

# DISBIOSI INTESTINALE NEI CANI E NEI GATTI

Diagnosi e interpretazione della disbiosi intestinale nei cani e nei gatti

Autore: Jan Suchodolski  
PII: S1090-0233(16)30033-8  
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tvjl.2016.04.011>  
Riferimento: YTVJL 4804  
Appare in: The Veterinary Journal  
Accettato in data: 21-4-2016



Si prega di citare questo articolo come: Jan Suchodolski, "Diagnosi e interpretazione della disbiosi intestinale in cani e gatti", *The Veterinary Journal* (2016), <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tvjl.2016.04.011>.

Questo è un file PDF di un manoscritto inedito che è stato accettato per la pubblicazione.

Come servizio ai nostri clienti, stiamo fornendo questa prima versione del manoscritto.

Il manoscritto sarà sottoposto a copyediting, composizione e revisione della prova risultante, prima di essere pubblicato nella sua forma definitiva.

Si prega di notare che, durante il processo produttivo, potrebbero essere riscontrati degli errori, che potrebbero influenzare il contenuto, e ai quali debbono riferirsi tutte le responsabilità legali relative alla rivista.

## Articolo di rassegna

### DIAGNOSI E INTERPRETAZIONE DELLA DISBIOSI INTESTINALE NEI CANI E NEI GATTI

Jan Suchodolski\*

Gastrointestinal Laboratory, Texas A&M University (TAMU), College of Veterinary Medicine,  
Department of Small Animal Clinical Sciences, 4474 TAMU, College Station, Texas 77843-4474, USA

\* Autore corrispondente. Tel.: +1 979 4580933.

E-mail address: [Jsuchodolski@cvm.tamu.edu](mailto:Jsuchodolski@cvm.tamu.edu) (J. Suchodolski).

## In rilievo

- Il tratto gastrointestinale (GI) ospita un complesso microbiota, che consiste di batteri, funghi, virus e protozoi.
- I metodi molecolari sono le attuali tecniche standard per valutare la disbiosi intestinale nei cani e nei gatti con malattie GI.
- La perdita del microbiota commensale è associata alla diminuzione degli acidi grassi a catena corta e degli acidi biliari.
- La disbiosi è un fattore di rischio, che può esacerbare l'infiammazione nei cani e nei gatti geneticamente suscettibili.

## Riassunto

Il tratto intestinale di cani e gatti ha un microbiota molto complesso, costituito da batteri, funghi, virus e protozoi.

Fino a poco tempo fa, la coltura batterica tradizionale era comunemente utilizzata per identificare i batteri presenti nel tratto gastrointestinale, ma è ormai riconosciuto che le tecniche di placcatura standard non hanno una risoluzione sufficiente per poter identificare i batteri - soprattutto anaerobi -, che si trovano all'interno dell'intestino.

Sono stati ora stabiliti dei metodi molecolari, per valutare la disbiosi intestinale nei cani e nei gatti con malattie gastrointestinali, ma questi approcci non sono ancora sufficientemente disponibili per una diagnosi di routine.

Nelle malattie intestinali acute e croniche, la perdita del normale microbiota batterico commensale (*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Faecalibacterium spp.*), è stata legata ai cambiamenti metabolici, per esempio alle alterazioni nei metaboliti batterici immunomodulatori, come gli acidi grassi a catena corta e gli acidi biliari secondari.

Ciò evidenzia l'importanza della disbiosi nella fisiopatologia delle malattie gastrointestinali.

Sono attualmente in corso, per aiutare a valutare la disbiosi, lo sviluppo di saggi su base molecolare per specifici gruppi batterici, i calcoli degli indici della disbiosi microbica e i saggi per i metaboliti funzionali microbici.

Questi forniranno una migliore comprensione della fisiopatologia delle malattie gastrointestinali, e potrebbero anche portare a nuovi approcci diagnostici e terapeutici, per la disbiosi.

**Parole chiave: Canino; Felino; Acidi biliari; Disbiosi; Microbioma; Microbiota**

---

## Introduzione

Il microbiota intestinale è il consorzio di tutti i microrganismi viventi (batteri, funghi, protozoi e virus), che abitano il tratto gastrointestinale (GI).

Mentre il termine "microflora" è spesso usato nella letteratura più antica, il termine "microbiota" (da "bios", "vita" in greco) è il termine appropriato.

I batteri sono i microbi più abbondanti nell'intestino (Swanson et al., 2011).

Fino a poco tempo fa, la coltura batterica tradizionale era comunemente utilizzata per identificare i batteri presenti nel tratto GI.

Ora, è riconosciuto che la grande maggioranza dei batteri intestinali non può essere colturata usando tecniche di placcatura standard.

Non esiste alcuna correlazione tra i conteggi batterici nell'intestino tenue e lo *status* della malattia (German et al., 2003). La coltura fecale qualitativa non permette una risoluzione sufficiente per poter caratterizzare *in toto* il complesso microbiota dell'intestino crasso.

I metodi di sequenziamento molecolare, che mirano soprattutto al gene 16S rRNA, sono ora lo standard riconosciuto per l'identificazione del microbiota batterico.

Tali approcci hanno dimostrato che i tratti GI canini e felini hanno un ecosistema microbale altamente complesso, composto di centinaia di diversi filotipi di batteri (Handl et al., 2011).

Si stima che ci siano circa un trilione ( $10^{12}$ - $10^{14}$ ) di cellule microbiche nel tratto GI, circa 10 volte più del numero di tutte le cellule dell'ospite. Inoltre, il *pool* genetico combinato di tutti i batteri intestinali supera il contenuto genetico dell'ospite, con un fattore di 100.

Questa nuova visione, in merito alla complessità del microbiota intestinale e della sua intima relazione con l'ospite, ha stimolato la ricerca per comprendere meglio l'importanza di un equilibrato ecosistema microbico, per la regolazione della salute e dell'immunità dell'ospite.

La disbiosi intestinale può essere definita come un'alterazione della composizione e/o della ricchezza (ovverosia, del numero di specie batteriche uniche) del microbiota intestinale.

Gli studi sugli esseri umani e sulle specie veterinarie hanno associato la disbiosi intestinale con vari disturbi GI, come la malattia infiammatoria intestinale (IBD), la colite granulomatosa e la sindrome dell'intestino irritabile (IBS) – (Suchodolski et al., 2012a, b; Honneffer et al., 2014; Minamoto et al., 2014).

Anche se non è sempre chiaro se la disbiosi sia una causa o un effetto della malattia GI, è probabile che queste due ipotesi si sovrappongano, in quanto l'infiammazione causerà la disbiosi, e recenti studi funzionali hanno dimostrato che la disbiosi, quando è presente, è un fattore di rischio che può esacerbare l'infiammazione in individui geneticamente suscettibili.

Pertanto, il ristabilimento della normobiosi dovrebbe essere un risultato desiderato del trattamento. Tuttavia, la ricerca per definire meglio le cause della disbiosi, associata a diverse malattie, è ancora in fase precoce.

È anche importante notare che esiste una sovrapposizione, nei modelli di disbiosi di molte malattie GI.

Al momento, non è stata descritta alcuna causa specifica della disbiosi per le malattie GI, che possa essere utilizzata a livello diagnostico per distinguere i sottogruppi di enteropatie croniche (CE).

Tuttavia, attualmente, si stanno valutando vari indici di disbiosi e di alterazioni metaboliche, che in futuro potrebbero avere un'utilità diagnostica e terapeutica.

La presente revisione fornirà una breve panoramica dei metodi per valutare il microbiota GI e la disbiosi, i principali gruppi batterici nei tratti GI canini e felini, nonché il ruolo della disbiosi nella fisiopatologia delle malattie GI.

### **Valutazione del microbiota e della disbiosi**

Non esiste un unico standard d'elezione, per la valutazione del microbiota e della disbiosi GI.

La maggior parte delle ricerche attuali è focalizzata sulla valutazione del microbiota batterico, e sono stati ottimizzati alcuni metodi, per la caratterizzazione dei batteri.

Poiché il microbiota intestinale è un ecosistema complesso e dinamico, il miglior approccio diagnostico sarebbe quello di una combinazione di strumenti molecolari, che includano l'amplificazione PCR del gene 16S rRNA, utilizzando dei primer batterici universali, seguita da un'analisi di ampliconi mediante "sequenziamento di prossima generazione" (NGS), da una diretta quantificazione di specifici *taxa* batterici mediante PCR quantitativa (qPCR) e dall'utilizzo dell'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH), per visualizzare la traslocazione dei batteri nell'epitelio della mucosa.

Gli studi futuri dovranno inoltre includere le misurazioni dei metaboliti batterici, quali gli acidi biliari fecali e gli acidi grassi a catena corta (SCFA), per valutare la funzione del microbiota e misurare i cambiamenti nel sistema immunitario dell'ospite.

La coltura batterica può essere una tecnica utile, per la rilevazione di enteropatogeni specifici (ad es., *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia spp.*). La coltura consente di determinare la presenza di un'infezione attiva (cioè, la vitalità degli organismi isolati), il test di sensibilità antibiotica degli esemplari clinici e la genotipizzazione degli isolati colturali per studi epidemiologici.

Tuttavia, è ora riconosciuto che la coltura batterica non è ben adatta per una caratterizzazione approfondita di ambienti complessi, come il tratto GI dei mammiferi.

Poiché la maggioranza dei batteri intestinali non può essere colturata, questo metodo sottostima i numeri batterici totali, e inoltre non consente l'identificazione della maggioranza dei gruppi batterici nel tratto GI.

I motivi di questa incapacità di colturalo della maggior parte dei batteri sono la mancanza di conoscenza, per quanto riguarda i loro fabbisogni ottimali di crescita, e il fatto che i tratti GI del cane e del gatto ospitano prevalentemente batteri anaerobi, che sono fragili e soggetti a danni da manipolazione.

Attualmente, si stima che meno del 20% dei batteri intestinali possano essere colturali con tecniche standard di laboratorio.

Gli strumenti molecolari consentono l'identificazione di microbi intestinali precedentemente non-caratterizzati; queste tecniche sono anche in grado di fornire informazioni sulla funzionalità del microbioma, mediante metagenomica. Sono disponibili diversi metodi, e tutti questi approcci potrebbero essere idealmente utilizzati in modo complementare (**Tabella 1**).

Tuttavia, la maggior parte di questi metodi è attualmente disponibile solo per la ricerca.

L'uso del NGS dei geni 16S rRNA è uno strumento utile, per valutare il microbiota intestinale, poiché questo approccio fornisce una panoramica delle proporzioni di tutti i gruppi batterici all'interno del microbiota completo. A causa dei suoi costi e dei tempi di risposta dei risultati, il NGS non è attualmente molto disponibile per l'uso diagnostico di routine.

Tuttavia, è importante notare che i gruppi batterici con minore abbondanza (in particolare, gli agenti patogeni) sono tipicamente presenti in una percentuale così bassa di batteri totali, che potrebbero sfuggire all'identificazione anche qualora venissero impiegate tecniche di elevata produttività.

Pertanto, per la rilevazione o la quantificazione dei gruppi batterici in minore abbondanza, è consigliabile l'uso supplementare di specifici primer del gruppo PCR.

**Tabella 1. Metodi comunemente utilizzati per la caratterizzazione del microbiota intestinale.**

Metodo	Descrizione	Vantaggi	Svantaggi
<b>Ibridazione fluorescente in situ (FISH)</b>	Le sonde oligonucleotidiche fluorescenti marcate con colorante sono ibridate con la sequenza di RNA ribosomiale nelle cellule batteriche	Identificazione, quantificazione e visualizzazione di cellule batteriche nei tessuti (luminali vs cellula-aderenti vs mucosa-invasive)	È necessario sviluppare delle efficienti sonde di ibridazione fluorescente in situ per ciascun gruppo batterico di riferimento
<b>PCR quantitativa in tempo reale (qPCR)</b>	Gli organismi-bersaglio vengono rilevati in tempo reale, utilizzando primer e/o sonde fluorescenti marcati con colorante	Rilevazione e quantificazione relativa di gruppi batterici in un campione; rapidi tempi di consegna (poche ore); poco costoso	I saggi devono essere progettati per ciascun gruppo batterico di riferimento
<b>Sequenziamento di nuova generazione</b> (ad esempio, il Pirosequenziamento-454, Illumina)	I batteri in un campione vengono amplificati utilizzando primer universali; gli ampliconi PCR vengono quindi sequenziati utilizzando un sequenziatore ad alto rendimento	Identificazione (teorica) di tutti i batteri presenti in un campione; semiquantitativo; indica cambiamenti relativi nei gruppi batterici all'interno di una comunità	Richiede una bioinformatica avanzata; lunga inversione di tendenza; ha un potenziale per segnali falsi positivi dai reagenti
<b>Metagenomica</b> (tecnica <i>shotgun</i> di sequenziamento del DNA genomico)	Il DNA genomico viene frammentato e poi sequenziato in modo casuale (senza amplificazione PCR) su un sequenziatore ad alto rendimento	Fornisce non solo l'identificazione dei batteri, ma indica anche quali geni funzionali sono presenti nel campione	Molto costoso, richiede una bioinformatica avanzata

È importante notare che i filotipi batterici possono possedere più copie del gene 16S rRNA, che possono variare notevolmente nel numero, tra le singole specie batteriche (possono essere presenti da 1 a 15 copie del gene 16R rRNA). Pertanto, i risultati della qPCR non possono essere correlati direttamente ai conteggi assoluti delle cellule batteriche.

L'uso della FISH è attualmente considerato come il metodo più accurato, per la quantificazione dei gruppi batterici, poiché essa si basa su conteggi microscopici, piuttosto che sull'amplificazione del DNA.

Tuttavia, questo approccio non consente un'analisi approfondita dei campioni.

Un ulteriore vantaggio della FISH è quello di visualizzare la posizione dei batteri, rispetto all'epitelio (intracellulare, aderente o invasiva).

Va inoltre osservato che gli strumenti molecolari, come le tecniche basate sul gene 16S rRNA, hanno limitazioni intrinseche. Il pregiudizio ha luogo durante l'estrazione del DNA, la selezione dei primer, l'amplificazione PCR e l'analisi delle sequenze. Ad esempio, un'insufficiente lisi cellulare, durante l'estrazione del DNA, può sottostimare la popolazione di batteri Gram-positivi, mentre un protocollo di lisi troppo rigido può diminuire il ripristino del DNA dai batteri Gram-negativi.

Alcuni, tra i primer e i protocolli PCR comunemente usati, sottostimano la presenza di specifici gruppi batterici, ad esempio il *Bifidobacterium spp.* In considerazione di questi potenziali pregiudizi, occorre fare attenzione, quando si confrontano i risultati quantitativi attraverso gli studi che hanno utilizzato diversi metodi di estrazione del DNA e diversi protocolli PCR.

Oltre all'identificazione dei gruppi batterici, una chiave per comprendere l'impatto del microbiota sulla salute GI è quello di esplorare la funzionalità della comunità microbica.

In metagenomica, il DNA viene estratto da un campione biologico, e viene quindi direttamente sequenziato, senza una previa amplificazione di geni specifici.

I risultati forniscono un'istantanea della "riserva genica" e del potenziale funzionale del microbioma, e sono stati applicati sui cani (Swanson et al., 2011; Barry et al., 2012).

Un'emergente area di studi è quella volta a indagare il ruolo dei metaboliti e dei batteri dell'ospite, in vari disturbi GI. Siffatto approccio può migliorare la nostra comprensione dei complessi percorsi metabolici, con l'obiettivo di trovare nuovi biomarcatori per l'eziologia, la progressione e il trattamento delle malattie GI.

Nella medicina veterinaria, è già stata eseguita una misurazione mirata dei metaboliti specifici: ad esempio, per le misurazioni delle concentrazioni sieriche di cobalamina e folato, nonché delle concentrazioni fecali degli SCFA.

La metabolomica non-mirata è una tecnica che fornisce un profilo imparziale dei metaboliti, usando la spettrometria di massa. Con una singola analisi, possono essere misurate diverse centinaia di metaboliti, che possono essere utilizzati per comprendere meglio quelle alterazioni delle vie biochimiche che si verificano quale conseguenza dell'infiammazione e della disbiosi GI (ad esempio, alterazioni di vari aminoacidi, percorsi dei triptofani e dismetabolismo degli acidi biliari).

### **Microbiota gastrointestinale di cani e gatti sani**

Utilizzando la coltura batterica tradizionale, gli studi iniziali hanno riferito che il carico batterico nell'intestino tenue dei cani sani varia da  $10^2$  a  $10^5$  CFU ("unità formanti colonie")/g, e alcuni studi riportano numeri fino a  $10^9$  CFU/g (German et al., 2003).

Nel colon, il numero di batteri coltivabili è molto più elevato, rispetto all'intestino tenue, e va da  $10^8$  a  $10^{11}$  CFU/g (Mentula et al., 2005). I gatti hanno un numero di batteri nel duodeno considerevolmente superiore, rispetto ai cani (Johnston et al., 1999).

I metodi molecolari hanno permesso un'identificazione più dettagliata dei batteri presenti all'interno dei tratti GI di cani e gatti (Suchodolski, 2011). L'intestino tenue ospita una miscela di batteri aerobi e batteri anaerobi facoltativi, mentre l'intestino crasso ospita quasi esclusivamente gli anaerobi (Suchodolski et al., 2008a).

I phyla batterici principali sono i *Firmicutes*, i *Bacteroidetes*, i *Proteobacteria* e i *Fusobacteria*, che costituiscono circa il 99% di tutto il microbiota intestinale di cani e gatti (Handl et al., 2011; Chaban et al., 2012). Gli *Helicobacter* spp. sono predominanti nello stomaco del cane, ma solitamente possono anche trovarsi gli *Actinobacillus* e gli *Streptococcus* spp. (Garcia-Mazcorro et al., 2012).

L'intestino tenue ospita prevalentemente *Clostridium* spp., *Lactobacillales* e *Proteobacteria*, mentre i *Clostridiales*, i *Bacteroides* spp., la *Prevotella* spp. e i Fusobatteri predominano nel crasso.

Oltre alle differenze nella composizione del microbiota lungo il tratto GI, ciascun animale ospita un profilo microbico unico (**Figura 1**) (Suchodolski et al., 2005).

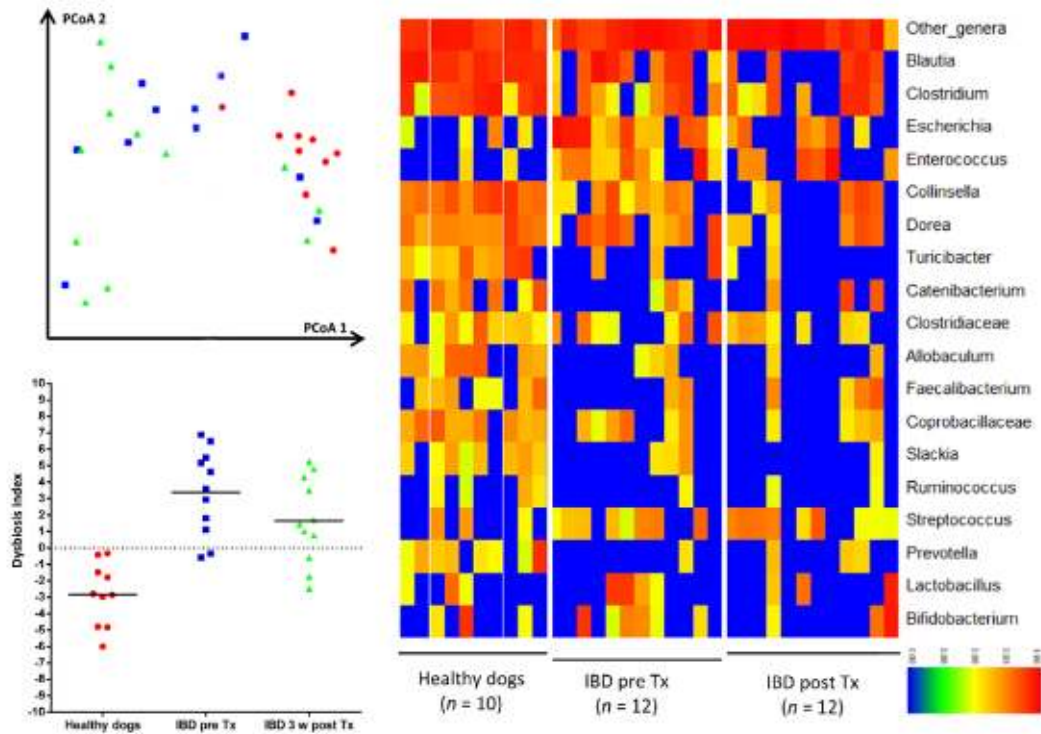
Tuttavia, i metagenomi (ossia, il contenuto genetico funzionale) sono conservati, e ciò suggerisce che gli aspetti funzionali dei microbiomi sono simili tra i singoli animali (Guard et al., 2016).

Gli algoritmi matematici possono essere usati per combinare in un unico numero i livelli dei vari gruppi batterici, che sono diversi per ciascun individuo (**Figura 1**), in modo da poter monitorare la direzione dei cambiamenti del microbiota, sia nella malattia che nella risposta alla terapia.

Anche i funghi e i virus sono membri importanti del microbiota, ma il loro ruolo nella salute e nella malattia è ancora in fase di valutazione. Sulla base dei conteggi metagenomici sequenziali, i funghi costituiscono circa il 2% delle cellule microbiche nei campioni fecali (Swanson et al., 2011).

I cani e i gatti ospitano diverse specie di funghi nel loro intestino; sono stati riportati fino a 40 diversi filotipi nei campioni fecali di singoli cani (Foster et al., 2013). Pertanto, ci aspettiamo di poter trovare dei funghi, negli esami fecali di routine.

Il ruolo dei funghi nella malattia GI è incerto, in quanto non sono state osservate chiare differenze tra i filotipi specifici, nel confronto tra campioni fecali di cani sani e di cani con diarrea acuta (Foster et al., 2013) o nei campioni duodenali di cani con CE (Suchodolski et al., 2008b).



**Figura 1**

**Legenda della figura**

**Fig. 1.** *Disbiosi nei cani con malattia intestinale infiammatoria idiopatica (IBD) prima e dopo 3 settimane di terapia.*

Questa figura mostra come gli stessi dati possano essere illustrati da una mappa termica e da vari algoritmi matematici, che tengano conto della composizione batterica all'interno di ciascun campione fecale.

Il DNA fecale viene estratto, e poi la composizione batterica viene identificata mediante l'amplificazione dei geni 16S rRNA, seguita dal sequenziamento. Dati basati su Minamoto et al., (2015).

In alto a sinistra: i dati possono essere visualizzati, utilizzando la trama principale di analisi delle coordinate (PCoA), dove i dati vengono visualizzati attraverso le due coordinate principali (PCoA 1 e 2).

Ciascun punto rappresenta la comunità batterica totale all'interno di un campione. Più vicini sono i due punti, più simile è la loro comunità batterica (cioè, essi condividono molti *taxa* batterici).

Maggiore è la distanza tra due punti, maggiore sarà la differenza tra le due comunità batteriche.

Ogni punto (cioè, ogni campione) viene colorato per fenotipo, in questo caso: cani sani (rossi), cani con IBD prima della terapia (blu) e cani con IBD 3 settimane dopo la terapia medica (verde).

La figura a sinistra mostra che i cani sani si raggruppano più strettamente tra loro, e sono più distinti dai cani con IBD, ad indicare le differenze nel microbiota fecale tra cani sani e cani con IBD.

Tre settimane dopo la terapia, e nonostante il miglioramento nell'attività della malattia clinica (punteggio CIBDAI), il microbiota è cambiato solo leggermente, e non si è ancora raggruppato in modo più vicino al microbiota dei cani sani. In basso a sinistra: gli stessi dati vengono visualizzati come un indice che riassume le abbondanze dei principali *taxa* batterici in ciascun campione fecale, come un singolo valore numerico (un numero positivo indica la disbiosi).

Questo indice può quindi essere utilizzato per monitorare i cambiamenti nel microbiota intestinale nel tempo. Come nella figura a sinistra, i dati indicano che, dopo 3 settimane di terapia, il microbiota non è tornato in uno stato simile a quello dei cani sani.

A destra: i generi batterici più abbondanti di questi cani sono visualizzati come una mappa termica.

Ciascuna colonna rappresenta i generi batterici in ciascun campione; ciascuna riga riassume l'abbondanza di questi generi (più sono rosse, e più è elevata l'abbondanza). La mappa termica mostra che i generi abbondanti principali nei cani sani sono diminuiti nei cani con IBD.

**Microbiota intestinale: Contributo alla salute**

Un equilibrato ecosistema microbico è di fondamentale importanza per la salute dell'ospite, poiché stimola il sistema immunitario, aiuta nella difesa contro gli enteropatogeni e fornisce benefici nutrizionali.

La presenza di batteri è importante anche per un corretto sviluppo della struttura dell'intestino, dal momento che i topi privi di germi (gnotobiotici) hanno un'architettura epiteliale alterata.

Un'area di ricerca emergente è quella di capire come il microbiota moduli lo stato di salute e di malattia dell'ospite.

Diversi studi hanno descritto il microbiota intestinale e il suo pool genetico funzionale (metagenoma) nei cani e nei gatti (Swanson et al., 2011; Barry et al., 2012; Guard et al., 2015; Minamoto et al., 2015).

Le interazioni tra i batteri intestinali e il sistema immunitario dell'ospite sono mediate sia attraverso il contatto diretto tra i batteri e il sistema immunitario innato (ad es., i recettori di tipo *Toll* e i recettori NOD2), sia attraverso i metaboliti microbici.

Questi metaboliti possono essere prodotti direttamente dai batteri (ad esempio: vitamine e acidi grassi a catena corta), oppure si tratta di metaboliti primari dell'ospite, che vengono convertiti in metaboliti secondari attraverso enzimi batterici (ad esempio, conversione di acidi biliari primari in secondari).

Gli acidi biliari sono un eccellente esempio delle strette interazioni tra l'ospite e il microbiota intestinale.

Soltanto i batteri intestinali possono convertire gli acidi biliari primari (che entrano nel colon) in acidi biliari secondari. Il rapporto ottimale tra acidi biliari primari e secondari è considerato un importante regolatore dell'omeostasi intestinale, poiché essi riducono l'infiammazione, inibiscono la germinazione delle spore del *C. Difficile* e modulano il metabolismo dell'insulina e del glucosio, mediante l'attivazione del peptide 1 glucagonico (GLP-1) (Pavlidis et al., 2015).

La disbiosi dell'intestino porta ad alterazioni dell'acido biliare, con conseguenze metaboliche potenzialmente negative per l'ospite (Duboc et al., 2013).

Il *phylum* batterico dei *Firmicutes*, un costituente principale del microbiota intestinale, comprende molti gruppi batterici filogeneticamente distinti, il cosiddetto *Gruppo Clostridium*.

Questi gruppi (ad esempio, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* e *Dorea spp.*), insieme ai *Bacteroidetes* e agli *Actinobacteria* (cioè, il *Bifidobacterium spp.*), sono ritenuti degli importanti produttori dei metaboliti, che hanno un positivo impatto diretto sulla salute dell'ospite (**Tabella 2**).

**Tabella 2. Importanza dei metaboliti derivati dai microbi nel tratto gastrointestinale.**

Attività metaboliche del microbiota intestinale	Prodotti finali del metabolismo	Effetto sulla salute dell'ospite e cambiamenti nella malattia
Fermentazione dei carboidrati	SCFA (es. propionato, acetato, butirato)	Antinfiammatorio, fonte di energia degli enterociti, regolazione della motilità intestinale, linfociti T regolatori, miglioramento della barriera intestinale permeabile; gli SCFA sono ridotti a causa della disbiosi
Sintesi vitaminica	Vitamine A, K2, B12; biotina, folato	Importanti cofattori per varie vie metaboliche e generazione di cellule T regolatorie; la disbiosi porta ad alterazioni del metabolismo della vitamina B12 e dei folati
Induce la degradazione della sfingomieline tramite la sfingomielinasi alcalina	Ceramide	Promuove i normali meccanismi apoptotici per limitare la displasia e la trasformazione neoplastica
Degradazione dell'amminoacido triptofano	Indolo	Aumenta la resistenza della giunzione stretta delle cellule epiteliali e attenua gli indicatori di infiammazione; le vie dell'indolo sono interrotte, nella disbiosi associata a IBD
Deconiugazione/deidrossilazione degli acidi biliari	Acidi biliari secondari (colato/deossalato)	Assorbimento dei grassi intestinali; regolazione dell'insulina attraverso l'attivazione del GLP-1; fornisce segnali antinfiammatori; gli acidi biliari secondari sono ridotti nella disbiosi associata a IBD e con la somministrazione di antibiotici.
Fermentazione dei carboidrati	D-lattato	Aumenti del D-lattato, dovuti alla disbiosi nell'EPI e nelle enteropatie croniche; incrementi associati all'encefalopatia

Come esempi, le fonti dei nutrienti dei batteri sono i carboidrati complessi (ad esempio: amido, cellulosa, pectina e inulina), e la fermentazione di questi substrati comporta principalmente la produzione di SCFA (ad esempio: acetato, propionato e butirato). Questi fungono da fonti energetiche per l'ospite, regolano la motilità intestinale e sono importanti fattori di crescita per le cellule epiteliali.

Gli SCFA hanno anche proprietà antinfiammatorie, giacché predispongono le cellule T immunoregolatrici (Treg) (Arpaia et al., 2013). Altri metaboliti batterici, come gli acidi biliari secondari e l'indolo (un sottoprodotto del degrado del triptofano), sono anche anti-infiammatori, e così mantengono l'omeostasi immunitaria e rafforzano la funzione di barriera intestinale (Bansal et al., 2010; Duboc et al., 2013).

### **Il ruolo della disbiosi intestinale nella fisiopatologia delle malattie gastrointestinali**

Alcune ragioni dello sviluppo della disbiosi sono riassunte nella Tabella 3.

I processi di malattia possono essere associati ai cambiamenti nella funzione del microbiota (ad esempio, la riduzione della produzione di SCFA e di altri metaboliti, e un alterato gruppo enzimatico batterico), piuttosto che agli spostamenti nella composizione del microbiota.

Queste alterazioni funzionali o immunologiche non sono facilmente individuabili, in quanto non siamo ancora in grado di valutare correttamente l'intero microbiota e le sue funzioni.

Il microbiota varia lungo il tratto GI, ed esistono anche chiare differenze tra il microbiota mucosale e quello luminale (Suchodolski et al., 2004, 2005; Manchester et al., 2013; White, 2015).

Inoltre, è quasi impossibile valutare correttamente tutte le interazioni tra il microbiota e il sistema immunitario dell'ospite (Kathrani et al., 2012).

Poiché questi fattori inaccessibili hanno probabilmente un ruolo cruciale, nella complessa comunicazione tra batteri e sistema immunitario dell'ospite, spesso una grezza valutazione dei cambiamenti batterici nei campioni intestinali non permette di rilevare l'intero processo della malattia. Tuttavia, sono stati compiuti molti progressi nella caratterizzazione della disbiosi intestinale nelle malattie GI, e la metabolomica ha anche fornito approfondimenti sulle conseguenze funzionali della disbiosi e sul suo ruolo nella fisiopatologia di alcuni disturbi GI negli esseri umani (Duboc et al., 2013) e nei cani (Honneffer et al., 2015).

**Tabella 3. Disturbi associati alla disbiosi intestinale.**

<b>Malattie infiammatorie dell'intestino</b>
Enteropatie croniche (cibo-responsive, antibiotico-responsive)
Malattia infiammatoria intestinale idiopatica
<b>Diarrea acuta</b>
Sindrome da diarrea emorragica acuta
Diarrea acuta di varia origine (infettiva e non-infettiva)
<b>Stasi intestinale</b>
Anomalie anatomiche
Anse cieche congenite
Diverticoli dell'intestino tenue, stenosi o aderenze
Resezione chirurgica della valvola ileocolica
Anse chirurgiche cieche (anastomosi termino-laterale)
Ostruzioni parziali dell'intestino tenue
Neoplasia
Corpi estranei
Intussuscezione cronica
<b>Disturbi della motilità</b>
Ipotiroidismo
Neuropatia autonoma diabetica
Sclerodermia
Complessi motori migranti anomali
<b>Diminuzione della produzione di acido gastrico</b>
Gastrite atrofica
Somministrazione di farmaci antiacidi (H2-bloccanti, omeprazolo)
<b>Insufficienza pancreatica esocrina</b>
Diminuzione della produzione di fattori antimicrobici pancreatici
<b>Fattori ambientali</b>
Antibiotici



## Microbiota intestinale nelle enteropatie acute e croniche

La disbiosi è stata descritta nei cani con malattie GI (ad es., IBD e diarrea acuta), nei gatti con CE, ed in cani e gatti infetti da *Giardia duodenalis* (Suchodolski et al., 2012b, 2015; Guard et al., 2015; Minamoto et al., 2015; Slapeta et al., 2015).

Nell'IBD umana e canina, si registrano aumenti nelle proporzioni di generi batterici appartenenti ai *Proteobacteria* (es., *Escherichia coli*, *Diaphorobacter spp.*) e diminuzioni di *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* e dei membri dei *Firmicutes* (es. *Faecalibacterium spp.*, *Ruminococcaceae*, *Turicibacter spp.*, *Blautia spp.*).

Questi cambiamenti sono stati osservati nel duodeno (Suchodolski et al., 2010, 2012a; Xenoulis et al., 2008) e nei campioni fecali (Suchodolski et al., 2012b; Honneffer et al., 2014; Minamoto et al., 2014, 2015) di cani con IBD. Ciò indica che, nonostante le differenze nella composizione microbica lungo il tratto GI, la disbiosi dovuta a un processo di malattia nell'intestino tenue può essere identificata nei campioni fecali.

La disbiosi nel duodeno era correlata con la gravità dei punteggi istopatologici, ma non con la gravità della malattia clinica, ossia non con l'indice clinico di attività IBD (CIBDAI) (Suchodolski et al., 2012a).

Generalmente, vi è somiglianza tra i modelli di disbiosi osservati nella diarrea cronica e in quella acuta, ma sono state descritte alcune differenze notevoli. Ad esempio, nei campioni fecali di cani con diarrea emorragica acuta, sono stati riportati notevoli incrementi nelle popolazioni di *Clostridium perfringens* e *Fusobacteria* (Suchodolski et al., 2012b).

Al contrario, quest'ultimo *taxon* è tipicamente diminuito nelle feci di cani con IBD.

Un incremento del *C. Perfringens*, o una sua individuazione nei campioni fecali di cani con diarrea, sono comunemente ritenuti causativi. Tuttavia, uno studio recente suggerisce che la crescita di *C. perfringens* si verifica come effetto della disbiosi intestinale e della perdita del normale microbiota nella diarrea cronica (Minamoto et al., 2014). Il ruolo dell'enterotossina del *C. Perfringens* è stato studiato anche nella diarrea acuta (Busch et al., 2015).

Recentemente, è stata identificata una nuova tossina formante pori (netF), in un sottoinsieme di cani con diarrea emorragica canina (Mehdizadeh Gohari et al., 2015); questo può essere un *focus* dei futuri test diagnostici.

I gatti con IBD avevano aumentati conteggi duodenali di *Enterobacteriaceae*, come valutati mediante la ibridazione fluorescente in situ (FISH); questi conteggi erano positivamente correlati coi cambiamenti nell'architettura mucosale e con la densità degli infiltrati cellulari (Janeczko et al., 2008).

Meno si sa sulla disbiosi fecale nei gatti con IBD, in quanto solo due studi hanno valutato il microbiota fecale di gatti con IBD confermata, utilizzando la FISH per identificare i singoli gruppi batterici, anziché per sequenziare.

Uno studio ha individuato un aumento del *Desulfovibrio spp.* nei gatti con IBD (Inness et al., 2007), mentre il secondo studio non ha trovato differenze tra gatti sani e gatti con IBD (Abecia, 2010).

In uno studio - che utilizzava il sequenziamento 16S rRNA nei gatti con diarrea acuta e CE, ma senza diagnosi chiara -, i gatti con diarrea cronica avevano diminuite proporzioni di *Bacteroidetes*, *Faecalibacterium spp.* e *Turicibacter spp.*, e accresciute proporzioni di *Enterobacteriaceae*, similmente a quanto si può verificare per i cani con IBD (Suchodolski et al., 2015).

Gli studi sopra descritti hanno chiaramente identificato una disbiosi duodenale e fecale nei cani con IBD. Al momento attuale, nessun studio ha valutato se i modelli di disbiosi differiscano tra le varie forme di CE, l'enteropatia cibo-reattiva (FRE), l'enteropatia reattiva agli antibiotici (ARE) e l'IBD.

Sono necessari studi di *follow-up* a lungo termine, per esaminare se i cambiamenti nel microbiota siano ripristinabili con la remissione clinica.

Studi iniziali hanno riportato che il microbiota GI e il metaboloma sierico subiscono solo minori normalizzazioni, dopo 3 settimane (Minamoto et al., 2015; Figura 1) o dopo 8 settimane di terapia (Rossi et al., 2014), anche se i cani mostrano miglioramenti nei punteggi CIBDAI. Ciò suggerisce che il microbiota rimane alterato, a causa della malattia sottostante o dell'infiammazione istologica residua, presente nell'intestino (Rossi et al., 2014), che in genere non si risolve completamente in questo periodo di tempo.

Ulteriori studi sono necessari, per correlare l'esito a lungo termine degli animali colpiti (ossia, il tasso di recidiva clinica) con la dinamica della disbiosi.

La disbiosi, inclusi i segni clinici associati ai cambiamenti nel microbiota, può anche essere indotta dalla somministrazione di agenti antimicrobici.

Alcuni agenti antimicrobici ad ampio spettro, come il metronidazolo, inducono importanti cambiamenti nei taxa batterici; queste modifiche sono simili ai modelli di disbiosi osservati nella CE (Minamoto et al., 2014, 2015).

Pertanto, la somministrazione di antibiotici in cani sani può causare cambiamenti che simulano la disbiosi osservata nella malattia GI cronica. La continua somministrazione di antibiotici durante la terapia può portare alla falsa diagnosi, su campioni di *follow-up*, che la disbiosi sia persistente a causa della malattia GI, mentre le modifiche possono essere imputabili al trattamento antimicrobico.

Nei casi in cui gli antibiotici vengono somministrati in via cronica, la valutazione seriale della disbiosi deve essere interpretata con cautela.

### **Conseguenze funzionali della disbiosi nelle enteropatie croniche**

Un microbioma disbiotico può essere direttamente deleterio per l'ospite; oppure, l'esaurimento del microbiota residente può portare a riduzioni dei metaboliti antinfiammatori.

Pertanto, è auspicabile una corretta caratterizzazione della disbiosi, per consentire una migliore comprensione del processo di malattia in animali con malattie GI, e per guidare le decisioni sul trattamento.

I cambiamenti nel microbiota comportano conseguenze funzionali e immunologiche per l'ospite, ma l'entità di tali cambiamenti dipenderà dalla grandezza e dal modello della disbiosi (vale a dire, da quali gruppi batterici siano alterati) e dalla posizione della disbiosi (intestino tenue o crasso).

Una migliore comprensione di queste conseguenze filogenetiche e funzionali può comportare una migliore comprensione della patogenesi della malattia.

I batteri dell'intestino tenue vivono in un rapporto molto delicato con l'ospite, poiché molti di questi sono mucosa-aderenti, e quindi sono importanti stimolatori dell'immunità mucosale.

I cambiamenti dietetici improvvisi, ivi compresa l'imprudenza dietetica, e i cambiamenti nell'architettura dell'intestino, coi susseguenti cambiamenti nella motilità intestinale (ad esempio, la creazione chirurgica di cicli intestinali, la sindrome dell'intestino corto e la resezione della valvola ileocolica), possono portare a cambiamenti nelle popolazioni batteriche.

L'insufficienza pancreatica esocrina (EPI) è stata associata a un aumento del numero totale di batteri nel duodeno dei cani (Simpson et al., 1990).

Tenui cambiamenti nella composizione del microbiota possono avere effetti significativi sulla risposta immunitaria dell'ospite.

Il microbiota può anche competere con l'ospite per i nutrienti e può produrre metaboliti deleteri.

Il microbiota del tenue, in particolare il *Lactobacillus spp.* e il *Clostridium spp.* (*C. hiranonis* e *C. scindens*), decòniuga gli acidi biliari; un'anormale composizione microbica può ridurre l'assorbimento dei grassi.

Altre funzioni anormali possono essere la deidrossilazione degli acidi grassi, la distruzione degli enzimi dal bordo a spazzola, i danni alle proteine trasportatrici e la concorrenza per i nutrienti (ad esempio, la vitamina B12).

Le enterotossine, prodotte dai batteri patogeni, possono stimolare le secrezioni del liquido mucosale, mentre la rottura dei villi e la perdita dell'area superficiale diminuiranno la capacità di assorbimento della mucosa, con conseguente diarrea.

Una disfunzione della barriera mucosale può portare a un aumento della permeabilità intestinale e a una traslocazione batterica clinicamente significativa.

La disbiosi che si verifica nell'intestino crasso è tipicamente associata a diminuzioni nei principali taxa batterici abbondanti (ad esempio, *Blautia spp.*, *Faecalibacterium spp.*, *Ruminococcaceae* e *Turicibacter spp.*, Fig. 1) che producono SCFA, indoli e altri metaboliti immunomodulatori. Pertanto, si prevedono importanti effetti sul metabolismo dell'ospite.

Di conseguenza, le diminuite abbondanze di *Ruminococcaceae* e *Faecalibacterium spp.* sono state correlate con la diminuzione delle concentrazioni fecali di propionato e con l'aumento delle concentrazioni fecali di butirato, nei cani con diarrea acuta (Guard et al., 2015) e con IBD (Minamoto et al., 2015).

I cani con diarrea acuta hanno avuto anche variazioni nel percorso del triptofano, come indicato dalle ridotte concentrazioni uriche di 2-metil-indolo e di 5-metossi-1H-indolo-3-carbaldeide, e dalla diminuzione di acido chinurenico sierico (un catabolita di chinurenina e triptofano), così come un ridotto rapporto tra triptofano ed acido chinurenico (Guard et al., 2015).

I cani con IBD avevano un profilo globale alterato nei metaboliti del siero, rispetto ai cani sani, con incrementi significativi nei percorsi di stress ossidativo (Minamoto et al., 2015).

Inoltre, il metagenoma fecale previsto era coerente con la diminuzione del metabolismo degli aminoacidi, e ciò suggerisce che il microbiota dei cani con IBD è coinvolto nel metabolismo proteico disfunzionale.

Gli studi, che hanno impiegato la metabolomica non mirata, hanno associato la disbiosi fecale alle riduzioni degli acidi biliari secondari immunomodulatori negli esseri umani (Duboc et al., 2013) e nei cani (Honneffer et al., 2015), e ai percorsi triptofano-indolo nei cani (Guard et al. 2015).

La deplezione dei gruppi commensali (mappa del calore in **Figura 1**) e dei loro rispettivi metaboliti immunoregolatori può compromettere la capacità dell'ospite di ridurre l'aberrante risposta immunitaria intestinale; così, la disbiosi diventa una componente della fisiopatologia del processo di malattia cronica.

Recenti studi epidemiologici negli esseri umani hanno rivelato che la disbiosi causata dalla somministrazione di farmaci (ad esempio antibiotici, farmaci antiinfiammatori non steroidei, sostanze depressive dell'acido gastrico) è un importante fattore di rischio per alcune malattie croniche.

L'esposizione precoce agli antibiotici, nell'infanzia, è associata allo sviluppo di allergie (Metsala et al., 2015) e dell'obesità (Saari et al., 2015), presumibilmente dovute alla disbiosi indotta da antibiotici.

La riduzione della diversità del microbiota intestinale, al momento del trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche, è un fattore di rischio per una mortalità più elevata (Taur et al., 2015).

Questi dati iniziali negli esseri umani, uniti alla migliore comprensione delle proprietà immunomodulatorie del microbiota intestinale, suggeriscono che una corretta diagnosi e una correzione della disbiosi diventeranno un importante obiettivo terapeutico. Ciò potrebbe includere l'uso di diete altamente digeribili e/o di una terapia con prebiotici / probiotici e agenti antimicrobici.

Tuttavia, attualmente, non sono disponibili dati clinici sufficienti per formulare raccomandazioni su quali modelli di disbiosi risponderanno meglio a una data terapia.

### **Enteropatie croniche associate ai batteri muco-invasivi**

La colite granulomatosa, talvolta designata come colite ulcerativa istiocitica, è una forma specifica di CE che risponde agli antibiotici e che è stata associata all'infiltrazione della mucosa operata dall'*E. coli* invasivo e aderente nel colon. I Boxer giovani (tipicamente, <4 anni di età) sono colpiti più frequentemente, ed è stata proposta una suscettibilità genetica per questa razza.

Tuttavia, possono esserne colpite anche altre razze di cani, in particolare i giovani bulldog francesi.

La predisposizione di questi cani alla colite granulomatosa associata all'*E. coli* suggerisce che essi abbiano un difetto genetico, che pregiudica la loro capacità di eliminare l'*E. coli* invasivo.

L'analisi *in situ* delle biopsie della mucosa di cani con colite granulomatosa, effettuata utilizzando sonde FISH contro l'*E. coli*, evidenzia gruppi multifocali di batteri invasivi all'interno dei macrofagi nella mucosa intestinale. La terapia con antibiotici (enrofloxacin) per 8 settimane si correla alla remissione dalla malattia (Manchester et al., 2013).

### **Disbiosi del tenue: Diarrea antibiotico-responsiva**

Negli esseri umani, la sovracrescita batterica dell'intestino tenue (SIBO) è definita come un aumento del numero di batteri nel tenue (Johnston, 1999).

Per i cani, è attualmente in discussione l'esistenza di una sindrome simile. I primi studi hanno riscontrato un aumento nei conteggi dei batteri nei cani con diarrea, rispetto ai cani sani, e gli autori di questo studio hanno definito la SIBO come  $>10^4$  di batteri anaerobi o  $>10^5$  CFU/mL totali nel succo duodenale a digiuno (Batt et al., 1983, Rutgers et al., 1995, 1996).

Tuttavia, negli studi successivi (German et al., 2003), sono stati trovati conteggi batterici sostanzialmente più elevati negli aspirati duodenali di cani sani. Inoltre, non vi era alcuna correlazione tra il numero di batteri nel duodeno e i segni clinici, nei cani con CE (German et al., 2003).

Poiché questa sindrome risponde al trattamento antibiotico, alcuni autori stanno usando il termine "diarrea antibiotico-responsiva" (ARD) (Hall, 2011). Inoltre, è stato segnalato che un sottogruppo di cani, con diarrea antibiotico-responsiva, risponde specificamente alla tilosina; per questo sottogruppo, è stato proposto il termine "diarrea tilosina-reattiva" (TRD) (Westermarck et al., 2005).

Attualmente non è disponibile alcun lavoro diagnostico che consenta una definizione migliore di questi sottogruppi. Non è chiaro se questi cani abbiano la stessa sindrome, o se esistano sottogruppi che potrebbero essere classificati come sovracrescita batterica intestinale, disbiosi del tenue (SID), diarrea tilosina-responsiva (TRD) o, generalmente, diarrea antibiotico- responsiva (ARD).

È importante notare che, in questa sindrome, non sono inclusi i disturbi causati da batteri potenzialmente patogeni, quali *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium perfringens* enterotossigenico e *C. difficile*.

Mentre i gatti sani sembrano avere conteggi batterici duodenali più alti, rispetto ai cani sani, e questi numeri non si differenziano da quelli nei gatti con enteropatie (Johnston et al., 1993), sembra vi sia un sottoinsieme di gatti con CE che rispondono favorevolmente alla somministrazione di antibiotici.

Diversi meccanismi fisiologici regolano la colonizzazione batterica dell'intestino tenue. Essi includono la secrezione di acido gastrico e di fattori antibatterici (ad es., secrezioni pancreatiche e biliari), e la motilità intestinale. Le anomalie, in uno o più di questi meccanismi di controllo, possono portare a una disbiosi dell'intestino tenue, con conseguenti segni clinici. Ad esempio, i cani che hanno ricevuto una terapia di soppressione dell'acido gastrico, con un inibitore della pompa protonica, hanno mostrato alterazioni nel microbiota dello stomaco e del tenue (Garcia-Mazcorro et al., 2012).

Il succo pancreatico contiene sostanze antimicrobiche, e i cani con EPI hanno significativamente aumentato i conteggi batterici nell'intestino tenue (Westermarck et al., 1993). Questo si associa a una scarsa risposta alla terapia sostitutiva dell'enzima pancreatico. La formazione di anelli, ciechi e stagnanti, nell'intestino tenue, è una ragione comune per la sovracrescita di batteri negli esseri umani, che può portare a segni di malattia GI cronica.

Alcune razze canine, quali quelle del Pastore Tedesco e dello Shar-Pei cinese, sembrano predisposte all'ARE. Per questi cani, si sospetta una suscettibilità genetica a una disregolazione della risposta immunitaria, mediata dalla cellula, a normali microrganismi luminali.

Non è stata confermata la carenza di IgA, come fattore sottostante di rischio.

L'istopatologia, nei pastori tedeschi e in altri cani con diarrea antibiotico-responsiva, è tipicamente riportata come IBD linfocitico-plasmocitica, da normale a lieve. Tuttavia, gli studi recenti hanno riportato una risposta anormale nell'immunità innata (alterata espressione dei recettori Toll-like) nei Pastori Tedeschi, che potrebbe portare a una reazione iperattiva alla flagellina batterica nell'intestino tenue (Kathrani et al., 2012).

È difficile diagnosticare in modo definitivo la SID e la ARD. La coltura duodenale non è utile a questo scopo, e non sono stati riportati studi molecolari. Pertanto, non è chiaro quali gruppi batterici siano alterati.

Può essere effettuata una diagnosi provvisoria sulla base dei segni clinici, di alterati livelli di cobalamina e di folati nel siero, e con una terapia antibiotica. Tuttavia, poiché le malattie, causate da patogeni intestinali non rilevati, possono rispondere alla terapia antibiotica, una risposta positiva alla terapia non conferma necessariamente la presenza di una disbiosi del tenue.

Dovrebbero essere escluse le diagnosi differenziali, come i parassiti, gli agenti patogeni batterici, la maldigestione causata da EPI, IBD, linfoma intestinale, linfangiectasia e intolleranza alimentare.

La valutazione istopatologica delle biopsie dell'intestino tenue è spesso irrilevante. Tuttavia, a volte è stata segnalata un'atrofia dei villi o una fusione. Gli animali colpiti dovrebbero essere valutati anche per i fattori sottostanti, quali le anomalie anatomiche.

### **Cobalamina sierica e concentrazioni di folati**

Nei cani con SID/ARD, le concentrazioni sieriche di cobalamina possono essere diminuite e le concentrazioni di folato sierico possono essere aumentate.

I cambiamenti nel microbiota del tenue possono portare a una maggiore utilizzazione batterica della cobalamina, con conseguente diminuzione dell'assorbimento di cobalamina dall'ileo.

Nel tenue e nel crasso distali, i batteri producono acido folico, ma l'assorbimento dei folati, attraverso le proteine trasportatrici, avviene nell'intestino tenue prossimale.

Quando i batteri produttori di folati si accumulano nell'intestino tenue prossimale, l'ospite assorbirà un'aumentata quantità di folato batterico, con conseguente aumento della concentrazione di folati sierici.

Tuttavia, l'assorbimento di cobalamina e folato dal tenue è molto complesso, e può essere influenzato da diversi meccanismi; pertanto, le modifiche non sono molto specifiche per la SID o la ARD.

Una dieta ricca in folati può portare a un aumento delle concentrazioni di folato sierico, indipendente dalla malattia.

L'infiammazione dell'ileo può danneggiare i recettori della cobalamina e, quindi, può portare al malassorbimento della cobalamina stessa. I cani con EPI hanno una diminuita secrezione di prodotti antibatterici, con una successiva sovracrescita batterica nel tenue (Simpson et al., 1989). Di conseguenza, i cani con EPI hanno spesso una maggiore concentrazione di folati nel siero. Pertanto, nei cani con un'anormale concentrazione sierica di cobalamina e/o folato, deve essere valutata l'immunoreattività tripsino-simile (TLI) sierosa, per escludere l'EPI.

Contrariamente alle aspettative, la somministrazione di tilosina non porta a una diminuzione delle concentrazioni di folato sierico, né a un aumento di quelle di cobalamina sierica (Ruau et al., 2005).

Pertanto, le concentrazioni di folato sierico possono non riflettere il successo terapeutico, e dovrebbero essere sempre valutate insieme ai risultati clinici.

Quando si alterano le concentrazioni di cobalamina e di folato sierico, ciò suggerisce la SID, ma entrambe le predette hanno una sensibilità e una specificità relativamente bassa, per la diagnosi di SID; la sensibilità riportata della concentrazione di cobalamina sierica, per una diagnosi, è del 25-55%, ed è del 50-66% per la concentrazione di folato sierico (German et al., 2003).

### **Conclusioni**

Siamo ancora in una fase precoce, per comprendere la complessità del microbiota intestinale e le conseguenze metaboliche della disbiosi nella malattia GI.

I recenti studi funzionali hanno collegato chiaramente la disbiosi a una gamma di malattie nei cani e nei gatti. Tuttavia, in questo momento, non sono disponibili dati clinici sufficienti per poter formulare raccomandazioni su quali modelli di disbiosi risponderanno meglio a una terapia specifica, e gli animali interessati devono essere trattati in base all'intero quadro clinico.

Mentre, in alcuni animali, l'uso di agenti antimicrobici è utile (ad esempio, per gli animali con ARD), il loro uso può esacerbare la disbiosi in altre malattie GI che non rispondono agli antibiotici.

Pertanto, sono necessari ulteriori studi clinici, che combinino i risultati dell'analisi filogenetica e di quella del microbiota funzionale, per meglio definire le varie firme e i vari approcci terapeutici alla disbiosi.

### **Dichiarazione di conflitto di interessi**

L'autore è impiegato nel Laboratorio Gastrointestinale presso la Texas A&M University, che offre test di funzionalità gastrointestinale a pagamento.

# Accepted Manuscript

Title: Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats

Author: Jan Suchodolski

PII: S1090-0233(16)30033-8

DOI: <http://dx.doi.org/doi: 10.1016/j.tvjl.2016.04.011>

Reference: YTVJL 4804

To appear in: *The Veterinary Journal*

Accepted date: 21-4-2016



Please cite this article as: Jan Suchodolski, Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats, *The Veterinary Journal* (2016), <http://dx.doi.org/doi: 10.1016/j.tvjl.2016.04.011>.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

1 **Review Article**

2

3 **Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats**

4

5 Jan Suchodolski \*

6

7 *Gastrointestinal Laboratory, Texas A&M University (TAMU), College of Veterinary*  
8 *Medicine, Department of Small Animal Clinical Sciences, 4474 TAMU, College Station,*  
9 *Texas 77843-4474, USA*

10

11 \* Corresponding author. Tel.: +1 979 4580933.

12 *E-mail address:* [Jsuchodolski@cvm.tamu.edu](mailto:Jsuchodolski@cvm.tamu.edu) (J. Suchodolski).

13

14 **Highlights**

- 15 • The gastrointestinal (GI) tract harbors a complex microbiota, which consists of  
16 bacteria, fungi, viruses and protozoa.
- 17 • Molecular methods are now the standard techniques for assessing intestinal dysbiosis  
18 in dogs and cats with GI disease.
- 19 • Loss of commensal microbiota is associated with decreased short chain fatty acids and  
20 bile acids.
- 21 • Dysbiosis is a risk factor that may exacerbate inflammation in genetically susceptible  
22 dogs and cats.

23 **Abstract**

24 The intestinal tracts of dogs and cats harbor a highly complex microbiota, which  
25 consists of bacteria, fungi, viruses and protozoa. Until recently, traditional bacterial culture  
26 was commonly used to identify bacteria present in the gastrointestinal tract, but it is now well  
27 recognized that standard plating techniques do not have enough resolution for identification of  
28 the mostly anaerobic bacteria that reside within the gut. Molecular methods are now  
29 established for assessing intestinal dysbiosis in dogs and cats with gastrointestinal disease, but  
30 these approaches are not yet widely available for routine diagnosis. The **loss of normal**  
31 **commensal bacterial microbiota (i.e. Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, and**

32 *Faecalibacterium* spp.) in acute and chronic intestinal diseases has been linked to metabolic  
33 changes, for example alterations in immunomodulatory bacterial metabolites, such as short  
34 chain fatty acids and secondary bile acids. This highlights the importance of dysbiosis in the  
35 pathophysiology of gastrointestinal diseases. Development of molecular based assays for  
36 specific bacterial groups, calculations of microbial dysbiosis indices and assays for microbial  
37 functional metabolites are currently underway to help assess dysbiosis. These will yield a  
38 better understanding of the pathophysiology of gastrointestinal diseases and may also lead to  
39 new diagnostic and therapeutic approaches to dysbiosis.

40

41 *Keywords:* Canine; Feline; Bile acids; Dysbiosis; Microbiome; Microbiota

42

### 43 **Introduction**

44 The intestinal microbiota is the consortium of all living microorganisms (bacteria,  
45 fungi, protozoa and viruses) that inhabit the gastrointestinal (GI) tract. Whilst the term  
46 ‘microflora’ is often used in the older literature, ‘microbiota’ (from ‘bios’, Greek: ‘life’) is the  
47 proper term. Bacteria are the most abundant microbes in the intestine (Swanson et al., 2011).  
48 Until recently, traditional bacterial culture was commonly used to identify bacteria present in  
49 the GI tract. It is now recognized that the vast majority of intestinal bacteria cannot be  
50 cultured using standard plating techniques.

51

52 There is no correlation between bacterial counts in the small intestine and disease  
53 status (German et al., 2003). Qualitative fecal culture does not yield enough resolution to  
54 characterize the complex large intestinal microbiota comprehensively. Molecular sequencing  
55 methods, mostly targeting the 16S rRNA gene, are now the recognised standard for  
56 identification of bacterial microbiota. Such approaches have demonstrated that the canine and



57 feline GI tracts harbor a highly complex microbial ecosystem, consisting of several hundred  
58 different bacterial phylotypes (Handl et al., 2011).

59

60 An estimated trillion ( $10^{12}$ - $10^{14}$ ) microbial cells are present in the GI tract, which is  
61 approximately 10 times more than the number of all host cells. Furthermore, the combined  
62 genetic pool of all intestinal bacteria outnumbers the host gene content by a factor of 100.  
63 This new insight into the complexity of the intestinal microbiota and its intimate relationship  
64 with the host has spurred research to better understand the importance of a balanced microbial  
65 ecosystem for regulation of host health and immunity. Intestinal dysbiosis can be defined as  
66 an alteration in the composition and/or richness (i.e. the number of unique bacterial species)  
67 of the intestinal microbiota. Studies in human beings and veterinary species have associated  
68 intestinal dysbiosis with various GI disorders, such as inflammatory bowel disease (IBD),  
69 granulomatous colitis and irritable bowel syndrome (IBS) (Suchodolski et al., 2012a, b;  
70 Honneffer et al., 2014; Minamoto et al., 2014).

71

72 Although it is not always clear whether dysbiosis is a cause or an effect of GI disease,  
73 there is likely to be an overlap, since inflammation will cause dysbiosis, and recent functional  
74 studies have demonstrated that dysbiosis, when present, is a risk factor that may exacerbate  
75 inflammation in genetically susceptible individuals. Therefore, reestablishment of  
76 normobiosis should be a desired treatment outcome. However, research to better define  
77 signatures of dysbiosis associated with different diseases is still at an early stage.

78

79 It is also important to note that there is an overlap in the dysbiosis patterns of many GI  
80 diseases. At this time, no specific dysbiosis signatures for GI diseases have been described  
81 that can be used diagnostically to distinguish subsets of chronic enteropathies (CE). However,

82 various dysbiosis indices and metabolic alterations currently are being evaluated, and these  
83 may have diagnostic and therapeutic utility in the future. This review will provide a brief  
84 overview of methods to assess the GI microbiota and dysbiosis, the major bacterial groups in  
85 the canine and feline GI tracts, and the role of dysbiosis in the pathophysiology of GI  
86 diseases.

87

### 88 **Assessment of microbiota and dysbiosis**

89 **There is no single gold standard for assessing the GI microbiota and dysbiosis.** Most  
90 current research is focused on evaluating the bacterial microbiota and methods have been  
91 optimized for characterization of bacteria. Since the gut microbiota is a complex and dynamic  
92 ecosystem, the **best diagnostic approach would be a combination of molecular tools that**  
93 **include PCR amplification of 16S rRNA genes using broad universal bacterial primers,**  
94 **followed by analysis of amplicons by next generation (NGS) sequencing,** direct quantification  
95 of specific bacterial taxa by quantitative PCR (qPCR) and the use of fluorescent in situ  
96 hybridization **(FISH) to visualize the translocation of bacteria into the mucosal epithelium.**  
97 Future studies will also need to incorporate measurements of bacterial metabolites, such as  
98 fecal bile acids and short chain fatty acids (SCFA), to assess microbiota function and to  
99 evaluate changes in the host immune system.

100

101 Bacterial culture can be a useful technique for detection of specific enteropathogens  
102 (e.g., *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Yersinia* spp.). Cultivation allows determination  
103 of an active infection (i.e. viability of isolated organisms), antibiotic sensitivity testing of  
104 clinical specimens and genotyping of cultured isolates for epidemiological studies. However,  
105 it is now recognized that bacterial culture is not well suited for in-depth characterization of  
106 complex environments, such as the mammalian GI tract. Since the majority of intestinal

107 bacteria cannot be cultured, this method underestimates total bacterial numbers and also does  
108 not allow identification of the majority of bacterial groups in the GI tract. Reasons for the  
109 inability to culture most bacteria include lack of knowledge regarding their optimal growth  
110 requirements and because the canine and feline GI tracts harbor predominantly anaerobic  
111 bacteria, which are fragile and prone to handling damage. It is currently estimated that less  
112 than 20% of intestinal bacteria are cultivable with standard laboratory techniques.

113

114 Molecular tools allow the identification of previously uncharacterized intestinal  
115 microbes and these techniques are also able to provide information about the functionality of  
116 the microbiome by means of metagenomics. Several methods are available and all of these  
117 approaches ideally would be used in a complementary fashion (Table 1). However, most of  
118 these methods are currently available for research only. The use of NGS of 16S rRNA genes  
119 is a useful tool to assess the intestinal microbiota, since this approach provides an overview of  
120 the proportions of all bacterial groups within the entire microbiota. Due to costs and  
121 turnaround time of results, NGS is not currently widely available for routine diagnostic use.  
122 However, it is important to note that bacterial groups with low abundance (especially  
123 pathogens) are typically present at such a low proportion of the total bacteria that they may  
124 escape identification even when high throughput techniques are employed. Therefore, for the  
125 detection or quantification of bacterial groups in low abundance, the additional use of group  
126 specific PCR primers is recommended.

127

128 It is important to note that bacterial phylotypes can possess multiple copies of the 16S  
129 rRNA gene, which can vary vastly in number amongst individual bacterial species (1-15  
130 copies of the 16S rRNA gene can be present). Therefore, qPCR results cannot be related  
131 directly to absolute bacterial cell counts. The use of FISH is currently considered to be the

132 most accurate method for quantification of bacterial groups because it is based on microscopic  
133 counts rather than amplification of DNA. However, this approach does not allow high  
134 throughput analysis of samples. A further advantage of FISH is to visualize the location of  
135 bacteria with regard to the epithelium (i.e. intracellular, adherent or invasive).

136

137 It also should be noted that molecular tools, such as 16S rRNA gene based techniques,  
138 have inherent limitations. Bias is introduced during DNA extraction, primer selection, PCR  
139 amplification and sequence analysis. As examples, insufficient cell lysis during DNA  
140 extraction can underestimate the population of Gram positive bacteria, whilst a lysis protocol  
141 that is too harsh can diminish DNA recovery from Gram negative bacteria. Some commonly  
142 used primers and PCR protocols underestimate the presence of specific bacterial groups, for  
143 example *Bifidobacterium* spp. In view of these potential biases, caution should be applied  
144 when comparing quantitative results across studies that have used different DNA extraction  
145 methods and PCR protocols.

146

147 In addition to identification of bacterial groups, a key to understanding the impact of  
148 the microbiota on GI health is to explore the functionality of the microbial community. In  
149 metagenomics, DNA is extracted from a biological sample and is then directly sequenced  
150 without prior amplification of specific genes. The results yield a snapshot of the gene pool  
151 and functional potential of the microbiome, and have been applied in dogs (Swanson et al.,  
152 2011; Barry et al., 2012). An emerging area is investigation of the role of host and bacterial  
153 metabolites in various GI disorders. This approach can improve our understanding of complex  
154 metabolic pathways, with the goal to find novel biomarkers for the etiology, progression and  
155 treatment of GI diseases. Targeted measurement of specific metabolites has already been

156 performed in veterinary medicine, for example measurements of serum concentrations of  
157 cobalamin and folate, and fecal concentrations of SCFA.

158

159 Untargeted metabolomics is a technique that provides an unbiased profile of  
160 metabolites using mass spectrometry. Several hundred metabolites can be measured in a  
161 single analysis and can be used to better understand the alterations in biochemical pathways  
162 that occur as a consequence of GI inflammation and dysbiosis (e.g. alterations in various  
163 amino acids, tryptophan pathways and bile acid dysmetabolism).

164

### 165 **Gastrointestinal microbiota of healthy dogs and cats**

166 Using traditional bacterial culture, initial studies reported that the bacterial load in the  
167 small intestine of healthy dogs ranges from  $10^2$  to  $10^5$  colony forming units (CFU)/g, with  
168 some studies observing numbers as high as  $10^9$  CFU/g (German et al., 2003). In the colon, the  
169 number of cultivable bacteria is much higher than the small intestine, ranging from  $10^8$  to  $10^{11}$   
170 CFU/g (Mentula et al., 2005). Cats consistently have higher numbers of bacteria in their  
171 duodenum than dogs (Johnston et al., 1999).

172

173 Molecular methods have enabled more detailed identification of bacteria present  
174 within the canine and feline GI tracts (Suchodolski, 2011). The small intestine harbors a  
175 mixture of aerobic and facultatively anaerobic bacteria, while the large intestine is home  
176 almost exclusively to anaerobes (Suchodolski et al., 2008a). Firmicutes, Bacteroidetes,  
177 Proteobacteria and Fusobacteria are the major bacterial phyla, constituting approximately  
178 99% of all gut microbiota in dogs and cats (Handl et al., 2011; Chaban et al., 2012).  
179 Helicobacter spp. predominate in the canine stomach, but *Actinobacillus* and *Streptococcus*  
180 spp. also can be found routinely (Garcia-Mazcorro et al., 2012). The small intestine harbors

181 predominantly *Clostridium* spp., Lactobacillales and Proteobacteria, while Clostridiales,  
182 *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp. and Fusobacteria predominate in the large intestine. In  
183 addition to differences in the composition of the microbiota along the GI tract, each animal  
184 harbors a unique microbial profile (Fig. 1) (Suchodolski et al., 2005). However, the  
185 metagenomes (i.e. functional gene content) are conserved, suggesting that functional aspects  
186 of the microbiomes are similar across individual animals (Guard et al., 2016). Mathematical  
187 algorithms can be used to combine levels of various bacterial groups that are different for  
188 each individual into one number (Fig. 1), which can be used to track the direction of changes  
189 in the microbiota in disease and in response to therapy.

190

191 Fungi and viruses also are important members of the microbiota, but their role in  
192 health and disease is still being evaluated. Based on metagenomic sequence counts, fungi  
193 make up approximately 2% of microbial cells in fecal samples (Swanson et al., 2011). Dogs  
194 and cats harbor multiple fungal species in their gut; up to 40 different phlotypes were  
195 reported in fecal samples of individual dogs (Foster et al., 2013). Therefore, we expect to find  
196 fungi occasionally on routine fecal examinations. The role of fungi in GI disease is uncertain,  
197 since no clear differences in specific phlotypes were observed when fecal samples of healthy  
198 dogs were compared with fecal samples of dogs with acute diarrhea (Foster et al., 2013) or  
199 duodenal samples of dogs with CE (Suchodolski et al., 2008b).

200

### 201 **Intestinal microbiota: Contribution to health**

202 A balanced microbial ecosystem is of crucial importance for host health, since it  
203 provides stimuli for the immune system, helps in the defense against enteropathogens and  
204 provides nutritional benefits. The presence of bacteria is also important for proper  
205 development of gut structure, since germ-free (gnotobiotic) mice have an altered epithelial

206 architecture. An emerging research area is understanding how microbiota modulate host  
207 health and disease. Several studies have described the intestinal microbiota and its functional  
208 gene pool (metagenome) in dogs and cats (Swanson et al., 2011; Barry et al., 2012; Guard et  
209 al., 2015; Minamoto et al., 2015). The interactions between intestinal bacteria and the host  
210 immune system are mediated either via direct contact between bacteria and the innate immune  
211 system (e.g. Toll-like receptors, NOD2 receptors) or through microbial metabolites. These  
212 metabolites can be produced directly by bacteria (e.g. vitamins, short chain fatty acids), or are  
213 primary host metabolites that are converted through bacterial enzymes into secondary  
214 metabolites (e.g. conversion of primary to secondary bile acids).

215

216 Bile acids are an excellent example of the close interactions between the gut  
217 microbiota and the host. Only gut bacteria can convert primary bile acids that enter the colon  
218 into secondary bile acids. The optimal ratio of primary to secondary bile acids is considered to  
219 be an important regulator of gut homeostasis, since they downregulate inflammation, inhibit  
220 germination of *C. difficile* spores, and modulate insulin and glucose metabolism through  
221 activation of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (Pavlidis et al., 2015). Gut dysbiosis leads to  
222 bile acid alterations, with potential negative metabolic consequences for the host (Duboc et  
223 al., 2013).

224

225 The bacterial phylum Firmicutes, a major constituent of intestinal microbiota,  
226 comprises many phylogenetically distinct bacterial groups, the so called *Clostridium* clusters.  
227 These groups (e.g. *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* and *Dorea* spp.), together with  
228 Bacteroidetes and Actinobacteria (i.e. *Bifidobacterium* spp.) are believed to be important  
229 producers of metabolites that have a direct beneficial impact on host health (Table 2). As  
230 examples, nutrient sources for bacteria are complex carbohydrates (e.g. starch, cellulose,

231 pectin and inulin) and fermentation of these substrates results mainly in the production of  
232 SCFA (e.g. acetate, propionate and butyrate). These act as energy sources for the host,  
233 regulate intestinal motility and are important growth factors for epithelial cells. SCFA also  
234 have anti-inflammatory properties, since they induce immunoregulatory T cells (T<sub>reg</sub>) (Arpaia  
235 et al., 2013). Other bacterial metabolites, such as secondary bile acids and indole (a byproduct  
236 of tryptophan degradation), are also anti-inflammatory, thereby maintaining immune  
237 homeostasis and strengthening intestinal barrier function (Bansal et al., 2010; Duboc et al.,  
238 2013).

239

#### 240 **The role of intestinal dysbiosis in the pathophysiology of gastrointestinal diseases**

241 Some reasons for the development of dysbiosis are summarized in Table 3. Disease  
242 processes may be associated with changes in microbiota function (e.g. reduced production of  
243 SCFA and other metabolites, and an altered bacterial enzyme pool) rather than shifts in  
244 microbiota composition. These functional or immunological alterations are not readily  
245 detected, since we are still not able to properly assess the entire microbiota and its functions.  
246 The microbiota varies along the GI tract, and there are also clear differences between mucosal  
247 and luminal microbiota (Suchodolski et al., 2004, 2005; Manchester et al., 2013; White,  
248 2015). Furthermore, it is almost impossible to properly assess the entire interactions between  
249 the microbiota and the host immune system (Kathrani et al., 2012). Since these inaccessible  
250 factors are likely to play a crucial role in the intricate communication between bacteria and  
251 the host immune system, crude assessment of bacterial changes in intestinal samples most  
252 often does not reveal the entire disease process. Nevertheless, much progress has been made  
253 in characterizing intestinal dysbiosis in GI diseases, and metabolomics have also provided  
254 insights into the functional consequences of dysbiosis and its role in the pathophysiology of  
255 some GI disorders in human beings (Duboc et al., 2013) and dogs (Honneffer et al., 2015).



256

257 *Intestinal microbiota in acute and chronic enteropathies*

258 Dysbiosis has been described in dogs with GI diseases (e.g. IBD and acute diarrhea),

259 in cats with CE, and in dogs and cats infected with *Giardia duodenalis* (Suchodolski et al.,

260 2012b, 2015; Guard et al., 2015; Minamoto et al., 2015; Slapeta et al., 2015). In human and

261 canine IBD, there are increases in the proportions of bacterial genera belonging to

262 Proteobacteria (e.g. *Escherichia coli*, *Diaphorobacter* spp.) and decreases in Fusobacteria,263 Bacteroidetes, and members of the Firmicutes (e.g. *Faecalibacterium* spp., Ruminococcaceae,264 *Turicibacter* spp., *Blautia* spp.). These changes have been observed in the duodenum

265 (Suchodolski et al., 2010, 2012a; Xenoulis et al., 2008) and in fecal samples (Suchodolski et

266 al., 2012b; Honneffer et al., 2014; Minamoto et al., 2014, 2015) of dogs with IBD. This

267 indicates that, despite differences in microbial composition along the GI tract, dysbiosis due

268 to a disease process in the small intestine can be identified in fecal samples. The dysbiosis in

269 the duodenum was correlated with the severity of histopathological scores, but not with

270 clinical disease severity, i.e. clinical IBD activity index (CIBDAI) (Suchodolski et al., 2012a).

271 Generally, there is similarity in the patterns of dysbiosis observed in chronic versus acute

272 diarrhea, but some notable differences have been described. As an example, in fecal samples

273 of dogs with acute hemorrhagic diarrhea, substantial increases in the populations of

274 *Clostridium perfringens* and Fusobacteria have been reported (Suchodolski et al., 2012b). In275 contrast, the latter taxon is typically decreased in feces of dogs with IBD. An increase in *C.*276 *perfringens* or its detection in fecal samples of dogs with diarrhea is commonly believed to be277 causative. However, a recent study would suggest that *C. perfringens* overgrowth occurs as an

278 effect of intestinal dysbiosis and the loss of normal microbiota in chronic diarrhea (Minamoto

279 et al., 2014). The role of *C. perfringens* enterotoxin has also been questioned in acute diarrhea280 (Busch et al., 2015). A novel pore forming toxin (*netF*) has been recently identified in a

281 subset of dogs with canine hemorrhagic diarrhea (Mehdizadeh Gohari et al., 2015); this may  
282 be a focus of future diagnostic testing.

283

284 Cats with IBD had increased duodenal counts of Enterobacteriaceae, as assessed by  
285 fluorescence in situ hybridization (FISH); these counts were positively correlated with  
286 changes in mucosal architecture and the density of cellular infiltrates (Janeczko et al., 2008).  
287 Less is known about fecal dysbiosis in cats with IBD, since only two studies have evaluated  
288 the fecal microbiota of cats with confirmed IBD, using FISH to identify individual bacterial  
289 groups rather than sequencing. One study identified an increase in *Desulfovibrio* spp. in cats  
290 with IBD (Inness et al., 2007), while the second study did not find any differences between  
291 healthy cats and cats with IBD (Abecia, 2010). In a study utilizing 16S rRNA sequencing in  
292 cats with acute and CE, but with no clear diagnosis, cats with chronic diarrhea had decreased  
293 proportions of Bacteroidetes, *Faecalibacterium* spp. and *Turicibacter* spp., and increased  
294 proportions of Enterobacteriaceae, similar to dogs with IBD (Suchodolski et al., 2015).

295

296 The above studies have clearly identified duodenal and fecal dysbiosis in dogs with  
297 IBD. At the present time, no studies have evaluated whether dysbiosis patterns differ between  
298 the various forms of CE, food responsive enteropathy (FRE), antibiotic responsive  
299 enteropathy (ARE) and IBD. Long term follow-up studies are needed to examine whether the  
300 changes in microbiota revert with clinical remission. Initial studies have reported that the GI  
301 microbiota and serum metabolome undergo only minor normalization after 3 weeks  
302 (Minamoto et al., 2015; Fig. 1) or 8 weeks of therapy (Rossi et al., 2014), even if dogs show  
303 improvement in CIBDAI scores. This suggests that the microbiota remains altered due to the  
304 underlying disease or the residual histological inflammation present in the intestine (Rossi et  
305 al., 2014), which typically does not fully resolve in this time frame. Further studies are needed

306 to correlate the long term outcome of affected animals (i.e. rate of clinical relapse) with the  
307 dynamics of dysbiosis.

308

309 Dysbiosis, including clinical signs associated with changes in the microbiota, can also  
310 be induced by administration of antimicrobial agents. Some broad spectrum antimicrobial  
311 agents, such as metronidazole, induce major changes in bacterial taxa; these changes resemble  
312 the dysbiosis patterns that are observed in CE (Minamoto et al., 2014, 2015). Therefore,  
313 administration of antibiotics to healthy dogs may cause changes that mimic the dysbiosis seen  
314 in chronic GI disease. Continued administration of antibiotics during therapy may lead to the  
315 false impression on follow-up samples that the dysbiosis is persistent due to GI disease,  
316 whereas the changes may be attributable to antimicrobial treatment. In cases where antibiotics  
317 are administered chronically, serial evaluation of dysbiosis should be interpreted with care.

318

### 319 *Functional consequences of dysbiosis in chronic enteropathies*

320 A dysbiotic microbiome may be directly deleterious to the host or the depletion of  
321 resident microbiota may lead to reductions in anti-inflammatory metabolites. Therefore,  
322 proper characterization of dysbiosis is desirable to enable a better understanding of the disease  
323 process in animals with GI disease and to guide treatment decisions. Changes in microbiota  
324 result in functional and immunological consequences for the host, but the extent of these  
325 changes will depend on the magnitude and the pattern of dysbiosis (i.e. which bacterial groups  
326 are altered) and the location of dysbiosis (small versus large intestine). A better understanding  
327 of these phylogenetic and functional consequences may result in a better understanding of  
328 disease pathogenesis.

329

330 Bacteria in the small intestine reside in a very delicate relationship with the host, since  
331 many are adherent to the mucosa and, therefore, are important stimulants of mucosal  
332 immunity. Sudden dietary changes, including dietary indiscretion, and changes in the  
333 architecture of the intestine, with subsequent changes in intestinal motility (e.g. surgical  
334 creation of intestinal loops, short bowel syndrome and resection of the ileocolic valve) may  
335 lead to changes in bacterial populations. Exocrine pancreatic insufficiency (EPI) has been  
336 associated with an increase in total bacterial counts in the duodenum of dogs (Simpson et al.,  
337 1990). Subtle changes in microbiota composition may have significant effects on the immune  
338 response of the host. The microbiota may also compete with the host for nutrients and may  
339 produce deleterious metabolites. Small intestinal microbiota, especially *Lactobacillus* spp.  
340 and *Clostridium* spp. (*C. hiranonis* and *C. scindens*) deconjugate bile acids; an abnormal  
341 microbial composition may impair fat absorption. Other abnormal functions may be the  
342 dehydroxylation of fatty acids, destruction of brush border enzymes, damage of carrier  
343 proteins and competition for nutrients (e.g. vitamin B12). Enterotoxins produced by  
344 pathogenic bacteria can stimulate mucosal fluid secretions, while villous effacement and loss  
345 of surface area will diminish mucosal absorptive capacity, resulting in diarrhea. A dysfunction  
346 of the mucosal barrier can lead to an increase in intestinal permeability and clinically  
347 significant bacterial translocation.

348

349 Dysbiosis that occurs in the large intestine is typically associated with decreases in the  
350 major abundant bacterial taxa (e.g. *Blautia* spp., *Faecalibacterium* spp., Ruminococcaceae  
351 and *Turicibacter* spp.; Fig. 1), which produce SCFA, indoles and other immunomodulatory  
352 metabolites. Therefore, major effects on host metabolism are expected. Consequently,  
353 decreased abundances of Ruminococcaceae and *Faecalibacterium* spp. were correlated with  
354 decreased fecal propionate and increased fecal butyrate concentrations in dogs with acute

355 diarrhea (Guard et al., 2015) and IBD (Minamoto et al., 2015). Dogs with acute diarrhea also  
356 had changes in the tryptophan pathway, as indicated by decreased urine concentrations of 2-  
357 methyl indole and 5-methoxy-1H-indole-3-carbaldehyde, and decreased serum kynurenic acid  
358 (a catabolite of kynurenine and tryptophan), as well as a decreased ratio of tryptophan to  
359 kynurenic acid (Guard et al., 2015).

360

361 Dogs with IBD had an altered global profile in serum metabolites compared to healthy  
362 dogs, with significant increases in oxidative stress pathways (Minamoto et al., 2015).

363 Furthermore, the predicted fecal metagenome was consistent with decreased amino acid  
364 metabolism, suggesting that the microbiota of dogs with IBD is involved in dysfunctional  
365 protein metabolism. Studies employing untargeted metabolomics have associated fecal  
366 dysbiosis with reductions in immunomodulatory secondary bile acids in human beings  
367 (Duboc et al., 2013) and dogs (Honneffer et al., 2015), and tryptophan-indole pathways in  
368 dogs (Guard et al., 2015). Depletion of commensal groups (heat map in Fig. 1) and their  
369 respective immunoregulatory metabolites may impair the ability of the host to down-regulate  
370 the aberrant intestinal immune response; thus, dysbiosis becomes a component of the  
371 pathophysiology of the chronic disease process.

372

373 Recent epidemiological studies in human beings have revealed that dysbiosis caused  
374 by administration of drugs (e.g. antibiotics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, gastric  
375 acid suppressants) is an important risk factor for some chronic diseases. Early exposure to  
376 antibiotics in childhood is associated with development of allergies (Metsala et al., 2015) and  
377 obesity (Saari et al., 2015), presumably due to antibiotic induced dysbiosis. Reduced diversity  
378 of the gut microbiota at the time of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is a risk  
379 factor for higher mortality outcomes (Taur et al., 2015). These initial data in human beings,

380 combined with our better understanding of the immunomodulatory properties of the gut  
381 microbiota, suggest that proper diagnosis and correction of dysbiosis will become an  
382 important therapeutic goal. This could include the use of highly digestible diets and/or  
383 prebiotics, probiotic therapy and antimicrobial agents. However, not enough clinical data is  
384 currently available to make recommendations as to which dysbiosis patterns will respond best  
385 to which therapy.

386

### 387 *Chronic enteropathies associated with mucosally invasive bacteria*

388 Granulomatous colitis, sometimes designated histiocytic ulcerative colitis, is a specific  
389 form of CE, which responds to antibiotics and has been associated with mucosal infiltration of  
390 invasive and adherent *E. coli* in the colon. Young Boxer dogs (typically <4 years of age) are  
391 affected most frequently and a genetic susceptibility has been proposed for this breed.  
392 However, other dog breeds, especially young French Bulldogs, may be affected. The  
393 predisposition of these dogs to *E. coli* associated granulomatous colitis suggests they harbor a  
394 genetic defect that impairs their ability to eliminate invasive *E. coli*. In situ analysis of  
395 mucosal biopsies from dogs with granulomatous colitis using FISH probes against *E. coli*  
396 demonstrates multifocal clusters of invasive bacteria within macrophages in the intestinal  
397 mucosa. Therapy with antibiotics (i.e. enrofloxacin) for 8 weeks correlates with remission  
398 from disease (Manchester et al., 2013).

399

### 400 *Small intestinal dysbiosis: Antibiotic responsive diarrhea*

401 In human beings, small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) is defined as an  
402 increased bacterial count in the small intestine (Johnston, 1999). In dogs, the existence of a  
403 similar syndrome is currently under debate. Early studies found increased bacterial counts in  
404 dogs with diarrhea compared to healthy dogs and the authors of this study defined SIBO as

405  $>10^4$  anaerobic bacteria or  $>10^5$  total CFU/mL in fasting duodenal juice (Batt et al., 1983;  
406 Rutgers et al., 1995, 1996). However, substantially higher bacterial counts in duodenal  
407 aspirates of healthy dogs have been found in subsequent studies (German et al., 2003).  
408 Furthermore, there was no correlation between the number of bacteria in the duodenum and  
409 clinical signs in dogs with CE (German et al., 2003).

410

411 Since this syndrome responds to antibiotic treatment, some authors are using the term  
412 antibiotic responsive diarrhea (ARD) (Hall, 2011). Also, a subgroup of dogs with antibiotic  
413 responsive diarrhea has been reported that is responsive specifically to tylosin; the term  
414 tylosin responsive diarrhea (TRD) has been proposed for this subgroup (Westermarck et al.,  
415 2005). Currently, no diagnostic work-up is available that would allow a better definition of  
416 these subgroups. It is not clear whether these dogs have the same syndrome or whether  
417 subgroups exist that could be classified as small intestinal bacterial overgrowth, small  
418 intestinal dysbiosis (SID), tylosin responsive diarrhea or generally as antibiotic responsive  
419 diarrhea (ARD). It is important to note that disorders caused by potentially pathogenic  
420 bacteria, such as *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., enterotoxigenic *Clostridium*  
421 *perfringens* and *C. difficile* are not included in this syndrome. Whilst healthy cats appear to  
422 have much higher duodenal bacterial counts than healthy dogs, and these numbers do not  
423 differ from cats with enteropathies (Johnston et al., 1993), there appears to be a subset of cats  
424 with CE that favorably responds to antibiotic administration.

425

426 Several physiological mechanisms regulate bacterial colonization in the small  
427 intestine. These include secretion of gastric acid and antibacterial factors (i.e. pancreatic and  
428 biliary secretions), and intestinal motility. Abnormalities in one or more of these control  
429 mechanisms may lead to small intestinal dysbiosis, resulting in clinical signs. As an example,

430 dogs that received gastric acid suppressant therapy with a proton pump inhibitor exhibited  
431 alterations in the gastric and small intestinal microbiota (Garcia-Mazcorro et al., 2012).  
432 Pancreatic juice contains antimicrobial substances and dogs with EPI have significantly  
433 increased bacterial counts in the small intestine (Westermarck et al., 1993). This is associated  
434 with a poor response to pancreatic enzyme replacement therapy. The formation of blind and  
435 stagnant small intestinal loops is a common reason for bacterial overgrowth in humans, which  
436 may lead to signs of chronic GI disease.

437

438 Certain canine breeds, such as the German shepherd and Chinese Shar-Pei, appear to  
439 be predisposed to ARE. A genetic susceptibility for a dysregulation in the cell mediated  
440 immune response to normal luminal microorganisms is suspected in these dogs. IgA  
441 deficiency as an underlying risk factor has not been confirmed. The histopathology in German  
442 shepherds and other dogs with antibiotic responsive diarrhea typically is reported as normal to  
443 mild lymphocytic-plasmacytic IBD. However, recent studies have reported an abnormal  
444 response in innate immunity (altered Toll-like receptor expression) in German shepherds,  
445 which may lead to hyper-responsiveness to bacterial flagellin in the small intestine (Kathrani  
446 et al., 2012).

447

448 It is difficult to diagnose SID/ARD definitively. Duodenal culture is not useful and  
449 molecular studies have not been reported. Therefore, it is unclear which bacterial groups are  
450 altered. A tentative diagnosis can be made on the basis of clinical signs, altered serum  
451 cobalamin and folate concentrations, and by an antibiotic therapeutic trial. However, since  
452 diseases due to undetected intestinal pathogens may respond to antibiotic therapy, a positive  
453 response to therapy does not necessarily confirm the presence of small intestinal dysbiosis.  
454 Differential diagnoses, such as parasites, bacterial pathogens, maldigestion due to EPI, IBD,



455 intestinal lymphoma, lymphangiectasia and food intolerance should be ruled out.

456 Histopathological assessment of small intestinal biopsies is often unremarkable. However,  
457 occasionally villous atrophy or fusion has been reported. Affected animals also should be  
458 evaluated for underlying factors, such as anatomical abnormalities.

459

460 *Serum cobalamin and folate concentrations*

461 Serum cobalamin concentrations may be decreased and serum folate concentrations  
462 may be increased in dogs with SID/ARD. Changes in the small intestinal microbiota may lead  
463 to increased bacterial utilization of cobalamin, resulting in decreased absorption of cobalamin  
464 by the ileum. Bacteria in the distal small and large intestines produce folic acid, but folate  
465 absorption via carriers takes place in the proximal small intestine. When folate producing  
466 bacteria accumulate in the proximal small intestine, an increased amount of bacterial folate  
467 will be absorbed by the host, resulting in an increased serum folate concentration. However,  
468 cobalamin and folate uptake from the small intestine is highly complex and can be affected by  
469 several mechanisms; therefore, alterations are not highly specific for SID/ARD. A diet high in  
470 folate may lead to increased serum folate concentrations independent of disease.

471 Inflammation of the ileum may damage cobalamin receptors and thus may lead to cobalamin  
472 malabsorption. Dogs with EPI have decreased secretion of antibacterial products, with  
473 subsequent small intestinal bacterial overgrowth (Simpson et al., 1989). As a consequence,  
474 dogs with EPI often have increased serum folate concentrations. Thus, in dogs with an  
475 abnormal serum concentration of cobalamin and/or folate, serum trypsin-like  
476 immunoreactivity (TLI) should be evaluated to rule out EPI.

477

478 Contrary to expectations, administration of tylosin does not lead to a decrease in  
479 serum folate or an increase in serum cobalamin concentration (Ruaux et al., 2005). Therefore,

480 serum folate concentrations may not reflect therapeutic success and serum folate  
481 concentrations should always be evaluated together with the clinical findings. When both  
482 serum cobalamin and folate concentrations are altered, this is suggestive of SID, but both  
483 have a relatively low sensitivity and specificity for the diagnosis of SID; the reported  
484 sensitivity of serum cobalamin concentration for a diagnosis is 25-55% and for serum folate  
485 concentration is 50-66% (German et al., 2003).

486

## 487 **Conclusions**

488 We are still at an early stage in understanding the complexity of the intestinal  
489 microbiota and the metabolic consequences of dysbiosis in GI disease. Recent functional  
490 studies have clearly linked dysbiosis with a range of diseases in dogs and cats. However, at  
491 this time, not enough clinical data is available to be able make recommendations as to which  
492 dysbiosis patterns will respond best to a specific therapy and affected animals need to be  
493 treated based on the entire clinical picture. While in some animals the use of antimicrobial  
494 agents is useful (e.g. animals with ARD), their use may exacerbate dysbiosis in other GI  
495 diseases that do not respond to antibiotics. Therefore, more clinical studies combining results  
496 from phylogenetic and functional microbiota analysis are required to better define the various  
497 signatures and therapeutic approaches to dysbiosis.

498

## 499 **Conflict of interest statement**

500 The author is employed by the Gastrointestinal Laboratory at Texas A&M University,  
501 which offers gastrointestinal function testing on a fee-for-service base.

502

## 503 **References**

504 Abecia, L., Hoyles, L., Khoo, C., Frantz, N., McCartney, A. L., 2010. Effects of a novel  
505 galactooligosaccharide on the faecal microbiota of healthy and inflammatory bowel

- 506 disease cats during a randomized, double-blind, cross-over feeding study. *International*  
507 *Journal of Probiotics and Prebiotics* 5, 61.
- 508
- 509 Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veecken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross,  
510 J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J., et al., 2013. Metabolites produced by commensal  
511 bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504, 451-455.
- 512
- 513 Bansal, T., Alaniz, R.C., Wood, T.K., Jayaraman, A., 2010. The bacterial signal indole  
514 increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of  
515 inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*  
516 *of America* 107, 228-233.
- 517
- 518 Barry, K.A., Middelbos, I.S., Vester Boler, B.M., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Henrissat,  
519 B., Coutinho, P.M., White, B.A., Fahey, G.C., Jr., Swanson, K.S., 2012. Effects of  
520 dietary fiber on the feline gastrointestinal metagenome. *Journal of Proteome Research*  
521 11, 5924-5933.
- 522
- 523 Batt, R.M., Needham, J.R., Carter, M.W., 1983. Bacterial overgrowth associated with a  
524 naturally occurring enteropathy in the German shepherd dog. *Research in Veterinary*  
525 *Science* 35, 42-46.
- 526
- 527 Busch, K., Suchodolski, J.S., Kuhner, K.A., Minamoto, Y., Steiner, J.M., Mueller, R.S.,  
528 Hartmann, K., Unterer, S., 2015. *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium*  
529 *difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in  
530 dogs. *Veterinary Record* 176, 253.
- 531
- 532 Chaban, B., Links, M.G., Hill, J.E., 2012. A molecular enrichment strategy based on *cpn60*  
533 for detection of epsilon-proteobacteria in the dog fecal microbiome. *Microbial*  
534 *Ecology* 63, 348-357.
- 535
- 536 Craven, M., Mansfield, C.S., Simpson, K.W., 2011. Granulomatous colitis of Boxer dogs.  
537 *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 41, 433-445.
- 538
- 539 Duboc, H., Rajca, S., Rainteau, D., Benarous, D., Maubert, M.A., Quervain, E., Thomas, G.,  
540 Barbu, V., Humbert, L., Despras, G., et al., 2013. Connecting dysbiosis, bile-acid  
541 dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 62, 531-  
542 539.
- 543
- 544 Foster, M.L., Dowd, S.E., Stephenson, C., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2013.  
545 Characterization of the fungal microbiome (mycobiome) in fecal samples from dogs.  
546 *Veterinary Medicine International* 2013, 658373.
- 547
- 548 Garcia-Mazcorro, J.F., Suchodolski, J.S., Jones, K.R., Clark-Price, S.C., Dowd, S.E.,  
549 Minamoto, Y., Markel, M., Steiner, J.M., Dossin, O., 2012. Effect of the proton pump  
550 inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs.  
551 *FEMS Microbiology Ecology* 80, 624-636.
- 552
- 553 German, A.J., Day, M.J., Ruaux, C.G., Steiner, J.M., Williams, D.A., Hall, E.J., 2003.  
554 Comparison of direct and indirect tests for small intestinal bacterial overgrowth and

- 555 antibiotic-responsive diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17, 33-  
556 43.
- 557
- 558 Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L.A., Vazquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B.,  
559 Schwager, E., Knights, D., Song, S.J., Yassour, M., et al., 2014. The treatment-naive  
560 microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host and Microbe* 15, 382-392.
- 561
- 562 Guard, B.C., Barr, J.W., Reddivari, L., Klemashevich, C., Jayaraman, A., Steiner, J.M.,  
563 Vanamala, J., Suchodolski, J.S., 2015. Characterization of microbial dysbiosis and  
564 metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PloS One* 10, e0127259.
- 565
- 566 Guard, B.C., Suchodolski, J.S., 2016. Canine intestinal microbiology and metagenomics: From  
567 phylogeny to function. *Journal of Animal Science* doi:10.2527/jas2015-0029.
- 568
- 569 Hall, E.J., 2011. Antibiotic-responsive diarrhea in small animals. *Veterinary Clinics of North*  
570 *America: Small Animal Practice* 41, 273-286.
- 571
- 572 Handl, S., Dowd, S.E., Garcia-Mazcorro, J.F., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2011. Massive  
573 parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and  
574 fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiology Ecology* 76, 301-  
575 310.
- 576
- 577 Honneffer, J., Guard, B., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2015. Untargeted metabolomics  
578 reveals disruption within bile acid, cholesterol, and tryptophan metabolic pathways in  
579 dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Proceedings of the 46th Annual*  
580 *Digestive Disease*, Washington, DC, USA, 16-19 May 2015. *Gastroenterology* 148  
581 (Suppl. 1), S-715 (Abstract Mo1805).
- 582
- 583 Honneffer, J.B., Minamoto, Y., Suchodolski, J.S., 2014. Microbiota alterations in acute and  
584 chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World Journal of*  
585 *Gastroenterology* 20, 16489-16497.
- 586
- 587 Inness, V.L., McCartney, A.L., Khoo, C., Gross, K.L., Gibson, G.R., 2007. Molecular  
588 characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats  
589 using fluorescence in situ hybridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp.  
590 *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition* 91, 48-53.
- 591
- 592 Janeczko, S., Atwater, D., Bogel, E., Greiter-Wilke, A., Gerold, A., Baumgart, M., Bender,  
593 H., McDonough, P.L., McDonough, S.P., Goldstein, R.E., et al., 2008. The  
594 relationship of mucosal bacteria to duodenal histopathology, cytokine mRNA, and  
595 clinical disease activity in cats with inflammatory bowel disease. *Veterinary*  
596 *Microbiology* 128, 178-193.
- 597
- 598 Johnston, K.L., 1999. Small intestinal bacterial overgrowth. *Veterinary Clinics of North*  
599 *America: Small Animal Practice* 29, 523-550.
- 600
- 601 Johnston, K.L., Lamport, A., Balleve, O., Batt, R.M., 1999. A comparison of endoscopic and  
602 surgical collection procedures for the analysis of the bacterial flora in duodenal fluid  
603 from cats. *The Veterinary Journal* 157, 85-89.
- 604

- 605 Johnston, K.L., Lamport, A., Batt, R.M., 1993. An unexpected bacterial flora in the proximal  
606 small intestine of normal cats. *Veterinary Record* 132, 362-363.  
607
- 608 Kathrani, A., Holder, A., Catchpole, B., Alvarez, L., Simpson, K., Werling, D., Allenspach,  
609 K., 2012. TLR5 risk-associated haplotype for canine inflammatory bowel disease  
610 confers hyper-responsiveness to flagellin. *PloS One* 7, e30117.  
611
- 612 Manchester, A.C., Hill, S., Sabatino, B., Armentano, R., Carroll, M., Kessler, B., Miller, M.,  
613 Dogan, B., McDonough, S.P., Simpson, K.W., 2013. Association between  
614 granulomatous colitis in French bulldogs and invasive *Escherichia coli* and response  
615 to fluoroquinolone antimicrobials. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27, 56-61.  
616
- 617 Mehdizadeh Gohari, I., Parreira, V.R., Nowell, V.J., Nicholson, V.M., Oliphant, K., Prescott,  
618 J.F., 2015. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated  
619 with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing  
620 enterocolitis. *PloS One* 10, e0122684.  
621
- 622 Mentula, S., Harmoinen, J., Heikkila, M., Westermarck, E., Rautio, M., Huovinen, P.,  
623 Kononen, E., 2005. Comparison between cultured small-intestinal and fecal  
624 microbiotas in Beagle dogs. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4169-4175.  
625
- 626 Metsala, J., Lundqvist, A., Virta, L.J., Kaila, M., Gissler, M., Virtanen, S.M., 2015. Prenatal  
627 and post-natal exposure to antibiotics and risk of asthma in childhood. *Clinical and*  
628 *Experimental Allergy* 45, 137-145.  
629
- 630 Minamoto, Y., Dhanani, N., Markel, M.E., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2014. Prevalence  
631 of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal  
632 samples of dogs with diarrhea. *Veterinary Microbiology* 174, 463-473.  
633
- 634 Minamoto, Y., Otoni, C.C., Steelman, S.M., Buyukleblebici, O., Steiner, J.M., Jergens, A.E.,  
635 Suchodolski, J.S., 2015. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite  
636 profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 6, 33-47.  
637
- 638 Pavlidis, P., Powell, N., Vincent, R.P., Ehrlich, D., Bjarnason, I., Hayee, B., 2015. Bile acids  
639 and intestinal inflammation-luminal aggressors or regulators of mucosal defence?  
640 *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 42, 802-817.  
641
- 642 Rossi, G., Pengo, G., Caldin, M., Palumbo Piccionello, A., Steiner, J.M., Cohen, N.D.,  
643 Jergens, A.E., Suchodolski, J.S., 2014. Comparison of microbiological, histological,  
644 and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination  
645 therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with  
646 idiopathic inflammatory bowel disease. *PloS One* 9, e94699.  
647
- 648 Ruaux, C.G., Suchodolski, J.S., Berghoff, N., Fetz, K., Stoll, A., Tress, U., Steiner, J.M.,  
649 Williams, D.A., 2005. Alterations in markers assessing the canine small intestinal  
650 microflora in response to altered housing and tylosin administration. *Journal of*  
651 *Veterinary Internal Medicine* 19, 441 (Abstract).  
652

- 653 Rutgers, H.C., Batt, R.M., Elwood, C.M., Lamport, A., 1995. Small-intestinal bacterial  
654 overgrowth in dogs with chronic intestinal disease. *Journal of the American Veterinary*  
655 *Medical Association* 206, 187-193.  
656
- 657 Rutgers, H.C., Batt, R.M., Proud, F.J., Sorensen, S.H., Elwood, C.M., Petrie, G.,  
658 Matthewman, L.A., Forster-van Hijfte, M.A., Boswood, A., Entwistle, M., et al., 1996.  
659 Intestinal permeability and function in dogs with small intestinal bacterial overgrowth.  
660 *Journal of Small Animal Practice* 37, 428-434.  
661
- 662 Saari, A., Virta, L.J., Sankilampi, U., Dunkel, L., Saxen, H., 2015. Antibiotic exposure in  
663 infancy and risk of being overweight in the first 24 months of life. *Pediatrics* 135, 617-  
664 626.  
665
- 666 Simpson, K.W., Morton, D.B., Batt, R.M., 1989. Effect of exocrine pancreatic insufficiency  
667 on cobalamin absorption in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 50, 1233-  
668 1236.  
669
- 670 Slapeta, J., Dowd, S.E., Alanazi, A.D., Westman, M.E., Brown, G.K., 2015. Differences in  
671 the faecal microbiome of non-diarrhoeic clinically healthy dogs and cats associated  
672 with *Giardia duodenalis* infection: Impact of hookworms and coccidia. *International*  
673 *Journal for Parasitology* 45, 585-594.  
674
- 675 Suchodolski, J.S., 2011. Intestinal microbiota of dogs and cats: A bigger world than we  
676 thought. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 41, 261-272.  
677
- 678 Suchodolski, J.S., Camacho, J., Steiner, J.M., 2008a. Analysis of bacterial diversity in the  
679 canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene  
680 analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 567-578.  
681
- 682 Suchodolski, J.S., Dowd, S.E., Wilke, V., Steiner, J.M., Jergens, A.E., 2012a. 16S rRNA gene  
683 pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the duodenum of dogs with idiopathic  
684 inflammatory bowel disease. *PloS One* 7, e39333.  
685
- 686 Suchodolski, J.S., Foster, M.L., Sohail, M.U., Leutenegger, C., Queen, E.V., Steiner, J.M.,  
687 Marks, S.L., 2015. The fecal microbiome in cats with diarrhea. *PloS One* 10,  
688 e0127378.  
689
- 690 Suchodolski, J.S., Markel, M.E., Garcia-Mazcorro, J.F., Unterer, S., Heilmann, R.M., Dowd,  
691 S.E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E.M., et al., 2012b. The fecal  
692 microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease.  
693 *PloS One* 7, e51907.  
694
- 695 Suchodolski, J.S., Morris, E.K., Allenspach, K., Jergens, A.E., Harmoinen, J.A.,  
696 Westermarck, E., Steiner, J.M., 2008b. Prevalence and identification of fungal DNA in  
697 the small intestine of healthy dogs and dogs with chronic enteropathies. *Veterinary*  
698 *Microbiology* 132, 379-388.  
699
- 700 Suchodolski, J.S., Ruaux, C.G., Steiner, J.M., Fetz, K., Williams, D.A., 2004. Application of  
701 molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial  
702 diversity in dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 4702-4708.

- 703  
704 Suchodolski, J.S., Ruaux, C.G., Steiner, J.M., Fetz, K., Williams, D.A., 2005. Assessment of  
705 the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal  
706 tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *American Journal of*  
707 *Veterinary Research* 66, 1556-1562.
- 708  
709 Suchodolski, J.S., Xenoulis, P.G., Paddock, C.G., Steiner, J.M., Jergens, A.E., 2010.  
710 Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with  
711 idiopathic inflammatory bowel disease. *Veterinary Microbiology* 142, 394-400.  
712
- 713 Swanson, K.S., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Middelbos, I.S., Vester, B.M., Barry, K.A.,  
714 Nelson, K.E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P.M., et al., 2011. Phylogenetic  
715 and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals  
716 similarities with humans and mice. *ISME journal* 5, 639-649.  
717
- 718 Taur, Y., Jenq, R.R., Ubeda, C., van den Brink, M., Pamer, E.G., 2015. Role of intestinal  
719 microbiota in transplantation outcomes. *Best Practice and Research. Clinical*  
720 *Haematology* 28, 155-161.  
721
- 722 Westermarck, E., Myllys, V., Aho, M., 1993. Effect of treatment on the jejunal and colonic  
723 bacterial flora of dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *Journal of Veterinary*  
724 *Internal Medicine* 8, 559-562.  
725
- 726 Westermarck, E., Skrzypczak, T., Harmoinen, J., Steiner, J.M., Ruaux, C.G., Williams, D.A.,  
727 Eerola, E., Sundboeck, P., Rinkinen, M., 2005. Tylosin-responsive chronic diarrhea in  
728 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, 177-186.  
729
- 730 White, R.S., G.; Atherly, T.; Webb, C.; Hill, S; Steiner, J.M.; Suchodolski, J.S.; Jergens, A.E.,  
731 2015. Effect of VSL#3 probiotic strains on the intestinal microbiota in canine  
732 inflammatory bowel disease. *Research Communications of the 24th European College*  
733 *of Veterinary Internal Medicine-Companion Animals (ECVIM-CA) Congress,*  
734 *Rheingoldhalle, Mainz, Germany, 4-6 September 2014. Journal of Veterinary Internal*  
735 *Medicine* 29, 433 (Abstract ESCG-O-2).  
736
- 737 Xenoulis, P.G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J.M., Van House, A.M., Suchodolski,  
738 J.S., 2008. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities  
739 imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS*  
740 *Microbiology Ecology* 66, 579-589.  
741

742 **Figure legend**

743

744 Fig. 1. Dysbiosis in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease (IBD) before and after 3  
745 weeks of therapy. This figure demonstrates how the same data can be illustrated by a heat  
746 map and various mathematical algorithms that take into account the bacterial composition  
747 within each fecal sample. Fecal DNA is extracted and then the bacterial composition is  
748 identified by amplification of 16S rRNA genes, followed by sequencing. Data based on  
749 Minamoto et al., (2015). Left top: The data can be displayed using principal coordinate  
750 analysis (PCoA) plot, where the data are displayed across the two main principal coordinates  
751 (PCoA 1 and 2). Each dot represents the total bacterial community within one sample. The  
752 closer the two dots, the more similar is their bacterial community (i.e. they share many  
753 bacterial taxa). The more distance between two dots, the more difference there is between the  
754 two bacterial communities. Each dot (i.e. sample) is then colored by phenotype, in this case  
755 healthy dogs (red), dogs with IBD before therapy (blue) and dogs with IBD 3 weeks after  
756 medical therapy (green). The figure on the left illustrates that the healthy dogs cluster more  
757 closely together and away from the IBD dogs, indicating differences in the fecal microbiota  
758 between healthy dogs and dogs with IBD. Three weeks after therapy and despite improvement  
759 in clinical disease activity (CIBDAI score), the microbiota changed only slightly and did not  
760 yet cluster closer to the microbiota of healthy dogs. Left bottom: The same data are displayed  
761 as an index that summarizes the abundances of major bacterial taxa in each fecal sample as  
762 one single numerical value (a positive number indicates dysbiosis). This index can then be  
763 used to monitor changes in gut microbiota over time. As in the left figure, the data indicate  
764 that, after 3 weeks of therapy, the microbiota has not returned to a state similar to that of  
765 healthy dogs. Right: The most abundant bacterial genera of these dogs are displayed as a heat  
766 map. Each column represents the bacterial genera in each sample; each row summarizes the  
767 abundance of these genera (the more red the higher the abundance). The heat map shows the  
768 major abundant genera in healthy dogs are decreased in dogs with IBD.

769



770 **Table 1.** Methods commonly used for characterization of the intestinal microbiota.

Method	Description	Advantages	Disadvantages
Fluorescence in situ hybridization (FISH)	Fluorescent dye-labeled oligonucleotide probes are hybridized to ribosomal RNA sequence in bacterial cells	Identification, quantification, visualization of bacterial cells in tissues (luminal versus cell-adherent versus mucosa-invasive)	Labor intense, fluorescent in situ hybridisation (FISH) probes need to be developed for each bacterial group of interest
Quantitative real-time PCR (qPCR)	Target organisms are detected in real-time using fluorescent dye-labeled primers and/or probes	Detection and relative quantification of bacterial groups in a sample; rapid turnaround (few hours), inexpensive	Assays need to be designed for each bacterial group of interest
Next-generation sequencing (e.g. 454-Pyrosequencing, Illumina)	Bacteria in a sample are amplified using universal primers; PCR amplicons are then sequenced using a high-throughput sequencer	Identification of (theoretically) all bacteria present in a sample; semi-quantitative; indicates relative changes in bacterial groups within a community	Requires advanced bioinformatics; long turnaround; potential for false positive signals from reagents
Metagenomics (shotgun sequencing of genomic DNA)	Genomic DNA is fragmented and then randomly sequenced (without PCR amplification) on a high-throughput sequencer	Provides not only identification of bacteria, but also which functional genes are present in sample	Very expensive, requires advanced bioinformatics

771

772 **Table 2.** Importance of microbial derived metabolites in the gastrointestinal tract.

Metabolic activities of intestinal microbiota	Metabolic end products	Effect on host health and changes in disease
Fermentation of carbohydrates	SCFA (e.g. propionate, acetate, butyrate)	Anti-inflammatory, energy source of enterocytes, regulation of intestinal motility, regulatory T cells, amelioration of leaky gut barrier; SCFA are reduced due to dysbiosis
Vitamin synthesis	Vitamin A, K2, B12, biotin, folate	Important co-factors for various metabolic pathways and generation of regulatory T cells; dysbiosis leads to alterations in vitamin B12 and folate metabolism
Induces degradation of sphingomyelin via alkaline sphingomyelinase	Ceramide	Promotes normal apoptotic mechanisms to limit dysplasia and neoplastic transformation
Degradation of the amino acid tryptophan	Indole	Increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation; indole pathways are disrupted in dysbiosis associated with IBD
Deconjugation/dehydroxylation of bile acids	Secondary bile acids (cholate/deoxycholate)	Intestinal fat absorption; regulation of insulin via GLP-1 activation; provides anti-inflammatory signals; secondary bile acids are reduced in dysbiosis associated with IBD and antibiotic administration
Carbohydrate fermentation	D-lactate	Increases in D-lactate due to dysbiosis in EPI and chronic enteropathies; increases associated with encephalopathy

773

774 GI, gastrointestinal; SCFA, short chain fatty acids; IBD, inflammatory bowel diseases; GLP-1, glucagon-like

775 peptide-1; EPI, exocrine pancreatic insufficiency.

776 **Table 3.** Disorders associated with intestinal dysbiosis.

---

**Inflammatory diseases of the intestine**

Chronic enteropathies (food responsive, antibiotic responsive)

Idiopathic inflammatory bowel disease

**Acute diarrhea**

Acute hemorrhagic diarrhea syndrome

Acute diarrhea due to various origins (infectious and non-infectious)

**Intestinal stasis**

Anatomic abnormalities

Congenital blind loops

Small bowel diverticula, strictures or adhesions

Surgical resection of the ileocolic valve

Surgical blind loops (end-to-side anastomosis)

Partial obstructions of the small intestine

Neoplasia

Foreign bodies

Chronic intussusception

**Motility disorders**

Hypothyroidism

Diabetic autonomic neuropathy

Scleroderma

Abnormal migrating motor complexes

**Decreased gastric acid output**

Atrophic gastritis

Administration of acid suppressing drugs (H<sub>2</sub>-blockers, omeprazole)

**Exocrine pancreatic insufficiency**

Decreased output of pancreatic antimicrobial factors

**Environmental factors**

Antibiotics

---

777

778

779