



MICROBIOTA INTESTINALE ANIMALE

Microbiota e Microbioma

L'intestino è un "organo metabolico", un biosistema unico caratterizzato dalla presenza di migliaia di tipi diversi di microbi che convivono ed interagiscono attivamente con l'organismo ospite, intervenendo nella regolazione di numerose funzioni sistemiche e aventi un ruolo cruciale nella diagnosi di numerose malattie gastrointestinali.

La comunità scientifica internazionale ha concordato nel definire **microbiota** tutti organismi microbici presenti in un particolare ambiente, mentre col termine **microbioma**, ci si riferisce all'informazione genetica insita nel microbiota stesso. Si stima che il microbiota dei mammiferi contenga circa 10^{14} cellule batteriche, un numero che è dieci volte superiori al numero delle cellule costituenti l'organismo.

I batteri colonizzano virtualmente ogni superficie del corpo esposto all'ambiente esterno: quindi troveremo un microbiota diverso a livello genito-urinario, respiratorio e cutaneo.

L'organo maggiormente colonizzato dai batteri è sicuramente l'apparato gastro intestinale che ospita tra 500 e 1000 differenti specie di batteri oltre a archeobatteri, funghi, protozoi e virus. Si stima, infatti, che il colon da solo contenga più del 70% di tutti i microorganismi presenti nel corpo dell'ospite.

Alcuni membri del microbiota sono considerati elementi autoctoni, mentre altri possono introdursi ex novo in seguito a modificazioni dietetiche e/o ambientali.

Oltre alla composizione del microbiota materno, la genetica dell'ospite pare contribuisca particolarmente nello sviluppo della flora batterica del nascituro: ad esempio, topi contenenti una mutazione genetica nell'elemento principale delle lipoproteine ad alta densità (apolipoproteina a-I), hanno un microbiota alterato rispetto a topi non mutati.

Inoltre è stato dimostrato come la composizione della dieta possa influenzare lo stato di benessere dell'animale, inducendo rapidi e importanti cambiamenti all'interno delle popolazioni batteriche che coabitano l'intestino dei mammiferi; ora l'uso di sostanze prebiotiche in nutrizione umana e animale rappresenta una delle strategie maggiormente impiegate e di riconosciuta efficacia per modulare positivamente la composizione e il metabolismo dell'ecosistema gastroenterico.

Ulteriormente, i rapporti che si stabiliranno tra microrganismo e ospite possono essere diversi secondo il beneficio che ne deriva per l'ospite. Il microbiota costituisce, infatti, parte della barriera intestinale, una struttura atta a difendere l'ospite dall'invasione dei patogeni. Il meccanismo di difesa si basa sull'instaurarsi di una



competizione diretta tra microorganismi, attraverso la sottrazione di nutrienti, l'occupazione preventiva dei siti di adesione a livello di mucosa e la produzione di sostanze ad azione antimicrobica.

In particolare il rapporto tra il microbiota intestinale e l'ospite è generalmente indicato come "commensale" (entrambi convivono in equilibrio), piuttosto che "mutualistico": in altre parole entrambi traggono beneficio dalla loro interazione. Più nello specifico, i batteri costituenti il microbiota usufruiscono di condizioni di vita ottimali all'interno dell'intestino animale, grazie principalmente alla grande disponibilità di nutrienti e alle temperature favorevoli. In cambio però i batteri svolgono tre funzioni tipiche a vantaggio dell'ospite:

1. Funzioni Metaboliche, in particolare
 - **Produzione vitamine**
 - **Biosintesi di aminoacidi**
 - **Bio-trasformazione della bile**
 - **Fermentazione di substrati non digeribili**
 - **Regolazione metabolica dell'ospite, produzione di Acidi grassi a corta catena**
 - **Detossificazione di tossici introdotti con la dieta o neoformati in seguito all'attività metabolica dell'ospite o dei microorganismi stessi.**
2. Funzioni Protettive quali
 - **Resistenza alla colonizzazione**
 - **Attivazione dell'immunità innata e adattativa**
 - **Regolazione delle citochine infiammatorie**
 - **Funzione d'immunomodulazione antiinfiammatoria**
 - **Sottrazione di ammoniaca e amine, destinate alla sintesi proteica batterica, con conseguente riduzione dell'assorbimento intestinale delle stesse.**
3. Funzioni strutturali e Istologiche
 - **Crescita delle cellule epiteliali e regolazione della differenziazione**
 - **Sviluppo dei villi intestinali e delle cripte**
 - **Micro vascolarizzazione dei villi**
 - **Permeabilità delle giunzioni delle cellule tissutali**
 - **Formazione degli strati di muco**

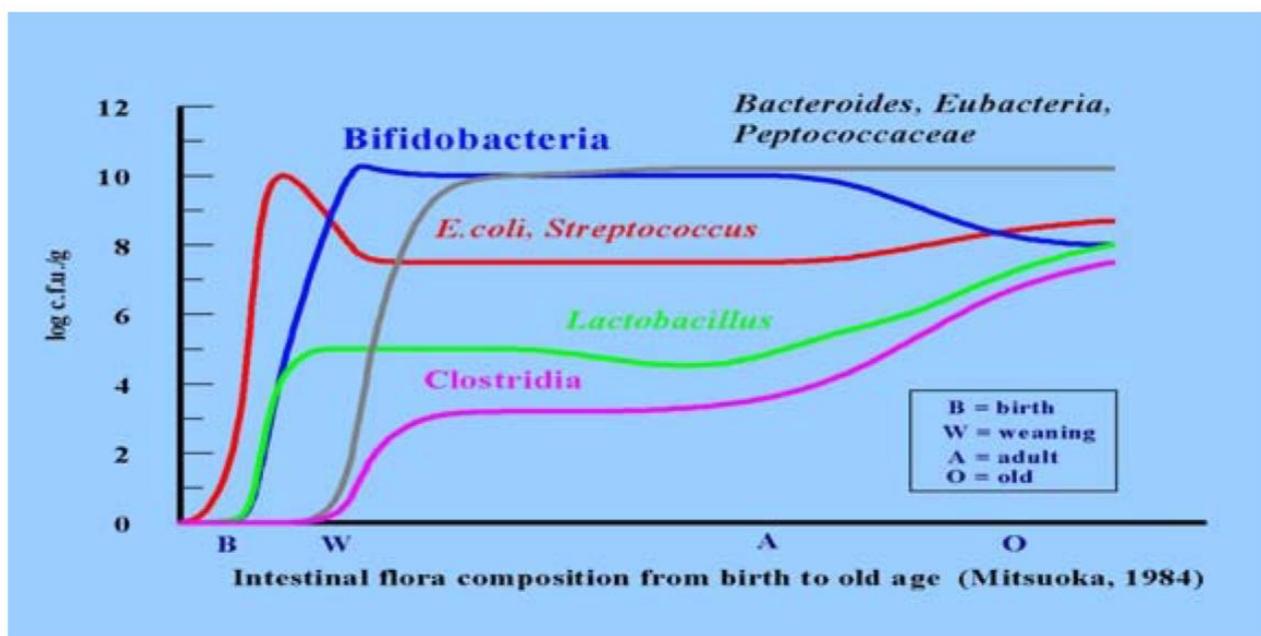
Pertanto è possibile osservare come la colonizzazione microbica del tratto digerente deriva dall'interazione tra ospite e ambiente. Si tratta di un equilibrio "fragile" e mutevole che permette, tuttavia, di mantenere in salute l'apparato gastro-intestinale. Un'elevata biodiversità di specie è necessaria per il mantenimento dell'omeostasi e per la stabilità strutturale della comunità microbica: la diminuzione delle specie batteriche a causa di un trattamento antibiotico o per l'avanzare dell'età riduce la capacità dell'ecosistema di "opporsi" ai



microrganismi patogeni e favorisce il sopravvento di specie particolarmente attive che diventeranno così “parassiti” piuttosto che commensali.

Alla nascita il tratto gastroenterico è sterile ma, con il passaggio attraverso il canale del parto e il passare delle ore, inizia ad arricchirsi di numerose specie batteriche provenienti dall’ambiente circostante e dal latte materno. Durante le prime settimane di vita predominano le specie aerobiche, mentre nell’intestino dell’animale adulto e in seguito anziano, sembrano prevalere le popolazioni anaerobiche e la diversità delle varie specie batteriche sembra ridursi, probabilmente per i cambiamenti strutturali e funzionali dell’intestino stesso.

Il microbiota intestinale è pertanto destinato a evolversi nel tempo: si sostiene quindi che il microbiota sia atto al supporto di alcune funzioni nelle prime fasi di vita mentre nelle ultime esso contribuisca alla morte dell’ospite. Per esempio è emerso che il microbioma possiede un potenziale oncogenico che si esplicita in relazione all’età dell’individuo causando l’aumento della proliferazione cellulare e producendo metaboliti pro-mutageni.

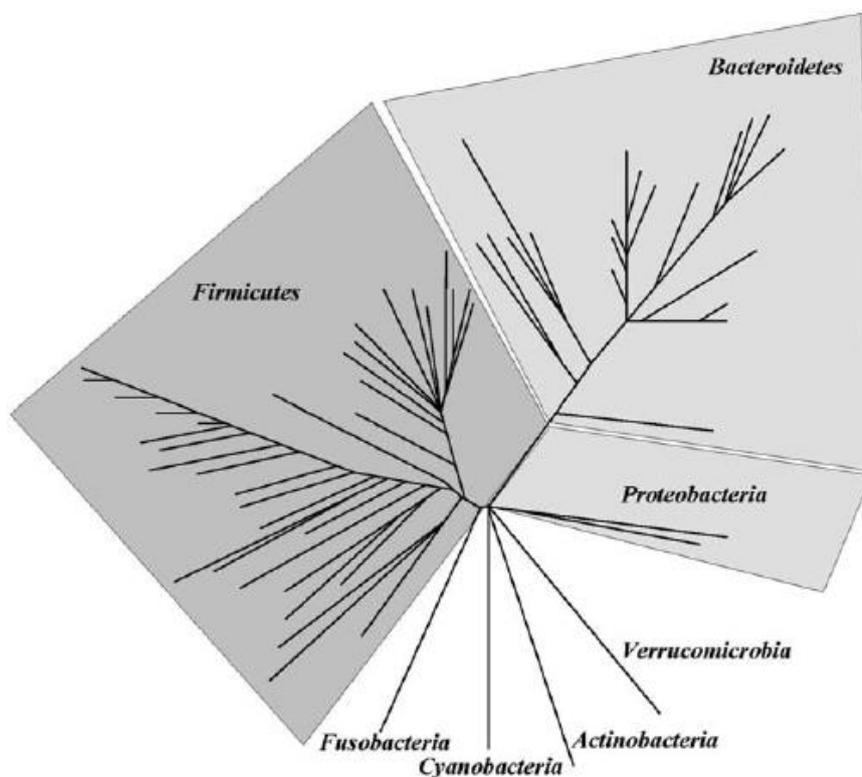


Rispetto all’uomo e ad altre specie d’interesse zootecnico, cane e gatto si sono evoluti come specie carnivore sviluppando un tratto gastroenterico relativamente semplice composto di almeno cinque Phyla batterici:

1. batteri appartenenti al Phylum dei Bacteroides



2. batteri appartenenti al Phylum dei Firmicutes
3. batteri appartenenti al Phylum dei Fusobatteri
4. batteri appartenenti al Phylum degli Actinobatteri
5. in percentuale minore e solo occasionalmente si possono riscontrare batteri appartenenti al Phylum dei Tenericutis e delle Spirochete.



Tecniche di caratterizzazione del Microbiota intestinale

A causa degli evidenti limiti dei tradizionali metodi di coltura batterica su piastra, le tecniche di biologia molecolare sono diventate il nuovo standard nello studio del microbiota intestinale. Numerosi “*molecular tools*” atti a studiare la filogenesi e identificare i batteri utilizzano come “marker molecolare” il gene 16S rRNA, la cui caratteristica peculiare risiede nella presenza di regioni a diverso grado di conservazione, ossia:



- regioni conservate universali, che possiedono la stessa sequenza in tutti i batteri;
- regioni semi conservate, possiedono sequenza identica tra batteri dello stesso taxon;
- regioni variabili, in cui batteri della stessa specie possiedono la medesima sequenza.

Il rapporto tra regioni conservate e variabili permette quindi di discriminare tra le differenti specie batteriche, identificarle e assegnarle correttamente a un determinato gruppo filogenetico.

Le tecniche di sequenziamento cosiddette “next-generation” (454 pyrosequencing, Illumina) correntemente utilizzate, sfruttano il metodo *shotgun*, che si basa sul clonaggio di frammenti multipli di piccole dimensioni per poi ricostruire la sequenza di contigui definitiva. Le sequenze simili sono raggruppate in OTU (*Operational Taxonomic Unit*); esse rappresentano un modo per distinguere le specie e classificare le sequenze nucleotidiche in diversi livelli tassonomici. L'abbondanza delle diverse OTU è poi stimata sulla base del numero di sequenze corrispondenti.

Un'importante caratteristica del microbiota intestinale è il livello di diversificazione in termini tassonomici dei gruppi batterici presenti definita come **biodiversità**. Come detto, più le specie di batteri presenti nell'ecosistema intestinale sono numerose e più l'organismo ospite godrà di buona salute. La valutazione della biodiversità delle specie batteriche all'interno del microbiota è condotta mediante approfondite analisi statistiche;

Riassumendo, possiamo classificare la biodiversità in:

- “**alfa**” che definisce la struttura e la complessità di un determinato habitat e con essa si spiega dunque la diversità osservata tra le specie di un dato sito;
- “**beta**” mostra le differenze osservate tra specie appartenenti a habitat distinti.

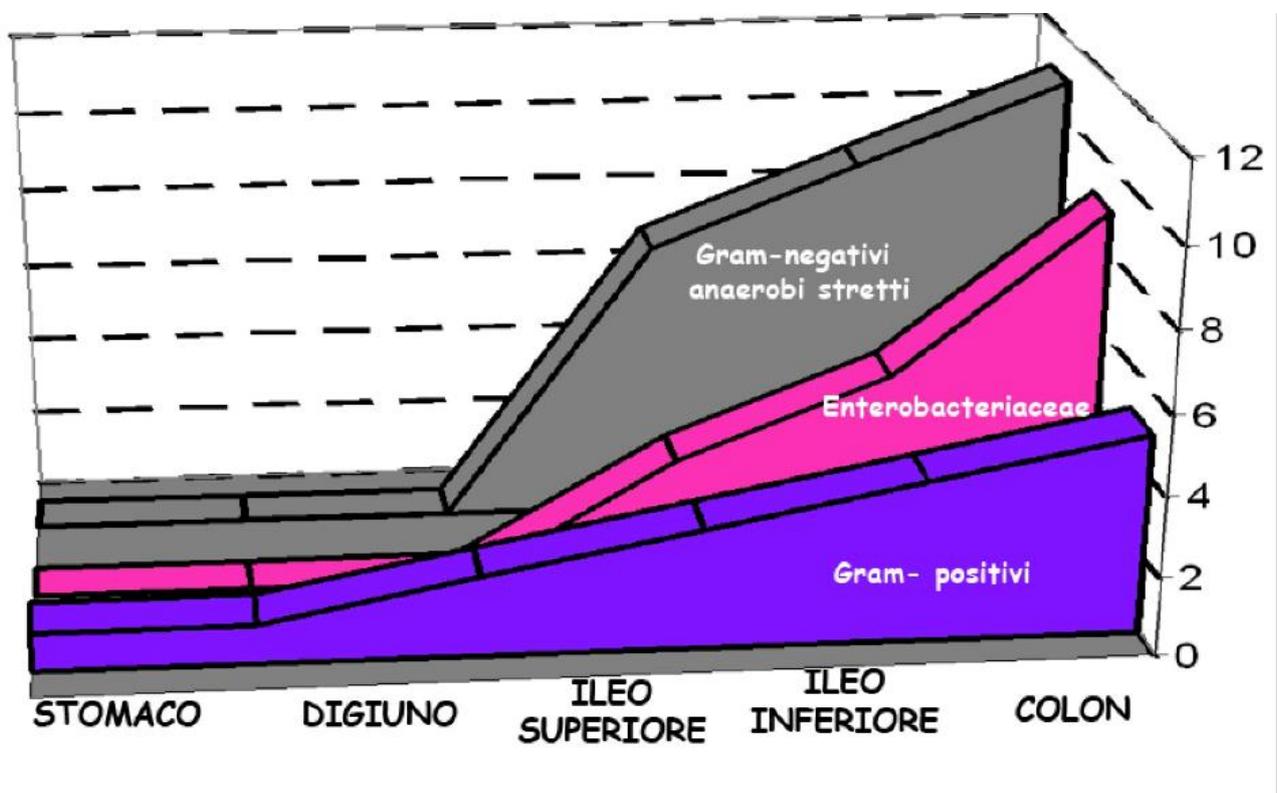
Caratterizzazione del Microbiota intestinale

Le popolazioni batteriche variano in qualità e quantità nei diversi distretti dell'apparato gastro-intestinale. Nello stomaco è presente una concentrazione di microorganismi variabile tra 10¹ e 10⁶ UFC/mL di contenuto gastrico (Benno et al., 1992), concentrazione che aumenta procedendo in senso cranio-caudale lungo il tratto gastroenterico. Nel duodeno del cane sono state rilevate concentrazioni comprese tra 10³ e 10⁹ UFC/ml; il gatto sembra invece ospitare una popolazione microbica più densa (10⁵-10⁸ UFC/ml) e prevalentemente anaerobica, al contrario di quanto presente nel cane. Mentre nel contenuto ileale sono state osservate concentrazioni batteriche pari a quelle già rilevate nel duodeno; la ridotta motilità del grosso intestino, il minor



flusso di materiale rispetto al tenue e l'innalzamento del pH indotto da secrezione di bicarbonati fanno sì che il colon sia l'ambiente maggiormente popolato, con valori pari a 10⁹-10¹¹ UFC/ml.

La maggioranza dei batteri del colon sono anaerobi e la loro principale funzione è quella di produrre energia dal cibo ed intervenire in modo competitivo nei confronti dei batteri patogeni. La diversità batterica è favorita dal lento passaggio delle ingesta attraverso il tratto intestinale e dalla disponibilità dei nutrienti in esse contenute. Così i batteri hanno sviluppato delle strategie cooperative per trasformare molecole complesse in sostanze nutrienti per loro stessi e per l'ospite che li alberga. Infatti i batteri del colon sono altamente specializzati nell'utilizzo dei carboidrati complessi, delle cellule epiteliali dell'intestino sfaldate nel lume, del muco e soprattutto dei substrati non digeriti. Per carboidrati complessi si intende amido, fibre dietetiche come la cellulosa, la pectina e i fruttani. La fermentazione di questi substrati dà luogo alla produzione di Acidi Grassi A Corta Catena (es. Acetato, Butirrato, Propionato) che forniscono energia per il metabolismo batterico, per la crescita e per la maturazione delle cellule epiteliali. Si stima infatti che più del 70% dell'energia metabolica di un cane adulto derivi proprio dalle fermentazioni batteriche.





Suchodolski et al. nel 2008 ha identificato nel colon del cane adulto quattro principali phyla: Firmicutes (47.7% delle sequenze), Proteobacteria (23.3%), Fusobacteria (16.6%), Bacteroidetes (12.4%).

Secondo quanto riportato dai più recenti studi, il phylum dei Firmicutes appare essere il più rappresentativo del microbiota canino e felino. Questo phylum è rappresentato principalmente dall'ordine Clostridiales, il quale è suddiviso in relativi gruppi clostridiali. I cluster XIVa e IV rappresentano circa il 60% di tutti i Clostridiales (Ritchie et al., 2008; Suchodolski et al., 2008a) e includono alcuni generi batterici identificati come produttori di acidi grassi volatili, quali ad esempio *Ruminococcus* spp., *Faecalibacterium* spp., *Dorea* spp. e *Turicibacter*, fondamentali per il mantenimento della buona salute dell'ospite.

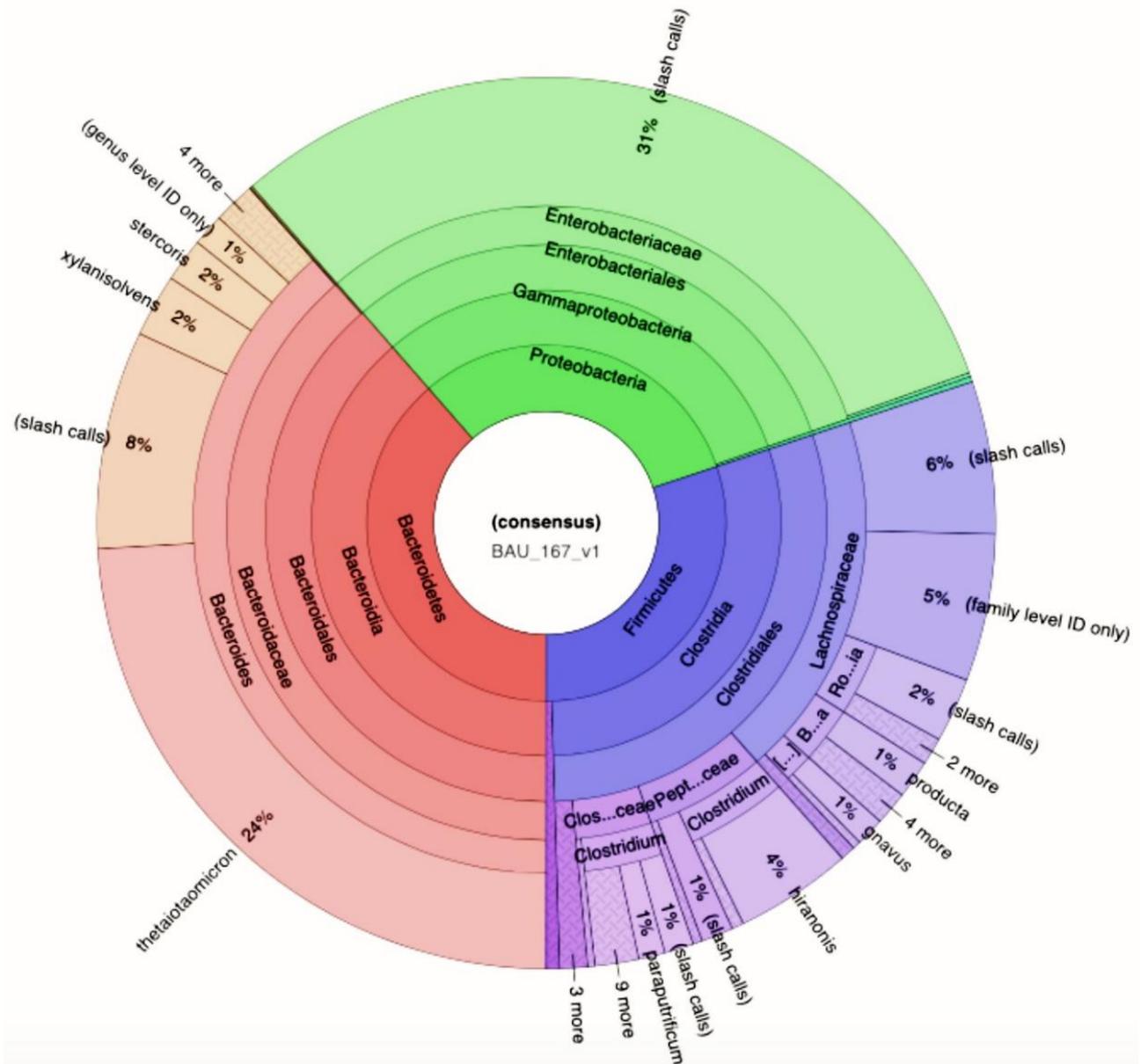
I Bacteroides sono deputati al metabolismo delle proteine, dei carboidrati e delle fibre. I Bacteroides sono batteri Gram-negativi, anaerobi stretti. Di particolare interesse sono le Prevotelle strettamente deputate alla digestione delle fibre: in medicina umana numerosi studi hanno evidenziato che il microbiota delle popolazioni rurali africane è ricco di batteri del genere Prevotella a differenza del microbiota di popolazioni che vivono in Occidente e si alimentano con una dieta ricca di proteine e carboidrati.

Nel cane e nel gatto tale classe batterica è ancora ampiamente sotto osservazione poiché esistono studi scientifici che associano la presenza di un'elevata percentuale di Prevotelle alle malattie infiammatorie intestinali croniche e altri invece le associano uno stato di benessere.

I Proteobatteri sono batteri Gram negativi e comprendono una vasta gamma di batteri spesso patogeni quali: E. Coli /Shigella, Salmonella, Helicobacter ecc.

I Fusobatteri sono un Phylum di batteri commensali che recentemente sono stati identificati come facente parte del "core microbiota" dei cani, quale specie batterica maggiormente rappresentata.

I vari membri della comunità intestinale sono in grado di eseguire funzioni simili e se un gruppo microbico è spostato a causa di particolari perturbazioni (ad esempio, antibiotico terapia), altri membri della comunità sono capaci di mantenere una funzione ecosistemica stabile.

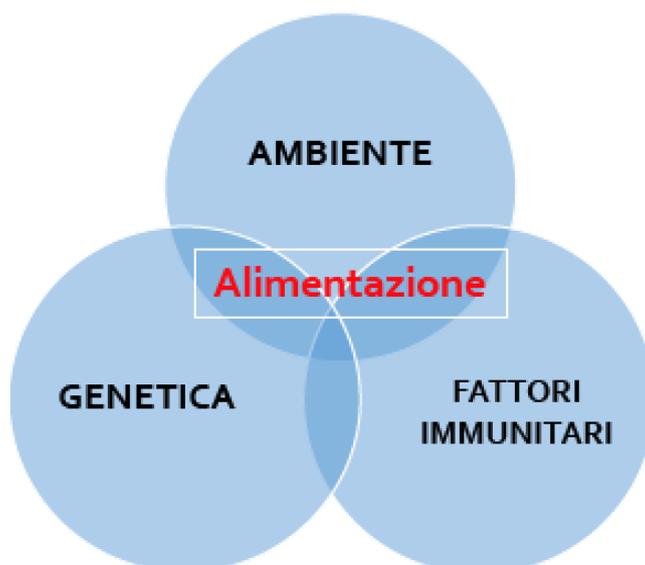




Microbiota e patologie gastrointestinali

Similmente a quanto osservato nella specie umana, la composizione del microbiota intestinale può essere influenzata da numerosi fattori esogeni fra cui la dieta e l'assunzione di antibiotici che possono profondamente alterare la flora batterica. Alcuni Phylum possono rimanere "depressi" per settimane o mesi. Tuttavia il microbiota è resiliente e può ritornare in parte rapidamente allo stato pre-trattamento. L'alterazione dell'equilibrio della flora batterica intestinale potrebbe contribuire all'insorgenza di disturbi gastro-intestinali nei cani e nei gatti.

Esistono due teorie: L'invasione di specifici patogeni o le tossine prodotte dagli stessi può disturbare profondamente l'epitelio intestinale alterando la funzione degli enterociti, stimolando la secrezione di fluidi mucosali e determinando la perdita dell'orletto a spazzola e quindi una ridotta capacità assorbente che causa diarrea. Alternativamente, la perdita di controllo da parte dell'ospite nei confronti dei meccanismi che regolano la composizione e l'equilibrio batterico, causa disbiosi. L'evidenza scientifica attuale supporta entrambe le teorie. In particolare recenti studi scientifici hanno dimostrato che i meccanismi patogenetici alla base dell'IBD coinvolgono un'anormale interazione fra microbiota intestinale e sistema immunitario locale in individui predisposti geneticamente. Nuove ipotesi indicano che il *Campylobacter Jejuni* e la *Salmonella* siano in grado di alterare l'architettura della mucosa intestinale e il sistema immunitario locale (MALT) diminuendo così la resistenza delle colonie batteriche residenti. Inoltre la ridotta diversità batterica dei Clostridi del cluster XIV e IV tipica dei pazienti con IBD, indica che questi gruppi batterici giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento dello stato di salute dell'apparato gastrointestinale.





Recenti studi hanno infatti evidenziato come in cani con diarrea cronica ci sia una predominanza di *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium Perfringens*, rispetto agli animali sani. ha valutato che il numero totale di *Bifidobacterium* spp. and *Bacteroides* spp. sono significativamente più bassi in gatti con IBD rispetto ai gatti sani, mentre più elevata è stata la conta di batteri della specie *Desulfovibrio* (produttori di solfati tossici). ha riscontrato che cani e gatti con IBD hanno un notevole aumento di Enterobacteriaceae ed una grave riduzione di *Bacteroides* rispetto ai cani sani.

S'intuisce inoltre che c'è una notevole variabilità di dati secondo le tecniche utilizzate, della razza e dell'età dei pazienti.

Resta comunque il fatto che la ridotta diversità batterica e l'equilibrio stesso dell'ecosistema sono fattori importanti per il mantenimento delle condizioni di salute dell'ospite. Poiché la valutazione del DNA batterico fornisce informazioni solo sull'identità di genere e specie e non sull'attività, saranno necessari studi fisiologici di metabolomica e dati istologici della mucosa intestinale per capire in modo approfondito le relazioni fra microbiota e ospite.

Bibliografia:

1. One Health, Fermented Foods, and Gut Microbiota. Bell V, Ferrão J, Pimentel L, Pintado M Fernandes T, Food 2018
2. The Gastrointestinal Microbiome: A Review C. Barko, M.A. McMichael, K.S. Swanson, and D.A. Williams. Vet Intern Med.2018
3. COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats1J. S. Suchodolski 2014
4. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-pre- and synbiotics – what is the evidence? Silke Schmitz and Jan Suchodolski
5. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. British Journal of Nutrition (2015), 113,
6. Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs Emma N. Bermingham, Paul Maclean, David G. Thomas, Nicholas J. Cave, and Wayne Young JPeerJ. 2017; 5: e3019.
7. Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease Jan S. Suchodolski^a, Panagiotis G. Xenoulis^a, Casey G. Paddock^a, Jörg M. Steiner^a, Albert E. Jergens^b
8. Dethlefsen L, Fall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. Nature 2007;449:811-8.

Testo a cura di: **Daniela Olivero, DVM,**

Responsabile reparto istologia BiEsseA Milano



BATTERI COMMENSALI RESIDENTI NEL MICROBIOTA

Potenzialmente dannosi

Proteus, Staphylococcus, Clostridium, Veilonella, Prevotella, Bacteroides, Enterococcus

Benefici

Lactobacillus, Eubacterium, Bifidobacterium

CIBO SECCO	CIBO UMIDO	DIETA CRUDA
CLOSTRIDIALES	PEPTOSTREPTOCOCCACCEE	CLOSTRIDIALES Notevolmente aumentati
RUMINOCOCCHI	FUSOBATTERI	ERISYPELOTRICHACEE diminuite
PREVOTELLA	CLOSTRIDIALES INERTA SEDIS XIV	BACTEROIDACEE diminuite
ERISYPELOTRICHACEE +++++++	BIFIDOBATTERIACEE	BIFIDOBATTERIACEE diminuite
HOLDEMAIA	LATTOBATTERIACEE	
	RUMINOCOCCACEE	

LO SAPEVATE CHE

I CANI CHE MANGIANO CIBO SECCO IN CROCCHETTE HANNO UN MICROBIOTA DIFFERENTE DAI CANI CHE MANGIANO CIBO UMIDO O DIETA CRUDA???