

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea a ciclo unico in Medicina Veterinaria

IL TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE NEL CANE: RECENTI ACQUISIZIONI E PROSPETTIVE TERAPEUTICHE

Relatore

Prof.ssa Helen Poser

Correlatore

Dott. Michele Berlanda

Laureando

Mirko Azzolin

Matricola n.

1118650

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

SOMMARIO

RIASSUNTO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUZIONE	13
1.1 Microbiota gastro-intestinale del cane: cos'è e quale ruolo svolge	13
1.3 Tecniche di analisi del microbiota intestinale	17
1.4 Disbiosi intestinale	21
1.4.1 Cause	22
1.4.2 Conseguenze.....	26
1.4.3 Markers e strumenti di valutazione.....	27
1.5 Tecniche di manipolazione del microbiota	28
1.5.1. Approccio dietetico	29
1.5.2 Antibiotici	29
1.5.3 Prebiotici.....	30
1.5.4 Probiotici.....	30
1.5.5 Simbiotici	31
1.6 Il trapianto di microbiota fecale nell'uomo	31
1.6.1 Selezione del donatore	32
1.6.2 Preparazione del materiale per il trapianto	32
1.6.3 Preparazione del paziente	34
1.6.4 Vie di somministrazione	34
1.6.5 Quantità e frequenza di somministrazione	35
1.6.6 Effetti avversi	35
1.6.7 Monitoraggio	37
1.7 Trapianto di microbiota fecale nelle varie specie	38
1.7.1 Utilizzo nell'uomo.....	38
1.7.2 Utilizzo nel bovino	39
1.7.3 Utilizzo nel suino.....	40
1.7.4 Utilizzo nei roditori da laboratorio	41
1.7.5 Utilizzo nel cavallo	41
1.7.6 Utilizzo nel pollo	42
2. OBIETTIVO.....	43
3. MATERIALI E METODI	45
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	47

4.1 Caratteristiche ideali del donatore canino	51
4.1.1 segnalamento	51
4.1.2 anamnesi	52
4.1.3 valutazione clinica	54
4.1.4 banca delle feci.....	57
4.2 Caratteristiche del ricevente canino	58
4.2.1 Segnalamento.....	58
4.2.2 Anamnesi clinica.....	59
4.2.3 Anamnesi dietetica.....	59
4.2.4 Anamnesi farmacologica	60
4.2.5 Criteri diagnostici.....	62
4.2.6 Diagnosi	65
4.3 Tecnica di trapianto di microbiota fecale nel cane.....	66
4.3.1 Raccolta e conservazione del materiale fecale del donatore canino	66
4.3.2 Preparazione del materiale per il trapianto	67
4.3.3 Via di somministrazione e tecnica d'esecuzione	72
4.3.4 Quantità somministrata e frequenza di somministrazione.....	75
4.4 Effetti avversi nel cane	76
4.5 Monitoraggio del paziente	77
4.5.1 Monitoraggio clinico.....	77
4.5.2 Monitoraggio mediante analisi del microbiota fecale.....	83
4.5.3 Monitoraggio mediante metabolomica	84
4.5.4 Frequenza di monitoraggio	85
4.6 Efficacia	86
4.6.1 Esiti negativi.....	86
4.6.2 Risultati dubbi.....	87
4.6.3 Successi terapeutici	89
4.7 Linee guida sulla tecnica di trapianto di microbiota fecale nel cane.....	91
4.7.1 Selezione del donatore	91
4.7.2 Selezione del ricevente.....	92
4.7.3 Preparazione del materiale fecale.....	94
4.7.4 Via di somministrazione	94
4.7.5 Quantità e frequenza di somministrazione	95
4.7.6 Effetti avversi.....	95
4.7.7 Monitoraggio	95

4.8 Prospettive future	96
5. CONCLUSIONI	99
6. BIBLIOGRAFIA.....	101

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

ARE	Antibiotic-Responsive Enteropathy
AHDS	Acute Hemorrhagic Diarrhea Syndrome
BARF	Bones and Raw Food
BCS	Body Condition Score
CCECAI	Canine Chronic Enteropathy Activity Index
CDI	<i>Clostridioides difficile</i> infection
CE	Chronic Enteropathy
CFU	Colony-Forming Units
CIBDAI	Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index
CPV	Canine Parvovirus
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DI	Dysbiosis Index
EPI	Exocrine Pancreatic Insufficiency
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
FMT	Fecal Microbiota Transplantation
FRE	Food-Responsive Enteropathy
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IRE	Immunosuppressant-Responsive Enteropathy
MUO	Meningoencephalitis of Unknown Origin
NGS	Next Generation Sequencing
NRE	Non-Responsive Enteropathy

PLE	Protein-Loosing Enteropathy
qPCR	quantitative PCR
RAC	Reazione Avversa al Cibo
rCDI	recurrent <i>Cl. difficile</i> Infection
SCFA	Short Chain Fatty Acids
SRE	Steroid-Responsive Enteropathy
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TLI	Trypsin-Like Immunoreactivity

RIASSUNTO

Il microbiota gastro-intestinale è l'insieme di tutti i microrganismi commensali che colonizzano il lume del tratto gastro-enterico e si relazionano con l'ospite in maniera simbiotica. Sebbene siano presenti anche protozoi, archea, funghi e virus, la popolazione preponderante e con maggior impatto sulla salute dell'ospite è quella batterica.

Molteplici sono le funzioni a cui è adibito il microbiota intestinale: dalla produzione e metabolismo di sostanze utili all'ospite (ad esempio, acidi grassi a corta catena, acidi biliari secondari e vitamine) alla modulazione del sistema immunitario o all'interazione con il sistema nervoso.

In numerosi stati patologici, soprattutto gastro-enterici, l'equilibrio della popolazione microbica intestinale può venire alterato: si parla quindi di "disbiosi intestinale". Tra le cause principali di disbiosi, si annoverano tutti i disordini responsabili di diarrea acuta, le enteropatie croniche, l'insufficienza pancreatica esocrina e l'effetto di trattamenti antibiotici.

Per correggere questo disordine, è necessario ricorrere a terapie mediche che agiscano direttamente sulla flora microbica intestinale rimodulandola. Le possibili opzioni sono: approccio dietetico, somministrazione di antibiotici (sebbene sempre meno consigliati), utilizzo di prebiotici, probiotici o simbiotici ed infine il trapianto di microbiota fecale (FMT).

Il trapianto di microbiota fecale è un tipo di trattamento medico che consiste nel trasferimento di materiale fecale, contenente un microbiota sano, da un donatore appositamente selezionato ad un ricevente con disbiosi intestinale.

In medicina umana, il FMT viene utilizzato da molti anni, con alte percentuali di successo, per la cura di pazienti affetti da infezione ricorrente da *Clostridioides difficile* (rCDI), l'unica patologia per cui questo trattamento è stato inserito in linee guida internazionali. Oltre alle numerose pubblicazioni riguardanti l'utilizzo del FMT nel trattamento di rCDI, in letteratura scientifica sono disponibili numerosi studi sull'uomo volti ad indagare l'efficacia di questa metodica anche in altri campi di applicazione (ad esempio, disturbi neurologici, malattie metaboliche o malattie endocrine).

L'utilizzo del trapianto fecale nel cane, invece, è ancora ai suoi esordi e i pochi studi pubblicati finora spiegano la sua rara applicazione clinica da parte dei medici veterinari.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di svolgere una revisione narrativa della letteratura scientifica riguardante l'utilizzo del trapianto di microbiota fecale nel cane, per poter fare maggiore chiarezza sulla metodica di esecuzione ed indagarne i possibili campi di applicazione.

Le informazioni ottenute dalle pubblicazioni sul FMT nel cane e la comparazione con quelle derivanti dalla medicina umana consentono di fornire indicazioni utili per "standardizzare" maggiormente la metodica di esecuzione di questa tecnica e di affermare che, attualmente, le patologie target sono quelle di natura gastro-enterica sia acuta che cronica. Le maggiori evidenze di efficacia sono state riscontrate in caso di diarrea acuta e di diarrea cronica dovuta ad enteropatogeni (nello specifico *Cl. perfringens* e *Cl. difficile*), ma esiti positivi sono stati registrati anche in cani con *inflammatory bowel disease* (IBD) idiopatica, enteropatia antibiotico-responsiva e sindrome da diarrea acuta emorragica dovuta a parvovirosi

In conclusione, per quanto riguarda il trapianto di microbiota fecale nel cane, sono necessari maggiori studi dal disegno sperimentale più accurato e con un livello di evidenza scientifica superiore, in modo da poter stilare delle linee guida quanto più complete e standardizzate possibile sulla metodica di esecuzione; inoltre, è auspicabile che vengano studiati anche campi di applicazione diversi da quello gastro-enterico, come già accade in medicina umana.

ABSTRACT

The gut microbiota is the complex population of microorganisms that colonize the lumen of the gastrointestinal tract and relate to the host in a symbiotic way.

The predominant population with the greatest impact on the host's health is represented by bacteria, although protozoa, archaea, fungi and viruses are also present.

The gut microbiota has many functions: from the metabolism of short-chain fatty acids, secondary bile acids and vitamins, substances of central importance to the host, to the modulation of the immune system or interaction with the nervous system.

In several pathological states, especially the gastrointestinal ones, the balance of the intestinal microbial population can be altered: we therefore speak of "intestinal dysbiosis".

Acute and chronic enteropathies, exocrine pancreatic insufficiency and antibiotic treatments are among the main causes of dysbiosis.

The possible options to correct dysbiosis are dietary approach, administration of antibiotics (although less and less recommended), use of prebiotics, probiotics or symbiotics and finally fecal microbiota transplantation (FMT).

Fecal microbiota transplantation is a type of medical treatment consisting in the transfer of fecal material containing a healthy microbiota from a selected donor to a recipient with intestinal dysbiosis.

In human medicine, FMT has been used for many years, with high success rates, for the treatment of patients suffering from recurrent *Clostridioides difficile* infection (rCDI), the only disease for which this treatment has been included in international guidelines. In addition to the numerous publications concerning the use of FMT in the treatment of rCDI, numerous studies are available in the scientific literature investigating its effectiveness also in other fields of application such as, for example, neurological disorders, metabolic diseases or endocrine diseases.

The use of fecal transplantation in dogs, on the other hand, is still in its infancy and the few studies published so far explain its rare clinical application by veterinarians.

The aim of this thesis was to carry out a narrative review of the use of fecal microbiota transplantation in dogs, to clarify its method of delivery and investigate the possible fields of application.

The information obtained from the publications on FMT in dogs and the comparison with those deriving from human medicine allow us to provide useful indications for more “standardizing” the method of performing this technique and to affirm that, currently, the target diseases are those of a gastro-enteric nature, both acute and chronic. The greatest evidence of efficacy was found for cases of acute diarrhea and chronic diarrhea due to enteropathogens (specifically *Cl. perfringens* and *Cl. difficile*). Positive outcomes were also recorded in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease (IBD), antibiotic-responsive enteropathy and acute hemorrhagic diarrhea syndrome due to parvovirus.

In conclusion, there is a need to increase the quality and the number of FMT studies in dogs in order to produce practical guidelines to standardize the FMT in dogs.

In the future, it is hoped that fields of application of FMT extend beyond the gastrointestinal one, as studies in human medicine seem to promise.

1. INTRODUZIONE

1.1 MICROBIOTA GASTRO-INTESTINALE DEL CANE: COS'È E QUALE RUOLO

SVOLGE

Il microbiota gastro-intestinale rappresenta l'insieme di tutti i microrganismi commensali che colonizzano l'ambiente gastro-enterico e si relazionano con l'ospite in maniera simbiotica (Pilla e Suchodolski, 2020). Le popolazioni presenti comprendono: archea, batteri, funghi, protozoi e virus; quella di maggior impatto su equilibrio e salute intestinale, nonché la più numerosa, è senza dubbio quella batterica. Per questo motivo, quando si parla di "microbiota intestinale", ci si riferisce generalmente alla flora batterica.

Nel tratto gastro-enterico del cane, la carica microbica totale oscilla tra 10^{12} e 10^{14} CFU/g di contenuto luminale: circa 10 volte il numero totale delle cellule che compongono l'organismo ospite (Suchodolski, 2011).

Ogni distretto gastro-intestinale rappresenta un microambiente in cui determinate comunità microbiche tendono a prevalere a discapito di altre. Nel piccolo intestino l'ambiente è più acido rispetto agli altri tratti e vi sono maggiori concentrazioni di ossigeno rispetto al grosso intestino; ciò favorisce la proliferazione di specie aerobie ed anaerobie facoltative. A livello di cieco e colon, invece, le quantità di ossigeno luminale sono molto inferiori, quindi la popolazione microbica è costituita quasi esclusivamente da anaerobi stretti (Honneffer et al., 2017; Mentula et al., 2005; Suchodolski et al., 2008).

Oltre alla composizione, anche la numerosità dei batteri è diversa in base al tratto gastro-enterico preso in considerazione: il grosso intestino ospita la maggior densità microbica dell'intero organismo, con una popolazione molto più ricca di quella del piccolo intestino (Gu et al., 2013) (vedi **Figura 1**). Questo è dovuto probabilmente alla minor velocità di transito del materiale alimentare in questa sede e la minor concentrazione di sostanze ad azione antimicrobica (ad esempio, gli acidi biliari) rispetto a ciò che avviene nel piccolo intestino (Tropini et al., 2017).

I 5 *phyla* a cui appartiene la quasi totalità delle specie batteriche del microbiota sono: *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* ed *Actinobacteria* (Honneffer et al., 2017).

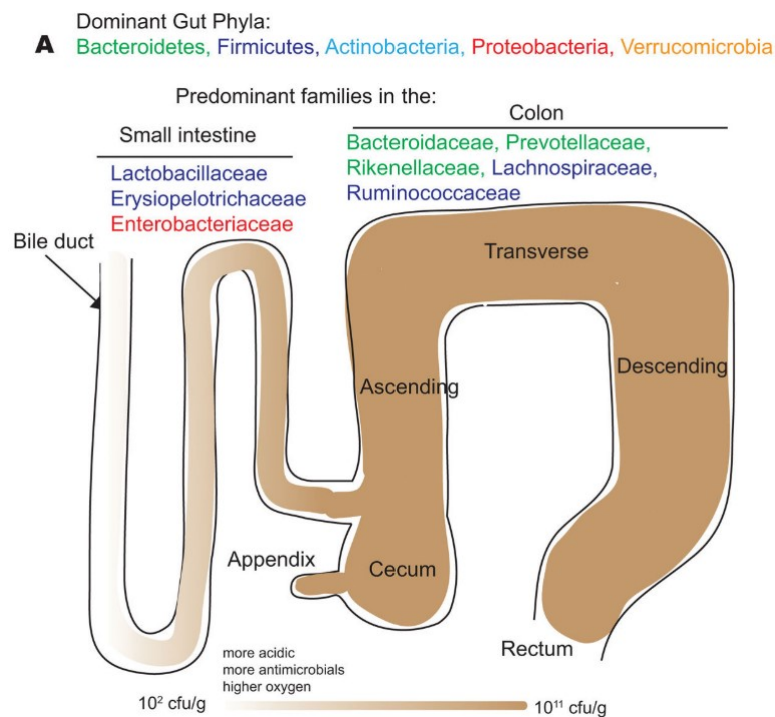


Figura 1. Rappresentazione schematica della variazione di densità batterica tra i vari distretti gastroenterici ed elenco dei principali *taxa* rinvenibili nel piccolo e nel grosso intestino. L'immagine rappresenta un modello umano (Donaldson et al., 2016).

cfu: *colony-forming units*

A livello fecale, i *phyla* batterici maggiormente rappresentati nel cane sono: *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Hand et al., 2013; Middelbos et al., 2010). I *phyla* *Proteobacteria* ed *Actinobacteria* sono presenti maggiormente a livello di piccolo intestino, quindi sono riscontrati in minor quantità nelle feci in condizioni fisiologiche (Pilla e Suchodolski, 2020).

Nei cani sani, si osserva la presenza di batteri del genere *Fusobacterium* in numero elevato, a differenza di quanto accade nell'uomo, dove questi stessi microrganismi sono associati a stati di malattia gastro-enterica (Deng e Swanson, 2015; Vázquez-Baeza et al., 2016).

La composizione del microbiota intestinale è caratterizzata da un'alta variabilità intraspecifica e questo dipende da numerosi fattori: l'ambiente in cui è cresciuto l'animale, la convivenza con altri conspecifici, la dieta, stati patologici presenti o passati, trattamenti con alcuni farmaci (soprattutto

antibiotici) (Blake e Suchodolski, 2016; Pilla e Suchodolski, 2020).

È stata anche notata una maggior similarità nel microbiota fecale tra cani geneticamente correlati, quando comparati con animali non imparentati (Deng e Swanson, 2015).

La colonizzazione del tratto gastro-intestinale, nei mammiferi, inizia già mentre il nascituro transita attraverso il canale del parto ed è influenzata dal tipo di parto (naturale VS cesareo) e dal tipo di nutrizione successiva (Bäckhed et al., 2015). Nel cane, così come nell'uomo, la maturazione del microbiota ad una composizione simile a quella dell'adulto coincide con lo svezzamento (Pilla e Suchodolski, 2020).

In molte specie, la composizione microbica dell'adulto si mantiene relativamente stabile nel lungo periodo ed è ragionevole pensare che questo avvenga anche nel cane (Pilla e Suchodolski, 2020). La biodiversità gastro-intestinale inizia a ridursi progressivamente quando si entra in età avanzata; questo aspetto non è ancora stato studiato nel cane, però è stato evidenziato nell'uomo, in cui si assiste all'instaurarsi di una condizione infiammatoria cronica di basso grado che porta a squilibrio del microbiota (García-Peña et al., 2017).

Il microbiota gioca un ruolo fondamentale sulla salute intestinale, grazie alle numerose funzioni cui è adibito.

In primo luogo, esso protegge l'organismo dalla proliferazione di batteri patogeni enterici mediante competizione per i nutrienti, modificazioni dell'ambiente intestinale (ad esempio, attraverso la diminuzione del pH) e stimolo alla produzione di muco e sostanze antimicrobiche da parte degli enterociti (Blake e Suchodolski, 2016; Redfern et al., 2017). Oltre a questo, la flora intestinale contribuisce alla normale salute e funzionalità del tratto gastro-enterico attraverso la stimolazione al turn-over degli enterociti, la regolazione della peristalsi e il rafforzamento delle *tight junctions* tra gli enterociti (fondamentali per il ruolo della barriera intestinale) (Blake e Suchodolski, 2016; Mondo et al., 2019; Redfern et al., 2017).

La composizione del microbiota ha, inoltre, un effetto significativo sulla funzione immunitaria e regola la produzione locale di anticorpi (Mondo et al., 2019; Pilla e Suchodolski, 2020). In condizioni di omeostasi, la flora microbica invia segnali ai precursori linfocitari enterici e ne guida la differenziazione per inibire possibili condizioni infiammatorie intestinali (Tizard e Jones, 2018).

Il metabolismo batterico a livello intestinale produce energia e substrati utili sia ai batteri stessi che all'ospite. L'attività principale è la fermentazione di alcoli e carboidrati non digeribili (amido, inulina, cellulosa, emicellulosa, pectine e gomme) a livello di colon (Schmitz e Suchodolski, 2016); in questo modo vengono prodotti gas e acidi grassi a corta catena (SCFA: *Short Chain Fatty Acids*), rappresentati da acetato, propionato e butirato (Mondo et al., 2019). Le funzioni degli SCFA sono: fungere da fonte di nutrimento, regolare il senso di sazietà, possedere proprietà antinfiammatorie e regolare la motilità intestinale (Rowland et al., 2018).

Inoltre, la sintesi di SCFA porta ad una riduzione del pH luminale: questo rappresenta una prima linea difensiva contro eventuali patogeni e supporta la crescita, proliferazione e differenziazione degli enterociti (Mondo et al., 2019).

La flora intestinale è coinvolta anche nella sintesi delle vitamine K e del gruppo B (Ziese e Suchodolski, 2020) e nel metabolismo degli xenobiotici che giungono a livello enterico (Mondo et al., 2019).

I batteri intestinali sono responsabili della produzione dei composti dell'indolo, metaboliti derivanti dal triptofano, un aminoacido essenziale; essi sono utili a ridurre la permeabilità intestinale e ad aumentare la produzione di mucina (Whitfield-Cargile et al., 2016).

Un altro importante ruolo del microbiota è la trasformazione degli acidi biliari primari (colico e chenodesossicolico) in secondari (desossicolico e litocolico), essenziali per l'assorbimento dei lipidi alimentari e delle vitamine liposolubili a livello intestinale (Staggers et al., 1982). Gli acidi biliari giocano anche un ruolo nelle difese mucosali enteriche e possiedono proprietà antinfiammatorie (Pilla e Suchodolski, 2020).

Infine, le condizioni dell'ambiente intestinale influiscono indirettamente anche sull'equilibrio di alcuni distretti extra-intestinali.

Ad esempio, a livello enterico viene prodotto circa il 90% della serotonina (De Vadder et al., 2018), un importante neurotrasmettitore che media diverse funzioni cognitive. La correlazione tra intestino e cervello è stata studiata, sia nel cane che in altre specie, in diversi stati patologici ed ha portato a sviluppare il concetto di "asse cerebro-intestinale" (Ghaisas et al., 2016; Suchodolski, 2018). Altre evidenze che avvalorano questa associazione sono le alterazioni del microbiota notate

in corso di patologie neurologiche quali meningoencefalomielite di origine sconosciuta (MUO) nel cane (Jeffery et al., 2017) e disturbi dello spettro autistico nell'uomo (Strati et al., 2017).

1.3 TECNICHE DI ANALISI DEL MICROBIOTA INTESTINALE

Dato che la composizione microbica varia in maniera significativa lungo l'intestino, effettuare un'analisi del microbiota intestinale richiederebbe di effettuare dei campionamenti di mucosa e/o contenuto luminale in diversi distretti enterici e questo sarebbe difficoltoso. Per aggirare questo problema, molto spesso si utilizza il microbiota contenuto nel materiale fecale come rappresentativo di quello intestinale.

Nel cane, a differenza dell'uomo, le feci presentano la maggior parte dei *taxa* presenti anche a livello enterico (Vázquez-Baeza et al., 2016), per via di ragioni anatomiche e fisiologiche: il tratto gastro-intestinale canino è infatti più breve e possiede un tempo di transito inferiore rispetto a quello umano (Pilla e Suchodolski, 2020).

Le principali metodiche di analisi microbiologica utilizzate sono:

1. tecniche di coltura batterica;
2. ibridazione fluorescente *in situ* (FISH);
3. *polymerase chain reaction* quantitativa (qPCR);
4. elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE) o di temperatura (TGGE);
5. metodo di sequenziamento Sanger;
6. tecnologie di *next generation sequencing* (NGS).

In passato, i primi studi sul microbiota fecale si sono basati sulle tecniche di coltura tradizionali. Tuttavia, per molte specie batteriche la coltura era difficoltosa, se non addirittura impraticabile (soprattutto per quanto riguarda gli anaerobi); oggi, grazie alla disponibilità di tecniche di sequenziamento del DNA ad alta resa e ai notevoli sviluppi nel campo della bioinformatica, la metodologia di analisi è completamente cambiata (Deng e Swanson, 2015).

Nei tempi odierni, le tecniche di coltura batterica possono comunque risultare utili non tanto per lo studio della popolazione intestinale, quanto piuttosto per l'identificazione di enteropatogeni specifici (ad esempio *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* o *Yersinia* spp.) (Suchodolski, 2016).

La metodica di ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) utilizza cellule intere (in questo caso i batteri), che vengono fissate, ibridizzate con oligonucleotidi (denominati “sonde”) marcati con composti fluorescenti e visualizzate attraverso un microscopio ad epifluorescenza (Zwirgmaier, 2010). Le sonde molecolari sono specifiche per determinati frammenti di RNA, quindi la scelta degli oligonucleotidi è fondamentale per l’accuratezza dei risultati ottenuti (Moter e Göbel, 2000).

La FISH è utile per monitorare particolari gruppi di microrganismi o individuare la presenza di una determinata specie batterica in una comunità microbica complessa (Moter e Göbel, 2000), oltre ad essere attualmente considerata la tecnica più accurata per la conta batterica assoluta (Suchodolski, 2016).

Questo tipo di esame viene utilizzato anche per studiare il pattern di distribuzione microbica (luminale, aderente alla mucosa o invasivo della parete) in biopsie intestinali (Suchodolski, 2016).

Per studiare la struttura filogenetica microbica, il principale target utilizzato per il sequenziamento è il gene che codifica per la subunità 16S dell’RNA ribosomiale (16S rRNA); il motivo di questa scelta risiede nel fatto che tale gene è presente in maniera costante in tutti i batteri ed è costituito sia da regioni non variabili che da regioni variabili (importanti per classificare un microrganismo da un punto di vista filogenetico) (Akondi e Lakshmi, 2013; Deng e Swanson, 2015).

Negli anni sono state sviluppate numerose tecniche molecolari basate sul gene codificante il 16S rRNA, di cui quelle più utilizzate in questo campo sono la PCR quantitativa (qPCR), l’elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE) o a gradiente di temperatura (TGGE), il metodo di sequenziamento Sanger e le cosiddette “*next generation sequencing (NGS) technologies*” (Deng e Swanson, 2015). Un esempio di studio del microbiota intestinale mediante metodiche molecolari è fornito in [Figura 2](#).

La qPCR (anche denominata “*real-time PCR*”) è una tecnica basata sulla PCR convenzionale, la quale viene utilizzata per amplificare e simultaneamente quantificare il DNA estratto dal substrato in esame. La differenza tra le due tecniche sta nella capacità della qPCR di quantificare il materiale in tempo reale, cioè durante l’amplificazione; con la PCR convenzionale, invece, la quantificazione può essere eseguita solamente a termine del processo e mediante ulteriori procedimenti laboriosi (ad esempio l’elettroforesi su gel).

La rilevazione e, quindi, il conteggio delle molecole di DNA avviene generalmente mediante metodi a fluorescenza (Singh e Roy-Chowdhuri, 2016).

Le tecniche di elettroforesi su gel sfruttano la differente velocità di movimento di molecole di DNA a singolo filamento, contenenti sequenze diverse, attraverso una matrice di poliacrilamide. In particolare, la DGGE utilizza sostanze chimiche denaturanti inserite a gradiente crescente nel gel, in modo da avere la formazione di diverse bande corrispondenti alle posizioni in cui le molecole di DNA si denaturano; idealmente, ad ogni banda dovrebbe corrispondere una singola specie batterica, tuttavia questo non avviene in maniera assoluta (Strathdee e Free, 2013).

Per quanto riguarda la TGGE, il meccanismo è analogo a quello della DGGE, con la differenza che il gradiente di denaturazione è dato dalla temperatura anziché da sostanze chimiche (Strathdee e Free, 2013).

Queste metodiche vengono utilizzate per studiare la diversità microbica in comunità batteriche miste dopo che le sequenze geniche di interesse sono state estratte dal materiale di origine ed amplificate mediante PCR (Muyzer et al., 1993).

La tecnica di sequenziamento Sanger è stata una delle prime ad essere sviluppate e possiede un'importanza tale che, nonostante svantaggiosa in termini di costi e tempistiche, viene ancora utilizzata in molte situazioni per via dell'elevata accuratezza dei risultati (Hutchison, 2007; Stranneheim e Lundeberg, 2012).

Si basa sull'utilizzo di nucleotidi modificati e marcati con un composto fluorescente (fondamentale per la visualizzazione delle bande all'elettroforesi), che permettono la frammentazione del DNA in sequenze di varia lunghezza; il materiale viene poi fatto scorrere per elettroforesi su una matrice di poliacrilamide, dove ogni banda rappresenterà una sequenza di determinata lunghezza, e i risultati vengono infine visualizzati mediante elettroferogramma (Verma et al., 2017).

L'avvento delle tecniche NGS ha segnato un grande passo avanti nello studio della genomica, in quanto queste consentono di ottenere un'enorme quantità di dati con costi e tempi molto inferiori rispetto alle metodiche tradizionali (Deng e Swanson, 2015; Verma et al., 2017).

Tra le più utilizzate nell'ambito dello studio del microbiota fecale ci sono il sequenziamento 454-Roche e la tecnologia Solexa/Illumina® (Deng e Swanson, 2015).

Il 454-Roche è una tecnica di pirosequenziamento, ossia sfrutta la produzione di luce da parte di reazioni enzimatiche che coinvolgono il pirofosfato inorganico; non vi è quindi più la necessità di utilizzare nucleotidi fluorescenti. Il segnale viene infine rilevato da una camera fotosensibile (Verma et al., 2017).

Con la tecnologia Solexa/Illumina® è possibile generare una quantità maggiore di frammenti di DNA, rispetto alle altre tecniche NGS, grazie ad un'amplificazione a ponte su supporto solido; i frammenti vengono poi marcati con nucleotidi fluorescenti (Verma et al., 2017). Questa metodica prevede costi e tempi inferiori non solo alle tecniche tradizionali, ma anche rispetto alle altre tecniche NGS (Hert et al., 2008; Pettersson et al., 2009).

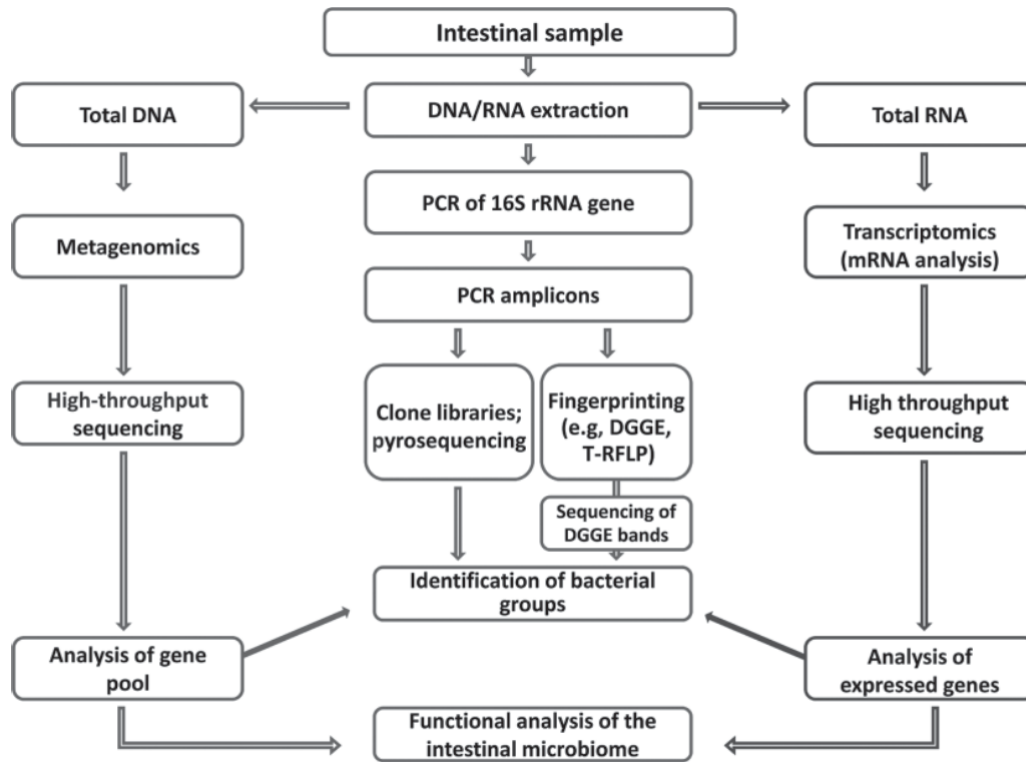


Figura 2. Schema riassuntivo di alcune tra le metodiche molecolari utilizzate per indagare il microbiota intestinale/fecale (Suchodolski, 2011).

Un campo di ricerca relativamente nuovo è quello della metabolomica: essa si occupa di analizzare gli scambi metabolici tra l'ospite e il microbiota intestinale (Nicholson e Lindon, 2008; Pilla e Suchodolski, 2020).

La ricerca dei metaboliti può avvenire su diversi substrati (come siero, urine o feci) ed è indirizzata potenzialmente a tutte le sostanze per il cui metabolismo è coinvolta l'azione della flora microbica intestinale (Guard et al., 2015).

La tecnologia solitamente utilizzata è quella della gascromatografia associata alla spettrometria di massa, che consente di analizzare diverse centinaia di metaboliti con un singolo esame (Suchodolski, 2016). Nel caso si utilizzino le feci come substrato, può essere necessario che queste vengano prima

liofilizzate (ad esempio per l'analisi degli acidi biliari) (Guard et al., 2019).

Queste analisi permettono di valutare la capacità funzionale del microbiota in correlazione alle caratteristiche quantitative e/o qualitative di quest'ultimo (Guard et al., 2015).

1.4 DISBIOSI INTESTINALE

La disbiosi intestinale è definita come qualsiasi alterazione del microbiota intestinale che risulti in alterazioni funzionali di trascrittoma, proteoma o metaboloma microbico (Zeng et al., 2017). Questi 3 termini si riferiscono al complesso di RNA trascritti (trascrittoma) e proteine prodotte (proteoma) dal genoma batterico e di metaboliti derivanti dai processi metabolici microbici (metaboloma).

In termini più semplici, la disbiosi intestinale può essere definita come una qualsiasi variazione nella composizione e/o numerosità dei batteri intestinali (Suchodolski, 2016).

Da un punto di vista patogenetico, possono essere riconosciuti tre tipi diversi di disbiosi: riduzione della diversità batterica, diminuzione della quota di batteri benefici, sovracrescita di batteri patogeni (Mondo et al., 2019).

Altro fattore di cui tenere conto, qualora sia possibile analizzarlo, è il pattern di distribuzione dei batteri perché le alterazioni possono interessare la popolazione luminale, quella aderente alla mucosa oppure entrambe contemporaneamente. Una disbiosi che interessa principalmente il comparto luminale è tipica dei casi di alterazione dei processi digestivi, esiti di un trattamento antibiotico o ritardi nella maturazione del microbiota e del sistema immunitario (Ziese e Suchodolski, 2020). Uno squilibrio della quota batterica aderente alla mucosa è invece un segno maggiormente associato alle enteropatie croniche (Giaretta et al., 2020).

Si ipotizza che il fattore responsabile delle alterazioni della composizione microbica sia un aumento di ossigeno libero nel lume intestinale, dovuto ad un aumento della permeabilità della parete intestinale (ad esempio, durante stati infiammatori); questo impatta negativamente sulle popolazioni di anaerobi stretti, determinando la proliferazione eccessiva degli anaerobi facoltativi (Rivera-Chávez et al., 2017). Per questo motivo, l'aumento degli anaerobi facoltativi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* è considerato un comune marker di disbiosi (Rivera-Chávez et al., 2017).

1.4.1 CAUSE

Uno stato di disbiosi si rileva in un'ampia gamma di malattie, come enteropatie, obesità, stati allergici, diabete o disturbi neurologici; tuttavia non è ancora ben chiaro se sia una conseguenza oppure una causa di tali disturbi (Mondo et al., 2019).

Più in generale, si può affermare che tutto ciò che ostacola i meccanismi regolatori di una fisiologica crescita microbica intestinale può portare ad una disbiosi. Ad esempio, questo potrebbe verificarsi conseguentemente ad insufficienza pancreatica esocrina (EPI), malformazioni anatomiche congenite o acquisite del tratto gastro-enterico oppure disordini della motilità intestinale primari o secondari (ad esempio, ad ipotiroidismo) (Redfern et al., 2017).

Nel cane, tra le principali cause di disbiosi intestinale rientrano:

- disturbi gastro-enterici (acuti e cronici);
- insufficienza pancreatica esocrina;
- effetto di alcuni farmaci.

Gli stati patologici in cui è più frequentemente riscontrata una disbiosi intestinale sono i disordini gastro-enterici. In particolare, il microbiota intestinale si ritrova alterato in corso di diarrea, sia acuta sia cronica (Pilla e Suchodolski, 2020).

Nei cani con diarrea acuta non complicata, si sviluppa una forte disbiosi con riduzione dei batteri produttori di SCFA (Suchodolski et al., 2012), un aumento di batteri del genere *Clostridium* (Guard et al., 2019) ed una riduzione della diversità microbica.

La sindrome da diarrea acuta emorragica (AHDS: *Acute Hemorrhagic Diarrhea Syndrome*) è un altro tipo di diarrea acuta, in cui è stata dimostrata la correlazione tra la malattia e la presenza a livello intestinale della tossina netF, prodotta da *Clostridium perfringens*; questa è quindi incriminata come la più probabile responsabile delle lesioni intestinali osservate nei cani affetti da AHDS (Leipig-Rudolph et al., 2018; Ziese et al., 2019). Nonostante questo, le alterazioni tra i gruppi batterici sono simili a quelle evidenziate in caso di diarrea acuta non complicata (Guard et al., 2015).

Un cane che si presenti con diarrea e/o altri sintomi gastro-enterici (vomito, borborigmi, perdita di appetito, dolore addominale, nausea, perdita di peso) da più di 3 settimane potrebbe essere affetto da enteropatia cronica (CE) (Dandrieux, 2016). Per la diagnosi è necessario prima escludere alcune

malattie extra-intestinali (patologie epatiche, pancreatiche e renali, ipoadrenocorticismo e ipercalcemia), malattie infettive o parassitarie e malattie intestinali di altra natura (ad esempio, intussuscezioni, corpi estranei e neoplasie intestinali) (Simpson e Jergens, 2011).

La CE viene classificata, secondo la risposta alla terapia, in: dieto-responsiva (FRE: *Food-Responsive Enteropathy*), antibiotico-responsiva (ARE: *Antibiotic-Responsive Enteropathy*), immunosoppressore-responsiva (IRE: *Immunosuppressant-Responsive Enteropathy*) e non responsiva (NRE: *Non-Responsive Enteropathy*) (Dandrieux, 2016). Una tipologia di IRE è quella riscontrata in cani che rispondono a terapia con steroidi, quindi denominata enteropatia steroido-responsiva (SRE: *Steroid-Responsive Enteropathy*); questa forma è quella che spesso viene chiamata anche *Inflammatory Bowel Disease (IBD)* idiopatica. Oltre alla classificazione secondo la risposta al trattamento, bisogna prestare attenzione ai casi in cui vi sia un'enteropatia proteino-disperdente (PLE: *Protein-Loosing Enteropathy*), perché questa forma è associata ad una prognosi peggiore rispetto a quella di cani con livelli di albumina sierica normali (Allenspach et al., 2007; Craven et al., 2004). L'incidenza delle varie categorie di CE nel cane è rappresentata in modo schematico nella

Figura 3.



Figura 3. Rappresentazione della quantificazione dell'incidenza delle varie categorie di CE in ordine decrescente partendo dal basso: i casi di FRE sono la maggior parte dei casi di CE, mentre quelli di NRE sono i meno frequenti (Dandrieux, 2016).

In maniera analoga alle alterazioni in corso di diarrea acuta, anche in caso di CE avviene una riduzione nel numero di batteri SCFA-produttori e della diversità batterica (Minamoto et al., 2019), associata però al riscontro di un aumento della quota di *Enterobacteriaceae* (segno molto indicativo

di disbiosi) (Suchodolski et al., 2010; Vázquez-Baeza et al., 2016; Xenoulis et al., 2008).

Le caratteristiche del microbiota nel corso di tutte queste forme di enteropatia cronica sono sostanzialmente sovrapponibili; ciò che può essere differente è il ripristino di una normale composizione microbica in seguito alla terapia, che non sempre avviene in caso di SRE, nonostante il recupero dal punto di vista clinico dell'animale (Guard et al., 2019; Kalenyak et al., 2018; Minamoto et al., 2015).

Sempre tra le cause intestinali di disbiosi rientrano anche eventuali infezioni virali o infestazioni parassitarie.

Tra i cuccioli di cane è particolarmente significativa, da un punto di vista sanitario, l'infezione da parvovirus canino (CPV: *Canine Parvovirus*) ed è riportato che questa sia in grado di provocare alterazioni quantitative e qualitative del microbiota intestinale (Park et al., 2019).

Alcuni soggetti possono presentare una predisposizione genetica allo sviluppo di disbiosi. Viene infatti ritenuto possibile che alcune razze, come il Pastore Tedesco e il Rottweiler, siano predisposte allo sviluppo di ARE (Allenspach et al., 2010; Kathrani et al., 2011). Altre razze, come Boxer e Bulldog francese in giovane età, sembrano essere maggiormente soggette a colite granulomatosa (una forma di ARE associata ad *E. coli* enteroinvasivo), forse per un difetto genetico nella capacità di eliminazione di questo patogeno (Manchester et al., 2013; Suchodolski, 2016).

L'esatto meccanismo patogenetico di questa maggior suscettibilità, tuttavia, non è ancora stato completamente chiarito (Redfern et al., 2017).

Un microrganismo meritevole di menzione è *Clostridioides difficile* perché, nell'uomo, l'infezione ricorrente da *Cl. difficile* (rCDI) può determinare una grave malattia intestinale in grado di causare disbiosi intestinale e, come descritto in seguito, è l'unica patologia per cui esistano delle linee guida comprendenti il trattamento mediante trapianto di microbiota fecale (Cammarota et al., 2017). *Clostridioides difficile* è un batterio Gram positivo, anaerobio e sporigeno che si può rinvenire nel tratto gastro-enterico dell'uomo e di numerose altre specie animali ed anche a livello ambientale (Weese, 2020).

Risulta quindi rilevante capire se questo agente eziologico possa avere un ruolo come patogeno anche negli animali da compagnia.

Nel cane, la presenza di *Cl. difficile* è stata rilevata sia nelle feci di animali sani (Rabold et al., 2018;

Schneeberg et al., 2012; Wei et al., 2019) che in quelle di soggetti con malattia gastro-intestinale (Orden et al., 2017; Weese et al., 2001), in prevalenze molto simili (Weese, 2020); alcuni studi hanno evidenziato una relazione tra la presenza del microrganismo nelle feci del cane e un contatto con persone maggiormente suscettibili a questa infezione, come bambini e persone ospedalizzate (Lefebvre et al., 2009; Weese et al., 2010).

Tutto questo porta a pensare che l'eliminazione di *Cl. difficile* da parte del cane sia dovuta maggiormente alla contaminazione ambientale da parte di soggetti umani portatori. Un altro fattore di rischio per la proliferazione di questo microrganismo negli animali potrebbe essere l'assunzione di antibiotici (Clooten et al., 2008; Hussain et al., 2015) o di farmaci immunosoppressivi (Clooten et al., 2008).

Tuttavia, il ruolo di *Cl. difficile* nella patogenesi di malattie gastro-enteriche nel cane è ancora non del tutto chiarito e, al momento, non è possibile definire se esso sia un effettivo potenziale patogeno oppure un innocuo commensale (Weese, 2020).

Degli studi hanno dimostrato come, in corso di insufficienza pancreatica esocrina (EPI), si possa sviluppare disbiosi intestinale (Isaiah et al., 2017; Simpson et al., 1990).

L'EPI è una patologia caratterizzata da insufficiente produzione di enzimi digestivi da parte delle cellule pancreatiche, con conseguente alterazione dei processi digestivi.

Nel cane, la causa più comune è l'atrofia degli acini pancreatici, mentre altre possibili cause possono essere la pancreatite cronica (la causa più comune nel gatto e nell'uomo) o una neoplasia pancreatica (Westermarck e Wiberg, 2012). La conferma della diagnosi si ha con valori di *trypsin-like immunoreactivity* (TLI) sierici $\leq 2,5 \mu\text{g/L}$ (Williams e Batt, 1988).

La disbiosi intestinale può essere attribuita ad una maggior quantità di materiale alimentare non digerito accumulato nel piccolo intestino, alla mancanza di fattori batteriostatici (normalmente contenuti nei succhi pancreatici), ad alterazioni nella motilità intestinale e ad un possibile squilibrio della funzione immunitaria gastroenterica (Simpson et al., 1990; Westermarck et al., 1993).

I cani con EPI, rispetto a quelli sani, dimostrano una diminuzione della diversità tassonomica batterica ed una differenza nella composizione microbica, con aumento delle specie produttrici di acido lattico. Inoltre, nei cani malati è stata riscontrata una riduzione nei geni batterici deputati al metabolismo energetico, di acidi grassi, aminoacidi, vitamine, cofattori e glicani (Isaiah et al., 2017).

Diversi farmaci possono portare ad uno squilibrio della flora intestinale; ad esempio, l'utilizzo di gastroprotettori può indurre un aumento della numerosità batterica gastrica e duodenale nel cane per via dell'aumento del pH in questi distretti (Garcia-Mazcorro et al., 2012).

I farmaci con maggior impatto a livello di microbiota intestinale sono sicuramente gli antinfiammatori non steroidei (FANS) e gli antibiotici (Redfern et al., 2017).

Non sono ancora del tutto chiari i meccanismi attraverso cui i FANS alterino l'equilibrio della flora intestinale; tuttavia, sembra che possano avere un effetto sia diretto (inibendo/stimolando la crescita, inducendo la morte cellulare e/o influenzando il metabolismo del microbiota) sia indiretto per interazione con l'ospite (alterazione del metabolismo sistemico e dell'ambiente intestinale, distruzione dell'integrità mucosale intestinale, aumento della permeabilità della barriera intestinale) (Maseda e Ricciotti, 2020).

Tra gli antibiotici che inducono maggiori cambiamenti sul microbiota sono da ricordare quelli ad ampio spettro, come il metronidazolo. Questo farmaco è in grado di indurre alterazioni compatibili con quelle riscontrate in corso di malattia gastro-intestinale cronica (Gevers et al., 2014; Minamoto et al., 2014, 2015). È necessario quindi prestare particolare attenzione nella valutazione della disbiosi in caso di terapia cronica, per evitare considerazioni errate (Suchodolski, 2016).

1.4.2 CONSEQUENZE

La disbiosi intestinale porta ad alterazioni nella regolazione del sistema immunitario e del metabolismo degli acidi biliari, con l'inevitabile sviluppo di un'infiammazione intestinale (Duboc et al., 2013; Giaretta et al., 2018; Guard et al., 2019); tuttavia, è altresì vero che una condizione infiammatoria può anche essere l'origine della disbiosi, quindi non è sempre semplice individuare la giusta correlazione causa-effetto (Suchodolski, 2016).

La natura delle alterazioni funzionali e immunologiche dipende dall'entità, dal pattern (quali gruppi batterici sono coinvolti) e dalla localizzazione (piccolo intestino VS grosso intestino) della disbiosi (Suchodolski, 2016).

I batteri presenti nel piccolo intestino sono quelli maggiormente deputati alla deconiugazione degli acidi biliari, quindi uno squilibrio a questo livello può portare a minor assorbimento dei grassi e delle sostanze liposolubili. La flora del grosso intestino, invece, si occupa principalmente della produzione di SCFA, composti dell'indolo e altri metaboliti immunomodulatori (Suchodolski, 2016).

1.4.3 MARKERS E STRUMENTI DI VALUTAZIONE

Esistono diversi test e strumenti utili a valutare lo stato del microbiota intestinale nei casi di patologie associate a disbiosi intestinale. Tra i più utilizzati si possono citare l'indice di disbiosi e l'analisi dei metaboliti fecali; invece, un esame la cui utilità per questo scopo è ancora dubbia è il dosaggio di cobalamina e folati sierici.

Al fine di analizzare la composizione microbica enterica, AlShawaqfeh e colleghi, nel 2017, hanno ideato un indice di disbiosi (DI). Il DI può essere utilizzato sia per valutare lo stato del microbiota intestinale in un particolare momento, sia per valutarne le modificazioni nel tempo o in risposta ad un trattamento (Ziese e Suchodolski, 2020).

Esso si basa sulla qPCR e misura la quantità di sette gruppi batterici (*Faecalibacterium* spp., *Turcibacter* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Blautia* spp., *Fusobacterium* spp. e *Clostridium hiranonis*) e dei batteri totali presenti nelle feci; inserisce questi valori in specifici intervalli di riferimento ed estrapola un singolo numero che esprime il grado di disbiosi. Valori inferiori a 0 indicano uno stato normale del microbiota, valori maggiori di 2 indicano disbiosi, mentre valori compresi tra 0 e 2 vengono considerati equivoci; all'aumentare del valore corrisponde una minor diversità microbica. Sensibilità e specificità nel distinguere un cane sano da uno con CE sono rispettivamente del 74% e 95% (AlShawaqfeh et al., 2017).

Per quanto riguarda le analisi di tipo metabolomico, a livello fecale è possibile misurare il livello di sostanze quali SCFA, lattati e acidi biliari (Blake et al., 2019).

I lattati sono prodotti in parte anche dal microbiota intestinale in 2 diverse isoforme: D- e L-lattato (Liu, 2003; Sheedy et al., 2009; Stiles e Holzapfel, 1997). È importante tenere in considerazione entrambe, perché i gruppi batterici coinvolti nella loro sintesi e metabolismo sono differenti, così com'è differente anche la sintomatologia data da un eventuale accumulo: l'acidosi lattica da D-lattati causa sintomatologia neurologica, a differenza di quella da L-lattati (Ewaschuk et al., 2005). Un aumento di lattati fecali può verificarsi in corso di enteropatia cronica o EPI (Blake et al., 2019). Al contrario, gli acidi biliari secondari fecali possono risultare diminuiti nei cani con patologia gastroenterica rispetto ai soggetti sani (Blake et al., 2019).

È importante interpretare queste alterazioni nei livelli di metaboliti assieme alle informazioni quali-

quantitative sulla composizione batterica affinché possano essere veramente uno strumento utile ad indagare eventuali stati di disbiosi (Blake et al., 2019).

Due sostanze spesso prese in considerazione per la valutazione dello stato di salute intestinale sono la cobalamina ed i folati sierici. La prima viene assorbita a livello di ileo ma, in caso di disbiosi, può essere consumata in maniera eccessiva dai batteri presenti nel piccolo intestino e risultare diminuita a livello sierico. Al contrario, i folati possono essere prodotti in quantità maggiore in caso di proliferazione microbica anomala del piccolo intestino prossimale (sito di assorbimento dei folati), quindi risulteranno aumentati alle indagini ematiche (Suchodolski, 2016).

Il riscontro di questi due parametri alterati potrebbe quindi essere un indizio di disbiosi del piccolo intestino; tuttavia la specificità di questi test per tale diagnosi non è elevata, in quanto il meccanismo di assorbimento di queste due sostanze è notevolmente complesso ed influenzato da numerosi altri fattori (Suchodolski, 2016) Per la diagnosi di disbiosi del piccolo intestino, le sensibilità riportate per le alterazioni di concentrazioni sieriche di cobalamina e folati sono rispettivamente del 25-55% e del 50-66% (German et al., 2003).

1.5 TECNICHE DI MANIPOLAZIONE DEL MICROBIOTA

Per correggere gli stati di disbiosi intestinale, si hanno a disposizione diverse tecniche di manipolazione del microbiota intestinale: approccio dietetico, somministrazione di antibiotici, somministrazione di probiotici, prebiotici o simbiotici, trapianto di microbiota fecale.

Il razionale è quello di eliminare i batteri patogeni, introdurre batteri benefici o fornire supporto alla flora normalmente residente, sebbene la manipolazione di una comunità microbica così complessa non sia semplice ed i risultati non sempre siano quelli prospettati (Pilla e Suchodolski, 2020).

È importante tenere in considerazione quale sia la patologia sottostante, perché nessuno di questi approcci è in grado di trattare tutti i tipi di disbiosi. Soprattutto nelle patologie gastro-enteriche infiammatorie croniche, è importante trattare la condizione infiammatoria per poter avere delle speranze di ripristino del microbiota mediante uno di questi approcci terapeutici (Ziese e Suchodolski, 2020).

1.5.1. APPROCCIO DIETETICO

La gestione dell'alimentazione è un caposaldo della terapia in animali con disbiosi intestinale. Il rationale è quello di fornire una dieta altamente digeribile per ridurre il potenziale accumulo di materiale non digerito all'interno del lume intestinale, che fungerebbe da substrato per la proliferazione batterica (Ziese e Suchodolski, 2020).

In corso di disbiosi da enteropatia cronica, un possibile approccio nutrizionale consiste nell'utilizzo di diete con "*novel proteins*" oppure con proteine idrolizzate (Wernimont et al., 2020); queste ultime si sono dimostrate maggiormente efficaci nel ridurre i segni clinici in cani affetti da IBD (Marchesi et al., 2017).

In molti casi di FRE, il solo approccio dietetico può essere sufficiente al miglioramento clinico dell'animale (Bresciani et al., 2018; Wang et al., 2019).

1.5.2 ANTIBIOTICI

Gli antibiotici vengono spesso utilizzati nella terapia di patologie gastroenteriche acute e croniche con lo scopo di eliminare i batteri patogeni responsabili.

La somministrazione può portare a miglioramento dei sintomi clinici per riduzione di un'eventuale iperproliferazione batterica intestinale e, conseguentemente dello stimolo proinfiammatorio (Westermarck et al., 1993); tuttavia, spesso si assiste ad una recidiva dopo il termine della terapia (Westermarck et al., 2005).

Inoltre, bisogna sempre tenere a mente la possibilità di insorgenza di antimicrobico-resistenza, che potrebbe ostacolare successive terapie ed è un fenomeno allarmante anche per la salute pubblica (Ziese e Suchodolski, 2020).

I principi attivi più comunemente utilizzati sono tilosina e metronidazolo, a volte anche in associazione tra loro. Questi sono in grado di indurre disbiosi intestinale, con riduzione sia nel numero che nella diversità tassonomica del microbiota (Suchodolski et al., 2009) e, anche in seguito all'interruzione della terapia, raramente si ottiene un ritorno alla composizione iniziale (Francino, 2016; Reese et al., 2018).

Dati questi presupposti, la prescrizione di antibiotici in corso di patologia intestinale dovrebbe essere valutata caso per caso e non utilizzata come standard. Se non sussistono motivi ragionevoli

per l'uso di antibiotici, è preferibile ricorrere ad altre metodiche di manipolazione del microbiota intestinale (Pilla e Suchodolski, 2020).

1.5.3 PREBIOTICI

I prebiotici sono sostanze alimentari non digeribili (ad esempio, la fibra) che favoriscono la proliferazione dei microrganismi benefici presenti nell'ospite (Pilla e Suchodolski, 2020).

Essi vengono classificati in solubili/non solubili e in fermentabili/non fermentabili (Ziese e Suchodolski, 2020).

Nel cane sono stati studiati differenti tipi di fibre con effetti prebiotici, ed ognuno induce specifici cambiamenti del microbiota intestinale (Alexander et al., 2018; Middelbos et al., 2010; Myint et al., 2017; Panasevich et al., 2015).

La categoria più rappresentata è quella dei carboidrati complessi e, tra i più comunemente utilizzati, possiamo citare *Psyllium*, polpa di barbabietola, amido resistente e cellulosa (Wernimont et al., 2020).

Il meccanismo d'azione dei prebiotici fermentabili è di fungere da substrato per i batteri presenti nel colon, portando alla produzione di SCFA e alla proliferazione di specifici gruppi benefici (Patra, 2011).

I possibili effetti collaterali dei prebiotici sono flatulenza e diarrea che si risolvono spontaneamente entro poco tempo dall'inizio della terapia (Ziese e Suchodolski, 2020).

L'efficacia di questo trattamento è molto variabile da caso a caso ma, in generale, un trial con prebiotici dovrebbe essere tenuto in considerazione qualora il paziente presenti una disbiosi sia della componente luminale che di quella aderente alla mucosa (Ziese e Suchodolski, 2020).

1.5.4 PROBIOTICI

La definizione ufficiale di "probiotico" è: "microrganismi vivi che, quando somministrati in adeguata quantità, conferiscono beneficio alla salute dell'ospite" (Hill et al., 2014).

I probiotici sono preparazioni che forniscono una fonte esogena di batteri vivi all'ospite, sebbene questi non siano in grado di colonizzare l'intestino a causa della competizione con la flora nativa (Pilla e Suchodolski, 2020).

Tuttavia, possiedono comunque degli effetti benefici attraverso la produzione di metaboliti e peptidi

antimicrobici che modificano il microbiota locale e che interagiscono con il sistema immunitario dell'ospite (Schmitz e Suchodolski, 2016). Gli effetti sul paziente dipendono da quali ceppi siano presenti nel prodotto ed è importante scegliere probiotici per i quali sussistano evidenze scientifiche di efficacia per la patologia da trattare (Ziese e Suchodolski, 2020).

Nell'ambito della salute dei nostri animali da compagnia, molti dei probiotici studiati appartengono ai tre generi: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ed *Enterococcus* (Jugan et al., 2017).

L'utilizzo dei probiotici è ancora parecchio dibattuto in medicina veterinaria, a causa della carenza di studi qualitativamente significativi in letteratura scientifica per quanto riguarda la loro efficacia. Senza contare che non ci sono ancora delle chiare linee guida in merito a scelta della formulazione, posologia e monitoraggio della terapia (Jugan et al., 2017).

1.5.5 SIMBIOTICI

I simbiotici sono prodotti contenenti una combinazione di prebiotici e probiotici, fornendo dunque un duplice effetto benefico (Schmitz e Suchodolski, 2016).

Tuttavia, in maniera analoga ai probiotici, anche per i simbiotici la letteratura non fornisce prove inequivocabili della loro efficacia; anzi, i risultati degli studi spesso dimostrano effetti benefici solamente parziali sulla salute dell'animale: ad esempio, cani con FRE trattati con simbiotici hanno mostrato solo un lieve aumento di diversità microbica (Whittemore et al., 2019), mentre la combinazione di probiotici e simbiotici ha mitigato solo alcuni dei sintomi gastro-enterici (incidenza e frequenza del vomito non sono calate in maniera significativa) indotti da enrofloxacin e metronidazolo (Pilla et al., 2019).

1.6 IL TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE NELL'UOMO

Il trapianto di microbiota fecale (FMT) è una metodica che consiste nel trasferimento di materiale fecale da un donatore sano al tratto gastro-enterico di un ricevente malato, con lo scopo di normalizzare la composizione del microbiota intestinale del ricevente.

Attualmente l'FMT viene utilizzato soprattutto per il trattamento di patologie gastro-enteriche (Borody et al., 2019); in medicina umana, l'applicazione come terapia per patologie non-gastro-enteriche (ad esempio neurologiche o metaboliche) sembra promettente, ma tuttora in fase di studio (Kang et al., 2017; Kootte et al., 2017).

1.6.1 SELEZIONE DEL DONATORE

La selezione del donatore è un passaggio fondamentale, probabilmente il più importante affinché la terapia porti ad un esito positivo. Bisogna infatti ridurre al minimo il rischio di trasmissione di patologie infettive o parassitarie ed è necessario che il microbiota del donatore sia quanto più possibile sano (Antushevich, 2020).

È dunque importante che il soggetto in questione sia in completa salute, non abbia sofferto di patologie (gastro-enteriche e non) in passato e non abbia ricevuto recenti terapie con farmaci che possano alterare la flora intestinale. Oltre a visita clinica, esame emocromocitometrico e biochimico ed esame delle feci, è bene che il donatore sia anche sottoposto a test specifici per escludere la presenza dei più comuni enteropatogeni (Vindigni e Surawicz, 2017).

Gli studi sull'uomo hanno evidenziato come il materiale prelevato da donatori non imparentati con il ricevente abbia efficacia comparabile a quello prelevato da parenti stretti (Lynch et al., 2019).

Per quanto riguarda le differenze di genere, nell'uomo è stato notato che maschi e femmine sani possiedono una composizione microbica intestinale diversa (Haro et al., 2016; Singh e Manning, 2016), fatto di cui si potrebbe tenere conto nella scelta del donatore.

Ad avvalorare l'idea di quanto sia importante avvalersi di un donatore ottimale, è stato notato come uno dei migliori indici prognostici per la risposta alla terapia sia un'alta biodiversità nel microbiota del donatore (Tang et al., 2017).

1.6.2 PREPARAZIONE DEL MATERIALE PER IL TRAPIANTO

Una volta raccolte le feci, esse devono essere processate per ottenere una forma liquida da utilizzare nel trapianto. Il materiale prodotto può essere utilizzato fresco oppure congelato per un uso successivo. In medicina umana, è in fase di studio anche l'uso di materiale fecale liofilizzato (Reigadas et al., 2020).

La tecnica di preparazione è simile per tutti i tipi di utilizzo (fresco, congelato o liofilizzato): nell'uomo solitamente vengono diluiti 50 grammi di feci in soluzione salina 0,9% (Gough et al., 2011) con un rapporto grammi/millilitri compreso tra 1/3 e 1/5 (Cammarota et al., 2017); il liquido ottenuto viene filtrato attraverso garze (Lee et al., 2016), filtri da tè o altri dispositivi (Brandt et al., 2012) e infine versato in un contenitore sterile. In alcune pubblicazioni, anche l'acqua è stata

utilizzata con successo come diluente (Mattila et al., 2012; Satokari et al., 2015), ma non ci sono studi di comparazione sull'efficacia di tipi di diluente diversi. La soluzione salina 0,9% è generalmente preferita perché permette una miglior conservazione microbica (Liao e Shollenberger, 2003).

Se si intende congelare il materiale fecale, è bene aggiungere alla sospensione anche glicerolo ad una concentrazione finale del 10% (Satokari et al., 2015), per proteggere le cellule microbiche dai danni provocati dal congelamento (Fuller, 2004). La temperatura di conservazione è di -80°C e il campione deve essere correttamente etichettato e tracciabile.

Il campione da congelare va preparato già diviso nelle dosi che si intendono utilizzare, perché ripetute azioni di congelamento e scongelamento possono danneggiare le cellule microbiche (Sleight et al., 2006).

Per la formulazione liofilizzata, sono necessari ulteriori passaggi preparatori in seguito alla filtrazione: lo studio di Reigadas (2020) riporta che il liquido viene poi centrifugato, decantato e centrifugato nuovamente (per aumentarne la concentrazione) e il sedimento viene successivamente risospeso in soluzione salina e trealosio (che funge da lioprotettore). La soluzione ottenuta viene liofilizzata a -85°C per 44 ore; infine, il materiale ottenuto è incapsulato in capsule di ipromellosa e conservato a 4°C fino alla somministrazione.

Preparare il materiale in una condizione di anaerobiosi, in linea teorica, dovrebbe portare dei vantaggi in quanto la componente più spesso alterata in corso di disbiosi intestinale è proprio quella degli anaerobi. Nella pratica, tuttavia, non sono state dimostrate differenze significative nell'efficacia del trattamento per rCDI nell'uomo qualora il materiale sia stato preparato in condizioni di aerobiosi (Satokari et al., 2015); questo è probabilmente dovuto al fatto che una buona parte dei batteri intestinali è in grado di sporulare e di resistere quindi fino al trasferimento (Browne et al., 2016).

Il materiale fresco andrebbe utilizzato entro 6 ore dalla defecazione, mentre quello congelato va prima scongelato a bagnomaria in acqua a 37°C e poi utilizzato entro 6 ore (Cammarota et al., 2017). Ad oggi non sussistono evidenze sulla superiorità dell'utilizzo di materiale fresco rispetto al congelato (Li et al., 2016) e non ci sono studi che mettano a confronto l'uso di materiale liofilizzato rispetto a quello fresco o congelato.

1.6.3 PREPARAZIONE DEL PAZIENTE

Prima della somministrazione, è necessario accertarsi che il soggetto non sia sotto terapia antibiotica, perché questa potrebbe ridurre notevolmente l'efficacia del trattamento.

In medicina umana, i pazienti con rCDI vengono sottoposti a terapia antibiotica per almeno 3 giorni (Trubiano et al., 2016) e questa viene sospesa 12-48 ore prima del FMT (Cammara et al., 2017). L'obiettivo è quello di ridurre la carica intestinale di *Cl. difficile*. Qualora vi siano stati patologici che non coinvolgano patogeni specifici, la terapia antibiotica non è raccomandata (Cammara et al., 2017).

1.6.4 VIE DI SOMMINISTRAZIONE

Esistono diverse possibili vie di somministrazione: capsule orali, colonscopia, tubo naso-gastrico, naso-duodenale o naso-digiunale, enema.

L'utilizzo di capsule orali contenenti materiale liofilizzato, sebbene si sia mostrato efficace nel trattamento di rCDI (Reigadas et al., 2020), è tuttora in fase di studio in medicina umana e non sono ancora state effettuate comparazioni rispetto ad altre vie di somministrazione. In questo paragrafo e nei successivi, quando si parla di "capsule orali", ci si riferisce a quelle contenenti materiale liquido precedentemente congelato.

Gli studi in medicina umana hanno riportato una miglior efficacia del trattamento per via coloscopica rispetto a quello mediante tubo naso-gastrico ed enema. Questo è probabilmente dovuto in gran parte alla sede di deposito del materiale fecale: con la colonscopia il trapianto avviene al livello di colon prossimale, cieco e/o ileo distale, con l'enema avviene a livello di colon distale, mentre con il tubo nasogastrico a livello di stomaco (Ramai et al., 2020).

La via discendente si è rivelata meno efficace probabilmente a causa dell'effetto degli acidi gastrici e biliari sulla vitalità e funzionalità dei batteri introdotti (Ramai et al., 2020).

L'efficacia sull'uomo delle capsule orali, sebbene anche esse debbano transitare attraverso l'ambiente gastrico, è risultata paragonabile a quella della colonscopia (Staley et al., 2018); il merito è del tipo di rivestimento, che consente una parziale protezione dagli acidi gastrici e il rilascio del materiale su differenti distretti del tratto gastroenterico (Allegretti et al., 2019). L'unica differenza sostanziale, per quanto riguarda l'effetto, tra colonscopia e capsule orali è che queste ultime possono impiegare un tempo maggiore per dare miglioramento, in base alla sede di rilascio del

materiale, al pH gastrico e alla motilità intestinale (Staley et al., 2018).

Dal momento che capsule orali e colonscopia sono approcci terapeutici comparabili dal punto di vista del rapporto costo/efficacia (Luo et al., 2020; Shaffer et al., 2020), la scelta di uno o dell'altro dipende principalmente dalle preferenze del proprietario e del medico, nonché dalla disponibilità del trattamento presso la struttura (Ramai et al., 2020).

1.6.5 QUANTITÀ E FREQUENZA DI SOMMINISTRAZIONE

La quantità/concentrazione di materiale somministrato è solitamente maggiore se si utilizza la via discendente rispetto all'ascendente (Ramai et al., 2020). Per quel che concerne la colonscopia, è stato evidenziato che quantità maggiori di materiale infuso non si associano ad un maggior tasso di guarigione (Ramai et al., 2020).

La frequenza di somministrazione dipende strettamente dalla risposta alla terapia ed è variabile da soggetto a soggetto. È possibile che un singolo trapianto sia efficace a lungo termine, ma può essere altresì necessaria una somministrazione multipla in un determinato periodo di tempo per assicurare una risposta duratura.

1.6.6 EFFETTI AVVERSI

Questo trattamento, indipendentemente dalla via di somministrazione, è considerato generalmente sicuro (Bunnik et al., 2017), a patto di operare una scrupolosa selezione del donatore.

Possono, tuttavia, verificarsi degli effetti avversi che, nella grande maggioranza dei casi, si rivelano lievi, autolimitanti e di natura gastroenterica ([Tabella 1](#)).

RIASSUNTO DEGLI EFFETTI AVVERSI DERIVANTI DAL TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE (FMT) NELL'UOMO	
Effetti avversi minori (comuni) del FMT	<ul style="list-style-type: none"> – <i>Discomfort</i> addominale – Abitudini intestinali alterate – Gonfiore – Borborigmi intestinali – Febbre lieve e transitoria – Flatulenza – Nausea e vomito
Effetti avversi gravi (rari) del FMT	<ul style="list-style-type: none"> – Febbre alta – Peggioramento dell'IBD – Infezione e sepsi – Trasmissione di enteropatogeni – Perforazione intestinale, sanguinamento intestinale, aspirazione a causa della sedazione (se utilizzata l'endoscopia) – Riattivazione di citomegalovirus (in pazienti sieropositivi) – Polmonite – Morte
Effetti avversi potenziali del FMT	<ul style="list-style-type: none"> – Induzione di malattie croniche (sindrome metabolica, diabete, malattie autoimmuni, malattie neoplastiche, ecc.) – Trasmissione di agenti infettivi (virus, batteri, ecc.)

Tabella 1: elenco dei potenziali rischi associati al trapianto di microbiota fecale nell'uomo (Dailey et al., 2019).

Le complicazioni possono essere influenzate anche dalla via di somministrazione: la colonscopia può essere associata a sanguinamento o perforazione intestinale (Mattila et al., 2012), mentre la via naso-digiunale a febbre transitoria ed aumento della proteina C reattiva (Vermeire et al., 2016). Inoltre la sedazione, associata alle tecniche endoscopiche o di posizionamento di tubo nasogastrico, naso-duodenale o naso-digiunale, può essere causa di aspirazione di materiale e conseguenti lesioni a livello respiratorio (Vindigni e Surawicz, 2017).

Da questo si evince che la forma farmaceutica più sicura è probabilmente la capsula orale.

La mortalità correlata all’FMT, sebbene estremamente rara, è stata riportata in medicina umana. Gli unici casi di morte con accertata associazione al trattamento sono dovuti a conseguenze di anestesia/sedazione (Kelly et al., 2014; Quraishi et al., 2017) ed alla trasmissione, mediante il trapianto, di un patogeno farmaco-resistente (*Escherichia coli* produttore di *extended spectrum-beta lactamase*) e verso cui non era stato eseguito lo screening sulle feci del donatore (DeFilipp et al., 2019).

1.6.7 MONITORAGGIO

La durata del monitoraggio post-terapia non è ancora stata chiaramente definita, probabilmente anche per il fatto che essa dipende da diversi fattori: patologia sottostante, condizioni del paziente e via di somministrazione (Sokol et al., 2016). I pazienti umani trattati per rCDI dovrebbero essere seguiti per almeno 8 settimane (Cammarota et al., 2017).

È importante che il trapianto di microbiota fecale sia programmato e seguito in tutte le sue fasi da un medico adeguatamente formato sugli aspetti sia teorici che pratici del trattamento (Cammarota et al., 2017).

1.7 TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE NELLE VARIE SPECIE

Il trapianto di microbiota fecale è una tecnica in uso anche per specie animali diverse dall'uomo, però solo a livello sperimentale o in maniera non regolamentata da apposite linee guida.

1.7.1 UTILIZZO NELL'UOMO

Nell'uomo, l'unica condizione clinica per cui esistano buone evidenze scientifiche riguardanti l'efficacia del trapianto di microbiota fecale è l'infezione da *Cl. difficile* (Cammarota et al., 2017). Questa tecnica è raccomandata a livello internazionale per il trattamento di infezione ricorrente da *Cl. difficile* (rCDI) (Debast et al., 2014; Surawicz et al., 2013), dal momento che il tasso di guarigione post-terapia si attesta intorno all'80% (Lee et al., 2016).

Gli studi di confronto tra FMT e somministrazione di vancomicina (uno degli antibiotici di scelta nella terapia per CDI) hanno dimostrato una maggior efficacia del trapianto fecale (Cammarota et al., 2015; van Nood et al., 2013). È quindi ragionevole supporre che, sebbene la scarsa quantità di studi a riguardo, il FMT possa essere una valida opzione terapeutica anche nei casi di CDI refrattaria alla terapia antibiotica standard (Cammarota et al., 2017).

Per quanto riguarda gli episodi iniziali di CDI, non sussiste ancora sufficiente evidenza per raccomandare il trapianto fecale in alternativa alla terapia standard, anche per giustificare la differenza di costi in rapporto al beneficio (Cammarota et al., 2017).

Esistono altre patologie gastroenteriche verso cui il FMT si è dimostrato una scelta terapeutica promettente. In alcune pubblicazioni di medicina umana, sono stati registrati miglioramenti della sintomatologia clinica dopo il trapianto in pazienti affetti da sindrome dell'intestino irritabile (Johnsen et al., 2017), colite ulcerativa (Ding et al., 2019) e acidosi D-lattica in corso di sindrome dell'intestino corto (Davidovics et al., 2017); inoltre si sono avuti miglioramenti negli esami di laboratorio e nella biodiversità microbica intestinale in casi di colangite sclerosante primaria (Allegretti et al., 2019; Philips et al., 2018).

Oltre alle patologie gastro-enteriche, il trapianto fecale è studiato nell'uomo come possibile ausilio per diversi disordini neurologici in cui si sia evidenziata una disbiosi intestinale potenzialmente correlata; tra le più conosciute, si annoverano: malattia di Parkinson, sclerosi multipla, disturbi dello spettro autistico, malattia di Alzheimer ed epilessia (Vendrik et al., 2020).

Al momento, la maggior efficacia del FMT si è rivelata essere quella nei confronti dei disturbi dello spettro autistico (Kang et al., 2017, 2019); in generale, tuttavia, mancano ancora studi di qualità tale da permettere una sufficiente conoscenza degli effetti del trapianto fecale in tutte queste malattie, sebbene sia un campo di ricerca molto promettente (Vendrik et al., 2020).

Per quanto riguarda i disordini di ordine metabolico, il trapianto di microbiota sembra avere un effetto mitigante in corso di sindrome metabolica, aumentando la sensibilità all'insulina e facilitando il metabolismo del glucosio (Kootte et al., 2017; Vrieze et al., 2012). Sono sempre più accreditate anche le convinzioni che il FMT possa avere un effetto modulante la regolazione del peso corporeo (Alang e Kelly, 2015; De Clercq et al., 2019).

Infine, il trapianto fecale si è dimostrato utile nel trattamento degli effetti collaterali dati da immunoterapia nei pazienti oncologici (Antushevich, 2020).

1.7.2 UTILIZZO NEL BOVINO

Nel bovino viene utilizzata da molti anni una tecnica chiamata "trasfaunazione": essa consiste nel trasferimento di liquido ruminale da un donatore ad un ricevente, con il conseguente trasferimento di sostanze utili per l'ambiente ruminale (come acidi grassi volatili, sostanze tampone e proteine) e microrganismi: batteri, protozoi (che in questo caso giocano un ruolo importante), funghi ed archea. Questa pratica è in uso da molto prima dello sviluppo del trapianto fecale e, sebbene presenti alcune differenze nell'esecuzione, il rationale è il medesimo (DePeters e George, 2014).

Una delle tecniche maggiormente utilizzate per la raccolta di liquido ruminale dall'animale donatore è attraverso una fistola ruminale permanente creata per via chirurgica: questo metodo è più agevole per l'operatore, consente il prelievo di maggiori quantità di fluido ed è anche meno stressante per l'animale rispetto al posizionamento di tubi naso-gastrici od oro-gastrici (DePeters e George, 2014).

La trasfaunazione è una pratica raccomandata e comunemente usata in caso di indigestione semplice; la letteratura scientifica è molto carente a riguardo, però questo trattamento è risultato efficace in uno studio recente (Steiner et al., 2020).

Un altro possibile utilizzo che si è dimostrato benefico è quello successivo a chirurgia per dislocazione sinistra dell'abomaso, permettendo agli animali un più rapido recupero (Rager et al., 2004).

1.7.3 UTILIZZO NEL SUINO

Nei maiali, il trapianto di microbiota fecale è ancora utilizzato sostanzialmente solo in ambito di ricerca, che si divide in due principali categorie: studi del suino come modello per l'uomo e studi per il miglioramento della gestione zootecnica del suino.

Per quel che concerne la produzione suinicola, il FMT è uno strumento utile ad indagare possibili miglioramenti nella performance di crescita degli animali, sviluppo di strategie di alimentazione alternative e riduzione nell'utilizzo di antibiotici e metalli pesanti, nell'ottica di limitare i fenomeni di antibiotico-resistenza e inquinamento ambientale; tutto questo cercando comunque di non inficiare il benessere animale e il livello produttivo (Canibe et al., 2019).

Tra i risultati ottenuti dai ricercatori in questo ambito, è di grande rilievo la constatazione di un effetto protettivo sulla barriera intestinale e di una modulazione della risposta infiammatoria grazie al FMT (Geng et al., 2018; Hu et al., 2018).

Un problema importante dell'allevamento suino è lo sviluppo di diarrea negli animali giovani, ed è per questo che è stato indagato se fosse possibile trasmettere un fattore di resistenza, da parte di razze meno affette da questa problematica, mediante trapianto fecale. I risultati ottenuti in questo ambito sono promettenti (Hu et al., 2018). Inoltre il FMT si è anche dimostrato un potenziale sussidio terapeutico in corso di infezione da circovirus suino (Niederwerder et al., 2018).

Se gli effetti da un punto di vista prettamente sanitario del FMT si sono rivelati nel complesso promettenti, la stessa cosa non si può dire per quel che riguarda la sfera produttiva: mentre alcuni studi hanno riportato esiti positivi (Cheng et al., 2019; Wang et al., 2019), altri hanno dimostrato addirittura un peggioramento delle performance produttive degli animali (McCormack et al., 2019).

L'altro campo di utilizzo del trapianto di microbiota fecale nel suino è lo studio sperimentale per la medicina umana, utilizzando questa specie come modello per l'uomo. Dato che il microbioma umano e suino sono più simili tra loro rispetto, ad esempio, a quelli di uomo e topo (Xiao et al., 2016), è possibile eseguire un trapianto di materiale fecale umano in un maiale con risultati più affidabili rispetto all'utilizzo di altre specie non-primati (Pang et al., 2007; Zhang et al., 2013).

Diversi studi sono stati volti ad indagare gli aspetti dell'infezione da rotavirus nei bambini (Wen et al., 2014; Zhang et al., 2014), gli effetti della malnutrizione negli infanti (Kumar et al., 2018) o anche l'utilità di alcuni prebiotici (Shen et al., 2010); in tutte queste indagini, è stato somministrato

materiale fecale, prelevato da donatori umani, ad animali “*germ-free*” utilizzati come modello sperimentale.

Riguardo l’utilizzo del FMT nel suino, sono necessarie molte altre ricerche prima di poter confermare questa pratica come effettivamente utile e vantaggiosa; soprattutto per quanto riguarda la produzione zootecnica, in cui i risultati ottenuti spesso si sono dimostrati inconsistenti (Canibe et al., 2019).

1.7.4 UTILIZZO NEI RODITORI DA LABORATORIO

Topi e ratti sono comunemente utilizzati come modello umano negli studi sperimentali volti ad indagare gli effetti di modulazione del microbiota intestinale. A questo scopo, generalmente gli animali vengono resi “abiotici”, cioè con un ambiente intestinale il più sterile possibile, in fasi precedenti all’esecuzione del trapianto fecale.

Essendo surrogati dell’uomo, essi sono impiegati in tutti i possibili campi di ricerca riguardanti il microbiota intestinale. Sono innumerevoli gli studi riguardanti la natura di stati patologici gastroenterici (e non) e il potenziale effetto terapeutico del FMT o di altre tecniche di modulazione della flora intestinale (Burrello et al., 2019; Prado et al., 2019; Zhou et al., 2019).

Molto interessanti sono le ricerche riguardanti l’obesità e il trasferimento di microbiota tra animali obesi e animali magri, sebbene i risultati riscontrati siano spesso contrastanti (Kulecka et al., 2016; Lai et al., 2018; Sun et al., 2018).

Oltre allo studio delle malattie, i roditori sono utili anche per approfondire le conoscenze di numerose funzioni fisiologiche in che vi sia un coinvolgimento diretto o indiretto del microbiota intestinale; alcuni esempi sono: regolazione della pressione sanguigna (Torral et al., 2019), aspetti comportamentali (Luo et al., 2018) e regolazione del sistema immunitario (Ekmekci et al., 2017).

1.7.5 UTILIZZO NEL CAVALLO

Il trapianto fecale nei cavalli è una tecnica poco studiata ma utilizzata nella pratica clinica e che ha riportato aneddotici risultati positivi nel trattamento per diarrea cronica (Feary e Hassel, 2006). Le cause riportate di disbiosi intestinale nell’equino sono numerose; tra le più comuni ci sono: colite di qualsiasi natura, colica post-partum, laminite acuta e cronica, cambi di dieta, somministrazione di antibiotici (Mullen et al., 2018). Potenzialmente il FMT potrebbe essere una valida opzione terapeutica per tutte queste situazioni, tuttavia sono necessari ancora molti studi per poterlo

affermare con certezza.

Uno studio recente (McKinney et al., 2020) ha supportato l'efficacia del FMT nel trattamento di colite, oltre a suggerire che l'età del donatore rispetto a quella del ricevente non è un fattore limitante, a differenza della tipologia di dieta.

1.7.6 UTILIZZO NEL POLLO

Anche nei polli gli studi riguardanti il trapianto di microbiota fecale sono molto limitati. Essi si occupano perlopiù di analizzare la correlazione tra microbiota ed efficienza alimentare, in modo da poter eventualmente trasmettere caratteristiche migliori ai nuovi nati (Metzler-Zebeli et al., 2019; Siegerstetter et al., 2018). Queste sperimentazioni non hanno purtroppo raggiunto l'obiettivo prefissato, ma non per questo negano l'importanza di ulteriori approfondimenti in merito.

Un altro aspetto analizzato dai ricercatori è stata la trasmissione di resistenza ad infezione da *Salmonella infantis* mediante FMT in pulcini appena nati; i risultati ottenuti sono stati positivi (Nurmi e Rantala, 1973).

2. OBIETTIVO

Lo scopo di questa tesi è di svolgere una revisione narrativa della letteratura scientifica riguardante l'utilizzo del trapianto di microbiota fecale nel cane, per poter fare maggiore chiarezza sulla metodica di esecuzione ed indagarne i possibili campi di applicazione.

3. MATERIALI E METODI

È stata condotta una ricerca nella letteratura scientifica di tutti gli articoli che riguardassero il trapianto di microbiota fecale nel cane.

Gli studi sono stati ricercati nei seguenti siti internet: *Pubmed* ([PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/)), *Scopus* ([Scopus - Document search | Signed in](https://www.scopus.com/documentsearch/signedin)), *Google Scholar* ([Google Scholar](https://scholar.google.com/)), *Wiley Online Library* ([Wiley Online Library | Scientific research articles, journals, books, and reference works](https://www.wiley.com/doi/10.1002/scientificresearch)).

Le parole-chiave utilizzate sono state: “dog” o “canine” associato a “fecal microbiota transplantation”, “fecal transplant”, “stool transplantation” o “FMT”.

Sono stati inclusi tutti gli articoli scientifici, abstract di congressi e tesi universitarie, pubblicati da giugno 2013 ad aprile 2020, che riportavano i risultati di prove e report clinici di applicazione del FMT nel cane.

Sono stati esclusi tutti gli articoli scientifici che:

- citavano solamente il FMT come opzione terapeutica nel cane, senza dare ulteriori informazioni a riguardo;
- eseguivano una revisione della letteratura scientifica riguardo il FMT nel cane, in quanto presentanti informazioni ridondanti con quelle degli studi clinici e dei *case report* selezionati.

È stata effettuata una prima ricerca su *Pubmed* in data 12 giugno 2020, inserendo nella barra di ricerca le parole-chiave sopra citate. Successivamente è stata scansionata la bibliografia degli articoli raccolti fino a quel momento, per ricercare eventuali altre pubblicazioni utili. Infine, è stata eseguita una ricerca mediante i medesimi criteri anche sulle piattaforme *Scopus* e *Google Scholar*.

È stata esaminata anche la bibliografia di alcune revisioni della letteratura che trattavano totalmente o in parte di FMT nel cane (Chaitman et al., 2016; Chaitman e Gaschen, 2020; Redfern et al., 2017) per cercare materiale precedentemente non reperito.

In data 17 novembre 2020, è stata ripetuta la ricerca su *Pubmed*, *Scopus* e *Google Scholar* con le medesime parole-chiave utilizzate la prima volta.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Mediante la prima ricerca su *Pubmed* con le parole-chiave “dog” associata a “fecal transplantation” si sono ottenuti 44 risultati, dei quali ne sono stati selezionati 4 (Chaitman et al., 2020; Niina et al., 2019; Pereira et al., 2018; Sugita et al., 2019) di utili per lo scopo di questa tesi; con le parole “FMT dog”, è stato trovato un ulteriore articolo (Burton et al., 2016) inerente all’argomento.

La ricerca su *Scopus* e *Google Scholar* con le medesime parole-chiave ha permesso di trovare un altro articolo scientifico (Bottero et al., 2017) e una tesi universitaria (Gerbec, 2016) riportanti studi clinici sull’utilizzo del FMT nel cane.

Sono stati utilizzati anche i termini “canine” associato a “fecal transplantation” e, mediante *Pubmed*, sono stati ottenuti 45 risultati; non era presente alcuna pubblicazione diversa da quelle precedentemente ottenute sull’argomento. Le combinazioni della parola-chiave “canine” con gli altri termini (riportati nel capitolo 3) e negli altri motori di ricerca (*Scopus* e *Google Scholar*) non ha portato all’acquisizione di nuovo materiale.

La scansione della bibliografia delle pubblicazioni raccolte fino a quel momento ha consentito di reperire 2 abstract di studi (Murphy et al., 2014; Weese et al., 2013), presentati a congressi internazionali, che trattavano dell’argomento in questione.

La bibliografia delle revisioni della letteratura citate nel capitolo precedente ha permesso di trovare altri 3 abstract di congressi (Burchell et al., 2018; Chaitman et al., 2017; Dwyer et al., 2019) rientranti nei criteri di inclusione del lavoro.

L’utilizzo di parole-chiave diverse da “fecal transplantation dog” e “FMT dog” nei vari motori di ricerca e il secondo controllo, effettuato in data 17 novembre 2020, non hanno consentito di trovare altro materiale utile.

Per ottenere gli abstract dei congressi, è stata utilizzata la piattaforma *Wiley Online Library*, per lo studio di Bottero (2017) è stato utilizzato *Scopus* e per la tesi di Gerbec (2016) *Google Scholar*. Tutti gli altri articoli sono stati trovati su *Pubmed*.

Dalle ricerche qui illustrate, è stato quindi possibile identificare e selezionare 12 pubblicazioni corrispondenti ai criteri di ricerca del lavoro, le cui caratteristiche principali sono riassunte nella

Tabella 2.

ARTICOLO	OBIETTIVO	TIPO DI STUDIO
<p><i>Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole</i>; 2020; Chaitman J. et al.</p>	<p>Valutare differenze su microbiota, metaboloma e miglioramento clinico in cani con diarrea acuta non complicata, dopo trapianto fecale o trattamento con metronidazolo</p>	<p>Studio di coorte</p>
<p><i>Improvement in Clinical Symptoms and Fecal Microbiome After Fecal Microbiota Transplantation in a Dog with Inflammatory Bowel Disease</i>; 2019; Niina A. et al.</p>	<p>Descrivere il trattamento di un cane con IBD mediante trapianto fecale ripetuto a lungo termine</p>	<p>Case report</p>
<p><i>Oral faecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhoea in a dog: a case report</i>; 2019; Sugita K. et al.</p>	<p>Descrivere il caso di un cane con diarrea associata a <i>Cl. difficile</i> trattata con trapianto fecale</p>	<p>Case report</p>
<p><i>Effect of fecal microbiota transplantation on the fecal microbiome of healthy dogs treated with antibiotics</i> [Abstract]; 2019; Dwyer E. et al.</p>	<p>Valutare l'efficacia del trapianto di microbiota fecale, somministrato oralmente o mediante enema, sul ripristino del microbioma fecale dopo trattamento con tilosina su cani sani</p>	<p>Studio controllato randomizzato</p>

ARTICOLO	OBIETTIVO	TIPO DI STUDIO
<i>Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection</i> ; 2018; Pereira G. Q. et al.	Valutare efficacia e sicurezza del trapianto fecale in cuccioli con diarrea emorragica acuta da parvovirosi	Studio controllato randomizzato
<i>Faecal microbial transplantation in a canine model of haemorrhagic diarrhoea syndrome</i> [Abstract]; 2018; Burchell R. et al.	Determinare se il FMT possa alterare sostanzialmente la diversità del microbiota per almeno un mese	Studio controllato randomizzato
<i>Trapianto del microbiota fecale (FMT) in 16 cani affetti da IBD idiopatica</i> ; 2017; Bottero E. et al.	Valutare risposta ed efficacia del trapianto fecale in cani con IBD idiopatica non responsiva alle comuni terapie mediche	Studio clinico osservazionale
<i>Fecal microbial transplantation decreases the dysbiosis index in dogs presented with chronic diarrhea</i> [Abstract]; 2017; Chaitman J. et al.	Valutare il microbiota fecale prima e dopo FMT in cani che si presentano con diarrea cronica	Studio clinico osservazionale
<i>Evaluation of Fecal Microbiota Transfer as Treatment for Postweaning Diarrhea in Research-Colony Puppies</i> ; 2016; Burton E. N. et al.	Valutare il trapianto fecale come strumento pragmatico ed efficace per accelerare la transizione del microbiota alla composizione adulta e stabilire il potenziale del trapianto fecale come trattamento o misura preventiva della diarrea post-svezzamento nei cuccioli	Studio controllato randomizzato

ARTICOLO	OBIETTIVO	TIPO DI STUDIO
<i>Evaluation of therapeutic potential of restoring gastrointestinal homeostasis by a fecal microbiota transplant in dogs</i> [Tesi]; 2016; Gerbec Z.	Valutare il potenziale terapeutico del trapianto fecale nel ripristino dell'omeostasi gastro-intestinale del cane	Studio clinico osservazionale
<i>Use of fecal transplant in eight dogs with refractory Clostridium perfringens associated diarrhea</i> [Abstract]; 2014; Murphy T. et al.	Determinare se il trapianto fecale possa essere utilizzato per il trattamento di cani con infezione da <i>Clostridium perfringens</i> , la cui terapia con metronidazolo e amoxicillina-acido clavulanico sia risultata inefficace	Studio clinico osservazionale
<i>Preliminary clinical and microbiome assessment of stool transplantation in the dog and cat</i> [Abstract]; 2013; Weese J. et al.	Fornire una valutazione preliminare sull'efficacia del trapianto fecale nel cane e nel gatto	Case report

Tabella 2. Caratteristiche degli studi sul FMT nel cane, in ordine cronologico partendo dalla pubblicazione più recente.

FMT: Fecal Microbiota Transplantation

IBD: Inflammatory Bowel Disease

I contenuti delle pubblicazioni selezionate verranno qui di seguito presentati e discussi, focalizzando l'attenzione su:

- caratteristiche ideali del donatore canino;
- caratteristiche del ricevente canino;
- tecnica di trapianto di microbiota fecale nel cane;
- effetti avversi nel cane;
- monitoraggio del paziente;
- efficacia.

4.1 CARATTERISTICHE IDEALI DEL DONATORE CANINO

La scelta del donatore è una fase di fondamentale importanza; se eseguita in maniera scorretta, infatti, può essere responsabile di gravi effetti avversi a seguito del FMT.

Le fasi di selezione sono sostanzialmente tre: segnalamento, anamnesi e visita clinica con esami collaterali.

4.1.1 SEGNALAMENTO

Per quanto riguarda il segnalamento, i possibili fattori da tenere in considerazione sono: età, razza e sesso (questi ultimi due sono da riportare a quelli del ricevente).

Negli studi in cui viene specificata l'età dei donatori, essa rientra nell'intervallo di età compresa tra 3 e 9 anni (Bottero et al., 2017; Gerbec, 2016; Niina et al., 2019; Pereira et al., 2018; Sugita et al., 2019). L'unica eccezione è che, nello studio di Bottero (2017), è ammesso un cane di 6 mesi d'età che funge da donatore per 3 diversi pazienti: in tutti e 3 ci sono stati dei miglioramenti del CCECAI rispetto a prima del trapianto, ma un soggetto ha presentato diarrea di maggior gravità, rispetto alle condizioni di partenza, nelle 48 ore successive al FMT; questo problema si è poi risolto e non ci sono evidenze che lo associno all'età del donatore.

Nella revisione della letteratura sul FMT nel cane più recente e completa da un punto di vista bibliografico (Chaitman e Gaschen, 2020), è suggerito di selezionare animali con un'età compresa tra 1 e 10 anni; il probabile rationale è di assicurarsi che la composizione microbica intestinale sia già quella tipica dell'animale adulto e di evitare l'utilizzo di animali troppo vecchi che potrebbero avere già una riduzione della biodiversità microbica gastro-enterica o patologie concomitanti di varia natura.

Uno studio recente (Scarsella et al., 2020) ha cercato di individuare possibili differenze nella composizione del microbiota tra cani maschi e femmine, senza rilevarne di significative; le maggiori diversità si sono invece riscontrate tra animali interi e sterilizzati, indipendentemente dal genere: questo fattore quindi potrebbe potenzialmente essere tenuto in considerazione durante la scelta del donatore. Nelle pubblicazioni oggetto della tesi, solamente Sugita (2019) e Niina (2019) hanno mantenuto lo stesso genere e lo stesso status riproduttivo tra donatori e riceventi.

Nonostante ciò, anche gli studi che non hanno rispettato una correlazione di genere e stato riproduttivo tra donatori e riceventi, non hanno dimostrato una mancanza di efficacia del trapianto fecale correlata a questa scelta (Bottero et al., 2017; Chaitman et al., 2020; Pereira et al., 2018).

Tra i vari autori, Bottero (2017) è l'unico che suggerisce di scegliere cani della stessa razza rispetto ai riceventi, nonostante il suo stesso studio non abbia potuto rispettare tale restrizione; inoltre, altre pubblicazioni hanno presentato un esito positivo del FMT, con miglioramento dei segni clinici post-terapia, pur utilizzando donatori e riceventi di razze completamente diverse tra loro (Niina et al., 2019; Sugita et al., 2019).

Ad oggi, quindi, non sussiste ancora un'evidenza scientifica che giustifichi una corrispondenza di razza tra donatori e riceventi come criterio di selezione. In generale, si potrebbe considerare di evitare l'uso di razze notoriamente predisposte allo sviluppo di patologie gastro-enteriche (ad esempio Pastore tedesco, Rottweiler, Bulldog francese e Boxer, che sono predisposte allo sviluppo di ARE).

4.1.2 ANAMNESI

La raccolta dell'anamnesi sia recente che remota è un passaggio essenziale per ricevere informazioni non ottenibili con la visita clinica. Per questo motivo, è fondamentale che i proprietari dei soggetti donatori siano persone affidabili e attendibili (Bottero et al., 2017).

L'elemento più importante da indagare durante l'anamnesi è la presenza di malattia o segni clinici gastro-enterici passati: vanno quindi tenuti in considerazione tutti gli episodi di diarrea, nausea, vomito, disoressia, dimagrimento, costipazione, colica addominale. Alcuni autori (Chaitman et al., 2020; Gerbec, 2016) restringono la selezione solo ad animali che non abbiano mai avuto disturbi gastro-intestinali nel corso della loro vita, mentre altri accettano donatori che non ne abbiano avuti negli ultimi 6 mesi (Bottero et al., 2017; Pereira et al., 2018). Bottero (2017) ammette anche cani che abbiano avuto segni clinici gastro-enterici al massimo 5 volte all'anno, prima degli ultimi 6 mesi.

Non è semplice fare il confronto fra i risultati di questi studi per valutare quale sia la scelta migliore, in quanto essi differiscono sotto molteplici aspetti (ad esempio, la numerosità di soggetti trattati, le patologie scelte come target del trattamento e la metodologia di esecuzione del trapianto). L'opzione più sicura, sebbene possa portare maggiori difficoltà nella ricerca di un donatore, sembra essere quella di selezionare solo soggetti che non siano mai stati affetti da patologie gastro-enteriche di qualsiasi natura; questa scelta è anche supportata dalle indicazioni presenti nella revisione della letteratura operata da Chaitman e Gaschen (2020).

Oltre alle patologie gastro-enteriche, è bene considerare come fattori di esclusione anche patologie croniche di natura metabolica, endocrina, allergica, autoimmune e oncologica (Bottero et al., 2017; Gerbec, 2016), dal momento che non è ancora stato completamente chiarito quante e quali siano tutte le condizioni patologiche che possano condizionare anche lo stato del microbiota intestinale.

Come abbiamo già visto, esistono anche farmaci che possono provocare disbiosi intestinale, in particolar modo gli antibiotici; quindi andrebbero esclusi dalla selezione animali che abbiano ricevuto una terapia antibiotica negli ultimi 3 mesi (Bottero et al., 2017) o 6 mesi (Pereira et al., 2018). Alcuni autori non ammettono addirittura alcuna terapia antibiotica durante l'intera vita dell'animale (Chaitman et al., 2020; Gerbec, 2016). Bottero (2017), oltre ai cani che abbiano assunto antibiotici, esclude anche quelli che abbiano effettuato un qualsiasi trattamento medico o integrativo negli ultimi 3 mesi; il ragionamento dietro questa scelta può essere duplice: per avere una maggior sicurezza che il soggetto in questione sia in salute e perché non si conosce esattamente l'effetto della maggior parte dei farmaci sul microbiota intestinale.

Per limitare il più possibile la trasmissione di patogeni o parassiti, è bene che il donatore sia regolarmente vaccinato per le malattie infettive rilevanti, secondo le linee guida internazionali WSAVA per la vaccinazione del cane (Day et al., 2016), e sottoposto ad un trattamento ad ampio spettro per parassiti intestinali (Pereira et al., 2018).

Diverse pubblicazioni tengono conto anche della dieta dei soggetti donatori, in quanto questa può influenzare notevolmente la composizione microbica intestinale. Sembra essere generalmente accettato qualsiasi tipo di dieta commerciale (Bottero et al., 2017; Gerbec, 2016; Pereira et al., 2018; Sugita et al., 2019).

Chaitman e colleghi (2020) utilizzano un donatore che, durante il periodo dello studio, viene alimentato mediante vari tipi di diete ipoallergeniche; da una parte, il motivo probabile è quello di

limitare la possibilità di sviluppo di reazioni avverse al cibo (RAC) durante il periodo terapeutico, evento che potrebbe portare a dover interrompere l'iter, ma dall'altra, dei cambi di dieta potrebbero alterare l'equilibrio del microbiota intestinale. Probabilmente è più saggia la decisione di Bottero (2017) di accettare solamente cani che siano stati alimentati con la stessa dieta (meglio se analoga a quella del ricevente) da almeno 3 mesi, indipendentemente dal tipo di questa.

Bottero (2017) considera anche inadatte le diete crude: la carne cruda contaminata può infatti aumentare il rischio di trasmissione di patogeni (Joffe e Schlesinger, 2002; Strohmeyer et al., 2006) ed è stata anche evidenziata un'alterazione di microbiota e metaboloma fecale in cani alimentati con dieta BARF (Schmidt et al., 2018).

Non sono mai stati utilizzati soggetti donatori imparentati con i riceventi, tranne nell'unico caso in cui i gruppi in studio erano delle cucciolate e le donatrici erano le rispettive madri (Burton et al., 2016).

Bottero (2017), invece, vieta l'utilizzo di cani che abbiano legami di parentela con i riceventi, probabilmente per evitare che possano esserci dei fattori comuni ad influenzare l'equilibrio della flora intestinale.

Nello studio di Bottero (2017), inoltre, viene data importanza anche alla regione geografica di provenienza del donatore: l'ideale sarebbe che fosse la medesima del ricevente, ma non è una discriminante per la selezione. Un motivo probabile può essere quello di una maggior praticità per il proprietario nel portare l'animale e/o le sue feci alla struttura veterinaria.

Infine, Gerbec (2016) ha incluso nei criteri di scelta anche il fatto che il donatore sia nato mediante parto naturale e successivamente allattato dalla madre; questi eventi infatti influiscono sullo sviluppo del microbiota intestinale neonatale. Nello studio in questione, la terapia con FMT ha avuto esito positivo con miglioramento delle condizioni di salute generale e gastro-enterica solo su 2 dei 3 cani arruolati come riceventi, ma la scarsa numerosità dei soggetti trattati limita molto le conclusioni che si possono trarre a riguardo.

4.1.3 VALUTAZIONE CLINICA

Ultima parte, ma non meno importante, è quella di valutazione clinica dell'animale da parte del medico veterinario. Il cane dev'essere necessariamente valutato come "sano" per poter fungere da donatore.

La prima cosa da fare è un esame fisico, prestando particolare attenzione alla valutazione del *Body*

Condition Score (BCS) dell'animale: cani troppo grassi o troppo magri vanno esclusi dalla selezione (Bottero et al., 2017; Chaitman et al., 2020). L'eccessiva magrezza può, infatti, essere un indicatore di stati patologici, mentre soggetti obesi potrebbero, in base agli studi sull'uomo e sui roditori da laboratorio (vedi paragrafi 1.7.1 e 1.7.4), presentare un microbiota alterato e trasmetterlo al ricevente.

Bottero (2017) suddivide anche i donatori e i riceventi in categorie di peso, per poter associare cani appartenenti alla stessa categoria; l'autore specifica che la scelta è stata eseguita solamente per limitare le possibili variabili all'interno dello studio, dal momento che non sussistono ancora evidenze di una maggior efficacia del FMT tra cani di peso simile rispetto a cani di peso diverso.

I successivi esami clinici sono stati scelti dagli autori in base a valutazioni personali sul livello di approfondimento diagnostico da voler raggiungere. Uno degli esami laboratoristici più utilizzati nella valutazione dello stato generale dell'animale è l'esame emato-biochimico, consigliato infatti da quasi tutti gli autori. Altri esami utili per rilevare stati patologici generali sono l'elettroforesi delle proteine e l'esame delle urine (Bottero et al., 2017).

Qualora si voglia svolgere un'indagine comprendente anche la diagnostica per immagini, si può ricorrere ad esame radiografico ed ecografia addominale (Niina et al., 2019; Sugita et al., 2019).

Per escludere anomalie funzionali intestinali, pancreatite o EPI, è necessario eseguire test laboratoristici più specifici: cobalamina, folati, lipasi pancreatica specifica e TLI (Bottero et al., 2017).

Infine, devono essere accuratamente analizzate le feci dell'animale sotto vari aspetti. La prima cosa che si può valutare è la consistenza delle feci (con eventuale assegnazione di un punteggio in base al *fecal scoring system* utilizzato), che dev'essere normale (Bottero et al., 2017; Chaitman et al., 2020).

C'è consenso generale sull'importanza di un esame delle feci per la ricerca di uova o larve di parassiti intestinali ed ovviamente questo dovrà risultare negativo; alcuni specificano di utilizzare feci di 3 giorni consecutivi (Bottero et al., 2017) e di ottenere la negatività meno di 15 giorni (Bottero et al., 2017) o 10 giorni (Gerbec, 2016) prima del trapianto oppure 3 giorni prima di raccogliere le feci utilizzate per il trapianto (Burton et al., 2016). Per quanto riguarda *Giardia* spp., è bene escludere una possibile infezione mediante test ELISA su feci (Bottero et al., 2017; Gerbec, 2016). Nel caso in cui si desideri avere maggior sicurezza nell'evitare una possibile trasmissione parassitaria, è possibile prescrivere un trattamento antelmintico nel periodo antecedente il FMT; nello specifico, Bottero (2017) richiede un trattamento antiparassitario effettuato con fenbendazolo a 50 mg/kg SID

per 5 giorni almeno 1 volta negli ultimi 3 mesi.

L'unico studio in cui è stata accettato un animale positivo a parassiti intestinali è quello condotto da Burton e colleghi (2016), in cui una cagna con infezione da coccidi è stata utilizzata per il FMT alla sua cucciolata; il motivo di questa scelta risiede nel fatto che precedentemente gli autori non avevano riscontrato correlazione tra infezione da coccidi e diarrea nei cuccioli della ricerca in questione. Questa scelta non ha dimostrato interferenza con gli esiti dello studio.

Sempre sulle feci, è possibile rilevare anche la presenza dei più comuni batteri enteropatogeni: quasi tutti gli autori inseriscono nell'iter clinico un esame colturale o mediante PCR sulle feci, sottolineando quanto questo passaggio sia essenziale nella selezione dei donatori. Tra i microrganismi ricercati ci sono *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* e *Yersinia enterocolitica*. Bottero (2017) richiede la negatività verso enteropatogeni entro 1 mese antecedente il trapianto, mentre Gerbec (2016) preferisce che sia 10 giorni prima il FMT. I risultati di entrambi gli studi non hanno permesso di stabilire quale sia l'intervallo di tempo migliore entro cui svolgere le analisi, ma gli esiti positivi ottenuti da Bottero (2017) suggeriscono che sia accettabile eseguirle fino ad 1 mese precedentemente al FMT.

Rimanendo nell'ambito delle malattie infettive, Pereira e colleghi (2018) richiedono anche una PCR su sangue negativa nei confronti di parvovirus, cimurro ed *Ehrlichia canis*. Il motivo di questa scelta probabilmente sta nel fatto che i soggetti riceventi sono cuccioli di età da 2 a 12 mesi, che quindi non hanno ancora terminato il primo ciclo di copertura vaccinale nella maggior parte dei casi; è quindi molto importante evitare una possibile trasmissione di questi agenti eziologici. Inoltre, questi cuccioli sono tutti già affetti da parvovirosi, quindi è necessario impedire di poter aumentare la carica virale mediante il trapianto con feci infette.

In caso vi sia la possibilità di farlo, sarebbe molto utile calcolare l'indice di disbiosi sulle feci, in modo da poter assicurare una buona qualità del microbiota fecale del donatore (cioè con DI minore di 0) (Dwyer et al., 2019).

4.1.4 BANCA DELLE FECI

In medicina veterinaria, così come in medicina umana, esistono delle strutture denominate “banche delle feci”, in cui viene congelato e conservato il materiale fecale derivante da cani e gatti donatori; questo poi può essere spedito per essere utilizzato da medici veterinari per eseguire il FMT presso la propria struttura.

Una di queste si trova ad Oakland, in California ([Fecal Microbiota Transplant Capsules aka "Poo Pills" | AnimalBiome®](#), ultimo accesso in data 13/01/2021).

I criteri per la selezione dei donatori sono molto simili a quelli pubblicati in letteratura dai vari autori sopra citati.

Per quanto riguarda la specie canina, “il materiale fecale donato, deriva da cani che non abbiano attuali o precedenti problemi di salute, non abbiano ricevuto trattamenti antibiotici nei 6 mesi precedenti, abbiano microbiomi con elevati livelli di diversità e ricchezza in termini di specie, un buon peso corporeo, un buon temperamento e una buona consistenza fecale.

Tutto il materiale derivante dai cani donatori viene regolarmente controllato per:

- (i) uova e parassiti intestinali usando la tecnica di flottazione fecale
- (ii) presenza di ancilostomi, cestodi e trichuridi mediante tecnica ELISA
- (iii) gene per la tossina CPnetEF di *Cl. perfringens*, gene per l'enterotossina di *Cl. perfringens*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Cimurro, Coronavirus enterico canino, Canine Parvovirus 2, Circovirus K9, tossina A di *Cl. difficile*, tossina B di *Cl. difficile*, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.*, *Salmonella spp.*”.

In Italia si può segnalare la recente costituzione di EuBiome ([EuBiome - Trapianto fecale di microbiota in cani e gatti](#), ultimo accesso in data 13/01/2021), un'azienda con sede a Padova che si occupa di selezionare donatori canini volontari, preparare il materiale per la somministrazione sotto forma di capsule e fornirlo ai medici veterinari. Per quest'azienda non vengono specificati nel dettaglio i criteri di scelta dei soggetti donatori, ma soltanto il metodo attraverso cui avviene la selezione: compilazione di un questionario online da parte del proprietario, visita clinica dell'animale ed analisi su sangue, feci ed urina.

4.2 CARATTERISTICHE DEL RICEVENTE CANINO

La selezione dei soggetti riceventi è un altro passaggio importante prima di eseguire il trapianto di microbiota fecale, per poter escludere altri possibili approcci terapeutici e per evitare la scelta di animali che beneficerebbero solo in parte o non beneficerebbero affatto della terapia.

4.2.1 SEGNALAMENTO

Nel caso della selezione del ricevente, in letteratura non viene assegnata grande importanza agli elementi del segnalamento (età, sesso, status riproduttivo, razza) come criteri di inclusione o esclusione.

L'unico a porre dei paletti è Bottero (2017), che dichiara di ammettere solamente cani di almeno 2 anni d'età, nonostante poi accetti anche un Cocker di 1,5 anni. La motivazione di questa scelta non è molto chiara: forse per consentire di provare tutte le altre opzioni terapeutiche per un certo tempo e di raggiungere una diagnosi ad esclusione prima di ricorrere al trapianto di microbiota fecale. Una possibile discriminante per quanto riguarda l'età potrebbe essere quella di scegliere cani riceventi che abbiano già completato lo svezzamento e in cui, quindi, sia già avvenuto lo sviluppo della composizione microbica intestinale verso la forma adulta. Questa affermazione è motivata dal fatto che l'unico studio in cui sia stata eseguito il FMT in animali pre-svezzamento (Burton et al., 2016), non ha dato risultati soddisfacenti: la consistenza fecale post-svezzamento non è risultata statisticamente migliore di quella del gruppo di controllo.

Anche Pereira e colleghi (2018) hanno utilizzato come riceventi animali di età inferiore ad 1 anno, però i più giovani partivano da 2 mesi d'età, quindi idealmente avrebbero già dovuto aver terminato lo svezzamento. In questo studio, infatti, il gruppo di animali con sindrome da diarrea acuta emorragica (AHDS) da parvovirus che ha ricevuto il trapianto fecale, ha dimostrato una riduzione del periodo di ospedalizzazione rispetto al gruppo trattato esclusivamente con il protocollo terapeutico standard.

L'età avanzata (indicativamente ≥ 10 anni, ma dipende anche dall'età media della razza) non sembra aver influito sull'efficacia della terapia nelle varie pubblicazioni, sebbene non siano mai stati utilizzati cani di età superiore ai 13 anni. L'unico caso di palese fallimento del FMT in soggetto di età avanzata (12 anni) si è verificato nello studio di Gerbec (2016): a 2 mesi dal trapianto, la consistenza fecale era rimasta pressoché invariata e il DI, sebbene leggermente diminuito, era ancora nell'intervallo di incertezza (intorno a 2). In quest'ultimo studio era stata eseguita una sola

donazione per via endoscopica; per una completa valutazione dell'efficacia del FMT sul soggetto in questione, sarebbe stato utile provare vie di somministrazione diverse (ad esempio, mediante capsule orali), somministrazioni aggiuntive oppure l'utilizzo di un donatore diverso.

Nei vari studi sono stati utilizzati soggetti di razza, genere e status riproduttivo diverso tra loro, quindi non è possibile trarre delle conclusioni su quanto questi aspetti possano influire sull'efficacia del trattamento.

4.2.2 ANAMNESI CLINICA

Diversi autori (Bottero et al., 2017; Gerbec, 2016; Niina et al., 2019; Sugita et al., 2019) hanno eseguito il trapianto di microbiota fecale su cani che, in anamnesi, avevano segni gastro-enterici cronici: diarrea (anche con presenza di muco e sangue), vomito, dimagrimento, disoressia, rumori gastro-intestinali anomali, nausea.

Il periodo intercorso tra la comparsa del problema e l'esecuzione del FMT varia molto tra le pubblicazioni; in alcuni casi si parla di mesi (Niina et al., 2019; Sugita et al., 2019), Bottero (2017) ha scelto cani malati da almeno 1 anno, mentre Gerbec (2016) ha utilizzato animali che presentavano il problema già da alcuni anni. Questo fattore non sembra influenzare l'efficacia del trattamento, in quanto si sono avuti esiti positivi su quasi tutti gli animali in studio; un caso emblematico di insuccesso terapeutico è quello riportato nello studio di Gerbec (2016), già citato anche nel paragrafo precedente: uno dei 3 cani riceventi non ha giovato di alcun miglioramento clinico, ma le motivazioni di ciò andrebbero indagate più a fondo per poter trarre delle conclusioni.

Altre situazioni patologiche scelte come target del trattamento sono state: diarrea acuta (comparsa da meno di 14 giorni), associata o meno a vomito (Chaitman et al., 2020), e AHDS (Pereira et al., 2018).

Durante la raccolta dell'anamnesi, è bene chiedere informazioni anche riguardo lo stato vaccinale dell'animale ed i trattamenti antiparassitari eseguiti sul soggetto (Pereira et al., 2018), per poter eventualmente indagare cause infettive o parassitarie dei sintomi gastro-enterici.

4.2.3 ANAMNESI DIETETICA

Rimanendo nell'ambito dell'anamnesi, si rivela importante anche chiedere informazioni al proprietario a proposito della dieta del cane ricevente (Pereira et al., 2018).

Questo serve principalmente per escludere che i problemi gastro-enterici possano essere di origine

alimentare e che, quindi, non ci sia necessità di eseguire un FMT. La maggior parte dei cani con enteropatia cronica, infatti, risponde positivamente ed in maniera rapida (da alcuni giorni ad un paio di settimane) ad un trial con dieta idrolizzata o contenente antigeni (proteine e carboidrati) mai assunti in precedenza (Allenspach et al., 2016); questo permette di includere la patologia all'interno del gruppo delle enteropatie dieto-responsive (FRE)

Tra gli autori degli studi oggetto della tesi, Gerbec (2016) utilizza 2 cani nutriti mediante dieta ad eliminazione, mentre Bottero (2017) richiede che i riceventi abbiano effettuato un trial alimentare con dieta casalinga, commerciale monoproteica o commerciale idrolizzata di almeno 3 settimane per escludere dalla selezione cani con FRE, cioè con miglioramento dei sintomi gastro-enterici dopo il cambio di dieta.

4.2.4 ANAMNESI FARMACOLOGICA

Un aspetto molto importante da indagare durante l'anamnesi è la storia dei trattamenti farmacologici subiti dall'animale in passato. In particolare, è necessario sapere se siano state effettuate terapie antibiotiche o immunosoppressive, con quali principi attivi e la risposta clinica del paziente.

Conoscere i trattamenti antibiotici subiti dall'animale in passato ed il loro esito è un aiuto nel capire se un caso di CE possa essere classificato come ARE oppure no. A questo proposito, Bottero (2017) richiede che sia stato effettuato un trial antibiotico con metronidazolo e/o tilosina di almeno 3 settimane e con esito negativo prima di ammettere il paziente al suo studio; questa scelta deriva dal fatto che il target dello studio erano i casi di IBD idiopatica.

Anche in altre pubblicazioni, molti dei pazienti hanno subito almeno 1 trattamento antibiotico inefficace nel periodo antecedente il trapianto fecale (Murphy et al., 2014; Niina et al., 2019; Sugita et al., 2019). L'unica eccezione è lo studio di Gerbec (2016), in cui la popolazione target era proprio quella di cani con ARE: tutti e 3 i soggetti arruolati avevano ottenuto una riduzione dei sintomi clinici gastro-enterici in seguito a somministrazione di tilosina; un cane addirittura non ha presentato recidiva in seguito ad interruzione della terapia antibiotica 1 settimana prima del trapianto.

I principi attivi maggiormente utilizzati sono stati metronidazolo e tilosina, a volte anche in combinazione tra loro (Bottero et al., 2017), mentre altri antibiotici riportati sono eritromicina (Sugita et al., 2019) ed orbifloxacina (Niina et al., 2019).

Bisogna anche essere a conoscenza di un'eventuale terapia antibiotica ancora in corso al momento della visita, per poter decidere se sospenderla o meno prima di effettuare il trapianto di microbiota fecale. Secondo quanto osservato nell'uomo in caso di rCDI, è probabile che gli antibiotici possano impattare negativamente sul microbiota intestinale e limitare così gli effetti benefici del trapianto (Tariq et al., 2020).

Alcuni autori scelgono di sospendere il trattamento antibiotico 1 settimana prima del FMT (Gerbec, 2016; Niina et al., 2019) o selezionano solamente cani che non abbiano assunto antibiotici nelle ultime 2 settimane (Chaitman et al., 2020). Al contrario, Bottero (2017) non sospende alcuna terapia in corso al momento del trapianto; il suo studio ha evidenziato miglioramenti clinici su quasi tutti i pazienti, nonostante tutti i cani abbiano continuato ad assumere metronidazolo e/o tilosina.

Nello studio di Dwyer e colleghi (2019), invece, i soggetti in esame hanno subito un trattamento con tilosina proprio nei 7 giorni precedenti il trapianto fecale perché lo scopo era di verificare l'efficacia di quest'ultimo nei confronti di una disbiosi intestinale acuta. Sia il gruppo trattato con FMT che il gruppo di controllo hanno presentato un DI normalizzato entro 15 giorni dal trapianto; l'unica differenza riscontrata è stata un ritardo nella normalizzazione alla qPCR per *Clostridium hiranonis* e *Faecalibacterium* spp. nel gruppo di controllo. Non sono riportate le condizioni cliniche dei soggetti durante il periodo di studio, quindi non è possibile trarre delle conclusioni sul significato clinico di questa differenza.

Un caso particolare è quello dello studio di Pereira e colleghi (2018), in cui il trapianto di microbiota fecale viene inserito all'interno di un protocollo terapeutico standard utilizzato per i cani con AHDS dovuta a parvovirosi: fluidoterapia IV, antiemetico (ondansetron o maropitant), gastroprotettore (ranitidina) e antibiotici IV (metronidazolo associato a cefalotina o trimetoprim-sulfamidico). Tutte queste terapie sono state iniziate 6-12 ore prima del trapianto e continuate durante il periodo di studio.

Il probabile motivo della scelta sta nel fatto che non sussistono ancora sufficienti evidenze scientifiche per l'utilizzo del FMT come unica terapia in cani affetti da parvovirosi. Non è chiaro quanto questo protocollo possa aver influito sull'efficacia del trapianto fecale, però è comunque risultata una riduzione dei tempi di ospedalizzazione nel gruppo trattato rispetto a quelli del gruppo di controllo.

Un'altra tipologia di farmaci molto spesso utilizzata in corso di malattia gastro-intestinale cronica è quella degli immunosoppressori, per contrastare la condizione infiammatoria enterica qualora gli

altri approcci terapeutici non abbiano funzionato. I casi di enteropatia cronica in cui via sia un miglioramento clinico solo in seguito alla somministrazione di immunosoppressori vengono classificati all'interno delle enteropatie immunosoppressore-responsive (IRE).

I farmaci maggiormente utilizzati a questo scopo, nel cane, sono: prednisolone, ciclosporina, azatioprina e budesonide (Dandrieux, 2016). Infatti, tutti i cani trattati con immunosoppressori nelle pubblicazioni oggetto della tesi hanno ricevuto prednisolone (Bottero et al., 2017; Gerbec, 2016; Niina et al., 2019), associato o meno a ciclosporina, azatioprina o budesonide (Bottero et al., 2017; Niina et al., 2019).

Dal momento che un trattamento immunosoppressore spesso non si dimostra efficace nel portare a risoluzione permanente della malattia dopo sospensione della terapia in cani affetti da IRE (Allenspach et al., 2007, 2016), questi casi sono anche quelli in cui spesso viene preso in considerazione il trapianto di microbiota fecale (Bottero et al., 2017; Niina et al., 2019; Weese et al., 2013).

In una recente revisione della letteratura (Chaitman e Gaschen, 2020), si afferma che l'utilizzo di steroidi a dosaggio immunosoppressore, clorambucile e/o ciclosporina non dovrebbe inficiare sulla sicurezza del FMT; a sostegno di ciò, Bottero (2017) non sospende alcun trattamento prima di eseguire il trapianto, senza evidenziare particolari conseguenze negative di questa scelta. Altri autori, invece, decidono di sospendere anche le terapie immunosoppressive 1 settimana prima del FMT (Gerbec, 2016; Niina et al., 2019).

4.2.5 CRITERI DIAGNOSTICI

L'obiettivo delle indagini diagnostiche, oltre a scoprire la natura del problema, è quello di escludere la presenza di cause trattabili mediante approcci diversi dal trapianto di microbiota fecale. Disturbi gastro-enterici cronici, oltre che da un'enteropatia, possono essere infatti provocati anche da una reazione avversa al cibo, parassiti intestinali, un'infezione virale, un'endocrinopatia (ad esempio l'ipoadrenocorticismo), una neoplasia o altre cause meno comuni.

All'interno delle enteropatie croniche bisogna poi distinguere FRE, ARE, IRE e NRE. Grazie all'anamnesi è possibile ottenere informazioni sulla dieta e sulle terapie precedenti dell'animale, in modo da orientarsi già verso una probabile forma di CE ed organizzare l'iter diagnostico di conseguenza.

Per escludere la presenza di patologie sistemiche, è importante una valutazione dell'animale attraverso l'esame fisico, gli esami di laboratorio di base ed eventualmente la diagnostica per

immagini. Chaitman e Ziese (2020) non ammettono la partecipazione allo studio da parte di cani con disidratazione grave (> 7%), con segni di infiammazione sistemica (temperatura corporea > 39,5°C, tachicardia, tachipnea, cattive condizioni generali) o che richiedano l'ospedalizzazione.

Tra gli esami laboratoristici, i più utilizzati sono l'emocromocitometrico (Bottero et al., 2017; Pereira et al., 2018; Sugita et al., 2019) e l'analisi biochimica su siero (Bottero et al., 2017; Sugita et al., 2019). Bottero (2017) sceglie di avvalersi anche dell'esame delle urine sui suoi pazienti, che potrebbe eventualmente evidenziare la presenza di patologie non gastro-enteriche.

L'unico autore che utilizza la diagnostica per immagini nella valutazione generale dell'animale è Sugita (2019); in questo *case report*, il paziente è sottoposto ad esami radiografici ed ultrasonografici dell'addome.

Dal momento che la diagnostica per immagini è utilizzata da un singolo autore, è difficile arrivare ad affermazioni conclusive sulla sua utilità all'interno della fase di screening dei riceventi.

È possibile anche effettuare analisi specifiche per la funzionalità gastro-enterica: TLI, folati e cobalamina (Bottero et al., 2017). Lo stesso autore richiede anche che gli esami laboratoristici più recenti risalgano a non più di 1 mese prima dell'esecuzione del FMT, affinché si possano considerare rappresentativi del momento in cui viene effettuata la procedura.

Per indagare la presenza di parassiti intestinali, dopo aver ottenuto dal proprietario le informazioni riguardanti la profilassi antiparassitaria dell'animale, è bene effettuare un esame copromicroscopico qualitativo. Bottero (2017) specifica che devono essere utilizzati 3 campioni fecali raccolti rispettivamente in 3 giorni consecutivi, mentre Pereira e colleghi (2018) danno maggiori informazioni riguardo alla metodica di conservazione del materiale fecale utilizzata: refrigerazione a 6°C per un massimo di 48 ore prima di eseguire l'esame.

Tra le metodiche utilizzate ci sono la flottazione fecale (Chaitman et al., 2020; Gerbec, 2016) ed i metodi Willis, Hoffman Pons and Janer, Faust modificato e Ziehl-Nielsen modificato (Pereira et al., 2018). Negli studi in cui non è specificato il metodo di esecuzione dell'esame delle feci, è probabile che venga utilizzata la flottazione fecale.

Gerbec (2016) sceglie di indagare anche la presenza di *Giardia duodenalis* nelle feci mediante il test FASTest GIARDIA®.

Tutti gli animali sottoposti a trapianto di microbiota fecale in queste pubblicazioni e sui quali sia stata effettuata la ricerca di parassiti intestinali sono risultati negativi, con l'unica eccezione di un cucciolo nello studio di Pereira e colleghi (2018), risultato positivo a *Toxocara* spp.; non è descritto

se questo evento abbia influenzato o meno l'esito della terapia.

Nello studio di Burton (2016), una madre donatrice era positiva ai coccidi; sui cuccioli riceventi non sono stati eseguiti test per la ricerca dei parassiti, ma è altamente probabile che questi fossero presenti. Nonostante questo, i soggetti trattati non hanno sviluppato diarrea; tale osservazione è in linea con dati precedenti registrati dagli autori sulla stessa colonia di animali, in cui non si dimostrava una correlazione tra positività ai coccidi e sviluppo di diarrea.

In alternativa o in aggiunta all'esame delle feci, è possibile eseguire un trattamento antiparassitario con fenbendazolo a 50 mg/kg SID (*semel in die*) per 5 giorni nei 15 giorni antecedenti il trapianto (Bottero et al., 2017) oppure per 3 giorni durante la settimana antecedente il trapianto (Gerbec, 2016). Questo consente una maggior sicurezza nell'escludere la presenza di infestazioni parassitarie intestinali.

Un altro tipo di esame che si consiglia di effettuare sulle feci è quello per la ricerca di enteropatogeni che potrebbero essere la causa della malattia. Diversi autori si avvalgono di laboratori specializzati, che offrono un panel specifico per la ricerca mediante *real-time* PCR dei più comuni agenti enteropatogeni nel cane (Chaitman et al., 2020; Murphy et al., 2014; Niina et al., 2019; Sugita et al., 2019). Tra gli obiettivi di ricerca rientrano: *Cryptosporidium* spp, *Giardia* spp, *Clostridium perfringens* α toxin, *Clostridioides difficile* toxin A&B, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp., *canine parvovirus type 2*, *canine distemper virus* e *canine enteric coronavirus genes* (Niina et al., 2019; Sugita et al., 2019).

Sugita (2019) utilizza anche un test immunocromatografico (Techlab C. Diff Quick Check Complete) per confermare la presenza delle tossine A&B di *Cl. difficile* evidenziate tramite *real-time* PCR e ripete entrambi gli esami dopo 24 giorni per avere un'ulteriore conferma.

Gerbec (2016) preferisce eseguire esami colturali sulle feci dei cani riceventi per la ricerca di *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp, *Clostridium perfringens* e *Clostridioides difficile*.

Nello studio di Pereira e colleghi (2018), è stato effettuato anche un tampone rettale per la ricerca di canine parvovirus (CPV) e la caratterizzazione molecolare per definirne la variante; il motivo di questo ulteriore esame risiede nel fatto che la popolazione target dello studio erano cani di età inferiore all'anno e con AHDS, quadro molto suggestivo di parvovirosi.

Una volta escluse tutte le altre possibili cause dei disturbi gastro-enterici, è possibile eseguire un'endoscopia con prelievo bioptico di mucosa intestinale per verificare che ci sia effettivamente

una CE e valutarne la tipologia in base all'esame istologico (Bottero et al., 2017; Niina et al., 2019). Bottero (2017) accetta soltanto cani in cui gli esami endoscopico ed istologico siano stati effettuati almeno 1 anno prima; tale decisione è servita a selezionare solamente pazienti che abbiano seguito un adeguato iter terapeutico prima di sottoporsi a trapianto fecale. Questo però potrebbe anche rappresentare un limite, in quanto il problema di partenza dei soggetti riceventi selezionati potrebbe essersi modificato nel corso di così tanto tempo dalla diagnosi.

Il trapianto di microbiota fecale può essere utile in qualsiasi paziente con diarrea, ma la causa primaria del problema va sempre ricercata e trattata, per evitare una recidiva (Chaitman e Gaschen, 2020). Questo fa capire quanto sia importante eseguire un iter diagnostico il più completo possibile.

4.2.6 DIAGNOSI

Tra le patologie target degli studi considerati in questo lavoro di tesi, compaiono solo disordini di natura gastro-enterica.

In ordine decrescente di numerosità di animali trattati, le patologie prese in considerazione sono state:

- sindrome da diarrea acuta emorragica da CPV-2b (33 cani) (Pereira et al., 2018);
- IBD idiopatica (18 cani, di cui 12 con infiltrato linfoplasmocitario, 4 con infiltrato eosinofilo, 1 con infiltrato linfoplasmocitario e neutrofilico), che rientra nel gruppo delle IRE (Bottero et al., 2017; Niina et al., 2019; Weese et al., 2013);
- diarrea acuta (18 cani) (Chaitman et al., 2020);
- disbiosi intestinale associata a somministrazione di tilosina (12 cani) (Dwyer et al., 2019);
- diarrea associata ad enteropatogeni (9 cani, di cui 8 con *Cl. perfringens* e 1 con *Cl. difficile*) e non rispondente alle terapie antibiotiche effettuate (Murphy et al., 2014; Sugita et al., 2019);
- diarrea cronica di origine non specificata (7 cani) (Chaitman et al., 2017);
- sindrome da diarrea emorragica di origine non specificata (4 cani) (Burchell et al., 2018);
- ARE (3 cani) (Gerbec, 2016).

L'efficacia del FMT nei confronti di queste patologie verrà discussa in maniera approfondita nel paragrafo 4.6.

È stato inoltre effettuato anche uno studio su cuccioli sani, di cui 11 hanno ricevuto FMT per osservare se questo potesse ridurre l'incidenza di diarrea post-svezzamento; tuttavia non si sono

evidenziate differenze statisticamente significative tra il gruppo trattato e il gruppo di controllo (Burton et al., 2016). In questo caso, quindi, il trapianto fecale non sembra avere una grande utilità; ma sono richiesti maggiori studi a riguardo per poterlo affermare con certezza.

4.3 TECNICA DI TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE NEL CANE

Ad oggi non sono ancora state pubblicate delle linee guida ufficiali per il trapianto di microbiota fecale, quindi la metodica di esecuzione può variare da caso a caso. Solitamente si fa riferimento alle informazioni derivanti dagli studi in medicina umana, cercando di adattare alla specie canina. Indipendentemente dalle scelte operative, è importante che ogni fase venga eseguita in maniera precisa ed accurata per evitare che possa inficiare sul buon esito della terapia.

4.3.1 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL MATERIALE FECALE DEL DONATORE

CANINO

In letteratura non vengono fornite particolari istruzioni riguardo le tempistiche di raccolta delle feci del donatore. L'unico autore a specificare la cosa è Bottero (2017), che indica di effettuare la raccolta entro 30 minuti dalla defecazione. Il motivo più probabile della mancanza di quest'informazione nelle altre pubblicazioni è il fatto che, per qualsiasi motivazione medica, solitamente le feci andrebbero raccolte immediatamente dopo la defecazione, in modo da limitare la contaminazione da parte di microrganismi ambientali.

Una volta raccolte, sarebbe bene che le feci fossero conservate in un contenitore ermetico (Bottero et al., 2017) o, in alternativa, in un sacchetto di plastica (Chaitman et al., 2020).

Se il materiale fecale deve essere utilizzato entro breve tempo, esso può essere conservato refrigerato ad una temperatura tra i 3°C e i 5°C (Bottero et al., 2017; Burton et al., 2016); se la temperatura esterna non supera i 25°C, Bottero (2017) consente anche una conservazione a temperatura ambiente fino al momento della preparazione.

Diversi autori rispettano le indicazioni derivanti dalla medicina umana di utilizzare feci fresche entro 6 ore dalla raccolta (Cammarota et al., 2017), quindi le tempistiche di conservazione delle feci sono ridotte al minimo indispensabile (Bottero et al., 2017; Gerbec, 2016; Niina et al., 2019; Sugita et al., 2019). A differenza degli altri, Burton (2016) decide di preparare la miscela fecale anche alcuni giorni prima del trapianto e di conservarla in frigorifero a temperature comprese tra 3° e 5°C fino al momento della somministrazione; nonostante questo, la composizione batterica fecale è rimasta

stabile (controllo mediante sequenziamento del microbiota delle aliquote di materiale) per tutto il periodo di trattamento, quindi tutti i riceventi hanno ricevuto un trapianto con materiale dalle stesse caratteristiche.

Quando invece il campione di feci deve essere conservato per più tempo, è possibile congelarlo ad una temperatura di -20°C (Chaitman et al., 2020; Pereira et al., 2018). In queste pubblicazioni non appaiono alterazioni nell'efficacia del trattamento imputabili alla metodica di conservazione del materiale fecale.

Nello studio di Pereira e colleghi (2018), i campioni fecali sono stati raccolti tutti dallo stesso donatore giornalmente per 2 settimane e congelati già suddivisi in aliquote da 10 grammi ciascuna (quantitativo successivamente utilizzato per ogni infusione). Questa scelta è motivata dal fatto che lo studio si svolge nell'arco di 13 mesi e gli autori hanno voluto limitare variazioni nella composizione microbica intestinale del cane donatore nel tempo, in modo da somministrare ai pazienti materiale quanto più simile possibile.

4.3.2 PREPARAZIONE DEL MATERIALE PER IL TRAPIANTO

La metodica di preparazione della miscela fecale utilizzata nel FMT per il cane non differisce in maniera significativa da quella utilizzata per l'uomo (descritta al paragrafo 1.6.2).

I passaggi fondamentali sono: diluizione di un certo quantitativo di feci in un volume adeguato di liquido, miscelazione e filtrazione per eliminare il materiale grossolano, importante soprattutto per non ostruire siringhe, sonde, cateteri o canali operativi endoscopici utilizzati.

In medicina umana generalmente si utilizzano circa 50 grammi di feci disciolte in un liquido diluente (solitamente soluzione salina allo 0,9%) in rapporto da 1/3 ad 1/5 grammi per millilitro.

In queste pubblicazioni, invece, i rapporti tra feci e diluente, nonché il tipo di diluente, differiscono in base alla scelta dell'autore. Tali informazioni sono state riassunte nella **Tabella 3**. Data la grande variabilità nei diversi articoli, è impossibile stabilire quali siano le quantità di feci e di liquido diluente da poter utilizzare in maniera più efficace.

Per quel che riguarda il tipo di diluente, nella maggior parte degli studi viene utilizzata la soluzione salina allo 0,9%; questo, unito al fatto che sia indicata anche in medicina umana (per approfondimenti fare riferimento al paragrafo 1.6.2), fa propendere per una sua scelta anche nel FMT nel cane.

Tuttavia, va tenuto in considerazione che anche scelte differenti hanno dimostrato una certa

efficacia, seppur in un numero inferiore di casi. Sugita (2019) ha utilizzato semplice acqua di rubinetto e ciò non ha compromesso gli esiti positivi della terapia, però la pubblicazione è un *case report*, quindi di valore scientifico limitato. L'utilizzo della soluzione di Ringer (Gerbec, 2016; Niina et al., 2019) è stato effettuato complessivamente in 4 cani, di cui 1 (Gerbec, 2016) con risposta negativa alla terapia; in questo caso di insuccesso, i fattori da tenere in considerazione sono sicuramente molteplici ed è poco probabile che il fallimento terapeutico sia dovuto esclusivamente al tipo di diluente.

Ultima tipologia di liquido utilizzato è il latte vaccino scremato al 2% (Burton et al., 2016): in questo caso, i soggetti riceventi erano cuccioli che dovevano ancora completare lo svezzamento, quindi molto probabilmente ancora in grado di digerire il lattosio (Craig, 2019). Questa scelta sarebbe stata più discutibile nel caso di cani adulti, per il rischio di provocare disturbi gastro-enterici dovuti a fenomeni di intolleranza, compromettendo quindi l'esito della terapia.

Al materiale da somministrare per via endoscopica, Bottero (2017) aggiunge anche dello yogurt magro, ma è difficile fare delle valutazioni sulla sua utilità: non si conosce il tipo commerciale di yogurt utilizzato e gli animali non sono stati divisi in modo casuale, quindi il gruppo che ha assunto lo yogurt partiva da una condizione clinica peggiore di quello che non l'ha assunto.

In una revisione della letteratura sul FMT in medicina umana (Gough et al., 2011), viene citato l'utilizzo di latte (16 pazienti) o di yogurt (1 paziente) nella preparazione del materiale somministrato per il trapianto fecale; la percentuale di risoluzione di rCDI è stata rispettivamente del 94% e del 100% senza recidiva. Tuttavia, è da considerare che entrambe queste sostanze contengono un elevato numero di batteri e vanno quindi ad alterare il microbiota fecale del donatore; data la disponibilità di altri tipi di diluente altrettanto (se non maggiormente) efficaci, non sembrano esserci motivazioni logiche per l'utilizzo di latte o yogurt nella preparazione dell'emulsione fecale.

AUTORE	PESO DEGLI ANIMALI	QUANTITÀ DI FECI E VIA DI SOMMINISTRAZIONE	VOLUME DI DILUENTE	TIPO DI DILUENTE
Bottero et al. (2017)	Categoria A: < 10 kg;	Per endoscopia (categorie A e B): 60-80 g	Per endoscopia (categorie A e B): 75-100 ml*	Soluzione salina 0,9%
	Categoria B: 10-20 kg;	Per endoscopia ¹ (categorie C e D): 100-150 g	Per endoscopia (categorie C e D): 150-200 ml*	
	Categoria C: 20-40 kg;	Per capsule orali ² (categorie A e B): 100 g	Per capsule orali (categorie A e B): 200 ml	
	Categoria D: > 40 kg	Per capsule orali (categorie C e D): 100 g	Per capsule orali (categorie C e D): 100 ml	
Burton et al. (2016)		100 g. Sonda oro-gastrica	200 ml	Latte vaccino scremato al 2% di grassi
Chaitman et al. (2020)	Da 2,5 a 30 kg (mediana 12,9 kg)	5 g per kg di peso corporeo del ricevente; per 1 soggetto sono stati utilizzati 2,5 g/Kg di peso. Enema rettale	60 ml per razze di taglia piccola e 120 ml per razze di taglia grande	Soluzione salina 0,9%
Chaitman et al. (2017)		5 g/kg di peso. Enema rettale	60 ml	Soluzione salina 0,9%

AUTORE	PESO DEGLI ANIMALI	QUANTITÀ DI FECI E VIA DI SOMMINISTRAZIONE	VOLUME DI DILUENTE	TIPO DI DILUENTE
Gerbec (2016)	2,7 kg e 43,4 kg (2 cani)	75 g. Endoscopia discendente	Circa 7 ml per grammo di feci	Soluzione di Ringer
	21,9 kg	60 g. Endoscopia discendente	350 ml	
Niina et al. (2019)	4 kg	Circa 12 g. Enema rettale	Circa 36 ml	Soluzione di Ringer
Pereira et al. (2018)	Da 1 a 14,3 kg (mediana 4,5 kg)	10 g. Enema rettale	10 ml	Soluzione salina 0,9%
Sugita et al. (2019)	11 kg	Circa 60 g. Somministrazione orale con siringa	50 ml	Acqua di rubinetto

Tabella 3. Descrizione di quantità di feci e volume di liquido diluente, in rapporto al peso dei cani riceventi ed alla via di somministrazione, e tipo di diluente utilizzato nelle pubblicazioni presenti in letteratura riguardo il trapianto di microbiota fecale nel cane.

1: materiale preparato per l'uso endoscopico

2: materiale preparato per l'uso come capsule orali

*: alla miscela vengono aggiunti anche 50-75 ml di yogurt magro come soluzione di arricchimento

In seguito alla diluizione, è necessario mescolare il materiale: lo si può comodamente fare mediante un comune miscelatore elettrico (Bottero et al., 2017; Chaitman et al., 2020; Gerbec, 2016; Murphy et al., 2014) per qualche minuto e a bassa velocità. L'obiettivo è di ottenere un liquido quanto più omogeneo possibile.

In alternativa o in associazione alla miscelazione automatica, è possibile mescolare il preparato manualmente (Bottero et al., 2017).

Anche in seguito alla miscelazione, rimarranno comunque peli o altro materiale grossolano derivante dalle feci; a questo punto è bene quindi filtrare la miscela attraverso garze mediche (Burton et al., 2016; Niina et al., 2019; Sugita et al., 2019), colino a trama fine (Bottero et al., 2017) o filtro da tè in metallo (Gerbec, 2016).

Niina (2019) afferma di aver filtrato il preparato per 2 volte, ma questo non sembra portare evidenti vantaggi rispetto alle altre pubblicazioni. Il numero di filtrazioni necessarie probabilmente si può facilmente stabilire mediante un controllo visivo del liquido ottenuto, che dev'essere il più possibile privo di materiale solido.

Per l'utilizzo come capsule orali, Bottero e colleghi (2017) raccolgono il liquido post-filtrazione in un contenitore e poi lo trasferiscono mediante una siringa a becco largo in sacchetti per creare cubetti di ghiaccio; questi poi vengono messi a congelare.

Gerbec (2016), invece utilizza il materiale come fresco e lo divide già in siringhe da 50 ml pronte per la somministrazione.

Una revisione della letteratura sul microbiota intestinale del cane (Redfern et al., 2017) tratta parzialmente anche del FMT e consiglia di eseguire la preparazione del materiale sotto cappa, in quanto le feci possono veicolare agenti patogeni classificati come rischio biologico di livello 2; un esempio è *Salmonella* spp. (Ta et al., 2019). Tuttavia, bisogna anche considerare che le feci dei soggetti donatori dovrebbero essere state analizzate accuratamente dal punto di vista microbiologico durante la fase di selezione, quindi questa precauzione potrebbe non essere così necessaria, sebbene non si possa definire completamente inutile.

4.3.3 VIA DI SOMMINISTRAZIONE E TECNICA D'ESECUZIONE

In diverse pubblicazioni, gli autori optano per eseguire il FMT mediante enema rettale (Chaitman et al., 2017; Dwyer et al., 2019; Murphy et al., 2014; Niina et al., 2019; Pereira et al., 2018; Weese et al., 2013).

Altre vie di somministrazione utilizzate nella specie canina sono l'endoscopia discendente (Bottero et al., 2017; Gerbec, 2016), le capsule orali (Bottero et al., 2017; Dwyer et al., 2019), la somministrazione orale mediante siringa (Sugita et al., 2019), la colonscopia (Burchell et al., 2018) e la sonda oro-gastrica (Burton et al., 2016).

In medicina veterinaria non esistono ancora studi significativi che mettano a confronto l'efficacia delle varie vie di somministrazione possibili per il trapianto di microbiota fecale.

Nel cane spesso viene preferito l'enema rettale, in quanto procedura di semplice applicazione e che solitamente non richiede anestesia generale (Chaitman e Gaschen, 2020).

Per effettuare un enema rettale, il materiale generalmente utilizzato dagli autori consiste in una siringa contenente il materiale fecale e un catetere in gomma (catetere uretrale) collegato alla siringa (Chaitman et al., 2017, 2020; Pereira et al., 2018); spesso non è necessaria neppure la sedazione (Chaitman et al., 2017; Murphy et al., 2014; Pereira et al., 2018).

Chaitman e Ziese (2020) descrivono accuratamente la metodica d'esecuzione: prima dell'introduzione, il materiale fecale viene spinto fino alla punta del catetere per evitare l'introduzione di aria nell'intestino; poi sulla superficie esterna del catetere viene applicato del lubrificante non batteriostatico e, infine, il catetere viene introdotto fino al colon per depositare il materiale. Nello studio di Pereira (2018) il catetere viene spinto solo fino alla porzione prossimale del retto.

Come descritto nel paragrafo 1.6.4, l'enema risulta meno efficace della colonscopia in medicina umana per via della sede di deposito del materiale fecale. Quindi è probabile che, nel caso si esegua un enema rettale, questo dia esiti migliori quanto più ci si riesca a spingere prossimalmente con il catetere, in modo da aumentare il tempo in cui il preparato permane all'interno dell'intestino.

Weese (2013), prima della procedura, ha effettuato un lavaggio mediante enema con acqua tiepida; gli altri autori non hanno eseguito questo passaggio, ma uno studio in medicina umana ha riportato un'alta efficacia del FMT mediante enema anche senza precedente lavaggio del colon (Lee et al., 2016); molto probabilmente ciò si può considerare valido anche per l'uso nel cane.

Gli autori che hanno optato per l'endoscopia discendente, hanno tenuto gli animali a digiuno rispettivamente da 12 ore (Gerbec, 2016) e da 24 ore (Bottero et al., 2017) prima del trapianto; Bottero (2017) limita anche l'assunzione di acqua da 6 ore prima del FMT. Ovviamente il soggetto viene posto in anestesia generale ed entrambi gli studi utilizzano anestesia gassosa con isoflorano. I pazienti vengono posizionati in decubito laterale sinistro e Gerbec (2016) sceglie di tenerli con la parte anteriore del corpo sollevata.

Una volta introdotto l'endoscopio per via orale, Bottero e colleghi (2017) eseguono prima un lavaggio con soluzione fisiologica tiepida a livello di duodeno e, nei pazienti opportunamente preparati, anche a livello di ileo e colon.

Gerbec (2016) fa giungere l'endoscopio fino a metà del duodeno, per poi somministrare il materiale fecale a velocità costante, in modo da non avere un transito irregolare lungo l'intestino. Nello studio di Bottero (2017), invece il materiale è distribuito in maniera omogenea partendo dalle porzioni del duodeno più distali raggiungibili; nei casi in cui non ci fossero difficoltà operative a raggiungere l'ileo e il colon fosse stato preparato adeguatamente, è stato eseguito il trapianto anche in questi due distretti.

In caso di ostruzione del flusso durante la somministrazione, il problema può essere risolto massaggiando lentamente l'addome dell'animale dall'esterno (Gerbec, 2016).

Sia che il FMT venga eseguito mediante enema che mediante endoscopia, per evitare una fuoriuscita prematura attraverso la defecazione del materiale trapiantato, c'è generale concordanza sull'indicazione di tenere il soggetto in decubito nel periodo immediatamente successivo, che può andare da 2 minuti (Pereira et al., 2018) fino a 45 minuti (Weese et al., 2013). In medicina umana è indicato di rimanere in decubito dorsale per circa 30 minuti (Cammarota et al., 2017), quindi Gerbec (2016) segue queste tempistiche anche per il cane.

Pereira (2018) opta per tenere gli animali con la pelvi sollevata ed inclinata di circa 45° rispetto alla superficie del tavolo per evitare la diffusione per gravità del materiale trapiantato.

Un altro modo per diminuire le possibilità di movimenti intestinali prematuri è quello utilizzato da Chaitman e Ziese (2020): l'animale viene tenuto a digiuno e limitato nel movimento per 4-6 ore dopo il FMT.

A differenza delle metodiche appena citate, l'utilizzo delle capsule orali è molto più semplice, in quanto possono essere somministrate anche a casa e con il cibo (Bottero et al., 2017).

Nello studio in questione (Bottero et al., 2017), le capsule non vengono scongelate prima

dell'assunzione da parte dell'animale. Questa è una scelta che ne rende meno laborioso l'utilizzo da parte del proprietario, ma che potrebbe alterare l'effetto del microbiota fecale del donatore sul tratto gastro-enterico del ricevente.

È difficile fare un confronto tra le varie vie di somministrazione utilizzate in letteratura scientifica nel cane per valutare quali siano le migliori, in quanto gli studi sono molto eterogenei (per tipologia di studio, numerosità di animali arruolati, criteri di selezione, ecc.) e presentano diversi fattori che possono interferire con i loro esiti.

Nello studio di Bottero (2017), un gruppo di cani viene trattato mediante endoscopia discendente, uno mediante capsule orali ed alcuni cani del primo gruppo ricevono entrambi i trattamenti. Non è possibile mettere a paragone i due gruppi principali, in quanto il trattamento non è stato scelto in modo randomizzato e nel secondo gruppo rientravano i soggetti con condizioni cliniche iniziali meno gravi; però il 90% dei cani trattati prima con endoscopia e successivamente con capsule orali ha avuto un miglioramento clinico più soddisfacente anche a distanza di 3 mesi dal trapianto, rispetto a quelli riceventi esclusivamente l'endoscopia. Questo fa pensare che l'utilizzo di capsule orali possa avere un effetto più a lungo termine rispetto al trapianto per via endoscopica, ma mancano ancora le basi scientifiche per poterlo confermare. A favore dell'idea di una miglior efficacia delle capsule orali rispetto ad altri metodi, Dwyer (2019) registra una più rapida discesa del DI in cani con disbiosi intestinale acuta da trattamento con tilosina nei soggetti trattati con capsule orali rispetto a quelli riceventi un singolo enema.

È probabile che la maggior efficacia del trattamento mediante capsule orali sia dovuta alla somministrazione multipla piuttosto che alla loro formulazione, essendo il materiale fecale preparato in maniera analoga a quello utilizzato per altre vie di somministrazione. Per confermare questa affermazione, servirebbero però più studi sul cane in cui vengano effettuate somministrazioni multiple mediante altri metodi. In medicina umana sono stati eseguiti degli studi sul FMT che riportano miglioramento clinico in seguito ad infusioni multiple; ad esempio, si sono ottenuti esiti positivi mediante enema rettale in pazienti affetti da colite ulcerativa, un particolare tipo di IBD, (Moayyedi et al., 2015) o mediante colonscopia in pazienti con rCDI (Cammarota et al., 2015).

4.3.4 QUANTITÀ SOMMINISTRATA E FREQUENZA DI SOMMINISTRAZIONE

Quando è utilizzato un trapianto di microbiota fecale con formulazione liquida, diversi autori scelgono di somministrarne circa 10 ml per chilogrammo di peso del cane ricevente, indipendentemente dalle proporzioni di feci e liquido diluente utilizzate per la preparazione e dalla via di somministrazione (Bottero et al., 2017; Gerbec, 2016; Niina et al., 2019; Weese et al., 2013). Burton (2016) sceglie di utilizzare 10 ml, ma non è specificato il peso dei soggetti trattati (cuccioli di Bassotto tedesco di 6-8 settimane). Sugita (2019) opta per una somministrazione di soli 2,7 ml per chilogrammo di peso del paziente e, nonostante questo, il trattamento ha portato a miglioramenti clinici a lungo termine (monitorato fino a 190 giorni); non è ben chiara la motivazione di un tale successo terapeutico, ma potrebbe essere dovuto anche ad un errore nella diagnosi. I problemi gastro-enterici del soggetto trattato sono stati imputati a *Cl. difficile*, però non è ancora stato chiarito se questo possa avere ruolo patogeno nel cane (vedi paragrafo 1.4.1); precedentemente nel paziente era stata rinvenuta una positività per *Campylobacter jejuni* (con successiva negativizzazione) ed erano state effettuate più terapie antibiotiche diverse, quindi forse il microbiota intestinale era solamente alterato dall'effetto dei farmaci utilizzati.

Nello studio di Bottero (2017), nei soggetti in cui il FMT è applicato in più tratti intestinali (duodeno, ileo e colon), il volume iniziale di materiale fecale utilizzato è lo stesso ma ripartito in maniera abbastanza omogenea tra i vari distretti.

Per quanto riguarda le capsule orali, solitamente vengono preparate in modo da doverne somministrare una sola per volta, indipendentemente dalla frequenza di somministrazione (Bottero et al., 2017; Dwyer et al., 2019).

La frequenza di somministrazione quando viene utilizzata una formulazione liquida (enema rettale, endoscopia discendente, colonscopia, sonda oro-gastrica e somministrazione per bocca con siringa) dipende sostanzialmente dall'obiettivo dello studio o dall'esito del primo trapianto. Molti autori utilizzano 1 sola somministrazione e ne valutano l'efficacia nel tempo (Bottero et al., 2017; Burchell et al., 2018; Chaitman et al., 2017, 2020; Dwyer et al., 2019; Gerbec, 2016; Sugita et al., 2019; Weese et al., 2013).

Somministrazioni multiple vengono effettuate quando la via scelta non richiede sedazione e/o anestesia generale: in letteratura, ciò avviene solamente nei casi di enema rettale (Murphy et al., 2014; Niina et al., 2019; Pereira et al., 2018) o sonda oro-gastrica (Burton et al., 2016). Nello studio di Murphy (2014) le somministrazioni per i cani riceventi variano da 1 a 3, senza ulteriori

specificazioni. Pereira e colleghi (2018) optano per una somministrazione ogni 48 ore fino alla scomparsa della diarrea o fino a raggiungere 5 somministrazioni; nei cani in studio, tuttavia, non si giunge mai a tale limite (numero medio di applicazioni: 1,82; range: 1-3). Burton (2016) sceglie di effettuare un trapianto al giorno per 5 giorni consecutivi, ma lo studio non ha raggiunto l'obiettivo di ridurre l'incidenza di diarrea post-svezzamento nei cuccioli trattati rispetto al gruppo di controllo. Infine, nel *case report* di Niina (2019), la frequenza di somministrazione viene stabilita sulla base dei miglioramenti clinici del paziente: vengono eseguiti 9 trapianti nell'arco di 6 mesi e poi, sulla base delle osservazioni effettuate, viene deciso di proseguire con una somministrazione ogni 3 settimane fino a tempo indeterminato. La necessità di dover ripetere a cadenza regolare il FMT significa che, in questo caso, la terapia non è stata sufficiente per garantire degli effetti benefici a lungo termine.

Nei due studi che le utilizzano, le capsule orali vengono somministrate ogni giorno per 14 giorni (Dwyer et al., 2019) oppure ogni 48 ore per un mese e ogni 72 ore per i due mesi successivi (Bottero et al., 2017).

Dal momento che nello studio di Bottero (2017) il gruppo trattato esclusivamente per via orale era rappresentato dai casi clinicamente meno gravi e che nello studio di Dwyer (2019) i cani erano clinicamente sani (solamente disbiosi intestinale acuta dovuta a somministrazione di tilosina), non è possibile trarre delle conclusioni su quale sia la miglior frequenza di somministrazione delle capsule orali in cani con malattia gastro-enterica.

4.4 EFFETTI AVVERSI NEL CANE

Le uniche pubblicazioni a riportare informazioni riguardo l'eventuale sviluppo di effetti avversi in corso di trapianto di microbiota fecale sono Sugita (2019), Niina (2019), Pereira (2018) e Bottero (2017): tutti e 4 affermano che non si sono sviluppate alterazioni cliniche correlabili alla procedura, ad eccezione di 1 soggetto (Bottero et al., 2017) che, nelle 48 ore successive al FMT, si presentava con diarrea di entità peggiore rispetto alle condizioni di partenza.

Pereira e colleghi (2018) valutano la sicurezza del FMT mediante la presenza o assenza di *discomfort* durante e successivamente al trattamento e monitorando i parametri vitali.

Lo studio di Bottero (2017) descrive nei dettagli la valutazione effettuata nel primo periodo dopo il trapianto per evidenziare la possibile presenza di anomalie cliniche imputabili alla terapia. Nelle 48 ore successive al FMT vengono monitorati: comportamento e attitudine dell'animale, consistenza delle feci e frequenza di defecazione, presenza di sintomi gastro-enterici non riscontrati in precedenza, necessità di ricovero e terapia intensiva; 1 solo cane ha dimostrato una consistenza

fecale peggiore rispetto a quella antecedente il trattamento. Dopo 48-72 ore dal trapianto, tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame emocromocitometrico e biochimico di base: nessuno ha riportato variazioni rispetto allo stato precedente. Ad una settimana dal trapianto, viene effettuato un esame colturale delle feci, qualora fosse possibile, per escludere la contaminazione con enteropatogeni: nessun soggetto ha riportato infezione.

Il fatto che gli altri autori non si pronuncino sulla questione potrebbe significare che nemmeno nei loro studi si siano riscontrati effetti avversi rilevanti; ma, non essendo dichiarato esplicitamente, non se ne può avere la certezza.

A conferma di quanto riportato in letteratura umana (vedi paragrafo 1.6.6), si può quindi affermare che, anche nel cane, il FMT è un trattamento medico sicuro quando eseguito correttamente in tutte le sue fasi. L'unico rischio che potrebbe comunque presentarsi riguarda la trasmissione, attraverso il trapianto, di batteri multiresistenti la cui ricerca non fosse stata compresa nello screening del donatore (DeFilipp et al., 2019).

4.5 MONITORAGGIO DEL PAZIENTE

La fase di monitoraggio è fondamentale per valutare se la terapia con trapianto di microbiota fecale abbia avuto esito positivo e quanto questo duri nel tempo.

Ci sono diversi elementi da poter valutare durante il follow up: in primis le condizioni cliniche dell'animale e, qualora sia possibile, le eventuali variazioni della popolazione microbica e dei metaboliti presenti nelle feci.

Indipendentemente dal tipo di monitoraggio scelto, è fondamentale che esso utilizzi come punto di riferimento iniziale uno stesso tipo di valutazione eseguita precedentemente al FMT.

4.5.1 MONITORAGGIO CLINICO

Il monitoraggio di tipo clinico è volto a valutare se la sintomatologia (in questo caso gastro-enterica) migliora in seguito al trapianto fecale, fino anche alla scomparsa totale dei sintomi.

In questo, è molto importante la *compliance* dei proprietari degli animali trattati, in quanto sono loro gli unici a poter compiere alcune osservazioni dopo le dimissioni. È dunque fondamentale che siano delle persone affidabili e che vengano adeguatamente istruiti riguardo agli elementi a cui prestare maggiore attenzione, dedicando del tempo alla comunicazione ed illustrazione di quanto dovranno eseguire. Gerbec (2016), ad esempio, adotta l'utilizzo di questionari in cui i proprietari devono annotare informazioni riguardo la salute generale, la salute gastro-enterica e la dieta seguita

dall'animale durante il periodo post-trapianto; questo strumento potrebbe essere utile affinché i clienti non si dimentichino di riportare elementi clinici significativi, cosa che spesso accade in ambito veterinario.

Sarebbe anche importante che l'animale non inizi nuove terapie o non modifichi la terapia in corso dopo il FMT (Bottero et al., 2017), perché questo potrebbe interferire con l'andamento clinico nel periodo di monitoraggio; tuttavia, non è sempre possibile.

Il fattore più spesso valutato dagli autori nel follow up è la variazione della consistenza fecale in seguito al trapianto. Essa può essere semplicemente descritta mediante aggettivi come liquida, pastosa, normale (Pereira et al., 2018; Sugita et al., 2019; Weese et al., 2013), oppure classificata mediante apposite scale di valutazione: quelle utilizzate in questi studi sono la scala Nestlé Purina® (Burton et al., 2016; Chaitman et al., 2020) e la scala Waltham™ (Gerbec, 2016; Niina et al., 2019). Oltre alla consistenza, è buona norma prestare attenzione anche alla frequenza di defecazione e all'eventuale presenza di muco e/o sangue nelle feci (Sugita et al., 2019).

Pereira e colleghi (2018) sottopongono gli animali ad esame fisico giornaliero, concentrandosi soprattutto su temperatura, frequenze cardiaca e respiratoria, postura e appetito; i loro pazienti però sono rimasti ricoverati per tutto il periodo di trattamento con FMT e di monitoraggio, quindi la valutazione era più attendibile perché effettuata direttamente dal veterinario.

Alcuni autori utilizzano degli indici di classificazione clinica che tengono conto di più parametri diversi e assegnano dei punteggi all'animale per stabilire la gravità della malattia.

Nello specifico, Niina (2019) ha scelto il *Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index* (CIBDAI), Burchell (2018) ricorre ad una scala di valutazione clinica (senza specificare quale) per cani affetti da sindrome da diarrea emorragica, mentre Bottero (2017) opta per il *Canine Chronic Enteropathy Clinical Activity Index* (CCECAI).

La scala di valutazione della consistenza fecale fornita da Nestlé Purina® Company utilizza un intervallo numerico da 1 a 7, con incrementi di singole unità (**Figura 4**).

Quella sviluppata da The Waltham™ Petcare Science Institute, invece, comprende valori tra 1 e 5, con incrementi di mezza unità (**Figura 5**).

Entrambe le scale sono disponibili pubblicamente e contengono descrizioni sia scritte che visive per ogni punteggio. Uno studio recente (Cavett et al., 2020) ha comparato l'utilizzo di queste due scale di valutazione, prendendo in considerazione anche le differenze di risultati quando utilizzate da medici veterinari e persone estranee al settore (come la gran parte dei proprietari di animali): è

risultato che entrambe le scale forniscono risultati concordi tra loro, con differenze minime tra i due metodi; tuttavia la valutazione della consistenza fecale rimane sempre soggettiva e si è evidenziata una maggior concordanza quando si comparano le opinioni esclusivamente di medici veterinari rispetto al confronto tra clinico e persona esterna.

Da ciò si evince che la scelta di uno o dell'altro metodo di valutazione della consistenza fecale sia da considerare una preferenza personale. L'importante è che la persona incaricata di assegnare il punteggio sia adeguatamente istruita sull'utilizzo di questo strumento, in modo da limitare i possibili equivoci nella comunicazione tra clinico e proprietario.

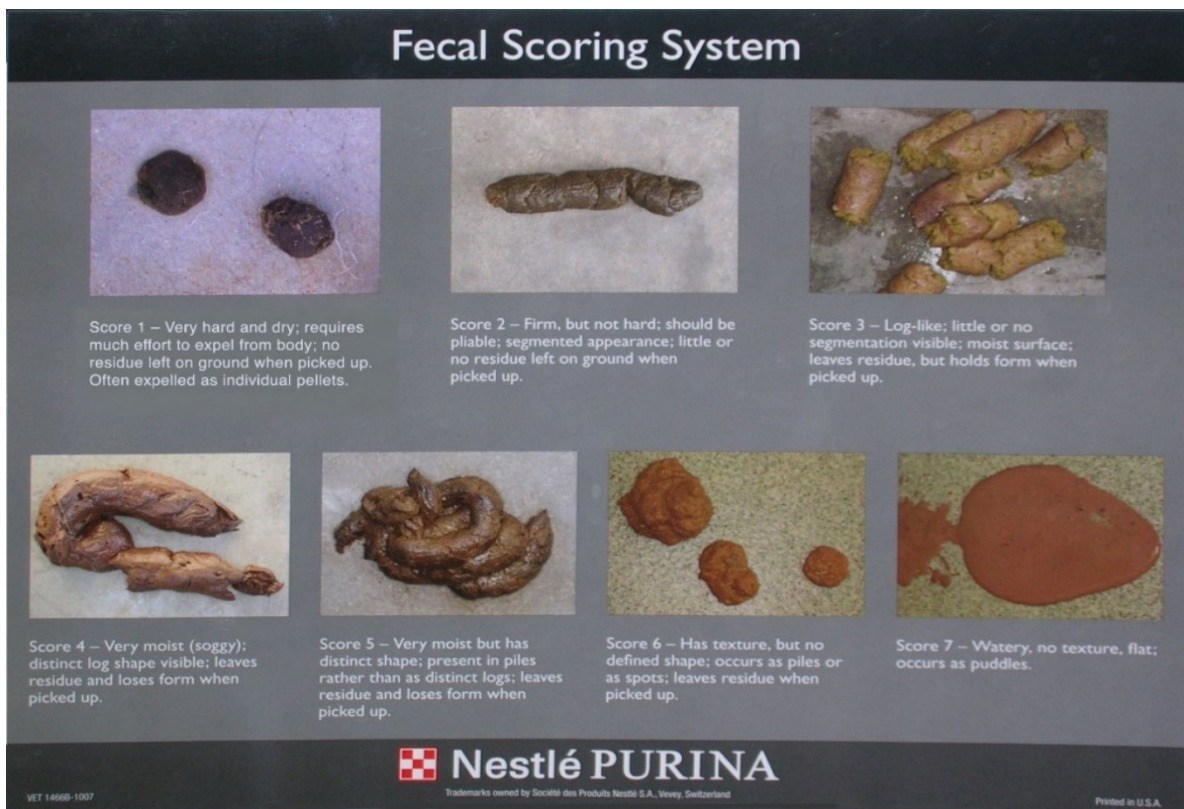


Figura 4. Scala di valutazione della consistenza fecale fornita da Nestlé Purina® Company

The WALTHAM™ Faeces Scoring System

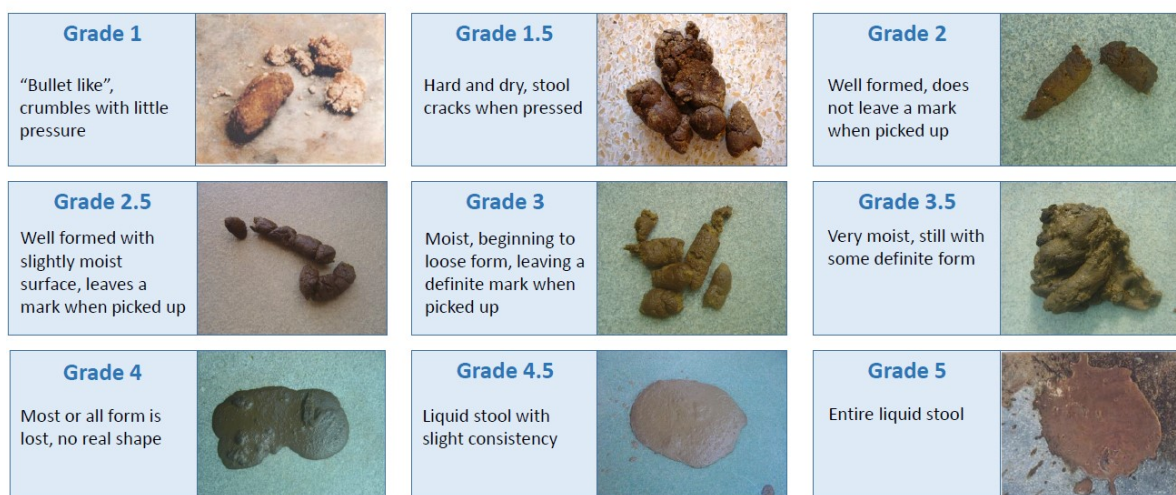


Figura 5. Scala di valutazione della consistenza fecale offerta da The Waltham™ Petcare Science Institute.

Il CIBDAI e il CCECAI sono indici di classificazione clinica utilizzati in cani affetti da enteropatia cronica (gli aspetti clinici presi in considerazione sono elencati in [Tabella 4](#)).

Il primo è stato ideato da Jergens nel 2003 e fornisce una quantificazione affidabile dei segni clinici di infiammazione in soggetti affetti da IBD (Jergens et al., 2003). Esso si basa su 6 variabili cliniche, alle quali viene assegnato un punteggio da 0 a 3; la somma dei punteggi consente di classificare la malattia come clinicamente insignificante (0-3), lieve (4-5), moderata (6-8) o grave (≥ 9). Un altro studio, tuttavia, ritiene che il miglior valore di cut-off per una prognosi negativa sia 8, con una sensibilità del 74% ed una specificità del 63% in cani affetti da CE (Allenspach et al., 2007).

Il CCECAI è stato proposto per la prima volta da Allenspach nel 2007 ed è sostanzialmente un miglioramento del CIBDAI, al quale vengono aggiunte le valutazioni del livello di albumine sieriche, della presenza di ascite e edema periferico e del prurito. Questo indice è quindi valido, oltre che per i casi di IRE, anche per quelli di FRE e di enteropatia proteino-disperdente. Il sistema di punteggio è uguale a quello del CIBDAI (da 0 a 3 punti per ogni categoria) e permette di classificare la patologia come clinicamente insignificante (0-3), lieve (4-5), moderata (6-8), grave (9-11) o molto grave (≥ 12); il valore di 12 si è rivelato il cut-off migliore per una prognosi negativa, con sensibilità del 91% e specificità del 83% in cani con CE (Allenspach et al., 2007).

Essendo un indice clinico più completo, ad oggi sembra più saggio eseguire un monitoraggio

mediante CCECAI anziché CIBDAI, soprattutto quando non si conosce esattamente la natura dell'enteropatia cronica in corso.

Canine inflammatory bowel disease activity index (CIBDAI)	Canine chronic enteropathy clinical activity index (CCECAI)
<p>Attitudine/attività</p> <p>0 normale</p> <p>1 leggermente diminuita</p> <p>2 moderatamente diminuita</p> <p>3 gravemente diminuita</p>	<p>Attitudine/attività</p> <p>0 normale</p> <p>1 leggermente diminuita</p> <p>2 moderatamente diminuita</p> <p>3 gravemente diminuita</p>
<p>Appetito</p> <p>0 normale</p> <p>1 leggermente diminuito</p> <p>2 moderatamente diminuito</p> <p>3 gravemente diminuito</p>	<p>Appetito</p> <p>0 normale</p> <p>1 leggermente diminuito</p> <p>2 moderatamente diminuito</p> <p>3 gravemente diminuito</p>
<p>Vomito</p> <p>0 normale</p> <p>1 lieve (1 volta/settimana)</p> <p>2 moderato (2-3 volte/settimana)</p> <p>3 grave (> 3 volte/settimana)</p>	<p>Vomito</p> <p>0 normale</p> <p>1 lieve (1 volta/settimana)</p> <p>2 moderato (2-3 volte/settimana)</p> <p>3 grave (> 3 volte/settimana)</p>
<p>Consistenza fecale</p> <p>0 normale</p> <p>1 feci leggermente molli</p> <p>2 feci molto molli</p> <p>3 diarrea acquosa</p>	<p>Consistenza fecale</p> <p>0 normale</p> <p>1 feci leggermente molli</p> <p>2 feci molto molli</p> <p>3 diarrea acquosa</p>

Canine inflammatory bowel disease activity index (CIBDAI)	Canine chronic enteropathy clinical activity index (CCECAI)
<p>Frequenza di defecazione</p> <p>0 normale</p> <p>1 leggermente aumentata (2-3 volte/giorno) o presenza fecale di sangue, muco o entrambi</p> <p>2 moderatamente aumentata (4-5 volte/giorno)</p> <p>3 gravemente aumentata (> 5 volte/giorno)</p>	<p>Frequenza di defecazione</p> <p>0 normale</p> <p>1 leggermente aumentata (2-3 volte/giorno) o presenza fecale di sangue, muco o entrambi</p> <p>2 moderatamente aumentata (4-5 volte/giorno)</p> <p>3 gravemente aumentata (> 5 volte/giorno)</p>
<p>Perdita di peso</p> <p>0 nessuna</p> <p>1 lieve (< 5%)</p> <p>2 moderata (5-10%)</p> <p>3 grave (> 10%)</p>	<p>Perdita di peso</p> <p>0 nessuna</p> <p>1 lieve (< 5%)</p> <p>2 moderata (5-10%)</p> <p>3 grave (> 10%)</p>
	<p>Livello di albumine</p> <p>0 albumine > 20 g/L</p> <p>1 albumine 15-19,9 g/L</p> <p>2 albumine 12-14,9 g/L</p> <p>3 albumine < 12 g/L</p>

Canine inflammatory bowel disease activity index (CIBDAI)	Canine chronic enteropathy clinical activity index (CCECAI)
	Ascite e edema periferico 0 nessuno 1 lieve ascite o edema periferico 2 moderata quantità di ascite/edema periferico 3 grave ascite/versamento pleurico e edema periferico
	Prurito 0 nessun prurito 1 occasionali episodi di prurito 2 regolari episodi di prurito, ma si ferma quando il cane dorme 3 il cane si sveglia regolarmente a causa del prurito

Tabella 4. Confronto tra gli elementi presi in considerazione negli indici CIBDAI e CCECAI (Allenspach et al., 2007).

4.5.2 MONITORAGGIO MEDIANTE ANALISI DEL MICROBIOTA FECALE

Ripristinare l'equilibrio del microbiota intestinale è l'obiettivo principale del FMT. Da questo si evince quanto sia importante valutare se lo stato di disbiosi intestinale si risolva in seguito alla terapia.

Per valutare la composizione batterica fecale, le feci generalmente vengono raccolte e conservate ad una temperatura di -80°C fino al momento dell'estrazione del DNA (Burton et al., 2016; Chaitman et al., 2020; Dwyer et al., 2019; Gerbec, 2016). Nel caso il proprietario fosse impossibilitato a consegnare subito le feci alla struttura di riferimento, esse possono essere conservate in un comune freezer ad una temperatura di -20°C anche per diverse settimane, senza che questo comprometta l'esito delle analisi successive (Gerbec, 2016).

A questo punto gli autori effettuano sostanzialmente due tipi di analisi sul DNA estratto:

- qPCR per le popolazioni di specie batteriche che normalmente vengono alterate in corso di malattia gastro-enterica nel cane e successivo calcolo dell'indice di disbiosi (vedi paragrafo 1.4.1) (Chaitman et al., 2017, 2020; Dwyer et al., 2019; Gerbec, 2016);
- sequenziamento di alcune regioni ipervariabili del gene 16S rRNA per valutare la biodiversità della composizione microbica fecale (le tecniche di sequenziamento genico sono descritte al paragrafo 1.3) (Burchell et al., 2018; Burton et al., 2016; Chaitman et al., 2020; Gerbec, 2016; Niina et al., 2019; Weese et al., 2013).

La maggior parte degli autori che ricorrono al sequenziamento genico specificano di utilizzare la tecnologia Illumina mediante il sistema MiSeq™ ([Scheda tecnica sul sistema MiSeq \(illumina.com\)](https://www.illumina.com)), una delle tecnologie più diffuse per l'analisi del microbiota fecale.

Sempre rimanendo in ambito di analisi microbiologiche sulle feci, nei cani in cui l'enteropatia fosse dovuta ad un agente batterico specifico, all'interno del monitoraggio è bene effettuare anche una ricerca dello stesso ed assicurarsi della negativizzazione del soggetto. Murphy (2014) ricorre a *real-time* PCR per *Cl. perfringens* α toxin gene; Sugita (2019) utilizza la *real-time* PCR specifica per *Cl. difficile* toxin A&B genes ed anche un test immunocromatografico per l'antigene di *Cl. difficile* e le proteine delle tossine A&B.

4.5.3 MONITORAGGIO MEDIANTE METABOLOMICA

Le analisi di tipo metabolomico sulle feci di un animale con patologia gastro-enterica sono uno strumento promettente, quando associate a quelle del microbiota fecale, perché permettono di capire quali siano le alterazioni funzionali della popolazione microbica intestinale.

In letteratura scientifica, questa tecnica è stata realizzata, come monitoraggio di cani che abbiano subito un trapianto di microbiota fecale, solamente nello studio di Chaitman e Ziese (2020), il cui obiettivo era anche quello di analizzare le alterazioni dei livelli di acidi biliari non coniugati e di metaboliti totali in cani trattati mediante FMT per diarrea acuta. Per far ciò, viene utilizzato un sistema di gascromatografia e spettrometria di massa. I risultati del suo studio mostrano come sia le quantità di acidi biliari non coniugati che quelle di metaboliti totali, inizialmente alterate, ritornino a livelli simili a quelli dei cani sani utilizzati come gruppo di controllo, nel corso di 4 settimane.

Dato che tutti gli altri autori non si servono della metabolomica durante il monitoraggio post-FMT, non è possibile eseguire alcun tipo di comparazione; d'altro canto, Chaitman e Ziese (2020) sottolineano l'importanza di questo strumento, il cui utilizzo dovrebbe quindi essere almeno preso in considerazione come opzione negli studi futuri.

4.5.4 FREQUENZA DI MONITORAGGIO

La frequenza di monitoraggio del paziente nel periodo successivo al trapianto di microbiota fecale è molto eterogenea nelle varie pubblicazioni analizzate; ogni autore ha scelto in maniera arbitraria quando effettuare un primo controllo e a che distanza di tempo effettuare quelli successivi.

Il primo monitoraggio in seguito al FMT (o al primo FMT nel caso di somministrazioni multiple) spesso viene effettuato una settimana dopo, indipendentemente dal tipo di valutazione da eseguire (clinica, microbiologica o metabolomica) (Chaitman et al., 2017, 2020; Dwyer et al., 2019; Sugita et al., 2019). Questo sembra quindi essere un ragionevole lasso di tempo da far trascorrere prima di un primo controllo.

Due eccezioni sono rappresentate dagli studi di Bottero (2017), che sceglie di aspettare 1 mese per la prima valutazione clinica mediante CCECAI, e quello di Gerbec (2016), che effettua una valutazione clinica mediante questionario a 2 mesi dal trapianto; i motivi di queste decisioni non sono noti.

Per quanto riguarda la cadenza dei controlli successivi, ciò che probabilmente influenza maggiormente l'organizzazione del follow up è il tipo di monitoraggio effettuato.

Quando si valutano lo stato di salute generale, la sintomatologia gastro-enterica o la consistenza fecale, il controllo può essere effettuato anche quotidianamente, sia in struttura per animali ricoverati (Burton et al., 2016; Pereira et al., 2018) che a casa da un proprietario adeguatamente istruito (Gerbec, 2016). Alcuni autori, tuttavia, mantengono intervalli di valutazione settimanali (Chaitman et al., 2020) o mensili (Bottero et al., 2017).

Qualora invece si vogliono analizzare le feci per la ricerca di specifici enteropatogeni, lo studio del microbiota o lo studio metabolomico, l'intervallo tra un controllo e quello successivo è non meno di una settimana (Burchell et al., 2018; Burton et al., 2016; Chaitman et al., 2020; Sugita et al., 2019).

Un altro tipo di approccio possibile è quello di organizzare il monitoraggio in base alle condizioni cliniche dell'animale nel tempo, quindi di valutarlo solo quando ci sia un effettivo peggioramento della sua salute; questo è anche quanto descritto nel *case report* di Niina (2019). Per fare questo, è

necessaria una comunicazione costante tra medico veterinario e proprietario e quest'ultimo dev'essere una persona affidabile e adeguatamente istruita a riconoscere le alterazioni cliniche del proprio cane.

Questa opzione potrebbe essere valida per quanto riguarda il monitoraggio clinico post-FMT, mentre per quanto riguarda le analisi sulle feci probabilmente sarebbe più pratico, da un punto di vista organizzativo, stabilire delle scadenze a priori.

Il numero ottimale di monitoraggi da effettuare per valutare l'efficacia del trapianto fecale è impossibile da stabilire, in quanto non esistono ancora studi che valutino gli effetti a lungo termine del FMT nel cane. Ad oggi, il dato che più avvicina a tale scopo è ottenibile dal *case report* di Sugita (2019): il paziente trattato per via orale mediante siringa presenta normalizzazione delle condizioni fecali ancora persistente a 175 giorni dal trapianto. Tutti gli altri autori riportano monitoraggi che si fermano al massimo a 3 mesi post-FMT (Bottero et al., 2017)

4.6 EFFICACIA

Le pubblicazioni presenti in letteratura riportano dati nel complesso positivi per quanto riguarda l'efficacia del trapianto di microbiota fecale nel cane; tuttavia, bisogna tenere in considerazione che gli studi non sono molto numerosi ed ognuno presenta delle lacune, quindi è difficile trarre delle conclusioni univoche sulla validità di questa tecnica.

Un altro fattore che rende difficile valutare l'efficacia del FMT è il fatto che questa sia influenzata da tutte le fasi del procedimento (selezione del ricevente, selezione del donatore, preparazione del materiale, ecc.) e basta un solo errore in una qualsiasi di queste fasi per compromettere, anche parzialmente, il risultato.

4.6.1 ESITI NEGATIVI

Uno degli studi più difficili da valutare è quello di Burton (2016), il cui obiettivo era di ridurre l'incidenza di diarrea post-svezzamento nei cuccioli: né il gruppo trattato con FMT né quello di controllo hanno sviluppato diarrea (secondo la scala di valutazione della consistenza fecale Nestlé Purina®) e i rispettivi punteggi non presentavano differenza statisticamente significativa; quindi apparentemente il trapianto non ha avuto alcuna utilità. Tuttavia, è da sottolineare che ci sono diversi fattori che potrebbero aver influito negativamente: il fatto che i soggetti dovessero ancora completare lo svezzamento al momento del trapianto, la somministrazione mediante sonda oro-gastrica e l'utilizzo di una scala di valutazione della consistenza fecale pensata per soggetti adulti.

Ovviamente, per lo scopo dello studio, non si sarebbero potuti scegliere soggetti già svezzati (quindi con una composizione microbica intestinale non più in fase di sviluppo), però l'utilizzo di una via di somministrazione che non comporti il contatto del materiale fecale con l'ambiente gastrico e di una scala di valutazione fecale adatta a cuccioli in fase di svezzamento (Grellet et al., 2012) avrebbe potuto dare dei risultati diversi.

Un altro studio in l'utilità del trapianto fecale sembra scarsa è quello di Burchell (2018): soggetti con sindrome da diarrea emorragica presentano un miglioramento della diversità microbica fecale dopo FMT solo temporaneo, per tornare ad una composizione simile a quella di partenza nell'arco di 30 giorni. Non si possiedono le informazioni complete dello studio, ma soltanto l'*abstract*, quindi non è possibile analizzare a fondo i motivi di questo esito.

Ulteriori insuccessi terapeutici sono descritti in 2 pubblicazioni (Bottero et al., 2017; Gerbec, 2016), ma si tratta di singoli soggetti.

Uno dei tre cani trattati nello studio di Gerbec (2016) non manifesta alcun miglioramento clinico successivamente al trapianto; inoltre l'indice di disbiosi si stabilizza su valori di poco inferiori a 2 e la popolazione microbica presenta caratteristiche tipiche dei cani con disbiosi (ad esempio, un aumento di *Enterobacteriaceae* ed una diminuzione del genere *Faecalibacterium*). Uno dei possibili motivi per cui l'esito è stato negativo è che in questo paziente potrebbero essere state utili delle somministrazioni aggiuntive in seguito alla prima.

Nella pubblicazione di Bottero (2017), un cane che ha subito trapianto esclusivamente per via endoscopica si è presentato al secondo controllo, 3 mesi dopo, con condizioni cliniche sostanzialmente analoghe a quelle di partenza (medesimo valore di CCECAI); uno dei soggetti riceventi il trattamento mediante capsule orali è stato addirittura obbligato ad interrompere la somministrazione dopo 1 mese ed a riprendere la terapia steroidea precedente, per via del peggioramento clinico. Per entrambi i casi, la motivazione potrebbe consistere in un fattore casuale oppure in un peggioramento improvviso della patologia sottostante e non controllabile a sufficienza mediante FMT.

4.6.2 RISULTATI DUBBI

Pereira e colleghi (2018) descrivono un aumento della percentuale di miglioramento di diarrea entro 48 ore dal ricovero ed un conseguente minor periodo di ospedalizzazione in cuccioli con AHDS da parvoviroso nel caso di FMT eseguito in aggiunta alla terapia standard. Questo dato sembra

incoraggiante, ma è da analizzare anche tenendo conto che il gruppo trattato con trapianto fecale aveva un'età media di circa 1,5 mesi maggiore rispetto al gruppo ricevente esclusivamente la terapia standard (5,18 VS 3,67 mesi); è infatti possibile che cuccioli di età maggiore possano avere migliori capacità di recupero.

Nello studio di Dwyer (2019), vengono trattati cani con disbiosi intestinale acuta, dovuta a trattamento con tilosina, mediante trapianto con enema o con capsule orali; il gruppo di controllo riceve capsule placebo. Sebbene con tempistiche più rapide per il gruppo trattato con FMT, il DI si riduce progressivamente in tutti e tre i gruppi nel periodo di osservazione di 22 giorni. Si può ipotizzare che il risultato sia dovuto al fatto che i cani erano precedentemente sani e che progressivamente vi sia una normalizzazione del microbiota fecale indipendentemente dall'esecuzione del FMT; il trapianto fecale in questo caso potrebbe anche non essere stato necessario.

Nella pubblicazione di Bottero (2017), cani con IBD idiopatica sono stati trattati con FMT mediante endoscopia, capsule orali oppure entrambe. Esclusi i due soggetti descritti nel paragrafo precedente, c'è stato un complessivo miglioramento delle condizioni cliniche dei pazienti (in base ai valori medi di CCECAI precedenti ed a 3 mesi dal trapianto). I riceventi che sembrano aver tratto maggior beneficio sono quelli in cui sono state utilizzate le capsule orali in seguito a somministrazione endoscopica.

Tuttavia, sono presenti numerose criticità in questo studio:

- l'assegnazione dei soggetti ai gruppi non è stata randomizzata perché sono stati trattati per via esclusivamente orale solamente i soggetti con CCECAI di partenza migliore; questo rappresenta sicuramente un limite dello studio e impedisce di valutare quale via di somministrazione sia più efficace;
- in molti pazienti non sono mai state sospese le terapie antibiotiche ed immunosoppressive;
- non è stata effettuata alcuna valutazione laboratoristica delle feci per monitorare le variazioni del microbiota fecale prima e dopo il trapianto.

Tutti questi fattori possono influenzare anche notevolmente l'effetto del FMT e la capacità di valutare se lo studio abbia avuto un effettivo successo.

Il case report di Niina (2019) descrive un caso di IBD idiopatica trattata con trapianto fecale mediante enema rettale: nell'arco di 11 giorni si assiste ad un miglioramento della sintomatologia gastro-

enterica (valutata mediante CIBDAI) ed una variazione del microbiota fecale verso una composizione simile a quella del donatore. Questa situazione però non rimane stabile e, nel tempo, è necessario effettuare somministrazioni ad intervalli regolari per mantenere sotto controllo le condizioni cliniche; non vi è quindi un effetto di lunga durata del FMT. Non è ben chiaro quale possa essere il motivo, ma forse, utilizzando un donatore o una via di somministrazione differente, la durata degli effetti sarebbe potuta variare.

4.6.3 SUCCESSI TERAPEUTICI

Uno degli studi più completi probabilmente è quello di Chaitman e Ziese (2020): cani con diarrea acuta da meno di 14 giorni vengono trattati con FMT mediante enema rettale oppure con metronidazolo; viene eseguito un monitoraggio sia clinico che di laboratorio mediante analisi del microbiota fecale e metabolomica fecale. Nei cani trattati con trapianto fecale si assiste ad aumento della consistenza fecale, diminuzione dell'indice di disbiosi, riduzione della percentuale di acidi biliari primari nelle feci e concentrazioni fecali di metaboliti totali che si avvicinano a quelle di soggetti sani; i miglioramenti di questi parametri sono di entità inferiore o addirittura assenti nel gruppo ricevente metronidazolo.

Nonostante sarebbe stato interessante effettuare un confronto anche con un gruppo trattato con placebo, è evidente che il FMT sia un'opzione terapeutica più efficace del trattamento antibiotico. Sebbene la suddivisione dei gruppi non sia stata casuale, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le caratteristiche dei soggetti inclusi, quindi non sembra probabile che questo abbia influito sui risultati.

Gerbec (2016) ha registrato esiti positivi su 2 dei 3 cani (le informazioni sul terzo paziente sono riportate al paragrafo 4.6.1) trattati mediante trapianto endoscopico per ARE: i sintomi gastro-enterici diminuiscono, il DI scende al di sotto dello 0, la composizione microbica fecale mostra un aumento di *taxa* associati a salute gastro-intestinale (come *Faecalibacterium* spp.) ed una riduzione di quelli associati a disbiosi (ad esempio, *Enterobacteriaceae*) e la composizione microbica fecale diventa simile a quella del soggetto donatore. Uno dei due soggetti mostra una ricaduta della salute gastro-enterica durante il secondo mese di monitoraggio, senza tornare tuttavia ai livelli di partenza; la consistenza fecale rimane comunque normale in seguito al trapianto.

Purtroppo, la scarsa numerosità dei cani riceventi arruolati rende questa pubblicazione una prova debole dell'efficacia del trapianto di microbiota fecale in cani affetti da enteropatia antibiotico-responsiva.

Altro caso di debole valore scientifico ma in cui si riporta una grande efficacia del FMT è il case report di Sugita (2019): un cane con enteropatia cronica non rispondente alle precedenti terapie antibiotiche è risultato positivo alle analisi delle feci per *Cl. difficile toxin A&B genes* ed è stato trattato con trapianto fecale mediante somministrazione orale con siringa. L'animale ha dimostrato un rapido miglioramento delle condizioni fecali ed è risultato negativo ai successivi controlli per la ricerca fecale del patogeno; inoltre non ha avuto bisogno di ulteriori trattamenti anche a distanza di mesi. Ciò che manca in questo caso è un'analisi più approfondita del microbiota fecale in seguito al trapianto.

Nonostante questa via di somministrazione dovrebbe essere teoricamente quella meno efficace (vedi paragrafo 1.6.4), il successo è stato notevole. Questo potrebbe essere stato dovuto ad un caso fortuito, oppure al fatto che ancora non siano chiari tutti i meccanismi attraverso cui il FMT influenza l'ambiente intestinale.

Infine, ci sono 3 pubblicazioni di cui è disponibile solamente l'*abstract* (Chaitman et al., 2017; Murphy et al., 2014; Weese et al., 2013); purtroppo, senza conoscere i dettagli degli studi è difficile fare delle valutazioni.

Chaitman (2017) ha ottenuto una riduzione significativa dell'indice di disbiosi in cani con diarrea cronica trattati mediante trapianto con enema. Murphy (2014) ha selezionato 8 cani positivi a *Cl. perfringens* e refrattari alle precedenti terapie; il FMT con enema rettale ha portato alla risoluzione della diarrea in tutti i soggetti e alla negativizzazione delle feci di 6 cani per *Cl. perfringens* α toxin gene al controllo successivo. Weese (2013) riporta il caso di un cane con IBD in cui la consistenza fecale migliora entro 24 ore dal trapianto fecale mediante enema; anche la composizione microbica fecale migliora e si avvicina a quella del donatore; il soggetto rimane clinicamente normale per i 3 mesi post-FMT in cui viene monitorato.

4.7 LINEE GUIDA SULLA TECNICA DI TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE NEL CANE

In base alle informazioni presenti ad oggi nella letteratura scientifica, purtroppo in alcuni casi ancora troppo lacunose, si è tentato di fornire delle linee guida sul trapianto di microbiota fecale nel cane.

4.7.1 SELEZIONE DEL DONATORE

Per quanto riguarda il segnalamento, si può consigliare l'inclusione di soggetti di età compresa tra 6 mesi e 10 anni.

Non sembra essere rilevante che essi possiedano medesimo genere, status riproduttivo (intero o sterilizzato) e razza del ricevente.

Non è necessario che donatore e ricevente siano imparentati tra loro.

L'ideale sarebbe che il donatore non abbia mai avuto problemi di salute e, di conseguenza, non abbia mai ricevuto terapie antibiotiche. Tuttavia, appare accettabile anche selezionare soggetti che non abbiano avuto problemi di salute di qualsiasi natura negli ultimi 6 mesi e che non abbiano assunto antibiotici negli ultimi 3 mesi. Ovviamente, qualora ve ne sia la possibilità, criteri più restrittivi sulla scelta del donatore consentono di aumentare il livello di sicurezza del trapianto.

È importante che il cane sia in regola con le vaccinazioni verso le malattie infettive secondo le linee guida internazionali (ad esempio, quelle fornite dalla WSAVA).

La dieta del donatore dovrebbe essere di tipo commerciale; è fondamentale che non siano utilizzati soggetti alimentati mediante diete crude.

Durante la visita clinica del soggetto donatore è importante prestare attenzione soprattutto al BCS: l'animale non deve essere né sovrappeso né troppo magro.

Le indagini cliniche successive sono a discrezione del medico veterinario; ovviamente, più sono complete e minori sono i rischi di utilizzare soggetti con patologie sottostanti difficili da rilevare. Assieme all'esame fisico, è fortemente consigliata l'esecuzione di un esame emocromocitometrico e di analisi biochimica su siero: questi possono indirizzare verso ulteriori approfondimenti diagnostici.

In caso si vogliano escludere in maniera più rigorosa eventuali anomalie funzionali intestinali, pancreatite ed EPI, si può ricorrere a degli esami specifici (cobalamina, folati, lipasi pancreatica specifica e TLI).

Le feci del donatore devono necessariamente avere una consistenza normale (facendo riferimento a scale di valutazione specifiche per il cane).

È fortemente raccomandato di escludere la presenza di possibili parassitosi intestinali mediante un esame copromicroscopico eseguito mediante flottazione fecale e, possibilmente, anche un test ELISA per *Giardia* spp. su feci. Per una maggior sicurezza, è possibile eseguire in aggiunta un trattamento antielmintico nel periodo antecedente la raccolta delle feci da trapiantare.

È fortemente raccomandato di escludere la presenza di batteri enteropatogeni o delle loro tossine mediante PCR o esame culturale. I principali microrganismi che devono essere ricercati sono: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridioides difficile* e *Yersinia enterocolitica*.

Quando ci sia la possibilità di farlo, è utile effettuare analisi più approfondite del microbiota fecale del donatore per poter calcolare l'indice di disbiosi: questo deve necessariamente essere inferiore a 0.

4.7.2 SELEZIONE DEL RICEVENTE

Le patologie gastro-enteriche, sia acute sia croniche, rappresentano il target del FMT.

Prima di optare per un trapianto fecale è necessario affrontare un adeguato iter diagnostico volto sia ad identificare la causa del problema sia ad escludere patologie che potrebbero essere trattate efficacemente mediante altre terapie.

Per indagare la presenza di malattie sistemiche anche non gastro-enteriche che potrebbero essere la causa della sintomatologia, è importante eseguire una visita clinica accurata ed un esame emato-biochimico; questi potrebbero fornire indicazioni utili per eventuali ulteriori approfondimenti diagnostici. Se si vogliono ricercare alterazioni della funzionalità gastro-enterica o la presenza di EPI, è possibile misurare cobalamina, folati e TLI sierici.

È importante escludere una possibile causa parassitaria dei problemi gastro-enterici. Oltre alle informazioni derivanti dall'anamnesi sulla profilassi antiparassitaria del paziente ed eventuali trattamenti per parassiti intestinali eseguiti in passato, va eseguito un esame copromicroscopico qualitativo. In aggiunta o in alternativa, è possibile somministrare un trattamento antiparassitario con fenbendazolo.

È bene raccogliere informazioni dettagliate sulla dieta del soggetto e su eventuali trial dietetici effettuati in passato. Il medico veterinario può anche decidere di prescrivere lui stesso un trial dietetico di almeno 3 settimane con dieta casalinga, commerciale ipoallergenica o commerciale idrolizzata.

Per indagare la presenza di microrganismi o virus enteropatogeni, oltre a constatare che il soggetto sia regolarmente vaccinato, è bene sottoporre le feci del ad analisi mediante *real-time* PCR. I patogeni che si consiglia di ricercare sono *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Clostridium perfringens* α toxin, *Clostridioides difficile* toxin A&B, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp., parvovirus canino di tipo 2, virus del cimurro canino e coronavirus enterico canino.

È necessario chiedere informazioni riguardo a precedenti terapie antibiotiche, prestando particolare attenzione ai principi attivi utilizzati e alla risposta clinica. Sebbene possa essere ulteriormente nocivo per l'equilibrio microbico intestinale del paziente, un trial antibiotico potrebbe escludere o confermare la presenza di ARE.

Inoltre, è importante sapere se l'animale sia attualmente in terapia con antibiotico, per decidere se sospenderla o meno. Attualmente le conoscenze derivanti dalla medicina umana e le informazioni delle pubblicazioni nel cane alimentano la scelta di interrompere tutti i trattamenti antibiotici almeno una settimana prima del trapianto.

Non vi è, invece, alcuna evidenza che giustifichi l'interruzione di terapie immunosoppressive in corso al momento del FMT.

Se nel corso di tutto questo iter diagnostico non è stata trovata la causa del problema, è consigliabile effettuare un esame endoscopico con prelievi biotici della mucosa intestinale per esame istopatologico, per indagare la presenza e la natura di un'eventuale CE.

Per quanto riguarda l'età ideale del soggetto da selezionare per il FMT, l'unica indicazione è di scegliere cani che abbiano già completato lo svezzamento.

4.7.3 PREPARAZIONE DEL MATERIALE FECALE

Una volta raccolte in un contenitore o un sacchetto chiusi in maniera più ermetica possibile, le feci devono essere conservate refrigerate (3-5°C) o a temperatura ambiente, purché questa non sia superiore a 25°C; se fosse necessario conservarle per periodi prolungati, le feci possono essere congelate e tenute ad una temperatura di -20°C.

Per preparare il materiale da utilizzare per il trapianto, le feci vanno miscelate con soluzione salina 0,9% o, al limite, con acqua di rubinetto.

Non ci sono chiare indicazioni sulle quantità ideali di feci e di diluente da utilizzare per il cane; nell'uomo vengono generalmente usati 50 grammi di feci con un rapporto tra 1/3 e 1/5 grammi/millilitri di liquido.

La sospensione ottenuta dev'essere mescolata e filtrata.

Per la preparazione del materiale fecale da congelare, si può fare riferimento alle indicazioni in medicina umana: aggiungere alla miscela glicerolo ad una concentrazione finale del 10%. Il preparato viene poi già suddiviso nelle aliquote da somministrare singolarmente, congelato e conservato ad una temperatura di -80°C.

È consigliato utilizzare feci fresche entro 6 ore dalla raccolta e materiale congelato dopo 6 ore dallo scongelamento (da effettuare a bagnomaria a 37°C).

4.7.4 VIA DI SOMMINISTRAZIONE

In base alle informazioni disponibili in letteratura, le vie di somministrazione ritenute efficaci nel cane sono: enema rettale, capsule orali, endoscopia discendente.

Quando si esegue l'enema rettale, è bene spingersi quanto più prossimalmente possibile con il catetere all'interno del tratto gastro-enterico. Non è necessario eseguire un lavaggio intestinale di preparazione.

Nell'utilizzo dell'endoscopia discendente, è buona norma depositare il materiale fecale in più distretti intestinali.

Per evitare una fuoriuscita prematura del materiale trapiantato mediante enema o endoscopia, è utile tenere l'animale in decubito laterale nel periodo immediatamente successivo (indicativamente per 15-30 minuti).

Le capsule orali possono essere somministrate anche a casa dal proprietario, in associazione o meno al cibo.

4.7.5 QUANTITÀ E FREQUENZA DI SOMMINISTRAZIONE

Una buona scelta, per quanto riguarda la quantità di preparato da somministrare, sembra essere quella di utilizzare 10 millilitri di materiale per chilogrammo di peso del paziente.

Le capsule orali vengono generalmente somministrate 1 per volta, ad intervalli regolari e per un determinato periodo di tempo.

La scelta di effettuare somministrazioni successive alla prima potrebbe essere presa in seguito alla valutazione sull'efficacia del primo trattamento.

4.7.6 EFFETTI AVVERSI

Stando alle informazioni attualmente disponibili in letteratura, il trapianto di microbiota fecale nel cane sembra essere una procedura estremamente sicura e con scarsissima probabilità di insorgenza di effetti avversi.

4.7.7 MONITORAGGIO

È considerato indispensabile eseguire un monitoraggio di tipo clinico volto a valutare il miglioramento della sintomatologia gastro-enterica e della salute generale dell'animale; l'elemento probabilmente più importante da tenere in considerazione è la variazione della consistenza fecale.

L'analisi del microbiota fecale mediante qPCR o tecniche di sequenziamento, qualora ci sia la possibilità di eseguirla, è una pratica fortemente consigliata.

Nei casi in cui la patologia fosse provocata dall'azione di microrganismi enteropatogeni, è bene accertarsi della negativizzazione del soggetto in seguito al trattamento.

La tempistica ideale per un primo controllo in seguito al trapianto fecale (o il primo trapianto, nel caso di somministrazioni multiple) sembra essere 1 settimana dopo. La cadenza dei controlli successivi dipende dal tipo di monitoraggio effettuato e da eventuali peggioramenti della condizione clinica, ma non ci sono delle indicazioni generali.

Non è ancora possibile stabilire per quanto tempo sia necessario monitorare l'animale.

4.8 PROSPETTIVE FUTURE

In medicina umana sono già numerosi gli studi che valutano l'efficacia del trapianto di microbiota fecale sia verso patologie gastro-enteriche sia verso condizioni di altra natura ma associate a disbiosi intestinale. Inoltre, il FMT viene già utilizzato con delle precise linee guida per il trattamento di rCDI nell'uomo.

Questa tecnica, per quanto riguarda il cane, è entrata in uso per il trattamento di patologie gastro-enteriche solamente di recente e non ha ancora preso sufficientemente piede, probabilmente anche a causa della bassa quantità di studi presenti in letteratura. Tra le lacune da colmare, sono da sottolineare la mancanza di dati relativi all'efficacia a lungo termine, la bassa numerosità di soggetti arruolati in gran parte delle pubblicazioni e la mancanza di studi significativi di confronto tra differenti vie di somministrazione.

Un primo grande traguardo sarebbe quindi quello di compiere un maggior numero di studi dal disegno sperimentale più accurato e con un livello di evidenza scientifica superiore, in modo da poter stabilire delle linee guida che consentano un utilizzo più standardizzato del trapianto fecale nella pratica clinica.

Una volta stabilita la reale efficacia nei confronti dei disturbi gastro-intestinali acuti e cronici, si potrebbe studiare l'applicazione di questa tecnica anche a patologie di natura diversa: disturbi neurologici, malattie endocrine (ad esempio il diabete mellito), sindrome metabolica e obesità, campi di applicazione per i quali esistono già degli studi in medicina umana.

Inoltre, nell'uomo sono già stati evidenziati dei risultati positivi mediante l'utilizzo di capsule orali contenenti materiale fecale liofilizzato (Reigadas et al., 2020). Questa formulazione potrebbe unire la semplicità di utilizzo delle capsule orali ad una maggior facilità di conservazione rispetto al materiale congelato.

È quindi auspicabile che in futuro vengano eseguiti degli studi per valutare l'efficacia di materiale liofilizzato anche nel cane, in quanto porterebbe sicuramente dei notevoli vantaggi gestionali nell'utilizzo del FMT. La maggior semplicità di somministrazione potrebbe anche ridurre le difficoltà nel pianificare trattamenti multipli rispetto alle metodiche più invasive.

La naturale evoluzione del trapianto di microbiota fecale nel tempo potrebbe essere una somministrazione di purificati batterici o addirittura solo di composti di derivazione microbica (D'Haens e Jobin, 2019). Queste nuove opzioni terapeutiche permetterebbero di ridurre al minimo

i rischi legati alla trasmissione di patologie infettive o parassitarie da parte dei soggetti donatori. Prima di arrivare a questo punto saranno però necessarie molte indagini scientifiche volte ad analizzare a fondo quali siano le specie batteriche o i prodotti alterati durante lo sviluppo delle malattie gastro-enteriche o quali microrganismi o molecole possano avere maggiori effetti terapeutici.

5. CONCLUSIONI

Il trapianto di microbiota fecale è una pratica terapeutica volta a ristabilire l'equilibrio del microbiota intestinale mediante il trasferimento di materiale fecale di soggetti sani nel tratto gastro-enterico di soggetti con disbiosi intestinale.

In medicina umana, ad oggi viene utilizzato come terapia per l'infezione ricorrente da *Cl. difficile*, ma sono in studio molti altri campi di applicazione (disordini neurologici, metabolici o endocrini).

Nella clinica del cane, questo tipo di trattamento è ancora agli esordi e la letteratura scientifica è abbastanza povera di studi. Questo purtroppo limita la possibilità dei medici veterinari di proporlo come alternativa a protocolli terapeutici standard che possiedano già un'efficacia sufficientemente testata.

Nonostante ciò, le informazioni derivanti dalla medicina umana e quelle ottenute finora nel cane consentono di affermare che il trapianto fecale sia un'opzione terapeutica promettente nei confronti di patologie gastro-enteriche acute e croniche. Le maggiori evidenze di efficacia sono state riscontrate in caso di diarrea persistente da meno di 14 giorni e di diarrea cronica dovuta ad enteropatogeni (nello specifico *Cl. perfringens* e *Cl. difficile*); in cani con IBD idiopatica, ARE e AHDS da parvovirus si sono registrati esiti positivi, ma di non semplice interpretazione a causa delle caratteristiche degli studi.

Oltre all'efficacia, i veri punti di forza di questa pratica consistono nell'estrema sicurezza in termini di possibili effetti avversi e nel fatto di rappresentare una valida alternativa agli antibiotici, che vengono ancora troppo spesso utilizzati nei cani affetti da diarrea acuta o cronica. Quest'ultimo punto è particolarmente importante, perché il trapianto fecale potrebbe diventare un'ulteriore "arma" per limitare il fenomeno dell'antimicrobico-resistenza.

Gli studi pubblicati sul FMT nel cane, purtroppo, consentono di delineare solamente delle linee guida parziali: le indicazioni più dettagliate si hanno per quanto riguarda i criteri di selezione del donatore e del ricevente, mentre sono carenti le indicazioni inerenti alla preparazione del materiale fecale, la scelta della via di somministrazione e la frequenza di monitoraggio in seguito al trattamento.

In conclusione, sebbene gli aspetti da studiare siano ancora molti, il trapianto di microbiota fecale possiede la potenzialità di apportare un notevole contributo alla gestione di pazienti canini con

malattia gastro-intestinale e, quindi, l'aspettativa è che nei prossimi anni diventi una metodica sempre più studiata ed affermata e che ne venga semplificata ulteriormente l'esecuzione.

6. BIBLIOGRAFIA

- Akondi, K. B., Lakshmi, V. V. (2013). Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 17(2), 61–70. <https://doi.org/10.1089/omi.2012.0082>
- Alang, N., Kelly, C. R. (2015). Weight gain after fecal microbiota transplantation, 2(September), 2633851. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv00>
- Alexander, C., Cross, T. W. L., Devendran, S., Neumer, F., Theis, S., Ridlon, J. M., ... Swanson, K. S. (2018). Effects of prebiotic inulin-type fructans on blood metabolite and hormone concentrations and faecal microbiota and metabolites in overweight dogs. *British Journal of Nutrition*, 120(6), 711–720. <https://doi.org/10.1017/S0007114518001952>
- Allegretti, J. R., Fischer, M., Sagi, S. V., Bohm, M. E., Fadda, H. M., Ranmal, S. R., ... Kassam, Z. (2019). Fecal Microbiota Transplantation Capsules with Targeted Colonic Versus Gastric Delivery in Recurrent Clostridium difficile Infection: A Comparative Cohort Analysis of High and Lose Dose. *Digestive Diseases and Sciences*, 64(6), 1672–1678. <https://doi.org/10.1007/s10620-018-5396-6>
- Allegretti, J. R., Kassam, Z., Carrellas, M., Mullish, B. H., Marchesi, J. R., Pechlivanis, A., ... Korzenik, J. R. (2019). Fecal Microbiota Transplantation in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis: A Pilot Clinical Trial. *American Journal of Gastroenterology*, 114(7), 1071–1079. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000115>
- Allenspach, K., Culverwell, C., Chan, D. (2016). Long-term outcome in dogs with chronic enteropathies: 203 cases. *Veterinary Record*, 178(15), 368. <https://doi.org/10.1136/vr.103557>
- Allenspach, K., House, A., Smith, K., McNeill, F. M., Hendricks, A., Elson-Riggins, J., ... Suchodolski, J. S. (2010). Evaluation of mucosal bacteria and histopathology, clinical disease activity and expression of Toll-like receptors in German shepherd dogs with chronic enteropathies. *Veterinary Microbiology*, 146(3–4), 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.025>
- Allenspach, K., Wieland, B., Gröne, A., Gaschen, F. (2007). Chronic enteropathies in dogs: Evaluation of risk factors for negative outcome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(4), 700–708. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21\[700:CEIDEO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[700:CEIDEO]2.0.CO;2)

- AlShawaqfeh, M. K., Wajid, B., Minamoto, Y., Markel, M., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., ... Suchodolski, J. S. (2017). A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(11), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix136>
- Antushevich, H. (2020). Fecal microbiota transplantation in disease therapy. *Clinica Chimica Acta*, *503*(December 2019), 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.12.010>
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., ... Jun, W. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host and Microbe*, *17*(5), 690–703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Blake, A. B., Guard, B. C., Honneffer, J. B., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. (2019). Altered microbiota, fecal lactate, and fecal bile acids in dogs with gastrointestinal disease. *PLoS ONE*, *14*(10), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224454>
- Blake, A. B., Suchodolski, J. S. (2016). Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. *Animal Frontiers*, *6*(3), 37–42. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0032>
- Borody, T. J., Eslick, G. D., Clancy, R. L. (2019). Fecal microbiota transplantation as a new therapy: from *Clostridioides difficile* infection to inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, and colon cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, *49*, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.04.017>
- Bottero, E., Benvenuti, E., Ruggiero, P. (2017). Trapianto del microbiota fecale (FMT) in 16 cani affetti da IBD idiopatica. *Veterinaria*, *31*(1), 31–45.
- Brandt, L. J., Aroniadis, O. C., Mellow, M., Kanatzar, A., Kelly, C., Park, T., ... Surawicz, C. (2012). Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *clostridium difficile* infection. *American Journal of Gastroenterology*, *107*(7), 1079–1087. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.60>
- Bresciani, F., Minamoto, Y., Suchodolski, J. S., Galiazzo, G., Vecchiato, C. G., Pinna, C., ... Pietra, M. (2018). Effect of an extruded animal protein-free diet on fecal microbiota of dogs with food-responsive enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *32*(6), 1903–1910. <https://doi.org/10.1111/jvim.15227>

- Browne, H. P., Forster, S. C., Anonye, B. O., Kumar, N., Neville, B. A., Stares, M. D., ... Lawley, T. D. (2016). Culturing of «unculturable» human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*, 533(7604), 543–546. <https://doi.org/10.1038/nature17645>
- Bunnik, E. M., Aarts, N., Chen, L. A. (2017). Physicians Must Discuss Potential Long-Term Risks of Fecal Microbiota Transplantation to Ensure Informed Consent. *American Journal of Bioethics*, 17(5), 61–63. <https://doi.org/10.1080/15265161.2017.1299816>
- Burchell, R. K., Pazzi, P., Gedeye, K., Midwinter, A. C., Gal, A. (2018). Faecal microbial transplantation in a canine model of haemorrhagic diarrhoea syndrome [abstract]. *ACVIM Forum reasearch abstract program*, 1026–1027.
- Burrello, C., Giuffrè, M. R., Macandog, A. D., Diaz-Basabe, A., Cribiù, F. M., Lopez, G., ... Facciotti, F. (2019). Fecal Microbiota Transplantation Controls Murine Chronic Intestinal Inflammation by Modulating Immune Cell Functions and Gut Microbiota Composition. *Cells*, 8(6), 517. <https://doi.org/10.3390/cells8060517>
- Burton, E. N., O'Connor, E., Ericsson, A. C., Franklin, C. L. (2016). Evaluation of fecal microbiota transfer as treatment for postweaning diarrhea in research-colony puppies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 55(5), 582–587.
- Cammarota, G., Masucci, L., Ianiro, G., Bibbò, S., Dinoi, G., Costamagna, G., ... Gasbarrini, A. (2015). Randomised clinical trial: Faecal microbiota transplantation by colonoscopy vs. vancomycin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 41(9), 835–843. <https://doi.org/10.1111/apt.13144>
- Cammarota, Giovanni, Ianiro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., ... Gasbarrini, A. (2017). European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*, 66(4), 569–580. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313017>
- Canibe, N., O'Dea, M., Abraham, S. (2019). Potential relevance of pig gut content transplantation for production and research. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0363-4>
- Cavett, C. L., Toner, M., Marks, S. L., Winston, J. A., Gilor, C. (2020). Consistency of faecal scoring using two canine faecal scoring systems. *Journal of Small Animal Practice*, 1–7.

<https://doi.org/10.1111/jsap.13283>

Chaitman, J., Gaschen, F. (2020). Fecal Microbiota Transplantation in Dogs. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 51(1), 219–233. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.09.012>

Chaitman, J., Guard, B. C., Sarwar, F., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. (2017). Fecal microbial transplantation decreases the dysbiosis index in dogs presenting with chronic diarrhea [abstract]. *ACVIM Forum reasearch abstract program*, 01(2), 1–7. Recuperato da <http://www.albayan.ae>

Chaitman, J., Jergens, A., Gaschen, F., Garcia-Mazcorro, J. F., Marks, S., Marroquin-Cardona, A., ... Weese, S. (2016). Commentary on key aspects of fecal microbiota transplantation in small animal practice. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 71. <https://doi.org/10.2147/vmrr.s105238>

Chaitman, J., Ziese, A. L., Pilla, R., Minamoto, Y., Blake, A. B., Guard, B. C., ... Suchodolski, J. S. (2020). Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00192>

Cheng, C. S., Wei, H. K., Wang, P., Yu, H. C., Zhang, X. M., Jiang, S. W., Peng, J. (2019). Early intervention with faecal microbiota transplantation: An effective means to improve growth performance and the intestinal development of suckling piglets. *Animal*, 13(3), 533–541. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001611>

Clooten, J., Kruth, S., Arroyo, L., Weese, J. S. (2008). Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Veterinary Microbiology*, 129(1–2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.013>

Craig, J. M. (2019). Food intolerance in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, 60(2), 77–85. <https://doi.org/10.1111/jsap.12959>

Craven, M., Simpson, J. W., Ridyard, A. E., Chandler, M. L. (2004). Canine inflammatory bowel disease: Retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995-2002). *Journal of Small Animal Practice*, 45(7), 336–342. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2004.tb00245.x>

- D'Haens, G. R., Jobin, C. (2019). Fecal Microbial Transplantation for Diseases Beyond Recurrent Clostridium Difficile Infection. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.04.053>
- Dailey, F. E., Turse, E. P., Daglilar, E., Tahan, V. (2019). The dirty aspects of fecal microbiota transplantation: a review of its adverse effects and complications. *Current Opinion in Pharmacology*, 49, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.04.008>
- Dandrieux, J. R. S. (2016). Inflammatory bowel disease versus chronic enteropathy in dogs: are they one and the same? *Journal of Small Animal Practice*, 57(11), 589–599. <https://doi.org/10.1111/jsap.12588>
- Davidovics, Z. H., Vance, K., Etienne, N., Hyams, J. S. (2017). Fecal Transplantation Successfully Treats Recurrent D-Lactic Acidosis in a Child with Short Bowel Syndrome. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 41(5), 896–897. <https://doi.org/10.1177/0148607115619931>
- Day, M. J., Horzinek, M. C., Schultz, R. D., Squires, R. A. (2016). WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, 48(9), 483. https://doi.org/10.1111/jsap.2_12431
- De Clercq, N. C., Frissen, M. N., Davids, M., Groen, A. K., Nieuwdorp, M. (2019). Weight Gain after Fecal Microbiota Transplantation in a Patient with Recurrent Underweight following Clinical Recovery from Anorexia Nervosa. *Psychotherapy and Psychosomatics*, 88(1), 52–54. <https://doi.org/10.1159/000495044>
- De Vadder, F., Grasset, E., Holm, L. M., Karsenty, G., Macpherson, A. J., Olofsson, L. E., Bäckhed, F. (2018). Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(25), 6458–6463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720017115>
- Debast, S. B., Bauer, M. P., Kuijper, E. J., Allerberger, F., Bouza, E., Coia, J. E., ... Widmer, A. F. (2014). European society of clinical microbiology and infectious diseases: Update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(S2), 1–26. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12418>
- DeFilipp, Z., Bloom, P. P., Torres Soto, M., Mansour, M. K., Sater, M. R. A., Huntley, M. H., ... Hohmann, E. L. (2019). Drug-Resistant E. coli Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota

Transplant . *New England Journal of Medicine*, 381(21), 2043–2050.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1910437>

Deng, P., Swanson, K. S. (2015). Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *The British journal of nutrition*, 113, S6–S17.
<https://doi.org/10.1017/S0007114514002943>

DePeters, E. J., George, L. W. (2014). Rumen transfaunation. *Immunology Letters*, 162(2), 69–76.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.05.009>

Ding, X., Li, Q., Li, P., Zhang, T., Cui, B., Ji, G., ... Zhang, F. (2019). Long-Term Safety and Efficacy of Fecal Microbiota Transplant in Active Ulcerative Colitis. *Drug Safety*, 42(7), 869–880.
<https://doi.org/10.1007/s40264-019-00809-2>

Donaldson, G. P., Lee, S. M., Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>

Duboc, H., Rajca, S., Rainteau, D., Benarous, D., Maubert, M. A., Quervain, E., ... Seksik, P. (2013). Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut*, 62(4), 531–539. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302578>

Dwyer, E. L., Margaux, M., Suchodolski, J. S., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., Mendoza, K., ... Gaschen, F. (2019). Effect of Fecal Microbiota Transplantation On The Fecal Microbiome Of Healthy Dogs Treated With Antibiotics [abstract]. *ACVIM Forum reasearch abstract program*, 88918.

Ekmekciu, I., von Klitzing, E., Fiebiger, U., Escher, U., Neumann, C., Bacher, P., ... Heimesaat, M. M. (2017). Immune responses to broad-spectrum antibiotic treatment and fecal microbiota transplantation in mice. *Frontiers in Immunology*, 8(APR).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00397>

Ewaschuk, J. B., Naylor, J. M., Zello, G. A. (2005). D-Lactate in Human and Ruminant Metabolism. *J. Nutr*, 135(February 2005), 1619–1625. <https://doi.org/10.1093/jn/135.7.1619>

Feary, D. J., Hassel, D. M. (2006). Enteritis and Colitis in Horses. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 22(2), 437–479. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.03.008>

Francino, M. P. (2016). Antibiotics and the human gut microbiome: Dysbioses and accumulation of

resistances. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01543>

Fuller, B. J. (2004). Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo-Letters*. Recuperato da <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15660165/>

Garcia-Mazcorro, J. F., Suchodolski, J. S., Jones, K. R., Clark-Price, S. C., Dowd, S. E., Minamoto, Y., ... Dossin, O. (2012). Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(3), 624–636.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01331.x>

García-Peña, C., Álvarez-Cisneros, T., Quiroz-Baez, R., Friedland, R. P. (2017). Microbiota and Aging. A Review and Commentary. *Archives of Medical Research*, 48(8), 681–689.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.11.005>

Geng, S., Cheng, S., Li, Y., Wen, Z., Ma, X., Jiang, X., ... Han, X. (2018). Faecal Microbiota Transplantation Reduces Susceptibility to Epithelial Injury and Modulates Tryptophan Metabolism of the Microbial Community in a Piglet Model. *Journal of Crohn's & colitis*, 12(11), 1359–1374. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy103>

Gerbec, Z. (2016). *Evaluation of therapeutic potential of restoring gastrointestinal homeostasis by a fecal microbiota transplant in dogs. MS Thesis.*

German, A. J., Day, M. J., Ruaux, C. G., Steiner, J. M., Williams, D. A., Hall, E. J. (2003). Comparison of Direct and Indirect Tests for Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Antibiotic-Responsive Diarrhea in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(1), 33–43.
[https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2003\)017<0033:CODAIT>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2003)017<0033:CODAIT>2.3.CO;2)

Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Treuren, W. Van, Ren, B., ... Xavier, R. J. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*, 15(3), 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.005>

Ghaisas, S., Maher, J., Kanthasamy, A. (2016). Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. *Pharmacology and Therapeutics*, 158, 52–62.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.11.012>

- Giaretta, P. R., Rech, R. R., Guard, B. C., Blake, A. B., Blick, A. K., Steiner, J. M., ... Suchodolski, J. S. (2018). Comparison of intestinal expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter between dogs with and without chronic inflammatory enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(6), 1918–1926. <https://doi.org/10.1111/jvim.15332>
- Giaretta, P. R., Suchodolski, J. S., Jergens, A. E., Steiner, J. M., Lidbury, J. A., Cook, A. K., ... Rech, R. R. (2020). Bacterial Biogeography of the Colon in Dogs With Chronic Inflammatory Enteropathy. *Veterinary Pathology*, 57(2), 258–265. <https://doi.org/10.1177/0300985819891259>
- Gough, E., Shaikh, H., Manges, A. R. (2011). Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent clostridium difficile infection. *Clinical Infectious Diseases*, 53(10), 994–1002. <https://doi.org/10.1093/cid/cir632>
- Grellet, A., Feugier, A., Chastant-Maillard, S., Carrez, B., Boucraut-Baralon, C., Casseleux, G., Grandjean, D. (2012). Validation of a fecal scoring scale in puppies during the weaning period. *Preventive Veterinary Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.03.012>
- Gu, S., Chen, D., Zhang, J. N., Lv, X., Wang, K., Duan, L. P., ... Wu, X. L. (2013). Bacterial Community Mapping of the Mouse Gastrointestinal Tract. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074957>
- Guard, B. C., Barr, J. W., Reddivari, L., Klemashevich, C., Jayaraman, A., Steiner, J. M., ... Suchodolski, J. S. (2015). Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PLoS ONE*, 10(5), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127259>
- Guard, B. C., Honneffer, J. B., Jergens, A. E., Jonika, M. M., Toresson, L., Lawrence, Y. A., ... Suchodolski, J. S. (2019). Longitudinal assessment of microbial dysbiosis, fecal unconjugated bile acid concentrations, and disease activity in dogs with steroid-responsive chronic inflammatory enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(3), 1295–1305. <https://doi.org/10.1111/jvim.15493>
- Hand, D., Wallis, C., Colyer, A., Penn, C. W. (2013). Pyrosequencing the Canine Faecal Microbiota: Breadth and Depth of Biodiversity. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053115>
- Haro, C., Rangel-Zúñiga, O. A., Alcalá-Díaz, J. F., Gómez-Delgado, F., Pérez-Martínez, P., Delgado-

- Lista, J., ... Camargo, A. (2016). Intestinal microbiota is influenced by gender and body mass index. *PLoS ONE*, *11*(5), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154090>
- Hert, D. G., Fredlake, C. P., Barron, A. E. (2008). Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: A Comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis*, *29*(23), 4618–4626. <https://doi.org/10.1002/elps.200800456>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *11*(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Honneffer, J. B., Steiner, J. M., Lidbury, J. A., Suchodolski, J. S. (2017). Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics*, *13*(3), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1165-3>
- Hu, J., Ma, L., Nie, Y., Chen, J., Zheng, W., Wang, X., ... Yan, X. (2018). A Microbiota-Derived Bacteriocin Targets the Host to Confer Diarrhea Resistance in Early-Weaned Piglets. *Cell Host and Microbe*, *24*(6), 817-832.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.006>
- Hu, L., Geng, S., Li, Y., Cheng, S., Fu, X., Yue, X., Han, X. (2018). Exogenous fecal microbiota transplantation from local adult pigs to crossbred newborn piglets. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JAN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02663>
- Hussain, I., Sharma, R. K., Borah, P., Rajkhowa, S., Hussain, I., Barkalita, L. M., ... Saikia, G. K. (2015). Isolation and characterization of *Clostridium difficile* from pet dogs in Assam, India. *Anaerobe*, *36*, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.09.006>
- Hutchison, C. A. (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research*, *35*(18), 6227–6237. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm688>
- Isaiah, A., Parambeth, J. C., Steiner, J. M., Lidbury, J. A., Suchodolski, J. S. (2017). The fecal microbiome of dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *Anaerobe*, *45*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.02.010>
- Jeffery, N. D., Barker, A. K., Alcott, C. J., Levine, J. M., Meren, I., Wengert, J., ... Suchodolski, J. S. (2017). The association of specific constituents of the fecal microbiota with immune-mediated

- brain disease in dogs. *PLoS ONE*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170589>
- Jergens, A. E., Schreiner, C. A., Frank, D. E., Niyo, Y., Ahrens, F. E., Eckersall, P. D., ... Evans, R. (2003). A Scoring Index for Disease Activity in Canine Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(3), 291–297. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2003\)017<0291:ASIFDA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2003)017<0291:ASIFDA>2.3.CO;2)
- Joffe, D. J., Schlesinger, D. P. (2002). Preliminary assessment of the risk of Salmonella infection in dogs fed raw chicken diets. *Canadian Veterinary Journal*, 43(6), 441–442.
- Johnsen, P. H., Hilpüsch, F., Cavanagh, J. P., Leikanger, I. S., Kolstad, C., Valle, P. C., Goll, R. (2017). Faecal microbiota transplantation versus placebo for moderate-to-severe irritable bowel syndrome: a double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, single-centre trial. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 3(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30338-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30338-2)
- Jugan, M., Rudinsky, A. J., Parker, V. J., Gilor, C. (2017). Use of probiotics in small animal veterinary medicine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 250(5), 24–28. <https://doi.org/10.2460/javma.250.5.519>
- Kalenyak, K., Isaiah, A., Heilmann, R. M., Suchodolski, J. S., Burgener, I. A. (2018). Comparison of the intestinal mucosal microbiota in dogs diagnosed with idiopathic inflammatory bowel disease and dogs with food-responsive diarrhea before and after treatment. *FEMS microbiology ecology*, 94(2), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix173>
- Kang, D. W., Adams, J. B., Coleman, D. M., Pollard, E. L., Maldonado, J., McDonough-Means, S., ... Krajmalnik-Brown, R. (2019). Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42183-0>
- Kang, D. W., Adams, J. B., Gregory, A. C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., ... Krajmalnik-Brown, R. (2017). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: An open-label study. *Microbiome*, 5(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0225-7>
- Kathrani, A., Werling, D., Allenspach, K. (2011). Canine breeds at high risk of developing

inflammatory bowel disease in the South-Eastern UK. *Veterinary Record*, 169(24), 635. <https://doi.org/10.1136/vr.d5380>

Kelly, C. R., Ihunnah, C., Fischer, M., Khoruts, A., Surawicz, C. (2014). Fecal microbiota transplant for treatment of *Clostridium difficile* infection in immunocompromised patients. *American Journal of Gastroenterology*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.133>

Kootte, R. S., Levin, E., Salojärvi, J., Smits, L. P., Hartstra, A. V., Udayappan, S. D., ... Nieuwdorp, M. (2017). Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metabolism*, 26(4), 611-619.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.008>

Kulecka, M., Paziewska, A., Zeber-Lubecka, N., Ambrozkiwicz, F., Kopczynski, M., Kuklinska, U., ... Ostrowski, J. (2016). Prolonged transfer of feces from the lean mice modulates gut microbiota in obese mice. *Nutrition and Metabolism*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0116-8>

Kumar, A., Vlasova, A. N., Deblais, L., Huang, H. C., Wijeratne, A., Kandasamy, S., ... Rajashekara, G. (2018). Impact of nutrition and rotavirus infection on the infant gut microbiota in a humanized pig model. *BMC Gastroenterology*, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12876-018-0810-2>

Lai, Z. L., Tseng, C. H., Ho, H. J., Cheung, C. K. Y., Lin, J. Y., Chen, Y. J., ... Wu, C. Y. (2018). Fecal microbiota transplantation confers beneficial metabolic effects of diet and exercise on diet-induced obese mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33893-y>

Lee, C. H., Steiner, T., Petrof, E. O., Smieja, M., Roscoe, D., Nematallah, A., ... Kim, P. T. (2016). Frozen vs fresh fecal microbiota transplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent *clostridium difficile* infection a randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 315(2), 142–149. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.18098>

Lefebvre, S. L., Reid-smith, R. J., Waltner-toews, D., Weese, S. (2009). Incidence of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, and other health-care-associated pathogens by dogs that participate in animal-assisted interventions. *Javma*, 234(11), 1404–1417. <https://doi.org/10.2460/javma.234.11.1404>

- Leipig-Rudolph, M., Busch, K., Prescott, J. F., Mehdizadeh Gohari, I., Leutenegger, C. M., Hermanns, W., ... Unterer, S. (2018). Intestinal lesions in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome associated with netF-positive *Clostridium perfringens* type A. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30(4), 495–503. <https://doi.org/10.1177/1040638718766983>
- Li, Y. T., Cai, H. F., Wang, Z. H., Xu, J., Fang, J. Y. (2016). Systematic review with meta-analysis: Long-term outcomes of faecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 43(4), 445–457. <https://doi.org/10.1111/apt.13492>
- Liao, C. H., Shollenberger, L. M. (2003). Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology*, 37(1), 45–50. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01345.x>
- Liu, S. Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 83(2), 115–131. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00366-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00366-5)
- Luo, Yuanyuan, Zeng, B., Zeng, L., Du, X., Li, B., Huo, R., ... Xie, P. (2018). Gut microbiota regulates mouse behaviors through glucocorticoid receptor pathway genes in the hippocampus. *Translational Psychiatry*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0240-5>
- Luo, Yuying, Lucas, A. L., Grinspan, A. M. (2020). Fecal Transplants by Colonoscopy and Capsules Are Cost-Effective Strategies for Treating Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. *Digestive Diseases and Sciences*, 65(4), 1125–1133. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05821-1>
- Lynch, S. M., Mu, J., Grady, J. J., Stevens, R. G., Devers, T. J. (2019). Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridium difficile* Infection: A One-Center Experience. *Digestive Diseases*, 37(6), 467–472. <https://doi.org/10.1159/000499873>
- Manchester, A. C., Hill, S., Sabatino, B., Armentano, R., Carroll, M., Kessler, B., ... Simpson, K. W. (2013). Association between Granulomatous Colitis in French Bulldogs and Invasive *Escherichia coli* and Response to Fluoroquinolone Antimicrobials. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1111/jvim.12020>
- Marchesi, M. C., Timpano, C. C., Busechian, S., Pieramati, C., Rueca, F. (2017). The role of diet in

managing inflammatory bowel disease affected dogs: A retrospective cohort study on 76 cases. *Veterinaria Italiana*, 53(4), 297–302. <https://doi.org/10.12834/VetIt.566.2700.1>

Maseda, D., Ricciotti, E. (2020). NSAID–Gut Microbiota Interactions. *Frontiers in Pharmacology*, 11(August), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01153>

Mattila, E., Uusitalo-Seppälä, R., Wuorela, M., Lehtola, L., Nurmi, H., Ristikankare, M., ... Arkkila, P. (2012). Fecal transplantation, through colonoscopy, is effective therapy for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterology*, 142(3), 490–496. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.037>

McCormack, U. M., Curião, T., Metzler-Zebeli, B. U., Wilkinson, T., Reyer, H., Crispie, F., ... Lawlor, P. G. (2019). Improvement of Feed Efficiency in Pigs through Microbial Modulation via Fecal Microbiota Transplantation in Sows and Dietary Supplementation of Inulin in Offspring. *Applied and environmental microbiology*, 85(22), 1–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01255-19>

McKinney, C. A., Oliveira, B. C. M., Bedenice, D., Paradis, M. R., Mazan, M., Sage, S., ... Widmer, G. (2020). The fecal microbiota of healthy donor horses and geriatric recipients undergoing fecal microbial transplantation for the treatment of diarrhea. *PLoS ONE*, 15(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230148>

Mentula, S., Harmoinen, J., Heikkilä, M., Westermarck, E., Rautio, M., Huovinen, P., Könönen, E. (2005). Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in beagle dogs. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4169–4175. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4169-4175.2005>

Metzler-Zebeli, B. U., Siegerstetter, S. C., Magowan, E., Lawlor, P. G., O'Connell, N. E., Zebeli, Q. (2019). Fecal microbiota transplant from highly feed efficient donors affects cecal physiology and microbiota in low- And high-feed efficient chickens. *Frontiers in Microbiology*, 10(JULY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01576>

Middelbos, I. S., Boler, B. M. V., Qu, A., White, B. A., Swanson, K. S., Fahey, G. C. (2010). Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. *PLoS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>

- Minamoto, Y., Dhanani, N., Markel, M. E., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. (2014). Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 174(3–4), 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.10.005>
- Minamoto, Y., Minamoto, T., Isaiah, A., Sattasathuchana, P., Buono, A., Rangachari, V. R., ... Suchodolski, J. S. (2019). Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(4), 1608–1618. <https://doi.org/10.1111/jvim.15520>
- Minamoto, Y., Otoni, C. C., Steelman, S. M., Büyükleblebici, O., Steiner, J. M., Jergens, A. E., Suchodolski, J. S. (2015). Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, 6(1), 33–47. <https://doi.org/10.1080/19490976.2014.997612>
- Moayyedi, P., Surette, M. G., Kim, P. T., Libertucci, J., Wolfe, M., Onischi, C., ... Lee, C. H. (2015). Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology*, 149(1), 102–109.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.001>
- Mondo, E., Marliani, G., Accorsi, P. A., Cocchi, M., Di Leone, A. (2019). Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. *Open Veterinary Journal*, 9(3), 253–258. <https://doi.org/10.4314/ovj.v9i3.10>
- Moter, A., Göbel, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41(2), 85–112. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00152-4)
- Mullen, K. R., Yasuda, K., Divers, T. J., Weese, J. S. (2018). Equine faecal microbiota transplant: Current knowledge, proposed guidelines and future directions. *Equine Veterinary Education*, 30(3), 151–160. <https://doi.org/10.1111/eve.12559>
- Murphy, T., Chaitman, J., Han, E. (2014). Use of fecal transplant in eight dogs with refractory *Clostridium perfringens* associated diarrhea [abstract]. *ACVIM Forum research abstract program*, 2014(June), 1–2. Recuperato da <https://repositories.lib.utexas.edu/handle/2152/39127%0Ahttps://cris.brighton.ac.uk/ws/po>

rtalfiles/portal/4755978/Julius+Ojebode%27s+Thesis.pdf%0Ausir.salford.ac.uk/29369/1/Angela_Darvill_thesis_esubmission.pdf%0Ahttps://dspace.lboro.ac.uk/dspace-jspui/ha

- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of Polymerase Chain Reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology Microbiology*, 59(3), 695–700.
- Myint, H., Iwahashi, Y., Koike, S., Kobayashi, Y. (2017). Effect of soybean husk supplementation on the fecal fermentation metabolites and microbiota of dogs. *Animal Science Journal*, 88(11), 1730–1736. <https://doi.org/10.1111/asj.12817>
- Nicholson, J. K., Lindon, J. C. (2008). *Metabonomics*, 455(October), 1054–1056.
- Niederwerder, M. C., Constance, L. A., Rowland, R. R. R., Abbas, W., Fernando, S. C., Potter, M. L., ... Cino-Ozuna, A. G. (2018). Fecal microbiota transplantation is associated with reduced morbidity and mortality in porcine circovirus associated disease. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01631>
- Niina, A., Kibe, R., Suzuki, R., Yuchi, Y., Teshima, T., Matsumoto, H., ... Koyama, H. (2019). <p>Improvement in Clinical Symptoms and Fecal Microbiome After Fecal Microbiota Transplantation in a Dog with Inflammatory Bowel Disease</p>. *Veterinary Medicine: Research and Reports, Volume 10*, 197–201. <https://doi.org/10.2147/vmrr.s230862>
- Nurmi, E., Rantala, M. (1973). New Aspects of Salmonella Infection in Broiler Production. *Nature*, 241(1971), 1972–1973. <https://doi.org/10.1038/241210a0>
- Orden, C., Blanco, J. L., Álvarez-Pérez, S., Garcia, M. E., Blanco, J. L., Garcia-Sancho, M., ... Kuijper, E. (2017). Isolation of Clostridium difficile from dogs with digestive disorders, including stable metronidazole-resistant strains. *Anaerobe*, 43(April 2012), 78–81. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.12.008>
- Panasevich, M. R., Kerr, K. R., Dilger, R. N., Fahey, G. C., Guérin-Deremaux, L., Lynch, G. L., ... Swanson, K. S. (2015). Modulation of the faecal microbiome of healthy adult dogs by inclusion of potato fibre in the diet. *British Journal of Nutrition*, 113(1), 125–133. <https://doi.org/10.1017/S0007114514003274>

- Pang, X., Hua, X., Yang, Q., Ding, D., Che, C., Cui, L., ... Zhao, L. (2007). Inter-species transplantation of gut microbiota from human to pigs. *ISME Journal*, 1(2), 156–162. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.23>
- Park, J. S., Guevarra, R. B., Kim, B. R., Lee, J. H., Lee, S. H., Cho, J. H., ... Kim, H. B. (2019). Intestinal microbial dysbiosis in beagles naturally infected with canine parvovirus. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1391–1400. <https://doi.org/10.4014/jmb.1901.01047>
- Patra, A. K. (2011). Responses of feeding prebiotics on nutrient digestibility, faecal microbiota composition and short-chain fatty acid concentrations in dogs: a meta-analysis. *Animal*, 5(11), 1743–1750. <https://doi.org/10.1017/S1751731111000887>
- Pereira, G. Q., Gomes, L. A., Santos, I. S., Alfieri, A. F., Weese, J. S., Costa, M. C. (2018). Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(2), 707–711. <https://doi.org/10.1111/jvim.15072>
- Pettersson, E., Lundeberg, J., Ahmadian, A. (2009). Generations of sequencing technologies. *Genomics*, 93(2), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.10.003>
- Philips, C. A., Augustine, P., Phadke, N. (2018). Healthy donor fecal microbiota transplantation for recurrent bacterial cholangitis in primary sclerosing cholangitis – a single case report. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 6(4), 438–441. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2018.00033>
- Pilla, R., Guard, B. C., Steiner, J. M., Gaschen, F. P., Olson, E., Werling, D., ... Suchodolski, J. S. (2019). Administration of a synbiotic containing enterococcus faecium does not significantly alter fecal microbiota richness or diversity in dogs with and without food-responsive chronic enteropathy. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00277>
- Pilla, R., Suchodolski, J. S. (2020). The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00498>
- Prado, C., Michels, M., Ávila, P., Burger, H., Milioli, M. V. M., Dal-Pizzol, F. (2019). The protective effects of fecal microbiota transplantation in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*, 54(8), 1578–1583.

<https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2018.10.045>

- Quraishi, M. N., Widlak, M., Bhala, N., Moore, D., Price, M., Sharma, N., Iqbal, T. H. (2017). Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 46(5), 479–493. <https://doi.org/10.1111/apt.14201>
- Rabold, D., Espelage, W., Sin, M. A., Eckmanns, T., Schneeberg, A., Neubauer, H., ... Lübke-Becker, A. (2018). The zoonotic potential of *Clostridium difficile* from small companion animals and their owners. *PLoS ONE*, 13(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193411>
- Rager, K. D., George, L. W., House, J. K., Depeters, E. J. (2004). Evaluation of rumen transfaunation after surgical correction of left-sided displacement of the abomasum in cows, 225(6). <https://doi.org/10.2460/javma.2004.225.915>
- Ramai, D., Zakhia, K., Fields, P. J., Ofosu, A., Patel, G., Shahnazarian, V., ... Chang, S. (2020). Fecal Microbiota Transplantation (FMT) with Colonoscopy Is Superior to Enema and Nasogastric Tube While Comparable to Capsule for the Treatment of Recurrent *Clostridioides difficile* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Digestive Diseases and Sciences*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06185-7>
- Redfern, A., Suchodolski, J., Jergens, A. (2017). Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease. *Veterinary Record*, 181(14). <https://doi.org/10.1136/vr.103826>
- Reese, A. T., Cho, E. H., Klitzman, B., Nichols, S. P., Wisniewski, N. A., Villa, M. M., ... David, L. A. (2018). Antibiotic-induced changes in the microbiota disrupt redox dynamics in the gut. *eLife*, 7, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.35987>
- Reigadas, E., Bouza, E., Olmedo, M., Vázquez-Cuesta, S., Villar-Gómara, L., Alcalá, L., ... Muñoz, P. (2020). Faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridioides difficile* infection: experience with lyophilized oral capsules. *Journal of Hospital Infection*, 105(2), 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.12.022>
- Rivera-Chávez, F., Lopez, C. A., Bäumlner, A. J. (2017). Oxygen as a driver of gut dysbiosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 105, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.022>
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., Tuohy, K. (2018). Gut microbiota

functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>

Satokari, R., Mattila, E., Kainulainen, V., Arkkila, P. E. T. (2015). Simple faecal preparation and efficacy of frozen inoculum in faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection - An observational cohort study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 41(1), 46–53. <https://doi.org/10.1111/apt.13009>

Scarsella, E., Stefanon, B., Cintio, M., Licastro, D., Sgorlon, S., Dal Monego, S., Sandri, M. (2020). Learning machine approach reveals microbial signatures of diet and sex in dog. *PLoS ONE*, 15(8 August), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237874>

Schmidt, M., Unterer, S., Suchodolski, J. S., Honneffer, J. B., Guard, B. C., Lidbury, J. A., ... Kölle, P. (2018). The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. *PLoS ONE*, 13(8), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201279>

Schmitz, S., Suchodolski, J. (2016). Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? *Veterinary Medicine and Science*, 2(2), 71–94. <https://doi.org/10.1002/vms3.17>

Schneeberg, A., Rupnik, M., Neubauer, H., Seyboldt, C. (2012). Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe*, 18(5), 484–488. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.08.002>

Shaffer, S. R., Witt, J., Targownik, L. E., Kao, D., Lee, C., Smieliauskas, F., ... Bernstein, C. N. (2020). Cost-effectiveness analysis of a fecal microbiota transplant center for treating recurrent *C. difficile* infection. *Journal of Infection*, 81(5), 758–765. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.09.025>

Sheedy, J. R., Wettenhall, R. E. H., Scanlon, D., Gooley, P. R., Lewis, D. P., McGregor, N., ... De Meirleir, K. L. (2009). Increased D-Lactic Acid Intestinal Bacteria in Patients with Chronic Fatigue Syndrome. *In Vivo*, 175, 23–38.

Shen, J., Zhang, B., Wei, H., Che, C., Ding, D., Hua, X., ... Zhao, L. (2010). Assessment of the modulating effects of fructo-oligosaccharides on fecal microbiota using human flora-associated piglets.

Archives of Microbiology, 192(11), 959–968. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0628-y>

- Siegerstetter, S. C., Petri, R. M., Magowan, E., Lawlor, P. G., Zebeli, Q., O’Connell, N. E., Metzler-Zebeli, B. U. (2018). Fecal microbiota transplant from highly feed-efficient donors shows little effect on age-related changes in feedefficiency- associated fecal microbiota from chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(2), 1–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.02330-17>
- Simpson, K W, Batt, R. M., Jones, D., Morton, D. B. (1990). Effects of exocrine pancreatic insufficiency and replacement therapy on the bacterial flora of the duodenum in dogs - PubMed. *American Journal of veterinary research*. Recuperato da <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2301831/>
- Simpson, Kenneth W., Jergens, A. E. (2011). Pitfalls and Progress in the Diagnosis and Management of Canine Inflammatory Bowel Disease. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 41(2), 381–398. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.02.003>
- Singh, C., Roy-Chowdhuri, S. (2016). Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods in Molecular Biology*, 1392, 33–42. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0>
- Singh, P., Manning, S. D. (2016). Impact of age and sex on the composition and abundance of the intestinal microbiota in individuals with and without enteric infections. *Annals of Epidemiology*, 26(5), 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2016.03.007>
- Sleight, S. C., Wigginton, N. S., Lenski, R. E. (2006). Increased susceptibility to repeated freeze-thaw cycles in *Escherichia coli* following long-term evolution in a benign environment. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-104>
- Sokol, H., Galperine, T., Kapel, N., Bourlioux, P., Seksik, P., Barbut, F., ... Zerbib, F. (2016). Faecal microbiota transplantation in recurrent *Clostridium difficile* infection: Recommendations from the French Group of Faecal microbiota Transplantation. *Digestive and Liver Disease*, 48(3), 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.08.017>
- Staggers, J. E., Frost, S. C., Wells, M. A. (1982). Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. III. Composition of bile and evidence for enterohepatic circulation of bile salts. *Journal of Lipid Research*, 23(8), 1143–1151.
- Staley, C., Kaiser, T., Vaughn, B. P., Graiziger, C. T., Hamilton, M. J., Rehman, T. U., ... Sadowsky, M. J. (2018). Predicting recurrence of *Clostridium difficile* infection following encapsulated fecal

microbiota transplantation. *Microbiome*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0549-6>

Steiner, S., Linhart, N., Neidl, A., Baumgartner, W., Tichy, A., Wittek, T. (2020). Evaluation of the therapeutic efficacy of rumen transfaunation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(1), 56–63. <https://doi.org/10.1111/jpn.13232>

Stiles, M. E., Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)

Stranneheim, H., Lundeberg, J. (2012). Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnology Journal*, 7(9), 1063–1073. <https://doi.org/10.1002/biot.201200153>

Strathdee, F., Free, A. (2013). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Methods in Molecular Biology*, 4(1), 37–40. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-565-1_9

Strati, F., Cavalieri, D., Albanese, D., De Felice, C., Donati, C., Hayek, J., ... De Filippo, C. (2017). New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0242-1>

Strohmeier, R. A., Morley, P. S., Hyatt, D. R., Dargatz, D. A., Scorza, A. V., Lappin, M. R. (2006). Evaluation of bacterial and protozoal contamination of commercially available raw meat diets for dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(4), 537–542. <https://doi.org/10.2460/javma.228.4.537>

Suchodolski, J. S. (2011). Companion animals symposium: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of Animal Science*, 89(5), 1520–1530. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3377>

Suchodolski, Jan S. (2011). Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: A Bigger World than We Thought. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 41(2), 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.12.006>

Suchodolski, Jan S. (2016). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *Veterinary Journal*, 215, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>

- Suchodolski, Jan S. (2018). Gut Brain Axis and Its Microbiota Regulation in Mammals and Birds. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 21(1), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2017.08.007>
- Suchodolski, Jan S., Camacho, J., Steiner, J. M. (2008). Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3), 567–578. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x>
- Suchodolski, Jan S., Dowd, S. E., Westermarck, E., Steiner, J. M., Wolcott, R. D., Spillmann, T., Harmoinen, J. A. (2009). The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiology*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-210>
- Suchodolski, Jan S., Markel, M. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Unterer, S., Heilmann, R. M., Dowd, S. E., ... Toresson, L. (2012). The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051907>
- Suchodolski, Jan S., Xenoulis, P. G., Paddock, C. G., Steiner, J. M., Jergens, A. E. (2010). Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Veterinary Microbiology*, 142(3–4), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.002>
- Sugita, K., Yanuma, N., Ohno, H., Takahashi, K., Kawano, K., Morita, H., Ohmori, K. (2019). Oral faecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhoea in a dog: a case report. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1754-z>
- Sun, W., Guo, Y., Zhang, S., Chen, Z., Wu, K., Liu, Q., ... Chen, D. (2018). Fecal Microbiota Transplantation Can Alleviate Gastrointestinal Transit in Rats with High-Fat Diet-Induced Obesity via Regulation of Serotonin Biosynthesis. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8308671>
- Surawicz, C. M., Brandt, L. J., Binion, D. G., Ananthakrishnan, A. N., Curry, S. R., Gilligan, P. H., ... Zuckerbraun, B. S. (2013). Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of clostridium difficile infections. *American Journal of Gastroenterology*, 108(4), 478–498. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.4>

- Ta, L., Gosa, L., Nathanson, D. A. (2019). Biosafety and Biohazards: Understanding Biosafety Levels and Meeting Safety Requirements of a Biobank. *Methods in Molecular Biology*, 1897, 307–318. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_19
- Tang, G., Yin, W., Liu, W. (2017). Is frozen fecal microbiota transplantation as effective as fresh fecal microbiota transplantation in patients with recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection: A meta-analysis? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(4), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.007>
- Tariq, R., Saha, S., Solanky, D., Pardi, D. S., Khanna, S. (2020). Predictors and Management of Failed Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. *Journal of Clinical Gastroenterology*, Publish Ah(00), 1–6. <https://doi.org/10.1097/mcg.0000000000001398>
- Tizard, I. R., Jones, S. W. (2018). The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 48(2), 307–322. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.008>
- Toral, M., Robles-Vera, I., De La Visitación, N., Romero, M., Yang, T., Sánchez, M., ... Duarte, J. (2019). Critical role of the interaction gut microbiota-sympathetic nervous system in the regulation of blood pressure. *Frontiers in Physiology*, 10(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00231>
- Tropini, C., Earle, K. A., Huang, K. C., Sonnenburg, J. L. (2017). The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function. *Cell Host and Microbe*, 21(4), 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.010>
- Trubiano, J. A., Cheng, A. C., Korman, T. M., Roder, C., Campbell, A., May, M. L. A., ... Athan, E. (2016). Australasian Society of Infectious Diseases updated guidelines for the management of *Clostridium difficile* infection in adults and children in Australia and New Zealand. *Internal Medicine Journal*, 46(4), 479–493. <https://doi.org/10.1111/imj.13027>
- van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., ... Keller, J. J. (2013). Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine*, 368(5), 407–415. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1205037>

- Vázquez-Baeza, Y., Hyde, E. R., Suchodolski, J. S., Knight, R. (2016). Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nature Microbiology*, 1(October), 1–5. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.177>
- Vendrik, K. E. W., Ooijselaar, R. E., de Jong, P. R. C., Laman, J. D., van Oosten, B. W., van Hilten, J. J., ... Contarino, M. F. (2020). Fecal Microbiota Transplantation in Neurological Disorders. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(March). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00098>
- Verma, M., Kulshrestha, S., Puri, A. (2017). *Genome Sequencing* (Vol. 1525). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_1
- Vermeire, S., Joossens, M., Verbeke, K., Wang, J., Machiels, K., Sabino, J., ... Raes, J. (2016). Donor Species Richness Determines Faecal Microbiota Transplantation Success in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 10(4), 387–394. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv203>
- Vindigni, S. M., Surawicz, C. M. (2017). Fecal Microbiota Transplantation. *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(1), 171–185. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.012>
- Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F. W. M., ... Nieuwdorp, M. (2012). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, 143(4), 913-916.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.031>
- Wang, S., Martins, R., Sullivan, M. C., Friedman, E. S., Masic, A. M., El-Fahmawi, A., ... Beiting, D. P. (2019). Diet-induced remission in chronic enteropathy is associated with altered microbial community structure and synthesis of secondary bile acids. *Microbiome*, 7(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0740-4>
- Wang, X., Tsai, T., Deng, F., Wei, X., Chai, J., Knapp, J., ... Zhao, J. (2019). Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome*, 7(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0721-7>
- Weese, J., Costa, M., Webb, J. (2013). Preliminary clinical and microbiome assessment of stool transplantation in the dog and cat [abstract]. *ACVIM Forum reasearch abstract program*.
- Weese, J. S., Finley, R., Reid-Smith, R. R., Janecko, N., Rousseau, J. (2010). Evaluation of Clostridium

difficile in dogs and the household environment. *Epidemiology and Infection*, 138(8), 1100–1104. <https://doi.org/10.1017/S0950268809991312>

Weese, J. Scott. (2020). Clostridium (Clostridioides) difficile in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(2), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1040638719899081>

Weese, J. Scott, Staempfli, H. R., Prescott, J. F., Kruth, S. A., Greenwood, S. J., Weese, H. E. (2001). The Roles of Clostridium difficile and Enterotoxigenic Clostridium perfringens in Diarrhea in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 53(9), 1689–1699.

Wei, Y., Sun, M., Zhang, Y., Gao, J., Kong, F., Liu, D., ... Tang, R. (2019). Prevalence, genotype and antimicrobial resistance of Clostridium difficile isolates from healthy pets in Eastern China. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3678-z>

Wen, K., Tin, C., Wang, H., Yang, X., Li, G., Giri-Rachman, E., ... Yuan, L. (2014). Probiotic Lactobacillus rhamnosus GG enhanced Th1 cellular immunity but did not affect antibody responses in a human gut microbiota transplanted neonatal gnotobiotic pig model. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094504>

Wernimont, S. M., Radosevich, J., Jackson, M. I., Ephraim, E., Badri, D. V., MacLeay, J. M., ... Suchodolski, J. S. (2020). The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01266>

Westermarck, E., Myllys, V., Aho, M. (1993). Effect of treatment on the jejunal and colonic bacterial flora of dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *Pancreas*, 8(5), 559–562. <https://doi.org/10.1097/00006676-199309000-00005>

Westermarck, E., Skrzypczak, T., Harmoinen, J., Steiner, J. M., Ruaux, C. G., Williams, D. A., ... Rinkinen, M. (2005). Tylosin-Responsive Chronic Diarrhea in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 53(9), 1689–1699. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2005\)19<177:tcdid>2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2005)19<177:tcdid>2.0.co;2)

Westermarck, E., Wiberg, M. (2012). Exocrine Pancreatic Insufficiency in the Dog: Historical Background, Diagnosis, and Treatment. *Topics in Companion Animal Medicine*, 27(3), 96–103. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2012.05.002>

- Whitfield-Cargile, C. M., Cohen, N. D., Chapkin, R. S., Weeks, B. R., Davidson, L. A., Goldsby, J. S., ... Alaniz, R. C. (2016). The microbiota-derived metabolite indole decreases mucosal inflammation and injury in a murine model of NSAID enteropathy. *Gut Microbes*, 7(3), 246–261. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1156827>
- Whittemore, J. C., Moyers, T. D., Price, J. M. (2019). Randomized, controlled, crossover trial of prevention of antibiotic-induced gastrointestinal signs using a synbiotic mixture in healthy research dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(4), 1619–1626. <https://doi.org/10.1111/jvim.15553>
- Williams, D. A., Batt, R. M. (1988). Sensitivity and specificity of radioimmunoassay of serum trypsin-like immunoreactivity for the diagnosis of canine exocrine pancreatic insufficiency. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192(2), 195–201. Recuperato da <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3258306/>
- Xenoulis, P. G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J. M., Van House, A. M., Suchodolski, J. S. (2008). Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3), 579–589. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00556.x>
- Xiao, L., Estellé, J., Kiilerich, P., Ramayo-Caldas, Y., Xia, Z., Feng, Q., ... Wang, J. (2016). A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nature Microbiology*, 1(September), 1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.161>
- Zeng, M., Inohara, N., Nuñez, G. (2017). Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol.*, 17(3), 139–148. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.75>.
- Zhang, H., Wang, H., Shepherd, M., Wen, K., Li, G., Yang, X., ... Yuan, L. (2014). Probiotics and virulent human rotavirus modulate the transplanted human gut microbiota in gnotobiotic pigs. *Gut Pathogens*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13099-014-0039-8>
- Zhang, Q., Widmer, G., Tzipori, S. (2013). A pig model of the human gastrointestinal tract. *Gut Microbes*, 4(3), 193–200. <https://doi.org/10.4161/gmic.23867>
- Zhou, G. F., Jiang, Y. H., Ma, D. F., Wang, Y. C., Yang, J. L., Chen, J. Y., ... Li, X. (2019). Xiao-Qing-Long Tang prevents cardiomyocyte hypertrophy, fibrosis, and the development of heart failure with

preserved ejection fraction in rats by modulating the composition of the gut microbiota. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9637479>

Ziese, A. L., Suchodolski, J. S. (2020). Impact of Changes in Gastrointestinal Microbiota in Canine and Feline Digestive Diseases. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 51, 155–169. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.09.004>

Ziese, A. L., Suchodolski, J. S., Hartmann, K., Busch, K., Anderson, A., Sarwar, F., ... Unterer, S. (2019). Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. *PLoS ONE*, 13(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204691>

Zwirgmaier, K. (2010). Detection of Prokaryotic Cells with Fluorescence In Situ Hybridization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 659, 389–400. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-789-1_27

RINGRAZIAMENTI

Questa tesi rappresenta la conclusione di un percorso che per me è stato molto più che semplice studio: gli ultimi cinque anni sono stati un pezzo importantissimo della mia vita, perché mi hanno permesso di crescere e di conoscere delle persone fantastiche.

Ci tengo quindi a ringraziare sia tutti coloro che ho incontrato durante questo viaggio sia quelli che invece ci sono sempre stati.

Per cominciare, un enorme grazie va alla mia famiglia: mia madre Mara e mio padre Delfo, mio fratello Diego, la mitica zia Carla, i nonni (anche quelli che purtroppo oggi non possono assistere a questo mio traguardo) e tutti gli altri zii e cugini.

In particolare, i miei genitori sono coloro che devo ringraziare più di tutti. Hanno sempre fatto il possibile per permettermi di seguire la mia strada e realizzare il mio sogno, sia mediante il sostegno morale che quello economico; se non fosse stato per loro, probabilmente non sarei riuscito a fare tutto questo.

In seconda battuta, voglio ringraziare la prof.ssa Helen Poser, per essersi resa disponibile a farmi da relatrice, e soprattutto il mio correlatore: il dott. Michele Berlanda. Lui ha saputo farmi conoscere ed appassionare ad un argomento di cui non sapevo nemmeno l'esistenza; inoltre, mi ha seguito ed aiutato con grande pazienza e meticolosità durante tutta la stesura della tesi.

Assieme a loro, sono da ringraziare anche tutti i professori e le altre figure universitarie (personale dell'OVUD, tecnici di laboratorio e responsabili esterni dei tirocini) che nel corso di questi cinque anni hanno contribuito alla mia formazione sia professionale che umana.

Un grande grazie va ai miei amici storici: Edoardo P., Giulio, Francesco, Matteo e Edoardo C.

Voi siete sempre riusciti ad esserci ed a supportarmi durante questo percorso, anche nei periodi in cui non siamo riusciti a frequentarci molto. Vi voglio bene e so che su di voi potrò sempre contare quando ne avrò bisogno.

Ringrazio anche tutti i miei compagni di corso, ma in particolar modo tre persone speciali con le quali ho condiviso moltissime esperienze.

Il primo da citare è senza alcun dubbio Luca: uno dei primi compagni con cui ho legato in università e da cui non mi sono mai più separato; in lui ho trovato un'amicizia preziosa e insostituibile.

Poi c'è Jessica, compagna di tirocinio e di sventure per quasi tutti gli anni universitari. Il nostro

rapporto è stato un progressivo crescendo e mi sento di dire che sei una delle persone che più hanno segnato in maniera positiva il mio percorso.

Infine, Claudia: coinquilina per alcuni anni, nonché una delle mie più grandi amiche. Ricorderò sempre con un sorriso un po' nostalgico tutti i momenti gioiosi e di festa trascorsi assieme, ma anche tutti quelli di sconforto in cui abbiamo saputo consolarci a vicenda. E sono sicuro che in futuro ce ne saranno molti altri.

Successivamente voglio ringraziare Ezio, il proprietario dell'ambulatorio che frequento da qualche anno, per la grande disponibilità che ha sempre mostrato nei miei confronti. Ed ovviamente un grazie va anche mie alle future colleghe Giorgia, Stefania, Martina, Alice e Caterina, per avermi insegnato un sacco di cose al di fuori dell'ambiente universitario.

Per concludere, mi piacerebbe citare, una per una, tutte le altre persone che hanno avuto un ruolo importante per me in questi cinque anni, ma purtroppo lo spazio non basterebbe...

Mi limiterò quindi a dire "Grazie" a tutti coloro che hanno sempre creduto in me o che mi abbiano anche solo detto qualche parola di incoraggiamento.

Questo traguardo è dedicato anche a tutti voi.