

# MANIPOLAZIONE TERAPEUTICA DEL MICROBIOMA GASTROINTESTINALE DEI PICCOLI ANIMALI: QUALI PROVE ABBIAMO DELLA SUA EFFICACIA?



ACVIM 2014

Stanley L. Marks, BVSc, PhD, DACVIM (Small Animal Internal Medicine, Oncology), DACVN  
University of California-Davis, Davis, CA, USA

Il tratto intestinale dei mammiferi contiene una complessa, dinamica e diversificata popolazione di batteri non patogeni. I ricercatori hanno stimato che l'essere umano medio contiene 100 trilioni di microbi nell'intestino, numero che è 10 volte maggiore delle cellule del corpo umano<sup>1</sup>.

Il microbiota intestinale influenza la salute dell'ospite, fornendo supporti nutrizionali, modulando il sistema immunitario e fornendo un supporto nella difesa contro i patogeni intestinali<sup>2</sup>.

Il termine **microbioma** si riferisce al numero totale di microrganismi e al loro materiale genetico, mentre il termine **microbiota** indica la popolazione microbica presente in diversi ecosistemi nel corpo.

C'è stata una pleora di ricerche, incentrate sui meccanismi con cui i batteri patogeni influenzano le funzioni intestinali e inducono le malattie; tuttavia, di recente, l'attenzione si è concentrata sul microbiota indigeno non patogeno e sui modi tramite cui esso può portare beneficio all'ospite.

La colonizzazione iniziale dell'intestino sterile del neonato si verifica con la flora batterica materna, vaginale e fecale. I primi colonizzatori hanno un elevato potenziale di riduzione, e includono specie come *Enterobacter*, *Streptococco* e *Stafilococco*. Questi batteri metabolizzano l'ossigeno, favorendo la crescita di batteri anaerobici, tra cui lattobacilli e bifidobatteri.

La colonizzazione con questi batteri è significativamente ritardata nei parti cesarei<sup>3</sup>, in quanto porta all'attivazione ritardata del membro efferente della risposta immunitaria mucosale<sup>4</sup>.

Altri effetti benefici dello sviluppo di una normale flora batterica si possono vedere nei topi privi di germi, che hanno un intestino tenue che pesa meno di quello dei loro omologhi sani. Questo effetto si verifica in parte a causa del sottosviluppo dei costituenti linfoidi, con una mancanza di plasmacellule nella lamina propria e nelle placche di Peyer, e con la conseguente riduzione della produzione di IgA.

L'esposizione ai batteri provoca un'inversione di questo fenomeno entro 28 giorni dall'esposizione<sup>5</sup>.

La flora batterica intestinale è stata associata alla malattia di Crohn e alla colite ulcerosa, così come alla sindrome dell'intestino irritabile nell'uomo<sup>6</sup>.

Inoltre, il microbiota intestinale è stato anche implicato nella patogenesi di vari disturbi gastrointestinali canini, ed anche associato anche alla presenza di specifici enteropatogeni, quali *Salmonella*, *Clostridium perfringens* e virus in episodi acuti di diarrea o in una malattia infiammatoria intestinale scatenata da una disbiosi aspecifica<sup>7</sup>.

Gli studi filogenetici molecolari hanno rivelato una disbiosi batterica e/o fungina nel duodeno dei cani con IBD.

<sup>1</sup> - Savage DC. Ann Rev Microbiol. 1977;31:107-33.

<sup>2</sup> - Hooper LV, et al. Science. 2001;291:881-884.

<sup>3</sup> - Gronlund MM, et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1999;28:19-25.

<sup>4</sup> - Insoft RM, et al. Pediatr Clin N Am. 1996;43:551-71.

<sup>5</sup> - McCracken VJ, et al. Cell Microbiol. 2001;3:1-11.

<sup>6</sup> - Seksik P, et al. Gut. 2003;52:237-242; Sokol H, et al. Inflamm Bowel Dis. 2006;12:106-111; Nobaek S, et al. Am J Gastroenterol. 2000; 95:1231-1238.

<sup>7</sup> - Xenoulis PG, et al. FEMS Microbiol Ecol. 2008;66:579-589.

Più comunemente, sono stati riscontrati<sup>8</sup> una diminuzione della percentuale di *Clostridiales* e un aumento dei Proteobatteri. Solo pochi studi hanno descritto il microbiota fecale di cani con disturbi gastrointestinali acuti e cronici. I cani con diarrea acuta, in particolare quelli con diarrea emorragica acuta (AHD), hanno le più profonde alterazioni nel loro microbioma, caratterizzate da diminuzioni di *Blautia* e *Ruminococcaceae*, compresi *Faecalibacterium* e *Turicibacter spp.*, e aumenti significativi nel genere *Sutterella* e *Clostridium perfringens*, rispetto ai cani sani. I cani con IBD clinicamente attiva avevano diminuite *Faecalibacterium spp.*, e i Fusobatteri che aumentavano durante la risoluzione dell'IBD<sup>9</sup>.

Si pensa che le specie batteriche, che comunemente diminuiscono durante la diarrea, siano degli importanti produttori di acidi grassi a catena corta, che potrebbero promuovere la salute intestinale.

Una più profonda comprensione del microbioma intestinale fornirà valori di riferimento per la popolazione sana e aiuterà nella diagnosi e nel trattamento degli animali malati. Inoltre, la manipolazione del microbioma intestinale tramite intervento dietetico, la somministrazione di probiotici, prebiotici o simbiotici, e il trapianto fecale, sono attualmente impiegati per mantenere la salute intestinale nelle persone e negli animali da compagnia.

La manipolazione del microbiota GI canino, per migliorare la salute attraverso l'intervento dietetico, ebbe inizio nei primi anni '90. Le principali strategie nutrizionali studiate per modulare il microbiota GI canino e felino hanno riguardato le fibre alimentari, i prebiotici e i probiotici.

Sfortunatamente, la maggior parte degli studi di ricerca pubblicati fino ad oggi hanno valutato gli effetti della manipolazione dietetica del microbioma GI in cani e gatti clinicamente sani, e molti di questi studi hanno utilizzato tecniche di placcatura tradizionale o qPCR, per quantificare un numero limitato di batteri (ad esempio, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *C. perfringens*, ed *E. coli*) per valutarne l'efficacia.

## **PROBIOTICI.**

I probiotici si riferiscono a microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono beneficio alla salute dell'ospite. Il termine deriva dal greco e significa: «*per la vita*».

La *Food and Agricultural Organization* degli Stati Uniti (FAO) e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) hanno dichiarato che vi è un'adeguata evidenza scientifica per indicare che esiste la possibilità che gli alimenti probiotici forniscano benefici per la salute, e che i ceppi specifici siano sicuri per l'uso umano<sup>10</sup>.

C'è stata letteralmente un'esplosione di interesse e di ricerche sull'argomento, negli ultimi anni.

Nonostante questa attività, resta ancora molto da fare per determinare le indicazioni e le applicazioni specifiche dei probiotici in cani e gatti.

C'è stato un enorme interesse tra le aziende alimentari veterinarie, e tra quelle di prodotti di salute e benessere, per commercializzare formulazioni di probiotici che siano sicuri, puri, stabili, e che conferiscano un effetto benefico in cani e gatti. Questi prodotti sono generalmente preferiti alla moltitudine di probiotici da bancone, in commercio per uso veterinario, date le preoccupazioni relative al controllo di qualità dei prodotti da bancone<sup>11</sup>.

Un certo numero di criteri è essenziale per l'efficacia e la sicurezza dei probiotici, tra cui la resistenza agli acidi gastrici e alla bile, la capacità di colonizzare il tratto gastrointestinale, l'efficacia contro i microrganismi patogeni e la modulazione del sistema immunitario<sup>12</sup>.

Sono stati proposti diversi meccanismi potenziali, relativi alle modalità per cui i probiotici riducono la gravità o la durata della diarrea: la competizione con batteri patogeni o virus per le sostanze nutritive, la concorrenza per i siti recettoriali, la modifica dell'attività metabolica della microflora intestinale e l'antagonismo diretto attraverso l'azione di metaboliti antimicrobici<sup>13</sup>.

## **Prova dei benefici dei probiotici negli esseri umani.**

Ci sono attualmente prove di primo livello (cioè, dati di alta qualità, o randomizzati, o di studi controllati con risultati statisticamente significativi, o di alcune limitazioni di progettazione o da revisioni sistematiche di prove) riguardanti l'efficacia dei probiotici nel trattamento dell'intolleranza o della cattiva digestione del lattosio, nel trattamento di infezioni acute o di diarrea nosocomiale nei bambini, nel prevenire o curare la diarrea associata agli antibiotici, nel prevenire e mantenere la remissione della *pouchite* negli adulti, e nel mantenere la remissione della colite ulcerosa negli adulti<sup>14</sup>.

<sup>8</sup> - Suchodolski JS, et al. PLoS One. 2012;7:e51907.

<sup>9</sup> - Suchodolski JS, et al. PLoS One. 2012;7:e51907.

<sup>10</sup> - Food and Agricultural Organization of the United States and World Health Organization (Online), 2001.

<sup>11</sup> - Weese JS. Can Vet J. 2003;44:982-3.

<sup>12</sup> - Tuomola E, et al. Am J Clin Nutr. 2001;73:393S-398S.

<sup>13</sup> - Coconnier MH, et al. FEMS Microbiol Lett. 1993;110:299-305; Rolfe RD, et al. J Infect Dis. 1981;143:470-475.

<sup>14</sup> - Guarner F. In: Versalovic J, Wilson M, eds. Therapeutic Microbiology: Probiotics and Related Strategies. Washington DC: ASM Press; 2008: 255.

Inoltre, vi sono prove di secondo livello (ottenute da studi randomizzati che hanno limitazioni nella metodologia o risultati che hanno intervalli di "ampia fiducia") per l'utilizzo di probiotici per trattare la diarrea del viaggiatore, impedire la sepsi secondaria a una grave pancreatite acuta e prevenire le infezioni nei pazienti del postoperatorio<sup>15</sup>. Sfortunatamente, manca nella professione veterinaria un simile livello di evidenza, che possa valutare criticamente i benefici di specifici ceppi probiotici per cani e gatti.

### **Prove dei benefici dei probiotici per i cani.**

Ad oggi, è stato pubblicato solo un numero relativamente piccolo di studi, per valutare gli effetti dei probiotici nei cani, e molti di questi si sono concentrati sul microbiota intestinale di cani apparentemente sani. I ceppi probiotici di origine umana o canina (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ed *Enterococcus*) sono stati utilizzati in cani adulti sani o in cani con diarrea cibo-responsiva, per valutarne gli effetti sulle popolazioni microbiche intestinali, la capacità nel ridurre specifici patogeni nelle feci e l'efficacia quali immunomodulatori<sup>16</sup>. In molti di questi studi, i probiotici aggiunti al cibo in cani sani hanno avuto un effetto ambiguo sulla microflora fecale e sui patogeni<sup>17</sup>.

Tuttavia, è importante notare che la maggior parte di questi studi non era randomizzata, né controllata, e i ceppi dei probiotici variavano da uno studio all'altro, rendendo quindi più impegnativa l'interpretazione dei risultati. Inoltre, molti studi si sono focalizzati sull'isolamento fecale e sulle colture quantitative di batteri patogeni putativi come il *C. Perfringens*, piuttosto che sulla valutazione degli obiettivi più significativi, come la caratterizzazione filogenetica del microbiota, l'immunopatologia della mucosa e le alterazioni dell'integrità intestinale.

A tutt'oggi, sono stati pubblicati solo due studi che riguardano il ruolo dei probiotici nella gestione della sensibilità alimentare e della diarrea «cibo-responsiva», con risultati complessivamente positivi<sup>18</sup>.

Solo uno di questi studi era randomizzato e clinicamente controllato con placebo<sup>19</sup>, e i risultati di tale studio, anche se clinicamente positivi (tutti i cani nello studio sono migliorati quando sono stati immessi nella "dieta ad eliminazione"), non hanno mostrato cambiamenti specifici nei modelli di citochine infiammatorie, né uno specifico beneficio del probiotico.

Nei cani, sono stati studiati gli effetti immunomodulatori dell'*Enterococcus faecium SF68*, e il probiotico è stato associato a un aumento della concentrazione di IgA fecali e a una maggior concentrazione di IgG e IgA circolanti vaccino-specifiche<sup>20</sup>.

Sebbene l'aumento delle immunoglobuline possa suggerire una maggior risposta immunitaria, la rilevanza clinica di questo evidenze non è nota.

Ulteriori studi saranno necessari sui cani, per valutare ulteriormente gli effetti immunomodulatori dei probiotici e per valutarne la sicurezza. Quest'ultima questione è particolarmente importante, dato il recente ritrovamento di una maggior aderenza intestinale di *Campylobacter jejuni* in un modello *in vitro* di muco intestinale canino, susseguente all'incubazione con *Enterococcus faecium*<sup>21</sup>.

Si deve notare che questo ceppo di *E. faecium* è differente dal ceppo di *E. faecium SF68* disponibile in commercio; inoltre, ad oggi non vi è stata alcuna evidenza clinica né aneddotica di diarrea *Campylobacter*-associata, nei cani sottoposti alla somministrazione di *E. faecium*.

Il trattamento a breve termine (6 settimane) di *E. faecium SF68*, in 20 cani con giardiasi subclinica cronica naturalmente acquisita, non è riuscito a incidere sulla disseminazione delle cisti giardiali, né sull'antigene giardiale fecale, né ha alterato le risposte immunitarie innate o di adattamento a diversi intervalli di tempo<sup>22</sup>.

Questi risultati sono in contrasto con quelli indicati in seguito alla somministrazione orale del ceppo *E. faecium SF68* a topi sperimentalmente infettati con trofozoiti di *Giardia intestinalis*<sup>23</sup>.

La somministrazione orale del ceppo di *E. faecium SF68*, a partire da 7 giorni prima dell'inoculazione con i trofozoiti di *Giardia*, ha aumentato significativamente la produzione di specifiche IgA-intestinali e IgG-sanguigne anti-*Giardia*. Questa risposta umorale è stata rispecchiata a livello cellulare da un aumento della percentuale di cellule T CD4+ nel patch di Peyer e nella milza di topi SF68-alimentati.

<sup>15</sup> - Guarner F. In: Versalovic J, Wilson M, eds. Therapeutic Microbiology: Probiotics and Related Strategies. Washington DC: ASM Press; 2008: 255.

<sup>16</sup> - Sauter SN, et al. Anim Nutr. 2006;90:269; Pascher M, et al. Arch Anim Nutr. 2008;62:107; Vahjen W, et al. Arch Anim Nutr. 2003;57:229; Swanson KS, et al. J Nutr. 2002;132:3721; Biagi G, et al. Vet Microbiol. 2007;124:160; Baillon MLA, et al. Am J Vet Res. 2004;65:338.

<sup>17</sup> - Vahjen W, et al. Arch Anim Nutr. 2003;57:229; Swanson KS, et al. J Nutr. 2002;132:3721; Biagi G, et al. Vet Microbiol. 2007;124:160; Baillon MLA, et al. Am J Vet Res. 2004;65:338.

<sup>18</sup> - Sauter SN, et al. Anim Nutr. 2006;90:269; Pascher M, et al. Arch Anim Nutr. 2008;62:107.

<sup>19</sup> - Sauter SN, et al. Anim Nutr. 2006;90:269.

<sup>20</sup> - Benyacoub J, et al. J Nutr. 2003;133:1158–1162.

<sup>21</sup> - Rinkinen M, et al. Vet Microbiol. 2003;92:111.

<sup>22</sup> - Simpson KW, et al. J Vet Intern Med. 2009;23:476–481.

<sup>23</sup> - Benyacoub J, et al. J Nutr. 2005;135:1171–1176.

Il miglioramento delle risposte immunitarie specifiche nei topi nutriti con probiotico è stato associato con una diminuzione nel numero di trofozoiti attivi nell'intestino tenue e con un diminuito spargimento di antigeni fecali di *Giardia* (proteina GSA65). Questi ultimi risultati sottolineano l'importanza di valutare attentamente il modello animale, il tempo di somministrazione di probiotici (prima o dopo l'infezione) e gli specifici obiettivi valutati.

### **Prova dei benefici dei probiotici nei gatti.**

Purtroppo, ci sono poche informazioni pubblicate riguardanti l'uso di probiotici nei gatti, e solo uno studio clinico ha riportato, ad oggi, un effetto benefico della terapia probiotica per malattie feline. In quello studio, la somministrazione di *Enterococcus faecium* SF68 su 217 gatti ospitati in un rifugio per animali è stata associata ad una percentuale significativamente inferiore di gatti con diarrea  $\geq 2$  giorni (7.4%), rispetto a un gruppo placebo (20,7%)<sup>24</sup>.

Uno studio, che ha valutato l'effetto della supplementazione dietetica con il ceppo probiotico di *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241 ( $2 \times 10^8$  UFC/d per 4,5 settimane), somministrato a 15 gatti adulti sani, ha dimostrato che il recupero del probiotico dalle feci dei gatti è stato associato a un significativa riduzione di *Clostridium* spp. e di *Enterococcus faecalis*<sup>25</sup>.

Tuttavia, gli effetti immunomodulatori sono stati riportati sulla base di una diminuzione dei linfociti e di un aumento delle popolazioni di eosinofili, nonché di una maggiore attività dei fagociti del sangue periferico.

La rilevanza di siffatti risultati non è chiara, in quanto questo studio non era randomizzato, e le variazioni rilevate nelle popolazioni di cellule del sangue periferico non possono essere estrapolate quale prova dei benefici per la salute sistemica.

La valutazione degli effetti della supplementazione col ceppo SF68 dell'*Enterococcus faecium* sulle risposte delle funzioni immunitarie, in seguito alla somministrazione di un vaccino polivalente, è stata valutata in specifici gattini esenti da organismi patogeni<sup>26</sup>.

Questo studio prospettico, randomizzato e controllato con placebo ha portato al recupero di *E. faecium* SF68 dalle feci di sette dei nove gatti trattati con il probiotico, e un aumento non significativo nei livelli di IgG siero-specifici-1 di herpesvirus nel felino. Le concentrazioni di IgG e IgA totali nel siero erano simili nei gruppi probiotici e placebo, e la percentuale dei linfociti CD4+ è aumentata in modo significativo solo in cuccioli a 27 settimane, e non in tutti gli altri periodi di tempo.

I probiotici sono stati valutati anche su giovani ghepardi in cattività, una popolazione con un'incidenza relativamente alta di enterite batteri-associata. La somministrazione di un probiotico specie-specifico, contenente *Lactobacillus* di Gruppo 2 ed *Enterococcus faecium*, a 27 giovani ghepardi, è stata associata a un aumento significativo del peso corporeo nel gruppo di trattamento, ma non vi è stato alcun aumento nel gruppo di controllo<sup>27</sup>. Inoltre, la somministrazione di probiotici nel gruppo probiotico è stata associata con una migliore qualità delle feci.

### **PREBIOTICI.**

Un prebiotico è definito come un «ingrediente alimentare non-digeribile che colpisce favorevolmente l'ospite, stimola selettivamente la crescita e/o attiva il metabolismo di uno o di pochi batteri salutari nel tratto intestinale.»<sup>28</sup>

I prebiotici più comuni studiati sono i fruttani, anche se sono in corso di valutazione altri prebiotici, quali i mannani, il lattosaccarosio e il lattulosio.

### **Prova dei benefici dei prebiotici in cani e gatti.**

Purtroppo, vi è una scarsità di informazioni per valutare i benefici clinici dei prebiotici in cani e gatti.

La maggior parte dei risultati pubblicati in letteratura si limita alla digeribilità dei nutrienti, alle concentrazioni microbiche nelle feci e ai cataboliti proteici fecali, che potrebbero non necessariamente indicare un beneficio per la salute del paziente. Gli effetti dei frutto-oligosaccaridi a catena corta (scFOS) sono stati valutati in un gruppo di cani pastori tedeschi, sospettati di avere deficit di IgA<sup>29</sup>.

Sebbene fossero diminuiti i batteri aerobi e anaerobi nelle biopsie intestinali nei cani scFOS-integrati, i risultati dello studio sono stati oscurati, per il fatto che la conta dei batteri anaerobi non diminuiva nei campioni di fluido intestinale di tali cani.

<sup>24</sup> - Bybee SN, et al. J Vet Intern Med. 2011;25:856–860.

<sup>25</sup> - Marshall-Jones ZV, et al. Am J Vet Res. 2006;67:1005.

<sup>26</sup> - Veir JK, et al. Vet Ther. 2007;8:229.

<sup>27</sup> - Koeppel KN, et al. J S Afr Vet Assoc. 2006;77:127.

<sup>28</sup> - Gibson GR, et al. J Nutr. 1995;125:1401–12.

<sup>29</sup> - Willard MD, et al. Am J Vet Res. 1994;55:654–659.

Gli effetti di vari oligosaccaridi sono stati testati in cani adulti incannulati ilealmente, per valutare gli effetti sulla digeribilità dei nutrienti del tratto ileale e totale, sulle popolazioni microbiche, sul pH ileale, sull'ammoniaca, sulla glicemia, sulla consistenza fecale e sulle concentrazioni di SCFA.

Gli oligosaccaridi (oligofruztosio, mannanoligosaccaridi [MOS] e xylo-oligosaccaridi) sono stati somministrati ognuno allo 0,5% della dieta in un "disegno a quadrati latini". L'unico reperto significativo è stato quello di un calo nelle popolazioni di *Clostridium perfringens* nelle feci di cani nutriti con MOS<sup>30</sup>.

Gli effetti dell'integrazione al 3% di inulina in diete a eliminazione e a base di proteine idrolizzate su cani sani sono stati associati a un leggero aumento del contenuto di umidità fecale (non clinicamente rilevante), a una diminuzione dei coefficienti di digeribilità apparente dei nutrienti di proteina grezza, nei cani sotto dieta ad eliminazione, e nessun effetto sulle concentrazioni di IgA fecale<sup>31</sup>.

Nei Beagles adulti, nutriti per 6 settimane con diete contenenti cellulosa o polpa di barbabietola più oligofruztosio, sono state reperite concentrazioni fecali simili di anaerobi e aerobi totali; tuttavia, i cani nutriti con oligofruztosio avevano meno *Enterobacteriaceae* e *Clostridia*, e un maggior numero di lattobacilli.

Inoltre, i cani nutriti con oligofruztosio avevano un intestino tenue più lungo e più pesante (35% più pesante), nonché una massa mucosale maggiore del 37%, con conseguente maggior superficie di assorbimento<sup>32</sup>.

La somministrazione di scFOS all'1% o inulina all'1% a cuccioli svezzati (di 12 settimane di età), in costanza di un agente patogeno (*Salmonella Typhimurium*), è stata associata a un'inferiore gravità della gangrena dell'enterocita nei cuccioli nutriti con fruttani, rispetto a quelli nutriti con dieta di controllo.

Inoltre, i cuccioli alimentati con inulina avevano anche un più alto acetato fecale, più alte concentrazioni totali di SCFA e di lattobacilli, a conferma del fatto che i prebiotici sembrano attenuare alcuni degli effetti negativi della *Salmonella* e possono fornire una protezione contro l'infezione nei cuccioli svezzati.

I gatti, alimentati con diete contenenti lo 0% o lo 0,75% di oligofruztosio, hanno avuto un significativo aumento delle concentrazioni fecali di lattobacilli e una diminuzione nelle concentrazioni di *C. perfringens* e di *E. coli*, rispetto ai controlli<sup>33</sup>.

Uno studio che valutava gli effetti dei frutto-oligosaccaridi a catena corta (0,5%) e dei galatto-oligosaccaridi (0,5%) in gatti sani, non ha mostrato alcun effetto sui cataboliti proteici fecali, tra cui l'ammoniaca, il 4-metilfenolo, l'indolo e le ammine biogene, sottolineando il fatto che dovrebbero essere utilizzate concentrazioni di oligosaccaridi >0,5% per ottenere una risposta positiva<sup>34</sup>.

Nel 2010, è stato eseguito il primo studio di intervento nutrizionale, nei cani che hanno usato il pirosequenziamento per valutare gli effetti della fibra della polpa di barbabietola sulla composizione microbica fecale<sup>35</sup>. I cani nutriti con una dieta di controllo sono stati confrontati con cani alimentati con una dieta contenente polpa di barbabietola al 7,5%, in un disegno-crossover, in periodi di 14 giorni.

*Eubacterium Balii* e il *Faecalibacterium prausnitzii*, entrambi produttori di butirrato, erano sovrarappresentati nei cani nutriti con dieta contenente polpa di barbabietole, il che suggerisce un possibile effetto anti-infiammatorio di quest'ultima. Al contrario, i Fusobatteri erano sottorappresentati nei cani alimentati con dieta contenente polpe di barbabietole. Gli effetti di una formulazione simbiotica per 21 giorni, per cani di proprietà privata, sono stati valutati tramite il pirosequenziamento 454 fecale<sup>36</sup>.

Il *phylum* più abbondante nelle feci di tutti i cani era quello dei *Firmicutes*, seguito da *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*, indipendentemente dal trattamento simbiotico. La somministrazione di simbiotici è stata associata a una maggiore abbondanza della famiglia delle *Eubacteriaceae* e del *phylum* dei Fusobatteri.

Recenti studi hanno tentato di caratterizzare il microbiota fecale dei cani con diarrea, così come dei cani con IBD.

Sono state osservate una diversità batterica ridotta e una percentuale significativamente più alta di *Enterobacteriaceae*, nei bordi a pennello del duodeno di cani con IBD, rispetto ai cani sani<sup>37</sup>.

Suchodolski et al. hanno confermato una disbiosi batterica in campioni fecali di cani con diarrea cronica (IBD) e con un'acuta diarrea emorragica, e hanno osservato dei cambiamenti del microbioma tra stati acuti e cronici della malattia. I gruppi batterici che sono comunemente diminuiti sono degli importanti produttori di acidi grassi a catena corta, e possono svolgere un ruolo importante nella salute intestinale canina<sup>38</sup>.

<sup>30</sup> - Strickling JA, et al. Anim Feed Sci Technol. 2000;86:205–219.

<sup>31</sup> - Verlinden A, et al. Br J Nutr. 2006;96:936–944.

<sup>32</sup> - Buddington RK, et al. Am J Vet Res. 1999;60:354–358.

<sup>33</sup> - Sparkes AH, et al. Am J Vet Res. 1998;59:436–440.

<sup>34</sup> - Kanakupt A, et al. J Anim Sci. 2011;89:1376–1384.

<sup>35</sup> - Middlebos IS, et al. PLoS One. 2010;5:e9768.

<sup>36</sup> - Garcia-Mazcorro JF, et al. FEMS Microbiol Ecol. 2011;78:542–554.

<sup>37</sup> - Xenoulis PG, et al. FEMS Microbiol Ecol. 2008;66:579–589.

<sup>38</sup> - Suchodolski JS, et al. PLoS One. 2012;7:e51907.

### **Trapianti del Microbiota Fecale (FMT).**

Il trapianto del microbiota fecale, o l'infusione di una sospensione fecale da un individuo sano nel tratto gastrointestinale di un'altra persona, al fine di curare una determinata malattia, è meglio conosciuto come un trattamento per ricorrenti infezioni da *Clostridium difficile* (RCDI) nelle persone<sup>39</sup>, e l'esperienza con l'FMT per colite ulcerosa e morbo di Crohn è un po' limitata. La re-istituzione della grande diversità del microbiota intestinale, mediante infusione da feci di donatori nel colon, è il meccanismo proposto per pazienti con RCDI e IBD.

Il FMT è stato eseguito in cani con una varietà di enteropatie croniche (Scott Weese, comunicazione personale), e l'autore (SLM) sta completando uno studio clinico per valutare l'efficacia del FMT in macachi con colite cronica.

C'è una varietà di metodi di applicazione, per inoculare nel paziente le feci dei donatori, e la maggior parte degli studi si è affidata alla colonscopia, oltre che a clisteri di ritenzione o sondini naso-gastrici, per facilitare l'inoculazione delle feci nell'ileo e nel colon.

Le feci del donatore sono più spesso utilizzate entro 8 ore dal passaggio; tuttavia, i campioni di feci congelate da donatori standardizzati sono stati scongelati e somministrati per via colonscopia 1-8 settimane dopo il passaggio per il trattamento di RCDI, con percentuali di successo simili a quelle con feci fresche<sup>40</sup>.

I campioni fecali dei donatori devono essere attentamente monitorati per poter riscontrare la presenza di enteropatogeni batterici, virali e parassitari, e i donatori umani saranno esclusi, qualora avessero assunto antibiotici nei 3 mesi precedenti, o se sono sotto agenti immunosoppressivi o chemioterapici. Inoltre, non potranno essere donatori nemmeno i pazienti con IBD, atopia, malignità del GI e diarrea cronica.

La quantità delle feci donate utilizzate è varia; tuttavia, in una revisione recente, la recidiva è stata quattro volte maggiore, quando è stato somministrato <50g di feci a persone con RCDI<sup>41</sup>.

Le feci sono di solito sospese in una soluzione salina non batteriostatica; tuttavia, altri diluenti (ad esempio, yogurt e latte) sono stati utilizzati con successo. Le feci del donatore sono miscelate con il diluente a una consistenza che può essere iniettata attraverso il canale di biopsia di un colonscopio.

La sospensione deve essere filtrata attraverso garze o colini, per eliminare il particolato di grandi dimensioni prima dell'aspirazione nella siringa. Il volume della sospensione fecale che si deposita nel colon varia enormemente, nonostante siano comunemente usati volumi di 300-500 mL. Un volume più grande consente al medico di depositare aliquote di 90-100 mL in più posizioni all'interno del tratto intestinale, tra cui il digiuno, l'ileo, il colon ascendente, il colon trasverso e il colon discendente superiore.

### **CONCLUSIONI E DIREZIONI FUTURE.**

I potenziali vantaggi e le indicazioni specifiche per la somministrazione di probiotici e prebiotici a cani e gatti devono ancora essere completamente definiti, anche se la nostra conoscenza e la comprensione della natura e della diversità del microbioma intestinale felino e canino, nello stato di salute e di malattia, sono espansive rapidamente dopo l'avvento di piattaforme a sequenziamento di DNA di alta produttività.

La definizione di un ruolo per probiotici e prebiotici, così come per il FMT in cani e gatti, richiederà il completamento di studi prospettici, randomizzati e controllati con placebo, che si basino su obiettivi clinicamente rilevanti, relativi a una particolare condizione fisiologica o patologica.

Saranno necessari ulteriori studi, per determinare la necessità che i probiotici siano microrganismi viventi, secondo gli studi provocatori di Rachmilewitz *et al.*, che hanno documentato che gli effetti benefici dei probiotici sono mediati dal loro DNA, aggirando così il bisogno di batteri vivi e vitali<sup>42</sup>.

Probiotici e prebiotici sembrano avere un ruolo potenziale nella prevenzione e nel trattamento di varie malattie gastrointestinali, ma è probabile che i benefici ottenuti siano specifici per le specie batteriche utilizzate e per il contesto della sottostante malattia.

### **INFORMAZIONI SUL RELATORE.**

Stanley L. Marks, BVSc, PhD, DACVIM (medicina interna per piccoli animali, oncologia), DACVN University of California-Davis Davis, California, Stati Uniti - URL: <http://www.vin.com/doc/?id=6293091>

<sup>39</sup> - Song Y, et al. PLoS One. 2013;8:e81330.

<sup>40</sup> - Hamilton MJ, et al. Am J Gastroenterol. 2012;107:761-767.

<sup>41</sup> - Gough E, et al. Clin Infect Dis. 2011;53:994-1002.

<sup>42</sup> - Rachmilewitz D, et al. Gastroenterol. 2004;126:520-528.



## Therapeutic Manipulation of the Small Animal GI Microbiome: What Evidence Do We Have For Efficacy?

ACVIM 2014

Stanley L. Marks, BVSc, PhD, DACVIM (Small Animal Internal Medicine, Oncology), DACVN  
University of California-Davis, Davis, CA, USA



26479897

The mammalian intestinal tract contains a complex, dynamic, and diverse population of non-pathogenic bacteria. Researchers have estimated that the average human contains 100 trillion microbes in the gut, which is 10 times more than the cells of the human body.<sup>1</sup> The intestinal microbiota influences the health of the host by providing nutritional substrates, modulating the immune system, and providing a support in the defence against intestinal pathogens.<sup>2</sup> The term **microbiome** refers to the total number of microorganisms and their genetic material and is contrasted from the term **microbiota**, which is the microbial population present in different ecosystems in the body.

There has been a plethora of research focusing on the mechanisms by which pathogenic bacteria influence intestinal function and induce disease; however, recent attention has focused on the indigenous non-pathogenic microbiota and the ways in which it may benefit the host. Initial colonization of the sterile newborn intestine occurs with maternal vaginal and fecal bacterial flora. The first colonizers have a high reduction potential and include species such as *Enterobacter*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus*. These bacteria metabolize oxygen, favouring the growth of anaerobic bacteria, including lactobacilli and bifidobacteria. Colonization with these bacteria is significantly delayed in caesarean deliveries,<sup>3</sup> leading to delayed activation of the efferent limb of the mucosal immune response<sup>4</sup>. Additional beneficial effects of developing a normal bacterial flora are seen in germ-free mice that have small intestines that weigh less than their healthy counterparts. This effect occurs partly due to underdevelopment of lymphoid constituents, with a lack of plasma cells in the lamina propria and Peyer's patches, and subsequent reduction in IgA production. Exposure to bacteria results in a reversal of this phenomenon within 28 days of exposure.<sup>5</sup>

The intestinal microbiota has been associated with Crohn's disease and ulcerative colitis, as well as irritable bowel syndrome in humans.<sup>6-8</sup> In addition, the intestinal microbiota has also been implicated in the pathogenesis of various canine GI disorders, either associated with the presence of specific enteropathogens such as *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, and viruses in acute episodes of diarrhea or a nonspecific dysbiosis precipitating inflammatory bowel disease.<sup>9,10</sup> Molecular phylogenetic studies have revealed a bacterial and/or fungal dysbiosis in the duodenum of dogs with IBD. A decrease in the proportion of Clostridiales and an increase in Proteobacteria is most commonly observed.<sup>10</sup> Only a few studies have described the fecal microbiota of dogs with acute and chronic GI disorders. Dogs with acute diarrhea, particularly those with acute hemorrhagic diarrhea (AHD) have the most profound alterations in their microbiome characterized by decreases in *Blautia*, Ruminococcaceae including *Faecalibacterium* and *Turicibacter* spp., and significant increases in genus *Sutterella* and *Clostridium perfringens* compared to healthy dogs. Dogs with clinically active IBD had decreased *Faecalibacterium* spp. and Fusobacteria that increased during resolution of the IBD.<sup>10</sup> The bacterial species that are commonly decreased during diarrhea are thought to be important short-chain fatty acid producers and could promote intestinal health. A deeper understanding of the gut microbiome will provide reference values for healthy populations and assist in diagnosing and treating diseased animals. In addition, manipulation of the intestinal microbiome via dietary intervention, administration of probiotics, prebiotics, or synbiotics, and fecal transplantation is currently being performed to maintain gut health in people and companion animals.



the early 1990s. Dietary fiber, prebiotics and probiotics have been the major nutritional strategies studied to modulate the canine and feline GI microbiota. Unfortunately, most of the research studies published to date have evaluated the effects of dietary manipulation of the GI microbiome in clinically healthy dogs and cats, and many of these studies have used traditional plating techniques or qPCR to quantify a limited number of bacteria (e.g., *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *C. perfringens*, and *E. coli*) to assess efficacy.

### **PROBIOTICS**

Probiotics refer to live microorganisms, which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. The term probiotic was derived from the Greek, meaning "for life." The Food and Agricultural Organization of the United States (FAO) and the World Health Organization (WHO) have stated that there is adequate scientific evidence to indicate that there is potential for probiotic foods to provide health benefits and that specific strains are safe for human use.<sup>11</sup> There has been a literal explosion of interest and research on the subject in recent years. Despite this activity, much still remains to be done to determine the specific indications and applications of probiotics in dogs and cats. There has been tremendous interest among veterinary pet food companies and manufacturers of animal health and wellness products to market probiotic formulations that are safe, pure, stable, and confer a beneficial effect in dogs and cats. These products are generally preferred to the multitude of over-the-counter probiotics marketed for veterinary use, given the concerns pertaining to quality control of the over-the-counter products.<sup>12</sup> A number of criteria are essential for efficacy and safety of probiotics. These include resistance to gastric acid and bile, ability to colonize the gastrointestinal tract, efficacy against pathogenic microorganisms, and modulation of the immune system.<sup>13</sup> Several potential mechanisms have been proposed for how probiotics reduce the severity or duration of diarrhea: competition with pathogenic bacteria or viruses for nutrients, competition for receptor sites, modification of the metabolic activity of the intestinal microflora, and the direct antagonism through the action of antimicrobial metabolites.<sup>14,15</sup>

### **Evidence for the Benefits of Probiotics in People**

There is currently level 1 evidence (i.e., data from either high-quality, randomized, controlled trials with statistically significant results and few design limitations or from systematic reviews of trials) for effectiveness of probiotics in treating lactose intolerance/maldigestion, treating acute infectious or nosocomial diarrhea in children, preventing or treating antibiotic-associated diarrhea, preventing and maintaining remission of pouchitis in adults, and maintaining remission of ulcerative colitis in adults.<sup>16</sup> In addition, there is level 2 evidence (evidence obtained from randomized trials that have limitations in methodology or results that have wide confidence intervals) for using probiotics to treat traveler's diarrhea, prevent sepsis secondary to severe acute pancreatitis, and prevent infections in postoperative patients.<sup>16</sup> Unfortunately, a similar level of evidence critically evaluating the benefits of specific probiotic strains in dogs and cats is currently lacking in the veterinary profession.

### **Evidence for the Benefits of Probiotics in Dogs**

To date, only a relatively small number of studies have been published evaluating the effects of probiotics in dogs, and many of these have focused on the intestinal microbiota in apparently healthy dogs. Probiotic strains of human or canine origin (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus*) were used in healthy adult dogs or dogs with food-responsive diarrhea to assess their effects on intestinal microbial populations, their ability to reduce specific pathogens in feces, and effectiveness as immunomodulators.<sup>17-22</sup> In many of these studies, probiotics added to the food in healthy dogs had an equivocal effect on fecal microflora and pathogens.<sup>19,22</sup> However, it is important to note that most of these studies were not randomized, controlled trials, and the strains of probiotic varied from study to study, making interpretation of findings more challenging. In addition, many studies focused on fecal isolation and quantitative cultures of putative pathogenic bacteria such as *C. perfringens*, rather than on the evaluation of more meaningful endpoints such as phylogenetic characterization of the microbiota, mucosal immunopathology,



and alterations in intestinal integrity. Only two studies addressing the role of probiotics in management of dietary sensitivity and food-responsive diarrhea have been published to date, with overall positive results.<sup>17,18</sup> Only one of those studies was a randomized, placebo-controlled clinical trial,<sup>17</sup> and the results of that study, although clinically positive (all of the dogs in the study improved when they were placed on the elimination diet) showed no specific changes in the inflammatory cytokine patterns or a specific benefit of the probiotic. The immunomodulatory effects of *Enterococcus faecium* SF68 have been studied in dogs, and the probiotic was associated with increased fecal IgA concentrations and increased vaccine-specific circulating IgG and IgA concentrations.<sup>23</sup> Although increased immune globulins may suggest enhanced immune response, the clinical relevance of this finding is not known.

Additional studies are warranted in dogs to further assess the immunomodulatory effects of probiotics and to evaluate their safety. The latter issue is particularly important given the recent finding of increased intestinal adhesion of *Campylobacter jejuni* in an *in vitro* model of canine intestinal mucus following incubation with *Enterococcus faecium*.<sup>24</sup> It should be noted that this *E. faecium* strain is different from the *E. faecium* SF68 strain available commercially; moreover, to date there has been no clinical or anecdotal evidence of *Campylobacter*-associated diarrhea in dogs associated with *E. faecium* administration. Short-term treatment (6 weeks) with *E. faecium* SF68 to 20 dogs with chronic naturally acquired subclinical giardiasis failed to affect giardial cyst shedding or fecal giardial antigen and did not alter innate or adaptive immune responses at multiple time points.<sup>25</sup> These results are in contrast to those shown following the oral feeding of *E. faecium* strain SF68 to mice experimentally infected with *Giardia intestinalis* trophozoites.<sup>26</sup> Oral feeding of *E. faecium* strain SF68 starting 7 days before inoculation with *Giardia* trophozoites significantly increased the production of specific anti-*Giardia* intestinal IgA and blood IgG. This humoral response was mirrored at the cellular level by an increased percentage of CD4+ T-cells in the Peyer's patches and in the spleens of SF68-fed mice. The improvement of specific immune responses in probiotic-fed mice was associated with a diminution in the number of active trophozoites in the small intestine as well as decreased shedding of fecal *Giardia* antigens (GSA65 protein). The latter findings underscore the importance of carefully evaluating the animal model, the timing of probiotic administration (prior to infection or following infection), and the specific endpoints assessed.

### **Evidence for the Benefits of Probiotics in Cats**

Unfortunately, there is little published information pertaining to probiotic use in cats, and only one clinical study has reported a beneficial effect of probiotic therapy for any feline disease to date. In that study, administration of *Enterococcus faecium* SF68 to 217 cats housed in an animal shelter was associated with a significantly lower percentage of cats with diarrhea  $\geq 2$  days (7.4%) compared with a placebo group (20.7%).<sup>27</sup> One study evaluating the effect of dietary supplementation with the probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241 ( $2 \times 10^8$  CFU/d for 4.5 weeks) administered to 15 healthy adult cats demonstrated that recovery of the probiotic from the feces of the cats was associated with a significant reduction in *Clostridium* spp. and *Enterococcus faecalis*.<sup>28</sup> However, the immunomodulatory effects were reported based on decreased lymphocyte and increased eosinophil populations and increased activities of peripheral blood phagocytes. The relevance of these findings is unclear, because this study was not a randomized trial and the changes reported in the populations of peripheral blood cells cannot be extrapolated into evidence of systemic health benefits. Evaluation of the effect of supplementation with *Enterococcus faecium* strain SF68 on immune function responses following administration of a multivalent vaccine was evaluated in specific pathogen-free kittens.<sup>29</sup> This prospective, randomized, placebo-controlled study resulted in the recovery of *E. faecium* SF68 from the feces of seven of nine cats treated with the probiotic, and a nonsignificant increase in feline herpesvirus 1-specific serum IgG levels. Concentrations of total IgG and IgA in serum were similar in the probiotic and placebo groups, and the percentage of CD4+ lymphocytes was increased significantly only in kittens at 27 weeks and not at any other time points. Probiotics also have been evaluated in juvenile, captive cheetahs, a population with a relatively high

incidence of bacteria-associated enteritis. Administration of a species-specific probiotic containing *Lactobacillus* Group 2 and *Enterococcus faecium* to 27 juvenile cheetahs was associated with a significantly increased body weight in the treatment group, with no increase in the control group.<sup>30</sup> In addition, administration of the probiotic was associated with improved fecal quality in the probiotic group.

## PREBIOTICS

A prebiotic is defined as a "nondigestible food ingredient that beneficially affects the host by selectively stimulating the growth of and/or activates the metabolism of one or a limited number of health-promoting bacteria in the intestinal tract."<sup>31</sup> The most common prebiotics studied are fructans, although other prebiotics such as mannans, lactosucrose, and lactulose are also being evaluated.

### Evidence for the Benefits of Prebiotics in Dogs and Cats

Unfortunately, there is a paucity of information evaluating the clinical benefits of prebiotics in dogs and cats. Most of the outcomes published in the literature are limited to nutrient digestibility, microbial concentrations in feces, and fecal protein catabolites that may not necessarily denote a health benefit to the patient. The effects of short-chain fructooligosaccharides (scFOS) were evaluated in a group of German Shepherd dogs suspected to have IgA deficiency.<sup>32</sup> Although the scFOS-supplemented dogs had decreased aerobic and anaerobic bacteria in intestinal biopsies, the findings of the study were clouded in light of the fact that anaerobic bacterial counts did not decrease in the intestinal fluid samples of the dogs supplemented with scFOS. The effects of various oligosaccharides have been tested in adult ileal cannulated dogs to evaluate the effects on ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations, ileal pH, ammonia, blood glucose, fecal consistency, and SCFA concentrations. Oligosaccharides (oligofructose, mannanoligosaccharides [MOS], and xylooligosaccharides) were each given at 0.5% of the diet in a Latin square design. The only significant finding was a decrease in fecal *Clostridium perfringens* populations in dogs fed MOS.<sup>33</sup> The effects of 3% inulin supplementation of elimination and hydrolyzed protein diets to healthy dogs was associated with a slight increase in fecal moisture content (not clinically relevant), decreased apparent nutrient digestibility coefficients of crude protein in dogs on the elimination diet, and no effect on fecal IgA concentrations.<sup>34</sup> Adult beagles fed diets containing cellulose or beet pulp plus oligofructose for 6 weeks were found to have similar fecal concentrations of total anaerobes and aerobes; however, the dogs fed oligofructose had fewer Enterobacteriaceae and clostridia and greater numbers of lactobacilli. In addition, dogs fed oligofructose had longer and heavier small intestines (35% heavier), and 37% more mucosal mass with consequent greater absorptive surface area.<sup>35</sup> Administration of 1% scFOS or 1% inulin to weanling puppies (12-week-old) during a pathogen (*Salmonella* Typhimurium) challenge was associated with a lower severity of enterocyte sloughing in puppies consuming the fructans versus the control diet. In addition, puppies fed inulin also had higher fecal acetate, total SCFA concentrations and lactobacilli, indicating that prebiotics appear to attenuate some of the adverse effects of *Salmonella* challenge, and may provide protection against infection in weanling puppies. Cats fed diets containing 0 or 0.75% oligofructose had significantly increased fecal concentrations of lactobacilli and decreased concentrations of *C. perfringens* and *E. coli* compared with controls.<sup>36</sup> A study evaluating the effects of short-chain fructooligosaccharides (0.5%) and galactooligosaccharides (0.5%) in healthy cats showed no effect on fecal protein catabolites, including ammonia, 4-methylphenol, indole, and biogenic amines, underscoring the fact that concentrations of oligosaccharides > 0.5% should be used to elicit a positive response.<sup>37</sup>

The first nutritional intervention study in dogs that used pyrosequencing to evaluate the effects of beet pulp fiber on fecal microbial composition was performed in 2010.<sup>38</sup> Dog fed a control diet were compared to dogs fed a diet containing 7.5% beet pulp in a crossover design with 14-day periods. *Eubacterium bali* and *Faecalibacterium prausnitzii*, both of which are butyrate producers, were overrepresented in the dogs fed the beet-pulp containing diet, suggesting a possible

anti-inflammatory effect of the beet pulp. In contrast, Fusobacteria was underrepresented in dogs fed the beet-pulp-containing diet. The effects of a synbiotic formulation to privately owned dogs for 21 days was evaluated via fecal 454 pyrosequencing.<sup>39</sup> The most abundant phylum in feces of all dogs was Firmicutes, followed by Actinobacteria and Bacteroidetes, regardless of synbiotic treatment. Synbiotic administration was associated with increased abundance of family Eubacteriaceae and phylum Fusobacteria. Recent studies have attempted to characterize the fecal microbiota of diarrheic dogs, as well as dogs with IBD. Reduced bacterial diversity as well as significantly higher proportion of Enterobacteriaceae were observed in duodenal brush borders from dogs with IBD compared to healthy controls.<sup>9</sup> Suchodolski *et al.* confirmed a bacterial dysbiosis in fecal samples of dogs with chronic diarrhea (IBD) and acute hemorrhagic diarrhea, and observed changes in the microbiome between acute and chronic disease states. The bacterial groups that were commonly decreased are important producers of short-chain-fatty acids and may play an important role in canine intestinal health.<sup>10</sup>

### **Fecal Microbiota Transplantation (FMT)**

Fecal microbial transplantation or infusion of a fecal suspension from a healthy individual into the gastrointestinal tract of another person to cure a specific disease, is best known as a treatment for recurrent *Clostridium difficile* infection (RCDI) in people,<sup>40</sup> and experience with FMT for ulcerative colitis and Crohn's disease is somewhat limited. Re-establishment of the wide diversity of intestinal microbiota via infusion of donor feces into the colon is the proposed mechanism in patients with RCDI and IBD. FMT has been performed in dogs with a variety of chronic enteropathies (Scott Weese, personal communication), and the author (SLM) is currently completing a clinical trial evaluating the efficacy of FMT in Macaques with chronic colitis. There are a variety of application methods to inoculate the donor feces into the patient, and most studies have relied upon colonoscopy over retention enemas or nasogastric tubes to facilitate inoculation of the feces in the ileum and colon.

Donor stool is most often used within 8 hours of passage; however, frozen stool samples from standardized donors have been thawed and colonoscopically administered 1–8 weeks after passage for treatment of RCDI with similar success rates to fresh stool.<sup>41</sup> Donor fecal samples must be carefully screened for bacterial, viral, and parasitic enteropathogens, and human donors are excluded if they have taken antibiotics within the preceding 3 months or are on immunosuppressive or chemotherapeutic agents. In addition, patients with IBD, atopy, GI malignancy, and chronic diarrhea are excluded from being donors. The amount of donor stool used has varied; however, in a recent review, relapse was four-fold greater when < 50 g of stool was used in people with RCDI.<sup>42</sup> Stool is most commonly suspended in nonbacteriostatic saline; however, other diluents (e.g., yoghurt and milk) have been successfully used. The donor stool is mixed with diluent to a consistency that can be injected via the biopsy channel of a colonoscope. The suspension should be filtered through gauze pads or strainer to remove large particulate matter before aspiration into the syringe. The volume of stool suspension that is deposited in the colon varies tremendously, although volumes of 300–500 mL are commonly used. A larger volume allows the clinician to deposit aliquots of 90–100 mL into multiple locations within the intestinal tract, including the jejunum, ileum, ascending colon, transverse colon, and upper descending colon.

### **CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS**

The potential benefits and specific indications for the administration of pro- and prebiotics to dogs and cats have yet to be fully defined, although our knowledge and understanding of the nature and diversity of the feline and canine intestinal microbiome during health and disease have expanded rapidly following the advent of high-throughput DNA-sequencing platforms. Defining a role for pro- and prebiotics as well as FMT in dogs and cats will require completion of prospective, randomized, placebo-controlled studies that rely on clinically relevant endpoints related to a particular physiological or pathological condition. Further studies are warranted to determine the need for probiotics to be live microorganisms following the provocative studies of

Rachmilewitz *et al.*, who documented that the beneficial effects of probiotics are mediated by their DNA, circumventing the need for live, viable bacteria.<sup>43</sup> Pro- and prebiotics do appear to have a potential role in the prevention and treatment of various gastrointestinal illnesses, but it is likely that benefits achieved are specific to the bacterial species used and to the underlying disease context.

## References

1. Savage DC. *Ann Rev Microbiol.* 1977;31:107–33.
2. Hooper LV, *et al.* *Science.* 2001;291:881–884.
3. Gronlund MM, *et al.* *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999;28:19–25.
4. Insoft RM, *et al.* *Pediatr Clin N Am.* 1996;43:551–71.
5. McCracken VJ, *et al.* *Cell Microbiol.* 2001;3:1–11.
6. Seksik P, *et al.* *Gut.* 2003;52:237–242.
7. Sokol H, *et al.* *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:106–111.
8. Nobaek S, *et al.* *Am J Gastroenterol.* 2000;95:1231–1238.
9. Xenoulis PG, *et al.* *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;66:579–589.
10. Suchodolski JS, *et al.* *PLoS One.* 2012;7:e51907.
11. Food and Agricultural Organization of the United States and World Health Organization (Online), 2001.
12. Weese JS. *Can Vet J.* 2003;44:982–3.
13. Tuomola E, *et al.* *Am J Clin Nutr.* 2001;73:393S–398S.
14. Coconnier MH, *et al.* *FEMS Microbiol Lett.* 1993;110:299–305.
15. Rolfe RD, *et al.* *J Infect Dis.* 1981;143:470–475.
16. Guarner F. In: Versalovic J, Wilson M, eds. *Therapeutic Microbiology: Probiotics and Related Strategies.* Washington DC: ASM Press; 2008: 255.
17. Sauter SN, *et al.* *Anim Nutr.* 2006;90:269.
18. Pascher M, *et al.* *Arch Anim Nutr.* 2008;62:107.
19. Vahjen W, *et al.* *Arch Anim Nutr.* 2003;57:229.
20. Swanson KS, *et al.* *J Nutr.* 2002;132:3721.
21. Biagi G, *et al.* *Vet Microbiol.* 2007;124:160.
22. Baillon MLA, *et al.* *Am J Vet Res.* 2004;65:338.
23. Benyacoub J, *et al.* *J Nutr.* 2003;133:1158–1162.
24. Rinkinen M, *et al.* *Vet Microbiol.* 2003;92:111.
25. Simpson KW, *et al.* *J Vet Intern Med.* 2009;23:476–481.
26. Benyacoub J, *et al.* *J Nutr.* 2005;135:1171–1176.
27. Bybee SN, *et al.* *J Vet Intern Med.* 2011;25:856–860.
28. Marshall-Jones ZV, *et al.* *Am J Vet Res.* 2006;67:1005.
29. Veir JK, *et al.* *Vet Ther.* 2007;8:229.
30. Koepfel KN, *et al.* *J S Afr Vet Assoc.* 2006;77:127.
31. Gibson GR, *et al.* *J Nutr.* 1995;125:1401–12.
32. Willard MD, *et al.* *Am J Vet Res.* 1994;55:654–659.
33. Strickling JA, *et al.* *Anim Feed Sci Technol.* 2000;86:205–219.
34. Verlinden A, *et al.* *Br J Nutr.* 2006;96:936–944.
35. Buddington RK, *et al.* *Am J Vet Res.* 1999;60:354–358.
36. Sparkes AH, *et al.* *Am J Vet Res.* 1998;59:436–440.
37. Kanakupt A, *et al.* *J Anim Sci.* 2011;89:1376–1384.
38. Middlebos IS, *et al.* *PLoS One.* 2010;5:e9768.
39. Garcia-Mazcorro JF, *et al.* *FEMS Microbiol Ecol.* 2011;78:542–554.
40. Song Y, *et al.* *PLoS One.* 2013;8:e81330.
41. Hamilton MJ, *et al.* *Am J Gastroenterol.* 2012;107:761–767.
42. Gough E, *et al.* *Clin Infect Dis.* 2011;53:994–1002.
43. Rachmilewitz D, *et al.* *Gastroenterol.* 2004;126:520–528.

## SPEAKER INFORMATION

(click the speaker's name to view other papers and abstracts submitted by this speaker)

[Stanley L. Marks, BVSc, PhD, DACVIM \(Small Animal Internal Medicine, Oncology\), DACVN](#)

University of California-Davis

Davis, CA, USA

URL: <http://www.vin.com/doc/?id=6293091>