

Indice

Riassunto.....	2
Abstract.....	3
Abbreviazioni	4
1. Introduzione.....	6
2. Cenni anatomici e funzionali.	7
3. Sistema immunitario intestinale.....	10
3.1 Regolazione della risposta immunitaria.....	12
4. Segnalamento.....	16
5. Patogenesi.....	17
5.1 Immunità innata.	21
5.2 Genetica.....	28
5.3 Microbiota intestinale.....	30
6. Segni clinici.	33
7. Diagnosi.....	45
7.1 Esame emocromocitometrico e profilo biochimico.....	48
7.2 Biomarker sierici nella pratica clinica.	50
7.3 Biomarker sierici in fase di studio.	51
7.4 Esame coprologico e biomarker fecali.....	56
7.5 Esame ecografico.....	60
7.6 Endoscopia.....	70
7.7 Istopatologia.....	79
7.8 Immunoistochimica.	97
8. Terapia.	103
8.1 Dieta.....	104
8.2 Probiotici e prebiotici.	110
8.3 Antibiotici.....	113
8.4 Immunosoppressori.....	119
8.5 Gestione della terapia.....	126
9 Conclusioni	127
Bibliografia.....	130

Riassunto

L'elaborato affronta la tematica delle enteropatie croniche del cane, che rappresentano una sfida diagnostica e terapeutica per i medici veterinari. Lo scopo dello studio è quello di analizzare gli aspetti principali di questa patologia. Inizialmente viene affrontato il tema della patogenesi, evidenziando quali sono i diversi fattori che giocano un ruolo nell'innescare di una risposta infiammatoria cronica, soffermandosi sugli aspetti legati al sistema immunitario mucosale, al microbiota e alla componente genetica. Vengono riportati i principali segni clinici della patologia, che sono aspecifici e spesso si manifestano in modo irregolare, e gli strumenti diagnostici a disposizione, che sono molteplici; i *biomarker* sierici e fecali, sia quelli attualmente utilizzati, sia quelli in fase di studio, possono avere, ad oggi, unicamente una funzione ausiliare. L'ecografia ha un'utilità marginale, ma l'ecografia con contrasto potrebbe rivelarsi utile in futuro in seguito ad ulteriori studi. Ad oggi però, l'unico modo per avere una conferma diagnostica è l'esame istopatologico.

In conclusione, si analizzano i diversi percorsi terapeutici attualmente utilizzati e quelli che potrebbero essere utilizzati in futuro. La letteratura evidenzia come l'utilizzo di una terapia dietetica sia efficace in alcuni soggetti permettendo una remissione completa, mentre in altri casi sia necessario l'utilizzo di una terapia antibiotica o immunosoppressiva.

Abstract

The topic of this thesis is the chronic dog's enteropathies, which represent a diagnostic and therapeutic challenge for veterinarians. The aim is to analyze the different aspects of this clinical condition.

At first, the dissertation deals with the issue of pathogenesis, with a focus on the role of the mucosal immune system, the intestinal microbiota, and the genetic factors, which are strongly involved in triggering the inflammatory response. The study continues highlighting the main clinical signs, usually nonspecific and variable, and the current diagnostic tools, like serum and fecal biomarker, ultrasonography, and histopathology. Histologic evaluation of gut biopsies currently represents the only tool for diagnostic confirmation.

Finally, the thesis deals with the currently available therapeutic options, and those still under investigation, which may represent future treatment options.

Abbreviazioni

3-BrY: 3-Bromotirosina
APRIL: ligando produttore proliferazione
ARE: enteropatia responsiva agli antibiotici
BAFF: fattore di attivazione dei linfociti B
CCECAI: canine chronic enteropathy clinical activity index
CD: morbo di Crohn
CE: enteropatia cronica
CEUS: contrast-enhanced ultrasonography
CIBDAI: canine IBD activity index
cPLI: lipasi canina pancreatico-specifica
CRTZ: chemoreceptor trigger zone
DAMP: pattern molecolare associato al danno
DC: cellule dendritiche
DLA: dog Leukocyte Antigen
EE: enterite eosinofila
EGE: gastroenterite eosinofila
FISH: ibridazione fluorescente in situ
FRE: enteropatia responsiva alla dieta
GALT: tessuto linfoide intestino-associato
GWAS: genome-wide association study
HUC: colite ulcerativa istiocitaria
IAP: fosfatasi alcalina intestinale
IBD: inflammatory bowel disease
IEL: linfociti intra-epiteliali
iNOS: sintetasi inducibile dell'ossido nitrico
IRE: enteropatia responsiva agli immunosoppressori
LPE: enterite linfo-plasmacellulare
MAMP: pattern molecolari associati ai microorganismi
MMA: acido metilmalonico
NF- κ B: fattore nucleare K-beta
NK: natural killer
NLR: neutrophil-to-lymphocyte ratio
NMH: N-Metilistamina
NRE: enteropatia non responsiva
pANCA: anticorpi citoplasmatici perinucleari anti-neutrofili
pIgR: recettore per le immunoglobuline polimeriche
PON1: paraoxonasi-1
PRR: pattern recognition receptor
pSTAT3: trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione 3 attivato
PXR: recettore X del pregnano
RAGE: receptor of advanced glycation end product

SCFAs: acidi grassi a catena corta
SNP: single nucleotide polymorphism
STAT3: trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione 3
TJP: proteina di giunzione stretta epiteliale
TLR: toll-like receptor
TNF- α : fattore alfa di necrosi tumorale
TRD: diarrea responsiva alla tilosina
T-Reg: linfociti T regolatori
UC: colite ulcerosa
UIBC: unsaturated iron binding capacity
WSAVA: World Small Animal Veterinary Association
 α 1PI: inibitore dell'alfa 1 proteinasi

1. Introduzione.

Quando si parla di enteropatia cronica (CE), ci si riferisce principalmente ad un quadro infiammatorio idiopatico cronico del tratto gastroenterico, associato a sintomi clinici persistenti o ricorrenti come diarrea e vomito.

Lo scopo di questo elaborato è quello di fornire una panoramica sulle enteropatie croniche (CE) nella specie canina. Queste forme di infiammazione intestinale cronica rappresentano una condizione difficile da diagnosticare e da trattare, sia per l'estrema variabilità dei sintomi, sia per la differente risposta terapeutica da soggetto a soggetto. Questo elaborato, quindi, si pone l'obiettivo di analizzare gli aspetti salienti di questa patologia, utilizzando le informazioni che sono attualmente disponibili e quelle ancora in fase di studio, effettuando quindi una revisione della letteratura in modo tale da riassumere gli aspetti più importanti su cui ci si deve concentrare nell'approccio a questa patologia.

Inizialmente ci si sofferma sulla patogenesi, analizzando la complessa interazione tra il sistema immunitario mucosale, il microbiota, la componente genetica e gli antigeni alimentari. Successivamente vengono passati in rassegna i principali segni clinici della patologia, per poi soffermarsi sugli aspetti diagnostici, in particolare quelli riguardanti i *biomarker* sierici e fecali, facendo una distinzione tra quelli attualmente utilizzati e quelli ancora in fase di studio. Viene analizzata l'utilità dell'ecografia come strumento diagnostico e ci si sofferma brevemente su una metodica ancora in fase di studio per quanto riguarda la medicina veterinaria, ossia l'ecografia con mezzo contrasto. Successivamente ci si concentra sull'esame endoscopico, per poi analizzare l'unico strumento diagnostico che ad oggi consente di confermare la diagnosi di enteropatia cronica, ossia l'esame istopatologico.

In conclusione, si analizzano le diverse opzioni terapeutiche, partendo dalla terapia dietetica per poi concentrarsi sulla terapia antibiotica e immunosoppressiva.

2. Cenni anatomici e funzionali.

L'apparato gastro-enterico nel cane ricopre un ruolo di fondamentale importanza, trasformando il cibo in modo tale da renderlo disponibile per la produzione o la sostituzione di cellule e di tessuti propri dell'organismo, e per ricavarne energia. Per fare ciò, l'apparato gastro-enterico è coadiuvato da una serie di stimoli ormonali e nervosi, che svolgono un ruolo di controllo e gestione del processo digestivo. Viene definito anche tubo digerente per la struttura tubulare che assume durante lo sviluppo embrionale e, in vari punti, è presente lo sbocco di ghiandole annesse, ossia le ghiandole salivari, il fegato e il pancreas.

Viene suddiviso anatomicamente in cinque porzioni: intestino cefalico (cavità orale e faringea), intestino anteriore (esofago e stomaco), intestino medio (intestino tenue), intestino posteriore (intestino crasso), canale anale con l'ano (H. E. König et al., 2017).

La parete intestinale è composta dall'interno verso l'esterno da: tonaca mucosa, tonaca sottomucosa, tonaca muscolare e tonaca sierosa. Lungo il canale intestinale sono presenti delle ghiandole chiamate cripte del Lieberkuhn. Nella tonaca mucosa sono presenti le cellule caliciformi mucipare che secernono muco. La tonaca sottomucosa è composta da tessuto connettivo lasso e ospita vasi sanguigni e linfatici, linfonodi e plessi nervosi vegetativi. In questo strato si trovano i gangli del plesso nervoso sottomucoso (plesso di Meissner), deputati all'innervazione vegetativa delle ghiandole intestinali, della muscolatura liscia e della parete dei vasi.

La tonaca muscolare è composta da uno strato più interno di muscolatura circolare ed uno più esterno longitudinale.

La tonaca sierosa è costituita dal foglietto viscerale del peritoneo (H. E. König et al., 2017).

L'intestino tenue è deputato alla digestione e all'assorbimento delle sostanze ingerite e al trasporto di queste ultime in direzione del colon/retto per poi essere espulse come feci; presenta una funzione di barriera atta ad impedire la traslocazione dei batteri e degli enzimi nel circolo sistemico e la perdita di proteine nel lume intestinale. Svolge un ruolo importante nella funzionalità immunitaria. Nell'intestino tenue sono presenti dei processi digitiformi chiamati villi intestinali, che aumentano nettamente la superficie di assorbimento. Il centro di ogni villo è percorso da una arteriola che si dirama in una rete capillare. Alla base del villo i capillari confluiscono in una venula. Nel villo sono presenti anche capillari linfatici, atti al trasporto dei prodotti derivanti dalla digestione e dall'assorbimento dei grassi (H. E. König et al., 2017).

Nell'intestino tenue avvengono delle contrazioni peristaltiche atte a mescolare il contenuto, ad assicurare che il contenuto venga a contatto con le cellule epiteliali e a trasportare il chimo ad una velocità adeguata lungo il tratto digerente. È il tratto intestinale principalmente adibito all'assorbimento, grazie anche all'ampia superficie interna garantita dall'architettura dei villi e dei microvilli.

Le cellule epiteliali originano dalle cripte per poi portarsi all'apice del villo. Le cellule epiteliali delle cripte secernono succo enterico, mentre quelle dei villi sono responsabili dell'assorbimento. Durante l'assorbimento, varie sostanze vengono trasferite da lume intestinale al sangue o ai capillari linfatici tramite diversi meccanismi fisiologici. Nell'intestino tenue vengono digeriti e assorbiti i seguenti nutrienti: monosaccaridi, amminoacidi, lipidi, vitamine, calcio e ferro, sali biliari e vitamina B12 (O. V. Sjaastad et al., 2013).

Il microbiota, ossia la popolazione di microorganismi che vive nell'intestino in simbiosi con l'ospite, influisce su diverse funzioni dell'intestino tenue; permette il turnover degli enzimi dell'orletto a spazzola e degli enterociti, influenza la dimensione dei villi e la motilità intestinale, ed ha una funzione molto importante nello sviluppo dell'immunità mucosale e nella prevenzione della colonizzazione da parte di agenti patogeni. La flora batterica è la componente preponderante e la quantità di batteri è maggiore man mano che si procede verso il colon, mentre è

quasi totalmente assente nella parte prossimale dell'intestino a causa delle secrezioni acide, biliari e pancreatiche e dell'intensa attività propulsiva in direzione distale. Oltre ai batteri, il microbiota è composto da protozoi, funghi e virus (Edward James Hall & Michael J. Day, 2019).

L'intestino crasso è formato dal cieco, dal colon, e dal retto; inizia dalla porzione distale dell'intestino tenue, in particolare dallo sfintere ileocolico, e termina in corrispondenza dell'ano. Generalmente ha un diametro che è il doppio di quello dell'intestino tenue. Il cieco è un diverticolo del colon prossimale ed è in comunicazione con quest'ultimo tramite l'orifizio ceco-colico. L'intestino crasso dal punto di vista istologico si suddivide in una tonaca sierosa, muscolare, sottomucosa e mucosa, partendo dall'esterno verso il lume. La mucosa si presenta liscia e priva di villi, con una minor presenza di microvilli ma una maggiore quantità di cellule caliciformi secernenti muco. Sono comunque presenti le cripte del Lieberkuhn (H. E. König et al., 2017).

Le funzioni principali del colon sono l'assorbimento di acqua ed elettroliti, determinando così un aumento della consistenza delle feci, e lo stoccaggio del materiale fecale nel colon distale e nel retto, dal quale sarà eliminato durante defecazione. Perché queste funzioni siano svolte correttamente, è fondamentale una motilità intestinale adeguata. La produzione di muco a questo livello agisce come lubrificante, agevolando il passaggio del contenuto fecale, svolge la funzione di barriera fisica proteggendo la mucosa da insulti meccanici o fisici, e permette di intrappolare agenti patogeni ed enterotossine impedendogli di svolgere la loro azione patogena.

Il colon è la porzione di intestino con la maggior concentrazione di batteri appartenenti alla flora batterica; il microbiota del colon svolge delle funzioni essenziali; infatti, è fondamentale per l'interazione con il sistema immunitario mucosale, fornisce, tramite le fermentazioni, delle molecole essenziali per il metabolismo dei colonociti e sintetizza amminoacidi e vitamine (Edward James Hall, 2019)

3. Sistema immunitario intestinale.

Il sistema immunitario intestinale ha la necessità di costituire una barriera sia fisica che funzionale nei confronti di antigeni patogeni e, allo stesso tempo, riconoscere antigeni non patogeni derivanti dalla dieta e dalla flora microbica residente. A livello intestinale la funzione immunitaria viene attuata tramite una precisa organizzazione anatomica e funzionale, ossia tramite il *tessuto linfoide intestino-associato* (GALT); quest'ultimo comprende dei siti induttivi, le placche di Peyer, follicoli linfoidi isolati e i linfonodi mesenterici e dei siti effettori, la lamina propria e l'epitelio.

Le difese immunitarie intestinali coinvolgono anche l'attività peristaltica, la flora microbica residente, lo strato di muco e la barriera degli enterociti.

Il riconoscimento dei batteri commensali e patogeni avviene tramite dei recettori, i cosiddetti recettori Toll-like (TLR), che si trovano sulle cellule endoteliali, sui monociti, sui macrofagi, sulle cellule dendritiche del *tessuto linfoide intestino-associato* (GALT) e sulla superficie basolaterale degli enterociti. I recettori Toll-like (TLRs) riconoscono i pattern molecolari associati ai microorganismi (MAMP) che sono espressi sia dai batteri patogeni sia dai batteri commensali; il riconoscimento causa la produzione del fattore di trascrizione nucleare NF-kB. Se i pattern molecolari associati ai microorganismi (MAMP) riconosciuti appartengono a patogeni, NF-kB viene legato all'ubiquitina causando quindi la trascrizione degli mRNA codificanti per citochine pro-infiammatorie. Se invece i recettori riconoscono un batterio commensale, il NF-kB non viene legato all'ubiquitina e di conseguenza non si instaura la risposta infiammatoria.

Nel *tessuto linfoide intestino-associato* (GALT) troviamo diverse cellule appartenenti al sistema immunitario. I linfociti B sono situati nelle placche di Peyer e nella lamina propria. In particolare, nella lamina propria si trova una grande

popolazione di plasmacellule destinate a produrre immunoglobuline di classe A (IgA).

I linfociti T si trovano nella lamina propria, alcuni di essi sono linfociti intraepiteliali (IEL); possono essere linfociti T CD4+ (linfociti T Helper) oppure linfociti CD8+ citotossici. I linfociti si spostano tra i siti effettori e i siti induttori grazie all'espressione di recettori *homing* che interagiscono con le addressine vascolari endoteliali.

Le cellule dendritiche si trovano sia nei siti induttivi (placche di Peyer), sia nei siti effettori (lamina propria); agiscono prevalentemente come cellule presentanti l'antigene. Nella lamina propria si trovano al di sotto dello strato di enterociti e sono in grado di estendere i loro processi citoplasmatici (dendriti) nel lume intestinale per campionare gli antigeni. Nelle placche di Peyer la captazione degli antigeni avviene attraverso le cellule a micropieghe (cellule M), che trasferiscono gli antigeni luminali alle cellule dendritiche che poi presenteranno l'antigene ai linfociti.

I macrofagi sono presenti sia nella lamina propria che nelle placche di Peyer; svolgono la funzione di fagocitosi, sono cellule presentanti l'antigene e sono implicati nell'immunoregolazione, producendo citochine, chemochine e mediatori infiammatori, come il fattore alfa di necrosi tumorale (TNF- α), gli eicosanoidi e i leucotrieni.

I neutrofili sono poco presenti, i mastociti e gli eosinofili sono in grado di produrre mediatori dell'infiammazione. Nel cane gli eosinofili si trovano maggiormente nella lamina propria ed hanno un ruolo pro-infiammatorio, soprattutto nei processi allergici.

Anche se gli enterociti non sono vere e proprie cellule dell'immunità, hanno la proprietà di esprimere i recettori Toll-like (TLR), possono presentare l'antigene e possono produrre mediatori chimici dell'infiammazione (Edward James Hall & Michael J. Day, 2019).

3.1 Regolazione della risposta immunitaria.

I meccanismi più importanti per la regolazione della funzionalità immunitaria a livello intestinale sono la produzione di IgA e la tolleranza orale, come schematizzato in Fig. 1.

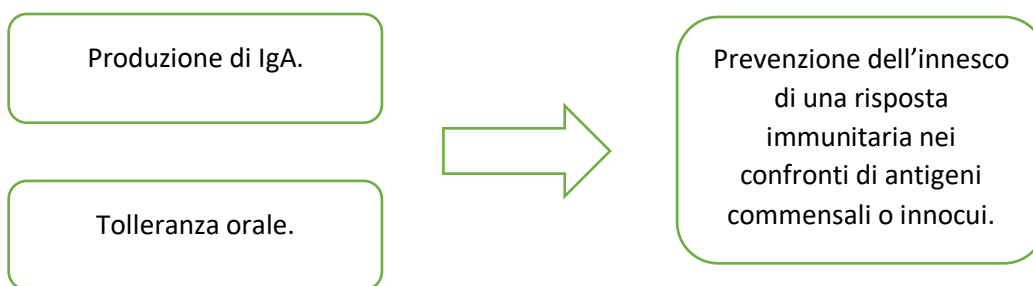


Fig. 1

Meccanismi principali che regolano la risposta immunitaria intestinale.

Nelle placche di Peyer avviene la produzione di IgA dipendente dai linfociti T; le cellule dendritiche campionano gli antigeni luminali, li portano nel centro germinale delle placche di Peyer; a questo punto interagiscono con i linfociti T *helper* follicolari che si differenziano in linfociti T regolatori produttori TGF- β e acido retinoico. Quest'ultimi interagiscono con i linfociti B e sono responsabili dello scambio di classe necessario per la produzione di IgA. Quindi, i linfociti B, dopo essere diventati plasmacellule produttrici IgA si dirigono ai linfonodi mesenterici, poi attraverso il dotto toracico ritornano nella lamina propria dove secernono IgA.

Le IgA possono essere prodotte anche nella lamina propria e nei follicoli linfoidi isolati con un meccanismo indipendente dai linfociti T; le cellule dendritiche campionano i PAMP tramite i TLR e producono citochine, come il fattore di

attivazione dei linfociti B (BAFF), un ligando produttore proliferazione (APRIL), il TNF e la sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS); i linfociti B vengono indotti da queste citochine e dal TGF- β prodotto dalle cellule stromali ad eseguire il cambio di classe e diventare plasmacellule produttrici IgA.

Le IgA sono dimeriche, ossia costituite da due monomeri legati dalla catena di giunzione; si legano al recettore per le immunoglobuline polimeriche (pIgR) espresso sulla superficie baso-laterale degli enterociti, formando un complesso recettore-IgA che attraversa il citoplasma degli enterociti e viene rilasciato nel lume intestinale. A questo punto il recettore per le immunoglobuline polimeriche (pIgR) viene scisso per formare la componente secretoria che permette di evitare la digestione delle IgA da parte degli enzimi intestinali. La funzione di difesa viene attuata tramite il legame con l'antigene e la sua neutralizzazione, contribuendo al mantenimento della tolleranza e alla protezione della mucosa dall'invasione antigenica. (Robert J. Washabau & Michael J. Day, 2013; Stephen J. Ettinger et al., 2019)

Oltre alla produzione di IgA, esiste un altro meccanismo fondamentale per garantire l'omeostasi a livello intestinale, ossia la cosiddetta tolleranza orale.

La tolleranza orale (Fig.2) è un meccanismo che permette l'inibizione della risposta immunitaria nei confronti di antigeni non patogeni, come microorganismi appartenenti alla flora microbica e/o antigeni derivati dalla dieta. Questo può avvenire perché a livello intestinale esiste un ambiente citochinico complesso che determina il tipo di risposta immunitaria predominante che si andrà a sviluppare (Steiner, 2008). In pratica, le cellule presentanti l'antigene a livello della mucosa intestinale interagiscono continuamente con gli antigeni presenti nel lume intestinale tramite i *pattern recognition receptors* (PRRs), e in base al tipo di antigene che viene riconosciuto si attivano dei percorsi intracellulari che portano a sviluppare una adeguata e specifica risposta immunitaria; l'epitelio intestinale e le altre cellule dotate di *pattern recognition receptors* (PRRs) agiscono come sentinella del GALT, aiutando a sviluppare un'adeguata risposta immunitaria (Robert J. Washabau & Michael J. Day, 2013). Nel caso in cui il microorganismo

patogeno sia un parassita, i linfociti T naive si differenziano in linfociti Th2 che richiamano eosinofili, basofili e mastociti. Nel caso in cui il microorganismo patogeno sia un virus, i linfociti T naive si differenziano in linfociti Th1 che producono IFN-gamma, il quale causa l'arrivo di macrofagi. Se invece il patogeno è un batterio, i linfociti T naive si differenziano in linfociti Th17, i quali producono citochine proinfiammatorie come IL-17 e IL-22, le quali causano il richiamo di linfociti T. Quando i *pattern recognition receptors* (PRRs) riconoscono i batteri commensali, i linfociti T naive sono indotti a differenziarsi in linfociti T regolatori, che contrastano gli effetti pro-infiammatori causati dalle citochine prodotte dai linfociti Th17; In pratica si instaura uno stato di omeostasi, mantenuto grazie ad una fitta rete di comunicazione citochinica che mantiene l'equilibrio tra i linfociti T effettori e quelli regolatori (Fig.2) (Allenspach, 2011).

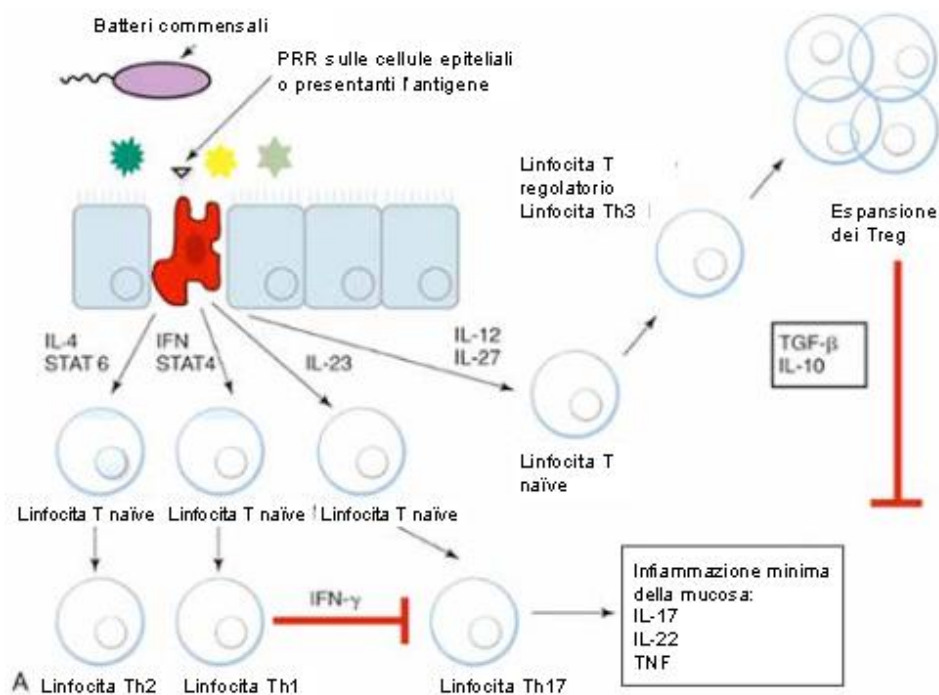


Fig.2

Funzionamento del meccanismo di tolleranza orale. Le cellule presentanti l'antigene campionano continuamente gli antigeni tramite i PRRs. In base al tipo di antigene, la risposta immunitaria sarà diversa. In presenza di un parassita, i linfociti T naive si differenziano in linfociti Th2. In presenza di un virus, i linfociti T naive si differenziano in linfociti Th1, che producono citochine come IFN-gamma. In caso di batteri patogeni, i linfociti T naive si differenziano in linfociti Th17, che producono citochine pro-infiammatorie come IL-17, IL-22, TNF. In caso di batteri commensali, i linfociti T naive si differenziano in linfociti T regolatori che contrastano l'attività pro-infiammatoria dei linfociti Th17. Tratto da "Trattato di clinica medica veterinaria" (Stephen J. Ettinger et al., 2019)

4. Segnalamento.

Il pastore tedesco rappresenta la razza più comunemente predisposta a sviluppare IBD e anche quella sulla quale sono stati condotti molti degli studi disponibili (Kathrani et al., 2010; Peiravan et al., 2016) . Altre razze sono descritte come altamente suscettibili allo sviluppo di IBD in uno studio retrospettivo eseguito nel Regno Unito sudorientale: Labrador Retriever, Boxer, Rottweiler, Border Collie, Staffordshire Bull Terrier, Cocker Spaniel, Golden Retriever, West Highland White Terrier, Weimaraner e Jack Russell Terrier (Kathrani, Werling, et al., 2011) .

Ad oggi non ci sono dati che documentino una precisa predisposizione alle enteropatie croniche sulla base dell'età; infatti, una enteropatia cronica può essere diagnosticata ad ogni età; nonostante questo, in alcuni rapporti, cani con enteropatia responsiva alla dieta (FRE) sono risultati essere più giovani dei cani con enteropatia responsiva agli immunosoppressori (IRE) e presentano frequentemente segni di malattia dell'intestino crasso (Allenspach et al., 2007, 2016) . Altri studi hanno riscontrato che i cani che rispondono positivamente ad una terapia antibiotica (ARE) sono generalmente cani giovani di taglia grande (Allenspach et al., 2016; German et al., 2001)

Uno studio giapponese ha valutato la prevalenza delle malattie nei cani inclusi in un database di polizze assicurative in un periodo di 1 anno. La malattia gastrointestinale è stata la terza causa più frequente; i cani maschi hanno avuto un piccolo ma significativo aumento della prevalenza annuale rispetto ai cani femmina. Le cinque razze con la più alta prevalenza annuale per la malattia gastrointestinale includevano il Bulldog francese, Cavalier King Charles spaniel, Yorkshire terrier, Golden retriever e Pembroke Welsh corgi (Inoue et al., 2015).

5. Patogenesi.

L'eziologia della IBD nei piccoli animali è per definizione sconosciuta, almeno attualmente. (Ettinger, 2019). La ricerca scientifica in questo ambito è in continua evoluzione, per cui non è da escludere che nei prossimi anni si possa arrivare ad ottenere delle informazioni più precise. La comprensione della patogenesi di queste patologie è al momento basata sui risultati ottenuti da studi effettuati sull'uomo, poichè sono carenti i lavori scientifici effettuati sulla specie canina.

Ad oggi, l'opinione più diffusa per spiegare l'eziopatogenesi delle enteropatie croniche vede interfacciarsi tra loro diversi fattori, in particolare il sistema immunitario mucosale, la flora microbica intestinale, fattori genetici e ambientali. Più precisamente, quello che scatenerebbe la risposta infiammatoria sembrerebbe essere una risposta alterata del sistema immunitario mucosale agli antigeni della normale flora microbica intestinale (Allenspach, 2011).

Vari studi sull'IBD nell'uomo e nel topo hanno portato alla conclusione che proprio l'alterazione di questo equilibrio tra la flora microbica intestinale e il sistema immunitario mucosale potrebbe essere alla base dello sviluppo di un'enteropatia cronica. (Cobrin & Abreu, 2005; Mizoguchi, 2012)

Sulla base di questo modello patogenetico, la patologia sarebbe la conseguenza di un riconoscimento alterato dei batteri, siano essi commensali o patogeni, da parte dei recettori del sistema immunitario mucosale. I PRRs, infatti, non sono in grado di riconoscere adeguatamente gli antigeni nel lume intestinale, scambiano i batteri commensali per batteri patogeni causando la produzione di IL-23, che a sua volta induce i linfociti T naive a differenziarsi in linfociti Th17 (Allenspach, 2011). Normalmente, IL-23 viene prodotta in caso di risposta immunitaria nei confronti di agenti microbici, in particolare batteri, ed ha un ruolo nell'espansione e nel mantenimento dei linfociti Th17. Nell'uomo la produzione di IL-23 è elevata nei pazienti affetti da IBD ed è stato dimostrato essere causa di aggravamento dello

stato infiammatorio intestinale (Neurath, 2019). I linfociti Th17 sono in grado di produrre diverse tipologie di citochine; IL-21 amplifica l'induzione dei linfociti Th-17, potenzia la sintesi di IFN-gamma da parte delle cellule Th1 e natural killer (NK), stimola i fibroblasti a produrre metalloproteinasi responsabili di danno tissutale, stimola i macrofagi a sintetizzare una proteina proinfiammatoria che richiama i linfociti T nella lamina propria e media la resistenza dei linfociti T alla soppressione da parte dei linfociti Tregs. IL-22 aumenta l'espressione di TNF- α e IL-8 da parte degli enterociti e stimola la produzione di citochine proinfiammatorie, chemochine e metalloproteinasi da parte dei fibroblasti (Robert J. Washabau & Michael J. Day, 2013) . IL-17 e TNF hanno un ruolo pro-infiammatorio. In tabella 1 sono riassunte le diverse citochine che intervengono nello sviluppo della risposta immunitaria intestinale. Questa serie di meccanismi porta ad uno stato di danno cellulare, che permette il passaggio di antigeni attraverso la lamina propria, aggravando quindi lo stato infiammatorio che a quel punto si sarà innescato (Allenspach, 2011).

In un recente studio, I cani con IBD presentano un'espressione di mRNA significativamente aumentata di IL-1 β , IL-23p19 e CCL28 nella mucosa del colon, rispetto ai controlli. IL-1 β è una citochina pro-infiammatoria con una vasta gamma di effetti sistemici e locali associati all'immunità innata ed è implicata nella risposta dell'ospite all'invasione da parte di antigeni microbici. CCL28 è un membro della sottofamiglia delle chemochine C-C ed è espressa nelle cellule epiteliali del colon e dell'intestino tenue; ha un importante ruolo nell'immunità mucosale come chemo-attrattore ed è anche una proteina antimicrobica ad ampio spettro. L'aumento dell'espressione di queste citochine è in parte il fattore responsabile dell'attivazione di una cascata infiammatoria che porta allo stato di infiammazione tipico delle enteropatie croniche; di conseguenza, è lecito ipotizzare un ruolo patogenetico di queste citochine (Konstantinidis et al., 2021).

Tabella 1.

Principali interleuchine coinvolte nello sviluppo della risposta infiammatoria intestinale.

<p>IL-23</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Contribuisce all'espansione dei linfociti Th17 • Può provocare infiammazione intestinale in assenza di cellule T o B • Contribuisce alla produzione di mediatori pro-infiammatori da parte di macrofagi, cellule dendritiche, eosinofili. • Inibisce l'accumulo dei linfociti Tregs. 	<p>Studi effettuati su topo e uomo.</p>	<p>(Wiekowski et al., 2001) (Ghilardi et al., 2004) (Aggarwal et al., 2003) (Uhlir et al., 2006) (Cheung et al., 2008) (Hue et al., 2006; Langrish et al., 2005)</p>
<p>IL-17</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Contribuisce all'espansione e alla migrazione dei neutrofili • Aumenta la maturazione delle cellule dendritiche • Aumenta la produzione di mediatori dell'infiammazione (IL-1, IL-6, IL-8, TNF, GM-CSF, NOS-2, prostaglandina E2, metalloproteasi e chemochine) 	<p>Studi effettuati sull'uomo.</p>	<p>(Fossiez et al., 1996; Ouyang et al., 2008)</p>

IL-21	<ul style="list-style-type: none"> • Essenziale per la differenziazione dei linfociti Th17. • Richiama i linfociti T nell'intestino infiammato. • Provoca la secrezione di enzimi di degradazione da parte dei fibroblasti intestinali. 	Studi effettuati sull'uomo.	(Fantini et al., 2008) (Poholek & Harrington, 2012).
IL-22	<ul style="list-style-type: none"> • Promuove la rigenerazione epiteliale, l'immunità innata e la produzione di muco; studi effettuati su uomo e topi • Ha un ruolo nel garantire l'omeostasi intestinale. • Promuove l'infiammazione e la crescita tumorale • Ha un ruolo nella patogenesi nei modelli di colite innata 	Studi effettuati su topo e uomo.	(Patnaude et al., 2021). (Keir et al., 2020). (Buonocore et al., 2010; Eken et al., 2014; Song et al., 2015).

5.1 Immunità innata.

I PRRs in questo caso sembrerebbero avere un ruolo chiave e, ad avvalorare questa tesi nell'uomo, ci sono alcuni studi che hanno dimostrato la sovra-regolazione di alcuni PRRs in pazienti affetti da Morbo di Crohn o colite ulcerativa (Gribar, Anand, et al., 2008; Gribar, Richardson, et al., 2008) Studi analoghi effettuati sui cani hanno portato alla luce dati simili. In uno dei primi studi che ha provato a comprendere quale fosse l'effettivo ruolo dei PRRs nella patogenesi della malattia nella specie canina, è emerso che i TLR2, TLR4 e TLR9 fossero sovra-regolati a livello di mucosa di duodeno e colon nei cani affetti da IBD (Burgener I.A., 2008)(Fig.3).

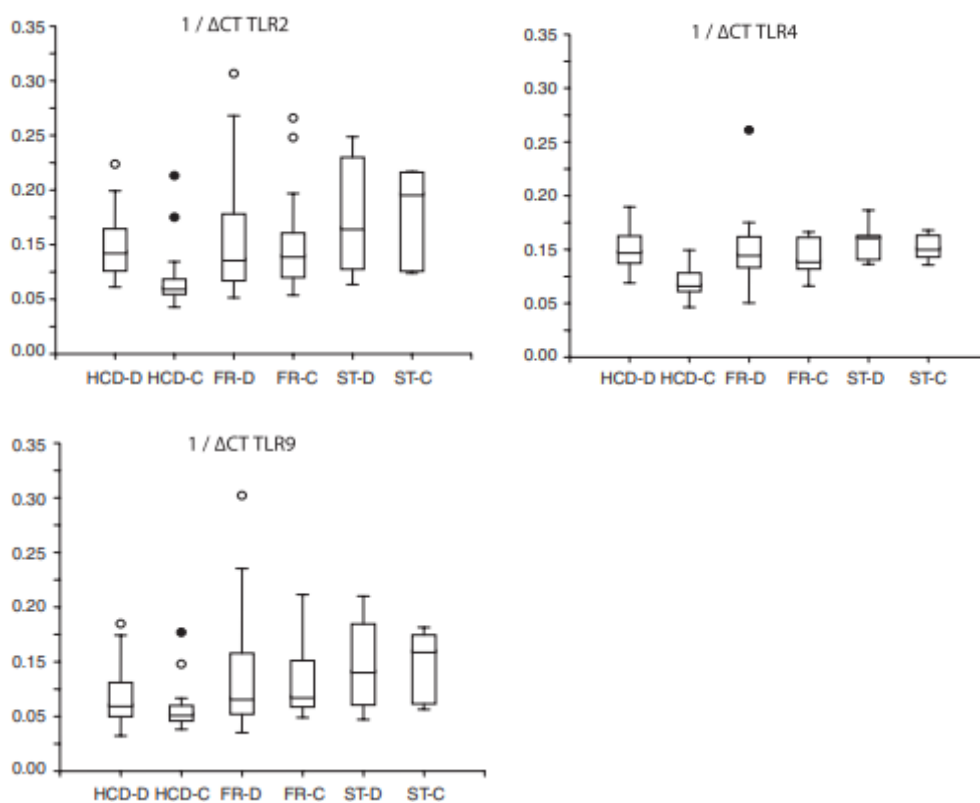


Fig.3

Box and whiskers plot riportanti il confronto sull'espressione di mRNA dei TLR tra cani sani di controllo (HCD), cani con diarrea responsiva alla dieta (FR) e cani con diarrea responsiva agli steroidi (ST) nel duodeno (D) e nel colon (C), prima della terapia. Tutti i TLR hanno mostrato un'espressione maggiore nei cani con ST rispetto ai controlli (HCD) (TLR2: p: 0,046; TLR4: p: 0,006; TLR9: p: 0,033). Non sono state riscontrate differenze significative tra ST e FR o tra FR e controlli (HCD) (Burgener et al., 2008).

In un altro studio è stato dimostrato che l'espressione di mRNA del TLR2 è maggiore nei cani affetti da IBD rispetto a quelli sani (Fig.4); inoltre, è stata evidenziata una leggera correlazione tra l'espressione dell'mRNA dei TLR2 e la gravità dei sintomi clinici (McMahon, 2010). Questo si traduce in una maggiore interazione tra la flora batterica commensale e i TLR, provocando l'instaurarsi di uno stato infiammatorio. Quando i TLRs sono sovraregolati, infatti, il riconoscimento dei batteri commensali normalmente presenti è aumentato e questo porta all'attivazione della cascata infiammatoria, che in condizioni fisiologiche non si dovrebbe attivare. Non è ancora chiaro se questo sia un evento primario oppure una conseguenza secondaria ad altri fattori. (Burgener et al., 2008).

La cronicizzazione dello stato infiammatorio della mucosa porta alla compromissione della funzionalità della barriera intestinale, impedendo il normale svolgimento dei meccanismi fisiologici di digestione, assorbimento e barriera; le conseguenze dal punto di vista clinico si manifestano come diarrea, dimagrimento, deperimento generale.

L'attivazione dei TLR, di solito, porta al rilascio di citochine e chemochine pro-infiammatorie, e di conseguenza all'instaurarsi di una risposta immunitaria. Un'attivazione inappropriata o incontrollata può portare allo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico (Shibolet & Podolsky, 2007).

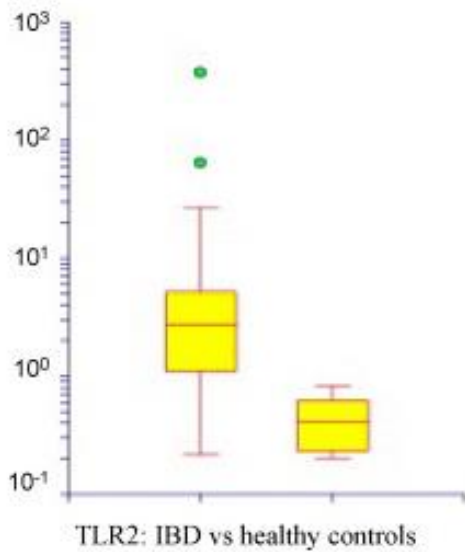


Fig.4

Box & whiskers plot dell'espressione relativa dell'mRNA del TLR2 in scala logaritmica. La parte superiore e inferiore del riquadro rappresentano rispettivamente il 75° e il 25° percentile, la linea centrale rappresenta la mediana e i baffi rappresentano il valore minimo e il valore massimo. L'espressione media dell'mRNA del TLR2 era 20 volte maggiore nei cani malati rispetto ai controlli. p: 0,001 (McMahon et al., 2010).

Il pastore tedesco è una razza predisposta ad enteropatie croniche; in questa razza è stato effettuato uno studio che ha evidenziato un aumento del TLR4 a livello di duodeno, ileo e colon nei cani con enteropatia cronica, mentre è stato riscontrato un abbassamento dei livelli di TLR5 (Fig.5)(K. Allenspach et al., 2010).Questo è in contrasto con la sovraregolazione relativa agli altri TLRs. Nel topo e nell'uomo l'espressione del TLR5 è elevata nei soggetti sani, in particolare sulle cellule dendritiche CD11+ (Uematsu et al., 2008); è probabile che questo fenotipo di cellule dendritiche (DC) provochi l'attivazione dei linfociti T regolatori e stimoli la produzione di citochine antiinfiammatorie. Inoltre, quando è presente infiammazione intestinale, le CD11+ esprimono bassi livelli di TLR5 (Uematsu & Akira, 2009).

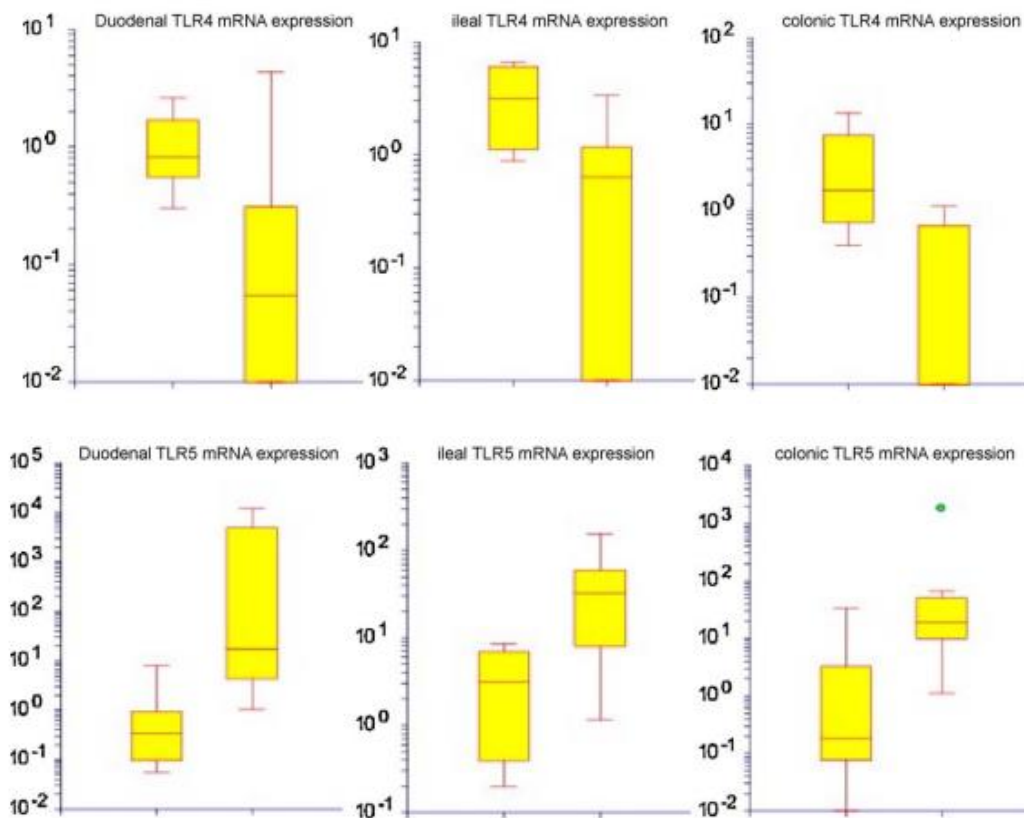


Fig.5

Box & whiskers plot dell'espressione relativa dell'mRNA del Toll Like Receptor 4 (in alto) e del Toll Like Receptor 5 (in basso) in diversi tratti dell'intestino. In ogni grafico vengono confrontati i risultati ottenuti in cani di razza Pastore tedesco (a sinistra), con quelli di cani sani di controllo (a destra). La parte superiore e inferiore del riquadro rappresentano rispettivamente il 75° e il 25° percentile, la linea centrale rappresenta la mediana e i baffi rappresentano il 95° e il 5° percentile. TLR4 duodeno: p:0,006. TLR4 ileo: p:0,02. TLR4 colon: p:0,0009. TLR5 duodeno: p:0,0007. TLR5 ileo: p:0,02. TLR5 colon: p:0,002 (K. Allenspach et al., 2010).

In cani affetti da colite linfo-plasmacellulare idiopatica, una comune forma di IBD, è stato riscontrato un aumento significativo dell'espressione dell'mRNA del recettore NOD2, un recettore appartenente alla famiglia dei PRRs. In particolare, l'espressione dell'mRNA del recettore NOD2 appariva aumentata del 63% nei cani malati rispetto a quelli sani (Fig.6). Normalmente il recettore NOD2 mostra una

bassa reattività alla microflora commensale, contribuendo a mantenere uno stato di omeostasi intestinale. Gli autori dello studio hanno provato a ipotizzare il meccanismo patogenetico che sta alla base dell'instaurarsi dello stato infiammatorio: nei cani con colite linfo-plasmacellulare i recettori NOD2 sovraregolati causano un aumento del riconoscimento del peptidoglicano, dando inizio all'infiammazione; quindi, l'intestino non è più in grado di tollerare i prodotti dei batteri luminali, la barriera intestinale viene compromessa permettendo l'invasione batterica e viene indotta una ulteriore espressione dell'mRNA di NOD2. Non è chiaro se l'infiammazione sia causata dall'attivazione dei NOD2 mucosali o dal reclutamento di cellule infiammatorie che esprimono il NOD2. (Okanishi H, 2013).

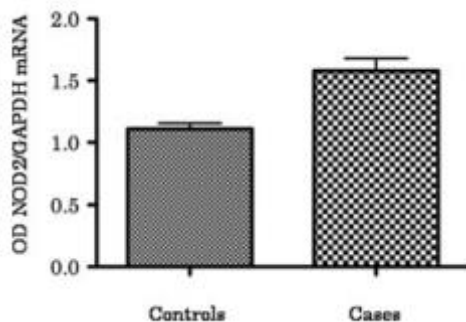


Fig.6

Istogramma rappresentante l'espressione dell'mRNA del recettore NOD2 nei cani sani e nei cani affetti da colite linfo-plasmacellulare. p: 0,019. Gli istogrammi indicano la media, le barre verticali la deviazione standard (Okanishi H, 2013).

Un altro recettore appartenente alla famiglia dei PRRs è il RAGE (*receptor of advanced glycation end product*), un recettore in grado di riconoscere diversi ligandi e che alcuni studi nell'ambito della Medicina umana hanno suggerito poter essere coinvolto nello sviluppo di un quadro infiammatorio cronico in caso di IBD; è stato dimostrato che l'interazione tra il recettore e un determinato ligando è in

grado di causare l'attivazione di un *pathway* di segnalazione intra-cellulare, compresa l'attivazione del fattore NF-Kappa β e quindi l'innescamento di una risposta infiammatoria (Bierhaus et al., 2005). Il *receptor of advanced glycation end product* solubile o sRAGE è una variante del RAGE e funziona come un recettore escita, sequestrando i ligandi e impedendo di conseguenza l'interazione tra i ligandi e il RAGE sulla superficie cellulare; nell'uomo è stato dimostrato un decremento nella concentrazione di *receptor of advanced glycation end product* solubile (sRAGE) in concomitanza di uno stato di IBD (Meijer et al., 2014) .

Per quanto riguarda la Medicina Veterinaria, uno studio analogo è stato effettuato ed ha portato alla luce risultati simili. È stata dimostrata una minore concentrazione sierica di *receptor of advanced glycation end product* solubile (sRAGE) nei cani con diagnosi di IBD rispetto ai cani sani, suggerendo che, così come negli esseri umani, ci possa essere una correlazione tra il rapporto RAGE/sRAGE e lo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico gastrointestinale. La minor concentrazione di sRAGE circolante potrebbe essere la causa di una maggior interazione tra il RAGE e i ligandi, causando così una condizione favorente la risposta infiammatoria. Nei pazienti in cui c'è stata una remissione completa dei sintomi si evidenzia un aumento della concentrazione sierica di sRAGE, e questo può suggerire l'ipotesi che l'interazione tra ligando e sRAGE possa inibire la risposta pro-infiammatoria del RAGE, attribuendo così al sRAGE un ruolo antiinfiammatorio (Fig.7) (Romy M Heilmann, 2014).

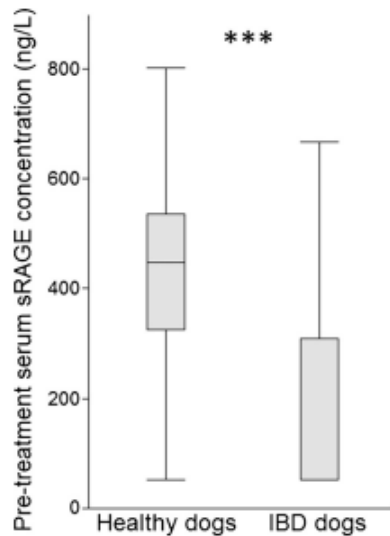


Fig.7

Box & whiskers plot del confronto tra le concentrazioni sieriche di sRAGE tra cani affetti da IBD e cani sani di controllo. La parte superiore e inferiore del riquadro rappresentano rispettivamente il 3° e il 1° quartile, la linea centrale rappresenta la mediana e i baffi rappresentano il valore minimo e il valore massimo. ***p: 0,0003 (K., 2011).

Uno studio più recente ha confermato che l'enteropatia cronica nei cani è correlata a una diminuzione del sRAGE sierico, suggerendo un'alterazione del rapporto RAGE/sRAGE (Angela Isabel Cabrera-García, 2020).

Quello che emerge dai vari studi sopracitati è il ruolo attivo del sistema immunitario innato nell'innescare una risposta infiammatoria e di conseguenza contribuire allo sviluppo di una enteropatia cronica, in particolare tramite l'attivazione aberrante dei PRRs e delle vie di segnalazione intracellulari sottostanti. La sovraregolazione dei PRRs, potenzialmente dovuta a difetti dell'immunità innata, e la conseguente alterazione nell'omeostasi della flora microbica, sembrano essere un elemento chiave nello sviluppo di una enteropatia cronica (CE).

5.2 Genetica.

Nell'uomo è già chiaro da tempo il ruolo che hanno le mutazioni di alcuni PRR, in particolare il TLR 4 e il NOD 2, nello sviluppo di IBD (Kaser & Pasaniuc, 2014)).

Nel cane è sempre stata sospettata una causa genetica alla base delle enteropatie infiammatorie croniche; infatti, i clinici hanno sempre riscontrato una predisposizione allo sviluppo della patologia in alcune razze. Uno studio effettuato nel Regno Unito su un campione di 546 cani con diagnosi di IBD ha evidenziato come alcune razze siano più rappresentate, in particolare Labrador Retriever, Boxer, Rottweiler, Border Collie, Staffordshire Bull-terrier, Cocker Spaniel, Golden Retriever, West Highland white terrier, Weimaraner e Jack Russell terrier (Kathrani, Werling, et al., 2011)(Kathrani, Werling, et al., 2011)(Kathrani, Werling, et al., 2011). In realtà, la razza più predisposta allo sviluppo di enteropatie croniche è il Pastore Tedesco, nel quale è stata dimostrata un'associazione tra polimorfismi dei geni responsabili del TLR4 e del TLR5 e lo sviluppo di IBD. In particolare, il G22A SNP (*single nucleotide polymorphism*) nel TLR5 è associato in modo significativo con enteropatia cronica (CE), mentre altri due *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) hanno un ruolo protettivo. Altri due SNPs nel TLR4 sono significativamente associati a CE (Kathrani et al., 2010). Successivamente si è cercato di capire se anche in altre razze fosse possibile dimostrare un'associazione di questo tipo; uno studio ha riscontrato come 2 SNPs del TLR5 (C100T e T1844C) potrebbero avere un ruolo protettivo nello sviluppo di CE in 38 razze diverse (Kathrani, House, et al., 2011) .

Per determinare il ruolo funzionale dei SNPs del TLR5 canino sono stati trasferiti gli aplotipi cosiddetti rischio-associati e rischio-protettivi in cellule embrionali renali umane, ed è stata valutata l'attivazione del fattore nucleare K-beta (NF-κB) e la produzione di CXCL8 dopo la stimolazione. Grazie a questo studio è stato possibile dimostrare una iperreattività alla flagellina in seguito al trasferimento

dell'aplotipo rischio-associato rispetto all'aplotipo rischio-protettivo. Questa iperreattività potrebbe essere responsabile, a livello patogenetico, dello sviluppo di una infiammazione aberrante, e questo spiegherebbe in parte la componente genetica. Una barriera intestinale danneggiata potrebbe determinare un maggior contatto tra la flagellina e il TLR5, aumentando così l'infiammazione della mucosa nei soggetti con aplotipo rischio-associato. Al contrario, i portatori dell'aplotipo rischio-protettivo dovrebbero essere meno suscettibili allo sviluppo di una IBD. Bloccando la risposta eccessiva alla flagellina, si potrebbe potenzialmente inibire lo sviluppo dell'infiammazione (Kathrani Aarti AND Holder, 2012)

Un altro studio riguardante il Pastore Tedesco ha permesso di identificare una associazione tra IBD e un *locus* del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe 2, il cosiddetto Dog Leukocyte Antigen (DLA). All'interno di questo locus sono stati identificati quattro geni funzionali che codificano per le catene alfa e beta delle proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II che sono coinvolte nella presentazione dell'antigene ai linfociti T CD4+ (Peiravan et al., 2016)). Un'analisi mutazionale del gene NOD2 è stata effettuata in 10 pastori tedeschi con IBD e ciò ha permesso di identificare 4 SNPs del NOD2 significativamente associati con IBD (Kathrani et al., 2014). Nel 2018 uno studio si è posto come obiettivo l'identificazione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) che possano conferire suscettibilità o resistenza genetica all'IBD, utilizzando una metodica che permette di analizzare l'intero genoma (*genome-wide association study*, GWAS); sono stati identificati 16 geni candidati potenzialmente associati all'IBD nel pastore tedesco (Peiravan Atiyeh AND Bertolini, 2018). Questi studi dimostrano che, all'interno dei numerosi fattori che intervengono nella patogenesi delle enteropatie croniche, si deve considerare anche una base genetica, che può predisporre insieme ad altri fattori alla comparsa di una sintomatologia coerente con IBD.

5.3 Microbiota intestinale.

Tra i fattori che intervengono nella patogenesi di una enteropatia infiammatoria cronica non si deve dimenticare la flora microbica intestinale; quest'ultima è composta da vari microorganismi, tra cui batteri, virus, archeobatteri e organismi eucarioti. La componente batterica è quella più ampia ed è quella che interviene maggiormente nella funzione digestiva. Un cambio nella composizione della flora microbica viene definito disbiosi ed è alla base di diverse patologie di interesse veterinario, tra cui l'IBD, in quanto ha anche effetti significativi sulla risposta immunitaria, regolando la produzione locale di anticorpi e la differenziazione dei precursori dei linfociti T-Helper intestinali (Pilla & Suchodolski, 2021). Il microbiota intestinale svolge un ruolo cruciale nel mantenimento della salute dell'ospite. Agisce come una barriera difensiva contro i patogeni, supporta l'ospite nella digestione e nella produzione di energia dalla dieta, stimola il sistema immunitario e fornisce nutrimento e supporto agli enterociti (Suchodolski, 2011). I cani con CE presentano una tipica disbiosi, che può essere valutata utilizzando metodi di analisi molecolare per studiare il genoma batterico trovato in biopsie intestinali e feci. Questa disbiosi sembrerebbe essere una conseguenza oltre che un potenziale fattore perpetuante della malattia (Allenspach & Mochel, 2020). Uno studio ha confrontato il microbiota fecale di cani sani, cani con diarrea acuta non emorragica, cani con diarrea acuta emorragica e cani con IBD attiva e controllata tramite terapia, in assenza di segni clinici. I risultati indicano differenze nel microbiota fecale tra i cani con diverse malattie gastrointestinali. I gruppi batterici che erano comunemente diminuiti durante gli episodi diarroici sono considerati importanti produttori di acidi grassi a catena corta e possono essere importanti per la salute intestinale del cane (Suchodolski et al., 2012). I risultati di un altro studio hanno evidenziato significative differenze nella composizione del

microbiota duodenale tra cani con IBD e cani sani. Non è stato identificato un singolo *phylum* chiaramente associato a IBD, nonostante i batteri del *phylum Proteobacteria* abbiano mostrato l'associazione più significativa. (Suchodolski et al., 2010). È stata dimostrata una diminuzione di *Faecalibacterium spp.* e *Turicibacter spp.* in cani affetti da IBD (Vázquez-Baeza et al., 2016); un aumento di *Escherichia coli* e *Streptococcus spp.* (Minamoto et al., 2014; White et al., 2017); una diminuzione di *Clostridium hiranonis* (Vázquez-Baeza et al., 2016). Quest'ultimo è di particolare interesse, perché una sua diminuzione può suggerire un metabolismo alterato degli acidi biliari, come è già stato dimostrato nell'uomo e anche in uno studio pilota nella specie canina (Duboc et al., 2013; Guard & Suchodolski, 2016). Per cercare di quantificare e standardizzare le alterazioni della flora microbica intestinale è stato sviluppato un indice di disbiosi (Fig.8), utile soprattutto per valutare la risposta ad un trattamento. In questo studio è stato dimostrato che la quantità di determinati gruppi batterici variava tra cani sani e cani affetti da CE; la quantità dei diversi gruppi batterici è stata misurata tramite PCR, e i risultati sono stati combinati attraverso un algoritmo matematico, tramite il quale si ottiene l'indice di disbiosi, che permette di visualizzare i dati in modo più completo rispetto alla valutazione di ogni gruppo batterico singolarmente. Sono stati scelti solamente 7 taxa (*Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *Streptococcus*, *E. coli*, *Blautia*, *Fusobacterium* and *C. hiranonis*) tramite metodiche statistiche, in modo tale da garantire la massima specificità e sensibilità. I campioni sono stati divisi in due gruppi. Il primo gruppo è stato usato come prova e consisteva di 36 campioni sani e 55 malati. Il secondo gruppo è stato utilizzato come gruppo di convalida e consisteva in campioni ottenuti da un gruppo distinto di 59 cani sani e 51 cani malati. L'indice di disbiosi è un valore numerico che misura la vicinanza del campione di prova alla media di ogni classe (sani e malati). Un valore uguale a zero significa che il campione di prova si trova alla stessa distanza dal centro di entrambe le classi. Più alto è il valore numerico, maggiore è la differenza dalla normobiosi e di conseguenza la disbiosi. Un valore numerico negativo indica normobiosi. (AlShawaqfeh et al., 2017).

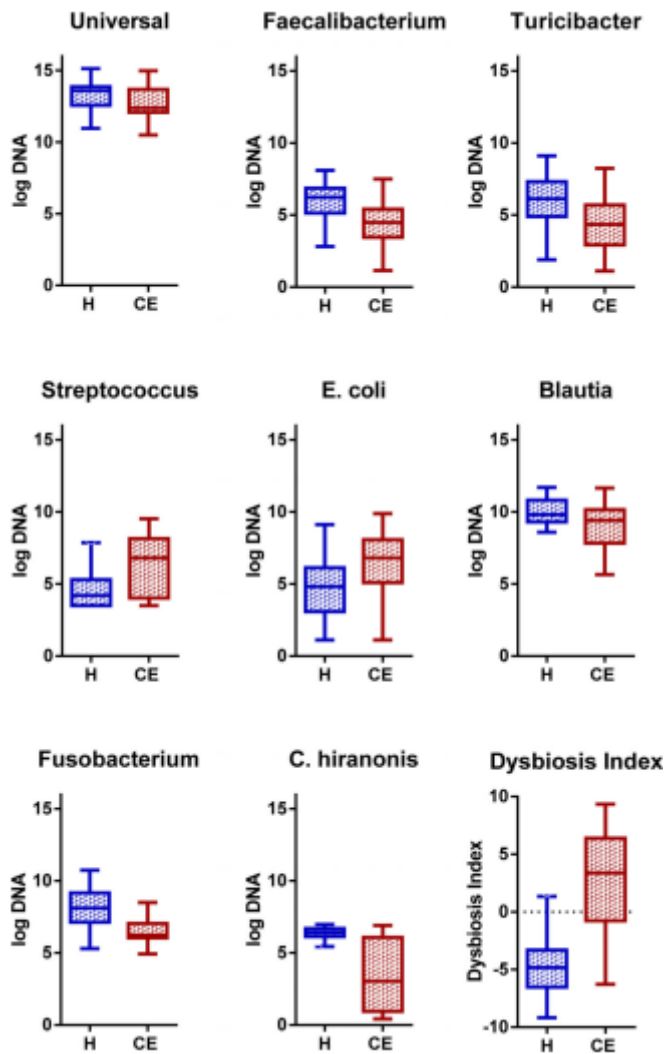


Fig.8

Box & whiskers plots indicanti i risultati delle PCR quantitative effettuate per i 7 gruppi batterici scelti e per i batteri totali, nei cani sani (H) e nei cani con IBD (CE). Da questo, è stato possibile ricavare l'indice di disbiosi. La parte superiore e inferiore del riquadro rappresentano rispettivamente il 3° e il 1° quartile, la linea centrale rappresenta la mediana e i baffi rappresentano il valore minimo e il valore massimo. $p < 0,001$ (AlShawaqfeh et al., 2017).

6. Segni clinici.

I segni clinici nei cani affetti da una enteropatia cronica possono variare da manifestazioni molto leggere fino a situazioni con sintomi più eclatanti, e in alcuni casi possono compromettere la vita del paziente se non trattati; inoltre, solitamente, presentano un andamento altalenante caratterizzato da periodi di stabilità seguiti da peggioramenti, a volte in conseguenza di un evento precipitante (stress, infezione gastrointestinale acuta o cambiamenti nella dieta). La gravità dei segni clinici non è in grado di predire la risposta al trattamento e non è correlata alla gravità della patologia. I segni clinici più comuni in presenza di una enteropatia cronica sono: diarrea, vomito, perdita di peso, alterazioni dell'appetito. In più possono essere presenti dolore/fastidio addominale, borborigmi e flatulenze eccessive, ispessimento delle anse intestinali, ipoproteinemia, ascite (Jorg M. Steiner, 2008; Robert J. Washabau & Michael J. Day, 2013; Stephen J. Ettinger et al., 2019)

La diarrea è uno dei segni clinici più comuni nei pazienti affetti da una enteropatia cronica, soprattutto nel cane, mentre nel gatto, generalmente, il sintomo più evidente è il vomito. Si definisce diarrea l'emissione di feci contenenti un'eccessiva quantità di acqua, che può derivare da un diminuito assorbimento intestinale e/o da una aumentata eliminazione intestinale. Dal punto di vista fisiopatologico distinguiamo una diarrea secretoria, una diarrea osmotica, una diarrea da alterata permeabilità ed una diarrea causata da disturbi della motilità intestinale. La diarrea può essere acuta o cronica e si definisce cronica quando ha una durata di 2-3 settimane. La diarrea acuta e autolimitante è un problema comune nel cane e nel gatto e, generalmente, ci si approccia tramite indagini diagnostiche poco invasive e terapie semplici, che spesso portano alla risoluzione dei sintomi, al contrario della diarrea cronica, che invece rappresenta una condizione più impegnativa sia dal punto di vista diagnostico che dal punto di vista terapeutico.

È importante considerare però che l'eventuale assenza di diarrea non è sufficiente per escludere un processo patologico a carico dell'intestino tenue; questo è comprensibile considerando che la porzione di intestino successiva al tenue è il colon, che ha una grande capacità di riassorbimento, di conseguenza, una malattia dell'intestino tenue causa diarrea solo se il materiale che transita nell'ileo supera la capacità assorbente del colon. Al contrario, una patologia coinvolgente l'intestino crasso provoca diarrea in ogni caso, poiché non esiste alcun segmento successivo di intestino in grado di limitare le perdite di acqua.

In base alla consistenza e alla frequenza di emissione delle feci, alla presenza o meno di sangue o muco, tenesmo o dischezia, il clinico può farsi un'idea di quale porzione di intestino sia interessata dalla patologia, in particolare può distinguere una malattia dell'intestino tenue da una dell'intestino crasso. Ovviamente è necessario considerare che una compartimentalizzazione così netta è soprattutto teorica, e spesso nella pratica clinica ci si trova davanti a situazioni in cui entrambe le porzioni di intestino sono coinvolte e non è possibile distinguere l'origine della diarrea; nonostante ciò, il reperimento di alcuni segni clinici particolari, come quelli elencati in tabella 2, possono aiutare il clinico ad individuare la localizzazione, che poi, se necessario, sarà confermata con ulteriori indagini diagnostiche più approfondite.

Tabella 2.

Sintomi clinici di una malattia dell'intestino tenue e dell'intestino crasso (Stephen J. Ettinger et al., 2019)

Segni	Malattia dell'intestino tenue	Malattia dell'intestino crasso
<i>Volume delle feci</i>	Grande	Piccolo
<i>Muco</i>	Raro	Comune
<i>Sangue</i>	Melena	Sangue fresco
<i>Grasso</i>	A volte	Assente
<i>Colore</i>	Variabile	Normale
<i>Cibo indigerito</i>	Occasionale	Assente
<i>Tenesmo</i>	Raro	Comune
<i>Frequenza</i>	Due-tre volte al giorno	Più di tre volte al giorno
<i>Urgenza dello stimolo</i>	Comune	Comune
<i>Vomito</i>	Qualche volta	Non comune
<i>Gas</i>	Qualche volta	Assente
<i>Dimagrimento</i>	Comune	Raro

La diarrea secondaria ad una patologia dell'intestino tenue è generalmente profusa, associata a perdita di peso ed occasionalmente vomito; l'intestino tenue è deputato all'assorbimento di nutrienti e quindi, quando è affetto da una patologia, ci si aspetta un deperimento delle condizioni generali. Generalmente nei cani affetti da IBD è la tipologia di diarrea più comune, mentre più raramente si riscontra diarrea secondaria ad un processo patologico del grosso intestino. La diarrea dell'intestino crasso è solitamente caratterizzata da piccole quantità di

feci, spesso mescolate con muco e/o sangue fresco (ematochezia), frequente defecazione con urgenza e tenesmo. Questi segni riflettono una mancata funzionalità del colon che si manifesta con una diminuita capacità di riassorbimento dell'acqua e di stoccaggio delle feci. L'ematochezia è dovuta ad un danno alla mucosa, mentre l'infiammazione è la causa della presenza eccessiva di muco.

Tutte queste caratteristiche possono essere utilizzate per creare dei sistemi di valutazione delle feci, assegnando dei punteggi in base alla consistenza e agli altri attributi; in questo modo è possibile creare una sorta di standardizzazione per la valutazione qualitativa del materiale fecale, che può rivelarsi utile anche al proprietario nel momento in cui si deve interfacciare con il clinico. Sono stati proposti diversi metodi di classificazione tramite punteggi, ma ad oggi non esiste una metodologia validata ed utilizzata dalla comunità scientifica.

Per esempio, nell'ambito di uno studio che si è proposto di valutare la risposta alla tilosina in cani con diarrea cronica, è stato implementato un sistema di punteggio fecale, con l'intento di classificare la consistenza delle feci attraverso dei valori numerici. In questo sistema (Tabella 3) la consistenza fecale viene valutata su una scala di 9 punti, da 1 (dura e friabile) a 5 (diarrea acquosa), con incrementi di mezzo punto. (Westermarck et al., 2005)

Tabella 3.

Sistema di valutazione della consistenza delle feci a punteggio (Westermarck et al., 2005)

Grado	Descrizione
1	Duro, secco e friabile; <i>“bullet-like”</i>
1.5	Duro e secco.
2	Ben formato; non lascia segni quando viene raccolto; <i>“kickable”</i>
2.5	Ben formato con superficie leggermente umida, che lascia un segno quando viene raccolto; "quasi appiccicoso al tatto"
3	Umido, comincia a perdere la forma, lascia un segno evidente quando viene raccolto.
3.5	Molto umido, ma ha ancora qualche forma definita.
4	La maggior parte della forma è persa, scarsa consistenza, viscoso.
4.5	Diarrea con alcune parti di maggiore consistenza.
5	Diarrea acquosa.

Il vomito è un segno clinico che può essere presente nei cani con CE, sebbene sia meno frequente e non rappresenti il sintomo principale; è un riflesso che protegge l'organismo dall'ingestione di sostanze tossiche o nocive tramite la chiusura coordinata del rino-faringe e della glottide. Esso può trarre origine da una via cosiddetta umorale, a causa di sostanze presenti nel sangue che vanno a stimolare la zona chemorecettoriale (CRTZ, *chemoreceptor trigger zone*) situata nel midollo allungato, oppure da una via neurale, innescata dalla stimolazione del centro del vomito da parte dei neuroni vagosimpatici, vestibolari, cerebrali o della

chemoreceptor trigger zone (CRTZ) (Alex Gallagher, 2019). Il contenuto e l'aspetto del vomito, la relazione con il pasto, la presenza di nausea e inappetenza sono informazioni necessarie che possono aiutare a localizzare la patologia (disordine sistemico, patologia gastrica, patologia esofagea).

Un altro segno clinico che può essere presente è la perdita di peso, che può essere dovuta a diminuito apporto calorico, aumentati fabbisogni metabolici, aumentato consumo energetico, incapacità di utilizzare le calorie ingerite e inappetenza. Nel caso di un cane affetto da IBD, la perdita di peso può essere causata dalla presenza di nausea, perdita di proteine nel lume intestinale, maldigestione e malassorbimento; è un ritrovamento tipico quando è affetto l'intestino tenue, ma può essere presente anche con una patologia del grosso intestino.

Un cane affetto da IBD può mostrare cambi nell'appetito e nelle abitudini alimentari; può essere presente polifagia associata a dimagrimento, mentre l'anoressia è più frequente nei casi più gravi. Si può verificare un maggiore consumo di erba, anche se viene considerato un segno piuttosto aspecifico perché è un meccanismo utilizzato dall'animale per indurre il vomito quando è presente nausea.

Nei casi in cui c'è perdita di proteine nel lume intestinale ci sarà ipoproteinemia, che potrebbe causare ascite ed edemi periferici (Jergens, 2012; Jorg M. Steiner, 2008; Robert J. Washabau & Michael J. Day, 2013; Stephen J. Ettinger et al., 2019). Occasionalmente si può riscontrare la presenza di prurito, in particolare nelle forme responsive alla dieta, anche se ad oggi non è stata dimostrata nessuna correlazione (Gaschen & Merchant, 2011).

In questo studio retrospettivo (Craven et al., 2004), in cui sono stati valutati 80 cani con diagnosi di IBD, i sintomi più comuni sono rappresentati da diarrea, vomito e perdita di peso (Fig.9).

Clinical sign*	Upper n=22 (per cent)	Lower n=32 (per cent)	Diffuse n=26 (per cent)
Vomiting	15 (68)	16 (50)	19 (73)
Diarrhoea	13 (59)	29 (91)	23 (89)
Haematochezia	3 (14)	19 (59)	14 (54)
Frequency†	1(5)	17 (53)	9 (35)
Mucus	3 (14)	26 (81)	16 (62)
Tenesmus	1 (5)	12 (38)	12 (46)
Melaena	1 (5)	1 (3)	2 (77)
Haematemesis	2 (9)	0	3 (12)
Weight loss	11 (50)	12 (38)	13 (50)
Polyphagia	4 (18)	2 (6)	4 (15)
Inappetence	2 (9)	9 (28)	5 (19)

*Most animals had multiple clinical signs
†Increased frequency of defecation

Fig.9

Segni clinici evidenziati in 80 cani affetti da IBD, riportati in funzione della porzione di intestino interessata. La classificazione della patologia in base al sito interessato è stata effettuata tramite istologia (Craven et al., 2004). Upper: intestino tenue. Lower: intestino crasso. Diffuse: coinvolgimento di entrambe le porzioni.

Un altro studio effettuato su 70 cani divisi in 3 gruppi (diarrea rispondente alla dieta, diarrea rispondente a trattamenti immunosoppressivi e enteropatia proteino-disperdente), 30 avevano segni clinici relativi al coinvolgimento dell'intestino tenue, 26 dell'intestino crasso e 14 di entrambi. I segni relativi al grosso intestino erano più comuni nei cani con diarrea responsiva alla dieta (Fig.10) (K. Allenspach et al., 2007)

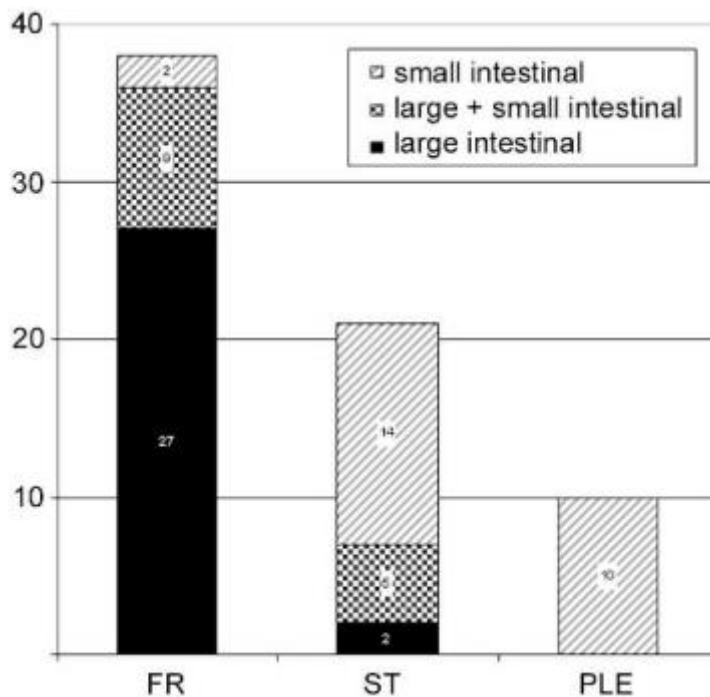


Fig.10

Istogramma in cui viene rappresentato il numero di cani in ogni gruppo che presentano segni relativi al piccolo intestino, al grosso intestino o ad entrambi. FR: gruppo rispondente alla dieta. ST: gruppo rispondente a trattamento immunosoppressivo. PLE: gruppo con perdita di proteine (K. Allenspach et al., 2007)

In uno studio retrospettivo che ha preso in considerazione 99 cani con diagnosi di CE, di cui 21 di razza Shiba-inu, è emerso che la perdita di peso moderata/grave e la diarrea sono risultati essere sintomi comuni sia negli Shiba-inu che nelle altre razze. L'anoressia è stata osservata frequentemente nei cani di razza Shiba-inu, mentre vomito e ascite risultavano più comuni nelle altre razze (Fig.11). In ogni caso, non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda i sintomi tra cani di razza Shiba-inu e i cani delle altre razze (OHMI et al., 2011).

	Shiba group (n=21)	n	Non-Shiba group (n=77)	n	P
Signalment					
Gender, M : MC : F : FS	9 : 5 : 7 : 0	21	30 : 9 : 18 : 20	77	ND
Male : Female ratio		2 : 1	21	1.03 : 1	770.2239
Age, median (range)	4.9 years (1.3–13.9 years)	21	7.0 years (0.8–13.6 years)	77	0.1009
Clinical signs and symptoms					
Degree of weight loss, median (range)	20% (6–35%)	14	21% (5–45%)	42	0.4663
Vomit, n (%)	7 (33%)	21	41 (53%)	77	0.1407
Diarrhea, n (%)	19 (90%)	21	68 (88%)	77	1
Anorexia, n (%)	12 (57%)	21	29 (38%)	77	0.1367
Lethargy, n (%)	9 (43%)	21	36 (47%)	77	0.8087
Ascites, n (%)	3 (14%)	21	28 (36%)	77	0.066
Pruritus, n (%)	2 (10%)	21	7 (9%)	77	1

Fig.11

Segnalamento e segni clinici nei cani di razza Shiba-inu e nei cani non di razza Shiba-inu. Tutti i cani presentavano una diagnosi di CE. Non sono emerse differenze significative nei sintomi tra cani di razza Shiba-inu e i cani di altre razze. M. maschio. MC: maschio castrato. F: femmina. FS: femmina sterilizzata (OHMI et al., 2011).

Il decorso clinico dell'IBD nei cani è caratterizzato da esacerbazioni e remissioni spontanee dei sintomi, il che rende difficile valutare la gravità della malattia. Per questo motivo è stato sviluppato un indice di valutazione che permette di dare un punteggio numerico alla gravità della malattia, il cosiddetto *canine IBD activity index* (CIBDAI), e di conseguenza eseguire una standardizzazione che può essere utile al clinico. In pratica, vengono presi in considerazione i principali aspetti clinici della patologia e per ognuno di essi si fornisce un punteggio da 0 a 3 a seconda della gravità; i segni clinici presi in considerazione sono l'atteggiamento/attività, l'appetito, il vomito, la consistenza delle feci, la frequenza di emissione delle feci e la perdita di peso. La somma dei punteggi fornisce un valore numerico che rifletterà la gravità della malattia (Jergens et al., 2003).

CIBDAI, *Canine inflammatory bowel disease activity index* (Jergens et al., 2003).

Atteggiamento/attività

0. Normale
1. Leggermente diminuito
2. Moderatamente diminuito
3. Gravemente diminuito

Appetito

0. Normale
1. Leggermente diminuito
2. Moderatamente diminuito
3. Gravemente diminuito

Vomito

0. Normale
1. Leggero (1 volta a settimana)
2. Moderato (2-3 volte a settimana)
3. Grave (più di 3 volte a settimana)

Consistenza delle feci

0. Normale
1. Feci leggermente morbide
2. Feci molto morbide
3. Diarrea acquosa

Frequenza di emissione delle feci

0. Normale
1. Leggermente aumentata (2-3 volte al giorno) o presenza di sangue, muco o entrambi.
2. Moderatamente aumentata (4-5 volte al giorno)
3. Gravemente aumentata (più di 5 volte al giorno)

Perdita di peso

0. Assente
1. Leggera (5%)
2. Moderata (5-10%)
3. Grave (più del 10%)

Totale: 0-3: clinicamente insignificante

4-5: leggero

6-8: moderato

>/= 9: grave

Successivamente questo indice è stato aggiornato tramite l'inserimento di altri tre parametri, ossia il livello di albumina sierica, la presenza di ascite ed edemi periferici e la presenza di prurito (*canine chronic enteropathy clinical activity index*, CCECAI)(Allenspach et al., 2007)(Allenspach et al., 2007)(Allenspach et al., 2007).

CCECAI, *Canine chronic enteropathy clinical activity index* (Allenspach et al., 2007)

Atteggiamento/attività

0. Normale
1. Leggermente diminuito
2. Moderatamente diminuito
3. Gravemente diminuito

Appetito

0. Normale
1. Leggermente diminuito
2. Moderatamente diminuito
3. Gravemente diminuito

Vomito

0. Normale
1. Leggero (1 volta a settimana)
2. Moderato (2-3 volte a settimana)
3. Grave (più di 3 volte a settimana)

Consistenza delle feci

0. Normale
1. Feci leggermente morbide
2. Feci molto morbide
3. Diarrea acquosa

Frequenza di emissione delle feci

0. Normale
1. Leggermente aumentata (2-3 volte al giorno) o presenza di sangue, muco o entrambi.
2. Moderatamente aumentata (4-5 volte al giorno)
3. Gravemente aumentata (più di 5 volte al giorno)

Perdita di peso

0. Assente
1. Leggera (5%)
2. Moderata (5-10%)
3. Grave (più del 10%)

Albumina sierica

0. >20 g/L
1. 15-19,9 g/L
2. 12-14,9 g/L
3. <12 g/L

Ascite ed edemi periferici

0. Assente
1. Leggera ascite/edemi periferici
2. Moderata ascite/edemi periferici
3. Grave ascite/edemi periferici e versamento pleurico

Prurito

0. Assente
1. Episodi occasionali di prurito
2. Episodi regolari di prurito che si interrompono durante il sonno
3. Il cane si sveglia regolarmente a causa del prurito

Totale: 0-4: clinicamente insignificante

5-6: leggero

7-9: moderato

10-12: grave

>12: estremamente grave

7. Diagnosi.

La diagnosi di IBD si basa su un'attenta anamnesi e sulla valutazione dei segni clinici, ma soprattutto necessita di diverse indagini diagnostiche che permettono di escludere altre cause di diarrea (Tabella 4);

Tabella 4.

Diagnosi differenziali della diarrea cronica del piccolo e del grosso intestino.

Categoria	Diarrea del piccolo intestino	Diarrea del grosso intestino
Malattie sistemiche	ipotiroidismo, ipoadrenocorticismo, epatopatia, nefropatia cronica	
Malattie infettive	Giardiasi, criptosporidiosi, elmintiasi, coccidi, micosi	Tricuridiosi, ancilostomiasi, giardiasi, Tricomoniasi, clostridiosi, micosi
Alimentare	Diarrea responsiva alla dieta, ipersensibilità alimentare	Diarrea responsiva alla dieta, ipersensibilità alimentare
Neoplasie	Linfoma, adenocarcinoma, mastocitoma, leiomioma/leiomiosarcoma, polipi adenomatosi.	Linfoma, adenocarcinoma, mastocitoma, leiomioma/leiomiosarcoma, polipi adenomatosi.
Pancreatica	Insufficienza pancreatica esocrina	Colite associata alla pancreatite
Altre	Intussuscezione, IBD, sindrome da ipercrescita batterica, linfangectasia, farmaci, tossine	Colite ulcerativa istiocitaria, sindrome del colon irritabile, farmaci, tossine

È possibile ottenere la conferma della diagnosi unicamente tramite la rilevazione di una popolazione leucocitaria indicativa di un'inflammatione a livello istopatologico, dopo aver escluso le possibili diagnosi differenziali e non aver identificato una chiara causa sottostante.

L'esame emocromocitometrico completo e un profilo biochimico possono rivelarsi utili, nonostante non esistano variazioni patognomiche indicative di IBD, per valutare lo stato generale del paziente e per iniziare ad escludere patologie sistemiche e metaboliche. Nell'iter diagnostico è importante effettuare un esame coprologico in modo tale da escludere la presenza di parassiti, come *Ancylostoma spp.*, *Uncinaria spp.*, *Trichuris spp.*, *Giardia spp.*; generalmente in questi casi, considerando che possono verificarsi dei falsi negativi, il clinico esegue un trattamento antiparassitario empirico. Può essere effettuata una coprocoltura per escludere la presenza di batteri patogeni quali *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* o *Clostridium*.

Può essere utile valutare i livelli sierici di folato e cobalamina, in quanto sono entrambe vitamine idrosolubili la cui concentrazione ematica può subire alterazioni in conseguenza di una situazione di malassorbimento intestinale (Tabella 5).

Tabella 5.

Fattori che influenzano le concentrazioni sieriche di acido folico e cobalamina (Edward J. Hall & Alexander J. German, 2016).

Vitamina	Aumento	Riduzione
Cobalamina	Alto apporto dietetico Integrazione parenterale Malattie epatiche Neoplasie	Carenza dietetica Insufficienza pancreatica esocrina Patologie dell'ileo Metabolismo batterico intestinale
Acido folico	Insufficienza pancreatica esocrina	Carenza dietetica Farmaci

	Emolisi	Patologie della porzione prossimale dell'intestino tenue
	Alto apporto dietetico	
	Metabolismo batterico intestinale	Invecchiamento del campione
	Basso pH intestinale	
	Integrazione parenterale	

L'esame delle urine, in particolare il rapporto proteine/creatinina, può aiutare ad escludere una perdita di proteine di origine renale in cani con ipoalbuminemia

La diagnostica per immagini può fornire ulteriori informazioni. In particolare, la radiografia senza mezzo di contrasto può rivelarsi utile per evidenziare patologie anatomiche intestinali, mentre il mezzo di contrasto è raramente utilizzato perché non fornisce informazioni aggiuntive. L'ecografia addominale può rivelare se la patologia è focale o diffusa e se sono coinvolti altri organi addominali, consente di valutare lo spessore della parete intestinale, anche se l'ispessimento delle anse non è presente in tutti i casi di IBD, e può contribuire a documentare una linfadenopatia mesenterica. Le informazioni ottenute grazie alla diagnostica per immagini consentono inoltre di scegliere la tecnica biotica più appropriata (endoscopia del tratto gastrointestinale superiore o inferiore o laparotomia esplorativa).

Dopo aver eseguito tutto questo iter diagnostico è fondamentale eseguire una biopsia intestinale per dimostrare la presenza di infiammazione. Il metodo meno invasivo è la biopsia endoscopica, che permette anche di valutare macroscopicamente la mucosa intestinale, ma consente di campionare porzioni di tessuto esclusivamente superficiali e di piccole dimensioni e non permette di raggiungere tutti i segmenti dell'intestino; di conseguenza, in alcuni casi si rende necessario effettuare la biopsia tramite laparotomia, nonostante sia una metodica più invasiva e con tempi di guarigione più lunghi, ed esponga il soggetto a maggiori rischi.

7.1 Esame emocromocitometrico e profilo biochimico.

Nei soggetti affetti da IBD è possibile che l'esame emocromocitometrico risulti nella norma; in alcuni casi si riscontra neutrofilia, con o senza deviazione a sinistra, e nei pazienti affetti da enterite linfo-plasmacellulare (LPE) è possibile riscontrare la presenza di linfociti atipici reattivi, inoltre è possibile rilevare la presenza di linfopenia nei casi in cui ci sia linfangectasia o leucogramma da stress. (Robert J. Washabau & Michael J. Day, 2013; Stephen J. Ettinger et al., 2019)

Uno studio recente ha dimostrato che nei cani affetti da IBD il valore del rapporto neutrofili/linfociti (*neutrophil-to-lymphocyte ratio*, NLR) è maggiore rispetto ai cani sani. L'aumento del rapporto neutrofili/linfociti (NLR) pare essere associato a forme più gravi di enteropatia con perdita di proteine e a linfangectasia. Un rapporto neutrofili/linfociti maggiore o uguale a 4.6 può aiutare a distinguere cani con IRE da cani con FRE con una sensibilità del 77% e una specificità del 69% (Benvenuti et al., 2020).

In alcuni casi può essere presente eosinofilia. Tale alterazione non deve essere considerata patognomonica in quanto può essere presente in animali affetti da enterite/gastroenterite eosinofila ma non sempre è presente in soggetti con diagnosi di enterite eosinofila (EE) confermata istologicamente (Stephen J. Ettinger et al., 2019). Il riscontro di una anemia all'esame emocromocitometrico può essere indicativo di un'inflammatione cronica o di un'emorragia cronica; In alcuni studi sono state riportate anemia ferropriva microcitica e ipocromica e trombocitosi (Ristic & Stidworthy, 2002), mentre un altro studio ha rilevato la presenza di trombocitopenia (Craven et al., 2004).

Nemmeno le alterazioni riportate nel profilo biochimico di animali con IBD, possono essere considerate patognomoniche, nonostante possano risultare utili

nell'evidenziare eventuali patologie concomitanti a carico di altri apparati e forniscano informazioni utili nella valutazione prognostica della patologia. Possono essere presenti ipocolesterolemia, indicativa di malassorbimento, ipomagnesiemia e ipocalcemia (Kimmel et al., 2000); l'ipocalcemia può essere associata ad una carenza di vitamina D causata dal malassorbimento intestinale secondario all'infiammazione cronica. La presenza di ipoalbuminemia e l'ipoglobulinemia indicano la perdita di proteine e di conseguenza la presenza di una enterite linfo-plasmacellulare (LPE), inoltre l'ipoalbuminemia è correlata ad una prognosi peggiore; è importante considerare che per confermare una perdita di proteine di origine intestinale è necessario escludere la presenza di significative alterazioni epatiche, la presenza di anemia e di proteinuria. Nel cane, l'infiammazione intestinale cronica può provocare una epatopatia reattiva e di conseguenza un aumento da lieve a moderato (2-4 volte) di alcuni enzimi epatici, in particolare ALT e ALP. Gli enzimi epatici possono essere aumentati anche per il trasporto attraverso la vena porta di tossine e batteri, che possono arrivare al fegato a causa della compromissione della barriera intestinale (Robert J. Washabau & Michael J. Day, 2013; Stephen J. Ettinger et al., 2019)

In alcuni casi è possibile rilevare un aumento dell'azoto ureico ematico (BUN), che può essere indicativo di sanguinamento gastrointestinale e rappresenta un fattore prognostico negativo nei cani con PLE (Kathrani et al., 2019).

La valutazione del cortisolo basale oppure un test di stimolazione con ACTH può escludere una diagnosi di ipoadrenocorticism atipico (Bovens et al., 2014).

Nei cani con PLE in cui si sospetta uno stato di ipercoagulabilità dovuto alla perdita di proteine anticoagulanti può diventare necessaria la conferma tramite una tromboelastografia, che permette di valutare la funzionalità piastrinica, la forza del coagulo e la fibrinolisi (Goodwin et al., 2011).

Uno studio condotto su cani affetti da CE ha rilevato un'alterazione dei livelli del ferro sierico e dell'*unsaturated iron binding capacity* (UIBC), con differenze significative pre e post trattamento. I soggetti dello studio sono stati divisi in 3 gruppi in base alla risposta clinica al trattamento: FRD, ARD, SRD.

Queste alterazioni a carico del metabolismo del ferro potrebbero rivelarsi utili come marker aspecifici di infiammazione intestinale (Marchetti et al., 2010).

7.2 Biomarker sierici nella pratica clinica.

La proteina C reattiva (CRP) è una proteina di fase acuta positiva espressa nel fegato che aumenta nel caso di infiammazione, infezione o neoplasia; in un soggetto affetto da una CE spesso è aumentata ed è stata dimostrata una correlazione con il *canine inflammatory bowel disease activity index* (CIBDAI), in particolare la concentrazione sierica di CRP è significativamente aumentata nei cani con punteggio CIBDAI maggiore o uguale a 5, che corrisponde ad un grado lieve della patologia (Jergens et al., 2003). La CRP si è rivelata utile non tanto per quanto riguarda la diagnosi, ma soprattutto per lo studio della progressione della patologia e della risposta al trattamento. Alcuni studi hanno dimostrato che valori di CRP 2.7 volte superiori ai valori normali possono essere considerati clinicamente utili (Carney et al., 2011). Una concentrazione di CRP maggiore o uguale a 9.1 mg/L ha permesso di distinguere cani affetti da SRE o NRE da cani affetti da FRE o ARE con una sensibilità del 72% e una specificità del 100% (Heilmann et al., 2018).

La Lipasi canina pancreatico-specifica (cPLI) viene generalmente valutata nei cani con sospetto di pancreatite; nonostante questo, uno studio ha evidenziato che alcuni dei cani affetti da IBD presentavano aumentati livelli di lipasi canina pancreatico-specifica (cPLI) sierica. Il significato da attribuire a questo reperto è ad oggi sconosciuto, è stato però ipotizzato che potrebbe essere dovuto allo sviluppo di una pancreatite associata a IBD. La valutazione del cPLI può rivelarsi

utile nei cani affetti da IBD poiché un aumento del valore è associato ad una prognosi peggiore (Kathrani et al., 2009).

Lo stato di malassorbimento intestinale spiega la presenza di bassi livelli di folato e cobalamina a livello sierico; i danni a carico della mucosa del tratto prossimale dell'intestino tenue causano malassorbimento del folato, mentre danni a carico del segmento distale causano malassorbimento della cobalamina. La riduzione di questi due valori, pur non essendo patognomica, indica uno stato di malassorbimento intestinale; inoltre, un basso livello di cobalamina sierica è associato ad una prognosi peggiore e necessita di una supplementazione terapeutica, questo perché può avere conseguenze a livello metabolico e causare indirettamente una alterata funzionalità intestinale (Morgan & McConnell, 1999); una concentrazione normale di cobalamina sierica non esclude la presenza di una CE (Heilmann & Steiner, 2018).

Una diminuita concentrazione di folato sierico non è specifica per una CE e livelli normali non sono sufficienti ad escluderla; inoltre, una concentrazione normale o aumentata può riflettere uno stato di disbiosi del piccolo intestino a causa della produzione di folati da parte del microbiota intestinale, oppure una ipocobalaminemia (Steiner JM, 2008).

7.3 Biomarker sierici in fase di studio.

Per evidenziare un'eventuale ipocobalaminemia in modo più preciso è possibile utilizzare l'acido metilmalonico (MMA), un metabolita che si accumula quando l'attività della metilmalonil-CoA mutasi diminuisce a causa di una deficienza di cobalamina sierica. La misurazione della cobalamina sierica associata alla

misurazione dell'acido metilmalonico (MMA) presenta una maggiore sensibilità nell'evidenziare uno stato di ipocobalaminemia rispetto alla valutazione della sola cobalamina; ad oggi, non è considerato un test di routine a causa dei costi elevati e della poca praticità, in quanto è un test che richiede metodiche di laboratorio piuttosto complesse che non possono essere replicate nell'ambito di una clinica veterinaria (gas-cromatografia, spettrometria di massa) ed inoltre non sono stati validati dei valori di riferimento standard (Grützner et al., 2013)(Kather et al., 2020).

Gli anticorpi citoplasmatici perinucleari anti-neutrofili (pANCA) sono autoanticorpi sierici che agiscono nei confronti di alcuni componenti dei granuli dei neutrofili e si sospetta che agiscano anche nei confronti di antigeni batterici gastrointestinali. Nei cani con CE è stata rilevata una condizione di sieropositività relativamente a questi autoanticorpi, anche se non è una condizione specifica per le CE, perché può essere presente anche in caso di altre patologie immunomediate, infezioni e neoplasie (Mancho et al., 2011). La sieropositività è maggiore nei cani che presentano FRE (61-62%) rispetto ai cani con IRE o NRE (0-37%). La sieropositività agli anticorpi citoplasmatici perinucleari anti-neutrofili (pANCA) è associata a PLE, nefropatia proteino-disperdente o entrambi nei Soft Coated Wheaten Terriers; inoltre, la positività a questi anticorpi viene rilevata circa 2 anni prima dell'insorgenza dell'ipoalbuminemia, in questo modo potrebbe rilevarsi utile nel diagnosticare molto più precocemente patologie con perdita di proteine nei cani di razza Soft Coated Wheaten Terriers. Inoltre, può rivelarsi utile nella diagnosi delle FRE. Ad oggi questo test non è utilizzato nella diagnostica di routine (Allenspach et al., 2008).

Cani con CE presentano un aumento della concentrazione sierica di 3-Bromotirosina (3-BrY), un metabolita della perossidasi eosinofila che viene attivato e rilasciato a seguito della degranolazione degli eosinofili, rappresentando a tutti gli effetti un *biomarker* indice di infiammazione eosinofila (Sattasathuchana et al., 2015). Nonostante la popolazione infiammatoria più comune nella lamina propria nei cani con CE sia rappresentata da linfociti e

plasmacellule, spesso è possibile trovare una popolazione eosinofila che può essere rilevata anche tramite la valutazione della 3-Bromotirosina (3-BrY); in uno studio è stato rilevato che nelle forme responsive a trattamenti antiinfiammatori o immunosoppressivi, i livelli sierici di 3-BrY sono più alti rispetto alle forme che si risolvono unicamente con il trattamento dietetico. È un test non invasivo, facile da eseguire, ma per ora non è incluso nell'iter diagnostico di base, anche perché sono necessari ulteriori studi per valutare l'utilità diagnostica di questo *biomarker* nei confronti di altre tipologie di CE. (Sattasathuchana et al., 2017).

La calprotectina è una proteina appartenente alla famiglia delle S100, viene espressa e rilasciata in seguito all'attivazione dei neutrofilo e dei macrofagi, ma l'espressione può anche derivare da cellule epiteliali; è un pattern molecolare associato al danno (DAMP) che si accumula nel sito di infiammazione ed è un ligando del TLR 4. La calprotectina sierica risulta aumentata nei cani affetti da CE ma non è specifica per una infiammazione del tratto gastroenterico e di conseguenza la validità clinica di questo parametro deve essere inserita e contestualizzata nell'ambito dell'iter diagnostico (Heilmann et al., 2012). La calprotectina risulta essere più utile quando viene valutata nel campione fecale. Anche la Calgranulina C rappresenta un pattern molecolare associato al danno (DAMP) ed è una proteina appartenente alla famiglia delle S100, presenta diversi recettori target, tra cui il *receptor for advanced glycation end products* (RAGE), ed ha un ruolo centrale nella risposta immunitaria innata ed acquisita. La calgranulina C rappresenta un marker di infiammazione gastrointestinale ma può essere aumentata a livello sierico in diversi disordini di natura infiammatoria (Foell et al., 2009).

Il sRAGE è la variante troncata del recettore RAGE, un PRR coinvolto nel processo infiammatorio. Il sRAGE agisce come recettore esca legando determinate molecole, come la calgranulina C, e impedendo il legame con il RAGE ed evitando in questo modo l'innescarsi dello stimolo infiammatorio; la concentrazione sierica di sRAGE risulta notevolmente diminuita nei cani affetti da CE, ma non si riscontra nessuna correlazione con la gravità dei segni clinici, le lesioni istologiche e non ha

valore prognostico. Questo *biomarker* può essere utilizzato anche per valutare la risposta al trattamento, in quanto la concentrazione torna in un *range* fisiologico esclusivamente in quei cani che presentano remissione completa dei segni clinici. Ad oggi non è un parametro utilizzato nella pratica clinica poiché sono necessari ulteriori studi per valutarne l'utilità come *biomarker* (Heilmann, Otoni, et al., 2014).

I linfociti T regolatori (T-Reg), che hanno un ruolo cruciale nel mantenimento dell'immunosoppressione della mucosa intestinale, oltre a diminuire a livello duodenale nelle biopsie effettuate in cani affetti da CE, diminuiscono anche quando vengono misurati nel sangue tramite citofluorimetria; di conseguenza, rappresentano un potenziale *biomarker* che potrebbe rivelarsi utile nella diagnosi, nel monitoraggio della progressione della patologia e nella valutazione della risposta al trattamento. Ad oggi, tuttavia, l'utilità clinica rimane potenziale, poiché sono necessarie ulteriori ricerche che possano permettere l'inserimento di questo parametro nell'iter diagnostico di routine (Volkman et al., 2014).

È stata ipotizzata la possibilità di utilizzare l'aumento di specifiche immunoglobuline prodotte in risposta ad antigeni alimentari nelle forme di FRE; in realtà la rilevazione di IgG e IgE specifiche nel siero o la rilevazione di IgA o IgM specifiche nella saliva non rappresentano dei test clinici affidabili in caso di FRE, questo perché un aumento del titolo immunoglobulinico indica unicamente la risposta ad un componente della dieta, ma non prova che ci sia stata una reazione avversa al cibo, né una FRE, infatti è possibile rilevare un titolo anticorpale aumentato anche in cani sani (Udraite Vovk et al., 2019).

Uno studio si è proposto di valutare il profilo amminoacidico a livello plasmatico in cani con IBD, per evidenziare una eventuale alterazione rispetto ai cani sani e per valutare se sia possibile utilizzarlo come biomarker. È stata dimostrata una significativa diminuzione nella concentrazione plasmatica di 4 amminoacidi (metionina, prolina, serina e triptofano) nei cani affetti da IBD; la concentrazione di serina è correlata negativamente con il *canine chronic enteropathy clinical activity index* (CCECAI), di conseguenza potrebbe rappresentare un nuovo

biomarker, anche se, ad oggi, rimane ancora in un ambito legato alla ricerca e non alla pratica clinica (Tamura et al., 2019).

Le concentrazioni sieriche di cobalamina, folato e CRP vengono utilizzate ampiamente nei cani con sospetta CE. La 3-BrY, la calprotectina e la calgranulina attualmente non sono disponibili su ampia scala.

Tabella 6.

Variazione di alcuni potenziali *biomarker* sierici in cani affetti da una CE.

Proteina C reattiva (CRP)*	↗↗
cPLI (<i>canine pancreatic lipase immunoreactivity</i>)*	↗↗
Folato e cobalamina*	↘↘
Anticorpi citoplasmatici perinucleari anti-neutrofili (pANCA)	++
Bromotirosina (3-BrY)	↗↗
Calprotectina	↗↗
Calgranulina	↗↗
RAGE solubile (sRAGE)	↘↘
Linfociti T regolatori (T-Reg)	↘↘
Metionina, prolina, serina e triptofano	↘↘

*: test attualmente utilizzati nella pratica clinica.

7.4 Esame coprologico e biomarker fecali.

Dopo aver escluso la presenza di una parassitosi che potrebbe essere alla base dei sintomi clinici, è possibile effettuare ulteriori analisi sul campione di feci per determinare la variazione di alcuni *biomarker* che possono fornire delle informazioni sullo stato di salute intestinale. Sarebbe utile escludere anche la presenza di batteri patogeni, come *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium perfringens*, e *Clostridium difficile*, che rappresentano i batteri più comunemente isolati nei campioni fecali dei cani; tuttavia, spesso la coltura batteriologica delle feci risulta positiva anche in cani in assenza di segni clinici, rendendo questo esame poco utile dal punto di vista clinico (Marks et al., 2011).

L'alfa 1-antitripsina o inibitore dell'alfa 1 proteinasi (α 1PI) è un inibitore della serin proteasi che ha la capacità di inibire diverse proteasi ed è principalmente sintetizzata a livello epatico; fisiologicamente è adibita alla protezione dagli effetti della tripsina, della chimotripsina e delle proteasi neutrofiliche a livello gastrointestinale. L'alfa 1-antitripsina (α 1PI) ha un peso molecolare simile a quello dell'albumina, quindi, una malattia che causa perdita di proteine dal comparto intestinale induce una perdita comparabile sia di albumina che di alfa 1-proteinasi (α 1PI). L'utilità clinica della α 1PI rispetto all'albumina sta nel fatto che l' α 1PI è resistente alla proteolisi e di conseguenza è rilevabile nei campioni fecali, permettendone l'estrazione e la quantificazione (Heilmann et al., 2011). Un aumento della concentrazione di α 1PI a livello fecale si è rivelato un *biomarker* utile per valutare la presenza di perdita proteica gastrointestinale, ed è associato alla presenza di lesioni istologiche compatibili con quadri di PLE (Murphy et al., 2003). Per aumentare l'utilità diagnostica le feci andrebbero raccolte ed esaminate per 3 giorni consecutivi; si considera anormale una concentrazione fecale media di α 1PI nei 3 giorni maggiore a 13.9 μ g/g, oppure una concentrazione massima nei 3 giorni maggiore a 21 μ g/g. Una concentrazione media di α 1PI nei 3

giorni inferiore a 4 µg/g è sufficiente ad escludere la PLE in un cane affetto da CE al 90%. L' α1PI fecale può iniziare ad aumentare prima della comparsa dei segni clinici e dell'ipoalbuminemia, ed è per questo che può rivelarsi utile per la determinazione precoce di perdita proteica gastrointestinale (Heilmann et al., 2011)(Heilmann, Parnell, et al., 2016). La concentrazione fecale di α1PI può essere aumentata nei cani con età inferiore ai 6-12 mesi anche in assenza di enteropatia (Heilmann et al., 2011).

Nel campione fecale è possibile misurare la concentrazione di immunoglobulina A (IgA); nei cani di razza Pastore Tedesco affetti da patologie gastrointestinali è stata rilevata una diminuzione della concentrazione fecale di IgA, che potrebbe riflettere un'alterazione della secrezione delle IgA da parte delle plasmacellule a livello mucosale; non è chiaro se questa alterazione sia causa o conseguenza del processo patologico, per cui nonostante siano state riscontrate alterazioni di questo parametro a livello fecale in cani affetti da CE, non è possibile, ad oggi, garantirne una validità clinica (Littler et al., 2006; Tress et al., 2006).

La calprotectina oltre ad essere misurata a livello sierico può essere misurata anche a livello fecale, e può rivelarsi utile come *biomarker* di infiammazione intestinale. La concentrazione di calprotectina fecale è associata alla gravità della patologia nei cani affetti da CE, in particolare un valore superiore a 50 µg/g indica uno stato clinico grave. Questo parametro è utile anche nel predire la risposta al trattamento (Grellet et al., 2013; Heilmann et al., 2018).

Oltre alla calprotectina, la calgranulina C è un'altra proteina misurabile sia a livello sierico che fecale. La concentrazione di calgranulina C fecale è correlata alla gravità dei segni clinici e delle lesioni endoscopiche, ma non all'entità delle lesioni istologiche (Heilmann et al., 2018; Heilmann, Grellet, et al., 2014). Una concentrazione fecale inferiore a 490 ng/g è fortemente indicativa di FRE o ARE in un cane affetto da CE (Heilmann, Volkmann, et al., 2016).

L'indice di disbiosi fecale è un *biomarker* utilizzato per quantificare lo stato di disbiosi intestinale tramite la valutazione di 8 gruppi batterici che sono normalmente alterati nei cani affetti da CE (*Clostridium hiranonis*, *Escherichia coli*,

Faecalibacterium spp., *Fusobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Turicibacter spp.* e i batteri totali). Le alterazioni nel microbiota intestinale che possono essere valutati da questo indice permettono di diagnosticare una SRE con una sensibilità del 74% e una specificità del 95% (AlShawaqfeh et al., 2017).

La N-Metilistamina (NMH) è un prodotto che deriva dal metabolismo dell'istamina e rappresenta un *biomarker* pro-infiammatorio indicativo dell'attivazione e della degranolazione dei mastociti, che può essere misurato a livello sierico ma anche nelle urine e nelle feci. L'aumento dei livelli di N-metilistamina (NMH) nelle feci e nelle urine dei cani affetti da CE indica che nell'infiltrato infiammatorio è presente una forte componente di mastociti. Le concentrazioni fecali e urinarie di NMH e il numero di mastociti duodenali non rappresentano indicatori utili della gravità della malattia. La mancanza di correlazione tra le concentrazioni di NMH e il CCECAI suggerisce che l'NMH potrebbe non essere un buon marcatore della gravità clinica della malattia nei cani. Sono necessarie ulteriori ricerche prima di poter raccomandare la misurazione di routine della concentrazione di N-metilistamina nelle urine o nelle feci dei cani con sospetta CE (Anfinsen et al., 2014; Berghoff et al., 2014).

Uno studio ha valutato l'espressione, l'attività e la concentrazione della fosfatasi alcalina intestinale (IAP) fecale in cani sani e in cani con CE. La fosfatasi alcalina intestinale (IAP) attiva è stata rilevata nelle feci di tutti i cani. L'espressione e l'attività della fosfatasi alcalina intestinale si sono rivelate inferiori nei cani malati rispetto ai cani sani, e la concentrazione fecale di IAP nei cani con CE moderata e grave è risultata inferiore a quella dei cani con CE lieve. I risultati indicano che i cani con CE hanno un'espressione e un'attività della IAP compromessa. Ulteriori ricerche sono necessarie per chiarire il ruolo di IAP nella patogenesi della CE e per determinare se possa rivelarsi utile come *biomarker* (Ide et al., 2016).

Un recente studio ha cercato di valutare la concentrazione fecale di acidi grassi a catena corta (SCFAs) in cani sani di controllo e in cani con CE, prendendo spunto dalle informazioni disponibili in medicina umana. Gli acidi grassi a catena corta (SCFAs) sono i principali prodotti della fermentazione batterica dei carboidrati nel

tratto intestinale e giocano un ruolo importante nell'interazione tra microbiota e ospite; di conseguenza, una valutazione di questo parametro può essere un utile indicatore riguardante lo stato di salute intestinale. I risultati indicano che i cani affetti da CE presentano una concentrazione fecale di acidi grassi a catena corta (SCFAs) inferiore rispetto ai cani sani di controllo, in particolare acetato e propionato (Minamoto et al., 2019).

Tabella 7.

Variazione di alcuni potenziali *biomarker* fecali in cani affetti da CE.

L'alfa 1-antitripsina (α 1PI)*	↗↗
IgA	↘↘
Calprotectina*	↗↗
Calgranulina *	↗↗
N-metilistamina(NMH)	↗↗
Fosfatasi alcalina intestinale (IAP)	↘↘
Acidi grassi a catena corta (SCFAs)	↘↘

*: test attualmente utilizzati nella pratica clinica.

7.5 Esame ecografico.

L'ecografia è un esame che si può rivelare utile nel corso di un iter diagnostico in un cane con una sospetta patologia gastrointestinale. Non ci sono parametri specifici e standardizzati che permettano, unicamente tramite l'esame ecografico, di raggiungere una diagnosi di CE; nonostante questo, l'ecografia diventa utile nell'escludere patologie intestinali di natura anatomica o neoplastica che possono dare sintomi clinici sovrapponibili ad una CE.

Un cane che deve essere sottoposto a esame ecografico deve essere a digiuno ed essere sottoposto a tricotomia della regione addominale; può essere posizionato in decubito dorsale, laterale destro e laterale sinistro. Alternare diverse posizioni durante l'esame consente di agevolare l'operatore nell'identificazione delle diverse porzioni dell'intestino. Inoltre, il contenuto di gas e fluidi si sposta nelle diverse porzioni dell'intestino quando l'animale viene riposizionato, il che può aiutare la visualizzazione della parete intestinale.



L'immagine ecografica permette di valutare: spessore della parete intestinale, stratificazione della parete intestinale, ecogenicità dei singoli strati, motilità, ecogenicità a livello peri-intestinale, presenza di fluido, linfadenomegalia dei linfonodi regionali, distribuzione del processo patologico (L. Gaschen, 2011).

Uno studio di Delaney e colleghi fornisce delle misurazioni dello spessore medio dei vari tratti dell'intestino tenue in cani sani in base a categorie di peso, dando un'idea di quelle che dovrebbero essere i valori di riferimento (tabella 8) (Delaney et al., 2003).

Tabella 8.

Caratteristiche ecografiche dell'intestino tenue in cani sani. (Delaney et al., 2003)

Immagini ecografiche fornite dall'ospedale veterinario universitario didattico di Legnaro.

Porzione intestinale	Spessore della parete	Caratteristiche peculiari e immagini ecografiche
Duodeno	<p><20 kg: ≤a 5.1 mm.</p> <p>20–29 kg: ≤5.3 mm.</p> <p>>30 kg: ≤6 mm.</p>	 <p>Placche di Peyer nella porzione antimesenterica.</p> <p>Papilla duodenale maggiore e papilla duodenale minore</p>
Digiuno	<p><20 kg: ≤4.1 mm.</p> <p>20–29 kg: ≤4.4 mm.</p> <p>>30 kg: ≤ 4.7 mm.</p>	



Lo spessore della parete intestinale è un parametro che viene utilizzato per valutare la presenza di uno stato infiammatorio nei pazienti umani affetti da IBD. L'ecografia viene utilizzata in medicina umana per rilevare la presenza di infiammazione intestinale e per monitorare i cambiamenti in seguito alla terapia. Nei pazienti umani affetti da IBD, l'ecografia rivela un ispessimento della parete che appare rigida, la scomparsa della stratificazione fisiologica e la riduzione della peristalsi (Ledermann et al., 2000; Parente et al., 2004; Ruess et al., 2000).

Uno studio ha valutato se lo spessore della parete intestinale sia diverso nei cani sani rispetto ai cani con IBD, in modo tale da capire se questo parametro possa essere utile nella diagnosi. La maggior parte dei cani presentava uno spessore della parete tra 3 e 4 mm per il duodeno e tra 2 e 3 mm per il digiuno, indipendentemente dal fatto che fossero sani o malati. Lo spessore della parete del duodeno e del digiuno nei cani sani, nei cani affetti da IBD e nei cani con sospetta IBD non presentava differenze significative tali da fornire delle indicazioni diagnostiche (Fig.12). Non è stata trovata una correlazione significativa tra lo spessore della parete intestinale nei cani e la diagnosi istologica o la risposta al

trattamento. Le misurazioni dello spessore della parete intestinale, quindi, non sembrano essere in grado di stabilire una diagnosi di infiammazione intestinale e possono risultare in una diagnosi falsamente negativa nei casi di IBD (Rudorf et al., 2005).

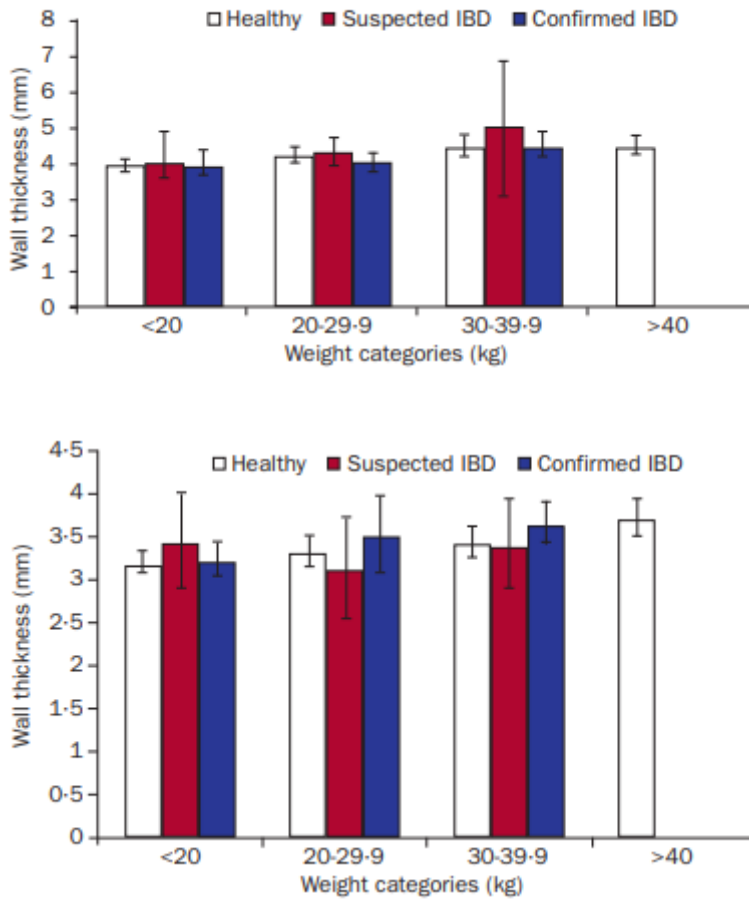


Fig.12

Istogramma che rappresenta lo spessore della parete duodenale (in alto), di cani sani (n=231), cani con sospetta IBD (n=18) e cani con IBD confermata (n=51) e lo spessore della parete digiunale (in basso) di cani sani (n=231), cani con sospetta IBD (n=21) e cani con IBD confermata (n=53) suddivisi in categorie di peso. Sono riportati i valori medi (colonne) e intervallo di confidenza al 95% (barre verticali). Una differenza significativa tra i gruppi è stata assunta con $p < 0.10$. Lo spessore della parete del duodeno e del digiuno nei cani

sani, con IBD confermata e con IBD sospetta non hanno mostrato differenze significative quando corretti per categoria di peso (Rudorf et al., 2005).

Lo spessore della parete intestinale, quindi, non è considerato un parametro attendibile per identificare una infiammazione intestinale; per trovare un'alternativa, è stata valutata la possibilità di utilizzare parametri ecografici come l'ecogenicità della mucosa, la presenza di linfadenomegalia dei linfonodi tributari e il ritrovamento di alterazioni secondarie del tratto gastrointestinale, come edema del pancreas e fluido libero in addome. In uno studio, 56 cani con diarrea cronica sono stati suddivisi in tre gruppi in base alla risposta al trattamento; nel gruppo responsivo alla dieta sono stati inclusi i cani che hanno mostrato un miglioramento unicamente con una terapia dietetica ipoallergenica; nel gruppo IBD sono stati inclusi i cani che necessitavano di un trattamento immunosoppressivo con prednisolone e/o ciclosporina; nell'ultimo gruppo sono stati inclusi i cani che presentano una malattia grave e debilitante, con perdita di proteine.

La presenza di segni gastrointestinali secondari si è rivelata molto sensibile (100%) ma poco specifica (68%) per identificare i cani affetti da PLE.

Sono stati identificati 2 pattern di aumento dell'ecogenicità della mucosa intestinale: punteggiature iperecogene (Fig.13) o striature iperecogene (Fig.14). I cani con diarrea responsiva alla dieta avevano punteggi di ecogenicità significativamente più bassi rispetto a cani con PLE. La presenza di striature iperecogene si è rivelata molto specifica per i cani affetti da PLE, e questo aspetto ecografico potrebbe essere dovuto alla presenza di vasi linfatici altamente congesti. I cani che hanno risposto al trattamento immunosoppressivo presentavano molto spesso delle punteggiature iperecogene sulla mucosa, che rappresentano un parametro sensibile per l'identificazione di infiammazione

intestinale, ma non permettono di distinguere la categoria e la gravità della malattia.

La dimensione dei linfonodi non è risultata essere associata al tipo di patologia infiammatoria e non è stata rilevata correlazione tra il punteggio ecografico dei linfonodi e l'attività clinica. La morfologia e la dimensione dei linfonodi, quindi, rappresentano un parametro poco sensibile per la diagnosi e il monitoraggio di una IBD.

La presenza di mucosa normale, ipoecoica, in un cane con diarrea cronica ha dimostrato una sensibilità del 80% e una specificità del 81% nell'identificare una FRE, mentre la presenza di striature iperecogene ha rivelato una sensibilità del 75% e una specificità del 96% nell'identificare una PLE, infine, la presenza di punteggiature iperecogene pare rappresentare un indicatore poco specifico di infiammazione intestinale.

Nello stesso studio è stata rilevata una significativa correlazione tra il punteggio ecografico, calcolato sommando i valori di alcuni parametri (spessore del duodeno e del digiuno, ecogenicità della mucosa, dimensioni e aspetto del linfonodo) e il punteggio CIBDAI alla presentazione, ma non dopo il trattamento.

L'ecogenicità della mucosa, quindi, sembra essere un parametro più affidabile per identificare una IBD rispetto allo spessore della parete (GASCHEN et al., 2008).

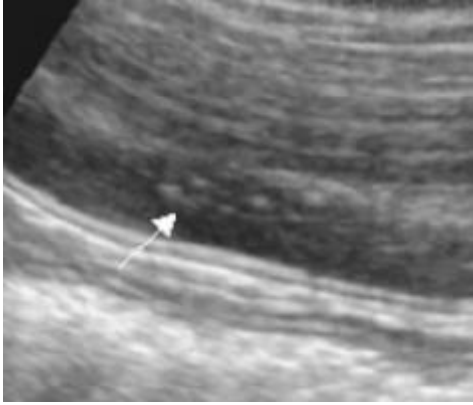


Fig.13

Immagine ecografica del duodeno di un cane con IBD. La freccia indica le punteggiature iperecoiche all'interno della mucosa (GASCHEN et al., 2008).

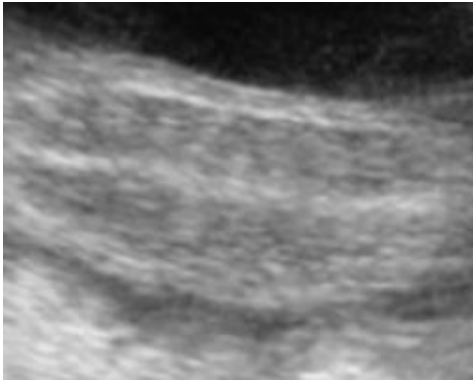


Fig. 14

Immagine ecografica di un segmento di digiuno in un cane con PLE. Si notano le striature iperecogene all'interno della mucosa (GASCHEN et al., 2008).

Uno studio retrospettivo ha dimostrato che la presenza di dilatazione intestinale nei cani con PLE è associata ad una minore aspettativa di vita, mentre la presenza di striature iperecogene nei cani con PLE è correlata ad una maggiore aspettativa di vita. La presenza di dilatazione intestinale rappresenterebbe quindi un fattore prognostico negativo (Fig.15) (OHTA et al., 2021).

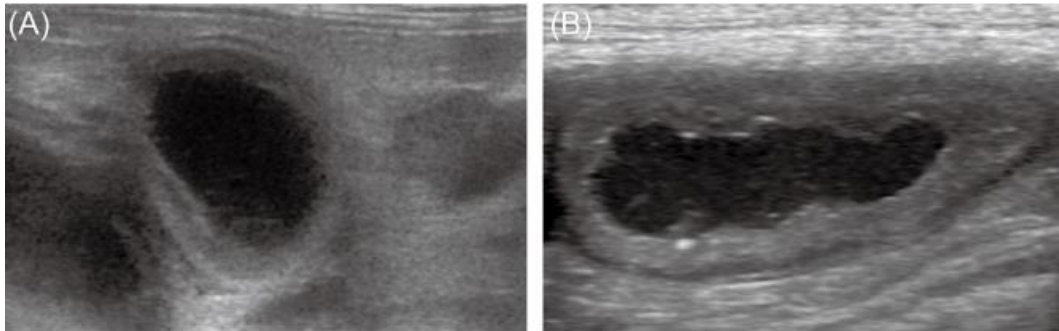


Fig. 15

Immagine ecografica dell'ileo di un cane con enterite linfoplasmacellulare (A) e del digiuno di un cane con enterite linfoplasmacellulare (B). Si noti l'evidente dilatazione di entrambi i compartimenti intestinali (OHTA et al., 2021).

L'esame ecografico risulta utile nel differenziare una patologia infiammatoria da una patologia neoplastica. In uno studio condotto da Penninck e colleghi, l'89% dei cani con enterite presentava una stratificazione intestinale normale o leggermente ridotta, ma comunque visibile, mentre il 99% dei cani con neoplasia presentavano perdita completa della stratificazione intestinale. La maggior parte dei cani con enterite presentavano lesioni diffuse, mentre i cani con neoplasia presentavano lesioni focali relative ad un segmento intestinale. I linfonodi presentavano uno spessore medio maggiore nei cani con neoplasia rispetto ai cani con enterite.

La perdita della normale stratificazione intestinale ha un forte valore predittivo nel determinare la presenza di un tumore intestinale (Penninck et al., 2003).

In medicina umana si utilizza una metodica ecografica con contrasto (*contrast-enhanced ultrasonography*, CEUS) per valutare la vascolarizzazione della parete intestinale in caso di patologie neoplastiche o infiammatorie (Serra et al., 2007).

Recentemente questa tecnica è stata applicata anche in una popolazione di cani affetti da IBD con l'obiettivo di valutarne l'utilità diagnostica (Linta et al., 2021). Sono stati valutati e descritti i pattern di aumento del contrasto nei cani con IBD, nei cani sani di controllo e nei cani con IBD dopo il trattamento (Fig.16)

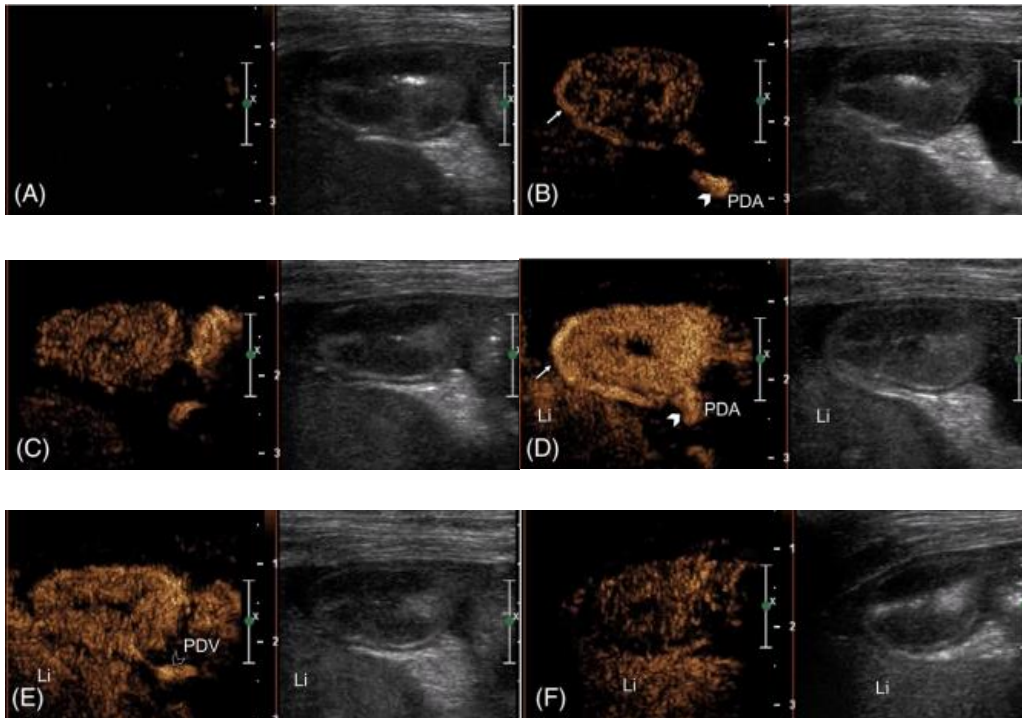


Fig.16

Sequenza rappresentativa di un pattern di aumento del contrasto della parete duodenale di un cane con IBD. Ogni immagine illustra l'immagine con il mezzo di contrasto (echi marroni) a sinistra e la relativa immagine in scala di grigi a destra. A. duodeno prima dell'iniezione del mezzo di contrasto. B. appena dopo l'iniezione è possibile vedere il mezzo di contrasto nell'arteria pancreatico-duodenale (punta di freccia) e nel suo ramo che circonda la parete intestinale(freccia) C. è evidente un simultaneo aumento del mezzo di contrasto sia dal lato mesenterico che dal lato antimesenterico. D. La parete duodenale mostra una distribuzione transmurale omogenea del mezzo di contrasto senza la visualizzazione della stratificazione della parete intestinale. L'arteria pancreatico-duodenale (PDA) (punta di freccia) e il suo ramo (freccia) sono ancora visibili. E, F. graduale

diminuzione del mezzo di contrasto. È visibile la vena pancreatico-duodenale (PDV) (punta di freccia bianca tratteggiata). Li: fegato (Linta et al., 2021).

Non sono state riscontrate differenze nel pattern di aumento del mezzo di contrasto tra i cani sani e i cani con IBD, a differenza della medicina umana, in cui i pattern vengono utilizzati per distinguere la fase acuta del morbo di Crohn (Serra et al., 2007). Un risultato simile è stato riportato anche in precedenza in uno studio in cui l'aumento del mezzo di contrasto dopo l'iniezione non ha mostrato differenze evidenti nei cani con CE in remissione, CE sintomatica o linfoma intestinale rispetto ai cani sani di controllo (Nisa et al., 2019).

Confrontando i parametri di perfusione CEUS (*contrast-enhanced ultrasonography*) tra cani sani e cani con IBD, tutti i parametri CEUS sono risultati più alti nei cani con IBD, anche se con differenze significative solo per quanto riguarda l'intensità del picco (*peak intensity*, PI) e l'area sotto la curva (AUC)(Linta et al., 2021). L'intensità di picco e l'AUC del CEUS sono indicatori del volume ematico regionale della mucosa, e il grado di aumento riflette la vascolarizzazione della parete intestinale infiammata. Non è stata trovata una correlazione tra i parametri di perfusione CEUS e gli altri punteggi (CCECAI, punteggio istologico, endoscopico, ecografico)(Linta et al., 2021). Questi risultati sono in contrasto con quelli precedentemente riportati negli esseri umani con morbo di Crohn, in cui si è dimostrata una correlazione positiva tra i parametri di perfusione e i punteggi clinici, endoscopici e istologici (Ripollés et al., 2011).

L'ecografia con contrasto (CEUS), quindi, potrebbe essere utilizzabile per la valutazione della perfusione della parete intestinale nei cani affetti da IBD utilizzando 2 parametri, ossia l'intensità di picco e l'AUC, che si sono dimostrati essere utili nel discriminare cani con IBD da cani clinicamente sani, mentre non è possibile ottenere informazioni cliniche valutando unicamente il pattern di aumento del mezzo di contrasto (Linta et al., 2021)

7.6 Endoscopia.

L'endoscopia gastrointestinale è una tecnica minimamente invasiva che permette di visualizzare l'esofago, lo stomaco, il duodeno, l'ileo, il colon e il retto. Può essere effettuata per indagare il tratto gastro-enterico superiore, in questo caso si parla di esofago-gastro-duodeno-scopia, oppure inferiore, colonscopia o proctoscopia.

L'endoscopia dell'apparato gastrointestinale si rivela utile nel valutare lo stato della mucosa intestinale dal punto di vista macroscopico, permette di visualizzare eventuali masse o erosioni, ed è una metodica che può essere utilizzata per una varietà di interventi diagnostici e terapeutici: raccolta di tessuti per l'esame istopatologico, citologia, test per malattie infettive, asportazione di corpi estranei, polipectomia, posizionamento di tubi per l'alimentazione enterale o stent.

L'endoscopia gastrointestinale è uno strumento importante nella diagnosi di IBD nel cane, in quanto permette una valutazione immediata e diretta del danno alla mucosa intestinale, inoltre, i risultati endoscopici potrebbero essere utilizzati per valutare lo stato di infiammazione.

Nell'uomo esistono diversi indici di valutazione quantitativa dell'attività infiammatoria della IBD nelle sue due forme, colite ulcerosa (UC) e morbo di Crohn (CD), per via endoscopica (Daperno et al., 2004; Osada et al., 2010).

Gli studi clinici che utilizzano punteggi endoscopici nei cani con IBD sono limitati ed hanno fornito risultati contrastanti per quanto riguarda l'utilità della valutazione endoscopica nella valutazione dello stato infiammatorio intestinale; probabilmente, ciò è dovuto a fattori operatore-dipendenti, a causa della diversa esperienza e alla mancanza di criteri standard su cui fare riferimento (Slovak et al., 2014).

Lo scopo dello studio di Slovak e colleghi (2015) è stato quello di sviluppare e validare un punteggio endoscopico prendendo in considerazione l'aspetto della

mucosa dello stomaco, del duodeno e del colon in cani con IBD (Slovak et al., 2015). È stato esaminato il grado di accordo tra diversi osservatori per quanto riguarda la valutazione endoscopica dell'aspetto della mucosa del tratto gastrointestinale, per progettare e validare un sistema di punteggio endoscopico semplice e facile da usare per i cani con IBD, utilizzando una combinazione di immagini (Fig.17) e videoclip precedentemente raccolti.

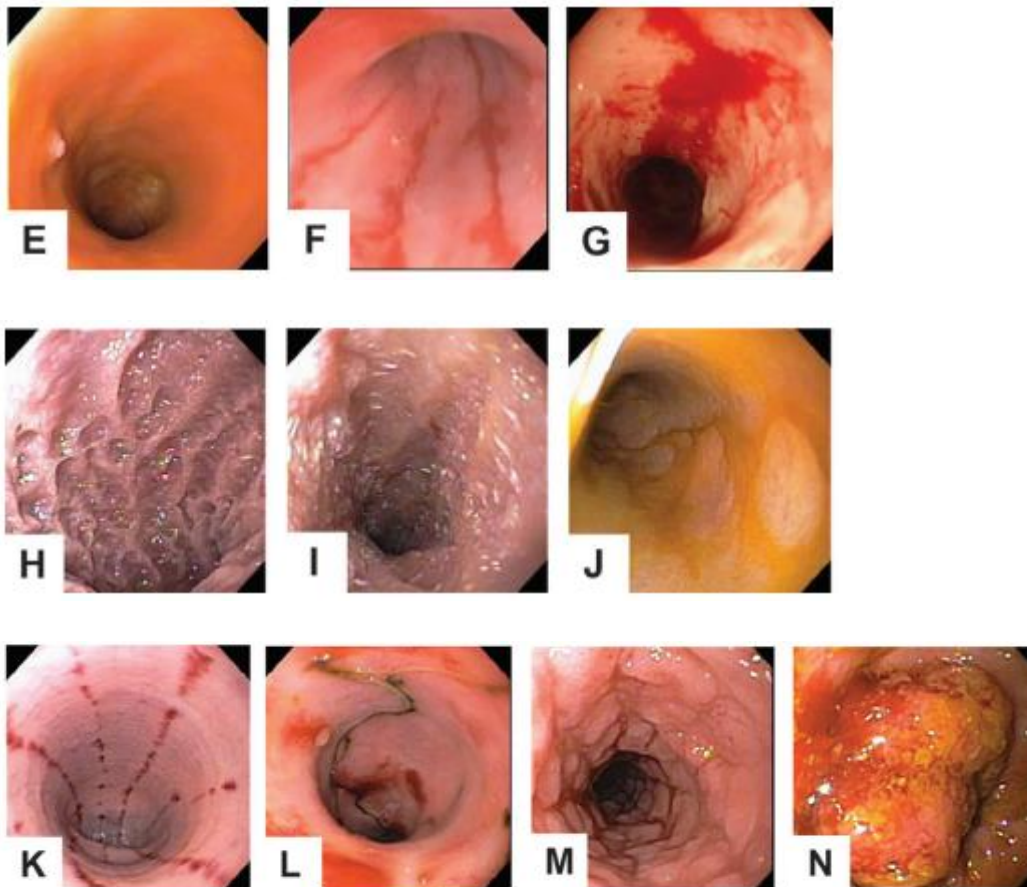


Fig.17

Immagini endoscopiche del duodeno di cani con IBD rappresentative di diversi livelli di gravità: (E) duodeno normale (F) erosioni del duodeno (G) friabilità del duodeno (H) granularità del duodeno (I) dilatazione dei vasi linfatici duodenali (J) colon normale (K) erosioni del colon (L) friabilità del colon (M) granularità del colon (N) massa nel colon (Slovak et al., 2015).

Prendendo spunto dai punteggi utilizzati in medicina umana, è stato proposto un punteggio endoscopico che permetta di stabilire la gravità di coinvolgimento della mucosa gastrointestinale dal punto di vista qualitativo, prendendo in considerazione la presenza di erosioni, friabilità, granularità, dilatazione dei vasi linfatici a livello duodenale e la presenza di masse a livello del colon (Tabella 9); tuttavia, la poco frequente presenza di masse a livello del colon nei cani con IBD ha fornito il motivo per escludere questo parametro dalla valutazione. In base alla presenza o all'assenza di questi aspetti endoscopici è possibile attribuire un punteggio che rifletta lo stato endoscopico della mucosa del tratto gastrointestinale. In presenza di friabilità della mucosa viene attribuito un punteggio di 1, in assenza un punteggio di 0, e si procede in questo modo anche per gli altri aspetti endoscopici. Il punteggio massimo che si può raggiungere in questo modo è 4, che sta a significare la presenza di tutti e 4 gli aspetti endoscopici presi in considerazione (Tabella 10).

Tabella 9.

Definizioni degli aspetti endoscopici della mucosa gastrointestinale (Jergens et al., 2016).

Aspetto della mucosa	Definizione
Mucosa normale	Nessuna lesione macroscopica sulla superficie.
Friabilità	Sanguinamento al contatto con l'endoscopio.
Granularità	Alterazioni nella struttura della mucosa.
Erosioni	Difetto lineare e superficiale della mucosa con emorragia.
Iperemia	Presenza di rossore della mucosa.
Dilatazione dei vasi linfatici	Punti bianchi della mucosa con distribuzione da multifocale a diffusa.
Masse	Crescita anormale di tessuto che si proietta nel lume.

Tabella 10.

Punteggio attribuito ai diversi rilievi endoscopici della mucosa intestinale (Slovak et al., 2015).

Punteggio massimo gastroscopia: 3

Punteggio massimo enteroscopia:4

Punteggio massimo colonscopia: 3

Aspetto	Punteggio	Descrizione
Friabilità	0	Assente
	1	Presente
Granularità	0	Assente
	1	Presente
Erosioni	0	Assente
	1	Presente
Dilatazione dei vasi linfatici	0	Assente
	1	Presente

Il punteggio endoscopico qualitativo proposto per l'IBD nel cane soddisfa i seguenti requisiti: è ben correlato con la valutazione complessiva dell'endoscopista, la qualità della valutazione è coerente quando viene valutata in soggetti diversi da quelli utilizzati nello studio, incorpora parametri della mucosa che sono considerati importanti da endoscopisti esperti e che sono riproducibili, ed infine è semplice da calcolare (Slovak et al., 2014).

L'endoscopia viene utilizzata soprattutto per la raccolta di campioni istologici della mucosa intestinale, che sono molto utili e spesso necessari per stabilire una

diagnosi definitiva, una prognosi e un approccio terapeutico nei cani che presentano CE. L'endoscopia permette inoltre la valutazione diretta delle lesioni mucosali non rilevabili dalla superficie sierosa, e di conseguenza una biopsia mirata; In secondo luogo, essendo in grado di ottenere numerosi campioni di tessuto su un tratto di intestino della lunghezza di 10-20 cm, è più probabile campionare le lesioni della mucosa che hanno una distribuzione multifocale.

La biopsia può essere eseguita anche per via laparotomica. In questo modo però si effettua una procedura più invasiva, con tempi di anestesia più lunghi e con maggiori rischi per gli animali debilitati, un'ospedalizzazione prolungata e maggiori costi procedurali. Con la biopsia endoscopica però è possibile campionare nella maggior parte dei casi solo la mucosa dello stomaco, del duodeno e del colon; la mucosa del digiuno può essere campionata raramente, mentre la mucosa dell'ileo si riesce ad ottenere in alcuni casi, ma necessita di un endoscopista esperto. In ogni caso, non sono stati pubblicati studi comparativi che documentino la superiorità di una tecnica biptica rispetto all'altra.

La decisione di eseguire una biopsia endoscopica viene presa dopo aver valutato i parametri clinici e laboratoristici del paziente, dopo aver effettuato un'indagine tramite diagnostica per immagini e dopo averne discusso con il proprietario. Devono essere presi in considerazione lo stato di salute dell'animale, i costi, il rapporto rischi benefici, il tempo necessario per la procedura. Le controindicazioni per la biopsia endoscopica riguardano generalmente i rischi anestesiolgici, soprattutto in animali con grave debilitazione generalizzata, malattia cardiopolmonare preesistente, grave ipoproteinemia o coagulopatia (Jergens et al., 2016).

Gli strumenti utilizzati per eseguire una biopsia endoscopica sono delle pinze da biopsia o delle spazzole per la citologia (*citobrush*). Le pinze flessibili sono le più utilizzate e possono avere diverse conformazioni (Fig.18).



Fig.18

Fotografie dei diversi tipi di pinze disponibili per eseguire una biopsia endoscopica. 1. Pinza a coccodrillo grande con punta. 2. Pinza a coccodrillo grande. 3. Pinza a coccodrillo standard. 4. Pinza a coccodrillo standard con punta. 5. Pinza ovale standard. 6. Pinza a coccodrillo pediatrica (Jergens et al., 2016).

Il duodeno rappresenta la porzione più difficile da campionare a causa della difficoltà nel posizionare le pinze perpendicolarmente alla mucosa; i cani di grossa taglia, inoltre, presentano una mucosa più spessa che rende difficile l'acquisizione di un campione a tutto spessore. Le biopsie duodenali di buona qualità lasciano occasionalmente una striscia opaca al di sotto della zona prelevata, indicando che

il campionamento ha compreso la mucosa in tutto il suo spessore, fino alla *muscularis mucosae* (Fig.19).



Fig.19

Immagine endoscopica di un tratto di duodeno dopo il prelievo di un campione bioptico mucosale. Si notino la presenza di una depressione sulla superficie dopo la rimozione di una striscia di mucosa e l'aspetto opaco della *muscularis mucosae* sottostante, che indica un'eccellente tecnica di campionamento (Jergens et al., 2016).

I campioni bioptici dell'ileo sono ottenibili più facilmente, perché la mucosa è relativamente sottile e di conseguenza permette un campionamento a tutto spessore senza particolari difficoltà. La mucosa dell'ileo è campionabile tramite un approccio alla cieca, che consiste nel passaggio delle pinze attraverso lo sfintere ileocolico (Fig.20).



Fig.20

Immagine endoscopica ottenuta durante il campionamento della mucosa ileale con tecnica alla cieca; si noti la pinza biotica che attraversa lo sfintere ileocecolico (Jergens et al., 2016)

La mucosa del colon è relativamente sottile e permette di ottenere campioni di buona qualità.

Il valore diagnostico della biopsia endoscopica può essere influenzato da diversi fattori quali l'esperienza dell'endoscopista, la numerosità dei campioni ottenuti, la correttezza delle operazioni con cui i campioni vengono manipolati e preparati. Viene inoltre consigliato di inviare i campioni ad un laboratorio con elevata esperienza e abilità nella valutazione istopatologica di queste patologie del tratto gastro-enterico (Jergens et al., 2016).

7.7 Istopatologia.

La valutazione istopatologica viene eseguita per distinguere un tessuto normale da un tessuto patologico, determinare la natura e la gravità del processo patologico ed infine fornire una diagnosi morfologica o eziologica. Alcune patologie, come l'adenocarcinoma, sono facilmente riconoscibili, mentre risulta molto più complesso identificare in modo specifico un determinato tipo di stato infiammatorio cronico. La difficoltà è dovuta anche alla grande variabilità che presentano i campioni istologici raccolti da cani sani, che sono influenzati dall'età, dalla dieta e da eventuali terapie (Washabau et al., 2010). L'interpretazione è complicata dalla qualità e dal numero dei campioni biotici prelevati, così come dall'orientamento errato durante il trasporto in laboratorio (Day et al., 2008). In passato, la mancanza di linee guida per la diagnosi istopatologica ha portato ad errori diagnostici su alcuni soggetti con CE, ed ha anche limitato l'accettazione di sistemi di classificazione nella valutazione della IBD. Una caratterizzazione dell'infiammazione gastrointestinale a livello istopatologico, quindi, è stata ostacolata nel tempo dalla mancanza di criteri standard. Per ovviare a questo problema è stato istituito un gruppo per la standardizzazione dei criteri gastrointestinali (*Gastrointestinal Standardization Group*) da parte della WSAVA (*World Small Animal Veterinary Association*), con lo scopo di sviluppare degli standard istopatologici per la diagnosi e il trattamento delle patologie gastrointestinali. Il gruppo ha creato delle linee guida che forniscono dei criteri per l'interpretazione delle principali alterazioni morfologiche, strutturali ed infiammatorie che si sviluppano nello stomaco, nel duodeno e nel colon, e della loro gravità (tabella 11, tabella 12)(Washabau et al., 2010).

Tabella 11.

Criteri istopatologici per la classificazione delle alterazioni morfologiche e infiammatorie tipiche della mucosa duodenale in animali con enteropatia cronica. (Washabau et al., 2010)


Criteri morfologici	Criteri infiammatori
Atrofia dei villi	Linfociti intraepiteliali
Danno epiteliale	Linfociti/plasmacellule della lamina propria
Distensione delle cripte	Eosinofili della lamina propria
Dilatazione dei vasi linfatici	Neutrofili della lamina propria
Fibrosi	

Tabella 12.

Criteri istopatologici per la classificazione delle alterazioni morfologiche e infiammatorie tipiche della mucosa del colon in animali con enteropatia cronica (Washabau et al., 2010).

Criteri morfologici	Criteri infiammatori
Danno della superficie epiteliale	Linfociti/plasmacellule della lamina propria
Iperplasia delle cripte	Eosinofili della lamina propria
Dilatazione e distorsione delle cripte	Neutrofili della lamina propria
Atrofia e fibrosi della mucosa	Macrofagi della lamina propria

Sono stati sviluppati dei moduli standard da compilare per agevolare i patologi durante la valutazione delle biopsie e la registrazione dei risultati in modo coerente (Fig.21).



STANDARD FORM FOR ASSESSMENT OF DUODENAL MUCOSA

Pathologist _____ Case number _____

Number of pieces of duodenal tissue on slide _____

Tissue present
 Inadequate Too superficial Adequate depth

Number of tissues abnormal _____

MORPHOLOGICAL FEATURES

	Normal	Mild	Moderate	Marked
Villous stunting	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Epithelial injury	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Crypt distension	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lacteal dilation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mucosal fibrosis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

INFLAMMATION

	Normal	Mild	Moderate	Marked
Intraepithelial lymphocytes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria lymphocytes and plasma cells	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria eosinophils	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria neutrophils	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Other	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

FINAL DIAGNOSIS

Normal tissue	<input type="checkbox"/>
Lymphoplasmacytic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Eosinophilic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Neutrophilic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Lymphangiectasia	<input type="checkbox"/>
Mucosal atrophy/fibrosis (non-inflammatory)	<input type="checkbox"/>
Other	<input type="checkbox"/>

Fig. 21

Modulo per la valutazione istopatologica della mucosa duodenale (Day et al., 2008).

Nonostante l' utilizzo di queste linee guida, c'è ancora una discreta variabilità inter-operatore nella valutazione delle biopsie endoscopiche. Per cercare di ridurla, è stato sviluppato un modello semplificato, che prende spunto dalle linee guida WSAVA (*World Small Animal Veterinary Association*) e le semplifica, escludendo alcuni parametri che sono risultati essere quelli con una maggior variabilità tra gli osservatori (dilatazione dei vasi linfatici e fibrosi nel duodeno, iperplasia delle cripte nel colon). Inoltre, viene aggiunto un nuovo parametro per il colon, ossia la deplezione delle cellule caliciformi mucipare. Il modello semplificato comprende 5 parametri infiammatori e morfologici utili per definire l'infiammazione a livello gastroenterico (tabella 13) (Jergens et al., 2014).

Tabella 13.

Parametri infiammatori e morfologici per la valutazione istopatologica dell'infiammazione gastroenterica (Jergens et al., 2014).

Duodeno	Colon
Atrofia dei villi	Danno epiteliale
Danno epiteliale	Dilatazione delle cripte
Dilatazione delle cripte	Atrofia/fibrosi
Linfociti intraepiteliali	Infiltrato infiammatorio nella lamina propria
Infiltrato infiammatorio nella lamina propria	Numero di cellule caliciformi mucipare

I punteggi ottenuti dalla valutazione istopatologica applicando le linee guida WSAVA non sono risultati significativamente correlati con la condizione clinica dell'animale; questo potrebbe essere dovuto ad una effettiva mancanza di

correlazione tra i 2 parametri, oppure indicare la necessità di un perfezionamento delle linee guida. È stato ipotizzato che l'utilizzo di un sistema di punteggio istopatologico semplificato potrebbe migliorare la coerenza nel descrivere le lesioni istologiche, e dimostrarsi maggiormente correlate con la condizione clinica. Utilizzando il sistema schematizzato in Tabella 14, la condizione clinica nei cani con IBD, valutata tramite i punteggi CCECAI e CIBDAI, è risultata correlata ai punteggi istopatologici del colon e del duodeno.

La condizione clinica, in particolare, è risultata correlata a diversi parametri istopatologici sia morfologici che infiammatori: aumento del numero di linfociti e neutrofili nel duodeno (Fig.23); fibrosi nello stomaco e nel colon; dilatazione delle cripte nell'ileo (Fig.24); crescita stentata dei villi nel duodeno e nell'ileo (Fig.25). Il numero delle cellule caliciformi mucipare del colon, i linfociti intraepiteliali, gli eosinofili e i macrofagi della lamina propria non hanno mostrato nessuna correlazione con gli indici di gravità clinica della malattia (K. A. Allenspach et al., 2019).

Tabella 14.

Sistema di punteggio quantitativo semplificato per definire la presenza e la gravità dell'infiammazione intestinale su biopsie intestinali. (K. A. Allenspach et al., 2019)

Porzione anatomica	Parametri istopatologici	0 (normale)	1 (lieve)	2 (moderato)	3 (grave)
Duodeno e ileo					
Parametri morfologici	Crescita stentata dei villi (% della lunghezza normale)	100	75	50	<25
	Dilatazione delle cripte (% di cripte dilatate)	<=2	3-10	11-25	>=26
	Dilatazione dei vasi linfatici (% della larghezza del villo)	<=25	26-50	51-75	>=76
	Danno epiteliale (% di villi per sezione)	Nessuna erosione o ulcerazione	<= 10 di erosione, nessuna ulcerazione	11-25 di erosione e/o <=10 di ulcerazione	>= 26 di erosione e/o >=11 di erosione
Parametri infiammatori	Linfociti e plasmacellule della lamina propria (% su campo 400x)	<=25, <=2	26-50, 3-5	51-75, 6-10	>=76, >=11

	Eosinofili della lamina propria (cellule per campo 400x)	≤ 3	4-10	11-20	≥ 21
	Neutrofili della lamina propria (cellule per campo 400x)	0	≤ 10	11-30	≥ 31
Colon					
Parametri morfologici	Dilatazione e distensione delle cripte (% di cripte per sezione)	0	≤ 25	26-50	≥ 51
	Fibrosi (numero di fibrociti che separano le cripte)	≤ 2	3-5	6-10	≥ 11
	Numero di cellule caliciformi (% di riduzione dal normale)	0	≤ 25	26-50	≥ 51
	Danno epiteliale (% di villi per sezione)	Come duodeno e ileo			
Parametri infiammatori	Linfociti e plasmacellule della lamina	≤ 5	6-10	11-20	≥ 21

	propria (cellule tra le cripte)				
	Eosinofili della lamina propria (cellule per campo 400x)	≤ 2	3-10	11-20	≥ 21
	Neutrofili della lamina propria (cellule per campo 400x)	Come duodeno e ileo			
	Macrofagi della lamina propria	≤ 2	3-20	21-50	≥ 51

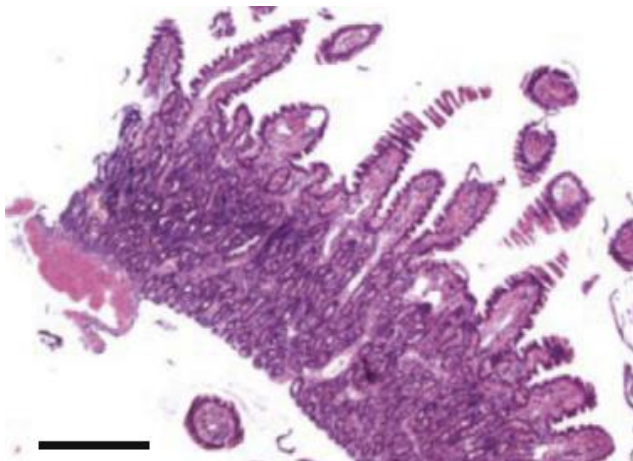


Fig 22. Sezione istologica di duodeno normale. Ematossilina-eosina. La barra corrisponde ad 1 mm (Day et al., 2008).

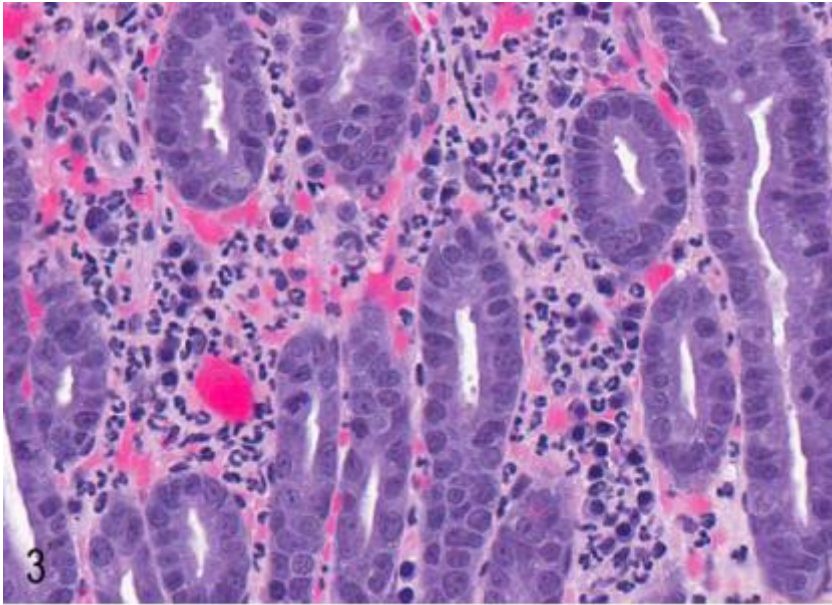


Fig.23

Sezione istologica di duodeno nella quale si evidenzia un marcato aumento dei neutrofili nella lamina propria. Ematossilina-eosina (K. A. Allenspach et al., 2019).

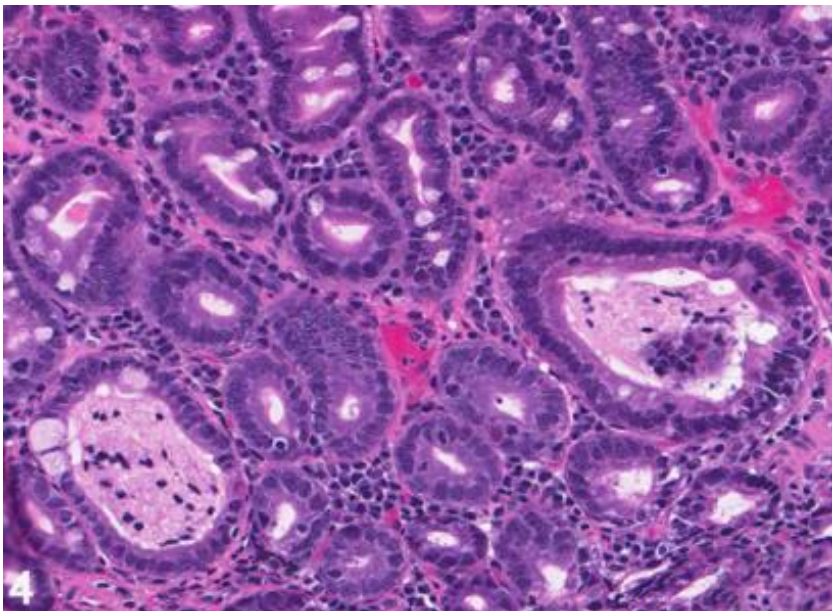


Fig.24

Sezione istologica di ileo. Si noti la dilatazione delle cripte. Ematossilina-eosina (K. A. Allenspach et al., 2019).

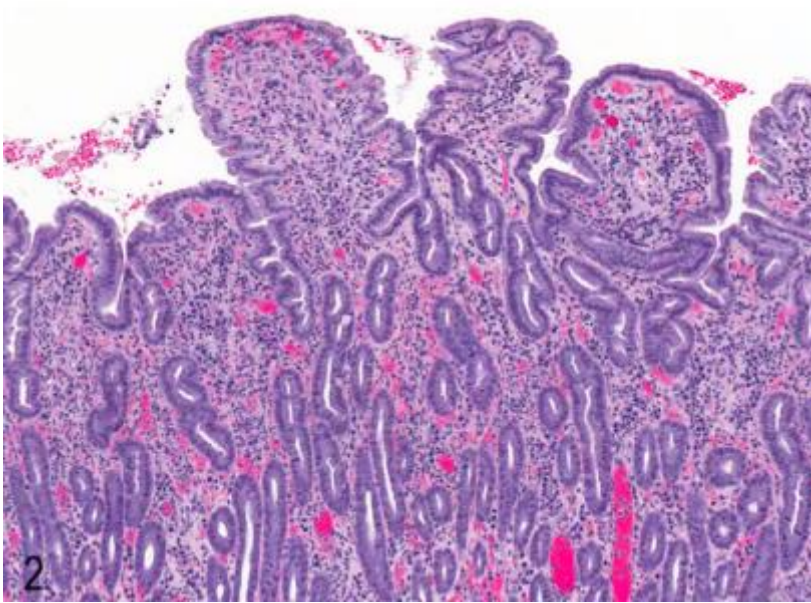


Fig.25

Sezione istologica di duodeno nella quale si evidenzia una moderata atrofia dei villi. Ematossilina-eosina (K. A. Allenspach et al., 2019).

I cambiamenti morfologici e cellulari nella mucosa dei cani con IBD sono stati oggetto di diversi studi.

In uno studio effettuato da German e colleghi nel 2001 sono stati raccolti dei campioni biotici da cani affetti da IBD, cani con ARD e cani che presentavano reazioni avverse al cibo. Nei cani che presentavano segni clinici sono state riscontrate diverse alterazioni istopatologiche: variazioni dei villi in altezza e larghezza, fino alla fusione tra loro, dilatazione e iperplasia delle cripte, alterazioni morfologiche dell'epitelio, necrosi focali e ulcere, edema, emorragia o fibrosi della lamina propria, mentre non sono state trovate differenze nella densità cellulare della lamina propria tra cani che presentavano una patologia intestinale e cani sani di controllo. La quantità totale di cellule presenti nella lamina propria non è quindi considerabile un parametro di valutazione patologica. Al contrario, l'analisi dei sottotipi cellulari potrebbe rivelarsi utile dal punto di vista diagnostico.

Non sono state riscontrate differenze nella quantità di eosinofili, mentre è stata rilevata una diminuzione nel numero dei mastociti nei cani con IBD rispetto ai controlli; ciò potrebbe essere dovuto ad una effettiva diminuzione numerica oppure al processo di degranulazione. Il numero di plasmacellule produttrici IgG è risultato aumentato nei cani che presentano IBD; Il numero di linfociti T CD4 è risultato aumentato sia nei cani con IBD che nei cani con ARD, mentre non sono emerse differenze significative nella popolazione di linfociti T CD8. I linfociti T CD3 e i linfociti intraepiteliali sono risultati aumentati solo nei cani con IBD, così come i macrofagi e i neutrofili. Nelle lesioni più lievi è stato descritto un infiltrato cellulare infiammatorio, ma la microarchitettura intestinale è rimasta invariata, mentre nelle lesioni più gravi è presente anche una alterazione strutturale della mucosa. (German et al., 2001).

Un altro studio ha esaminato le biopsie del duodeno, dell'antro pilorico e del corpo dello stomaco in cani che presentavano una enterite linfo-plasmacellulare. Per quanto riguarda la mucosa gastrica, sono stati valutati i seguenti parametri: iperplasia epiteliale, infiltrazione di cellule infiammatorie, edema e fibrosi. Per quanto riguarda la mucosa del duodeno le variabili sono le seguenti: linfociti intraepiteliali (IEL), infiltrazione di cellule infiammatorie, edema, dilatazione dei vasi linfatici, iperplasia ghiandolare e fibrosi. Il numero e la gravità delle lesioni osservate nei cani con enterite linfo-plasmacellulare sono nettamente maggiori rispetto ai cani di controllo. In particolare, nello stomaco sono stati rilevati tutti i parametri valutati, mentre nel duodeno è stata riscontrata la presenza, in tutti i cani affetti, di infiltrato infiammatorio, edema e dilatazione dei vasi linfatici (M. Garcia-Sancho et al., 2007).

Molti studi concordano nell'attribuire all'ipoalbuminemia un valore prognostico negativo nei cani con CE (K. Allenspach et al., 2007); uno studio effettuato da Wennogle e colleghi ha valutato le caratteristiche istopatologiche di biopsie effettuate in cani con CE, con e senza una concomitante ipoalbuminemia. L'infiltrato infiammatorio di natura linfo-plasmacellulare ed eosinofila nella lamina propria non ha mostrato differenze tra i 2 gruppi di cani; inoltre, la gravità

dell'infiltrato non è risultata correlata alla concentrazione di albumina sierica. I cani con ipoalbuminemia hanno mostrato una maggior proporzione di villi con crescita stentata, maggior danno epiteliale, maggiore distensione delle cripte e dilatazione dei vasi linfatici rispetto ai cani con normo-albuminemia. In più, i cani con ipoalbuminemia presentavano una maggiore quantità di linfociti intraepiteliali (IEL) e neutrofili nella lamina propria (Fig.26). I risultati hanno portato alla conclusione che molte caratteristiche istopatologiche rilevate in cani con CE potrebbero differire a seconda che si analizzino soggetti con o senza una concomitante ipoalbuminemia; l'infiltrato infiammatorio linfo-plasmacellulare ed eosinofilo è risultato significativamente differente tra i 2 gruppi, mentre altri tipi di cellule infiammatorie e alcune caratteristiche morfologiche sono risultate diverse (Wennogle et al., 2017).

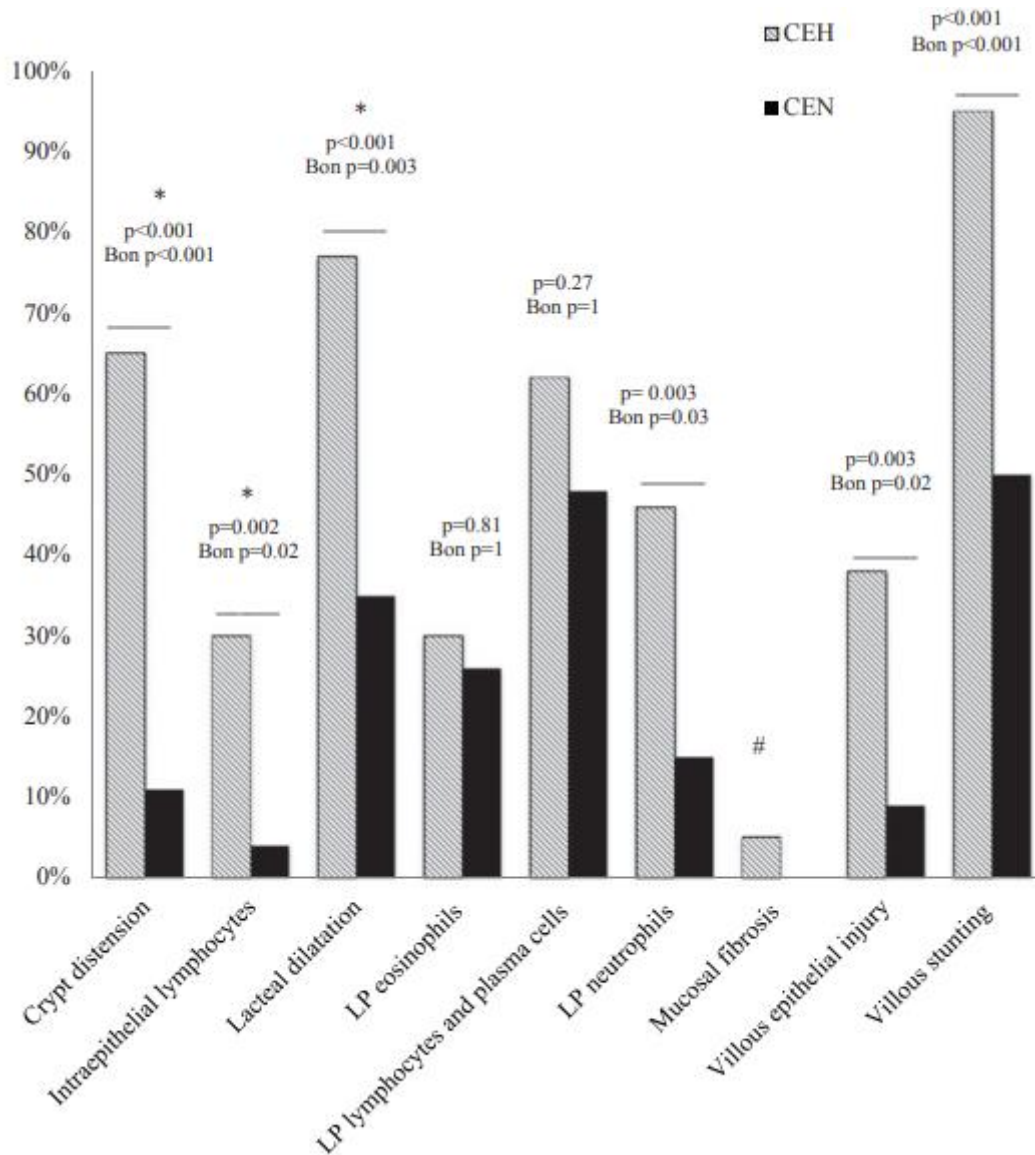


Fig. 26

Istogramma in cui sono riportate la percentuale di presenza delle alterazioni istopatologiche intestinali in cani con ipoalbuminemia (CEH) e in cani con normoalbuminemia (CEN). Il valore P (p) e il valore P corretto (Bon) dopo correzione di Bonferroni indicano la significatività statistica delle variabili. Livello di significatività <5.0% (Wennogle et al., 2017).

Questi risultati sono stati in parte confermati da un altro studio, che ha preso in considerazione diversi parametri laboratoristici in 136 cani, 94 di questi affetti da LPE. Un punteggio istologico negativo è risultato correlato a bassi livelli di albumina e colesterolo, mentre l'altezza dei villi intestinali ha presentato una correlazione inversa con i livelli di albumina sierici, così come con l'altezza dei vasi linfatici, ma non con il colesterolo ematico. L'altezza dei vasi linfatici viene intesa come la distanza presente tra la punta e la base del vaso, escludendo la cripta. La larghezza dei vasi linfatici risulta correlata inversamente sia con l'albuminemia che con la colesterolemia; in particolare, è stato notato che una larghezza maggiore a 108 micron è costantemente associata ad una grave ipoalbuminemia (<2 g/dL). Il rapporto altezza/larghezza dei villi è correlato inversamente con l'albuminemia, mentre il rapporto altezza/larghezza dei vasi linfatici risulta correlato inversamente sia con l'albuminemia che con la colesterolemia. Questo può indicare come il danneggiamento dei villi intestinali e dei vasi linfatici sia responsabile della perdita di albumina e colesterolo. Nei cani con LPE, quindi, l'ipoalbuminemia è correlata ad alcune anomalie istologiche, in particolare con l'altezza e la larghezza dei villi intestinali, così come con l'altezza e la dilatazione dei vasi linfatici (linfangectasia) (Fig.27). Questi aspetti possono assumere di conseguenza un valore diagnostico e rappresentare un importante indice utile nell'indirizzare l'approccio terapeutico. (Rossi et al., 2015).

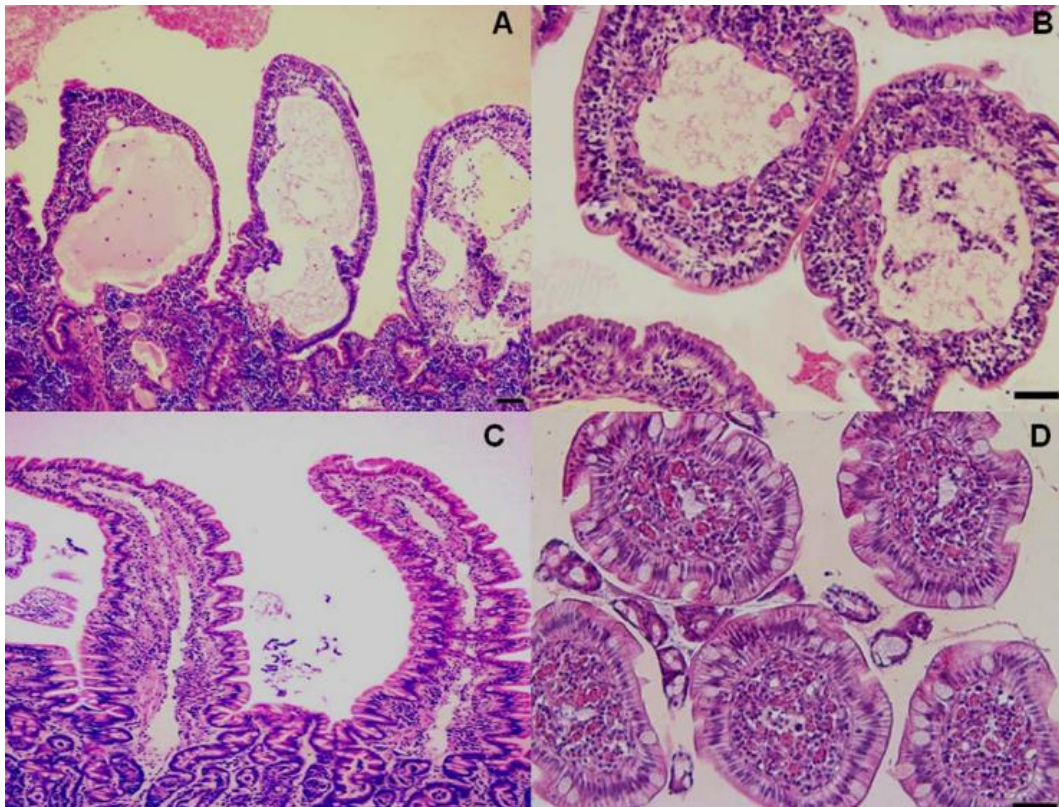


Fig. 27

Immagini istopatologiche ottenute da campioni bioptici di duodeno. Si noti la presenza di linfangectasia (A e B) e lo si confronti con l'aspetto istologico normale (C e D) dello stesso tratto. A. numerosi vasi linfatici appaiono dilatati, anastomizzati e contenenti linfociti. La dilatazione distorce l'architettura del villo. A e B. nella lamina propria sono evidenti vasi sanguigni congesti e l'infiltrazione di cellule infiammatorie, soprattutto linfociti e plasmacellule. Le anomalie relative all'altezza e alla larghezza sono evidenti nella sezione longitudinale (A) e nella sezione coronale (B). Nella mucosa normale (C e D), i vasi linfatici sono difficili da distinguere in entrambe le sezioni. Ematossilina-eosina. La barra corrisponde a 800 μm (A e C) e a 200 μm (B e D) (Rossi et al., 2015) .

Un' indagine (Walker et al., 2013) ha analizzato una serie di campioni istologici relativi a cani con una enteropatia rispondente alla dieta (FRD), confrontandoli con cani sani di controllo e con gli stessi cani affetti dalla patologia dopo che erano stati trattati con una terapia dietetica. I campioni istologici sono stati analizzati

tramite istopatologia, immunoistochimica, e anche sulla base dei cambiamenti ultrastrutturali rilevati tramite microscopia elettronica. (Walker et al., 2013)

Sedici dei cani con CE presentavano una leggera infiammazione linfoplasmacellulare del duodeno, in 8 casi associata ad un lieve infiltrato eosinofilo e in un caso associata ad un infiltrato misto eosinofilo/neutrofilico. Un cane presentava infiammazione linfoplasmacellulare moderata, mentre uno ne presentava una forma grave. I cani con CE presentavano una atrofia dei villi e punteggi WSAVA complessivi maggiori rispetto ai cani sani di controllo. Il rapporto altezza/larghezza dei villi risultava più basso nei cani con CE; la densità degli eosinofili nella lamina propria era più alta nei cani con CE. Non sono state riscontrate differenze significative nell'altezza dei villi, nel conteggio dei linfociti intraepiteliali (IEL), delle cellule caliciformi mucipare e nella densità delle cellule mononucleate, dei neutrofili, delle cellule CD3 positive, delle IgA. Dal punto di vista ultrastrutturale, nei cani con CE è stato rilevato un aumento della gravità delle lesioni mitocondriali e della vacuolizzazione citoplasmatica, un incremento dello spazio tra microvilli (Fig.28) e un aumento della larghezza delle giunzioni serrate (*tight junction*). I danni mitocondriali riflettono un processo di danneggiamento, che inizia con l'ingresso di ioni e acqua, e porta alla mancata funzionalità della fosforilazione ossidativa (Zick et al., 2009). La vacuolizzazione citoplasmatica è indice di danno cellulare, in quanto testimonia l'accumulo di ioni e acqua nei vacuoli in seguito ad un insulto (Tomimoto & Yanagihara, 1992). Un aumento dello spazio intra-microvillare è indice della perdita dei microvilli (Iancu & Manov, 2010). L'aumento della larghezza delle giunzioni serrate riflette la perdita dell'integrità strutturale di quest'ultime, e l'espansione dello spazio intercellulare (Edelblum & Turner, 2009).

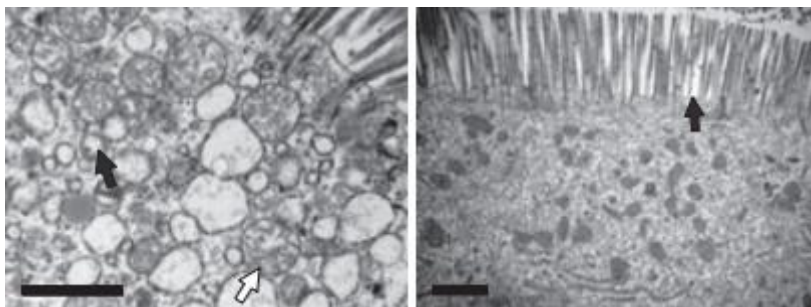


Fig.28

Immagine ottenuta tramite microscopia elettronica a trasmissione di una sezione di duodeno. A sinistra sono illustrate le vacuolizzazioni citoplasmatiche (freccia nera) e il rigonfiamento dei mitocondri (freccia bianca). A destra viene evidenziato l'aumento dello spazio tra microvilli. La barra a sinistra corrisponde a 2 μm , la barra a destra a 1 μm (Walker et al., 2013).

Dopo 6 settimane di terapia dietetica il punteggio medio delle cellule mononucleate della lamina propria, così come la densità degli eosinofili e delle cellule mononucleate nella lamina propria apparivano diminuiti. Inoltre, non è stato rilevato alcun miglioramento delle lesioni ultrastrutturali dei mitocondri e dell'orletto a spazzola (Walker et al., 2013).

I linfociti intraepiteliali intestinali costituiscono una componente del sistema immunitario adattivo, ed hanno un ruolo cruciale nello sviluppo e nel mantenimento dello stato infiammatorio sia pazienti umani con CE che in modelli animali; pazienti affetti da Morbo di Crohn presentano un numero aumentato di linfociti T citotossici CD8+ e linfociti T TCR $\gamma\delta$ nella mucosa del colon infiammata (McVay et al., 1997). I cani con IBD presentano un aumento significativo dei linfociti T TCR gamma-delta rispetto ai cani sani; questo dato potrebbe dimostrare un'associazione tra la quantità di linfociti intraepiteliali e la gravità dello stato infiammatorio nei cani con IBD, così come rilevato nell'uomo (Haas et al., 2014). Le lesioni presenti in caso di CE sono spesso multifocali e possono coinvolgere diverse porzioni dell'intestino, anche con gradi di severità differente; ad oggi, la procedura standard per eseguire una biopsia endoscopica in cani con CE prevede

l'acquisizione di campioni provenienti dallo stomaco e dal duodeno, poiché l'ileo è più difficilmente raggiungibile, e necessita di anestesia di maggior durata, senza fornire informazioni rilevanti dal punto di vista diagnostico e prognostico. Uno studio ha confrontato alcune biopsie duodenali e ileali, ed è stata riscontrata una differenza tra le lesioni a carico dell'ileo rispetto alle lesioni a carico del duodeno in una buona parte dei casi; in più, spesso le lesioni sono state più facilmente identificate nei campioni ileali (Casamian-Sorrosal et al., 2010). Uno studio successivo ha riscontrato una scarsa associazione tra i punteggi WSAVA dei campioni ileali e duodenali; solo nel 50% dei casi era presente lo stesso grado di gravità istopatologica. Nel 21% dei casi la malattia è stata trovata in una sola porzione dell'intestino. Inoltre, la patologia è stata identificata in 4 casi su 5 solo a livello ileale, mentre la mucosa del duodeno appariva normale. La dilatazione delle cripte e la linfangectasia sono state riscontrate più facilmente a livello ileale, mentre le lesioni dei villi e i danni epiteliali a livello duodenale. Per quanto riguarda i parametri infiammatori del punteggio WSAVA, non è stata riscontrata nessuna associazione significativa tra i reperti dell'ileo e quelli del duodeno, ma è stato rilevato più facilmente un aumento dei IEL e dell'infiltrato linfo-plasmacellulare nel duodeno, mentre l'infiltrato eosinofilo è stato identificato più facilmente nell'ileo. È stata rilevata una correlazione tra il punteggio CCECAI e la dilatazione delle cripte duodenali, la presenza di linfangectasia e di infiltrato linfo-plasmacellulare nell'ileo. È stata riscontrata anche una correlazione tra l'aumento del numero di IEL ileali e la presenza di ipocobalaminemia. Entrambe queste associazioni hanno un significato clinico ancora poco chiaro. Lo scarso accordo tra i reperti ottenuti da biopsie ileali e duodenali supporta l'idea che durante una biopsia endoscopica sia necessario, quando possibile, raccogliere anche dei campioni di mucosa dell'ileo, poiché possono fornire ulteriori informazioni cliniche che potrebbero sfuggire nel caso di un campionamento effettuato esclusivamente a carico del duodeno (Procoli et al., 2013).

7.8 Immunoistochimica.

L'immunoistochimica è una tecnica per la rilevazione di determinati antigeni presenti nei tessuti che, sfruttando la reazione immunitaria tra antigene e anticorpo, porta alla formazione di un precipitato insolubile colorato visibile al microscopio ottico.

La proteina CD11c è una beta integrina utilizzata come marker cellulare per l'identificazione delle cellule dendritiche (DC) nei topi e negli umani (Henri et al., 2001). È stato dimostrato che, anche nel cane, le cellule che esprimono questo marcatore appartengono alle cellule dendritiche (DC). Alcuni studi hanno evidenziato il potenziale ruolo delle DC nello sviluppo di IBD nell'uomo e nei topi (Baumgart et al., 2009). Uno studio ha quantificato il marcatore CD11c nella mucosa del duodeno, ileo e colon nei cani con IBD rispetto a cani sani di controllo. I risultati hanno evidenziato una diminuzione della quantità di cellule che esprimono il marcatore CD11c nei cani con IBD, ossia DC, ma anche monociti, granulociti e macrofagi (Fig.29); inoltre, è stata riscontrata una significativa correlazione negativa tra il numero di cellule presentanti il marcatore nel colon e la CCECAI, suggerendo che il numero di queste cellule a livello del colon potrebbe essere in relazione con la gravità dei segni clinici e, di conseguenza, fornire rilevanti informazioni diagnostiche. Al contrario, il numero di cellule CD11c positive nei cani con IBD non è risultato significativamente correlato con le linee guida WSAVA per la valutazione istopatologica (Kathrani, Schmitz, et al., 2011).

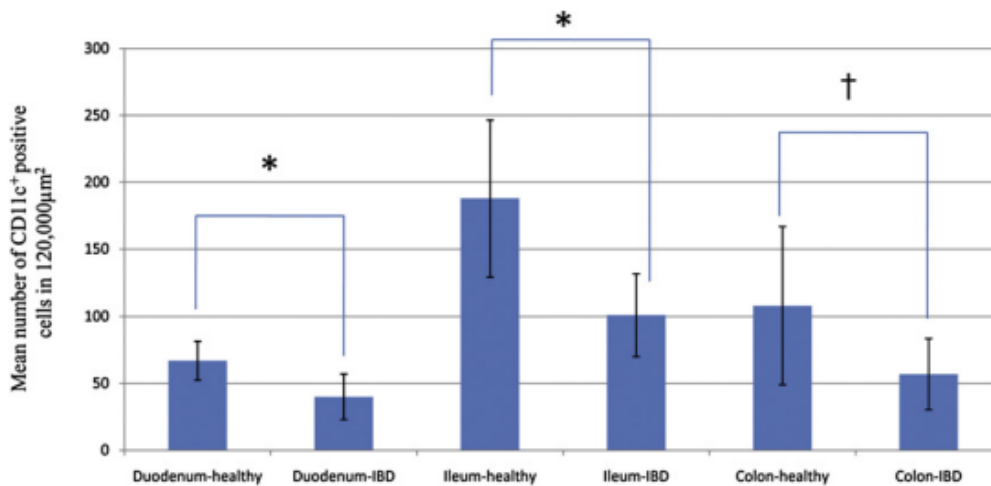


Fig.29

Istogramma rappresentante il numero totale delle cellule positive al CD11c presenti nella mucosa del duodeno, dell'ileo e del colon nei cani sani e nei cani con IBD. Il numero di cellule CD11c positive nel duodeno, nell'ileo e nel colon dei cani sani è significativamente superiore a quello dei cani con IBD (*P < 0.01, †P < 0.05) (Kathrani, Schmitz, et al., 2011).

Un altro studio ha evidenziato come il numero totale di cellule nella lamina propria e la presenza di cellule CD3 positive non forniscano informazioni riguardanti la gravità della patologia o la risposta al trattamento; infatti, non è stata riscontrata nessuna differenza significativa tra la classificazione istologica, il numero totale di cellule nella lamina propria e il numero di cellule CD3 positive nei campioni istologici raccolti prima e dopo la terapia. Inoltre, non è stata evidenziata nessuna correlazione con la CCECAI (Schreiner et al., 2008). In un altro studio, al contrario, il numero di cellule CD3 positive nella lamina propria del duodeno è risultato significativamente differente rapportando cani con IBD a cani sani di controllo (German et al., 2001).

Il *cluster* di differenziazione (CD3) è un complesso proteico multimerico che agisce come co-recettore dei linfociti T, dei quali è considerato un marker di riconoscimento istologico (Schreiner et al., 2008). L'antigene Ki-67 è un indicatore di proliferazione cellulare (Scholzen & Gerdes, 2000). I linfociti T hanno un ruolo

nello sviluppo dello stato infiammatorio in caso di CE; utilizzando queste 2 molecole (CD3 e Ki-67) durante l'esame immunohistochimico, è possibile monitorare una eventuale crescita di linfociti T nella mucosa intestinale, in quanto le cellule positive ad entrambi i marcatori rappresentano linfociti T in fase di proliferazione. La combinazione del Ki-67 come indicatore di proliferazione e del CD3 come marcatore dei linfociti T è stata utilizzata per indagare i linfociti T attivi in diverse aree della parete intestinale. I risultati hanno evidenziato un significativo aumento delle cellule positive ad entrambi i marcatori nella lamina propria delle cripte nei cani con CE rispetto ai cani di controllo. Al contrario, non è stata riscontrata nessuna alterazione significativa nell'epitelio dei villi e delle cripte, così come nella lamina propria dei villi (Fig.30). La lamina propria delle cripte, quindi, rappresenta una zona metabolicamente attiva per i linfociti T.

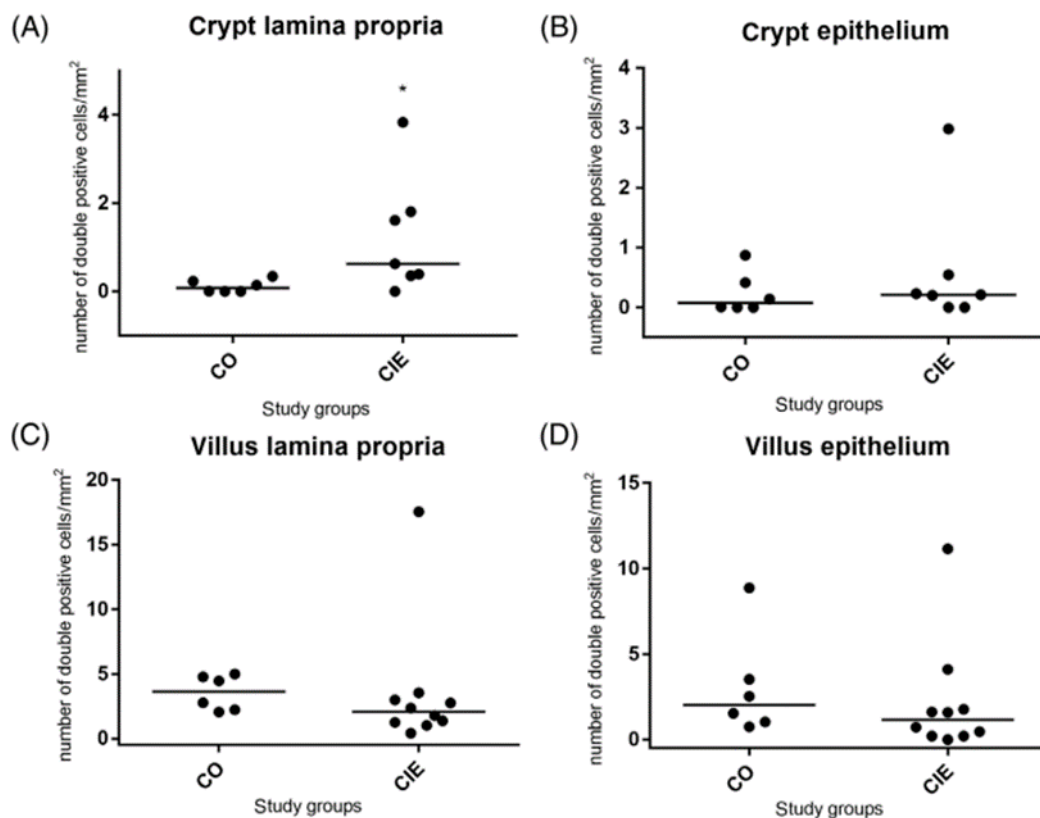


Fig.30

Grafici indicanti la quantità di cellule positive ad entrambi i marcatori (CD3 e Ki-67) nell'epitelio e nella lamina propria di villi e cripte. CO: cani di controllo. CIE: cani con enteropatia cronica. $P < 0,05$ (Karlovits et al., 2020).

Non è stata trovata nessuna correlazione tra il rapporto Ki-67/CD3 e i punteggi istopatologici, mentre è stata riscontrata una correlazione significativa con il punteggio CCECAI.

Il rapporto Ki-67/CD3 può rappresentare uno strumento diagnostico utile nell'identificazione di una CE (Karlovits et al., 2020).

Il trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione 3 (STAT3) è un importante fattore di trascrizione attivato da varie citochine e fattori di crescita implicato nella regolazione dell'omeostasi intestinale (Sugimoto, 2008); nell'uomo, l'espressione del trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione 3 STAT3 attivato (pSTAT3) rappresenta un *biomarker*, poiché esiste una correlazione positiva tra l'aspetto istologico, la gravità e l'indice di attività clinica e l'espressione di pSTAT3 nella mucosa intestinale (Lovato et al., 2003).

In uno studio condotto su campioni biotici di 28 cani con CE sono stati confrontati tramite immunistochemica con quelli ottenuti da cani sani di controllo per determinare se sia possibile attribuire lo stesso ruolo allo pSTAT3 nella specie canina (Manz et al., 2021); è stata rilevata una significativa attivazione dello STAT3 nella mucosa duodenale in tutti e tre i gruppi CE (SRE, FRE, PLE), con alcune differenze nel *pattern* di distribuzione rilevate tra i gruppi. Nei cani con FRE è stata rilevata una maggior espressione a livello dell'area delle cripte, mentre nei cani con PLE l'attivazione è risultata maggiore nell'epitelio della cripta e nei villi. Il gruppo SRE presentava un aumento in entrambe le aree (Fig.31). È stata dimostrata una correlazione positiva tra l'espressione di pSTAT3 e la CCECAI (Fig.32), così come con il punteggio WSAVA (fig.33). L'espressione dello pSTAT3

nella mucosa intestinale potrebbe in futuro essere utilizzato come *biomarker* in caso di CE, nonostante non permetta di distinguere tra le diverse forme esistenti.

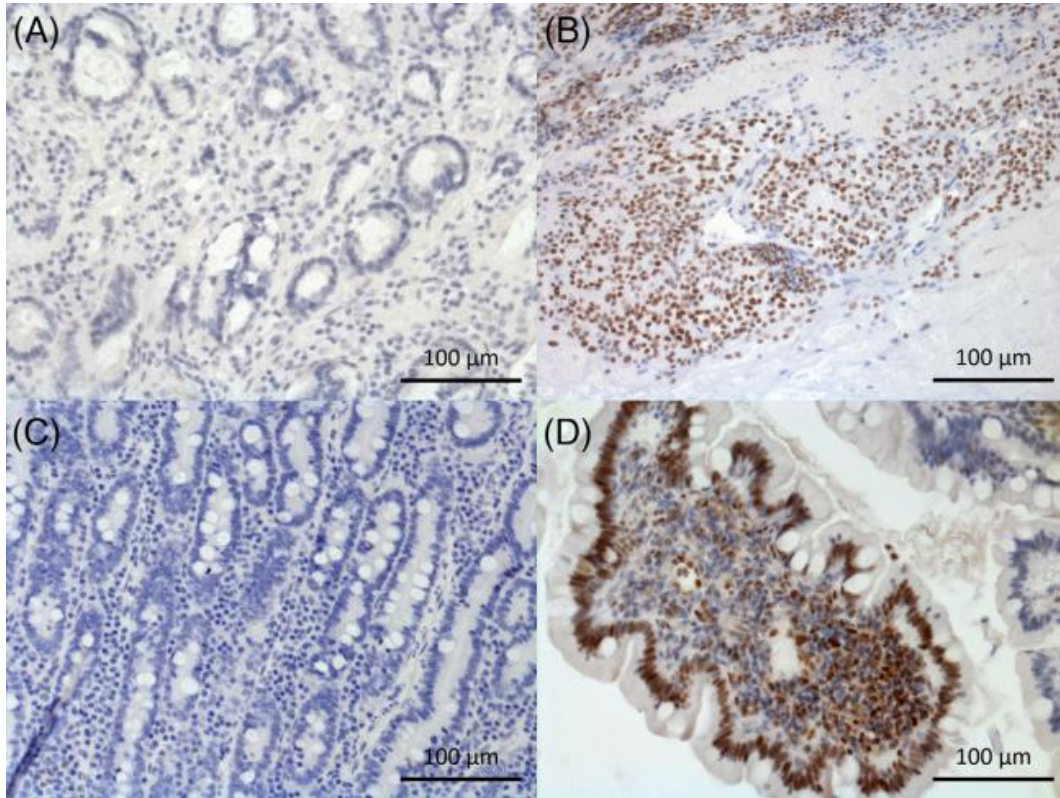


Fig.31

Colorazione immunoistochimica dello pSTAT3 nella mucosa duodenale. A: controllo negativo. B: controllo positivo (carcinoma mammario). C: cane di controllo, regione delle cripte. D: regione dei villi in cane con SRE. I nuclei delle cellule positive per lo pSTAT3 sono colorati in marrone, i negativi in blu con ematossilina. La barra corrisponde a 100 µm (Manz et al., 2021).

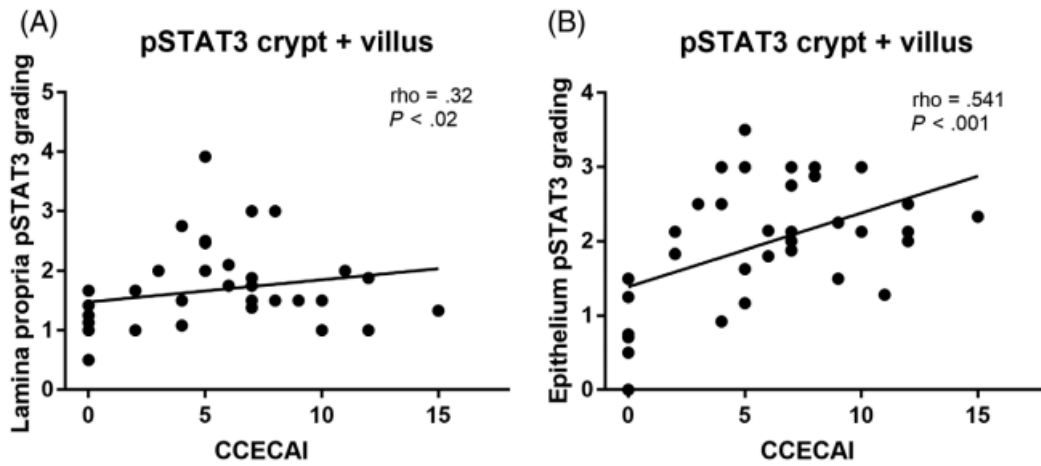


Fig.32

Grafico in cui sono riportate le correlazioni di Spearman tra pSTAT3 e CCECAI nella lamina propria (A) e tra pSTAT3 e CCECAI nell'epitelio (B) (Manz et al., 2021).

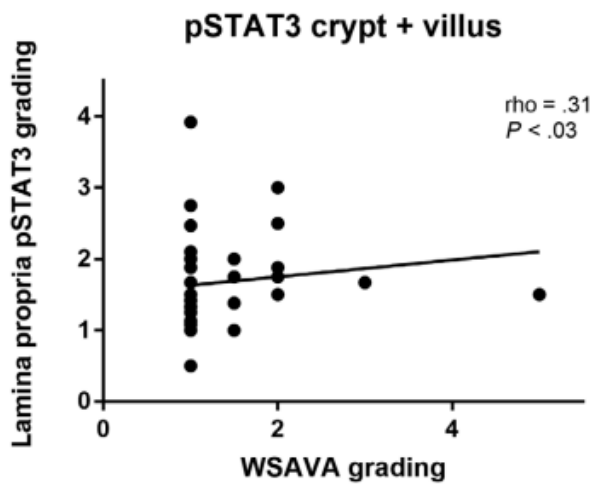


Fig.33

Grafico in cui è riportata la correlazione di Spearman tra pSTATe e punteggio WSAVA nella lamina propria (Manz et al., 2021).

8. Terapia.

L'approccio terapeutico in caso di una enteropatia cronica non è univoco e spesso si rende necessario attraversare diversi passaggi sequenziali per ottenere la migliore risposta clinica. Nelle forme più lievi, il primo approccio prevede il trattamento tramite una terapia dietetica; successivamente, in caso di mancata efficacia, si passa ad una terapia antibiotica ed infine ad una terapia immunosoppressiva (Makielski et al., 2019). È importante considerare che la maggior parte delle linee guida pratiche per il trattamento di una CE nel cane si basano sull'esperienza individuale dei clinici, che a loro volta si basano sul cambiamento riscontrato dal punto di vista clinico ed istopatologico in seguito ad un determinato trattamento (Malewska et al., 2011). Davanti ad un soggetto affetto da una CE, l'impostazione della terapia deve prendere in considerazione il tipo di CE, la gravità e la variabilità soggetto-specifica, infatti, non si può parlare di una terapia universale, ma è più corretto considerare un iter terapeutico calibrato per ogni paziente.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi iter terapeutici per il trattamento delle CE, nonostante le prove scientifiche siano poche e molto variabili (Makielski et al., 2019).

8.1 Dieta.

La dieta ha una forte influenza sulla condizione dell'apparato gastrointestinale, in quanto modula il microbiota intestinale, influenza il sistema immunitario, incrementa la funzionalità della barriera epiteliale intestinale e influisce sulla motilità. Il tipo di dieta può essere un fattore che interviene nella patogenesi di una CE e, di conseguenza, può diventare un *target* terapeutico (Kathrani, 2021).

I lipidi, in particolare gli acidi grassi, sono coinvolti nel mantenimento dell'integrità e della fluidità della membrana cellulare, nella modulazione dell'infiammazione e nell'assorbimento delle vitamine liposolubili. La quantità di grassi inclusi in una dieta può rappresentare un *target* terapeutico utile in un cane con CE.

Un aumento della quantità di grassi promuove l'aumento di peso in animali che si presentano con un BCS sotto la norma. I grassi rendono il cibo più appetibile e permettono di diminuirne la quantità, mantenendo la stessa quota energetica; In più, diete arricchite con acidi grassi specifici come l'acido eicosapentaenoico o l'acido docosaesaenoico presentano proprietà antiinfiammatorie ed immunomodulatorie (Ontsouka et al., 2010).

In caso di disordini nella motilità gastrointestinale, linfangectasia o pancreatite, può rivelarsi utile diminuire la quota lipidica (Tolbert et al., 2022). In caso di linfangectasia, si ipotizza che le diete a basso contenuto di grassi siano in grado di diminuire il flusso e la pressione a livello dei vasi linfatici grazie ad una diminuzione nella produzione di chilomicroni; la riduzione del flusso e della pressione impedisce la dilatazione dei vasi linfatici e la perdita di linfa (Kathrani, 2021).

In un modello sperimentale di IBD è stato dimostrato che diete ad alto contenuto di grassi aumentano l'espressione dell'mRNA del NOD2 e del TLR5, due PRRs implicati nella patogenesi della CE (Martinez-Medina et al., 2014). In uno studio sui suini è stato dimostrato che la supplementazione con olio di pesce ricco di acidi grassi omega-3 per 21 giorni riduce i livelli di mRNA del NOD2, del TLR4 e del TLR5

(Liu et al., 2012). La supplementazione con acidi grassi omega-3 potrebbe rivelarsi utile in quei cani che presentano una risposta immunitaria mucosale alterata, ma ad oggi non esistono studi che confermino questa teoria (Kathrani, 2021).

La quantità e la qualità dei lipidi presenti nella dieta, quindi, possono rappresentare un *target* terapeutico nei cani con CE; di conseguenza, può rivelarsi utile, all'inizio di un iter terapeutico, utilizzare una dieta a basso contenuto di grassi, oppure integrare la dieta con acidi grassi specifici.

Le proteine sono nutrienti necessari in quanto forniscono aminoacidi essenziali e sono fonte di azoto per la sintesi di aminoacidi non essenziali. Oltre ad avere un ruolo strutturale ed in parte energetico, le proteine svolgono anche ruoli importanti nell'ambito dell'immunocompetenza, nella guarigione delle ferite e nella normale funzionalità degli organi. Aminoacidi specifici come arginina e glutammina hanno un ruolo nella regolazione della barriera mucosale dell'intestino (Liu et al., 2017).

Nei cani con CE è possibile che lo stato di malassorbimento intestinale porti ad una condizione di emaciazione, con perdita di massa muscolare, ipoalbuminemia e difetti nella cute. In questi casi si rende necessaria una supplementazione proteica, tenendo in considerazione che un intestino compromesso non è in grado di assorbire una grande quantità di proteine e di conseguenza una supplementazione può portare ad un peggioramento dei segni clinici. La quantità di proteine, quindi, dovrebbe essere regolata in base alla gravità dei segni clinici (Tolbert et al., 2022).

I cani con CE presentano una diminuzione nella concentrazione sierica di triptofano (Tamura et al., 2019). Studi effettuati su topi e suini hanno dimostrato che la supplementazione dietetica con triptofano, o con i suoi metaboliti, induce un effetto antiinfiammatorio; in particolare, la supplementazione migliora i segni clinici, il peso e l'aspetto istologico, mentre diminuisce la permeabilità intestinale e l'espressione di citochine pro-infiammatorie (Islam et al., 2017; Kim et al., 2010).

Le fibre sono carboidrati complessi resistenti alla digestione enzimatica ed all'assorbimento intestinale. La fermentazione delle fibre nell'intestino porta alla produzione di acidi grassi a catena corta (acido acetico, butirrico e propionico), i

quali contribuiscono alla crescita e all'attività dei batteri commensali, inibiscono la crescita di batteri patogeni e rappresentano una fonte di energia per le cellule epiteliali del colon. La fermentazione delle fibre contribuisce alla stimolazione del sistema immunitario e alla creazione di un ambiente antiinfiammatorio, aumenta la capacità di assorbimento delle cellule epiteliali del colon e riduce la presenza di metaboliti tossici (Tolbert et al., 2022).

Uno studio retrospettivo ha dimostrato che il trattamento con una dieta commerciale altamente digeribile, integrata con fibra solubile, ha portato ad una risposta clinica da molto buona ad eccellente nella maggior parte dei cani che presentavano una diarrea cronica idiopatica del grosso intestino (Leib, 2000).

In un altro studio, 19 cani con colite cronica hanno risposto positivamente ad una dieta commerciale integrata con fibre, la quale ha permesso il mantenimento di uno stato di remissione senza l'utilizzo di ulteriori terapie anche nel lungo termine (Lecoindre & Gaschen, 2011).

Nei cani affetti da una CE è probabile osservare una carenza di micronutrienti e vitamine causata dal malassorbimento, dalla perdita intestinale o da un inadeguato apporto dietetico (Tolbert et al., 2022). In caso di ipocobalaminemia, è improbabile che la supplementazione di quest'ultima si traduca in un miglioramento duraturo, tuttavia, un'integrazione di vitamina B 12 garantisce l'aumento di peso e il miglioramento dei segni clinici. La supplementazione di cobalamina può essere effettuata per via enterale, da 250 a 1000 µg di cianocobalamina ogni 24 ore, oppure per via parenterale, da 250 a 1000 µg di cianocobalamina SC ogni 7 giorni (Toresson et al., 2018).

La supplementazione di vitamina B9 è raccomandata negli stati carenziali, nonostante non ci siano studi che dimostrino un miglioramento dei segni clinici nei cani con CE (Tolbert et al., 2022).

La carenza di vitamina D è un riscontro comune nei cani con CE, tuttavia, ad oggi non ci sono studi che dimostrino il beneficio di una supplementazione di vitamina D nei cani con CE (Tolbert et al., 2022). Nell'uomo è stato dimostrato che la

supplementazione di vitamina D nei pazienti affetti da IBD migliora l'attività biologica e clinica della malattia (Guzman-Prado et al., 2020).

In alcuni cani con PLE è possibile rilevare una carenza di magnesio; Il magnesio può essere integrato per via orale con una dose da 1 mEq/kg/d a 2 mEq/kg/d, utilizzando ossido di magnesio, citrato di magnesio o solfato di magnesio (Kathrani, 2021).

Esistono diversi tipi di diete terapeutiche che possono essere utilizzate come primo step nell'approccio terapeutico ad una CE.

In cani con segni clinici lievi di una patologia a carico del piccolo intestino è possibile somministrare una dieta altamente digeribile con un basso contenuto di fibra (Tolbert et al., 2022).

Nel caso di un coinvolgimento del grosso intestino, spesso si somministra una dieta arricchita con fibre. In uno studio su cani da lavoro con colite idiopatica cronica, l'integrazione dietetica con cuticola di psyllium macinata, una pianta asiatica nota come *Plantago ovata* (dose media: 2/3 cucchiaini/kg/giorno), ha portato ad un miglioramento della consistenza delle feci e ad una ridotta frequenza di defecazione (Alves et al., 2021).

In un altro studio effettuato su cani con diarrea idiopatica del grosso intestino, l'aggiunta di *psyllium* ad una dieta altamente digeribile ha portato ad un miglioramento della consistenza delle feci nella maggior parte dei cani (Leib, 2000).

Le proteine spesso sono implicate nell'insorgere di una risposta immunitaria avversa e, per ovviare a questo problema, sono state sviluppate delle diete a base di proteine idrolizzate; l'idrolisi consiste in un trattamento enzimatico che scinde le proteine in frammenti, con l'obiettivo di minimizzare la risposta immunitaria (Cave, 2006).

In uno studio effettuato su 26 cani con CE, i cani nutriti con una dieta a base di soia idrolizzata hanno avuto un netto miglioramento del punteggio CIBDAI rispetto ai cani nutriti con una dieta terapeutica altamente digeribile (Mandigers et al., 2010).

Kathrani e colleghi hanno valutato la risposta delle citochine nel sangue ad alcune diete a base di proteine idrolizzate; i risultati hanno riportato una minima se non nulla risposta, confermando le ipotesi iniziali (Kathrani & Hall, 2019).

Alcune diete idrolizzate sono associate ad un basso contenuto di lipidi, che può avere un effetto benefico, come precedentemente dimostrato, oppure sono integrate con acidi grassi omega-3 e soia, che possono avere effetti immunomodulatori (Kathrani, 2021).

Un altro approccio dietetico consiste nell'utilizzare diete a base di proteine diverse da quelle normalmente utilizzate nella dieta. Alcune diete terapeutiche a base di nuove proteine hanno il vantaggio di avere un maggior contenuto di fibra, questo può tornare utile in quei casi in cui sia presente diarrea a carico del grosso intestino (Kathrani, 2021).

In uno studio effettuato su 15 cani con CE alimentati con una dieta monoproteica a base di uova, 12 cani hanno mostrato un marcato miglioramento del punteggio CIBDAI (Tørnqvist-Johnsen et al., 2020).

Alcuni studi hanno comparato l'efficacia delle diete idrolizzate e delle diete a base di nuove proteine. In uno studio retrospettivo, 40 cani nutriti con una dieta a base di proteine idrolizzate, con o senza una concomitante terapia immunosoppressiva, hanno avuto meno episodi di ricaduta rispetto ai 18 cani nutriti con una dieta a base di nuove proteine (Maria Chiara Marchesi et al., 2017). Un altro studio non ha evidenziato nessuna differenza significativa nella risposta clinica confrontando i due tipi di diete (K. Allenspach et al., 2016).

Alcuni emulsionanti e conservanti che si trovano nelle diete commerciali possono avere effetti negativi sul microbiota intestinale e sul sistema immunitario mucosale. Questo significa che alcuni soggetti possono beneficiare di una dieta *home-made*, la quale dovrebbe essere formulata seguendo i consigli di un veterinario nutrizionista (Kathrani, 2021).

Una dieta *home-made* permette una rotazione periodica degli alimenti, che può rivelarsi utile nel mantenimento dell'appetito; questo diventa particolarmente vantaggioso in quei cani che presentano una forma di CE grave, in quanto possono

sviluppare delle avversioni al cibo durante il trattamento e la novità può rappresentare uno stimolo per l'appetito (Tôrres et al., 2003). Le diete fatte in casa non presentano la problematica della contaminazione crociata, che si può riscontrare nelle diete commerciali, che consiste nella presenza di prodotti animali non dichiarati che possono causare una stimolazione antigenica indesiderata (Pagani et al., 2018).

8.2 Probiotici e prebiotici.

I probiotici sono microorganismi vivi non patogeni somministrati per migliorare l'equilibrio microbico, in particolare nel tratto gastrointestinale; esercitano i loro effetti benefici attraverso vari meccanismi, tra cui l'abbassamento del pH intestinale, la diminuzione della colonizzazione e dell'invasione da parte di organismi patogeni e la modifica della risposta immunitaria dell'ospite (Williams, 2010).

In uno studio è stata valutata l'efficacia terapeutica di un probiotico multi-ceppo nei confronti di cani affetti da IBD. Venti cani affetti da IBD sono stati divisi in due gruppi da 10; ad un gruppo è stato somministrato il probiotico, all'altro un trattamento a base di prednisone e metronidazolo, entrambi per 8 settimane. I risultati hanno preso in considerazione la gravità clinica della malattia espressa tramite punteggio CIBDAI, l'aspetto istologico, l'espressione della proteina di giunzione stretta epiteliale (TJP) e la composizione del microbiota fecale. C'è stato un netto miglioramento dei segni clinici in entrambi i gruppi, ma solo il gruppo trattato con probiotici ha mostrato *l'upregulation* dell'espressione della proteina di giunzione stretta epiteliale (TJP), che potrebbe suggerire una maggiore integrità della barriera epiteliale intestinale nei cani trattati con probiotici.

Nel gruppo trattato con probiotici è stata dimostrata una significativa diminuzione dei punteggi clinici ed istologici, una diminuzione dell'infiltrazione di cellule T CD3 e la normalizzazione della disbiosi (Rossi et al., 2014).

Un altro studio ha valutato gli effetti di un probiotico multi-ceppo sul microbiota intestinale in cani affetti da IBD. Trentaquattro cani con IBD sono stati divisi casualmente per ricevere una terapia standard (dieta e prednisone) con o senza la somministrazione di probiotici. Le sezioni di tessuto ricavate dalle biopsie endoscopiche sono state valutate mediante ibridazione fluorescente in situ (FISH). L'attività clinica della malattia, i cambiamenti nel microbiota mucosale e

l'espressione della TJP sono stati valutati prima e dopo la terapia della durata di 8 settimane. Entrambi i trattamenti hanno aumentato il numero totale di batteri e le singole specie presenti nella mucosa intestinale. Nonostante entrambi i trattamenti siano stati associati ad una remissione clinica rapida e progressiva, non è stato osservato un miglioramento dal punto di vista istopatologico.

Così come nel precedente studio, l'espressione della TJP è risultata maggiore nei cani sottoposti al trattamento con probiotici.

Il condroitin solfato, un glicosamminoglicano naturale presente nella matrice extracellulare, viene considerato un'opzione terapeutica per ridurre l'incidenza e la gravità delle ricadute nei pazienti umani con IBD (du Souich et al., 2009). Segarra e colleghi hanno valutato gli effetti di una somministrazione a lungo termine (180 giorni) di condroitin solfato e prebiotici (amido resistente, β -glucani e mannanoligosaccaridi), associati ad una dieta a base di proteine idrolizzate in cani con IBD. In totale 27 cani sono stati suddivisi casualmente in 2 gruppi, un gruppo placebo e un gruppo con supplemento dietetico. Entrambi i gruppi hanno mostrato una diminuzione del punteggio CIBDAI.

È stata monitorata la paraoxonasi-1 (PON1), un enzima antiossidante utilizzato come *biomarker* per l'infiammazione e lo stress ossidativo nell'uomo; un abbassamento della concentrazione sierica di paraoxonasi-1 (PON1) è associata, nell'uomo, ad un maggior grado di infiammazione intestinale (Boehm et al., 2009). Dopo il trattamento, un aumento della concentrazione sierica di PON1 è stato rilevato solo nel gruppo che ha ricevuto il trattamento con condroitin solfato e prebiotici; questo potrebbe indicare un effetto protettivo di questi integratori nei confronti dello stress ossidativo che si manifesta in caso di IBD. Non sono stati rilevati cambiamenti significativi nella CRP pre e post trattamento.

Nonostante sia stato rilevato un miglioramento dal punto di vista istologico nei cani trattati con gli integratori, la differenza tra i due gruppi nel punteggio istologico WSAVA post trattamento non ha raggiunto un livello adeguato di significatività statistica. La popolazione microbica non ha mostrato cambiamenti significativi in nessuno dei due gruppi.

La somministrazione combinata di condroitin solfato e prebiotici con una dieta idrolizzata per 180 giorni si è dimostrata sicura, ed ha indotto dei cambiamenti in alcuni *biomarker*, suggerendo un potenziale effetto benefico sullo stato infiammatorio intestinale (Segarra et al., 2016).

Un altro studio ha valutato l'efficacia clinica della somministrazione di prebiotici in associazione a probiotici in cani con CE; questa associazione viene definita sinbiotica. I cani sono stati suddivisi in due gruppi, in uno è stata somministrata solo una dieta idrolizzata, nell'altro, oltre alla dieta, è stato somministrato un sinbiotico contenente il probiotico *Enterococcus faecium*. Non sono state riscontrate differenze tra i gruppi per quanto riguarda l'efficacia clinica, l'aspetto istologico e l'espressione di geni infiammatori. Siccome dei 45 cani reclutati, solo 12 hanno terminato lo studio, non è stato possibile determinare se il sinbiotico in questione abbia avuto qualche effetto benefico nell'arco delle sei settimane di trattamento (Schmitz et al., 2015).

8.3 Antibiotici.

Gli antibiotici vengono spesso utilizzati nel trattamento delle CE nel cane, presumibilmente per contrastare gli effetti della disbiosi che possono innescare le risposte infiammatorie dell'ospite (Makielski et al., 2019).

I cani con CE possono essere trattati con diverse tipologie di antibiotici (tetraciclina, metronidazolo, ampicillina, tilosina); le forme di CE che rispondono maggiormente ad un trattamento antibiotico possono essere definite ARD, ossia diarrea rispondente agli antibiotici (Westermarck et al., 2005).

La tilosina è un macrolide che viene spesso utilizzato per trattare forme di diarrea cronica ed intermittente nel cane. La sua attività antimicrobica è diretta nei confronti dei batteri gram-positivi anaerobi facoltativi od obbligati.

La diarrea responsiva alla tilosina (TRD) viene descritta nei cani come una forma di ARD, che colpisce tipicamente cani adulti di razza grande. In uno studio effettuato su 14 cani, il trattamento con la tilosina ha eliminato la diarrea in tutti i soggetti nell'arco di 3 giorni; dopo la sospensione della terapia, la diarrea è ricomparsa in 12 cani nell'arco di 30 giorni.

La risposta positiva alla terapia potrebbe essere spiegata dalla capacità della tilosina di interferire con l'adesione batterica, impedendo ai batteri di colonizzare la mucosa intestinale, ma anche alle proprietà immunomodulatorie del macrolide (Westermarck et al., 2005).

Normalmente la consistenza delle feci nei cani con diarrea responsiva alla tilosina (TRD) è normale finché il soggetto è sotto trattamento, ma la diarrea tende a ripresentarsi una volta che la terapia viene interrotta (Westermarck et al., 2005).

Molti proprietari di cani riportano la stessa efficacia della tilosina anche dopo trattamenti ripetuti; questo è inusuale, poiché trattamenti antibiotici ripetuti possono portare allo sviluppo di resistenze (Kilpinen et al., 2011).

L'apparente efficacia della tilosina ha sollevato dei dubbi da parte di altri studiosi, in particolare riguardanti il ridotto numero di cani utilizzati per ricavare queste informazioni (Westermarck et al., 2005) ; per risolvere questi dubbi, Kilpinen e colleghi hanno effettuato uno studio con l'obiettivo di valutare l'effetto della tilosina sulla consistenza fecale e stabilire se il trattamento sia davvero così efficace come riportato in letteratura. In totale 71 cani con sospetta TRD sono stati inclusi nello studio e suddivisi in un gruppo placebo ed in un gruppo ricevente il trattamento, che consiste nella somministrazione di 25 mg/kg di tilosina PO ogni 24h per sette giorni. Su 24 cani che hanno ricevuto il trattamento con tilosina, 20 hanno risposto positivamente. L'efficacia della tilosina sulla consistenza fecale è risultata significativamente superiore a quella del trattamento con placebo. Nell'85% dei cani che hanno ricevuto il trattamento, la diarrea è cessata nell'arco di una settimana, mentre nei cani che hanno ricevuto il placebo solo il 29% ha mostrato una remissione. Una volta che la tilosina è stata interrotta, molti cani hanno avuto una recidiva, confermando i risultati degli studi precedenti.

Non esiste un dosaggio standard della tilosina nei cani con CE; in questo studio si è scelto di utilizzare il dosaggio di 25 mg/kg ogni 24h, seguendo le informazioni che derivano dalla letteratura. Sulla base dei risultati dello studio, questa dose risulta sufficiente, e non sono stati riscontrati benefici aumentandola; infatti, nessuno dei soggetti che inizialmente non ha risposto alla terapia ha mostrato dei miglioramenti quando è stata raddoppiata la dose.

Lo studio ha confermato l'efficacia della tilosina nel trattamento della diarrea ricorrente nel cane (Kilpinen et al., 2011).

Il dosaggio di 25 mg/kg ogni 24h è il più utilizzato per il trattamento della TRD; uno studio ha cercato di valutare se un dosaggio inferiore (5 o 15 mg/kg ogni 24h) sia efficace allo stesso modo nel migliorare i sintomi e la consistenza fecale. Sono stati inclusi nello studio 15 cani che precedentemente avevano risposto al trattamento con tilosina a 25 mg/kg per sette giorni. 8 cani hanno ricevuto un trattamento con un dosaggio di 5 mg/kg, 7 cani con un dosaggio di 15 mg/kg. In totale, 14 su 15 cani hanno risposto positivamente alla terapia, con un miglioramento della

consistenza fecale paragonabile a quello ottenuto con un dosaggio di 25 mg/kg (Fig 34).

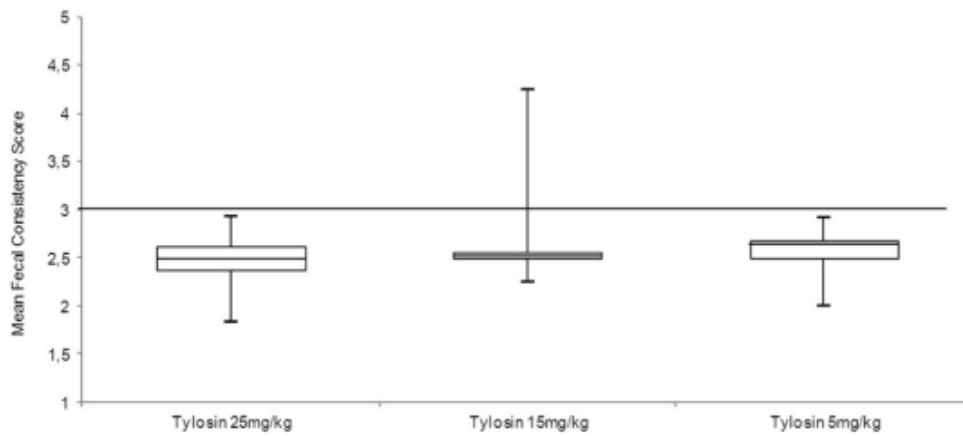


Fig 34

Box & whisker plot dei punteggi medi di consistenza fecale valutati durante gli ultimi tre giorni di trattamento ai dosaggi di tilosina di 25 mg/kg, 15 mg/kg e 5 mg/kg. I boxes rappresentano i valori del 25° e 75° percentile, la linea orizzontale rappresenta i valori mediani e le barre verticali rappresentano l'intervallo tra il valore massimo e il valore minimo. Non sono state riscontrate differenze significative nel *fecal score* dei tre gruppi. $p > 0,05$ (Kilpinen et al., 2014).

Questi dati indicano che, al contrario di quello che riporta la maggior parte dei testi, è possibile utilizzare una dose inferiore a 25 mg/kg di tilosina nel trattamento della TRD, senza andare incontro ad una riduzione dell'efficacia del farmaco (Kilpinen et al., 2014).

Uno studio ha confrontato l'efficacia clinica della rifaximina con quella del metronidazolo, un antibiotico comunemente prescritto ai cani con IBD (Menozzi et al., 2016). La rifaximina è una rifamicina semisintetica ad ampio spettro, già utilizzata in medicina umana nel trattamento del morbo di Crohn (Prantera et al., 2012; Venturini, 1983). Sono stati inclusi nello studio 24 cani divisi in due gruppi, un gruppo di 10 cani che ha ricevuto un trattamento a base di metronidazolo, e un

gruppo di 14 cani che ha ricevuto un trattamento a base di rifaximina, entrambi per 21 giorni. Entrambi i gruppi alla fine del trattamento hanno mostrato un netto miglioramento dei sintomi clinici, confermato dall'abbassamento dei punteggi CIBDAI. Non sono state riscontrate differenze significative nel miglioramento clinico causato dai due trattamenti. In questo studio, quindi, metronidazolo e rifaximina si sono dimostrati ugualmente efficaci nell'indurre una remissione clinica dei sintomi (Fig. 35).

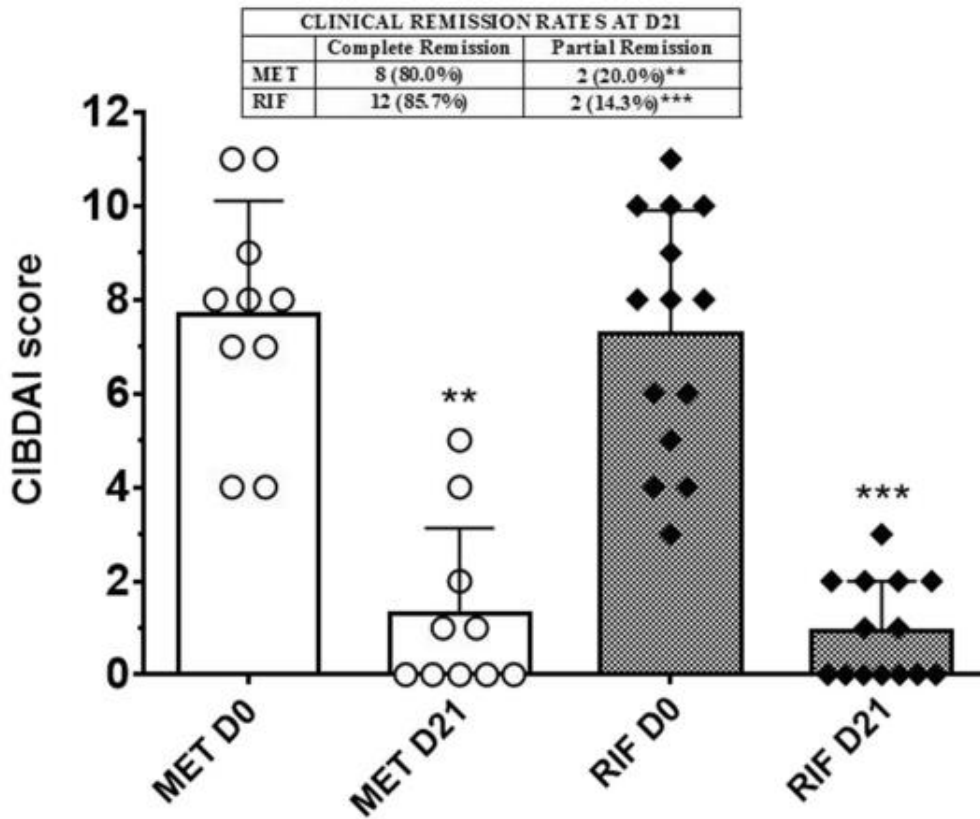


Fig 35

Effetto della somministrazione di metronidazolo e rifaximina sul tasso di remissione clinica (box in alto) e sui punteggi CIBDAI (colonne e simboli) in entrambi i gruppi, al giorno 0 (D0) e al giorno 21 (D21). Le colonne rappresentano la media e la deviazione standard (barre verticali) dei punteggi CIBDAI. I simboli rappresentano i punteggi CIBDAI individuali dei cani in ogni gruppo. **P < 0.001 D21 vs D0; ***P < 0.0001 D21 vs D0. (Menozzi et al., 2016)

L'efficacia del metronidazolo e della rifaximina sono stati confermati dalla significativa diminuzione della concentrazione sierica di CRP nell'ultimo giorno di trattamento.

Nell'uomo è stato dimostrato che la rifaximina è in grado di aumentare la crescita di batteri con effetto benefico, come *bifidobacteria* o *Faecalibacterium praunsnitzii* (Maccaferri et al., 2010). Tuttavia, il metronidazolo, che è risultato efficace come la rifaximina in questo studio clinico, è al contrario noto per causare una diminuzione degli anaerobi come *Faecalibacterium*, e quindi il ruolo protettivo di alcuni batteri contro l'infiammazione rimane da chiarire.

La rifaximina è un'agonista del recettore X del pregnano (PXR), un recettore nucleare che è stato studiato per i suoi effetti sulla colite sperimentale del topo (Ma et al., 2007); il recettore in questione ha un effetto protettivo che esplica tramite l'inibizione della cascata infiammatoria indotta da NF- κ B (Cheng et al., 2010). Poiché l'attivazione di NF- κ B è stata osservata nei cani con CE, è possibile che l'efficacia della rifaximina sia in parte dovuta alla sua attività antiinfiammatoria.

Considerando che anche la tilosina presenta delle proprietà antiinfiammatorie, potrebbe rafforzarsi l'ipotesi secondo cui gli antibiotici più efficaci nei confronti degli stati infiammatori cronici dell'intestino siano quelli che mirano a ridurre sia la carica microbica che la risposta immunitaria (Menozzi et al., 2016).

La colite ulcerativa istiocitaria (HUC) è una tipologia di IBD che causa tenesmo, ematochezia ed una grave perdita di peso. Nove cani con diagnosi confermata di colite ulcerativa istiocitaria (HUC) sono stati inclusi in uno studio per valutare l'efficacia della terapia antibiotica. Tra questi, 2 cani sono stati trattati con enrofloxacin, 6 con una combinazione di enrofloxacin, metronidazolo e amoxicillina e 1 con una combinazione di enrofloxacin e metronidazolo. Dopo il trattamento sono stati ottenuti dei campioni biotici da 5 cani, che hanno mostrato un netto miglioramento delle lesioni istologiche. È stato riscontrato un aumento significativo del peso corporeo dopo il trattamento in tutti i cani. Queste

osservazioni suggeriscono che un agente infettivo sensibile agli antibiotici giochi un ruolo importante nella manifestazione clinica della HUC, e supportano l'uso di antibiotici nel suo trattamento.

Uno studio ha valutato l'evoluzione clinica, endoscopica ed istopatologica della LPE in 16 cani trattati con metronidazolo e prednisone. I cani sono stati trattati con una terapia dietetica associata ad una terapia medica a base di prednisone (dosi progressivamente decrescenti nell'arco di 90 giorni, da 1mg/kg ogni 12h a 0,5 mg/kg ogni 48h) e metronidazolo (10 mg/kg ogni 24h per 21 giorni), e sono stati monitorati per 120 giorni dall'inizio del trattamento. I segni clinici sono diminuiti di intensità e frequenza durante il trattamento, in particolare durante il primo mese. Il trattamento ha portato ad un evidente aumento del peso in tutti i cani monitorati, in particolare dal primo mese di trattamento, ed ha continuato ad essere evidente fino ad un mese dopo la fine della terapia farmacologica.

L'esame endoscopico post trattamento ha mostrato una significativa riduzione delle lesioni macroscopiche (Fig 36), senza però evidenziarne una completa remissione, mentre le lesioni istopatologiche non hanno mostrato nessun miglioramento significativo.

La mancata correlazione tra il miglioramento endoscopico e quello istopatologico potrebbe essere dovuta ad una maggiore attenzione da parte dei proprietari nel gestire l'alimentazione dei cani, che può aver contribuito a ridurre le lesioni endoscopiche iniziali; oppure, le biopsie post-trattamento potrebbero essere state effettuate troppo precocemente e quindi, se fossero state effettuate dopo un intervallo di tempo più lungo, avrebbero potuto dare risultati diversi, in quanto ci sarebbe stato più tempo per garantire una riorganizzazione istologica completa (M. Garcia-Sancho et al., 2007).

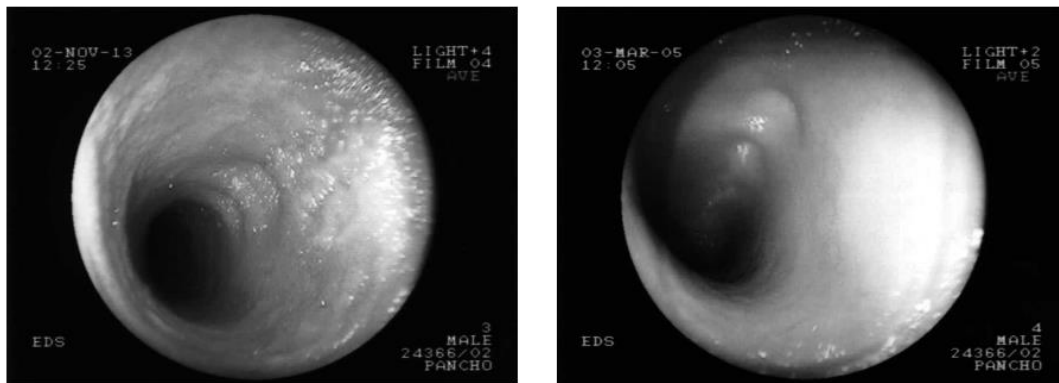


Fig.36

Aspetto endoscopico del duodeno prima del trattamento (a sinistra) e dopo il trattamento (a destra) a base di prednisone e metronidazolo. A sinistra è possibile vedere la mucosa duodenale irregolare, con una evidente granularità(M. Garcia-Sancho et al., 2007).

8.4 Immunosoppressori.

Nei cani che non rispondono alla terapia dietetica o antibiotica si rende necessario effettuare un trattamento a base di farmaci immunosoppressivi, con i corticosteroidi che rappresentano la classe farmacologica più utilizzata (Makielski et al., 2019).

In uno dei primi studi che ha valutato la risposta ad una terapia immunosoppressiva, viene confrontata l'efficacia di un trattamento a base di prednisone con uno a base di prednisone e metronidazolo. I cani oggetto di studio

sono stati suddivisi casualmente in due gruppi; ad un gruppo è stato somministrato prednisone al dosaggio di 1mg/kg ogni 12h, all'altro è stato somministrato prednisone allo stesso dosaggio associato a metronidazolo al dosaggio di 10 mg/kg ogni 12h, entrambi i trattamenti della durata di 21 giorni. L'efficacia del trattamento è stata valutata attraverso l'analisi dei punteggi CIBDAI e della concentrazione di CRP prima e dopo il trattamento. Il tasso di remissione dopo 21 giorni di trattamento è risultato simile per entrambi i gruppi. Entrambi i regimi di trattamento hanno portato ad una significativa riduzione della concentrazione di CRP sierica, ma l'entità della riduzione è stata maggiore nei cani trattati solo con prednisone.

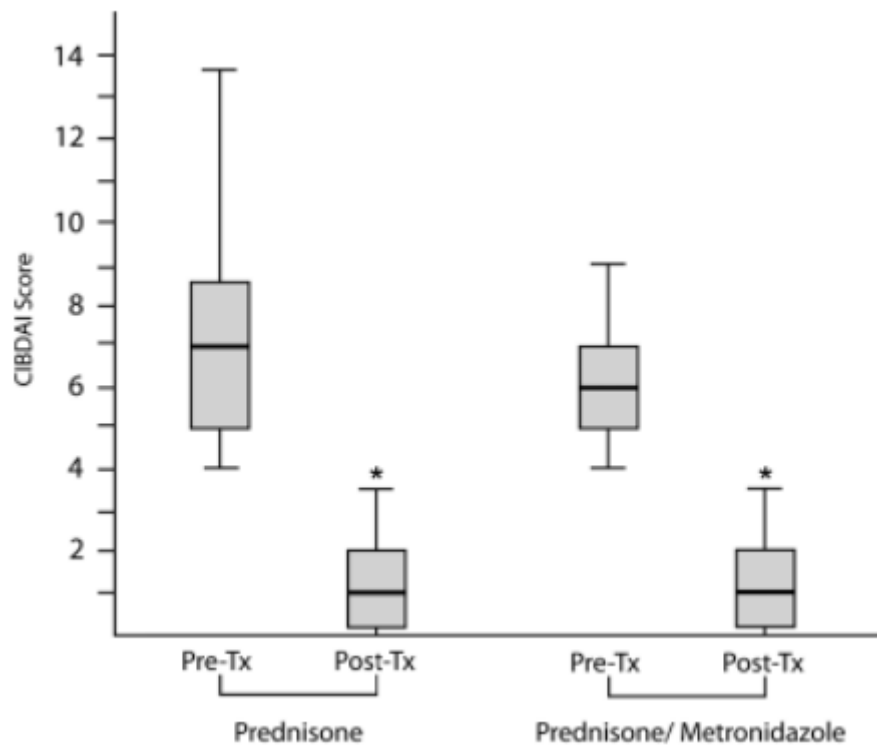


Fig 37

Effetto del trattamento farmacologico nell'indurre una remissione clinica secondo i punteggi CIBDAI. La remissione è stata definita come una riduzione del 75% o più del punteggio CIBDAI dopo il trattamento. I *box-plots* raffigurano la media (linea orizzontale), l'intervallo tra il valore massimo e il valore minimo (barre verticali) e i quartili 25° e 75° percentile del punteggio CIBDAI (box). * $p < .05$ rispetto a Pre-Tx. (Jergens et al., 2010)

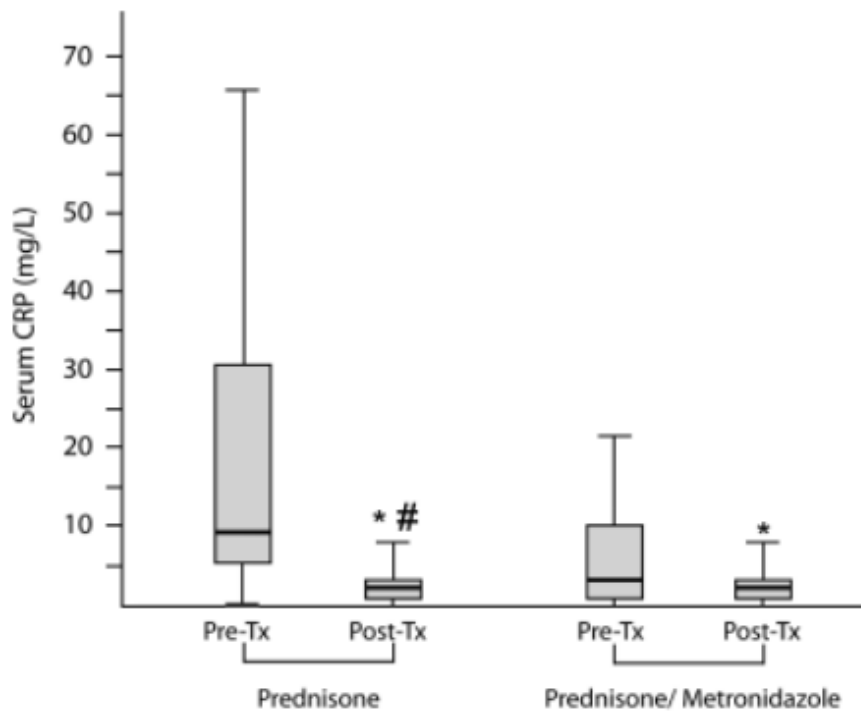


Fig 38

Effetto della terapia farmacologica sulla concentrazione sierica di CRP. I *box-plots* raffigurano la media (linee orizzontali), l'intervallo tra il valore massimo e il valore minimo (barre verticali) e i quartili 25° e 75° della concentrazione di CRP. * $p < .05$ rispetto a Pre-Tx. # $p < .05$ rispetto a prednisone/metronidazolo. L'entità del cambiamento della concentrazione di CRP del gruppo prednisone è maggiore rispetto al gruppo prednisone/metronidazolo (Jergens et al., 2010).

I risultati dello studio hanno mostrato che l'efficacia del trattamento a base di prednisone è equivalente all'efficacia del trattamento a base di prednisone e metronidazolo. Entrambi i farmaci sono stati ben tollerati e gli effetti collaterali si sono rivelati rari (Jergens et al., 2010).

Il budesonide è un glucocorticoide non alogenato sviluppato per l'uso nei pazienti umani con IBD con lo scopo di limitare gli effetti sistemici tipici dei glucocorticoidi. Nel cane viene utilizzato per il trattamento della dermatite allergica, delle malattie

infiammatorie croniche delle vie aeree e dell'IBD (AHLSTROM et al., 2010; Melamies et al., 2012; Pietra et al., 2013).

Dye e colleghi hanno valutato l'efficacia del budesonide rapportandola a quella del prednisone; i cani oggetto dello studio sono stati suddivisi casualmente in due gruppi: il primo gruppo ha ricevuto un trattamento a base di budesonide tramite una formulazione in polvere (3–7 kg: 1 mg PO q24h, 7.1–15 kg: 2 mg PO q24h, 15.1–30 kg: 3 mg PO q24h, >30 kg: 5 mg PO q24h, per sei settimane), il secondo gruppo ha ricevuto un trattamento a base di prednisone (1 mg/kg PO q12h per 3 settimane e poi 0.5 mg/kg PO q12h per 3 settimane). Entrambi i protocolli terapeutici sono stati efficaci, con una significativa diminuzione dei punteggi CIBDAI in entrambi i gruppi. Nel gruppo trattato con budesonide è stato riscontrato un netto miglioramento nella concentrazione di albumina sierica. I risultati dello studio hanno dimostrato che il budesonide può rappresentare una valida alternativa al prednisone nel trattamento dei cani con IBD (Dye et al., 2013).

Un altro studio, al contrario, ha mostrato il fallimento del budesonide nel migliorare i sintomi clinici e l'aspetto macroscopico della mucosa nei cani con IBD; 14 cani con IBD sono stati divisi in due gruppi, ad uno è stato somministrato budesonide al dosaggio di 2 mg al giorno per 30 giorni, all'altro è stato somministrato un placebo per 30 giorni. I risultati del trattamento sono stati monitorati valutando i segni clinici, l'aspetto endoscopico e l'aspetto istologico della mucosa intestinale. In entrambi i gruppi i segni clinici come vomito e diarrea non sono diminuiti nell'arco dei 30 giorni di trattamento; inoltre, non c'è stato un miglioramento dell'appetito, della vitalità, non si è verificato un aumento di peso e non c'è stato un incremento nella consistenza fecale tale da far pensare ad un miglioramento della funzionalità digestiva. Alla fine del trattamento con budesonide, la gravità media della patologia misurata tramite punteggi CIBDAI era ancora elevata. In nessuno dei cani del gruppo che ha ricevuto il trattamento con budesonide la mucosa intestinale è stata riportata ad una condizione fisiologica dopo 30 giorni di trattamento; l'assenza del miglioramento macroscopico è stata correlata con l'assenza di miglioramenti clinici. Dal punto di vista istopatologico

c'è stato un miglioramento dopo il trattamento con budesonide in tutti i cani del gruppo dei trattati, ma solo in 2 cani è stata ripristinata la struttura istologica normale. (Rychlik et al., 2016).

Pietra e colleghi hanno valutato l'efficacia terapeutica del budesonide in 11 cani con IBD; ad ogni paziente è stato somministrato budesonide al dosaggio di 3 mg/m² ogni 24h per 30 giorni. I punteggi CIBDAI sono stati misurati prima del trattamento e dopo 20 giorni di somministrazione del farmaco. L'efficacia terapeutica del farmaco è stata valutata in base ai risultati delle valutazioni cliniche e delle interviste ai proprietari dei cani prima e dopo 20 e 30 giorni di trattamento. Dopo 20 giorni di trattamento i punteggi CIBDAI erano diminuiti in modo significativo in tutti i soggetti dello studio. Secondo il parere dei proprietari, 3 cani su 11 non hanno mostrato miglioramenti clinici dopo 30 giorni di trattamento; in 8 cani è stato notato un miglioramento dell'appetito ed un aumento della vitalità. Secondo questo studio, quindi, la somministrazione di budesonide ha mostrato di avere un'adeguata risposta terapeutica (Pietra et al., 2013).

Uno studio retrospettivo ha comparato l'efficacia terapeutica di un trattamento a base di prednisolone e azatioprina con uno a base di prednisolone e clorambucile. L'azatioprina è un analogo purinico sintetico derivato dalla 6-mercaptopurina, che presenta un effetto citotossico e immunosoppressivo (Prefontaine et al., 2009). Il clorambucile è un agente alchilante con attività immunosoppressiva. Ventisette cani con CE e ipoalbuminemia sono stati inclusi nello studio. Il gruppo A, che comprendeva 13 cani, ha ricevuto un trattamento a base di prednisolone e azatioprina, mentre il gruppo C, comprendente 14 cani, ha ricevuto un trattamento a base di prednisolone e clorambucile. Tutti i cani sono stati rivalutati 7/14 giorni dopo l'inizio del trattamento. La risposta al trattamento è stata valutata tramite il cambiamento del peso corporeo, la concentrazione di albumina sierica e il cambiamento dei segni clinici. Dopo 2 settimane di terapia, la concentrazione di albumina sierica è aumentata significativamente in entrambi i gruppi, con un aumento più netto nel gruppo C (Fig 39).

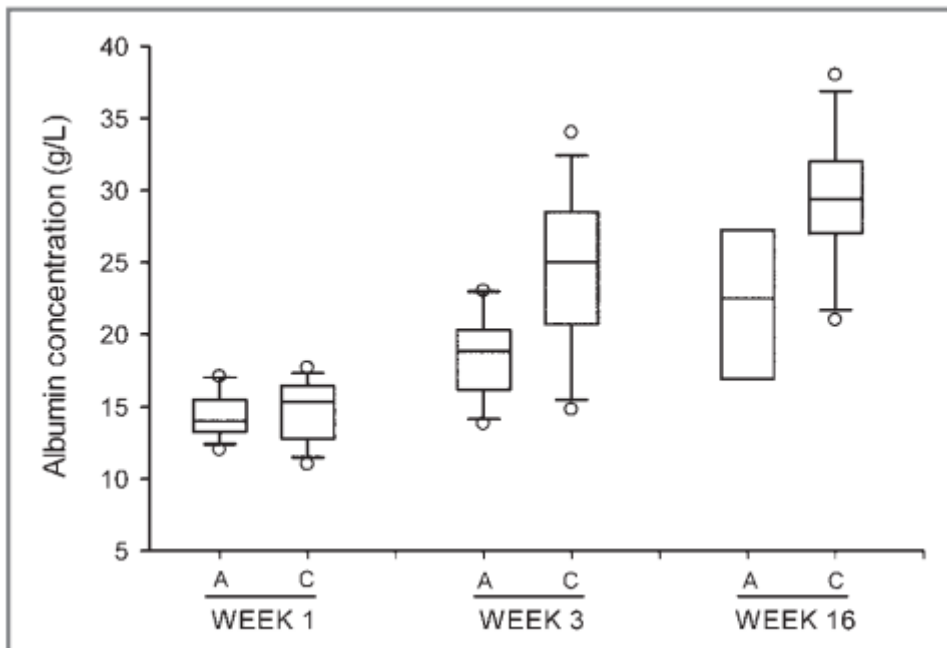


Fig 39

Box & whisker plots delle concentrazioni di albumina sierica in cani con CE e PLE trattati con azatioprina-prednisolone (A) o clorambucile-prednisolone (C) dopo 1, 3 e 16 settimane. Ogni box indica l'intervallo interquartile, la linea orizzontale indica la mediana, i baffi indicano il 10° e il 90° percentile e i cerchi indicano gli *outliers*. Dopo 3 settimane, l'entità dell'aumento della concentrazione di albumina era maggiore nel gruppo C (p: 0,021). Per i dati relativi al controllo dopo 16 settimane non sono disponibili analisi statistiche a causa del ridotto numero di cani rimanenti nel gruppo A (Dandrieux et al., 2013).

I segni clinici sono migliorati in 6 cani su 13 nel gruppo A e in 12 su 14 cani nel gruppo C durante le prime 2 settimane di trattamento; sempre durante questo periodo, il peso corporeo è diminuito nei cani del gruppo A, mentre è rimasto invariato nei cani del gruppo C.

I risultati di questo studio hanno suggerito che un trattamento a base di prednisolone e clorambucile potrebbe essere più efficace del trattamento a base di prednisolone e azatioprina nei cani con CE e concomitante PLE (Dandrieux et al., 2013).

Nonostante i trattamenti con corticosteroidi siano ampiamente utilizzati, un certo numero di cani trattati non risponde al trattamento o presenta delle ricadute dopo qualche settimana di interruzione del trattamento. In più, i corticosteroidi presentano una serie di effetti collaterali che possono portare all'interruzione del trattamento. Un'alternativa ai corticosteroidi è rappresentata dalla ciclosporina, un potente agente immunomodulatore la cui principale modalità d'azione è l'inibizione della produzione di citochine coinvolte nella regolazione dell'attivazione dei linfociti T (Russell et al., 1992). La ciclosporina ha dimostrato di essere efficace nella IBD umana refrattaria al trattamento con corticosteroidi. Allenspach e colleghi hanno effettuato uno studio con lo scopo di valutare l'efficacia clinica della ciclosporina in 14 cani affetti da IBD refrattaria al trattamento con corticosteroidi. Tutti i cani oggetto dello studio sono stati trattati con ciclosporina al dosaggio di 5 mg/kg PO ogni 24h per 10 settimane. È stata valutata l'attività clinica della malattia ed il numero totale di linfociti e linfociti T nelle biopsie duodenali prima e dopo il trattamento. Otto cani hanno mostrato una remissione completa entro 4 settimane dall'inizio del trattamento, 3 cani una risposta parziale, 2 non hanno risposto al trattamento. Un cane ha risposto bene per 14 settimane per poi avere una recidiva con segni clinici intrattabili ed è stato sottoposto ad eutanasia. Il peso corporeo medio è cresciuto significativamente in tutti i cani. Non sono state notate differenze significative dal punto di vista istopatologico e nella conta dei linfociti duodenali prima e dopo il trattamento; tuttavia, il numero medio di linfociti T delle cripte e dei villi è risultato significativamente ridotto dopo il trattamento. Sulla base di questo studio, la ciclosporina sembra essere un'alternativa efficace nei cani con IBD che sono refrattari a trattamenti immunosoppressivi con steroidi (Allenspach K. et al., 2006).

8.5 Gestione della terapia

L'approccio terapeutico ad una CE è influenzato dalla gravità della malattia, dalla concentrazione di albumina e cobalamina, dall'aspetto endoscopico della mucosa, dal tipo di infiltrato cellulare presente e dalla presenza di alterazioni strutturali come ulcerazioni e linfangectasia. La terapia ha la funzione di correggere le carenze nutrizionali causate dal malassorbimento intestinale, e contrastare l'infiammazione e la disbiosi.

Una CE lieve viene inizialmente trattata con una terapia dietetica per almeno 2 settimane; nelle forme più lievi questo tipo di trattamento riesce ad assicurare la remissione dei segni clinici per lunghi periodi.

Purtroppo, non è sempre così facile, infatti, spesso i soggetti non rispondono al cambio di dieta e diventa necessario un trattamento antibiotico, con tilosina e metronidazolo che ad oggi rappresentano le molecole più utilizzate.

In assenza di risposta, si aggiungono dei farmaci immunosoppressivi come prednisone o ciclosporina, ad un dosaggio decrescente.

Ad oggi non esiste un metodo preciso che permetta di capire quali cani risponderanno a quale trattamento, di conseguenza, spesso vengono attuati dei regimi terapeutici di prova, che vengono valutati in base alla risposta clinica del paziente.

Ogni paziente sotto terapia deve essere soggetto ad accertamenti sistematici per monitorare l'andamento della malattia ed eventualmente modificare il regime terapeutico.

9 Conclusioni

Quello che emerge dalla ricerca scientifica e dalla letteratura attualmente disponibile è la complessità diagnostica e terapeutica di una patologia che presenta varie sfaccettature e non può essere approcciata in modo univoco. Le CE rappresentano una sfida diagnostica e terapeutica per i clinici, che si trovano a dover fronteggiare una malattia cronica che può avere riscontri terapeutici molto diversi da soggetto a soggetto e che, nei casi più gravi, può portare al decesso dell'animale.

Per trattare queste forme di infiammazione cronica dell'intestino diventano importanti le nuove scoperte nell'ambito della patogenesi; infatti, ad oggi, le informazioni disponibili indicano una causa multifattoriale, che comprende un'alterazione del sistema immunitario mucosale, cambiamenti nel microbiota intestinale, fattori genetici ed ambientali. La ricerca scientifica può avere un impatto diretto sull'approccio clinico, infatti, la scoperta di nuovi fattori coinvolti dell'innescò della risposta infiammatoria potrebbe portare all'individuazione di ulteriori *target* di trattamento e, di conseguenza, portare allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

La difficoltà nell'affrontare questa patologia è evidente anche dal punto di vista diagnostico; i cani con CE si presentano al clinico con alcuni segni clinici particolarmente aspecifici, in particolare con vomito e diarrea. È compito del clinico escludere tutte le numerose diagnosi differenziali per arrivare alla diagnosi, considerando che la conferma della diagnosi è attualmente ottenibile unicamente tramite l'esame istopatologico

È evidente come nella realtà clinica quotidiana sia poco realistico sottoporre tutti i cani con diarrea cronica ad una endoscopia o laparotomia per prelevare i campioni biotici; il clinico, in questi casi, deve riuscire ad utilizzare gli strumenti a sua disposizione, come alcuni biomarker sierici e fecali, per poi decidere se sottoporre il cane ad una biopsia.

Non sempre è necessario effettuare un iter diagnostico completo, infatti nelle forme più lievi si può riscontrare un'ottima risposta ad un cambio di dieta o alla supplementazione con probiotici e prebiotici.

Una volta confermata la diagnosi, il clinico deve impostare una terapia specifica per il singolo paziente; ogni soggetto presenta un diverso grado di gravità della patologia e risponde in modo variabile ai diversi approcci terapeutici. Per questo il clinico deve essere in grado di impostare una terapia che sia il più efficace possibile, basandosi principalmente sulla risposta terapeutica del singolo paziente. La terapia che viene impostata può essere molto lunga e spesso può durare per tutta la vita, e in alcuni casi può provocare effetti collaterali indesiderati e necessita di un monitoraggio continuo del paziente.

Attualmente la ricerca scientifica si sta concentrando sull'individuazione di nuovi potenziali *biomarker* sierici, quali l'MMA, i pANCA, la 3-BrY, e fecali, quali l'NMH, l'IAP, gli SCFAs; questi potenziali *biomarker* potrebbero in futuro entrare a far parte della pratica clinica, fornendo preziose informazioni con un approccio non invasivo.

Un altro filone di ricerca sta valutando la possibilità di utilizzare la diagnostica per immagini, in particolare l'ecografia; gli studi più recenti hanno provato ad investigare l'utilità della ultrasonografia con contrasto, una metodica relativamente nuova, già utilizzata in medicina umana. Nonostante ad oggi gli studi siano pochi, non si può escludere che in futuro questa metodica possa entrare a far parte dell'iter diagnostico.

Per quanto riguarda l'immunoistochimica, le ricerche più recenti hanno portato all'individuazione di uno strumento diagnostico come il rapporto Ki-67/CD3, che rappresenta un indicatore di proliferazione dei linfociti nella mucosa intestinale.

Dal punto di vista terapeutico, le ricerche più recenti si stanno concentrando sullo sviluppo di terapie alternative; l'utilizzo della dieta e la modulazione del microbiota intestinale rappresentano un importante argomento di studio, in quanto potrebbero permettere di ridurre l'utilizzo di antibiotici e immunosoppressori e di conseguenza le diverse problematiche che ne derivano.

Nonostante questo, l'utilizzo di immunosoppressori si rivela spesso indispensabile, ed è per questo che si sta cercando di valutare l'utilizzo di molecole alternative ai corticosteroidi, come la ciclosporina.

I risultati ottenuti dagli studi nei filoni di ricerca presentati in questo lavoro potranno fornire nuove evidenze sulla comprensione dei meccanismi patogenetici, sull'approccio diagnostico e permettere lo sviluppo di regimi di trattamento alternativi.

Bibliografia

- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., De Sauvage, F. J., & Gurney, A. L. (2003). Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(3), 1910–1914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207577200>
- Ahlstrom, L. A., Mason, K. v., & Mills, P. C. (2010). Barazone decreases skin lesions and pruritus and increases quality of life in dogs with atopic dermatitis: a randomized, blinded, placebo-controlled trial. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *33*(6), 573–582. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2010.01181.x>
- Alex Gallagher. (2019). Vomito e rigurgito. In *Trattato di Clinica Medica Veterinaria* (Vol. 1, pp. 158–164).
- Allenspach, K. (2011). Clinical Immunology and Immunopathology of the Canine and Feline Intestine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *41*(2). <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.01.004>
- Allenspach, K. A., Mochel, J. P., Du, Y., Priestnall, S. L., Moore, F., Slayter, M., Rodrigues, A., Ackermann, M., Krockenberger, M., Mansell, J., Luckschander, N., Wang, C., Suchodolski, J., Berghoff, N., & Jergens, A. E. (2019). Correlating Gastrointestinal Histopathologic Changes to Clinical Disease Activity in Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *Veterinary Pathology*, *56*(3), 435–443. <https://doi.org/10.1177/0300985818813090>
- Allenspach, K., Culverwell, C., & Chan, D. (2016). Long-term outcome in dogs with chronic enteropathies: 203 cases. *Veterinary Record*, *178*(15). <https://doi.org/10.1136/vr.103557>
- Allenspach, K., House, A., Smith, K., McNeill, F. M., Hendricks, A., Elson-Riggins, J., Riddle, A., Steiner, J. M., Werling, D., Garden, O. A., Catchpole, B., & 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., Lomas, B., Wieland, B., Harris, T., Pressler, B., Mancho, C., Lees, G. E., & Vaden, S. L. (2008). Evaluation of perinuclear anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibodies as an early marker of protein-losing enteropathy and protein-losing nephropathy in Soft Coated Wheaten Terriers. *American Journal of Veterinary Research*, *69*(10). <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.10.1301>

- Allenspach, K., & Mochel, J. P. (2020). Genetics and Immunopathogenesis of Chronic Inflammatory Enteropathies in Dogs. *Advances in Small Animal Care*, *1*, 91–100. <https://doi.org/10.1016/J.YASA.2020.07.007>
- Allenspach K., Rufenacht S., Sauter S., Grone A., Steffan J., Strehlau G., & Gaschen F. (2006). Pharmacokinetics and Clinical Efficacy of Cyclosporine Treatment of Dogs with Steroid-Refractory Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *20*, 239–244.
- 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). <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03011.x>
- AlShawaqfeh, M., Wajid, B., Minamoto, Y., Markel, M., Lidbury, J., Steiner, J., Serpedin, E., & Suchodolski, J. (2017). A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(11). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix136>
- Alves, J. C., Santos, A., Jorge, P., & Pitães, A. (2021). The use of soluble fibre for the management of chronic idiopathic large-bowel diarrhoea in police working dogs. *BMC Veterinary Research*, *17*(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02809-w>
- Anfinsen, K. P., Berghoff, N., Priestnall, S. L., Suchodolski, J. S., Steiner, J. M., & Allenspach, K. (2014). Urinary and faecal N-methylhistamine concentrations do not serve as markers for mast cell activation or clinical disease activity in dogs with chronic enteropathies. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *56*(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0090-y>
- Baumgart, D. C., Thomas, S., Przesdzing, I., Metzke, D., Bielecki, C., Lehmann, S. M., Lehnardt, S., Dörffel, Y., Sturm, A., Scheffold, A., Schmitz, J., & Radbruch, A. (2009). Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical & Experimental Immunology*, *157*(3), 423–436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03981.x>
- Benvenuti, E., Pierini, A., Gori, E., Lucarelli, C., Lubas, G., & Marchetti, V. (2020). Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) in Canine Inflammatory Bowel Disease (IBD). *Veterinary Sciences*, *7*(3), 141. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030141>
- Berghoff, N., Hill, S., Parnell, N. K., Mansell, J., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2014). Fecal and urinary N-methylhistamine concentrations in dogs with chronic gastrointestinal disease. *The Veterinary Journal*, *201*(3), 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.016>
- Bierhaus, A., Humpert, P. M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B., Stern, D. M., & Nawroth, P. P. (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine*, *83*(11). <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0688-7>

- Boehm, D., Krzystek-Korpacka, M., Neubauer, K., Matusiewicz, M., Berdowska, I., Zielinski, B., Paradowski, L., & Gamian, A. (2009). Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *15*(1), 93–99. <https://doi.org/10.1002/ibd.20582>
- Bovens, C., Tennant, K., Reeve, J., & Murphy, K. F. (2014). Basal Serum Cortisol Concentration as a Screening Test for Hypoadrenocorticism in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *28*(5), 1541–1545. <https://doi.org/10.1111/jvim.12415>
- Buonocore, S., Ahern, P. P., Uhlig, H. H., Ivanov, I. I., Littman, D. R., Maloy, K. J., & Powrie, F. (2010). Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*, *464*(7293), 1371–1375. <https://doi.org/10.1038/nature08949>
- Burgener, I. A., König, A., Allenspach, K., Sauter, S. N., Boisclair, J., Doherr, M. G., & Jungi, T. W. (2008). Upregulation of Toll-Like Receptors in Chronic Enteropathies in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *22*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0093.x>
- Carney, P. C., Ruaux, C. G., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2011). Biological Variability of C-Reactive Protein and Specific Canine Pancreatic Lipase Immunoreactivity in Apparently Healthy Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *25*(4). <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0729.x>
- Casamian-Sorrosal, D., Willard, M. D., Murray, J. K., Hall, E. J., Taylor, S. S., & Day, M. J. (2010). Comparison of Histopathologic Findings in Biopsies from the Duodenum and Ileum of Dogs with Enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *24*(1), 80–83. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0427.x>
- Cave, N. J. (2006). Hydrolyzed Protein Diets for Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *36*(6), 1251–1268. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.08.008>
- Cheng, J., Shah, Y. M., Ma, X., Pang, X., Tanaka, T., Kodama, T., Krausz, K. W., & Gonzalez, F. J. (2010). Therapeutic Role of Rifaximin in Inflammatory Bowel Disease: Clinical Implication of Human Pregnane X Receptor Activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *335*(1), 32–41. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.170225>
- Cheung, P. F. Y., Wong, C. K., & Lam, C. W. K. (2008). Molecular Mechanisms of Cytokine and Chemokine Release from Eosinophils Activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: Implication for Th17 Lymphocytes-Mediated Allergic Inflammation. *The Journal of Immunology*, *180*(8), 5625–5635. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5625>
- Cobrin, G. M., & Abreu, M. T. (2005). Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunological Reviews*, *206*(1). <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00293.x>

- 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). <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2004.tb00245.x>
- Dandrieux, J. R. S., Noble, P.-J. M., Scase, T. J., Cripps, P. J., & German, A. J. (2013). Comparison of a chlorambucil-prednisolone combination with an azathioprine-prednisolone combination for treatment of chronic enteropathy with concurrent protein-losing enteropathy in dogs: 27 cases (2007–2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *242*(12), 1705–1714. <https://doi.org/10.2460/javma.242.12.1705>
- Daperno, M., D’Haens, G., van Assche, G., Baert, F., Bulois, P., Maunoury, V., Sostegni, R., Rocca, R., Pera, A., & Gevers, A. (2004). Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn’s disease: the SES-CD. *Gastrointestinal Endoscopy*, *60*(4), 505–512. [https://doi.org/10.1016/S0016-5107\(04\)01878-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5107(04)01878-4)
- Day, M. J., Bilzer, T., Mansell, J., Wilcock, B., Hall, E. J., Jergens, A., Minami, T., Willard, M., & Washabau, R. (2008). Histopathological Standards for the Diagnosis of Gastrointestinal Inflammation in Endoscopic Biopsy Samples from the Dog and Cat: A Report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *Journal of Comparative Pathology*, *138*, S1–S43. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.01.001>
- Delaney, F., O’Brien, R. T., & Waller, K. (2003). ULTRASOUND EVALUATION OF SMALL BOWEL THICKNESS COMPARED TO WEIGHT IN NORMAL DOGS. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, *44*(5), 577–580. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2003.tb00510.x>
- Du Souich, P., García, A. G., Vergés, J., & Montell, E. (2009). Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(8a), 1451–1463. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00826.x>
- Duboc, H., Rajca, S., Rainteau, D., Benarous, D., Maubert, M.-A., Quervain, E., Thomas, G., Barbu, V., Humbert, L., Despras, G., Bridonneau, C., Dumetz, F., Grill, J.-P., Masliah, J., Beaugerie, L., Cosnes, J., Chazouillères, O., Poupon, R., Wolf, C., ... 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>
- Dye, T. L., Diehl, K. J., Wheeler, S. L., & Westfall, D. S. (2013). Randomized, Controlled Trial of Budesonide and Prednisone for the Treatment of Idiopathic Inflammatory Bowel Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *27*(6), 1385–1391. <https://doi.org/10.1111/jvim.12195>
- Edelblum, K. L., & Turner, J. R. (2009). The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Current Opinion in Pharmacology*, *9*(6), 715–720. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.022>

- Edward J. Hall, & Alexander J. German. (2016). Valutazione di laboratorio delle malattie gastrointestinali. In Elizabeth Villiers & Jelena Ristic (Eds.), *Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto.* (3rd ed., pp. 295–324).
- Edward James Hall. (2019). Malattie dell'intestino crasso . In Stephen J. Ettinger, Edward C. Feldman, & Etienne Cote (Eds.), *Trattato di Clinica Medica Veterinaria* (8th ed., Vol. 2, pp. 1565–1593).
- Edward James Hall, & Michael J. Day. (2019). Malattie dell'intestino tenue. In Stephen J. Ettinger, Edward C. Feldman, & Etienne Cote (Eds.), *Trattato di Clinica Medica Veterinaria* (8th ed., Vol. 2, pp. 1551–1560).
- Eken, A., Singh, A. K., Treuting, P. M., & Oukka, M. (2014). IL-23R+ innate lymphoid cells induce colitis via interleukin-22-dependent mechanism. *Mucosal Immunology*, *7*(1), 143–154. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.33>
- Fantini, M. C., Monteleone, G., & MacDonald, T. T. (2008). IL-21 comes of age as a regulator of effector T cells in the gut. *Mucosal Immunology*, *1*(2), 110–115. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.17>
- Foell, D., Wittkowski, H., & Roth, J. (2009). Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut*, *58*(6). <https://doi.org/10.1136/gut.2008.170019>
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J. J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., das Mahapatra, B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J., & Lebecque, S. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *Journal of Experimental Medicine*, *183*(6), 2593–2603. <https://doi.org/10.1084/jem.183.6.2593>
- Gaschen, F. P., & Merchant, S. R. (2011). Adverse Food Reactions in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *41*(2). <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.02.005>
- Gaschen, L. (2011). Ultrasonography of Small Intestinal Inflammatory and Neoplastic Diseases in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *41*(2), 329–344. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.01.002>
- Gaschen, L., Kircher, P., Stüssi, A., Allenspach, K., Gaschen, F., Doherr, M., & Gröne, A. (2008). Comparison of ultrasonographic findings with clinical activity index (CIBDAI) and diagnosis in dogs with chronic enteropathies. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, *49*(1), 56–64. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2007.00318.x>
- German, A. J., Hall, E. J., & Day, M. J. (2001). Immune Cell Populations within the Duodenal Mucosa of Dogs with Enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *15*(1), 14. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2001\)015<0014:ICPWTD>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2001)015<0014:ICPWTD>2.3.CO;2)
- Ghilardi, N., Kljavin, N., Chen, Q., Lucas, S., Gurney, A. L., & de Sauvage, F. J. (2004). Compromised Humoral and Delayed-Type Hypersensitivity Responses in IL-23-

- Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 172(5), 2827–2833.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2827>
- Goodwin, L. V., Goggs, R., Chan, D. L., & Allenspach, K. (2011). Hypercoagulability in Dogs with Protein-Losing Enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 273–277. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0683.x>
- Grellet, A., Heilmann, R. M., Lecoindre, P., Feugier, A., Day, M. J., Peeters, D., Freiche, V., Hernandez, J., Grandjean, D., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2013). Fecal calprotectin concentrations in adult dogs with chronic diarrhea. *American Journal of Veterinary Research*, 74(5), 706–711. <https://doi.org/10.2460/ajvr.74.5.706>
- Gribar, S. C., Anand, R. J., Sodhi, C. P., & Hackam, D. J. (2008). The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(3). <https://doi.org/10.1189/jlb.0607358>
- Gribar, S. C., Richardson, W. M., Sodhi, C. P., & Hackam, D. J. (2008). No Longer an Innocent Bystander: Epithelial Toll-Like Receptor Signaling in the Development of Mucosal Inflammation. *Molecular Medicine*, 14(9–10).
<https://doi.org/10.2119/2008-00035.Gribar>
- Grützner, N., Heilmann, R. M., Stupka, K. C., Rangachari, V. R., Weber, K., Holzenburg, A., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2013). Serum homocysteine and methylmalonic acid concentrations in Chinese Shar-Pei dogs with cobalamin deficiency. *The Veterinary Journal*, 197(2). <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.02.002>
- Guard, B. C., & Suchodolski, J. S. (2016). HORSE SPECIES SYMPOSIUM: Canine intestinal microbiology and metagenomics: From phylogeny to function1. *Journal of Animal Science*, 94(6), 2247–2261. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-0029>
- Guzman-Prado, Y., Samson, O., Segal, J. P., Limdi, J. K., & Hayee, B. (2020). Vitamin D Therapy in Adults With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 26(12), 1819–1830.
<https://doi.org/10.1093/ibd/izaa087>
- H. E. König, P. Sotonyi, J. Ruberte, & H.-G. Liebich. (2017). Apparato digerente. In H. E. König & H.-G. Liebich (Eds.), *Anatomia dei mammiferi domestici* (6th ed., pp. 309–376).
- Haas, E., Rütgen, B. C., Gerner, W., Richter, B., Tichy, A., Galler, A., Bilek, A., Thalhammer, J. G., Saalmüller, A., & Luckschander-Zeller, N. (2014). Phenotypic Characterization of Canine Intestinal Intraepithelial Lymphocytes in Dogs with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(6), 1708–1715. <https://doi.org/10.1111/jvim.12456>
- Heilmann, R. M., Berghoff, N., Mansell, J., Grützner, N., Parnell, N. K., Gurtner, C., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2018). Association of fecal calprotectin concentrations with disease severity, response to treatment, and other biomarkers in dogs with chronic inflammatory enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(2), 679–692. <https://doi.org/10.1111/jvim.15065>

- Heilmann, R. M., Grellet, A., Allenspach, K., Lecoindre, P., Day, M. J., Priestnall, S. L., Toresson, L., Procoli, F., Grützner, N., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2014). Association between fecal S100A12 concentration and histologic, endoscopic, and clinical disease severity in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *158*(3–4), 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.01.006>
- Heilmann, R. M., Jergens, A. E., Ackermann, M. R., Barr, J. W., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2012). Serum calprotectin concentrations in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *American Journal of Veterinary Research*, *73*(12). <https://doi.org/10.2460/ajvr.73.12.1900>
- Heilmann, R. M., Otoni, C. C., Jergens, A. E., Grützner, N., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2014). Systemic levels of the anti-inflammatory decoy receptor soluble RAGE (receptor for advanced glycation end products) are decreased in dogs with inflammatory bowel disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *161*(3–4). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.08.003>
- Heilmann, R. M., Paddock, C. G., Ruhnke, I., Berghoff, N., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2011). Development and analytical validation of a radioimmunoassay for the measurement of alpha₁-proteinase inhibitor concentrations in feces from healthy puppies and adult dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *23*(3), 476–485. <https://doi.org/10.1177/1040638711404152>
- Heilmann, R. M., Parnell, N. K., Grützner, N., Mansell, J., Berghoff, N., Schellenberg, S., Reusch, C. E., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2016). Serum and fecal canine alpha₁-proteinase inhibitor concentrations reflect the severity of intestinal crypt abscesses and/or lacteal dilation in dogs. *The Veterinary Journal*, *207*, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.042>
- Heilmann, R. M., & Steiner, J. M. (2018). Clinical utility of currently available biomarkers in inflammatory enteropathies of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *32*(5). <https://doi.org/10.1111/jvim.15247>
- Heilmann, R. M., Volkman, M., Otoni, C. C., Grützner, N., Kohn, B., Jergens, A. E., & Steiner, J. M. (2016). Fecal S100A12 concentration predicts a lack of response to treatment in dogs affected with chronic enteropathy. *The Veterinary Journal*, *215*, 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.03.001>
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., & Shortman, K. (2001). The Dendritic Cell Populations of Mouse Lymph Nodes. *The Journal of Immunology*, *167*(2), 741–748. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.741>
- Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M. C., Cua, D. J., McKenzie, B. S., Powrie, F., & Maloy, K. J. (2006). Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(11), 2473–2483. <https://doi.org/10.1084/jem.20061099>

- Iancu, T. C., & Manov, I. (2010). Ultrastructural Aspects of Enterocyte Defects in Infancy and Childhood. *Ultrastructural Pathology*, 34(3), 117–125.
<https://doi.org/10.3109/01913121003648410>
- Ide, K., Kato, K., Sawa, Y., Hayashi, A., Takizawa, R., & Nishifuji, K. (2016). Comparison of the expression, activity, and fecal concentration of intestinal alkaline phosphatase between healthy dogs and dogs with chronic enteropathy. *American Journal of Veterinary Research*, 77(7), 721–729. <https://doi.org/10.2460/ajvr.77.7.721>
- Inoue, M., Hasegawa, A., Hosoi, Y., & Sugiura, K. (2015). Breed, gender and age pattern of diagnosis for veterinary care in insured dogs in Japan during fiscal year 2010. *Preventive Veterinary Medicine*, 119(1–2), 54–60.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.010>
- Islam, J., Sato, S., Watanabe, K., Watanabe, T., Ardiansyah, Hirahara, K., Aoyama, Y., Tomita, S., Aso, H., Komai, M., & Shirakawa, H. (2017). Dietary tryptophan alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through aryl hydrocarbon receptor in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 42, 43–50.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.12.019>
- Jergens, A. E. (2012). Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. *Frontiers in Bioscience*, E4(1). <https://doi.org/10.2741/470>
- Jergens, A. E., Crandell, J., Morrison, J. A., Deitz, K., Pressel, M., Ackermann, M., Suchodolski, J. S., Steiner, J. M., & Evans, R. (2010). Comparison of Oral Prednisone and Prednisone Combined with Metronidazole for Induction Therapy of Canine Inflammatory Bowel Disease: A Randomized-Controlled Trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(2), 269–277. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0447.x>
- Jergens, A. E., Evans, R. B., Ackermann, M., Hostetter, J., Willard, M., Mansell, J., Bilzer, T., Wilcock, B., Washabau, R., Hall, E. J., Minami, T., Wang, C., & Day, M. J. (2014). Design of a Simplified Histopathologic Model for Gastrointestinal Inflammation in Dogs. *Veterinary Pathology*, 51(5), 946–950.
<https://doi.org/10.1177/0300985813511123>
- Jergens, A. E., Schreiner, C. A., Frank, D. E., Niyo, Y., Ahrens, F. E., Eckersall, P. D., Benson, T. J., & Evans, R. (2003). A Scoring Index for Disease Activity in Canine Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(3).
<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02450.x>
- Jergens, A. E., Willard, M. D., & Allenspach, K. (2016). Maximizing the diagnostic utility of endoscopic biopsy in dogs and cats with gastrointestinal disease. *The Veterinary Journal*, 214, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.008>
- Jorg M. Steiner. (2008). *Gastroenterologia del cane e del gatto*.
- Karlovits, S., Manz, A., Allenspach, K., Walter, I., Kummer, S., Tichy, A., Richter, B., Burgener, I. A., & Luckschander-Zeller, N. (2020). Ki-67/CD3 ratio in the diagnosis of

- chronic inflammatory enteropathy in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(1), 92–97. <https://doi.org/10.1111/jvim.15680>
- Kaser, A., & Pasaniuc, B. (2014). IBD Genetics: Focus on (Dys) Regulation in Immune Cells and the Epithelium. *Gastroenterology*, 146(4), 896–899. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2014.02.023>
- Kather, S., Grützner, N., Kook, P. H., Dengler, F., & Heilmann, R. M. (2020). Review of cobalamin status and disorders of cobalamin metabolism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(1), 13–28. <https://doi.org/10.1111/jvim.15638>
- Kathrani, A. (2021). Dietary and Nutritional Approaches to the Management of Chronic Enteropathy in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 51(1), 123–136. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.09.005>
- Kathrani, A., & Hall, E. (2019). A preliminary study assessing cytokine production following ex vivo stimulation of whole blood with diet in dogs with chronic enteropathy. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 185. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1940-7>
- Kathrani, A., House, A., Catchpole, B., Murphy, A., German, A., Werling, D., & Allenspach, K. (2010). Polymorphisms in the Tlr4 and Tlr5 Gene Are Significantly Associated with Inflammatory Bowel Disease in German Shepherd Dogs. *PLoS ONE*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015740>
- Kathrani, A., House, A., Catchpole, B., Murphy, A., Werling, D., & Allenspach, K. (2011). Breed-independent toll-like receptor 5 polymorphisms show association with canine inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens*, 78(2). <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2011.01707.x>
- Kathrani, A., Lee, H., White, C., Catchpole, B., Murphy, A., German, A., Werling, D., & Allenspach, K. (2014). Association between nucleotide oligomerisation domain two (Nod2) gene polymorphisms and canine inflammatory bowel disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 161(1–2), 32–41. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2014.06.003>
- Kathrani, A., Sánchez-Vizcaíno, F., & Hall, E. J. (2019). Association of chronic enteropathy activity index, blood urea concentration, and risk of death in dogs with protein-losing enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 536–543. <https://doi.org/10.1111/jvim.15448>
- Kathrani, A., Schmitz, S., Priestnall, S. L., Smith, K. C., Werling, D., Garden, O. A., & Allenspach, K. (2011). CD11c+ Cells are Significantly Decreased in the Duodenum, Ileum and Colon of Dogs with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Comparative Pathology*, 145(4), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.03.010>
- Kathrani, A., Steiner, J. M., Suchodolski, J., Eastwood, J., Syme, H., Garden, O. A., & Allenspach, K. (2009). Elevated canine pancreatic lipase immunoreactivity concentration in dogs with inflammatory bowel disease is associated with a

- negative outcome. *Journal of Small Animal Practice*, 50(3).
<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2008.00693.x>
- 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). <https://doi.org/10.1136/vr.d5380>
- Kathrani Aarti AND Holder, A. A. N. D. C. B. A. N. D. A. L. A. N. D. S. K. A. N. D. W. D. A. N. D. A. K. (2012). TLR5 Risk-Associated Haplotype for Canine Inflammatory Bowel Disease Confers Hyper-Responsiveness to Flagellin. *PLOS ONE*, 7(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030117>
- Keir, M. E., Yi, T., Lu, T. T., & Ghilardi, N. (2020). The role of IL-22 in intestinal health and disease. *Journal of Experimental Medicine*, 217(3).
<https://doi.org/10.1084/jem.20192195>
- Kilpinen, S., Spillmann, T., Syrjä, P., Skrzypczak, T., Louhelainen, M., & Westermarck, E. (2011). Effect of tylosin on dogs with suspected tylosin-responsive diarrhea: a placebo-controlled, randomized, double-blinded, prospective clinical trial. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-26>
- Kilpinen, S., Spillmann, T., & Westermarck, E. (2014). Efficacy of two low-dose oral tylosin regimens in controlling the relapse of diarrhea in dogs with tylosin-responsive diarrhea: a prospective, single-blinded, two-arm parallel, clinical field trial. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0043-5>
- Kim, C. J., Kovacs-Nolan, J. A., Yang, C., Archbold, T., Fan, M. Z., & Mine, Y. (2010). L-Tryptophan exhibits therapeutic function in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(6), 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.019>
- Kimmel, S. E., Waddell, L. S., & Michel, K. E. (2000). Hypomagnesemia and hypocalcemia associated with protein-losing enteropathy in Yorkshire Terriers: five cases (1992–1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(5).
<https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.703>
- Konstantinidis, A. O., Adamama-Moraitou, K. K., Pardali, D., Dovas, C. I., Brellou, G. D., Papadopoulos, T., Jergens, A. E., Allenspach, K., & Rallis, T. S. (2021). Colonic mucosal and cytobrush sample cytokine mRNA expression in canine inflammatory bowel disease and their correlation with disease activity, endoscopic and histopathologic score. *PLOS ONE*, 16(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245713>
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., & Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 201(2), 233–240. <https://doi.org/10.1084/jem.20041257>

- Lecoindre, P., & Gaschen, F. P. (2011). Chronic Idiopathic Large Bowel Diarrhea in the Dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *41*(2), 447–456. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.02.004>
- Ledermann, H. P., Börner, N., Strunk, H., Bongartz, G., Zollikofer, C., & Stuckmann, G. (2000). Bowel Wall Thickening on Transabdominal Sonography. *American Journal of Roentgenology*, *174*(1), 107–115. <https://doi.org/10.2214/ajr.174.1.1740107>
- Leib, M. S. (2000). Treatment of Chronic Idiopathic Large-Bowel Diarrhea in Dogs with a Highly Digestible Diet and Soluble Fiber: A Retrospective Review of 37 Cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *14*(1), 27. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2000\)014<0027:TOCILB>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2000)014<0027:TOCILB>2.3.CO;2)
- Linta, N., Pey, P., Baron Toaldo, M., Pietra, M., Felici, M., Bettini, G., Cipone, M., & Diana, A. (2021). Contrast-enhanced ultrasonography in dogs with inflammatory bowel disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *35*(5), 2167–2176. <https://doi.org/10.1111/jvim.16202>
- Littler, R. M., Batt, R. M., & Lloyd, D. H. (2006). Total and relative deficiency of gut mucosal IgA in German shepherd dogs demonstrated by faecal analysis. *Veterinary Record*, *158*(10), 334–341. <https://doi.org/10.1136/vr.158.10.334>
- Liu, Y., Chen, F., Odle, J., Lin, X., Jacobi, S. K., Zhu, H., Wu, Z., & Hou, Y. (2012). Fish Oil Enhances Intestinal Integrity and Inhibits TLR4 and NOD2 Signaling Pathways in Weaned Pigs after LPS Challenge. *The Journal of Nutrition*, *142*(11), 2017–2024. <https://doi.org/10.3945/jn.112.164947>
- Liu, Y., Wang, X., Hou, Y., Yin, Y., Qiu, Y., Wu, G., & Hu, C.-A. A. (2017). Roles of amino acids in preventing and treating intestinal diseases: recent studies with pig models. *Amino Acids*, *49*(8), 1277–1291. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2450-1>
- Lovato, P., Brender, C., Agnholt, J., Kelsen, J., Kaltoft, K., Svejgaard, A., Eriksen, K. W., Woetmann, A., & Ødum, N. (2003). Constitutive STAT3 Activation in Intestinal T Cells from Patients with Crohn's Disease. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(19), 16777–16781. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207999200>
- M. Garcia-Sancho, F. Rodriguez-Franco, A. Sainz, C. Mancho, & A. Rodriguez. (2007). Evaluation of clinical, macroscopic, and histopathologic response to treatment in nonhypoproteinemic dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis. *J Vet Internal Medicine*, 11–17.
- Ma, X., Shah, Y. M., Guo, G. L., Wang, T., Krausz, K. W., Idle, J. R., & Gonzalez, F. J. (2007). Rifaximin Is a Gut-Specific Human Pregnane X Receptor Activator. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *322*(1), 391–398. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.121913>
- Maccaferri, S., Vitali, B., Klinder, A., Kolida, S., Ndagijimana, M., Laghi, L., Calanni, F., Brigidi, P., Gibson, G. R., & Costabile, A. (2010). Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an in vitro approach using a

- continuous culture colonic model system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2556–2565. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq345>
- Makielski, K., Cullen, J., O'Connor, A., & Jergens, A. E. (2019). Narrative review of therapies for chronic enteropathies in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/jvim.15345>
- Malewska, K., Rychlik, A., Nieradka, R., & Kander, M. (2011). Treatment of inflammatory bowel disease (IBD) in dogs and cats. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(1). <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0026-7>
- Mancho, C., Sainz, Á., García-Sancho, M., Villaescusa, A., & Rodríguez-Franco, F. (2011). Evaluation of perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibodies in sera from dogs with inflammatory bowel disease or intestinal lymphoma. *American Journal of Veterinary Research*, 72(10). <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.10.1333>
- Mandigers, P. J. J., Biourge, V., van den Ingh, T. S. G. A. M., Ankringa, N., & German, A. J. (2010). A Randomized, Open-Label, Positively-Controlled Field Trial of a Hydrolyzed Protein Diet in Dogs with Chronic Small Bowel Enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(6), 1350–1357. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0632.x>
- Manz, A., Allenspach, K., Kummer, S., Richter, B., Walter, I., Macho-Maschler, S., Tichy, A., Burgener, I. A., & Luckschander-Zeller, N. (2021). Upregulation of signal transducer and activator of transcription 3 in dogs with chronic inflammatory enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(3), 1288–1296. <https://doi.org/10.1111/jvim.16141>
- Marchetti, V., Lubas, G., Lombardo, A., Corazza, M., Guidi, G., & Cardini, G. (2010). Evaluation of Erythrocytes, Platelets, and Serum Iron Profile in Dogs with Chronic Enteropathy. *Veterinary Medicine International*, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/716040>
- Maria Chiara Marchesi, Cecilia C. Timpano, Sara Busechian, Camillo Pieramati, & Fabrizio Rueca. (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.
- Marks, S. L., Rankin, S. C., Byrne, B. A., & Weese, J. S. (2011). Enteropathogenic Bacteria in Dogs and Cats: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Control. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(6), 1195–1208. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00821.x>
- Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., & Barnich, N. (2014). Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut*, 63(1), 116–124. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304119>
- McMahon, L. A., House, A. K., Catchpole, B., Elson-Riggins, J., Riddle, A., Smith, K., Werling, D., Burgener, I. A., & Allenspach, K. (2010). Expression of Toll-like receptor

- 2 in duodenal biopsies from dogs with inflammatory bowel disease is associated with severity of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 135(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.11.012>
- McVay, L. D., Li, B., Biancaniello, R., Creighton, M. A., Bachwich, D., Lichtenstein, G., Rombeau, J. L., & Carding, S. R. (1997). Changes in human mucosal gamma delta T cell repertoire and function associated with the disease process in inflammatory bowel disease. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 3(3), 183–203. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9100225>
- Meijer, B., Hoskin, T., Ashcroft, A., Burgess, L., Keenan, J. I., Falvey, J., Gearry, R. B., & Day, A. S. (2014). Total soluble and endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in IBD. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(6), 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.11.004>
- Melamies, M., Vainio, O., Spillmann, T., Junnila, J., & Rajamäki, M. M. (2012). Endocrine effects of inhaled budesonide compared with inhaled fluticasone propionate and oral prednisolone in healthy Beagle dogs. *The Veterinary Journal*, 194(3), 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.04.029>
- Menzio, A., Dall'Aglio, M., Quintavalla, F., Dallavalle, L., Meucci, V., & Bertini, S. (2016). Rifaximin is an effective alternative to metronidazole for the treatment of chronic enteropathy in dogs: a randomised trial. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 217. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0851-0>
- 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., McNeely, I. H., Lidbury, J., Steiner, J. M., & 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>
- Mizoguchi, A. (2012). Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 105, 263–320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394596-9.00009-3>
- Morgan, L., & McConnell, J. (1999). Cobalamin deficiency associated with erythroblastic anemia and methylmalonic aciduria in a border collie. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(5). <https://doi.org/10.5326/15473317-35-5-392>
- Murphy, K. F., German, A. J., Ruaux, C. G., Steiner, J. M., Williams, D. A., & Hall, E. J. (2003). Fecal α_1 -Proteinase Inhibitor Concentration in Dogs with Chronic Gastrointestinal Disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 32(2), 67–72. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2003.tb00316.x>

- Neurath, M. F. (2019). IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 45, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2018.12.002>
- Nisa, K., Lim, S. Y., Shinohara, M., Osuga, T., Yokoyama, N., Tamura, M., Nagata, N., Sasaoka, K., Dermlim, A., Leela-Arporn, R., Morita, T., Sasaki, N., Morishita, K., Nakamura, K., Ohta, H., & Takiguchi, M. (2019). Evaluation of duodenal perfusion by contrast-enhanced ultrasonography in dogs with chronic inflammatory enteropathy and intestinal lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 559–568. <https://doi.org/10.1111/jvim.15432>
- Sjaastad O.V., Sand, O., & Hove, K. (2013). L'apparato digerente. In *Fisiologia degli animali domestici* (pp. 526–610).
- Ohmi, A., Ohno, K., Uchida, K., Nakayama, H., Koshino-Goto, Y., Fukushima, K., Takahashi, M., Nakashima, K., Fujino, Y., & Tsujimoto, H. (2011). A Retrospective Study in 21 Shiba Dogs with Chronic Enteropathy. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(1), 1–5. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0154>
- Ohta, H., Nagata, N., Yokoyama, N., Osuga, T., Sasaki, N., Morishita, K., & Takiguchi, M. (2021). Prognostic value of small intestinal dilatation in dogs with protein-losing enteropathy. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(3), 378–384.
<https://doi.org/10.1292/jvms.20-0489>
- Ontsouka, C. E., Burgener, I. A., Mani, O., & Albrecht, C. (2010). Polyunsaturated fatty acid-enriched diets used for the treatment of canine chronic enteropathies decrease the abundance of selected genes of cholesterol homeostasis. *Domestic Animal Endocrinology*, 38(1), 32–37.
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.08.001>
- Osada, T., Ohkusa, T., Yokoyama, T., Shibuya, T., Sakamoto, N., Beppu, K., Nagahara, A., Otaka, M., Ogihara, T., & Watanabe, S. (2010). Comparison of several activity indices for the evaluation of endoscopic activity in UC: Inter- and intraobserver consistency. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(2), 192–197.
<https://doi.org/10.1002/ibd.21000>
- Ouyang, W., Kolls, J. K., & Zheng, Y. (2008). The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity*, 28(4), 454–467.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.004>
- Pagani, E., Soto del Rio, M. de los D., Dalmaso, A., Bottero, M. T., Schiavone, A., & Prola, L. (2018). Cross-contamination in canine and feline dietetic limited-antigen wet diets. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 283. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1571-4>
- Parente, F., Greco, S., Molteni, M., Anderloni, A., Maconi, G., & Porro, G. B. (2004). Modern Imaging of Crohn's Disease Using Bowel Ultrasound. *Inflammatory Bowel Diseases*, 10(4), 452–461. <https://doi.org/10.1097/00054725-200407000-00022>

- Patnaude, L., Mayo, M., Mario, R., Wu, X., Knight, H., Creamer, K., Wilson, S., Pivorunas, V., Karman, J., Phillips, L., Dunstan, R., Kamath, R. v., McRae, B., & Terrillon, S. (2021). Mechanisms and regulation of IL-22-mediated intestinal epithelial homeostasis and repair. *Life Sciences*, *271*, 119195. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119195>
- Peiravan, A., Allenspach, K., Boag, A. M., Soutter, F., Holder, A., Catchpole, B., Kennedy, L. J., Werling, D., & Procoli, F. (2016). Single nucleotide polymorphisms in major histocompatibility class II haplotypes are associated with potential resistance to inflammatory bowel disease in German shepherd dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *182*, 101–105. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2016.10.012>
- Peiravan A, Bertolini F, Rothschild MF, Simpson KW, Jergens AE, Allenspach K, et al. (2018). Genome-wide association studies of inflammatory bowel disease in German shepherd dogs. *PLOS ONE*, *13*(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200685>
- Penninck, D., Smyers, B., Webster, C. R. L., Rand, W., & Moore, A. S. (2003). Diagnostic value of ultrasonography in differentiating enteritis from intestinal neoplasia in dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, *44*(5), 570–575. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2003.tb00509.x>
- Pietra, M., Fracassi, F., Diana, A., Gazzotti, T., Bettini, G., Peli, A., Morini, M., Pagliuca, G., & Roncada, P. (2013). Plasma concentrations and therapeutic effects of budesonide in dogs with inflammatory bowel disease. *American Journal of Veterinary Research*, *74*(1), 78–83. <https://doi.org/10.2460/ajvr.74.1.78>
- Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2021). The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *51*(3), 605–621. <https://doi.org/10.1016/J.CVSM.2021.01.002>
- Poholek, C., & Harrington, L. (2012). The role of interleukin-21 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (123.45). *The Journal of Immunology*, *188*(1 Supplement), 123.45. http://www.jimmunol.org/content/188/1_Supplement/123.45.abstract
- Prantera, C., Lochs, H., Grimaldi, M., Danese, S., Scribano, M. L., & Gionchetti, P. (2012). Rifaximin-Extended Intestinal Release Induces Remission in Patients With Moderately Active Crohn's Disease. *Gastroenterology*, *142*(3), 473-481.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.032>
- Prefontaine, E., Sutherland, L. R., MacDonald, J. K., & Cepoiu, M. (2009). Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. In L. R. Sutherland (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000067.pub2>
- Procoli, F., Mötsküla, P. F., Keyte, S. V., Priestnall, S., & Allenspach, K. (2013). Comparison of Histopathologic Findings in Duodenal and Ileal Endoscopic Biopsies

- in Dogs with Chronic Small Intestinal Enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(2), 268–274. <https://doi.org/10.1111/jvim.12041>
- Ripollés, T., Martínez-Pérez, M. J., Blanc, E., Delgado, F., Vizquete, J., Paredes, J. M., & Vilar, J. (2011). Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in Crohn's disease: technique, image interpretation and clinical applications. *Insights into Imaging*, 2(6), 639–652. <https://doi.org/10.1007/s13244-011-0124-1>
- Ristic, J. M. E., & Stidworthy, M. F. (2002). Two cases of severe iron-deficiency anaemia due to inflammatory bowel disease in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 43(2). <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00034.x>
- Robert J. Washabau, & Michael J. Day. (2013). *Canine and Feline Gastroenterology*.
- Rossi, G., Cerquetella, M., Antonelli, E., Pengo, G., Magi, G. E., Villanacci, V., Rostami-Nejad, M., Spaterna, A., & Bassotti, G. (2015). The importance of histologic parameters of lacteal involvement in cases of canine lymphoplasmacytic enteritis. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 8(1), 33–41. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25584174>
- Rossi, G., Pengo, G., Caldin, M., Palumbo Piccionello, A., Steiner, J. M., Cohen, N. D., Jergens, A. E., & Suchodolski, J. S. (2014). Comparison of Microbiological, Histological, and Immunomodulatory Parameters in Response to Treatment with Either Combination Therapy with Prednisone and Metronidazole or Probiotic VSL#3 Strains in Dogs with Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*, 9(4), e94699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094699>
- Rudorf, H., van Schaik, G., O'Brien, R. T., Brown, P. J., Barr, F. J., & Hall, E. J. (2005). Ultrasonographic evaluation of the thickness of the small intestinal wall in dogs with inflammatory bowel disease. *Journal of Small Animal Practice*, 46(7), 322–326. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2005.tb00327.x>
- Ruess, L., Blask, A. R. N., Bulas, D. I., Mohan, P., Bader, A., Latimer, J. S., & Kerzner, B. (2000). Inflammatory Bowel Disease in Children and Young Adults. *American Journal of Roentgenology*, 175(1), 79–84. <https://doi.org/10.2214/ajr.175.1.1750079>
- Russell, G., Graveley, R., Seid, J., Al-Humidan, A.-K., & Skjodt, H. (1992). Mechanisms of action of cyclosporine and effects on connective tissues. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 21(6), 16–22. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(92\)90009-3](https://doi.org/10.1016/0049-0172(92)90009-3)
- Rychlik, A., Kołodziejska-Sawerska, A., Nowicki, M., & Szweda, M. (2016). Clinical, endoscopic and histopathological evaluation of the efficacy of budesonide in the treatment of inflammatory bowel disease in dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(1), 159–164. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0020>
- Sattasathuchana, P., Allenspach, K., Lopes, R., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2017). Evaluation of Serum 3-Bromotyrosine Concentrations in Dogs with Steroid-Responsive Diarrhea and Food-Responsive Diarrhea. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(4). <https://doi.org/10.1111/jvim.14742>

- Sattasathuchana, P., Grützner, N., Lopes, R., Guard, B. C., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2015). Stability of 3-bromotyrosine in serum and serum 3-bromotyrosine concentrations in dogs with gastrointestinal diseases. *BMC Veterinary Research*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0321-0>
- Schmitz, S., Glanemann, B., Garden, O. A., Brooks, H., Chang, Y. M., Werling, D., & Allenspach, K. (2015). A Prospective, Randomized, Blinded, Placebo-Controlled Pilot Study on the Effect of *Enterococcus faecium* on Clinical Activity and Intestinal Gene Expression in Canine Food-Responsive Chronic Enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *29*(2), 533–543. <https://doi.org/10.1111/jvim.12563>
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, *182*(3), 311–322. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9)
- Schreiner, N. M. S., Gaschen, F., Gröne, A., Sauter, S. N., & Allenspach, K. (2008). Clinical Signs, Histology, and CD3-Positive Cells before and after Treatment of Dogs with Chronic Enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *22*(5), 1079–1083. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0153.x>
- Segarra, S., Martínez-Subiela, S., Cerdà-Cuellar, M., Martínez-Puig, D., Muñoz-Prieto, A., Rodríguez-Franco, F., Rodríguez-Bertos, A., Allenspach, K., Velasco, A., & Cerón, J. (2016). Oral chondroitin sulfate and prebiotics for the treatment of canine Inflammatory Bowel Disease: a randomized, controlled clinical trial. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0676-x>
- Serra, C., Menozzi, G., Labate, A. M. M., Giangregorio, F., Gionchetti, P., Beltrami, M., Robotti, D., Fornari, F., & Cammarota, T. (2007). Ultrasound assessment of vascularization of the thickened terminal ileum wall in Crohn's disease patients using a low-mechanical index real-time scanning technique with a second generation ultrasound contrast agent. *European Journal of Radiology*, *62*(1), 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2006.11.027>
- Shibolet, O., & Podolsky, D. K. (2007). TLRs in the Gut.IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *292*(6), G1469–G1473. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00531.2006>
- Slovak, J. E., Wang, C., Morrison, J. A., Deitz, K. L., LeVine, D. N., Otoni, C., King, R. R., Gerber, L. E., Hanson, K. R., Lundberg, A. P., & Jergens, A. E. (2014). Endoscopic Assessment of the Duodenum in Dogs with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *28*(5), 1442–1446. <https://doi.org/10.1111/jvim.12424>
- Slovak, J. E., Wang, C., Sun, Y., Otoni, C., Morrison, J., Deitz, K., LeVine, D., & Jergens, A. E. (2015). Development and validation of an endoscopic activity score for canine inflammatory bowel disease. *The Veterinary Journal*, *203*(3), 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.12.030>

- Song, C., Lee, J. S., Gilfillan, S., Robinette, M. L., Newberry, R. D., Stappenbeck, T. S., Mack, M., Cella, M., & Colonna, M. (2015). Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 212(11), 1869–1882. <https://doi.org/10.1084/jem.20151403>
- Steiner JM. (2008). *Small animal Gastroenterology*.
- Stephen J. Ettinger, Edward C. Feldman, & Etienne Cote. (2019). *Trattato di Clinica Medica Veterinaria* (Ottava edizione).
- Suchodolski, J. S. (2011). COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats1. *Journal of Animal Science*, 89(5), 1520–1530. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3377>
- Suchodolski, J. S., Markel, M. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Unterer, S., Heilmann, R. M., Dowd, S. E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E. M., Steiner, J. M., Cook, A. K., & Toresson, L. (2012). The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLOS ONE*, 7(12), e51907-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051907>
- Suchodolski, J. 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>
- Sugimoto, K. (2008). Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14(33), 5110. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.5110>
- Tamura, Y., Ohta, H., Kagawa, Y., Osuga, T., Morishita, K., Sasaki, N., & Takiguchi, M. (2019). Plasma amino acid profiles in dogs with inflammatory bowel disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(4), 1602–1607. <https://doi.org/10.1111/jvim.15525>
- Tolbert, M. K., Murphy, M., Gaylord, L., & Witzel-Rollins, A. (2022). Dietary management of chronic enteropathy in dogs. *Journal of Small Animal Practice*. <https://doi.org/10.1111/jsap.13471>
- Tomimoto, H., & Yanagihara, T. (1992). Electron microscopic investigation of the cerebral cortex after cerebral ischemia and reperfusion in the gerbil. *Brain Research*, 598(1–2), 87–97. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90171-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90171-5)
- Toresson, L., Steiner, J. M., Razdan, P., Spodsberg, E., Olmedal, G., Suchodolski, J. S., & Spillmann, T. (2018). Comparison of efficacy of oral and parenteral cobalamin supplementation in normalising low cobalamin concentrations in dogs: A randomised controlled study. *The Veterinary Journal*, 232, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.010>
- Tørnqvist-Johnsen, C., Campbell, S., Gow, A., Bommer, N. X., Salavati, S., & Mellanby, R. J. (2020). Investigation of the efficacy of a dietetic food in the management of chronic enteropathies in dogs. *Veterinary Record*, 186(1), 26–26. <https://doi.org/10.1136/vr.105172>

- Tôrres, C. L., Hickenbottom, S. J., & Rogers, Q. R. (2003). Palatability Affects the Percentage of Metabolizable Energy as Protein Selected by Adult Beagles. *The Journal of Nutrition*, *133*(11), 3516–3522. <https://doi.org/10.1093/jn/133.11.3516>
- Tress, U., Suchodolski, J. S., Williams, D. A., & Steiner, J. M. (2006). Development of a fecal sample collection strategy for extraction and quantification of fecal immunoglobulin A in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, *67*(10), 1756–1759. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.10.1756>
- Udraite Vovk, L., Watson, A., Dodds, W. J., Klinger, C. J., Classen, J., & Mueller, R. S. (2019). Testing for food-specific antibodies in saliva and blood of food allergic and healthy dogs. *The Veterinary Journal*, *245*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.12.014>
- Uematsu, S., & Akira, S. (2009). Immune responses of TLR5+ lamina propria dendritic cells in enterobacterial infection. *Journal of Gastroenterology*, *44*(8), 803–811. <https://doi.org/10.1007/s00535-009-0094-y>
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B.-G., Jung, Y.-J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K. J., & Akira, S. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature Immunology*, *9*(7), 769–776. <https://doi.org/10.1038/ni.1622>
- Uhlig, H. H., McKenzie, B. S., Hue, S., Thompson, C., Joyce-Shaikh, B., Stepankova, R., Robinson, N., Buonocore, S., Tlaskalova-Hogenova, H., Cua, D. J., & Powrie, F. (2006). Differential Activity of IL-12 and IL-23 in Mucosal and Systemic Innate Immune Pathology. *Immunity*, *25*(2), 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.05.017>
- 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*(12). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.177>
- Venturini, A. P. (1983). Pharmacokinetics of L/105, a New Rifamycin, in Rats and Dogs, after Oral Administration. *Chemotherapy*, *29*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1159/000238165>
- Volkman, M., Hepworth, M. R., Ebner, F., Rausch, S., Kohn, B., & Hartmann, S. (2014). Frequencies of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with primary immune-mediated thrombocytopenia and chronic enteropathy: A pilot study. *The Veterinary Journal*, *202*(3). <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.10.012>
- Walker, D., Knuchel-Takano, A., McCutchan, A., Chang, Y.-M., Downes, C., Miller, S., Stevens, K., Verheyen, K., Phillips, A. D., Miah, S., Turmaine, M., Hibbert, A., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S., Mohan, K., Eastwood, J., Allenspach, K., Smith, K., & Garden, O. A. (2013). A Comprehensive Pathological Survey of Duodenal Biopsies from Dogs with Diet-Responsive Chronic Enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *27*(4), 862–874. <https://doi.org/10.1111/jvim.12093>

- Washabau, R. J., Day, M. J., Willard, M. D., Hall, E. J., Jergens, A. E., Mansell, J., Minami, T., & Bilzer, T. W. (2010). Endoscopic, Biopsy, and Histopathologic Guidelines for the Evaluation of Gastrointestinal Inflammation in Companion Animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *24*(1), 10–26. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0443.x>
- Wennogle, S. A., Priestnall, S. L., & Webb, C. B. (2017). Histopathologic Characteristics of Intestinal Biopsy Samples from Dogs With Chronic Inflammatory Enteropathy With and Without Hypoalbuminemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *31*(2), 371–376. <https://doi.org/10.1111/jvim.14669>
- Westermarck, E., Skrzypczak, T., Harmoinen, J., Steiner, J. M., Ruaux, C. G., Williams, D. A., Eerola, E., Sundbäck, P., & Rinkinen, M. (2005). Tylosin-Responsive Chronic Diarrhea in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *19*(2). <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02679.x>
- White, R., Atherly, T., Guard, B., Rossi, G., Wang, C., Mosher, C., Webb, C., Hill, S., Ackermann, M., Sciabarra, P., Allenspach, K., Suchodolski, J., & Jergens, A. E. (2017). Randomized, controlled trial evaluating the effect of multi-strain probiotic on the mucosal microbiota in canine idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, *8*(5). <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1334754>
- Wiekowski, M. T., Leach, M. W., Evans, E. W., Sullivan, L., Chen, S.-C., Vassileva, G., Bazan, J. F., Gorman, D. M., Kastelein, R. A., Narula, S., & Lira, S. A. (2001). Ubiquitous Transgenic Expression of the IL-23 Subunit p19 Induces Multiorgan Inflammation, Runting, Infertility, and Premature Death. *The Journal of Immunology*, *166*(12), 7563–7570. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7563>
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *67*(6), 449–458. <https://doi.org/10.2146/ajhp090168>
- Zick, M., Rabl, R., & Reichert, A. S. (2009). Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1793*(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.06.013>