



Valutazione clinica ed effetto sul microbiota fecale di una formulazione probiotica in cani affetti da diarrea acuta non complicata. Studio clinico randomizzato a doppio cieco placebo-controllo

Introduzione e scopo del lavoro: l'effetto sul microbiota dell'utilizzo dei probiotici in corso di diarrea acuta è in larga parte sconosciuto. Lo scopo di questo lavoro è di studiare gli effetti di un probiotico in cani con diarrea acuta valutandone durata, qualità delle feci e composizione del microbiota fecale.

Materiali e metodi: sono stati arruolati cani con diarrea acuta, randomizzati in due gruppi a cui è stato fornito il probiotico (Gruppo A) o il placebo (Gruppo B) per 8 giorni (in doppio cieco). Sono stati valutati punteggio fecale (FS) e frequenza di defecazione; la composizione del microbiota è stata valutata ai giorni 0 (T0), 8 (T1) e 16 (T2).

Risultati: sono stati inclusi 30 cani suddivisi in gruppo A (n=15) e gruppo B (n=15). Non è stata rilevata differenza statistica tra i gruppi nel valore di FS a T0 e nel tempo di risoluzione della diarrea. I Clostridiales aumentavano nel gruppo B a T2, mentre gli Enterobacteriales diminuivano nel gruppo A a T2. *Lactobacillus* spp. era 450 volte più abbondante nel gruppo A rispetto al gruppo B a T2.

Discussione: sebbene non siano stati rilevati dati statisticamente significativi nei parametri clinici tra i gruppi, l'aumento dei lattobacilli nel gruppo A a T2 potrebbe essere benefico per il ripristino della flora microbica intestinale eubiontica, sfavorendo quella patogena.

Simone Peletto¹
Med Vet

Francesco Cerutti¹
Med Vet

Riccardo Ferriani²
Med Vet

Cristiana Maurella¹
Med Vet, MS

Barbara Bruno³
Med Vet, PhD

Antonio Borrelli³
Med Vet, PhD, MS

Pietro Ruggiero²
Med Vet

Enrico Bottero²
Med Vet

INTRODUZIONE

Le gastroenteriti acute rappresentano uno dei problemi di più comune riscontro nella pratica clinica veterinaria. Le cause della diarrea acuta sono molteplici e includono disordini alimentari, infezioni parassitarie o protozoarie, intolleranze alimentari, cambi di dieta, stress e cause idio-

patiche. La diarrea acuta (di durata inferiore a 7-14 gg) è spesso autolimitante e responsiva alla terapia sintomatica, limitando l'uso degli antibiotici ai casi in cui sono presenti segni sistemici d'infezione o in caso di peggioramento clinico.¹ L'antibioticoterapia, infatti, può causare alterazioni

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino.

² Gruppo Endovet Italia.

³ Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Torino.

*Corresponding Author (antonio.borrelli@unito.it)

L'utilità di probiotici nel trattamento della diarrea acuta del cane è un ambito della ricerca da approfondire.

Ricevuto: 30/11/2020 - Accettato: 25/06/2021

del microbiota intestinale che possono perdurare per mesi,^{2,3,4} inoltre l'uso inappropriato degli antibiotici può favorire lo sviluppo di antibiotico-resistenza.^{5,6}

Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, i probiotici sono microrganismi vivi che, quando somministrati in quantità adeguata, forniscono beneficio all'organismo ospite.⁷ Il loro utilizzo è ampiamente consolidato in medicina umana, dove vi è evidenza che abbiano un effetto benefico in corso di diarrea associata a terapia antibiotica, alla sindrome del colon irritabile e di colite necrotizzante.⁸ L'interesse verso i probiotici è correlato all'importanza che il microbiota ha assunto negli ultimi 10 anni per la comprensione e, potenzialmente, per il trattamento di numerose condizioni fisiologiche e patologiche.

Negli ultimi anni, anche in medicina veterinaria, l'uso dei probiotici ha trovato un impiego sempre maggiore per la gestione sintomatica della diarrea acuta; esistono alcuni studi in cui la loro somministrazione è variabilmente associata a miglioramento della sintomatologia clinica, con riduzione dell'incidenza e della durata degli episodi diarroidi.^{9,10,11} Il loro esatto meccanismo d'azione non è ancora chiaro, ma si suppone che agiscano come antagonisti di batteri patogeni mediante diversi possibili meccanismi: competizione per le sostanze nutritive, produzione di sostanze antimicrobiche, modulazione della risposta immunitaria mucosale e stimolazione della risposta immunitaria innata e/o acquisita. Una recente metanalisi, che aveva lo scopo di valutare l'evidenza clinica dell'uso dei probiotici, ha però messo in luce che solo pochi degli studi effettuati fino ad ora sono comparabili e che i dati forniti sono ancora insufficienti per valutarne la reale efficacia.⁸ Nello specifico, esistono pochi studi che indagano l'interazione dei probiotici con il microbiota in corso di diarrea acuta.

Lo scopo di questo studio è valutare gli effetti clinici della somministrazione di una formulazione probiotica in cani con diarrea acuta utilizzando come variabili la durata della diarrea e la qualità delle feci. Inoltre è stata valutata la composizione del microbiota fecale prima e dopo 8 e 16 giorni dall'inizio del trattamento con il probiotico.

MATERIALI E METODI

Tipo di studio, criteri d'inclusione e analisi dei dati

Lo studio è un trial clinico randomizzato in doppio cieco, approvato dalla commissione di Etica e Benessere Animale del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università

degli Studi di Torino (n° 1876; 6/12/2017). La dimensione campionaria è stata stabilita considerando una potenza dell'80%, un livello di significatività del 5%, una potenziale correlazione tra misurazioni ripetute pari a 0,5 e una varianza dell'errore pari a 58; con questi criteri si è ottenuto che ci volessero 15 pazienti per ogni ramo dello studio per rilevare una dimensione dell'effetto di 0,6747.

Il criterio d'inclusione per l'arruolamento nello studio era la presenza di diarrea acuta non complicata in cani adulti, insorta da meno di 24 ore e definita da un punteggio fecale (FS) compreso fra 4 e 7. I criteri di esclusione comprendevano: somministrazione di farmaci come antibiotici, antinfiammatori steroidei e non steroidei, prebiotici, probiotici, simbiotici e cambi di dieta nei 30 gg precedenti, presenza di ematochezia e/o melena, dolorabilità addominale, presenza di vomito, ipertermia, depressione del sensorio, bradicardia o tachicardia e disidratazione. Sono stati considerati come criteri di esclusione anche: età <1 anno o >10 anni, razze con predisposizione ad enteropatie infiammatorie croniche, come Pastore Tedesco, Weimaraner, Rottweiler, Basenji, Bulldog Francese, Setter Irlandese e Norsk Lundehund, e la mancata firma del consenso informato da parte dei proprietari.

Gli animali inclusi sono stati suddivisi in due gruppi a cui sono stati somministrati Florentero Act® (Istituto Candioli Pharma, Beinasco TO) (Gruppo A) o il placebo (Gruppo B). La scelta dell'assegnazione a un ramo o all'altro dello studio è avvenuta in maniera randomizzata (tramite software Excel) e cieca (i prodotti erano identici per forma, aspetto e confezionamento). Il dosaggio era di una compressa ogni 7 kg di peso, suddivisa in due somministrazioni giornaliere (OS, ogni 12 ore), per un totale di 8 giorni. In ogni compressa di probiotico la ditta riporta che sono presenti *Enterococcus faecium* UFC 3,4×10⁸ e *Lactobacillus acidophilus* UFC 1,0×10¹⁰.

La valutazione del FS è stata eseguita giornalmente, secondo i criteri del Nestle Purina System Fecal Score,¹² basato sulla valutazione visiva dell'aspetto delle feci e assegnazione di un punteggio su una scala numerica da 1 a 7. Il valore 1 indica delle feci molto secche e dure, il valore 7 delle feci liquide, mentre 2 è il valore di normalità. Per facilitare l'assegnazione del FS, ogni proprietario è stato opportunamente istruito e fornito di una scheda corredata di immagini e relativa descrizione delle caratteristiche fecali per ogni punteggio. La risoluzione della diarrea è stata definita da un FS ≤3. È stato inoltre richiesto ai proprietari di non cambiare l'alimentazione abituale del proprio cane e di non introdurre farmaci o altri integratori per tutta la durata dello studio.

Analisi del microbiota fecale

Per la valutazione del microbiota fecale i campioni sono stati prelevati nei seguenti momenti: T0 = prima dell'inizio della terapia; T1 = ottavo giorno dopo inizio di terapia,

Due gruppi di cani affetti da diarrea acuta sono stati inclusi e trattati con placebo o probiotico per valutare l'effetto sulla sintomatologia e sul microbiota.

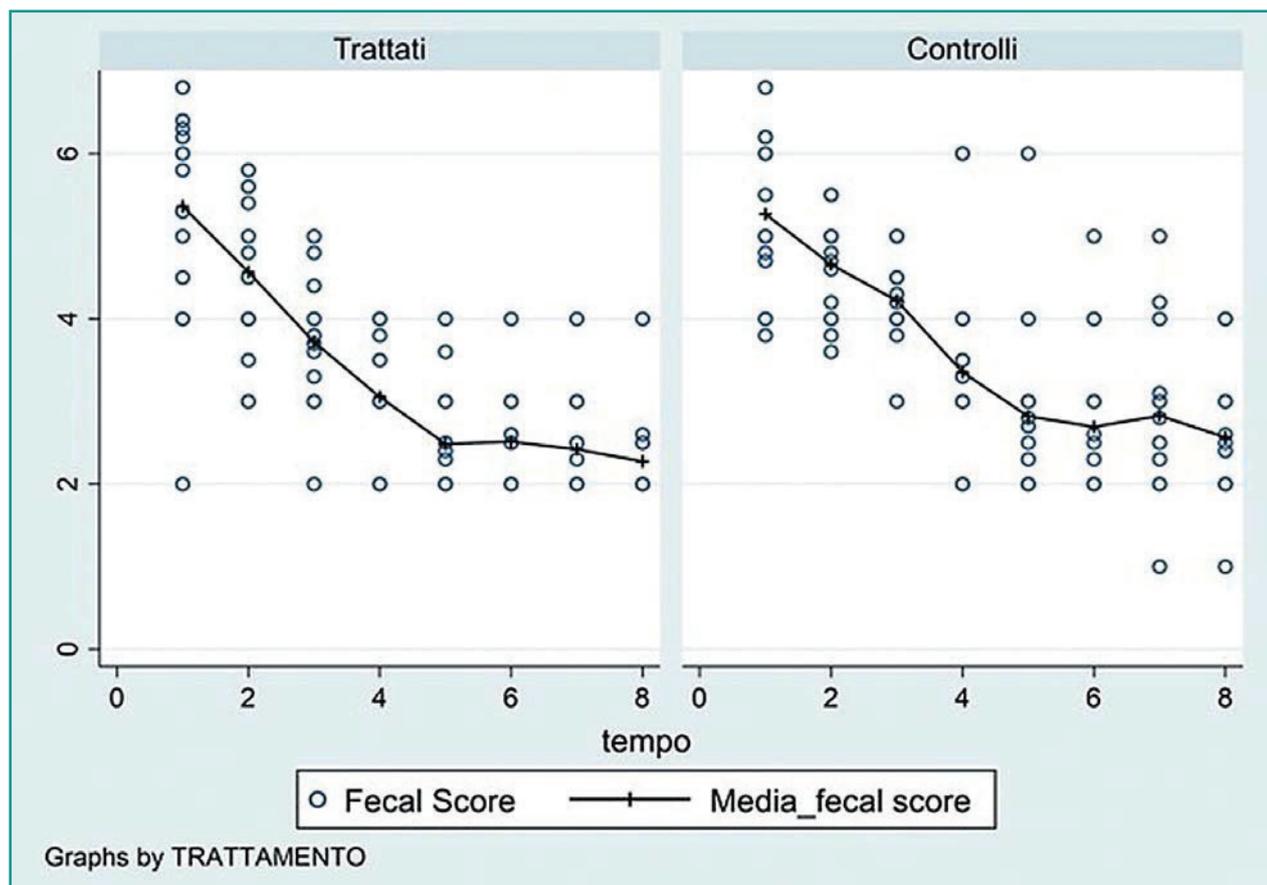


Figura 1 - Valore puntuale del fecal score nei due gruppi e valore medio lungo il tempo.

T2 = sedicesimo giorno dopo inizio terapia. È stata analizzata la composizione del microbiota identificando le famiglie dei batteri mediante l'utilizzo del kit OMNIgene•GUT/OMR-200 (DNA Genotek, Ottawa, ON, Canada). Il DNA è stato estratto seguendo le indicazioni del kit di conservazione e utilizzando il kit QIAamp PowerFecal DNA (Qiagen, Hilden, Germany), nella versione automatizzata presente nello strumento QIAcube (Qiagen), seguendo il protocollo IRT®. Si è quindi proceduto con l'estrazione del DNA da una MOCK community (ZymoBIO-MICS™ Microbial Community Standard, Zymo Research, Irvine, CA, USA), utilizzando un bianco di estrazione rispettivamente come controllo positivo e controllo negativo.

Metabarcoding

Per il metabarcoding del 16S ribosomiale è stato seguito il protocollo suggerito da Illumina (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation), utilizzando i primer 515FB-806RB con target V4 (Earth Microbiome Project).¹³ Il prodotto della prima PCR è stato visualizzato su gel di agarosio al 2%, per verificare l'avvenuta amplificazione del target. Dopo la purificazione mediante biglie magnetiche (AMPure XP), è stata eseguita la Index PCR, assegnan-

Il microbiota dei due gruppi di cani è stato analizzato prima e dopo il trattamento con placebo o probiotico.

do ad ogni campione una coppia univoca di index (sequenze di 8 nucleotidi diversi utili per distinguere i singoli campioni).

Dopo la seconda purificazione, le library sono state quantificate mediante Qubit dsDNA HS e la dimensione media degli ampliconi è stata valutata sullo strumento BioAnalyzer 2100 mediante il kit Agilent High Sensitivity DNA. Le library sono quindi state normalizzate e unite in pool, quantificato mediante NEBNext Library Quant Kit for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) e sottoposto a sequenziamento paired-end 2x200 su piattaforma Illumina con MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle).

Analisi bioinformatica

I dati generati dal sequenziamento massivo sono stati analizzati mediante una pipeline in R, utilizzando funzioni integrate nei pacchetti DADA2 e Phyloseq. Dopo la rimozione dei primer con cutadapt v1.18,¹⁴ le read sono state filtrate per qualità, raggruppate e classificate utilizzan-

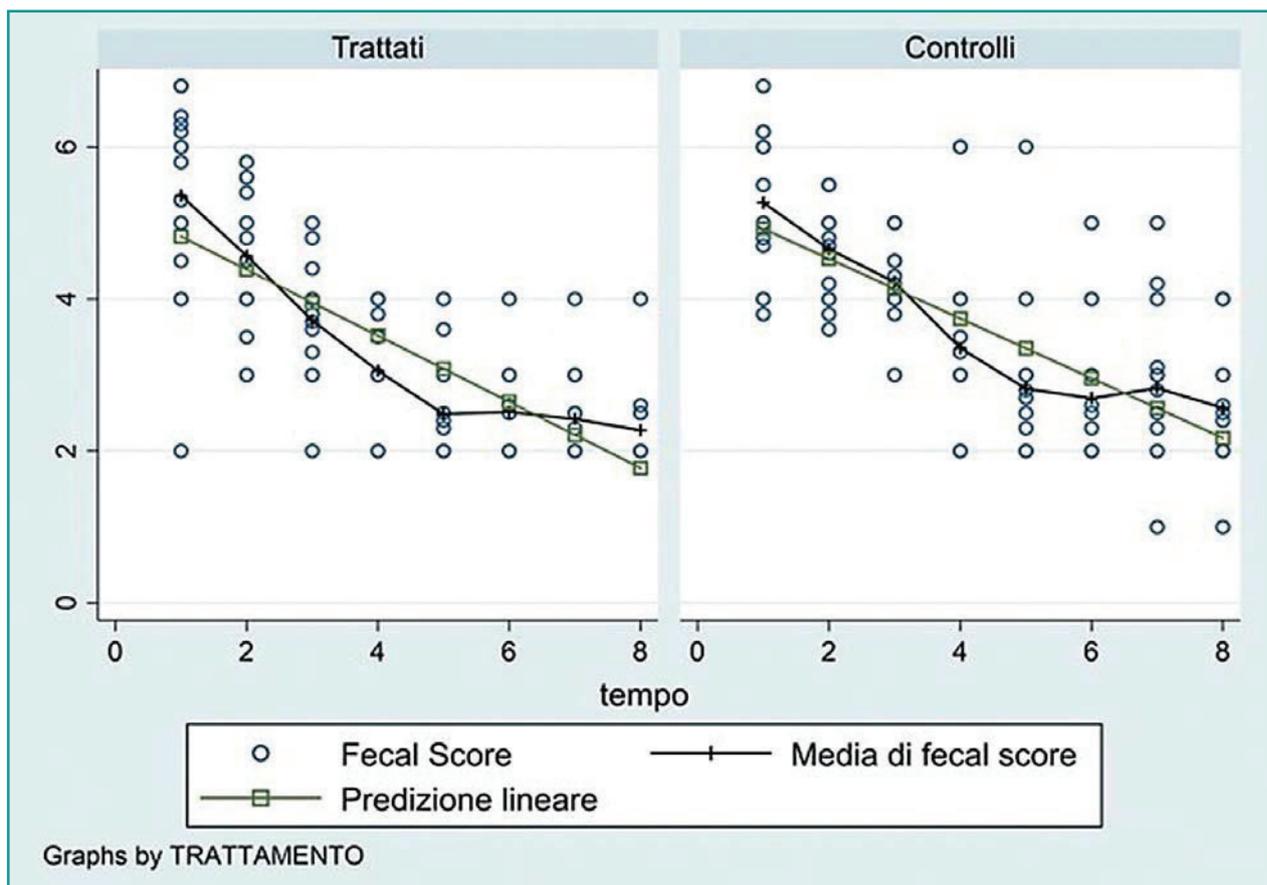


Figura 2 - Valori puntuali dello score, valori medi e predizione lineare come risultante dal modello gerarchico.

do il database RDP per creare una OTU table.¹⁵ Sono state valutate la diversità alfa (diversità all'interno dei gruppi) e la diversità beta (metodo di Bray-Curtis e Principal Coordinates Analysis, PcoA).

L'analisi bioinformatica è stata eseguita utilizzando il test Kruskal-Wallis per la diversità alfa e mediante il test PERMANOVA, implementato nella funzione *adonis* del pacchetto del software R Phyloseq, per la diversità beta.^{16,17} L'analisi differenziale è stata condotta con il pacchetto DeSeq, considerando l'abbondanza sia per ASV sia per generi raggruppati.¹⁵

Analisi statistica

Per l'analisi dei dati è stato costruito un apposito database; per valutare se vi fosse una differenza tra il gruppo trattato con probiotico (Gruppo A) e il gruppo trattato con placebo (Gruppo B) al tempo T=0 è stato utilizzato il test di Student.

La differenza nella remissione della diarrea tra i due gruppi è stata indagata utilizzando un modello gerarchico di regressione lineare a effetti misti, in cui l'effetto casuale è dato dal singolo individuo. La normalità dei dati è stata verificata con il test di Shapiro-Wilk.

È stata considerata significativa una $p < 0,05$.

I dati sono stati elaborati con il software Stata 15.1.

Trenta cani sono stati inclusi e suddivisi in due gruppi tra cui non è stata riscontrata differenza nel tempo di risoluzione della diarrea, ma il gruppo trattato con il probiotico ha avuto un incremento di lactobacilli.

RISULTATI

Nel periodo compreso tra agosto 2017 e luglio 2018 sono stati arruolati 37 cani. Sono stati inclusi nell'analisi 30 cani, perchè 7 sono stati esclusi per mancato rispetto dei criteri di inclusione o per mancanza di collaborazione dalla parte del proprietario.

Il peso medio era di 18 kg (DS±3), ed erano suddivisi in 16 femmine (10 sterilizzate) e 14 maschi (3 castrati), appartenenti alle seguenti razze: 14 meticci, 4 Labrador, 4 Golden Retriever, 3 Beagle, 3 Jack Russel, 2 Bassotti tedeschi. Quindici soggetti hanno ricevuto il probiotico (Gruppo A), e 15 il placebo (Gruppo B) e nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata tra i due gruppi in termini di peso, età, sesso.

Il valore medio di FS al tempo T0 per il gruppo A era pari a 5,26 (DS±1), mentre per il gruppo B era di 5,36 (DS±1,3), senza differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ($p=0,82$). Il valore del punteggio fecale è pas-

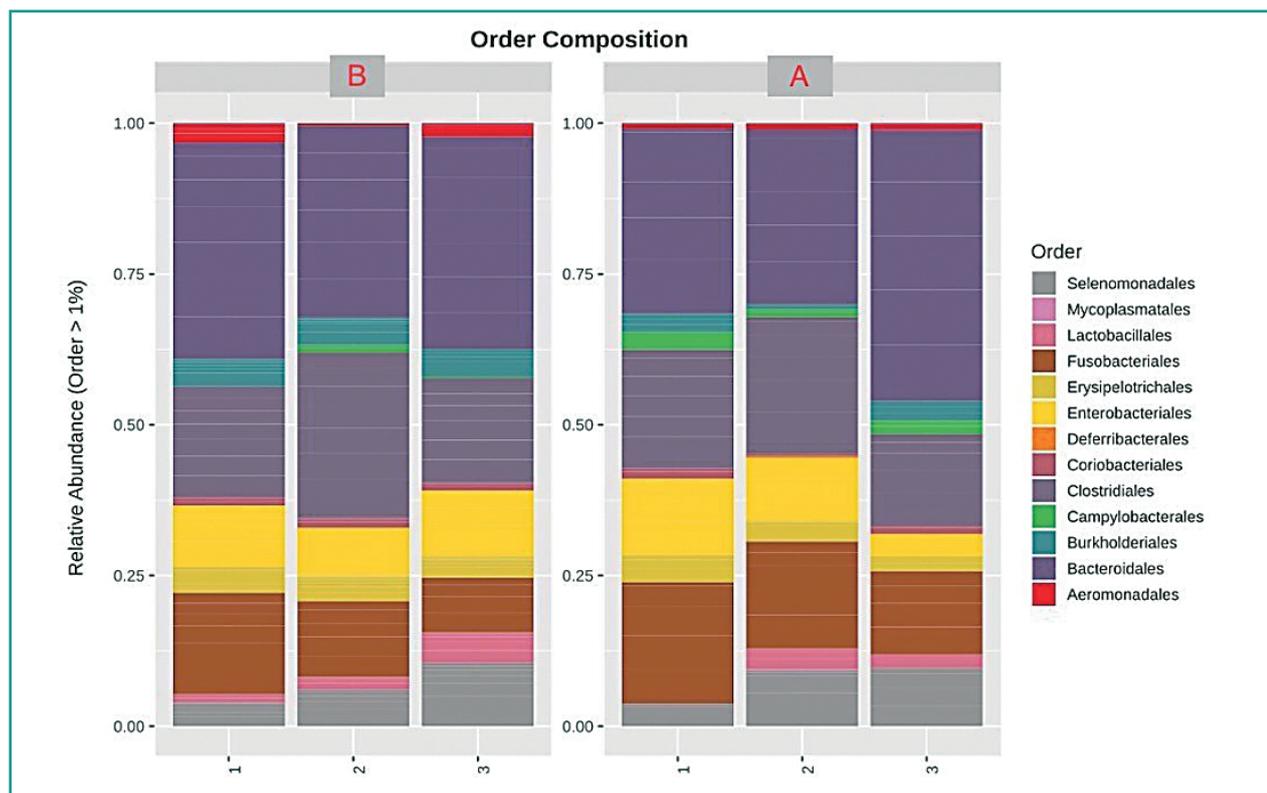


Figura 3 - Barplot della composizione del microbiota dei cani sottoposti a trattamento A (trattati) e B (placebo) a livello di Ordine.

sato da una media di 5,20 (giorno 1) a 2,36 (giorno 8) nel gruppo trattato con probiotico (Gruppo A), e da una media di 5,30 (giorno 1) a 2,69 (giorno 8) nel gruppo trattato con placebo (Gruppo B). Nelle figure 1 e 2 viene rappresentata la decrescita del FS nel tempo nei due gruppi. Nella Tabella 1 sono rappresentati i risultati del modello gerarchico: si evince come vi sia una differenza statisticamente significativa tra lo score iniziale e quello finale, mentre non viene evidenziata altrettanta significatività tra i due gruppi.

La risoluzione della diarrea (FS ≤ 3) è avvenuta in media in 2,71 giorni nei cani del gruppo A (trattati) e 4,13 giorni nei cani del gruppo B (placebo).

La frequenza delle defecazioni è passata da una media di 3,1 eventi giornalieri al giorno 1, ad una media di 2 eventi giornalieri al giorno 8. Anche rispetto alla frequenza delle defecazioni l'analisi dei dati dimostra che nei cani trat-

tati con il probiotico la frequenza delle defecazioni è diminuita da una media di 3,43 episodi giornalieri (giorno 1) ad una media di 1,89 (giorno 8). Nei cani trattati invece con il placebo, si passa da una frequenza media di 3 defecazioni giornaliere (giorno 1) ad una media di 2,13 (giorno 8).

Analisi del microbiota fecale

La comunità microbica totale, considerando tutti i campioni insieme, era composta principalmente dai seguenti Phyla: Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria e in misura minore da Proteobacteria, Actinobacteria, Tenericutes e Deferribacteres, mentre a livello di ordine sono stati identificati: Bacteroidales, Clostridiales, Fusobacteriales, Enterobacteriales, Selenomonadales, Erysipelotrichales, Burkholderiales, Lactobacillales, Aeromonadales, Campylobacteriales, Coriobacteriales, Mycoplasmatales, Deferribacteriales.

Tabella 1 - Risultati del modello gerarchico; lo score diminuisce in maniera significativa lungo il tempo ($\beta=-0,435$, $p=0,000$), ma non c'è differenza tra i due gruppi ($p=0,836$), né considerando l'interazione tra il gruppo e il tempo ($p=0,354$).

| | Coefficiente β | Errore Standard | t | P > t | (95% IC) | |
|--------------|----------------------|-----------------|---------|-------|----------|--------|
| Tempo | -0,435 | 0,032 | -13,660 | 0,000 | -0,498 | -0,372 |
| Gruppo | | | | | | |
| Controlli | 0,059 | 0,282 | 0,210 | 0,836 | -0,518 | 0,636 |
| Gruppo*Tempo | | | | | | |
| Controlli | 0,042 | 0,045 | 0,930 | 0,354 | -0,047 | 0,131 |
| Intercetta | 5,256 | 0,199 | 26,460 | 0,000 | 4,849 | 5,663 |

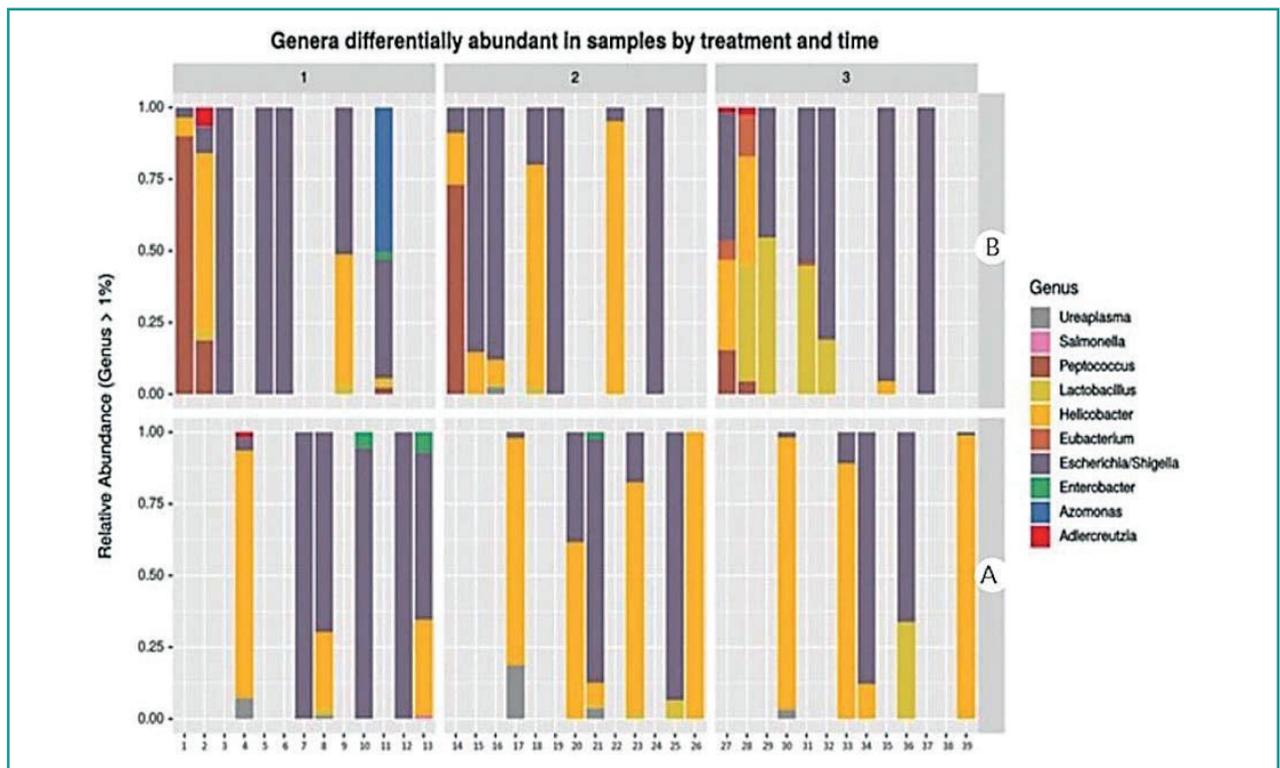


Figura 4 - Abbondanza relativa dei generi con una differenza di quantità statisticamente significativa nei campioni a seconda del tempo e del trattamento.

bacterales. L'analisi del microbiota a livello di ordine, non ha evidenziato differenze di composizione significative tra i gruppi A e B.

Considerando il parametro trattamento, le analisi di diversità alfa (diversità *intraindividuale* del microbiota) e beta (diversità *interindividuale* del microbiota) non hanno rivelato alcuna differenza nel numero e nell'abbondanza degli Amplicon Sequence Variant (ASV) che compongono i due gruppi di animali A e B (alfa $p=0,7$; beta $p=0,09$).

Raggruppando i campioni per tempo di campionamento e trattamento, alcuni ordini hanno un'evoluzione nel tempo diversa nel gruppo A e nel gruppo B (Fig. 3). Ad esempio, l'ordine Clostridiales è aumentato in T2 nel gruppo B ma non in A. L'ordine Enterobacteriales presenta un andamento pressoché costante nel gruppo B mentre diminuisce a T2 nel gruppo A. I dati sono stati filtrati in base all'abbondanza delle differenze nei generi per visualizzare meglio la loro distribuzione tra i campioni e gli individui (Fig. 4). In particolare, il genere *Lactobacillus* è 450 volte più abbondante nel gruppo A rispetto a quello B al giorno 8. Al giorno 16, i generi *Salmonella* ed *Helicobacter* sono più abbondanti nel gruppo A, mentre *Escherichia/Shigella* è più abbondante nel gruppo B (Fig. 4).

DISCUSSIONE

Questo studio ha valutato l'effetto di una formulazione probiotica sull'andamento clinico e sul microbiota fecale

in cani affetti da diarrea acuta non complicata. Il miglioramento del FS nel tempo è stato evidenziato sia nei cani trattati con il probiotico sia nei cani trattati con il placebo. Seppur in modo non statisticamente significativo, nel gruppo A (probiotico) il miglioramento dello score è stato raggiunto più rapidamente. Questo dato si differenzia da quanto ottenuto da altri autori in studi simili,^{9,10} forse a causa del numero ridotto di pazienti incluso nel nostro studio. Un'altra ricerca¹⁸ ha ottenuto un miglioramento statisticamente significativo nell'aspetto delle feci utilizzando uno score "Waltham Faeces Scoring System", suddiviso in un numero maggiore di intervalli (9 rispetto a 7).

Sembra che l'utilizzo del probiotico incrementi i batteri utili alla salute dell'intestino, a scapito di quelli dannosi.

Dato che l'utilizzo del FS implica un grado di soggettività e difficoltà di comparazione nel caso si utilizzino score differenti, nel nostro studio abbiamo inserito la valutazione del microbiota, analizzando le eventuali variazioni nel gruppo probiotico vs. placebo. Studi precedenti hanno dimostrato che i cani con diarrea acuta non complicata, abbiano alterazioni significative nel loro microbiota (es. riduzione della biodiversità, alterazione delle comunità microbiche, aumento dell'indice disbiotico).^{6,19,20}

Il dato più interessante nel nostro studio è rappresentato dall'aumento della presenza di lattobacilli a T2 nel gruppo A (probiotico) rispetto al gruppo B (placebo). Infatti, gli effetti benefici dei lattobacilli sono numerosi e riferibili alla produzione di molecole quali acidi organici (es. l'etanolo) e batteriocine, che modificano il pH intestinale e inibiscono la colonizzazione mucosale dei germi opportunisti.²¹

L'utilizzo di probiotici, in corso di sindrome da diarrea emorragica acuta secondaria a *Clostridium perfringens*, riduce la percentuale di questo batterio al giorno 21.²² È possibile, inoltre, che essi abbiano un effetto benefico anche sul sistema immunitario, regolando la produzione di citochine pro-infiammatorie e favorendo la risposta dei linfociti T.²³ Sebbene non esista un dato simile in pazienti con diarrea acuta non complicata, uno studio sul microbiota di cani con diarrea cronica ha rilevato una notevole riduzione di *Lactobacillus* spp. ed *Enterococcus* spp. rispetto ai cani sani²⁴, in grado di svolgere un potenziale ruolo probiotico favorevole alla salute dell'ecosistema intestinale nei cani sani.²⁴ Infatti uno studio effettuato su pazienti con diarrea cronica trattati con probiotico per 60 giorni ha mostrato un incremento del numero di lattobacilli e bifidobatteri rispetto alla popolazione controllo.²²

È anche noto che i bambini con diarrea acuta in fase sintomatica mostrino un numero di lattobacilli nettamente inferiore rispetto alle fasi di remissione della malattia.²⁵ Le limitazioni di questo studio comprendono il fatto di non aver individuato la causa primaria scatenante la diarrea. Nella pratica quotidiana, in corso di diarrea acuta, non sempre è possibile individuare il fattore eziologico primario. Infatti, se alla visita clinica il cane si presenta in buone condizioni generali, si può scegliere di intraprendere una terapia sintomatica. L'uso del probiotico è una opzione valida in corso di diarrea acuta, da prediligere rispetto all'utilizzo degli antibiotici. L'utilizzo di antibiotico (metronidazolo) vs probiotico nella diarrea acuta²⁶ del cane, non ha mostrato differenza significativa nei tempi di remissione. In contrasto, un recente studio ha evidenziato

che la somministrazione di metronidazolo in corso di diarrea acuta sia in grado di ridurre la durata della sintomatologia, rispetto al placebo.²⁷ Data la presenza di risultati contrastanti e il rischio di sviluppo di antibiotico-resistenza, la somministrazione di antibiotico in corso di diarrea acuta non complicata, dovrebbe essere evitato.

Per il tipo e la concentrazione dei batteri vitali presenti nel probiotico utilizzato ci si è basati sulle dichiarazioni della ditta, manca la valutazione da parte di un laboratorio indipendente. Se la concentrazione di batteri vitali fosse stata inferiore a quella dichiarata, questo fatto potrebbe aver influito sui nostri risultati.

Il numero ridotto di cani inclusi rappresenta un altro limite del nostro studio. Avendo scelto di eseguire il sequenziamento del gene 16S mediante NGS, il costo elevato di tale analisi ha influito sulla numerosità campionaria.

Questo studio presenta dei limiti, ma evidenzia una modifica del microbiota in seguito alla somministrazione di probiotici.

Un altro limite individuato potrebbe essere l'aver lasciato ai proprietari la valutazione del FS. Questo potrebbe aver influito sulla mancanza di significatività statistica tra i due gruppi; infatti i proprietari hanno avuto la tendenza a preferire i valori estremi all'interno della scala di FS trascurando i punteggi intermedi.

Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio, è possibile affermare che il probiotico (Florentero Act) è efficace nel supporto di un microbiota composto in prevalenza da famiglie batteriche eubiotiche a scapito di quelle patogene.

Ulteriori studi eseguiti aumentando la numerosità della popolazione, applicando categorie eziologiche più definite e campionamenti fecali più numerosi e condotti per un periodo di tempo più prolungato, sarebbero necessari per comprendere meglio il ruolo del probiotico nella modificazione del microbiota, in corso di diarrea acuta.

PUNTI CHIAVE

- Questo è uno studio prospettico randomizzato in doppio-cieco che valuta l'utilizzo di un probiotico in caso di diarrea acuta.
- Nessuna differenza è stata riscontrata tra il tempo di remissione dei segni clinici tra chi assumeva placebo e chi probiotico, ma si è constatato un aumento dei lattobacilli nel secondo gruppo.
- I lattobacilli fanno parte dei batteri eubiotici utili per il benessere dell'intestino e inibiscono i batteri nocivi.

Clinical evaluation and effect on fecal microbiota of a probiotic formulation in dogs with acute non-concerning diarrhea. A randomized double blinded placebo-controlled clinical trial

Summary

Introduction and aim of the study: probiotics supplementation during acute diarrhea in dogs have been investigated in few clinical studies, although the effect on gut microbiome is still largely unknown.

The aim of the study was to evaluate the effects of probiotics in dogs with acute non-concerning diarrhea. Duration of clinical signs, fecal score (FS) and microbiome composition were analyzed.

Materials and methods: A randomized, double-blinded placebo controlled clinical trial was performed, including dogs experiencing an episode of acute diarrhea. Group A was assigned to probiotic while Group B to placebo, both for 8 days. Fecal score (FS) and defecation frequency were evaluated. Microbiota composition was assessed at days 0 (T0), 8 (T1) and 16 (T2).

Results: 30 dogs were enrolled and divided in Group A (n=15) and B (n=15). No statistical differences were noted for FS at T0, nor the diarrhea resolution time. In Group B, Clostridiales count was increased at T2, while in Group A Enterobacteriales count was decreased at T2. *Lactobacillus* spp. was 450 times increased in Group A at T2.

Discussion: although no clinical statistical significance was present among the two groups, the increase of *Lactobacillus* spp. at T2 in Group A may potentially have a beneficial effect on the recovery of the eubiotic gut microbiota, counteract the pathogenic one.

BIBLIOGRAFIA

- Unterter S, Strohmeyer K, Kruse BD, *et al.* Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25:973-979, 2011.
- Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, *et al.* The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology* 6:e280, 2008.
- Torres-Henderson C, Summers S, Suchodolski J, *et al.* Effect of *Enterococcus faecium* Strain SF68 on gastrointestinal signs and fecal microbiome in cats administered amoxicillin-clavulanate. *Topics in Companion Animal Medicine* 32:104-108, 2017.
- Pilla R, Gaschen FP, Barr JW, *et al.* Effects on metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 34:1853-1866, 2020.
- Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, *et al.* Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal* 340:c2096, 2010.
- Chaitman J, Ziese AL, Pilla R, *et al.* Fecal microbial and metabolic profiles in dogs with acute diarrhea receiving either fecal microbiota transplantation or oral metronidazole. *Frontiers in Veterinary Science* 7:192, 2020.
- Hill C, Guarner F, Reid G, *et al.* The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Review Gastroenterology & Hepatology* 11:506-514, 2014.
- Jensen AP, Bjonvad CR. Clinical effects of probiotics in prevention or treatment of gastrointestinal disease in dogs: A systematic review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33:1849-1864, 2019.
- Kelley RL, Minikhiem D, Kiely B, *et al.* Clinical benefits of probiotic canine-derived *Bifidobacterium animalis* strain AHC7 in dogs with acute idiopathic diarrhea. *Veterinary Therapeutics* 10:121-130, 2009.
- Herstad HK, Nesheim BB, L'Abée-Lund T, *et al.* Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis: a controlled clinical trial. *Journal of Small Animal Practice* 51:34-38, 2010.
- Rose L, Rose J, Gosling S, *et al.* Efficacy of a probiotic-prebiotic supplement on incidence of diarrhea in a dog shelter: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 31:377-382, 2017.
- Fecal Scoring Chart. Available at: <https://www.proplanveterinarydiets.ca/wp-content/uploads/2016/04/PPPVD-Fecal-Scoring-Chart-EN-FINAL.pdf>. Ultimo accesso al sito 25 settembre 2020.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (Suppl 1):4516-22, 2011.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. Journal*, 17:10-12, 2011.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods* 13:581-583, 2016.
- McMurdie PJ, Holmen S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8: e61217, 2013.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R. *et al.* Package 'vegan'; Community ecology package, version 2.9 (2013): 1-295.
- Bottero E, Innella G, Astorina S, *et al.* Valutazione dell'efficacia di una formulazione probiotica commerciale costituita da *Enterococcus faecium* in corso di diarrea acuta. *Veterinaria* 31:169-178, 2017.
- Honnefer JB, Minamoto Y, Suchodolski J. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *Journal of World Gastroenterology* 20:16489-16497, 2014.
- Guard BC, Barr JW, Reddivari L, *et al.* Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PLoS One* 22 10: e0127259, 2015.
- Hill C, Guarner F, Reid G, *et al.* Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11:506-14, 2014.
- Ziese AL, Suchodolski JS, Hartmann K, *et al.* Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. *PLoS One* 13: e0204691, 2018.
- Xu H, Zhao F, Hou Q, *et al.* Metagenomic analysis revealed beneficial effects of probiotics in improving the composition and function of the gut microbiota in dogs with diarrhoea. *Food & Function* 10:2618-2629, 2019.
- Jia J, Frantz N, Khoo C, *et al.* Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhoea. *FEMS Microbiology Ecology* 71:304-312, 2010.
- Balamurugan R, Janardhan HP, George S, *et al.* Molecular studies of fecal anaerobic commensal bacteria in acute diarrhea in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 46:514-519, 2008.
- Shmalberg J, Montalbano C, Morelli G, *et al.* A randomized double blinded placebo-controlled clinical trial of a probiotic or metronidazole for acute canine diarrhea. *Frontiers in Veterinary Science* 6:163, 2019.
- Langlois DK, Koenigshof AM, Mani R. Metronidazole treatment of acute diarrhea in dogs: a randomized double blinded placebo-controlled clinical trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 34:98-104, 2020.