. Burton et al. hanno cercato di prevenire la diarrea post-svezzamento nei cuccioli mediante la somministrazione orale dell'inoculo fecale. In questo caso, non è stato notato alcun miglioramento clinico [166]. In un altro studio, i ricercatori hanno cercato di aumentare la sopravvivenza dei cuccioli con infezione da parvovirus combinando il trattamento standard con il FMT. Questo studio non ha migliorato in modo significativo la sopravvivenza, ma il tempo di ospedalizzazione è stato più breve e la risoluzione della diarrea è stata ridotta a due giorni [167].

Chaitman et al. hanno condotto uno studio confrontando l'applicazione orale per 7 giorni di metronidazolo (15 mg/kg q 12 h) con la somministrazione di materiale fecale tramite clistere in cani con diarrea non infettiva non complicata. Sebbene la consistenza delle feci fosse migliorata dopo una settimana di cura in entrambi i gruppi, solo nei pazienti trattati con FMT sono state osservate feci più solide al 28° giorno. L'indice di disbiosi fecale non è migliorato nella maggior parte dei pazienti trattati con metronidazolo, mentre si è normalizzato dopo una settimana nella maggior parte dei cani trattati con FMT [34,42].

Si è verificato un aumento della diversità batterica fecale di batteri benefici come *C. hiranonis* e *Faecalibacterium* e una diminuzione di *E. coli*, ma solo nei cani trattati con FMT [64].

Un caso di barboncino toy affetto da IBD refrattaria ha confermato l'effetto positivo del FMT anche in caso di malattie croniche. Questo cane ha ricevuto nove FMT tramite clistere. Dopo un periodo di 6 mesi, l'indice di attività clinica delle IBD e la consistenza delle feci del cane sono migliorati [168].

Un altro studio ha descritto un bulldog francese di 8 mesi con colite cronica e coltura fecale positiva per *C. difficile*. Questo cane ha ricevuto una singola dose orale di FMT. La frequenza della defecazione e la consistenza delle feci sono migliorate significativamente dopo 2 o 3 giorni. Non sono state osservate ricadute per almeno 6 mesi [167].

Secondo Chaitman et al., la somministrazione di un singolo FMT in cani con diarrea acuta (AD) sembra avere molto successo [34]. L'uso di un FMT al posto degli antibiotici permette di prevenire alcune conseguenze negative come la riduzione della diversità microbica, i cambiamenti in taxa batterici specifici, l'abbondanza e il cambiamento metabolico [34,153]. Il FMT mostra risultati promettenti anche come trattamento per cani con malattie croniche come enteropatie croniche o insufficienza pancreatica esocrina. Purtroppo, il miglioramento dopo pochi giorni dall'applicazione di un trapianto fecale è spesso seguito da ricadute. Pertanto, nella maggior parte delle situazioni possono essere necessari numerosi FMT [34].

Oggi, nella pratica dei piccoli animali, il FMT ha il potenziale per migliorare la salute nelle malattie acute e croniche associate alla disbiosi. Poiché esistono pochi studi sul suo utilizzo, la sua standardizzazione richiede ulteriori ricerche.

11.5.6 ESPERIENZA CON IL TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE NELLE PERSONE

In medicina umana il trapianto di microbiota fecale rappresenta il mezzo più efficace per manipolare il microbioma gastrointestinale a scopi terapeutici. Questa tecnica è ora il trattamento privilegiato per l'infezione ricorrente da *Clostridioides difficile* (rCDI), potenzialmente letale [2,5]. Il *C. difficile*, bacillo Gram-positivo, anaerobio, formante spore e produttore di tossine, è causa di infezioni nosocomiali e provoca segni clinici che vanno da una lieve diarrea acquosa a una malattia grave chiamata colite pseudomembranosa [169,170]. Il FMT si è diffuso durante l'epidemia di CDI, dove ha raggiunto tassi di successo prossimi al 100%. Durante l'apice dell'epidemia, la CDI è stata responsabile di circa 30.000 decessi [162]. In questi casi difficili da trattare, il FMT ha raggiunto tassi di guarigione >90% [171].

Sebbene il *C. difficile* sia originario dell'intestino distale, la sua crescita e attività patogena sono normalmente inibite dal microbiota commensale [4]. L'infezione si verifica più frequen-

temente quando i pazienti ricevono antibiotici che alterano i normali batteri intestinali, consentendo la crescita eccessiva di *C. difficile* [172]. Nei pazienti con rCDI, la diversità batterica è notevolmente ridotta. L'abbondanza di *Firmicutes* e *Bacteroidetes* è ridotta, mentre i membri della famiglia *Enterobacteraceae* dei *Gammaproteobacteria* sono aumentati nei campioni fecali di questi pazienti. L'FMT ripristina una composizione del microbiota intestinale simile a quella del donatore, dominata da *Bacteroidetes* e *Firmicutes* e da una quantità ridotta di *Gammaproteobacteria* [173,174,175].

Sono disponibili poche informazioni sui meccanismi con cui *C. difficile* sopprime dei membri specifici del microbiota. L'esclusione competitiva dalla nicchia è il meccanismo classico, che si basa su principi ecologici. Il principio di questo meccanismo è la competizione per quantità limitate di nutrienti. Questo meccanismo può essere utilizzato per la prevenzione o il trattamento della CDI, utilizzando il *C. difficile* non tossigeno (NTCD), che protegge dal *C. difficile* tossigeno [176]. Esistono anche batteri che inibiscono la crescita o l'attività tossigena producendo fagi o peptidi antimicrobici (batteriocine). La batteriocina curicina, secreta dal *Bacillus thuringensis*, ha un'azione a spettro ristretto contro il *C. difficile* e un modello in vitro del microbiota fecale del colon distale [177].

Il trattamento standard consiste in un ciclo di vancomicina o metronidazolo [150]. Ci sono stati due studi che hanno confrontato il FMT con la terapia con vancomicina. A causa dell'efficacia superiore del FMT, entrambi sono stati interrotti [178]. Gli studi dimostrano che l'infusione duodenale di feci di donatori per rCDI ha avuto un tasso di guarigione dell'81% rispetto a un tasso di guarigione del 31% per i pazienti trattati con la vancomicina orale standard [175].

Si è concluso che il FMT dovrebbe essere preso in considerazione per la CDI ricorrente o recidivante quando la terapia standard non funziona. La CDI ricorrente è definita come una risoluzione completa con una terapia *ad hoc* seguita da una recidiva di CDI dopo l'interruzione del trattamento [179]. In caso di

CDI moderata, il FMT è indicato quando non c'è risposta alla terapia standard per almeno 1 settimana. Per la CDI grave, è indicata quando non c'è risposta al trattamento dopo una terapia massimale *ad hoc* per 48 ore [129].

Questo metodo di trattamento è stato applicato, con un successo più limitato, anche a pazienti con altre malattie intestinali come il morbo di Crohn, la colite ulcerosa e il cancro del colon-retto [137,180]. Esistono anche alcune prove, da confermare, del fatto che il FMT può essere d'aiuto in condizioni non gastroenterostinali come l'encefalopatia epatica, le malattie neuropsichiatriche, le allergie, la psoriasi, i disturbi neurologici, la sindrome metabolica e il cancro che sono correlati alla disbiosi intestinale [181].

11.5.7 FMT NELLA MALATTIA INFIAMMATORIA INTESTINALE

La malattia infiammatoria intestinale (IBD) è una condizione infiammatoria cronica del tratto gastroenterostinale che comprende la colite ulcerosa (UC) e la malattia di Crohn (CD). L'eziologia di questi disturbi è multifattoriale. La genetica, i cambiamenti nella composizione microbica, l'alterazione del sistema immunitario e i fattori ambientali hanno un ruolo nella patogenesi delle IBD. I segni clinici delle IBD includono diarrea, nausea, perdita di peso, inappetenza, febbre e dolore addominale. Lo scopo principale della gestione delle IBD è quello di sopprimere la risposta infiammatoria con salicilati, corticosteroidi, tiopurine, agenti anti-fattore di necrosi tumorale e anti-integrine. Questi trattamenti presentano alcune limitazioni dovute agli effetti collaterali, alle infezioni, alle neoplasie secondarie e alla mancata risposta [182].

I medici hanno scoperto che i pazienti con IBD presentano microbioma batterico fecale e mucosale alterato rispetto ai controlli sani [182]. È stato dimostrato che la flora batterica fecale dei pazienti con IBD differisce da quella degli individui sani [183,184]. Lo squilibrio del microbioma è stato recentemente considerato come un possibile fattore patologico delle IBD [20]. Nei pazienti con IBD è stata riscontrata una riduzione generale della diversità batterica, con una riduzione specifica dei

membri del phylum *Bacteroidetes* e *Lachnospiraceae* all'interno del phylum *Firmicutes* e un aumento di *Proteobacteria* e *Actinobacteria* [184,185,186]. È noto che anche la componente batterica della superficie mucosale dei pazienti con IBD differisce da quella degli esseri umani sani [187]. L'invasione batterica della mucosa è evidente nei pazienti con CD e UC, anche se raramente si riscontra negli individui sani [188,189]. In questi pazienti si registra un aumento dei batteri enteroaderenti e una diminuzione delle comunità batteriche favorevoli alla salute [190].

La manipolazione del microbioma che ripristina la composizione del microbioma intestinale è stata considerata un'opzione terapeutica nel trattamento dei pazienti con IBD. Una rigorosa revisione sistematica di 18 studi che includono 122 pazienti con IBD trattati con FMT ha rilevato tassi complessivi di remissione clinica del 36,2%. Nei pazienti affetti da UC, la remissione clinica è stata del 22%; i pazienti affetti da CD hanno avuto un tasso del 60,5% e nei pazienti più giovani (di età compresa tra 7 e 20 anni) [191]. Sembra che il FMT possa essere più efficace per la CD e nei pazienti più giovani rispetto all'infezione da UC.

Esistono altri studi che esplorano l'uso del FMT per il trattamento delle IBD. In uno studio sono stati inclusi 75 pazienti con UC attiva. Alcuni sono stati trattati con FMT e altri con un clistere d'acqua per 6 settimane. Nei pazienti trattati con FMT, la remissione è stata del 24% (definita dal punteggio Mayo <3 e dalla completa guarigione della mucosa), mentre nei pazienti trattati con un clistere d'acqua la remissione è stata solo del 5% [192].

È chiaro che l'efficacia del FMT nelle IBD non è così elevata come nella CDI. Ciò è probabilmente dovuto alla fisiopatologia multifattoriale delle IBD [115]. Sono necessari ulteriori studi per determinare l'eventuale effetto benefico in questa popolazione e gli esiti avversi. Il FMT ha anche potenziali applicazioni cliniche nel trattamento di un ampio spettro di condizioni associate alla disbiosi intestinale. La [Tabella 7](#) presenta le malattie associate alla disbiosi, nelle quali il FMT ha potenziali effetti benefici.

Malattie metaboliche	Malattie autoimmuni
Obesità	Artrite reumatoide
Diabete mellito	Porpora trombocitopenica idiopatica
Sindrome metabolica	Sindrome di Sjögren
NAFLD [193,194]	Lupus eritematoso sistemico
Malattie cardiovascolari [48]	Tiroidite di Hashimoto [195]
Disturbi neuropsichiatrici	Disturbi allergici
Malattia di Parkinson	Atopia
Sclerosi multipla	Allergia alimentare
Autismo	Asma [48]
Distonia mioclonica	
Sindrome da fatica cronica [48]	
Cancro	Disturbi gastrointestinali funzionali
Cancro gastrointestinale	Sindrome dell'intestino irritabile [200]
Cancro gastrico	
Cancro del colon-retto	
Carcinoma epatocellulare	
Cancro del pancreas [196,197,198,199]	
Cancro non gastrointestinale	
Cancro al seno	
Melanoma	
Cancro alla prostata	
Linfoma	

Tabella 7. Malattie per cui un FMT potrebbe avere effetto.

11.6 SICUREZZA DEL FMT, ALTERNATIVE E PROSPETTIVE FUTURE

Il FMT è uno dei nuovi metodi per modulare la composizione del microbiota intestinale nell'uomo. È infatti noto come la

terapia più efficace per la CDI ricorrente, ma ha anche un potenziale effetto nel trattamento di un ampio spettro di altre malattie associate alla disbiosi intestinale. Gli studi hanno dimostrato che il FMT non ha lo stesso impatto significativo sulla IBD e su altre malattie come sulla CDI. Sebbene sia la CDI che le IBD siano caratterizzate da un microbioma alterato, le IBD sono una malattia molto più complessa, con interazioni sfaccettate tra l'ospite e il suo ambiente [182].

Questa forma di batterioterapia è generalmente considerata sicura e ben tollerata anche nei pazienti ad alto rischio. Tuttavia, vi sono anche opinioni secondo cui, a causa della composizione non identificata e della patogenicità dei batteri fecali, la sicurezza di un FMT rimane controversa [201]. La maggior parte dei rischi a breve termine sono lievi e sono noti per essere associati ai metodi di somministrazione. Questi comprendono febbre transitoria, malessere addominale, diarrea, gonfiore, flatulenza, aumento dei marcatori infiammatori e vomito (dopo infusioni duodenali) [191,202]. Ciò che ha suscitato controversie è la recente pubblicazione di un avviso di sicurezza da parte della Food and Drug Administration (FDA), che mette in guardia sui potenziali rischi di trasmissione di batteri multiresistenti ai farmaci e di sviluppo di successive infezioni potenzialmente letali. Diversi casi riportano infezioni da *E. coli* produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) dopo un FMT, gastroenterite da norovirus, batteriemia da *E. coli* e infezione da citomegalovirus [203,204,205,206].

Oltre alla trasmissione di agenti patogeni, esiste anche la possibilità di diffondere geni che causano malattie. Durante il processo di trasferimento del materiale fecale, esiste il rischio che alcuni componenti sconosciuti delle feci del donatore passino al ricevente e di conseguenza scatenino malattie croniche (obesità, autismo, disturbi cardiovascolari, autoimmuni o gastrointestinali) [203].

Per mantenere la sicurezza del paziente e l'uso appropriato di un FMT, si prevede l'emergere di protocolli standardizzati per lo screening dei donatori, la preparazione delle feci, i metodi di somministrazione e le indicazioni per il trattamento dei rice-

venti [148]. Come già menzionato, il FMT presenta un rischio per alcuni pazienti; pertanto, esistono alcune nuove alternative al FMT, note come terapie di nuova generazione basate sul microbiota, che sono più sicure del FMT. Sono in fase di sviluppo anche come trattamenti questi prodotti di feci sintetiche o consorzi batterici con definiti ceppi microbiocici, basati sul principio della ricostituzione del microbiota intestinale [102,172]. La composizione esatta dei batteri che si va a fornire è nota con queste miscele derivate dalle feci, che possono essere regolate e replicate per trattamenti futuri. Il vantaggio dell'applicazione di miscele sintetiche è che la loro applicazione non richiede il trasferimento delle feci complete come in un FMT. Inoltre, queste miscele non includono patogeni contagiosi e non richiedono donatori oltre la fase iniziale di isolamento [4]. La scelta dei ceppi inclusi nella miscela si basa sul reintegro dei batteri assenti nel paziente. Oltre alla sicurezza, sono più facili da produrre e più coerenti tra i lotti [207,208].

Nel 2013, l'uso di queste miscele derivate dalle feci è stato descritto in uno studio in cui la miscela di 33 ceppi è stata utilizzata con successo nel trattamento della CDI [172]. Altri studi confermano che queste miscele sintetiche di microbi definiti, chiamate anche ecosistemi terapeutici microbici (MET), sono un'alternativa disponibile al FMT convenzionale per la CDI ricorrente [4].

Nel contesto delle alternative al FMT, il termine "medicina personalizzata" è sempre più utilizzato [182]. La medicina personalizzata è un approccio avanzato che tiene conto della variabilità, compresi i fattori genetici, ambientali e di stile di vita tra gli individui, e caratterizza i modelli metabolici complessi e unici di ciascun paziente [209]. Questo campo si concentra sul trattamento di una specifica malattia considerando il microbioma specifico dell'individuo. Il principio di questa medicina si basa sull'analisi di routine del microbioma di un individuo e sul prevedere la risposta di un individuo a diversi nutrienti e agenti terapeutici, il che crea l'opportunità di sviluppare nuove strategie terapeutiche specifiche per la malattia [91].

Come abbiamo detto, esistono alcuni metodi tradizionali di modulazione del microbioma intestinale, come la somministrazione di probiotici, prebiotici, postbiotici o sinbiotici. A differenza del FMT, che è destinato principalmente al trattamento delle malattie, questi metodi valgono anche per la prevenzione delle malattie; pertanto, il loro uso deve essere tenuto presente [210].

Questi metodi sono indubbiamente molto efficaci; l'effetto di questi approcci è altamente generico e aspecifico. I probiotici tradizionali sono stati isolati da molte fonti, come l'intestino e gli alimenti fermentati tradizionali. Tutti hanno una lunga storia di utilizzo e si sono dimostrati sicuri. La maggior parte di essi appartiene a un elenco limitato di generi, fundamentalmente batteri lattici spp. e *Bifidobacterium* spp. sebbene vi siano anche alcuni membri di *Bacillus* ed *E. coli* per i batteri e del lievito *Saccharomyces*, tra gli altri [211].

La somministrazione di probiotici convenzionali promuove il miglioramento della funzione della barriera intestinale, aumentando i livelli di IgA nei fluidi intestinali, mantenendo l'omeostasi del microbiota intestinale e riducendo gli organismi patogeni nel tratto intestinale attraverso la produzione di componenti antimicrobici e la produzione di molecole essenziali [91,190]. Per lungo tempo si è ipotizzato che i probiotici influissero solo sulla salute intestinale, ma le evidenze attuali suggeriscono che siano coinvolti anche nella regolazione della qualità del sonno, dell'umore e delle funzioni cognitive attraverso l'asse intestino-microbiota-cervello, un percorso specifico che coinvolge il sistema neurale, endocrino e immunitario [212,213,214,215,216,217]. Nonostante queste qualità, gli effetti dei probiotici convenzionali sono molto specifici del ceppo e variano anche tra gli ospiti. Inoltre, la loro somministrazione mira a prevenire malattie mirate piuttosto che a migliorarle [91]. Di conseguenza è necessario un metodo che moduli il microbioma in modo più preciso e personalizzato. Per questo motivo, il campo della medicina personalizzata ha introdotto un nuovo tipo di probiotici, noti anche come probiotici di nuova generazione (NGP). In realtà, si tratta di batteri commensali progettati come probiotici, che sono as-

sociati alla progressione della gravità di una particolare malattia [218]. Gli NGP sono stati identificati principalmente sulla base di un'analisi comparativa della composizione del microbiota tra individui sani e non sani e appartengono a vari generi. Non hanno una lunga storia di utilizzo sicuro e quindi la loro sicurezza non è considerata provata [211].

Recentemente, la Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti ha introdotto il termine “Prodotto Bioterapeutico Vivo” (LBP), ovvero un prodotto biologico che contiene organismi vivi e che si adatta alla prevenzione, al trattamento o alla cura di una malattia o di un disturbo dell'uomo, e che non è un vaccino. Questo termine, talvolta proposto come sostituto degli NGP, include i microrganismi bioterapeutici vivi e gli altri ingredienti che compongono il LBP finale. Questo è il motivo per cui sosteniamo che il termine “LBP” non possa essere usato sistematicamente per sostituire gli NGP [219,220].

In futuro, gli NGP potranno essere utilizzati per migliorare le malattie specifiche modulando il microbiota intestinale [91], ad esempio nello sviluppo di probiotici per le donne in gravidanza e in allattamento, per prevenire le allergie cutanee, le infezioni e i problemi gastrointestinali, la DM2, le allergie e gli eczemi infantili, ecc. [191]. La maggior parte dei prodotti NGP non è ancora disponibile in commercio e la ricerca è attualmente in corso per selezionare i candidati adatti alla terapia mirata.

11.7 CONCLUSIONI

Il trapianto di microbiota fecale rappresenta un metodo alternativo di terapia in caso di fallimento del trattamento standard o come integrazione della terapia convenzionale. In medicina veterinaria, siamo nelle prime fasi di studio della potenziale applicazione di un FMT nella modulazione del microbiota intestinale. Tuttavia, ci sono ancora molte cose che non capiamo sull'esatto meccanismo d'azione; si prevede che la standardizzazione di un FMT sarà stabilita nei prossimi anni e le sue indicazioni saranno

ampliate. Dato che attualmente si tende a sviluppare il campo della medicina personalizzata umana e della modulazione mirata del microbiota intestinale, il suo ulteriore sviluppo e la sua introduzione nella medicina veterinaria potrebbero essere la chiave per il trattamento di molte malattie gastrointestinali e non gastrointestinali.

12 - PROFILI MICROBICI E METABOLICI FECALI NEI CANI CON DIARREA ACUTA SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE O A METRONIDAZOLO ORALE

Tratto e tradotto da



Chaitman J, Ziese A-L, Pilla R, Minamoto Y, Blake AB, Guard BC, Isaiah A, Lidbury JA, Steiner JM, Unterer S and Suchodolski JS (2020) *Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole*. *Front. Vet. Sci.* 7:192.

doi: 10.3389/fvets.2020.00192

Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

Il nostro obiettivo era caratterizzare le differenze nella consistenza fecale e nei profili del microbiota e del metaboloma fecale in cani con diarrea acuta (AD, [Acute Diarrhea]) trattati con trapianto di microbiota fecale sotto forma di clistere (FMT; $n = 11$) o metronidazolo orale (MET; $n = 7$) per 7 giorni. Nei giorni 0, 7 e 28 sono stati prelevati dei campioni fecali. Per il confronto sono stati usati dei campioni fecali di cani sani (HC; $n = 14$). I campioni sono stati analizzati mediante l'indice di disbiosi canina (DI) basato sulla qPCR, precedentemente validato; dei valori superiori indicano una disbiosi del microbiota) e il sequenziamento del gene 16S rRNA. Il metaboloma fecale è stato analizzato usando un test canino mirato per gli acidi biliari non coniugati e non mirato, precedentemente validato. La consistenza fecale è migliorata significativamente nei cani trattati con FMT e MET al giorno 7 e al giorno 28 ($p < 0,01$) rispetto al giorno 0. Tuttavia, al giorno 28 la consistenza fecale era significativamente migliore nel FMT rispetto al MET ($p = 0,040$). Al giorno 0, i cani con AD presentavano un microbiota

alterato, indicato da un aumento significativo della DI, una diminuzione dell'alfa-diversità e un'alterazione della beta-diversità. Nel gruppo FMT, il DI è diminuito nel tempo, mentre il MET ha portato a un aumento significativo dell'indice di disbiosi al giorno 7 e 28 rispetto all'FMT. I dati di sequenziamento hanno rivelato che nell'FMT la diversità microbica e la beta-diversità erano simili a quelle dell'HC al giorno 28, mentre nel MET questi parametri erano ancora significativamente diversi dall'HC. Nei cani trattati con FMT è stata osservata una diminuzione dell'acido colico e della percentuale di acidi biliari primari, mentre il trattamento con metronidazolo ha portato a un aumento dell'acido colico al giorno 7 e a un aumento della percentuale di acidi biliari primari nel tempo. Sulla base della metabolomica non mirata, i cani affetti da AD presentavano un metaboloma fecale alterato rispetto agli HC. I cani trattati con FMT si sono raggruppati più vicino agli HC al giorno 28, mentre i cani trattati con MET non lo hanno fatto. In questo studio pilota, i cani con AD presentavano differenze significative nel microbiota fecale e nei profili del metaboloma. I cani trattati con MET presentavano ancora profili microbici e metabolici alterati al giorno 28 rispetto ai cani trattati con FMT o ai cani sani.

12.1 INTRODUZIONE

La diarrea acuta (AD) è un disturbo comune nei cani nella pratica veterinaria di base. Gli antibiotici sono il trattamento di prima linea più comunemente usato per l'AD nel cane, indipendentemente dalla causa sottostante. Le indagini hanno mostrato che il 50-71% dei cani con AD presentati a un veterinario sono stati trattati con antimicrobici (1-3), anche se solo una minoranza (3,2%) di questi animali è stata testata per agenti infettivi (3). Solo studi molto recenti hanno esaminato se la somministrazione di antimicrobici porti a una minore durata della diarrea, e i risultati rimangono poco chiari. Mentre uno studio ha dimostrato che il metronidazolo riduce la durata della diarrea acuta (durata media 2,1 giorni contro 3,6 giorni per il placebo), un altro studio non ha rivelato differenze statistiche nella durata della diarrea quando i

cani sono stati trattati con un probiotico (durata media 3,5 giorni), metronidazolo (4,6 giorni) o placebo (4,8 giorni) (4, 5).

Gli antibiotici sono stati associati a potenziali conseguenze negative. Il tratto intestinale è abitato da circa 100 trilioni di cellule microbiche che creano un ecosistema complesso, il microbiota intestinale. La composizione e la funzione adeguata del microbioma svolgono un ruolo cruciale per la salute dell'ospite. I batteri intestinali contribuiscono in modo determinante al metabolismo dell'ospite. Alcuni studi hanno dimostrato che gli antibiotici alterano il microbiota intestinale, determinando una minore diversità microbica, cambiamenti nell'abbondanza di *taxa* batterici specifici e cambiamenti metabolici (6-8). Nell'uomo e negli animali da compagnia, l'uso di antibiotici è associato allo sviluppo di diarrea in un sottogruppo di pazienti (7, 9). La disbiosi intestinale associata all'uso di antibiotici, soprattutto nelle prime fasi della vita, è stata anche associata a un aumento del rischio di malattie infiammatorie intestinali (10), nonché di atopia (11) o obesità (12) nell'uomo.

Il trapianto di microbiota fecale (FMT) è il trasferimento di contenuto intestinale da un donatore sano a un ricevente malato con l'obiettivo di ridurre la diarrea e migliorare la salute dell'intestino. Nell'uomo, il FMT è stato ampiamente studiato in soggetti affetti da diarrea e ha ottenuto alti tassi di successo nel trattamento delle infezioni da *Clostridium difficile* refrattarie agli antibiotici (13). È stato inoltre dimostrato che il FMT ripristina la composizione degli acidi biliari fecali in associazione a infezioni ricorrenti da *Clostridium difficile* (14). Il FMT è stato descritto in cani con infezione da parvovirus (15), malattia infiammatoria intestinale idiopatica (IBD) (16) e trattamento della diarrea associata al *Clostridium difficile* (17).

La maggior parte degli studi che valutano l'impatto degli antibiotici sul microbiota intestinale sono stati condotti su animali sani e nulla si sa se gli antibiotici portino a una normalizzazione del microbiota nei cani con malattie intestinali - questo è il razionale per l'uso di antibiotici nella diarrea acuta. A causa delle potenziali conseguenze negative dell'uso di antibiotici sul microbiota intesi-

nale, è importante caratterizzare meglio i cambiamenti microbici e metabolici che si verificano nell'AD e come la manipolazione del microbiota con due trattamenti opposti possa influenzare questi cambiamenti nel tempo. Questi dati possono aiutare a progettare nuovi approcci al trattamento della diarrea acuta.

Lo scopo di questo studio pilota è stato quello di valutare le differenze nel microbiota e nel metaboloma, nonché il miglioramento clinico nei cani con diarrea acuta non complicata dopo il trattamento con il trapianto di microbiota fecale o la terapia antibiotica orale con metronidazolo. In questo studio abbiamo valutato il microbiota fecale e il metaboloma utilizzando esemplari qPCR mirati e convalidati per la disbiosi nel cane (18) ed esemplari mirati e convalidati per misurare le concentrazioni di acidi biliari non coniugati nel cane (19, 20). Inoltre, abbiamo valutato gli spostamenti globali nel metaboloma utilizzando la metabolomica fecale non mirata e nel microbiota utilizzando il sequenziamento del gene 16S rRNA.

12.2 MATERIALI E METODI

[...]

12.2.1 CANI CON DIARREA ACUTA

Tra ottobre 2016 e giugno 2017, 18 cani si sono presentati al Veterinary Internal Medicine and Allergy Specialists, New York City, Stati Uniti, con diarrea acuta (AD) di durata inferiore a 14 giorni. Il giorno 0 è stato definito come il giorno della presentazione clinica e dell'inclusione nello studio. In tutti i pazienti sono stati eseguiti un'anamnesi, un esame fisico e un esame fecale standardizzato tramite flottazione e pannello PCR per gli enteropatogeni [...]. I criteri di inclusione erano l'insorgenza acuta di diarrea con o senza vomito della durata di <14 giorni. I criteri di esclusione erano disidratazione grave (>7%), segni di infiammazione sistemica all'esame clinico (ad esempio, ipertermia > 39,5°C, tachicardia, tachipnea, cattive condizioni generali), necessità di ricovero

ospedaliero, parassiti intestinali, anamnesi nota di segni gastrointestinali cronici o pre-trattamento con antibiotici o farmaci noti per causare irritazione della mucosa (ad esempio, farmaci antinfiammatori non steroidei, corticosteroidi) entro 2 settimane dalla presentazione. I campioni fecali sono stati raccolti dai proprietari il giorno dell'appuntamento, nei giorni 0, 7 e 28, e trasportati in una scatola refrigerata alla clinica. Qui i campioni sono stati congelati e conservati a -20°C per un massimo di 1 mese prima di essere spediti per l'estrazione e l'analisi del DNA.

12.2.2 CANI DI CONTROLLO SANI

Tutti i cani di controllo sani (HC) erano di proprietà e vivevano in ambienti domestici diversi nella stessa area geografica. Questi campioni sono stati raccolti come parte di uno studio più ampio che valutava il microbiota fecale in diverse località e sono stati raccolti dai proprietari e portati in ospedale per la conservazione e la spedizione come descritto sopra per i cani malati. Tutti i cani erano alimentati con diete commerciali diverse e nessuno aveva una storia di segni gastrointestinali o di somministrazione di antibiotici. I campioni fecali dei cani di controllo sani sono stati raccolti in un unico momento durante lo stesso periodo dei cani malati.

12.2.3 DONATORE DI FECI

Il donatore di feci per il trapianto fecale era un cane maschio castrato di razza mista di proprietà, di 3 anni, residente a New York City, USA, senza storia di malattie gastrointestinali, senza storia di trattamenti antibiotici, con un punteggio di condizione corporea e un punteggio fecale normali, e alimentato con diverse diete ipoallergeniche durante il periodo di studio (*Natural Balance, Limited Ingredient Diets® Sweet Potato & Bison, Sweet Potato and Venison dry dog food, Purina ProPlan Veterinary Diets HA Vegetarian Formula e Natural Balance Limited Ingredient Treats Sweet Potato and Bison Formula*). Le feci dei donatori sono state analizzate per verificare la presenza di parassiti, enteropatogeni e un microbiota normale utilizzando l'indice di disbiosi (18). Le feci sono state

raccolte regolarmente (da un giorno all'altro) in un sacchetto di plastica, etichettato con la data, e congelate e conservate a -20°C fino al trattamento per l'FMT.

12.2.4 TRATTAMENTO

I cani con AD ($n = 18$) sono stati suddivisi in un gruppo di trapianto di microbiota fecale (FMT, $n = 11$) e in un gruppo metronidazolo (MET, $n = 7$) in base alla volontà dei proprietari di accettare uno dei trattamenti. Dieci cani del gruppo FMT hanno ricevuto un singolo FMT con 5 g di feci congelate di donatore per kg di peso corporeo (BW). Il cane rimanente, a causa della sua taglia (27,5 kg) e della disponibilità di feci nel giorno del trasferimento, ha ricevuto 2,5 g di feci del donatore per kg di peso corporeo. Le feci del donatore sono state mescolate con 60 ml (razza piccola) o 120 ml (razza grande) di NaCl 0,9% non batteriostatico il giorno 0 e somministrate come clistere rettale. Le feci congelate sono state mescolate con la soluzione salina in un frullatore e frullate per circa 5 minuti. La soluzione è stata prelevata in una siringa con punta a catetere da 60 ml con attaccato un catetere di gomma rossa da 12 French. Il materiale fecale è stato spinto nel catetere per evitare il trapianto di aria. Per somministrare il clistere è stata messa una piccola quantità di lubrificante non batteriostatico sul catetere e il catetere è stato introdotto completamente nel colon. Per ridurre le probabilità di un movimento intestinale prematuro, il cane ricevente non è stato alimentato e l'attività è stata limitata per 4-6 ore dopo il trapianto. I cani del gruppo MET hanno ricevuto 15 mg/kg di metronidazolo p.o. q12 h per 7 giorni. Il trattamento aggiuntivo consisteva in un antiemetico (maropitant a 1 mg/kg s.c. q24 h; Cerenia®, Zoetis) in caso di vomito. I pazienti non hanno ricevuto ulteriori trattamenti e la dieta non è stata standardizzata.

12.2.5 VALUTAZIONE DEI SEGNALI CLINICI

Il decorso clinico della DA è stato valutato da un medico certificato utilizzando il *Purina Fecal Scoring Chart* nei giorni 0, 7

e 28 in entrambi i gruppi. Un punteggio fecale più basso indica una consistenza delle feci più normale.

[...]

12.2.6 ANALISI DEL METABOLOMA FECALE

[12.2.6.1 Approccio metabolomico mirato per la misurazione degli acidi biliari non coniugati nelle feci](#)

Per la misurazione delle concentrazioni di acidi biliari non coniugati (BA) con metodi precedentemente descritti (19, 20) sono stati utilizzati campioni fecali di 14 cani di controllo sani in un unico punto temporale e campioni fecali di 18 cani con diarrea acuta (11 trattati con FMT e 7 trattati con metronidazolo) nei giorni 0, 7 e 28.

[...]

[12.2.6.2 Approccio metabolomico non mirato](#)

Per valutare il metaboloma fecale, sono stati utilizzati i campioni fecali di 14 cani sani provenienti da un unico punto temporale e i campioni fecali di 17 cani con diarrea acuta (10 trattati con FMT, sette trattati con metronidazolo) raccolti nei giorni 0, 7 e 28. In un paziente del gruppo FMT non è stato possibile eseguire l'analisi non mirata del metaboloma fecale a causa del basso volume di campione disponibile.

[...]

12.3 RISULTATI

12.3.1 ANIMALI

Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella [Tabella 1](#). Non c'erano differenze significative di età ($p = 0,839$) o di peso corporeo ($p = 0,360$) tra FMT, MET e HC. I gruppi hanno mostrato una differenza significativa nel sesso ($p = 0,031$).

	HC	FMT	MET	p-value
Age in years median (range)	4.5 (1.0–12.0)	4.0 (0.5–13)	7.0 (2.0–9.0)	$p = 0.839$
Weight in kg median (range)	21.8 (2.3–49.9)	12.9 (2.5–30.0)	7.0 (4.3–39.1)	$p = 0.360$
Gender female/male	6/7	8/2	1/6	$p = 0.031$

HC, healthy controls; FMT, fecal transplant group; MET, metronidazole group.

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti.

12.3.2 PUNTEGGI FECALI

Il giorno 0, il punteggio fecale mediano dei cani del gruppo FMT era 6 (range 4-7) e quello del gruppo MET era 6 (5-6), non significativamente diverso ($p = 0,212$; Figura 1). I punteggi fecali sono diminuiti significativamente in entrambi i gruppi FMT e MET rispettivamente al giorno 7 e al giorno 28 rispetto al giorno 0 ($p < 0,001$). Tuttavia, il giorno 28 i punteggi fecali erano significativamente più bassi nel gruppo FMT rispetto a quelli del gruppo MET ($p = 0,036$; Figura 1).

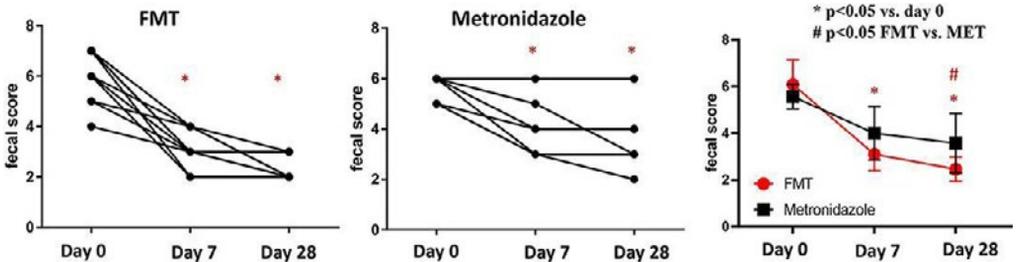


Figura 1. Punteggi fecali in cani con diarrea acuta trattati con FMT come clistere singolo o con metronidazolo per 7 giorni (MET). Un punteggio fecale più basso indica una consistenza delle feci più normale. In entrambi i gruppi è stata osservata una diminuzione significativa dei punteggi fecali al giorno 7 ($p < 0,001$ nell’FMT e $p = 0,017$ nella MET) rispetto al giorno 0. I punteggi fecali erano significativamente più bassi nei pazienti trattati con FMT come singolo clistere o con metronidazolo per 7 giorni. I punteggi fecali erano significativamente più bassi nel gruppo FMT rispetto al gruppo MET al 28° giorno ($p = 0,040$). FMT, trapianto microbico fecale; * $p < 0,05$ rispetto al giorno 0; # differenza significativa tra FMT e MET in punti temporali specifici.

12.3.3 ANALISI MICROBICHE

12.3.3.1 Indice di disbiosi fecale

Non sono state riscontrate differenze significative in nessuno dei *taxa* batterici e nella DI tra entrambi i gruppi di trattamento al giorno 0. I cani con AD (Figura 2) avevano un DI significativamente ($p < 0,001$) più alto al giorno 0, con un DI mediano di 4,1 (intervallo -4,5-6,5) rispetto ai cani di controllo sani (DI mediano di -4,6, intervallo da -8,4 a -0,6). Le abbondanze di *Faecalibacterium* ($p < 0,001$), *Fusobacterium* ($p = 0,004$), *Blautia* ($p = 0,010$), *C. hiranonis* ($p = 0,002$) e *Turicibacter* ($p = 0,004$) erano significativamente più basse nell'AD al giorno 0, mentre le abbondanze di *Streptococcus* spp. ($p = 0,012$) ed *E. coli* ($p = 0,046$) erano significativamente maggiori rispetto ai cani sani.

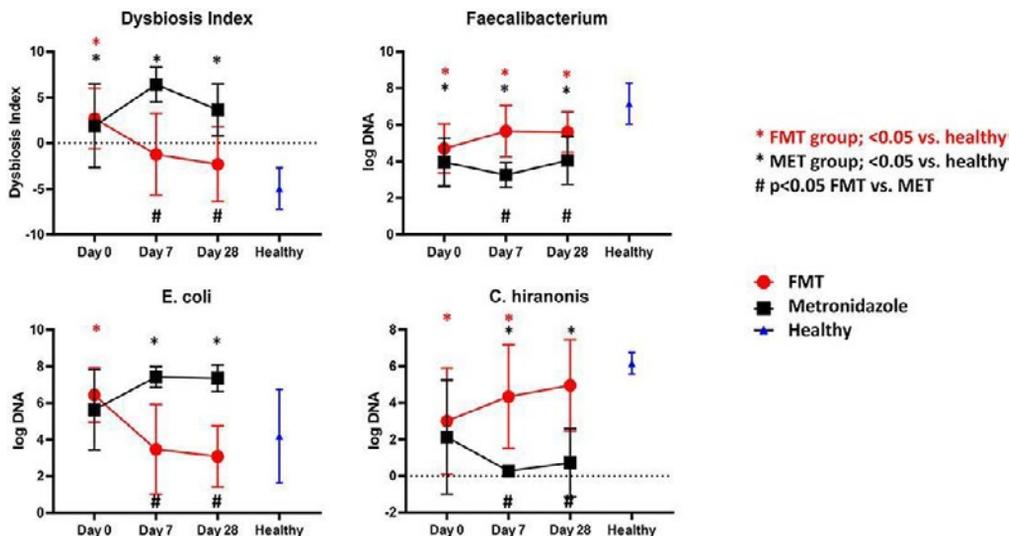


Figura 2. Risultati della qPCR. Indice di disbiosi fecale (DI) e abbondanze di *Faecalibacterium*, *E. coli* e *C. hiranonis* in entrambi i gruppi di trattamento nel tempo e rispetto ai cani sani. I cani sottoposti a FMT hanno mostrato una diminuzione significativa dell'indice DI e dell'*E. coli*, che non erano significativamente diversi ai giorni 7 e 28 rispetto ai cani sani. Al contrario, i cani del gruppo MET hanno mostrato un aumento significativo del DI e dell'abbondanza di *E. coli*, che sono aumentati significativamente

ai giorni 7 e 28 rispetto ai cani sani. L'abbondanza di *Faecalibacterium*, un taxon batterico associato alla salute, è aumentata numericamente nel gruppo FMT ed è risultata significativamente più elevata rispetto ai cani del gruppo MET ai giorni 7 e 28. Tuttavia, le abbondanze sono rimaste significativamente inferiori in entrambi i gruppi, se comparate con quelle dei cani sani. *C. hiranonis*, un batterio importante nei cani per la conversione degli acidi biliari primari in secondari, è aumentato in abbondanza nel gruppo FMT, che non era più significativamente diverso dai cani sani al 28° giorno. Al contrario, i cani del gruppo MET hanno mostrato una diminuzione dell'abbondanza di *C. hiranonis* al giorno 7 (fine del trattamento MET) e al giorno 28 rispetto ai cani sani.

I cani dopo il FMT hanno mostrato una diminuzione significativa del DI e dell'*E. coli*, che non erano significativamente diversi ai giorni 0 e 28 rispetto ai cani sani. I cani del gruppo MET hanno mostrato un aumento significativo del DI e dell'abbondanza di *E. coli*, che erano significativamente maggiori ai giorni 0 e 28 rispetto ai cani sani.

L'abbondanza di *Faecalibacterium*, un taxon batterico associato alla salute, è aumentata numericamente nel gruppo FMT ed è risultata significativamente più elevata rispetto ai cani del gruppo MET al giorno 7 e 28. Tuttavia, le abbondanze sono rimaste significativamente inferiori in entrambi i gruppi rispetto ai cani sani.

C. hiranonis, un batterio importante nei cani per la conversione degli acidi biliari primari in secondari, è aumentato in abbondanza nel gruppo FMT, che non era significativamente diverso dai cani sani al 28° giorno. I cani del gruppo MET hanno mostrato una diminuzione dell'abbondanza di *C. hiranonis* al giorno 7 (fine del trattamento MET) e al giorno 28 rispetto ai cani sani.

12.3.3.2 Sequenziamento del gene 16S rRNA-Misure di diversità alfa

Non ci sono state differenze significative in nessuna delle misure di diversità alfa al giorno 0 tra i due gruppi di trattamento. L'analisi statistica (Tabella S1; Figura 3) ha rivelato che i cani con diarrea acuta in entrambi i gruppi avevano una diversità alfa significativamente ridotta (specie osservate, indice di Shannon) rispetto ai cani sani al giorno 0. I cani del gruppo FMT hanno mostrato un aumento delle misure di diversità alfa (Tabella S1; Figura 3), che non erano significativamente diverse al giorno 0. I cani del gruppo FMT hanno mostrato un aumento delle misure

di diversità alfa (Tabella S1; Figura 3), che non erano significativamente diverse ai giorni 7 e 28 rispetto ai cani sani. Al contrario, i cani del gruppo MET hanno mostrato una diminuzione significativa di entrambi i parametri al giorno 7 e 28 rispetto ai cani sani.

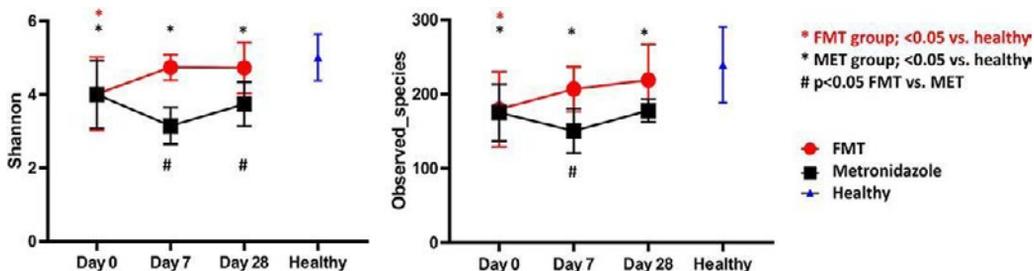


Figura 3. Indice di Shannon (pannello di sinistra) e ricchezza di specie (pannello di destra) per cani di controllo sani e cani con diarrea acuta trattati con FMT come clistere singolo o con metronidazolo (MET) per 7 giorni. Sia Shannon che la ricchezza di specie erano significativamente inferiori al giorno 0 rispetto ai cani sani. I cani del gruppo FMT hanno mostrato un aumento significativo di entrambi i parametri, che non erano più significativamente diversi ai giorni 7 e 28 rispetto ai cani sani. Al contrario, i cani del gruppo MET sono rimasti significativamente più bassi in entrambi i parametri ai giorni 7 e 28 rispetto ai cani sani.

12.3.3.3 Sequenziamento del gene 16S rRNA - Cambiamenti nelle comunità microbiche (Beta-Diversità)

Non ci sono state differenze significative tra il gruppo FMT e il gruppo MET al giorno 0 in base alle distanze unifracc ponderate (Analisi delle somiglianze [ANOSIM], $R = 0,137$, $p = 0,943$).

Entrambi i gruppi erano significativamente diversi da HC (Figura 4). Per il gruppo FMT vs. HC, l'analisi statistica è stata la seguente: distanze unifracc ponderate ANOSIM $R = 0,309$, $p = 0,002$. Per il gruppo MET rispetto a HC: distanze unifracc ponderate ANOSIM $R = 0,291$, $p = 0,010$.

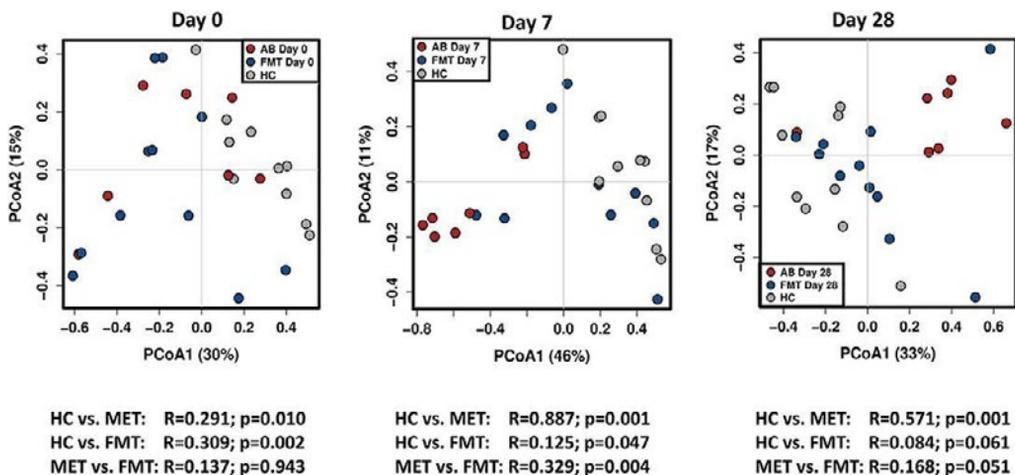


Figura 4. Grafici PCoA basati sulle distanze unifracc ponderate per cani di controllo sani (HC) rispetto a cani con diarrea acuta trattati con FMT come clistere singolo o con metronidazolo (MET). Le statistiche sono basate su ANOSIM (il valore R indica l'effetto di dimensione). Non ci sono state differenze significative tra il gruppo FMT e MET al giorno 0, ma entrambi i gruppi erano significativamente diversi da HC. Dopo l'FMT, le comunità microbiche si sono raggruppate più vicino a quelle dei cani sani al giorno 7 e non erano significativamente diverse da quelle dei cani sani al giorno 28. Al contrario, la somministrazione di MET ha mostrato una maggiore differenza nelle comunità microbiche rispetto ai cani sani al giorno 7 (sulla base di un aumento della dimensione dell'effetto $R = 0,887$), e le comunità microbiche erano ancora significativamente diverse rispetto all'HC al giorno 28.

Il giorno 7 e il giorno 28 dopo il FMT, le comunità microbiche hanno mostrato una tendenza a raggrupparsi più vicino ai controlli sani (in base alla dimensione dell'effetto ANOSIM decrescente) e non erano significativamente diverse dai controlli sani al giorno 28 in base alle distanze ponderate (ANOSIM $R = 0,084$, $p = 0,061$).

Al contrario, in base alla dimensione dell'effetto ANOSIM, il microbiota del gruppo MET ha mostrato una differenza maggiore rispetto a HC al giorno 7 (fine della somministrazione di MET). Al giorno 28 (Figura 4), le comunità microbiche erano ancora significativamente diverse dai cani sani in base alle distanze ponderate (ANOSIM $R = 0,571$, $p = 0,001$). I risultati per

le distanze unifracc non ponderate erano simili e sono riportati nella [Figura supplementare 1](#).

[12.3.3.4 Taxa batterici](#)

Le statistiche univariate hanno mostrato diverse differenze significative nei taxa batterici tra i cani con diarrea acuta di entrambi i gruppi e i controlli sani al giorno 0 ([Tabella S1](#)). A livello di *phylum*, i cani con AD avevano un'abbondanza significativamente inferiore di *Bacteroidetes* ($p = 0,003$) e *Fusobacteria* ($p = 0,029$). A livello di famiglia, i cani con AD avevano abbondanze significativamente più elevate di *Enterobacteriaceae* ($p = 0,006$), *Corynebacteriaceae* ($p = 0,011$), *Bifidobacteriaceae* ($p = 0,001$), *Staphylococcaceae* ($p = 0,008$), *Lactobacillaceae* ($p = 0,020$) e *Leuconostocaceae* ($p = 0,001$). Le abbondanze di *Bacteroidaceae* ($p = 0,006$), *Fusobacteriaceae* ($p = 0,029$), *Ruminococcaceae* ($p = 0,024$), *Veillonellaceae* ($p < 0,001$) e *Alcaligenaceae* ($p = 0,005$) erano significativamente diminuite nei cani con AD rispetto a quelli con HC.

[12.3.3.5 Concentrazioni di acidi biliari nelle feci](#)

Rispetto ai cani di controllo sani ([Figura 5](#)), i gruppi FMT ($p = 0,054$) e MET ($p = 0,012$) al giorno 0 presentavano una maggiore concentrazione fecale dell'acido colico primario e una maggiore percentuale di acidi biliari primari rispetto al pool totale di acidi biliari fecali analizzati (gruppo FMT, $p = 0,007$; gruppo MET, $p = 0,357$). Tra gli acidi biliari secondari, l'acido litocolico era significativamente più basso ($p = 0,0016$), mentre l'acido deossicolico era numericamente più basso ($p = 0,080$). Il trapianto di microbiota fecale (FMT) ha portato a una diminuzione significativa della percentuale di acidi biliari primari al 28° giorno rispetto al giorno 0, mentre il MET ha portato a un aumento significativo al 7° giorno. Anche la percentuale di acidi biliari primari è risultata inferiore nel gruppo FMT al giorno 7. Al giorno 7 e 28 la percentuale di acidi biliari primari nel gruppo FMT si è avvicinata ai valori dei cani sani ([Figura 5](#)). Anche le concentrazioni fecali di acido colico erano significativamente più alte

nel gruppo MET al giorno 7 rispetto al FMT. È stata osservata una tendenza all'aumento dell'acido biliare secondario, l'acido litocolico, dopo il FMT, ma questo non ha raggiunto la significatività ($p = 0,189$). È stata riscontrata una correlazione negativa significativa tra l'abbondanza (basata sulla PCR quantitativa) del batterio 7α -deidrossilante *C. hiranonis* e le concentrazioni fecali di acidi biliari primari (Spearman $r = -0,575$; $p < 0,0001$) e la percentuale di acidi biliari primari fecali (Spearman $r = -0,651$; $p < 0,0001$).

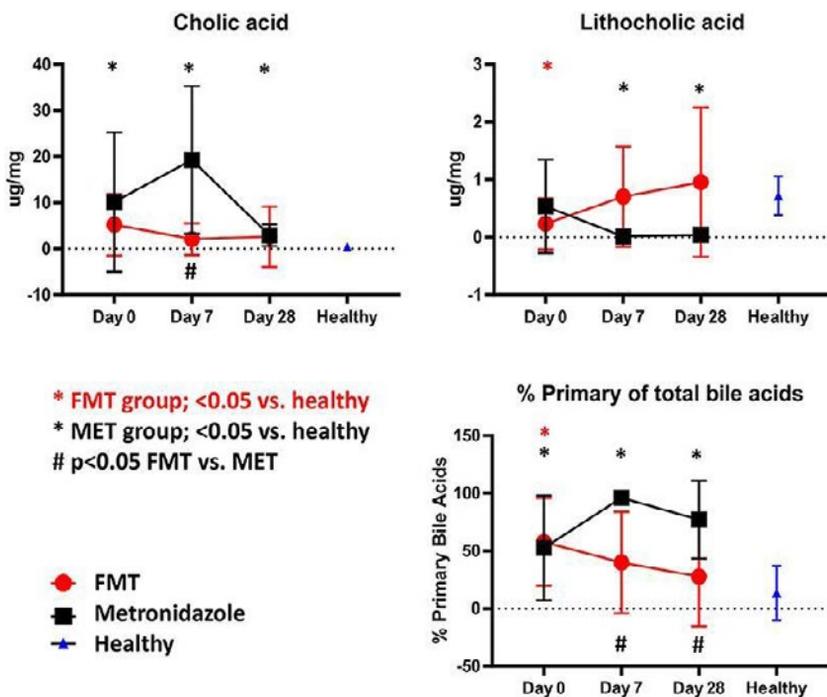


Figura 5. Concentrazioni di acidi biliari non coniugati nelle feci di entrambi i gruppi di trattamento e rispetto ai cani sani. I cani del gruppo FMT hanno mostrato una normalizzazione dei profili degli acidi biliari, che non erano significativamente diversi da quelli dei cani sani ai giorni 7 e 28 per l'acido colico, l'acido litocolico e la percentuale di acidi biliari primari. Al contrario, i cani del gruppo MET hanno mostrato concentrazioni significativamente anormali di questi parametri rispetto ai cani sani al giorno 7 e al giorno 28.

12.3.4 METABOLOMICA FECALE NON MIRATA

Un totale di 237 e 261 metaboliti sono stati misurati rispettivamente nel gruppo FMT e MET. Di questi, 131 metaboliti erano significativamente diversi dall'HC in base ai valori di p aggiustati nel gruppo FMT e 117 nel gruppo MET. Pertanto, i grafici basati sull'analisi delle componenti principali (PCA; Figura 6) hanno rivelato un chiaro raggruppamento dei campioni del giorno 0 rispetto all'HC in entrambi i gruppi. I cani con diarrea acuta trattati con FMT si sono raggruppati più vicino ai cani sani al 28° giorno. Al contrario, i cani con diarrea acuta trattati con metronidazolo non si sono raggruppati più vicino ai cani sani al 28° giorno. Gli *Spider plot* (Figura 7) illustrano visivamente come i metaboliti più significativamente diversi basati sull'analisi univariata tra HC e gruppi di trattamento (Tabella S2) siano cambiati dopo il trattamento in ciascun gruppo. In generale, l'abbondanza mediana dei metaboliti nel gruppo FMT si avvicina all'abbondanza dei metaboliti nei cani sani nei giorni 7 e 28 dopo il FMT. Al contrario, la maggior parte dei metaboliti che erano alterati nel MET al giorno 0, non sono cambiati in abbondanza dopo il trattamento con metronidazolo.

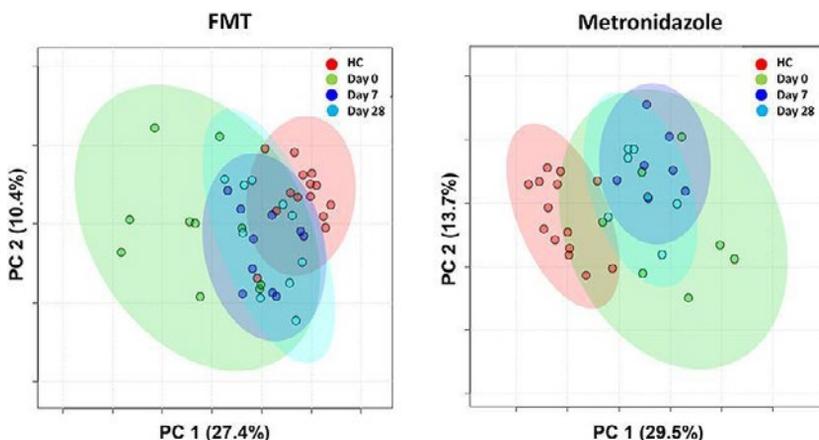


Figura 6. Grafici PCA che mostrano i cambiamenti basati sulla metabolomica non mirata nei cani di controllo sani (HC) rispetto ai cani con diarrea acuta trattati con FMT

come clistere singolo o con metronidazolo. I cani con diarrea acuta trattati con trapianto di microbiota fecale (FMT) si sono raggruppati più vicino ai cani sani al 28° giorno. I cani con diarrea acuta trattati con metronidazolo non si sono raggruppati più vicini ai cani sani il giorno 28 rispetto a prima.

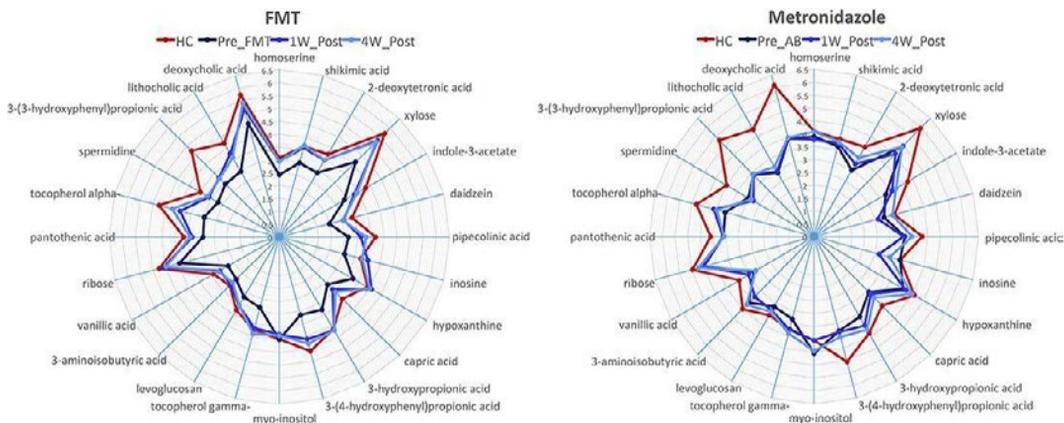


Figura 7. Spider plot che mostrano i cambiamenti in metaboliti selezionati nei cani di controllo sani (HC) rispetto ai cani con diarrea acuta trattati con FMT o metronidazolo. Gli spider plot illustrano visivamente come i metaboliti più significativamente diversi in base all'analisi univariata tra HC e gruppi di trattamento (Tabella S2) siano cambiati dopo il trattamento in ciascun gruppo. L'abbondanza mediana dei metaboliti nel gruppo FMT si è avvicinata all'abbondanza dei metaboliti nei cani sani nei giorni 7 e 28 dopo l'FMT. Al contrario, la maggior parte dei metaboliti che erano alterati nel MET al giorno 0, non sono cambiati in abbondanza dopo il trattamento con metronidazolo (i numeri sull'asse indicano il valore log mediano per ciascun composto).

12.4 DISCUSSIONE

I cani con diarrea acuta non complicata hanno mostrato alterazioni significative del microbiota fecale (cioè una ridotta diversità microbica, comunità microbiche alterate e un maggiore indice di disbiosi) e alterazioni significative del metaboloma fecale rispetto ai cani sani. Questi risultati sono coerenti con studi precedenti che hanno valutato il microbiota nei cani con diarrea acuta. Uno studio condotto su 12 cani con diarrea acuta ha rive-

lato cambiamenti simili a quelli osservati in questo studio, con una diminuzione significativa di *Faecalibacterium*, *Turicibacter* e *Bacteroidetes* e un aumento di *C. perfringens* (26). Cambiamenti simili nel microbiota fecale sono stati riportati anche in un altro studio che ha valutato 13 cani con diarrea acuta, con una sottorappresentazione di *Bacteroidetes*, *Faecalibacterium* e un genere non classificato di *Ruminococcus*, mentre è aumentata l'abbondanza del genere *Clostridium* (27). L'indice di disbiosi basato sulla qPCR è stato sviluppato in cani con enteropatie croniche (18), tuttavia, vi sono risultati comuni di comunità batteriche alterate tra cani con diarrea acuta e cronica (26-28). In questo studio, diversi *taxa* batterici che sono tipicamente alterati nelle enteropatie croniche sono risultati alterati anche nei cani con diarrea acuta. Tra questi, la diminuzione di *Faecalibacterium*, *Fusobacteria*, *Blautia*, *C. hiranonis* e *Turicibacter*, molti dei quali sono stati riportati in studi precedenti (26-28). Pertanto, i cani con diarrea acuta hanno mostrato un aumento significativo dell'indice di disbiosi basato su qPCR.

Una via che oggi si ritiene importante nella fisiopatologia della diarrea nell'uomo è quella degli acidi biliari intestinali (29-31). Le infezioni da *C. difficile* sono associate a un dismetabolismo degli acidi biliari, con un aumento degli acidi biliari primari e una riduzione di quelli secondari (14). La via degli acidi biliari intestinali non è ancora stata valutata nei cani con diarrea acuta. Con un test convalidato per campioni fecali canini (19), abbiamo confermato che i cani con AD presentano concentrazioni fecali più elevate dell'acido colico primario e una percentuale significativamente più alta di acidi biliari primari rispetto ai controlli sani. Uno studio recente ha riportato che i cani affetti da enteropatia infiammatoria cronica (CE) hanno una ridotta espressione del trasportatore apicale di acidi biliari sodio-dipendente, che potenzialmente porta a un malassorbimento degli acidi biliari nell'ileo e a un aumento della percentuale di acidi biliari primari nelle feci (20). Inoltre, la disbiosi fecale e in particolare una diminuzione dell'abbondanza del batterio 7β-deidrossilante *C. hiranonis* si correla significativamente con una diminuzione della percen-

tuale di acidi biliari secondari nei cani con CE (20). È probabile che la diminuzione di *C. hiranonis* osservata nel presente studio in cani con diarrea acuta abbia portato a una conversione insufficiente degli acidi biliari primari in secondari (32) e, quindi, sia almeno in parte responsabile dell'aumento della percentuale di acidi biliari primari. Il trattamento con FMT ha portato a una diminuzione della percentuale di acidi biliari primari nel tempo rispetto ai cani di controllo sani. Al contrario, il trattamento con metronidazolo non ha portato alla normalizzazione di questi profili di acidi biliari. La diminuzione degli acidi biliari primari dopo il FMT ma non dopo il trattamento antibiotico è coerente con i dati relativi agli esseri umani con infezione da *C. difficile* sottoposti a FMT (14). Il FMT può ripristinare la composizione degli acidi biliari fecali reintegrando i batteri del colon, che deconiugano e deidrossilano gli acidi biliari primari acido colico e acido chenodesossicolico per formare gli acidi biliari secondari acido desossicolico e acido litocolico. Tuttavia, il metronidazolo può colpire i batteri intestinali come *C. hiranonis* o *C. scindens*, che convertono gli acidi biliari primari in acidi biliari secondari, con conseguente diminuzione della produzione di acido litocolico e acido desossicolico. Ciò è evidente in questo studio, in quanto la *C. hiranonis* è risultata anormalmente bassa dopo il trattamento con metronidazolo (Figura 2), ma è aumentata dopo il FMT, e vi è stata una correlazione significativa con l'abbondanza di *C. hiranonis* e gli acidi biliari primari. L'aumento degli acidi biliari primari può essere causa di diarrea, ma non è chiaro a quali concentrazioni possa verificarsi e come sia correlato alle interazioni tra altri metaboliti e batteri (31, 33). Attualmente non si sa perché i punteggi fecali siano migliorati nel gruppo MET, anche se gli acidi biliari primari sono rimasti aumentati.

La metabolomica non mirata è un campo relativamente nuovo e gli studi riportati sono pochi, soprattutto per i campioni fecali. Nei pazienti umani con malattia infiammatoria intestinale (IBD) idiopatica, un approccio metabolomico non mirato su campioni di feci ha rivelato diverse alterazioni nelle vie metaboliche (34). Un profilo non mirato di metaboliti sierici in cani con IBD

ha mostrato un aumento delle abbondanze di 3-idrossibutirrato, acido esuronico, ribosio e lattone dell'acido gluconico rispetto ai cani sani, suggerendo la presenza di stress ossidativo (25). La metabolomica fecale di cani sani alimentati con ossa e cibo crudo ha mostrato un aumento delle abbondanze di acido 4-idrossibutirrico e acido 4-aminobutirrico rispetto ai cani alimentati con diete commerciali (35). Uno studio ha riportato un'analisi metabolomica non mirata del siero e un'analisi mirata degli acidi grassi a catena corta (SCFA) fecali in cani con diarrea acuta. In questo studio, i cani con diarrea acuta hanno mostrato alterazioni nella via triptofano-serotonina-indolo nel siero e una diminuzione dell'acido propionico fecale rispetto ai cani sani (27).

In questo studio abbiamo utilizzato un approccio metabolomico non mirato per valutare se i metaboliti fecali dei cani con diarrea acuta sono alterati rispetto ai cani di controllo sani e per studiare l'effetto di due approcci terapeutici. Le differenze più significative tra cani con diarrea acuta e cani di controllo sani erano legate a diverse vie metaboliche, tra cui il metabolismo degli aminoacidi (ad esempio, l'omoserina e l'acido pipercolonico), il metabolismo del colesterolo e dei lipidi (ad esempio, lo zimosterolo, il diidrocolesterolo e il beta-sitosterolo) e il metabolismo del triptofano (ad esempio, l'indolo-3-lattato e l'acido nicotinico).

In uno studio recente i cuccioli infettati da parvovirus che hanno ricevuto il FMT in aggiunta alla terapia standard con antibiotici hanno risolto più rapidamente la diarrea rispetto ai cani che hanno ricevuto solo la terapia standard con antibiotici, cosa che suggerisce un beneficio del FMT sui punteggi della diarrea fecale (15). Mentre i cani del gruppo FMT e del gruppo MET hanno mostrato un miglioramento della consistenza fecale nel tempo, al 28° giorno i punteggi fecali erano significativamente più bassi nei cani sottoposti a FMT rispetto al gruppo MET. Le differenze nei punteggi fecali in base al trattamento osservate in questo studio potrebbero anche essere dovute alle ridotte dimensioni del campione in entrambi i gruppi, in particolare nel gruppo metronidazolo; sono necessari gruppi di dimensioni

maggiori per valutare se il FMT può portare a una risoluzione più rapida della diarrea rispetto al trattamento antibiotico. Tuttavia, lo studio attuale ha mostrato chiare differenze sull'effetto del FMT rispetto al metronidazolo sul microbiota fecale e sul metaboloma nel tempo. I cani che hanno ricevuto il FMT hanno mostrato una normalizzazione del microbiota, come indicato da un aumento della diversità microbica, un profilo del microbiota che si è avvicinato a quello dei cani di controllo sani e anche una diminuzione significativa dell'indice di disbiosi. Non esistono studi completi che abbiano valutato i cambiamenti del microbiota fecale nei cani con malattie intestinali dopo il FMT. Tuttavia, anche gli studi sul FMT nell'uomo con infezione da *C. difficile* mostrano in genere un aumento della diversità microbica e cambiamenti verso i profili microbici dei controlli sani (36, 37).

Al contrario, il microbiota dei cani che hanno ricevuto il MET ha mostrato la persistenza della disbiosi anche a 28 giorni, come indicato da un aumento significativo dell'indice di disbiosi e da un aumento dei valori R nelle distanze unifrac. Alcuni studi su cani sani hanno dimostrato che gli antibiotici comunemente usati, come la tilosina (6, 38) o il metronidazolo (39), hanno un effetto profondo e duraturo sulla composizione microbica dell'intestino tenue e crasso. In particolare, il metronidazolo somministrato a cani sani ha portato a una diminuzione delle abbondanze fecali di *Fusobacteriaceae* e *Turicibacteraceae* e a un aumento di *Enterobacteriaceae* e *Streptococcaceae*. Nello studio attuale, i cani con diarrea acuta hanno mostrato cambiamenti nel microbiota fecale dopo la somministrazione di metronidazolo simili ai cambiamenti nei cani sani che hanno ricevuto metronidazolo, come descritto nello studio precedente (39). Dato che i gruppi batterici citati fanno parte anche dell'indice di disbiosi (18), questo spiega perché l'indice è aumentato dopo la terapia antibiotica. Si sa poco dell'effetto degli antibiotici sul microbiota nei cani con malattie intestinali. Gli antibiotici comunemente usati, come il metronidazolo o la tilosina, possono avere effetti immunomodulatori, ma possono anche agire riducendo la carica batterica totale nell'intestino tenue, ad esempio nei cani con

sovracrescita batterica dovuta a insufficienza pancreatica esocrina, che è stata riportata come correlata al miglioramento della diarrea (40). Anche la riduzione della carica batterica totale può essere un meccanismo che può portare a un miglioramento del punteggio fecale nel tempo nei cani trattati con metronidazolo. Tuttavia, lo studio attuale suggerisce chiaramente che il metronidazolo ha effetti negativi e duraturi sul microbiota fecale anche dopo la cessazione della somministrazione e questo deve essere considerato nella decisione di trattamento della diarrea acuta.

Allo stesso modo, sono state osservate chiare differenze nel metaboloma fecale tra le due strategie di trattamento. La misurazione dei metaboliti fecali consente di valutare i cambiamenti funzionali del microbiota intestinale, ma anche le anomalie nei metaboliti derivati dall'ospite (24, 41). Pertanto, ci si aspetta che i metaboliti di origine batterica siano correlati al miglioramento o al peggioramento della disbiosi microbica. Di conseguenza, i grafici PCA (Figura 6) hanno mostrato che il metaboloma fecale del gruppo FMT dopo 28 giorni si raggruppava più vicino ai controlli sani. Al contrario, il metaboloma fecale è rimasto sostanzialmente invariato dopo il trattamento con metronidazolo e si è raggruppato lontano dai controlli sani anche dopo 28 giorni. I diagrammi a ragnatela rappresentati nella Figura 7 illustrano che diversi metaboliti fecali che erano anormali al giorno 0 nei cani con diarrea acuta si sono avvicinati all'abbondanza media riscontrata nei cani sani al giorno 28 dopo il FMT. Al contrario, dopo il trattamento con metronidazolo, la maggior parte di questi stessi metaboliti non si avvicinava alle abbondanze medie riscontrate nei cani sani. Questi dati suggeriscono che il FMT aiuta a ripristinare il metaboloma fecale, mentre il metronidazolo non lo fa. Poiché alcuni metaboliti rimangono alterati dopo il trattamento con metronidazolo, questi risultati suggeriscono che l'impatto della DA è principalmente sui metaboliti di origine batterica, piuttosto che sui metaboliti dell'ospite. Dato che il campo della metabolomica è relativamente nuovo, i dati disponibili sui diversi regimi di trattamento sul metaboloma fecale sono limitati, soprattutto nei pazienti con diarrea acuta. Nei bambini affetti da

colite ulcerosa pediatrica, il FMT ha portato alla normalizzazione di alcuni metaboliti, correlata a un miglioramento clinico (42). Poiché la diarrea acuta non è probabilmente associata a danni gravi al tratto intestinale, ci si aspetterebbe che la maggior parte delle alterazioni metabolomiche fosse dovuta alla disbiosi batterica, che dovrebbe regredire dopo la correzione della disbiosi. È da notare che alcuni metaboliti, come l'acido 3-(3-idrossifenil)propionico, non si sono normalizzati rispetto ai cani sani con nessuno dei due trattamenti. Al momento le funzioni di molti di questi metaboliti sono sconosciute e si può solo ipotizzare perché l'abbondanza di questi metaboliti sia rimasta alterata. Ad esempio, l'acido 3-(3-idrossifenil)propionico è un metabolita dell'acido propionico, che diminuisce nei cani con diarrea acuta (27), e questi dati potrebbero dimostrare che anche dopo un episodio di diarrea acuta alcune funzioni microbiche rimangono alterate per un periodo di tempo prolungato. Se queste alterazioni necessitano di più tempo per risolversi dovrà essere determinato in studi con un intervallo di follow-up più lungo.

Mentre il microbiota e il metaboloma si sono avvicinati ai cani sani 28 giorni dopo aver ricevuto il FMT, c'erano ancora alterazioni rispetto al gruppo di controllo sano. È ipotizzabile che il microbiota non si riprenda completamente dopo un episodio di diarrea acuta. Inoltre, alcuni dei metaboliti alterati potrebbero essere derivati dall'ospite e indicare un danno prolungato ai tessuti dell'ospite. Sono necessari degli studi futuri per determinare se i pazienti con AD assomigliano ai cani HC dopo periodi di *follow-up* più lunghi.

I limiti di questo studio pilota sono stati la dimensione ridotta del campione, la mancanza di randomizzazione e di un gruppo placebo, nonché il fatto che la valutazione dei punteggi fecali non è stata eseguita da uno sperimentatore in cieco e non è stata eseguita quotidianamente nella prima settimana. I pazienti non sono stati randomizzati in questo studio, poiché il FMT è un'opzione terapeutica nuova negli animali da compagnia e occorre generare dei dati per ottenere la fiducia da parte dei proprietari prima di avviare studi su scala più ampia. Per lo stesso motivo non

è stato incluso alcun gruppo placebo. Tuttavia, poiché al basale non vi erano differenze significative tra i gruppi di trattamento per tutti i parametri misurati analiticamente, è improbabile che la mancanza di randomizzazione abbia causato un bias nei nostri risultati. In questo studio abbiamo confrontato il FMT con il metronidazolo perché, sebbene la diarrea acuta non complicata sia spesso autolimitante, nella pratica il trattamento con antibiotici viene comunque iniziato nel 50%-71% dei pazienti (2, 3). Alcuni dati recenti suggeriscono che il beneficio clinico della somministrazione di metronidazolo rispetto al placebo sia limitato perché entrambi i trattamenti hanno avuto esiti clinici simili (4, 5), ma nessuno dei due studi ha riportato degli effetti sul microbiota e sul metaboloma (4, 5). Di conseguenza gli studi futuri dovrebbero includere anche confronti tra FMT e placebo per valutare se il trattamento con FMT ha migliorato i risultati nel metaboloma e nel microbiota. Un futuro consenso sulle migliori pratiche di raccolta e conservazione dei campioni per gli studi metabolomici rafforzerà anche gli studi futuri. Uno studio condotto su esseri umani con infezione ricorrente o refrattaria da *C. difficile* non ha rilevato differenze nella risoluzione della diarrea quando il FMT è stato eseguito con feci fresche o congelate del donatore (43). Tuttavia, resta da stabilire se il FMT nei cani con AD debba essere eseguito con feci fresche o congelate per ottenere un miglioramento microbico e metabolico ottimale, oltre che clinico. Resta da determinare anche la dose ottimale di feci del donatore. In questo studio 10/11 cani hanno ricevuto una dose di 5 g di feci del donatore per kg di peso corporeo. L'undicesimo cane ha ricevuto 2,5 grammi/kg di peso corporeo a causa del suo peso (27,5 kg) e della disponibilità di feci del donatore il giorno del FMT. Nonostante abbia ricevuto solo metà della dose, i punteggi fecali (7 al giorno 0, 4 al giorno 7 e 2 al giorno 28) e l'indice di disbiosi (+4,5 al giorno 0, -1,0 al giorno 28 e -5,0 al giorno 28) hanno avuto una risposta simile a quella degli altri cani. Infine, sarebbe interessante confrontare il microbiota del donatore con quello del ricevente dopo il FMT in studi futuri.

In conclusione, in questo studio pilota, i cani con MA presentano differenze significative nei profili del microbiota fecale e del metaboloma. Abbiamo osservato che i cani con AD presentano profili fecali di acidi biliari anormali. Abbiamo osservato differenze nella risposta del microbiota e del metaboloma al trattamento con FMT o metronidazolo. Nonostante un miglioramento simile dei punteggi fecali, i cani trattati con MET presentavano ancora profili microbici e metabolici alterati al giorno 28 rispetto ai cani trattati con FMT o ai cani sani. Ciò suggerirebbe che l'uso del metronidazolo ha un impatto negativo sul microbiota fecale nei cani con diarrea acuta, analogamente a quanto precedentemente riportato nei cani sani. Sono necessari ulteriori studi per analizzare queste alterazioni metaboliche e valutare nuovi approcci terapeutici per la diarrea acuta.

13 - RECUPERO DEL MICROBIOMA FECALE E DEGLI ACIDI BILIARI NEI CANI SANI DOPO LA SOMMINISTRAZIONE DI TILOSINA CON E SENZA TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE

Tratto e tradotto da

Marclay, M.; Dwyer, E.; Suchodolski, J.S.; Lidbury, J.A.; Steiner, J.M.; Gaschen, F.P. *Recovery of Fecal Microbiome and Bile Acids in Healthy Dogs after Tylosin Administration with and without Fecal Microbiota Transplantation*. *Vet. Sci.* 2022, 9, 324.

<https://doi.org/10.3390/vetsci9070324>



Le parti omesse dal curatore rispetto all'originale sono indicate dal segno [...]

Abstract

Gli antibiotici causano disbiosi intestinale e dismetabolismo degli acidi biliari nei cani. L'effetto del trapianto di microbiota fecale (FMT) sul recupero del microbioma e del metaboloma è sconosciuto. Questo studio prospettico, randomizzato e controllato con placebo ha incluso sedici cani sani di razza. Tutti i cani hanno ricevuto tilosina 20 mg/kg PO una volta al giorno (giorni 1-7) e sono stati assegnati in modo casuale a ricevere un FMT tramite clistere (giorno 8), capsule FMT orali giornaliere (giorni 8-21) o capsule placebo giornaliere (giorni 8-21). I campioni fecali sono stati congelati a intervalli regolari fino al 42° giorno. È stata eseguita la PCR quantitativa per 8 taxa batterici per calcolare l'indice di disbiosi fecale (FDI) e sono state misurate le concentrazioni fecali di acidi biliari non coniugati (UBA) mediante gascromatografia-spettrometria di massa. La tilosina ha alterato l'abbondanza della maggior parte dei batteri valutati e ha indotto in tutti i cani una diminuzione significativa delle concentrazioni di acidi biliari secondari al giorno 7. Tuttavia, la maggior parte dei parametri è tornata ai valori di base entro il 14° giorno in tutti i cani. In conclusione, la tilosina ha avuto

un impatto marcato sul microbiota fecale e sulle concentrazioni di acidi biliari, anche se il ritorno ai valori di base è stato rapido dopo la sospensione dell'antibiotico. Nel complesso, il FMT non ha accelerato il recupero dei parametri misurati. Sono necessari ulteriori studi per confermare il valore del FMT nell'accelerare il recupero del microbiota nella disbiosi associata agli antibiotici nei cani.

13.1 INTRODUZIONE

Il microbiota intestinale svolge un ruolo importante nello sviluppo del sistema immunitario intestinale, protegge dagli agenti patogeni, fornisce nutrienti all'ospite e contribuisce allo sviluppo della barriera intestinale [1]. In medicina umana, le alterazioni del microbioma intestinale sono implicate nell'infezione da *Clostridioides difficile*, in varie altre malattie gastrointestinali e in altri disturbi, come l'obesità, la sindrome metabolica e le malattie neurologiche e psicologiche [2].

Nel cane invece si tenta spesso la manipolazione del microbioma per trattare malattie intestinali acute e croniche utilizzando antibiotici, prebiotici, probiotici, postbiotici e, più recentemente, il trapianto fecale [3]. Diversi studi hanno valutato l'impatto degli antibiotici sul microbioma intestinale canino. Sono stati riportati cambiamenti significativi nel microbiota fecale in seguito all'uso di tilosina, metronidazolo e amoxicillina in cani sani e malati [4,5,6,7,8,9,10]. La tilosina è un antibiotico della classe dei macrolidi, in grado di colpire i batteri Gram-positivi aerobi, nonché alcuni batteri Gram-negativi aerobi e alcuni anaerobi [11]. Inoltre, la tilosina ha effetti antinfiammatori [12,13]. Recentemente, è stato condotto uno studio prospettico randomizzato su sedici cani adulti sani che hanno ricevuto per 7 giorni la tilosina o un placebo. I cani esposti alla tilosina hanno mostrato una rapida diminuzione della diversità batterica fecale e delle alterazioni degli acidi biliari. Alcuni di questi cani hanno subito

alterazioni a lungo termine e non sono tornati alla composizione del microbiota di base dopo la sospensione dell'antibiotico [7].

Gli acidi biliari non coniugati (UBA) dell'intestino crasso svolgono un ruolo importante nel metabolismo dell'ospite e interagiscono con il sistema immunitario intestinale. Gli UBA primari sono convertiti in UBA secondari dal microbiota dell'intestino crasso. È stato dimostrato che il *Clostridium hiranonis* possiede una significativa attività 7 β -deidrossilante, contribuendo così alla conversione degli UBA primari in secondari [1,14]. Nelle persone, profili UBA intestinali alterati con una diminuzione dell'UBA secondario sono stati collegati a varie malattie gastrointestinali ed epatiche [15,16]. Nei cani, le concentrazioni di UBA secondari sono diminuite in caso di enteropatia cronica e di insufficienza del pancreas esocrino [17,18].

Il trapianto di microbiota fecale (FMT) e i suoi effetti sul microbiota intestinale sono stati oggetto di grande interesse negli ultimi anni. Il FMT è ormai riconosciuto come trattamento preferenziale per le infezioni ricorrenti da *Clostridioides difficile* negli umani e i suoi effetti benefici in altre malattie gastrointestinali e non gastrointestinali sono oggetto di studi in corso [19,20]. Sebbene il FMT sia utilizzato anche nei cani, ci sono pochi studi pubblicati che ne valutano l'efficacia [21]. I cuccioli con infezione da parvovirus trattati con FMT in aggiunta alla terapia standard hanno avuto tempi di ospedalizzazione e di recupero significativamente più brevi rispetto ai controlli [22]. Inoltre, i profili microbici e metabolici fecali dei cani con diarrea acuta trattati con FMT sono migliorati, mentre non sono migliorati in quelli trattati con metronidazolo [9].

L'obiettivo del nostro studio era valutare il recupero del microbioma fecale e del profilo UBA fecale di cani sani trattati con la tilosina dopo la somministrazione di FMT con capsule orali o clistere rispetto al placebo. La nostra ipotesi era che il FMT somministrato attraverso una delle due vie accelerasse il ritorno ai valori precedenti alla tilosina. Il risultato primario era l'indice di disbiosi fecale e i risultati secondari includevano le abbondanze

fecali dei *taxa* batterici utilizzati per calcolare l'indice di disbiosi e le concentrazioni di acidi biliari fecali.

13.2 MATERIALI E METODI

13.2.1 ANIMALI

[...] Sono stati reclutati sedici cani da ricerca sani della Louisiana State University School of Veterinary Medicine Division of Laboratory Animal Medicine (DLAM). I cani idonei avevano un'età compresa tra 1 e 8 anni. I criteri di esclusione erano: precedente malattia gastrointestinale e/o esposizione ad antimicrobici sistemici nei 6 mesi precedenti. I cani sono stati inizialmente sottoposti a un esame fisico e a una diagnostica di laboratorio che comprendeva un emocromo, un profilo biochimico del siero, uno screening parassitologico fecale, compreso lo striscio diretto, la flottazione con centrifugazione e il test immunoenzimatico (ELISA) fecale per la rilevazione di *Giardia*. La reazione a catena della polimerasi (PCR) fecale per il rilevamento degli enteropatogeni (*Clostridioides difficile*, *Canine parvovirus* di tipo 2, gene dell'enterotossina di *Clostridium perfringens*, gene NetF di *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*) e l'anticorpo a immunofluorescenza (IFA) per *Giardia* e per il rilevamento del *Cryptosporidium* sono stati eseguiti presso il GI Laboratory del College of Veterinary Medicine (Texas A&M University) come parte del protocollo di screening iniziale. A tutti i cani è stato somministrato fenbendazolo a 50 mg/kg PO q 24 h per 3 giorni prima di iniziare la raccolta delle feci per il periodo di studio.

Tra i sedici cani da ricerca sani è stato selezionato un donatore sano. Tutti i risultati degli esami di laboratorio menzionati erano rientrati nei rispettivi intervalli di riferimento, prima di reclutare il cane come donatore. Il donatore è stato sottoposto a uno screening per escludere la disbiosi utilizzando l'indice di disbiosi fecale basato sulla qPCR come descritto in precedenza [23]. Il donatore è stato selezionato in base a un indice di disbiosi

fecale (FDI) <0 e alla qPCR di *C. hiranonis* entro l'intervallo di riferimento. Il cane donatore è stato successivamente randomizzato al gruppo placebo.

13.2.2 PREPARAZIONE AL TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE

Le feci dei donatori sono state raccolte dal pavimento della gabbia entro 12 ore dalla defecazione per diversi giorni prima dell'inizio dello studio e preparate per l'FMT entro 4 ore dalla raccolta. Le feci sono state trattate come segue: 4 volumi di soluzione fisiologica allo 0,9% sono stati aggiunti a 1 volume di feci, ottenendo una soluzione fecale al 20%, che è stata mescolata e filtrata in un sacchetto di plastica a due scomparti con uno strato filtrante di polietilene finemente perforato, per rimuovere le particelle più grandi (Whirl-Pak Homogenizer Blender Filter Bag, Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Quindi, 11 mL di glicerolo al 100% sono stati aggiunti a 100 mL di soluzione fecale prima di essere congelati in aliquote a -80 °C e conservati per un massimo di 2 mesi. Per il FMT somministrato tramite clistere la soluzione fecale congelata è stata scongelata in un bagno d'acqua a 37 °C e instillata entro 4 ore nel colon discendente prossimale a una dose di 10 mL/kg. Per il FMT orale, la soluzione fecale sopra descritta è stata centrifugata, il surnatante è stato scartato e il sedimento finale (600 μ L) è stato pipettato in capsule di gelatina #00 che sono state sovraincapsulate con capsule di gelatina #000. Per il gruppo placebo, 1 volume di glicerolo è stato aggiunto a 9 volumi di soluzione fisiologica allo 0,9% e 600 μ L della soluzione sono stati pipettati nelle stesse capsule di gelatina, anch'esse sovraincapsulate. Le capsule fecali e placebo sono state poi congelate e conservate a -80 °C fino a 2 mesi prima dell'uso. In assenza di raccomandazioni per il FMT orale nei cani, abbiamo adattato la dose utilizzata in un recente studio di valutazione del FMT orale in pazienti umani [24]. Di conseguenza, a ciascun cane sono state somministrate capsule orali al giorno per 2 settimane, corrispondenti a una dose totale

di circa 1 g di feci per kg di peso corporeo somministrata nell'arco delle 2 settimane.

13.2.3 DISEGNO DELLO STUDIO

Si è trattato di uno studio prospettico, randomizzato e controllato con placebo, il cui disegno è illustrato in [Figura 1](#). I cani sono stati accoppiati in base al piano di stabulazione esistente (recinti al coperto), e a ogni coppia di cani è stato assegnato un numero e casuale a uno dei tre gruppi di trattamento separati: placebo (gruppo 1, 10 cani; 4 in concomitanza con i cani sottoposti a FMT e 6 cani sottoposti a FMT che sono stati nuovamente arruolati come cani placebo un anno dopo), FMT per clistere (gruppo 2, 6 cani) e FMT orale (gruppo 3, 6 cani). Tutti i sedici cani hanno ricevuto un ciclo di 7 giorni di tilosina orale a circa 20 mg/kg PO q24h (dose mediana 23,1 mg/kg; dose minima e massima 21,1-27,8 mg/kg).

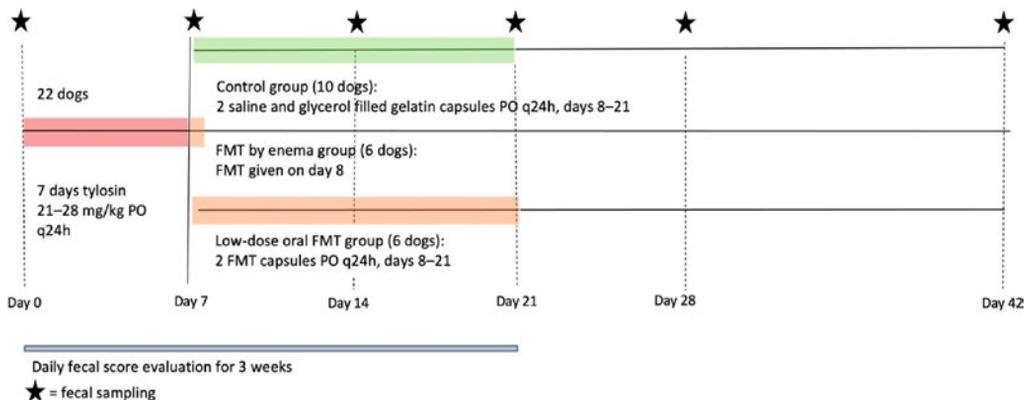


Figura 1. Schema che illustra l'intervento effettuato dallo studio, la durata, le osservazioni e il campionamento. Legenda: FMT; trapianto di microbiota fecale.

Il giorno 8 (D8), il gruppo 2 ha ricevuto un singolo FMT tramite clistere alla dose di 10 mL/kg. I cani sono stati sedati con butorfanolo (0,3 mg/kg IV) e dexmedetomidina (0,004 mg/kg IV) prima della procedura e mantenuti coricati lateralmente per

30 minuti dopo il clistere. Inoltre, a partire dallo stesso giorno, il gruppo 3 ha ricevuto le capsule di gelatina fecale PO una volta al giorno per 2 settimane (dose mediana 2,6 capsule al giorno; range: 2-4). Infine, il gruppo 1 ha ricevuto 2 capsule di gelatina placebo PO una volta al giorno per 2 settimane.

Le feci di ciascun cane sono state raccolte in sei momenti: all'inizio dello studio prima del trattamento antibiotico (D0), l'ultimo giorno di trattamento antibiotico (D7), poi settimanalmente per 3 settimane (D14, D21 e D28) e infine 6 settimane dopo l'inizio degli antibiotici (D42). Le feci sono state inserite in fiale di plastica e immediatamente congelate e conservate a -80 °C. Sono state poi spedite in lotti con ghiaccio secco e analizzate entro 3 mesi dalla raccolta al laboratorio di gastroenterologia del College of Veterinary Medicine della Texas A&M University. La consistenza delle feci di ciascun cane è stata valutata quotidianamente per 3 settimane e ogni volta che le feci sono state raccolte, con un sistema di punteggio fecale a 5 punti (Fecal Scoring System for Dogs, Royal Canin, Aimargues, Francia).

[...]

13.3 I RISULTATI

13.3.1 PUNTEGGI FECALI E OSSERVAZIONE DEL CANE

I punteggi fecali per tutti e 3 i gruppi sono rimasti tra 3,5 (“feci umide che iniziano a perdere la loro forma e le loro fessure”) e 4 (“feci con forma ben definita e fessure visibili, che lasciano pochi residui sul terreno quando vengono raccolte”), durante il periodo iniziale di osservazione giornaliera di 21 giorni (D1-21), così come al D28 e al D42. Non sono state riscontrate differenze significative nei diversi periodi. Tutti i cani che hanno ricevuto il FMT tramite clistere hanno avuto un episodio di diarrea entro 24 ore dalla procedura, che si è risolto senza alcun intervento. Un cane che ha ricevuto il FMT tramite capsule orali

ha vomitato una volta, cosa che è stata poi evitata somministrando una piccola quantità di cibo con le capsule.

Nel corso dello studio diversi cani di tutti e 3 i gruppi hanno mostrato un comportamento coprofago. Tuttavia, poiché i cani erano tenuti in coppie assegnate allo stesso gruppo e i loro recinti venivano puliti quotidianamente, potevano mangiare solo le loro feci dello stesso giorno o quelle del loro compagno di cuccia.

13.3.2 ABBONDANZA DI TAXA BATTERICI E INDICE DI DISBIOSI FECALE

Le IDF iniziali mediane dei gruppi di controllo e di FMT con clistere erano entrambe nell'intervallo equivoco, mentre quella dei cani con FMT orale era nell'intervallo normale. Complessivamente, l'IDE è aumentata oltre il valore 2 durante il trattamento con la tilosina in tutti i gruppi ($p < 0,001$) e si è normalizzata 7 giorni dopo l'interruzione dell'antibiotico in tutti i cani. Diversi cani dei gruppi controllo e clistere FMT presentavano un valore anomalo (>2) in diversi punti temporali tra D14 e D42 (Figura 2).

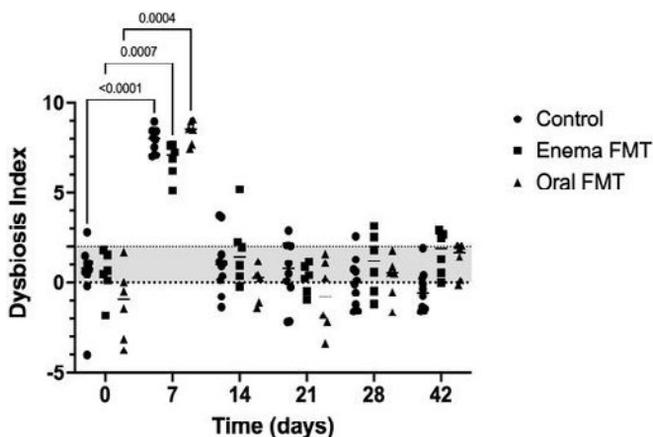


Figura 2. Grafico a punti che rappresenta la variazione dell'indice di disbiosi fecale nei cani di controllo, nei cani che ricevono il FMT tramite clistere e nei cani che ricevono il FMT per via orale durante le 6 settimane di durata dello studio. Legenda: L'indice di disbiosi fecale (IDE) < 0 è considerato normale, mentre un valore compreso tra 0 e 2 è considerato equivoco e l'IDE > 2 è anormale. I punti rappresentano i valori individuali

per ciascun cane, le barre indicano la mediana del gruppo. Sono indicati i confronti statisticamente significativi tra coppie.

I risultati della valutazione quantitativa PCR di 7 *taxa* batterici nelle feci per i primi 14 giorni dello studio sono riportati nella [Tabella 1](#). L'abbondanza di *Blautia* era leggermente diminuita a D7, ma è tornata ai valori iniziali a D14 nei controlli, mentre era invariata a D7 nei cani sottoposti a FMT. Tuttavia, l'abbondanza di *Blautia* è diminuita a D14, 7 giorni dopo l'interruzione della somministrazione di tilosina e FMT nei cani sottoposti a FMT con clistere ($p = 0,0013$). È diminuita anche a D21 dopo 14 giorni di trattamento con capsule orali (6,90; 5,88-7,59 [mediana; intervallo]) rispetto alle abbondanze iniziali (10,2; 9,6-10,6) nei cani con FMT orale ($p = 0,009$). È rimasta invariata rispetto al valore di base in tutti gli altri momenti (dati non mostrati). L'abbondanza di *C. hiranonis* è diminuita drasticamente a D7, ma si è ripresa al 14° giorno in tutti i cani tranne due. Questi due cani di controllo avevano abbondanze fortemente ridotte di 0,01 log DNA/g di feci al D7 e al D14, che sono rimaste basse in modo persistente al D21 e hanno recuperato i valori iniziali al D28 ([Figura 3](#)). L'abbondanza di *E. coli* è aumentata al D7 ma si è normalizzata al D14 nei cani di controllo e nei cani sottoposti a FMT orale. Non è risultata significativamente aumentata al D7 nei cani sottoposti a FMT con clistere ($p = 0,10$). L'abbondanza di *Faecalibacterium* è diminuita significativamente, pur rimanendo nell'intervallo di riferimento del laboratorio al D7 in tutti i cani, e si è ristabilita al D14 nei cani sottoposti a FMT tramite clistere o capsule orali. Era ancora ridotta al D14 e al D21 nei cani di controllo e ha recuperato i valori iniziali solo al D28 ([Figura 4](#)). Le abbondanze di *Fusobacterium* e *Turicibacter* sono diminuite al D7 e si sono riprese al D14 in tutti i cani. Infine, le abbondanze di *Streptococcus* sono rimaste invariate nei controlli e nei cani sottoposti a clistere FMT, mentre sono aumentate al D7 ma si sono riportate ai valori iniziali al D14 nei cani sottoposti a FMT orale.

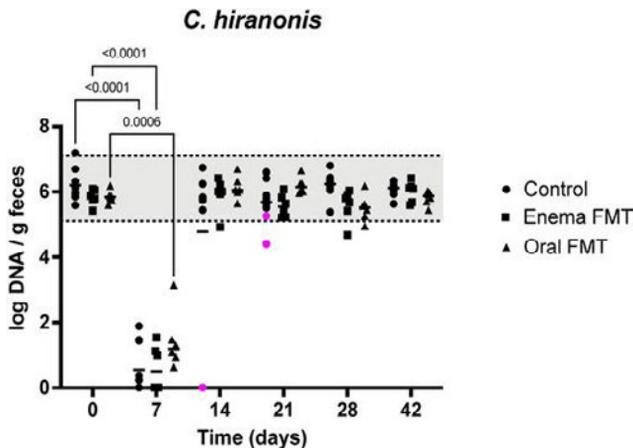


Figura 3. Grafico a punti che rappresenta la variazione dell'abbondanza di *C. hiranonis* nelle feci dei cani di controllo, dei cani che hanno ricevuto il FMT per clistere e dei cani che hanno ricevuto il FMT per via orale durante le 6 settimane di durata dello studio. Legenda: l'area ombreggiata evidenzia l'intervallo di riferimento per l'abbondanza di *C. hiranonis* nelle feci dei cani. I punti rappresentano i valori individuali per ciascun cane, le barre indicano la mediana per il gruppo e il punto temporale. Sono mostrati i confronti statisticamente significativi tra coppie. Il punto magenta identifica 2 cani con abbondanze fecali di *C. hiranonis* identicamente molto basse al giorno 14, che presentavano anche basse concentrazioni di acidi biliari fecali secondari allo stesso tempo (vedi Figura 2). L'abbondanza è rimasta al di sotto dell'intervallo di riferimento in un cane al 21° giorno.

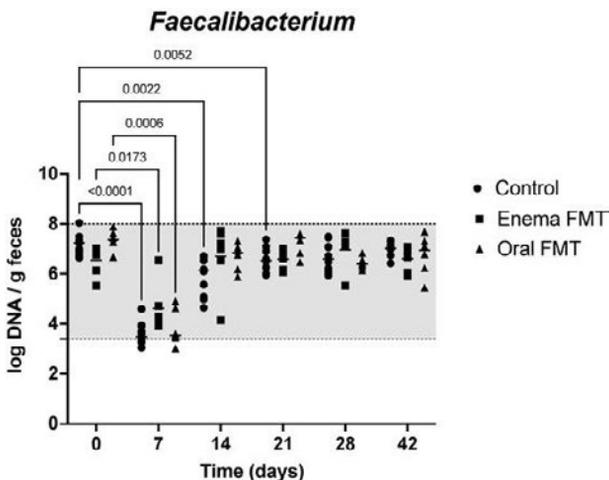


Figura 4. Grafico a punti che rappresenta la variazione dell'abbondanza di *Faecalibacterium* fecale nei cani di controllo, nei cani sottoposti a FMT tramite clistere e nei

cani sottoposti a FMT per via orale nel corso delle 6 settimane di durata dello studio. Legenda: L'area ombreggiata evidenzia l'intervallo di riferimento dell'abbondanza di *Faecalibacterium* nelle feci dei cani. I punti rappresentano i valori individuali per ciascun cane, le barre indicano la mediana per il gruppo e il punto temporale. Sono mostrati i confronti statisticamente significativi con il basale in ciascun gruppo.

	Universale	Blautia	C. hiranonis	Fecalibacterium	Fusobacterium	E. coli	Streptococco	Turicibacter
Intervallo di riferimento #	10.6-11.4	9.5-11.0	5.1-7.1	3.4-8.0	7.0-10.3	0.9-8.0	1.9-8.0	4.6-8.1
Controllo (D0)	11.2 (11.0-11.4)	10.4 (10.0-10.9)	6.1 (5.6-7.2)	7.2 (6.7-8.1)	9.1 (8.5-10.1)	7.3 (5.1-7.6)	8.2 (4.8-8.5)	7.4 (6.1-8.2)
Controllo (D7)	11.1 (10.5-11.4)	9.8 * (8.7-10.2)	0.13 * (0.0-1.9)	3.5 * (3.1-4.6)	7.6 * (7.0-8.0)	8.5 * (7.9-8.9)	7.6 (6.5-8.4)	5.2 * (4.8-5.6)
Controllo (D14)	11.0 (10.2-11.4)	10.2 (9.3-10.6)	5.8 (0.0-6.7)	6.1 * (4.7-6.7)	9.4 (8.7-9.7)	7.1 (6.2-7.7)	7.3 (5.3-8.3)	7.2 (5.5-8.1)
Clistere FMT (D0)	10.5 (10.4-11.0)	10.0 (9.8-10.1)	5.8 (5.4-6.0)	6.8 (5.5-7.0)	8.7 (8.4-9.3)	6.6 (5.6-7.6)	8.0 (5.7-8.8)	7.2 (6.7-8.0)
Clistere FMT (D7)	10.7 (10.7-10.8)	10.0 (9.9-10.5)	0.5 * (0-1.5)	4.2 * (3.9-6.5)	7.7 * (7.4-8.2)	8.0 (7.8-8.8)	7.9 (7.7-8.6)	5.2 * (4.8-5.5)
Clistere FMT (D14)	11.1 * (11.0-11.3)	7.5 * (6.4-8.2)	6.0 (4.9-6.4)	7.1 (4.2-7.7)	8.8 (7.8-9.6)	7.5 (6.4-8.2)	8.5 (7.7-8.9)	7.6 (6.0-8.6)
FMT orale (D0)	11.2 (11.1-11.2)	10.2 (9.6-10.6)	5.8 (5.6-6.2)	7.4 (6.7-7.9)	9.3 (9.0-9.6)	5.9 (5.1-6.7)	6.7 (4.8-7.8)	7.5 (6.2-8.1)
FMT orale (D7)	11.1 (11.0-11.3)	9.5 (6.9-10.3)	1.2 * (0.6-3.1)	3.5 * (3.0-4.9)	7.1 * (6.8-7.5)	8.2 * (8.0-8.5)	8.7 * (8.4-8.9)	5.2 * (5.1-5.5)
FMT orale (D14)	11.1 (10.9-11.3)	10.4 (9.9-11.1)	6.1 (5.6-6.7)	6.8 (5.9-7.3)	9.6 (8.8-10.0)	6.8 (5.5-7.7)	7.6 (6.3-8.1)	7.9 (5.9-8.2)

Tabella 1. Risultati dell'analisi qPCR di 7 taxa batterici nelle feci al basale (D0), alla fine del trattamento con tilosina (D7) e una settimana dopo la sospensione della tilosina (D14). Tutti i dati sono espressi come mediana (minimo-massimo) log DNA/grammo di feci. # Intervalli di riferimento del laboratorio GI del Texas A&M College of Veterinary Medicine per l'analisi qPCR fecale di 7 taxa batterici. D0 = basale, D7 = ultimo giorno di trattamento con tilosina, D14 = 7 giorni dopo la sospensione della tilosina. * Statisticamente diverso da D0 nello stesso gruppo.

13.3.3 CONCENTRAZIONI DI ACIDI BILIARI NELLE FECI

I dati relativi alle concentrazioni di acidi biliari fecali per i primi 14 giorni dello studio sono riassunti nella [Tabella 2](#). Le concentrazioni totali primarie e percentuali di UBA fecali erano notevolmente aumentate al D7 in tutti i gruppi rispetto al basale. Si sono normalizzate in tutti i cani una settimana dopo. Al contrario, le concentrazioni totali e percentuali di UBA secondari fecali erano fortemente diminuite l'ultimo giorno di trattamento con tilosina (D7) in tutti i gruppi rispetto al basale. Tuttavia, sono tornate al valore basale al D14 e non sono risultate diverse dal valore basale in nessuno dei successivi punti di campionamento in nessun gruppo ([Figura 5](#)). I due cani di controllo con concentrazioni di *C. hiranonis* costantemente ridotte al D14 e al D21 mantenevano anche un'alta percentuale di acidi biliari primari (D14: 83,7 e 88,9; D21: 64,7 e 52,8) e una bassa percentuale di acidi biliari secondari (D14: 16,3 e 11,1, rispettivamente; D21: 35,3 e 47,2, rispettivamente) in questi momenti.

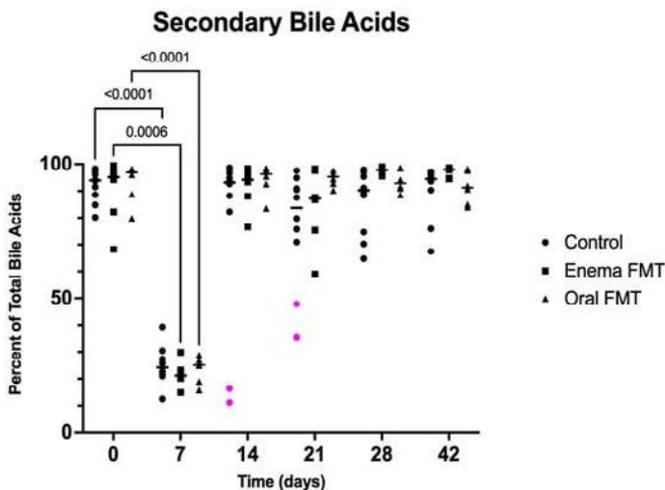


Figura 5. Grafico a punti che rappresenta la percentuale di UBA fecali secondari nei cani di controllo, nei cani che ricevono FMT tramite clistere e nei cani che ricevono FMT per via orale durante le 6 settimane di durata dello studio. Legenda: I punti rappresentano i valori individuali per ciascun cane, le barre indicano le mediane per il

gruppo e il punto temporale. Sono indicati i confronti statisticamente significativi tra coppie. I punti magenta identificano 2 cani con basse concentrazioni percentuali di acidi biliari secondari fecali al giorno 14 che avevano anche abbondanze fecali molto basse di *C. hiranonis* nello stesso periodo (vedi Figura 3). Le concentrazioni percentuali di acidi biliari secondari erano basse anche al giorno 21 in questi due cani.

	Concentrazione totale di UBA (µg/mg)	Concentrazione di UBA primari (µg/mg)	UBA primario Percentuale di UBA totali	Concentrazione di UBA secondari (µg/mg)	UBA secondario Percentuale di UBA totali
Controllo (D0)	2.65 (1.88-4.27)	0.16 (0.05-0.72)	6.1 (1.7-19.8)	2.51 (0.52-4.00)	93.4 (80.2-98.3)
Controllo (D7)	1.79 (1.01-5.03)	1.40 (0.61-4.41) *	75.8 (60.7-87.5) *	0.42 (0.33-0.63) *	24.2 (12.5-39.3) *
Controllo (D14)	3.38 (1.34-7.31)	0.24 (0.07-3.45)	6.9 (1.3-88.9)	2.41 (0.43-7.07)	93.1 (11.1-98.7)
Clistere FMT (D0)	2.46 (1.18-5.75)	0.15 (0.03-0.49)	4.9 (0.5-31.8)	2.20 (0.80-5.72)	95.1 (68.2-99.4)
Clistere FMT (D7)	2.02 (1.37-4.01)	1.56 (1.09-3.37) *	78.8 (70.1-85.2) *	0.46 (0.28-0.81) *	21.2 (14.8-29.9) *
Clistere FMT (D14)	4.00 (1.26-4.39)	0.16 (0.03-0.88)	5.9 (1.6-23.4)	3.34 (1.23-4.32)	94.1 (76.6-98.4)
FMT orale (D0)	3.15 (1.09-4.01)	0.11 (0.04-0.79)	3.1 (1.7-20.1)	3.02 (0.97-3.92)	96.9 (79.9-98.9)
FMT orale (D7)	2.14 (1.44-3.61)	1.69 (1.08-2.70) *	74.9 (71.1-84.3) *	0.53 (0.35-0.91)*	25.1 (15.7-28.9) *
FMT orale (D14)	3.33 (2.14-4.81)	0.16 (0.06-0.35)	3.7 (1.5-16.6)	3.19 (1.79-4.70)	96.3 (83.4-98.5)

Tabella 2. Concentrazioni fecali di UBA totali e concentrazioni fecali totali e relative di UBA primari e secondari al basale (D0), alla fine del trattamento con tilosina (D7) e 1 settimana dopo la sospensione della tilosina (D14). Tutti i dati sono espressi come mediana (minimo-massimo). D0 = basale, D7 = ultimo giorno di trattamento con tilosina, D14 = 7 giorni dopo la sospensione della tilosina. * Statisticamente diverso da D0 nello stesso gruppo.

13.4 DISCUSSIONE

I principali risultati del nostro studio possono essere riassunti come segue: in primo luogo, è stato confermato l'impatto immediato della tilosina sul microbioma fecale e sul profilo degli acidi biliari dei cani sani, anche se questi effetti non erano così duraturi come documentato in precedenza [4,7]. In secondo luogo, è stato possibile rilevare solo differenze positive marginali nel recupero del microbioma nelle feci dei cani sottoposti a FMT.

Due studi precedenti hanno riportato gli effetti della tilosina sul microbioma fecale e sul metaboloma dei cani. Suchodolski et al. (2009) hanno somministrato la tilosina alla stessa dose uti-

lizzata da noi (20-25 mg/kg PO q24h) a cani di razza con una fistola digiunale preesistente [4]. Hanno prelevato campioni dalla mucosa digiunale prima, durante e 14 giorni dopo il trattamento antibiotico per valutare le variazioni del microbiota aderente alla mucosa mediante pirosequenziamento. Hanno notato una diminuzione di numerosi *taxa* batterici e un aumento relativo di *E. coli* intrinsecamente resistente alla tilosina (che è aumentato anche nel presente studio) e di *C. perfringens* (che non abbiamo valutato) l'ultimo giorno di trattamento, che in alcuni cani è persistito per altre 2 settimane. Quello studio si è concentrato sul microbiota mucoso-associato dell'intestino tenue, mentre il nostro studio ha analizzato il microbiota luminale dell'intestino crasso. L'impatto della stessa dose di tilosina potrebbe essere stato diverso in queste comunità microbiche separate, rif. [1] inoltre le tecniche utilizzate erano molto diverse. Di conseguenza i risultati dei due studi non sono facilmente confrontabili. Manchester et al. (2019) hanno somministrato la tilosina a una dose giornaliera doppia rispetto alla nostra, a cani da compagnia sani reclutati in un ospedale universitario [7]. Come nel nostro studio, l'analisi qPCR ha mostrato un impatto importante dell'antibiotico alla fine del trattamento, con una diminuzione delle abbondanze di *Blautia*, *C. hiranonis*, *Faecalibacterium*, *Fusobacterium* e *Turicibacter*, con un recupero della maggior parte di questi *taxa* 2 settimane dopo la sospensione dell'antibiotico. Tuttavia, *Fusobacterium* è tornato alle normali abbondanze solo 8 settimane dopo la sospensione della tilosina. Inoltre, non è stato documentato alcun effetto della tilosina sull'abbondanza di *E. coli*, a differenza del presente studio in cui è aumentata alla fine del trattamento con tilosina in 2 dei 3 gruppi, ma è tornata ai valori iniziali 1 settimana dopo. Inoltre, l'IDE nei loro cani è rimasta aumentata rispetto al basale 2 settimane dopo l'interruzione della tilosina ed è tornata ai valori iniziali alla misurazione successiva, 6 settimane dopo. Tuttavia, gli autori non hanno fornito dati sull'evoluzione del microbiota fecale tra le 2 e le 8 settimane dopo l'interruzione della tilosina e questo rende difficile un confronto preciso tra i risultati dei due studi.

In un altro studio pubblicato di recente, Pilla et al. hanno analizzato gli effetti di un trattamento con metronidazolo di 2 settimane sul microbiota fecale di cani da compagnia sani [8]. L'IDE è aumentato significativamente durante le 2 settimane di trattamento antibiotico, ma non era significativamente più alto dei valori iniziali a 2 e 4 settimane dopo l'interruzione dell'antibiotico, anche se i valori mediani rimanevano nell'intervallo equivoco e alcuni cani presentavano una disbiosi persistente, come indicato da un IDE > 2. Come nel caso della tilosina nel presente studio, le abbondanze di *C. hiranonis*, *Faecalibacterium*, *Fusobacterium* e *Turicibacter* sono diminuite durante il trattamento con metronidazolo, mentre quelle di *E. coli* e *Streptococcus* sono aumentate. Tuttavia, le abbondanze di questi 7 taxa batterici non erano diverse dai valori iniziali 2 settimane dopo la sospensione degli antibiotici. A differenza del nostro studio, quello di Pilla et al. non ha valutato il microbiota fecale una settimana dopo la sospensione del trattamento.

Sia il lavoro di Manchester et al. che quello di Pilla et al. includevano una valutazione più approfondita del microbioma fecale attraverso il sequenziamento dei geni 16S rRNA [7,8]. L'alfa-diversità, la ricchezza e la diversità delle specie sono diminuite durante la somministrazione di antibiotici, per poi tornare ai valori di base 2-8 settimane dopo. Tuttavia, la beta-diversità (diversità tra i campioni) è rimasta significativamente diversa dal valore di base fino a 8 settimane dopo la sospensione degli antibiotici. Inoltre, è stato registrato un cambiamento nelle comunità microbiche dei campioni fecali per tutti i tempi di campionamento, che persiste fino a 4-8 settimane dopo la sospensione degli antibiotici. Il sequenziamento non è stato eseguito nel presente studio e avrebbe potuto dimostrare ulteriori differenze tra i controlli e i cani sottoposti a FMT.

Un terzo studio ha valutato gli effetti dell'amoxicillina con o senza acido clavulanico su cani a cui era stato prescritto un ciclo di 5-7 giorni di questi antibiotici per varie malattie in 2 cliniche per animali da compagnia [10]. I campioni fecali sono stati raccolti durante il trattamento e una settimana dopo la sua sospen-

sione. L'alfa-diversità del microbiota fecale è diminuita durante il trattamento, seguita da un ritorno alle condizioni precedenti il trattamento una settimana dopo la sua conclusione. Inoltre, durante il trattamento si è verificato un aumento di *E. coli* ed enterococchi resistenti all'ampicillina [10]. Quest'ultimo dato è stato confermato in uno studio su cani con diarrea acuta a cui sono stati somministrati amoxicillina e acido clavulanico per 7 giorni [25].

Nel presente studio le concentrazioni fecali totali e percentuali di UBA primari sono aumentate, mentre quelle di UBA secondari sono diminuite alla fine del trattamento con la tilosina e si sono ristabilite una settimana dopo la sospensione della tilosina. Ciò è simile a quanto accaduto in seguito alla somministrazione di metronidazolo [8]. Tuttavia, il lavoro di Manchester et al. ha mostrato un aumento delle concentrazioni fecali di UBA primari che è persistito per 8 settimane dopo la sospensione dell'antibiotico [7]. Le concentrazioni totali di UBA fecali non sono variate in nessuno di questi studi. Una forte correlazione tra *C. hiranonis* e UBA fecali secondari è stata precedentemente descritta nei cani, in quanto *C. hiranonis* esprime un'elevata attività di 7 β -deidrossilazione, che è correlata alla conversione di UBA primari in secondari [8,26,27]. Questi ultimi hanno la capacità di modulare la composizione del microbiota intestinale sia direttamente che indirettamente, attraverso l'attivazione del sistema immunitario innato, e di influenzare il metabolismo dell'ospite attraverso la segnalazione dei recettori degli acidi biliari [16,28]. Pertanto, una diminuzione delle concentrazioni fecali di UBA secondari, come avviene nei cani sani che ricevono antibiotici, può potenzialmente contribuire ulteriormente alla disbiosi intestinale e compromettere l'omeostasi del metabolismo dell'ospite.

La maggiore resistenza del microbiota fecale alla tilosina nel nostro studio potrebbe essere dovuta al diverso regime di dosaggio della tilosina. Non sono disponibili studi farmacocinetici per la somministrazione orale, tuttavia una dose di 10 mg/kg per via endovenosa da 12 a 24 ore è risultata efficace contro *Pasteurella* sensibile e *Staphylococcus* spp. emolitico nei cani [29]. Inoltre, le

dosi fino a 5 mg/kg PO hanno avuto successo nel trattamento della diarrea cronica sensibile alla tilosina, presumibilmente attraverso la modulazione del microbioma intestinale [30]. Le dosi di tilosina per somministrazione orale elencate nei libri di testo di farmacoterapia variano da 5 a 80 mg/kg con un intervallo di dosaggio da una a tre volte al giorno [11]. Inoltre, il fatto che i nostri cani facessero parte di una colonia didattica e non di cani da compagnia come in studi recenti che hanno analizzato gli effetti degli antibiotici sul microbiota fecale può aver influenzato la resilienza del loro microbiota intestinale [7,8,10]. I fattori ambientali, come la dieta, possono svolgere un ruolo importante, come dimostrato da un recente studio in cui la dieta dell'ospite ha avuto un forte impatto sulla risposta di specifici *taxa* batterici alla somministrazione di antibiotici nei topi [31]. I cani tenuti in colonia hanno uno stile di vita più controllato, con un livello costante di attività e di dieta, rispetto ai cani da compagnia, ed è ipotizzabile che questo ambiente stabile possa influenzare positivamente la resilienza del loro microbioma intestinale alle perturbazioni a breve termine [32]. Tuttavia, questa ipotesi non è supportata dall'effetto prolungato (2 settimane o più) della tilosina su diversi *taxa* batterici del microbiota aderente alla mucosa in una parte dei beagle di laboratorio con fistola digiunale [4]. Infine, alcuni cani inclusi nel nostro studio avevano un comportamento coprofago, che potrebbe rappresentare un altro fattore confondente. Studi condotti su piccoli roditori hanno dimostrato che la prevenzione della coprofagia può alterare in modo significativo il microbioma e il metaboloma del loro intestino tenue e crasso, con possibili ripercussioni sulla loro salute [33,34]. I nostri cani sono stati tenuti in coppia ed entrambi i cani sono stati assegnati allo stesso gruppo di trattamento per ridurre al minimo la potenziale interferenza della coprofagia sullo studio. Tuttavia, è impossibile escludere che la coprofagia abbia in qualche modo influenzato la resilienza del loro microbioma fecale.

Abbiamo riscontrato che il FMT è una procedura ben tollerata. La dose di soluzione fecale per kg di peso corporeo del ricevente per il FMT tramite clistere è stata adattata da uno studio

condotto su pazienti umani ed è equivalente a circa 2 g di feci del donatore per kg di peso corporeo [24]. Da allora, altri hanno utilizzato dosi più elevate di 2,5-5 g di feci per kg con successo in casi clinici [9]. Tuttavia, ad oggi non è stata determinata la dose ideale di FMT somministrata ai cani tramite clistere [21]. Inoltre, abbiamo adattato la dose orale di FMT a 1 g di feci del donatore per kg di peso corporeo, distribuita in un periodo di 2 settimane. Nel nostro studio, le feci del donatore sono state lasciate a temperatura ambiente per un massimo di 12 ore. Sebbene non vi siano dati relativi alle feci canine, la conservazione a temperatura ambiente di feci umane e feline non ha influito sul numero di unità tassonomiche operative, sulla diversità o sulla ricchezza del microbioma fecale [35,36].

I cambiamenti nelle abbondanze della maggior parte dei *taxa* batterici testati sono stati di breve durata in tutti i cani; tuttavia, l'abbondanza di *Faecalibacterium* nei cani di controllo è risultata significativamente ridotta rispetto al valore di base per 2 settimane dopo la sospensione della tilosina, ma è rimasta entro l'intervallo di riferimento del laboratorio. Questo cambiamento persistente non è stato osservato nei cani che hanno ricevuto il FMT tramite clistere o per via orale, che hanno mostrato una diminuzione dell'abbondanza di *Faecalibacterium* solo alla fine del trattamento con la tilosina. Il *Faecalibacterium* produce peptidi antinfiammatori [37], e acidi grassi a catena corta (SCFA) dai carboidrati alimentari, e gli SCFA agiscono come nutrienti per gli enterociti e hanno molte altre proprietà per mantenere la salute dell'intestino [3]. Tuttavia, nel complesso, questi risultati non dimostrano un chiaro effetto positivo del FMT nei cani affetti da disbiosi intestinale indotta dalla tilosina. Non possiamo escludere che le fluttuazioni nelle abbondanze di *Faecalibacterium* possano essersi verificate in modo casuale, come apparentemente è avvenuto per *Blautia* in determinati punti temporali. È importante notare che il modello utilizzato nel presente studio non era ottimale per valutare gli effetti del FMT, poiché la maggior parte dei parametri del microbioma e del metaboloma misurati si sono normalizzati rapidamente dopo la sospensione della tilosina.

Il nostro studio non ha incluso un'analisi completa del microbioma e del metaboloma fecale. Perciò non abbiamo ottenuto dati sulla diversità alfa e beta del microbioma né su altri *phyla* e *taxa* batterici oltre a quelli da noi riportati. Tuttavia alcuni studi precedenti hanno dimostrato una buona correlazione tra IDE e diversità alfa e beta [8,27]. Inoltre la nostra analisi metabolomica era limitata agli UBA fecali. Ulteriori dati avrebbero potuto rivelare un effetto più profondo e duraturo del trattamento antibiotico e mostrare un miglioramento di questi parametri dopo il FMT.

In sintesi, il presente studio ha replicato la maggior parte dei cambiamenti nel microbiota fecale e negli acidi biliari che erano stati documentati in studi recenti condotti con tilosina, metronidazolo o amoxicillina e acido clavulanico in cani sani. Però la maggior parte di questi parametri è tornata ai valori basali una settimana dopo l'interruzione degli antibiotici e ciò suggerisce che la durata dell'efficacia degli antibiotici orali può variare in base al regime di dosaggio e all'ambiente e allo stile di vita dei cani. Inoltre, il FMT somministrato tramite clistere o per via orale è stato ben tollerato. Tuttavia, dato il ritorno al valore di base dell'IDE e degli UBA dopo la sospensione degli antibiotici, ciò non ha accelerato il recupero di questi parametri. Questi risultati preliminari dovrebbero essere alla base di ulteriori studi che valutino l'effetto dell'FMT in seguito a perturbazioni spontanee o iatrogene del microbioma intestinale nei cani.

LE FONTI DI QUESTO NUMERO

Li Q, Larouche-Lebel E, Loughran KA, Huh TP, Suchodolski JS, Oyama MA. 2021. Gut, dysbiosis and its associations with gut microbiota-derived metabolites in dogs with myxomatous mitral valve disease. *mSystems* 6: e00111-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems-21>.

Tratto da **mSYSTEMS** - mSystems® pubblica tutte le scoperte biologiche e biochimiche più importanti derivanti dall'analisi di grandi insiemi di dati, nonché nuovi approcci computazionali per ricavare queste conoscenze. mSystems accoglie le proposte di ricercatori che si concentrano sul microbioma, sulla genomica, sulla metagenomica, sulla trascrittomica, sulla metabolomica, sulla proteomica, sulla glicomica, sulla bioinformatica e sulla microbiologia computazionale. mSystems consente di prendere decisioni più rapide, pur portando avanti la tradizione di rigorosa revisione paritaria dell'American Society of Microbiology.

Wernimont SM, Radosevich J, Jackson MI, Ephraim E, Badri DV, MacLeay JM, Jewell DE and Suchodolski JS (2020) The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. *Front. Microbiol.* 11:1266. doi: 10.3389/fmicb.2020.01266

Tratto da **FRONTIERS IN MICROBIOLOGY** - È una rivista leader nel suo settore, che pubblica ricerche rigorosamente sottoposte a peer-review nell'intero spettro della microbiologia. Questa rivista multidisciplinare open access è all'avanguardia nel diffondere e comunicare le conoscenze scientifiche e le scoperte d'impatto a ricercatori, accademici, clinici e pubblico di tutto il mondo.

Marsilio, S., Pilla, R., Sarawichitr, B. et al. Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma. *Sci Rep* 9, 19208 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55691-w>

Kieler, I.N., Osto, M., Hugentobler, L. et al. Diabetic cats have decreased gut microbial diversity and a lack of butyrate producing bacteria. *Sci Rep* 9, 4822 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41195-0>

Tratti da **SCIENTIFIC REPORTS** - Scientific Reports è una rivista open access che pubblica ricerche originali in tutte le aree delle scienze naturali, della psicologia, della medicina e dell'ingegneria. Scientific Reports è la quinta rivista più citata al mondo, con oltre 696.000 citazioni nel 2021.

Stavroulaki EM, Suchodolski JS, Pilla R, Fosgate GT, Sung C-H, Lidbury JA, et al. (2021) Short- and long-term effects of amoxicillin/ clavulanic acid or doxycycline on the gastrointestinal microbiome of growing cats. *PLoS ONE* 16(12): e0253031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253031>

Tratto da **PLoS ONE** - Plos One accoglie le proposte di ricerca originali provenienti dalle scienze naturali, dalla ricerca medica, dall'ingegneria, nonché dalle scienze sociali e umanistiche correlate, tra cui ricerche primarie che contribuiscono alla base delle conoscenze scientifiche, revisioni sistematiche, presentazioni e ricerche qualitative che rispettino le linee guida per la progettazione e la presentazione degli studi.

Pilla R and Suchodolski JS (2020) The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Front. Vet. Sci.* 6:498. doi: 10.3389/fvets.2019.00498

Chaitman J, Ziese A-L, Pilla R, Minamoto Y, Blake AB, Guard BC, Isaiah A, Lidbury JA, Steiner JM, Unterer S and Suchodolski JS (2020) Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole. *Front. Vet. Sci.* 7:192. doi: 10.3389/fvets.2020.00192

Tratti da **FRONTIERS IN VETERINARY SCIENCE** - È una rivista globale, peer-reviewed, ad accesso libero, che collega la salute degli animali e dell'uomo, offre un approccio comparativo alle sfide mediche e chirurgiche e promuove biotecnologie

e terapie innovative. *Frontiers in Veterinary Science* pubblica articoli su scoperte eccezionali in un ampio spettro di ricerca traslazionale, fondamentale e clinica.

Leverett, K.; Manjarín, R.; Laird, E.; Valtierra, D.; Santiago-Rodriguez, T.M.; Donadelli, R.; Perez-Camargo, G. Fresh Food Consumption Increases Microbiome Diversity and Promotes Changes in Bacteria Composition on the Skin of Pet Dogs Compared to Dry Foods. *Animals* 2022, 12, 1881. <https://doi.org/10.3390/ani12151881>

Rochegüe, T.; Haenni, M.; Mondot, S.; Astruc, C.; Cazeau, G.; Ferry, T.; Madec, J.-Y.; Lupo, A. Impact of Antibiotic Therapies on Resistance Genes Dynamic and Composition of the Animal Gut Microbiota. *Animals* 2021, 11, 3280. <https://doi.org/10.3390/ani11113280>

Tratti da **ANIMALS** - *Animals* è una rivista internazionale, peer-reviewed, open access, interamente dedicata agli animali, comprese la zoologia e le scienze veterinarie, pubblicata semestralmente online da MDPI. La World Association of Zoos and Aquariums (WAZA), l'European College of Animal Welfare and Behavioural Medicine (ECAWBM) e la Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) sono affiliate ad *Animals* e i loro membri ricevono uno sconto sulle spese di elaborazione degli articoli.

Takáčová, M.; Bomba, A.; Tóthová, C.; Michál'ová, A.; Turčína, H. Any Future for Faecal Microbiota Transplantation as a Novel Strategy for Gut Microbiota Modulation in Human and Veterinary Medicine? *Life* 2022, 12, 723. <https://doi.org/10.3390/life12050723>

Tratto da **LIFE** - È una rivista scientifica internazionale, peer-reviewed e open access, che tratta temi fondamentali delle scienze della vita. I campi di ricerca di interesse includono, ma non si limitano a: vita artificiale, biochimica, biologia cellulare, biologia molecolare e virologia.

Marclay, M.; Dwyer, E.; Suchodolski, J.S.; Lidbury, J.A.; Steiner, J.M.; Gaschen, F.P. Recovery of Fecal Microbiome and Bile Acids in Healthy Dogs after Tylosin Administration with and without Fecal Microbiota Transplantation. *Vet. Sci.* 2022, 9, 324. <https://doi.org/10.3390/vetsci9070324>

Tratto da **VETERINARY SCIENCES** - Veterinary Sciences è una rivista scientifica internazionale e interdisciplinare open access. Pubblica articoli originali che riguardano qualsiasi campo delle scienze veterinarie, tra cui la prevenzione, la diagnosi e il trattamento di malattie, disturbi e lesioni negli animali. I campi di ricerca di interesse includono, ma non solo: anestesiologia, anatomia, batteriologia, immunologia, microbiologia, biologia molecolare, oncologia, oftalmologia, farmacologia, fisiologia, radiologia, chirurgia, tossicologia, virologia.

Suchodolski, J. Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. *Vet Clin Pathol.* 2022; 50 (Suppl. 1): 6- 17. <https://doi.org/10.1111/vcp.13031>

Tratto da **VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY** - È la rivista ufficiale dell'American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) e della European Society of Veterinary Clinical Pathology (ESVCP). Accoglie ricerche sperimentali originali e contributi clinici che coinvolgono specie domestiche, di laboratorio, aviarie e selvatiche nelle aree dell'ematologia, dell'emostasi, dell'immunopatologia, della chimica clinica, della citopatologia, della patologia chirurgica, della tossicologia, dell'endocrinologia, delle tecniche di laboratorio e di analisi, della strumentazione, della garanzia di qualità e della formazione in patologia clinica.

Zhao, Ruonan, Hao, Jie, Yang, Jintao, Tong, Cuihong, Xie, Longfei, Xiao, Danyu, Zeng, Zhenling, and Xiong, Wenguang. 2022. "The Co-Occurrence of Antibiotic Resistance Genes Between Dogs and their Owners in Families." *iMeta* 1, e21. <https://doi.org/10.1002/imt2.21>

Tratto da **iMeta** - È una rivista open access e partner di Wiley, lanciata da scienziati dell'Accademia cinese delle scienze.

La rivista si propone di promuovere lo sviluppo della metagenomica e della bioinformatica pubblicando ricerche originali, metodi o protocolli riproducibili e recensioni sistematiche. L'obiettivo è quello di pubblicare articoli ad alto impatto con un'ampia gamma di lettori e di fornire ai colleghi nuove scoperte, strumenti di analisi facili da usare e conoscenze sistematiche.