



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Corso di laurea magistrale in

PRODUZIONI ANIMALI INNOVATIVE E SOSTENIBILI

**APPROCCIO MULTI-OMICO ALLO STUDIO DEL
MICROBIOTA NEGLI ANIMALI DA REDDITO**

MULTI-OMIC APPROACH TO THE STUDY OF MICROBIOTA IN
FARM ANIMALS

Relatore

Prof.ssa Maria Cristina OSSIPRANDI

Tesi di Laurea di

Martina BERNARDIS

Anno Accademico 2022/23

Indice

Abstract	2
1. Introduzione	3
2. Fondamenti del microbiota animale	6
2.1 Concetto di Microbiota e Microbioma.....	6
2.2 Il Microbiota durante le Fasi di Vita Animale	10
Suini	12
Ruminanti.....	14
2.3 Ruolo del Microbiota nella Fisiologia Animale.....	17
3. Approcci Omici nell'Analisi del Microbiota	23
3.1 Genomica: Sequenziamento del DNA Microbico	24
3.2 Metagenomica: Profilazione dell'Intero Microbioma	29
3.3 Metatrascrittomica: Espressione Genica Microbica	31
3.4 Metaproteomica: Analisi delle Proteine Microbiche	36
3.5 Metabolomica: Profilazione dei Metaboliti Microbici	39
4. Applicazioni multi-omiche del microbiota	43
4.1 Valutazione dell'effetto della dieta	43
Suini	43
Ruminanti.....	48
4.2 Probiotici.....	57
4.3 Trapianto di microbiota fecale (FMT: <i>Fecal Microbiome Transplantation</i>).....	66
5. Eventi avversi del microbioma (MAEs: <i>microbiome adverse events</i>) .	69
5.1 Disbiosi	69
5.2 Microbiota e stress	73
5.3 Resistenza agli antibiotici: Resistoma	77
6. Conclusione. Prospettive Future per la Ricerca e l'Applicazione dell'Approccio Multi-omico	87
Bibliografia	89

Abstract

In recent years, thanks to improved sequencing techniques and subsequently to the new approaches based on culture-dependent methods integrated with high-throughput identification techniques, called culturomics, there has been growing interest in microbiota research.

In fact, it has been discovered that this community of microorganisms contributes extensively under normal conditions to the psycho-physical well-being of the host. We are currently aware of the fact that it has various functions such as improving digestive efficiency, acting as a competitive barrier against invasion and/or colonization, participating in the development and education of the immune system, etc.

In the current conditions of the planet where alternative solutions must be sought to save and promote environmental sustainability, the applications of microbiota studies have become extremely relevant. Therefore, the application of multiomics technologies in microbiome research has become valuable to unveil a comprehensive interaction between these commensals in health and disease.

1. Introduzione

A partire dai primi anni duemila e via via sempre più frequentemente, si è sentito parlare di microbiota umano o animale, una complessa e variegata comunità di microrganismi, quali batteri, virus, archea, funghi e protozoi che convive con l'organismo ospite senza danneggiarlo (in condizioni di normale funzionamento del sistema immunitario). Infatti, vi sono diversi studi che confermano come vi sia un legame stretto di convivenza simbiotica tra l'ospite e i microrganismi e di come essi stessi contribuiscano alla salute dell'ospite (Figura 1).

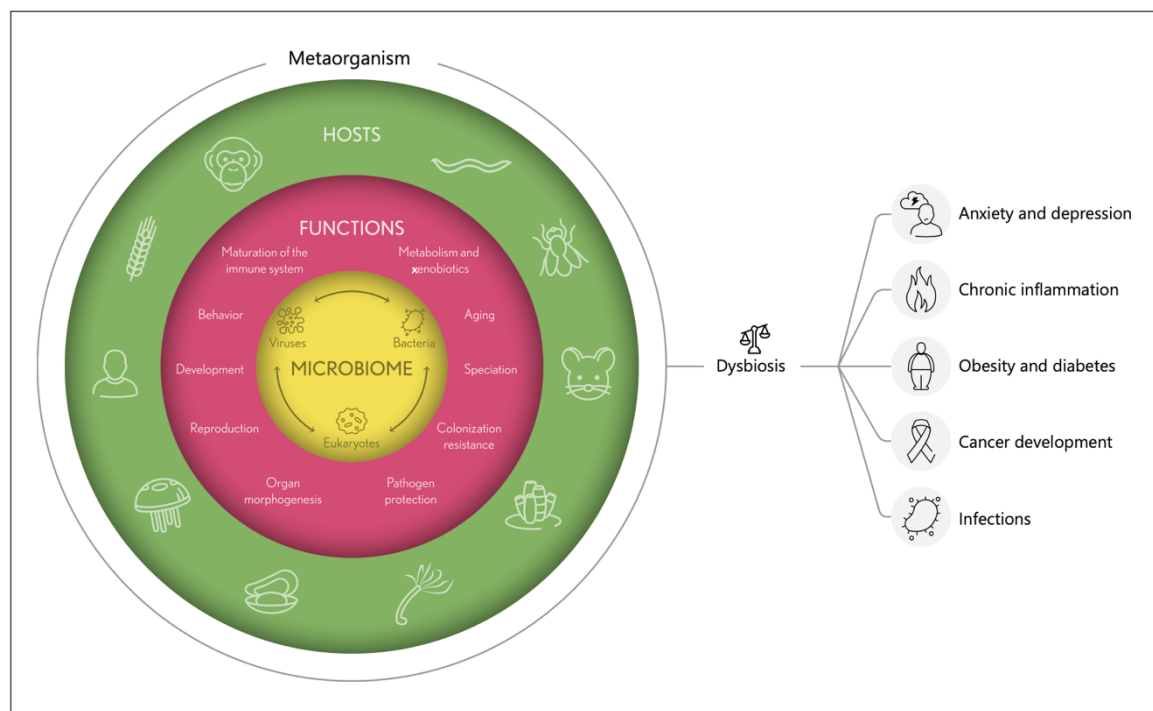


Figura 1 Interazioni funzionali nei metaorganismi. Tutti gli organismi eucarioti vivono in una relazione stretta e interdipendente con il loro microbioma, che comprende batteri, virus e altri piccoli eucarioti, e sono quindi considerati metaorganismi. I membri del microbioma hanno diverse funzioni all'interno del meta-organismo. I microrganismi contribuiscono allo sviluppo dell'ospite, alla morfogenesi degli organi, al metabolismo, all'invecchiamento, al comportamento, alla resistenza alla colonizzazione, alla protezione dagli agenti patogeni e alla maturazione del sistema immunitario. Le disbiosi o gli squilibri di queste interazioni omeostatiche tra ospite e microbioma sono associate a varie malattie, tra cui ansia, depressione, diabete, cancro, obesità e infiammazione cronica. (Esser, et al., 2019)

Sulla base di tali studi, il concetto di metaorganismo, inteso come l'insieme delle cellule eucariote e microbiche presenti in uno specifico ecosistema, e la cui eterogeneità dipende dalla colonizzazione delle nicchie corporee e dal corredo genetico dell'ospite, è diventato ampiamente utilizzato.

Si stima che il microbiota dei mammiferi contenga circa 10^{14} cellule batteriche, un numero che è dieci volte superiori al numero delle cellule costituenti l'organismo stesso.

I batteri colonizzano virtualmente ogni superficie del corpo esposto all'ambiente esterno: quindi sarà possibile riconoscere un microbiota differente a seconda della localizzazione anatomica: a livello genito-urinario, respiratorio e cutaneo.

L'organo maggiormente colonizzato dai batteri è sicuramente l'apparato gastro intestinale che ospita tra 500 e 1000 differenti specie di batteri oltre a archeobatteri, funghi, protozoi e virus. Si stima, infatti, che il colon da solo contenga più del 70% di tutti i microorganismi presenti nel corpo dell'ospite.

A livello scientifico, sono numerose le prove sperimentali che hanno dimostrato il coinvolgimento del microbiota nella digestione e assorbimento degli alimenti, nel metabolismo degli acidi grassi a catena corta e nella produzione di vitamine. Oltre ad influenzare il metabolismo dei nutrienti, il microbiota ha un forte impatto su molti altri aspetti della fisiologia dell'ospite: supporta il mantenimento dell'integrità intestinale, contribuisce alla regolazione delle risposte immunitarie dell'ospite, contrasta la colonizzazione

di specie patogene ed è coinvolto nella comunicazione bidirezionale tra l'intestino e cervello (gut-brain axis). Di conseguenza, viene considerato come un vero e proprio "organo" virtuale che gioca un ruolo cruciale e determinante nel mantenimento dell'omeostasi dell'ospite.

L'approccio multi-omico rappresenta una svolta rivoluzionaria nella ricerca biologica e nella scienza dei dati. Si basa sull'integrazione e sull'analisi simultanea di diverse "omics" - quali genomi, trascritti, proteine e metaboliti - per ottenere una visione completa e integrata di un sistema biologico. Nel contesto dello studio del microbiota animale, l'approccio multi-omico offre un'enorme opportunità per svelare la complessità delle interazioni tra i microorganismi intestinali e l'animale ospite, consentendo una comprensione più approfondita dei meccanismi sottostanti che modellano la salute e la produttività animale.

2. Fondamenti del microbiota animale

2.1 Concetto di Microbiota e Microbioma

Fin dalla sua nascita la microbiologia si è occupata di indagare i cosiddetti batteri “cattivi”, in quanto ritenuti prevalentemente fonti di malattie (Piccini, 2018). L’attenzione dei diversi studi ed piani sperimentali si concentrava quindi sul conoscere l’azione dei patogeni nell’alterare la salute umana.

È solo dagli inizi del ‘900 che la comunità scientifica ha iniziato a rivolgere il proprio interesse anche ai batteri “buoni”, quelli in grado di portare specifici benefici all’organismo.

Elie Metchnikoff (1845-1916), allievo di Pasteur e premio Nobel per la medicina, parlò per la prima volta dell’incidenza dei batteri sul nostro intestino e del loro ruolo nel miglioramento delle condizioni di salute dell’ospite. Studiando le popolazioni dei Balcani e della Russia, note per la presenza di abitanti centenari, Metchnikoff arrivò alla conclusione che la longevità della vita poteva essere migliorata e la senilità ritardata modulando il microbiota intestinale mediante l’assunzione dei cosiddetti batteri buoni presenti nello yogurt (Mackowiak, 2013).

La svolta nella ricerca sul mondo della biologia, è avvenuta nei primi anni Duemila, prima con lo “*Human Microbiome Project*” (Progetto Microbioma Umano) [<https://hmpdacc.org/>] e nel 2010 con la nascita dello “*Earth Microbiome Project*” (Progetto Microbioma Terrestre)

[<https://earthmicrobiome.org/>]. Questi due progetti, per la prima volta, si posero come obiettivo quello di censire tutti i batteri esistenti sulla Terra – unitamente ai loro geni – allo scopo di comprendere le loro reciproche relazioni e la loro interazione con i diversi ecosistemi del pianeta (Piccini, 2018).

Solo grazie a molte innovazioni tecnologiche che hanno dato impulso alla ricerca microbiologica, si è concretizzato un vero e proprio cambiamento di paradigma nella nostra comprensione della salute e della malattia (Figura 2).

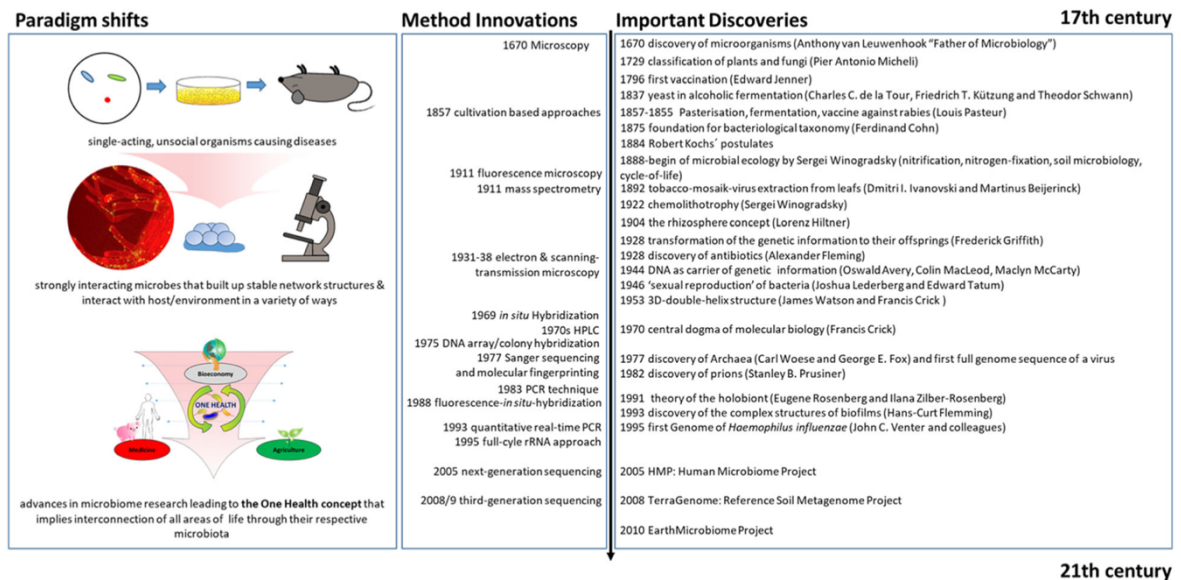


Figura 2 La storia della ricerca sul microbioma dal Settesimo secolo fino ai nostri giorni, evidenziando lo spostamento del paradigma dai microbi come organismi asociali che causano malattie alla visione olistica dei microrganismi come centro del concetto di One Health: interconnettere positivamente tutte le aree della nostra vita .

Il termine “microbiota” è costituito “dall’unione di due parole di origine greca: *micro*, ossia “molto piccolo”, e *biota*, che in ecologia indica l’insieme degli organismi viventi che popolano un determinato luogo”. Il microbiota, quindi, può essere definito come “l’insieme dei microrganismi situati nei distretti del nostro corpo che interagiscono con il mondo esterno” (Di Maio & Mereta,

2021). Si tratta di un vero ecosistema che colonizza il nostro corpo in vari distretti anatomici, in particolare quelli a contatto con l'ambiente esterno. Possiamo definire infatti il microbiota uro-genitale, il microbiota orale, il microbiota cutaneo, il microbiota polmonare, il microbiota intestinale.

E' possibile definire il microbiota anche come "l'insieme dei microrganismi che convivono con un organismo senza danneggiarlo, in condizioni di normale funzionamento del suo sistema immunitario." (Piccini, 2018). Questa definizione dà maggior enfasi alla relazione esistente tra ospite e microrganismi, un rapporto simbiotico-mutualistico in cui entrambe le parti traggono vantaggi e benefici dalla presenza dell'altro.

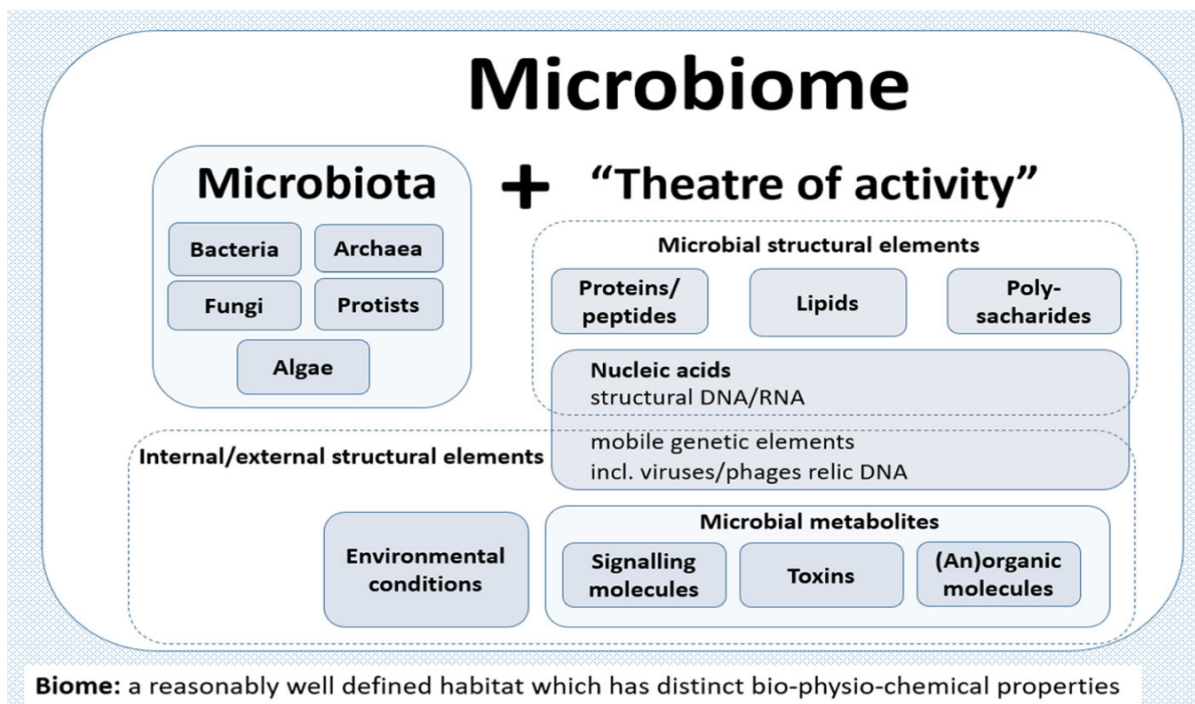


Figura 3 Uno schema che evidenzia la composizione del termine microbioma che contiene sia il microbiota (comunità di microrganismi) che il loro "teatro di attività" (elementi strutturali, metaboliti/molecole segnale e condizioni ambientali circostanti) (Berg, et al., 2020).

Per microbioma invece si intende “una comunità microbica caratteristica che occupa un habitat definito, con proprietà fisicochimiche distinte. Il microbioma

non si riferisce solo ai microbi coinvolti, ma comprende anche il loro teatro di attività, che si traduce nella formazione di vere e proprie “nicchie ecologiche”.

Il microbiota che forma un habitat dinamico e un micro-sistema interattivo soggetto a cambiamenti, è integrato nei macro-sistemi, compresi gli ospiti eucarioti, e in questi è fondamentale per il loro funzionamento e il loro stato di salute” (Berg, et al., 2020). (Figura 3)

Il microbiota comprende i microrganismi viventi, quindi batteri, archei, funghi, alghe e piccoli protisti. Mentre i fagi, i virus, i plasmidi, i prioni, i viroidi e il DNA libero, che non sono generalmente considerati microrganismi viventi e quindi non sono inclusi nella definizione di microbiota, fanno parte del microbioma.

In molti animali, il microbioma svolge un ruolo essenziale nell'ecologia e nel sistema metabolico dell'ospite, rendendolo un elemento fondamentale per la sopravvivenza e la persistenza dell'ospite nel tempo e nello spazio.

L'insieme completo del genoma dell'ospite unito al genoma dei microrganismi viene definito olobionte, cioè si considerano entrambi i partner come un'unica comunità. La natura di questa relazione simbiotica varia da un ospite all'altro e presenta diversi gradi di dipendenza (Hammer, et al., 2019).

Nella maggior parte dei sistemi ospite-microbioma in cui esiste una dipendenza tra le parti, gruppi microbici specifici tendono a essere prevalenti in più ospiti separati della stessa specie, soprattutto se sono strettamente legati alle funzioni dell'ospite. Diverse ricerche hanno definito questo insieme di taxa microbici

condivisi tra consorzi microbici provenienti da habitat simili, che identificano ulteriormente i componenti stabili e coerenti negli assemblaggi microbici complessi come microbi di base. All'interno di ecosistemi associati all'ospite, come animali e piante, è stato proposto il principio del core microbiota per descrivere la comunità microbica che è sistematicamente associata all'ospite (Perlman, et al., 2022).

2.2 Il Microbiota durante le Fasi di Vita Animale

Da tempo si ritiene che lo sviluppo del microbiota avvenga al momento della nascita, quando il feto passa da un ambiente idealmente sterile all'interno del sacco amniotico, attraverso il canale del parto, ad un ambiente esterno denso di microrganismi.

In uno studio effettuato dal gruppo di ricerca di Vi, (Vi, et al., 2021) è stato rivelato un microbioma con bassa diversità e biomassa nell'intestino prenatale degli agnelli, indicando quindi che la colonizzazione microbica dell'intestino fetale inizi già a livello uterino. Per contro, secondo altri lavori scientifici, i microbi rilevati in utero potrebbero essere dovuti al DNA contenuto nei reagenti di laboratorio e ai contaminanti delle apparecchiature, poiché il microbioma non mostra attività immunitaria o virulenza (Walter & Hornef, 2021). Pertanto, vi sono pareri contrastanti sul fatto che la comunità microbica intestinale inizi la colonizzazione dell'intestino fetale prima del parto.

Un'ulteriore colonizzazione microbica si verifica durante il parto, fattori come il tempo di transizione e la modalità di parto hanno un'influenza sulle popolazioni microbiche colonizzatrici. Infatti, i neonati nati per via naturale hanno un microbiota simile al microbiota vaginale della madre, principalmente *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, mentre quelli nati con parto cesareo sono colonizzate da comunità microbiche simili al microbiota cutaneo della madre, con *Staphylococcus* come genere principale (Dominguez-Bello, et al., 2010). L'impatto della tipologia di parto è stato ampiamente studiato nell'uomo, dimostrando che un parto cesareo comporta nel neonato un microbiota povero in termini di quantità e diversità microbica. Questa è la causa principale dell'aumento dell'incidenza di malattie allergiche in neonati partoriti con taglio cesareo (Bager, et al., 2008).

Sebbene il cesareo non sia una pratica diffusa in allevamento, questo dimostra come i microorganismi colonizzatori al momento del parto abbiano implicazioni a lungo termine sull'ospite.

Il microbiota post-parto ha tre ruoli fondamentali: quello protettivo, metabolico e trofico. In primo luogo, i microrganismi fungono da barriera nei confronti degli organismi patogeni per esclusione competitiva. Poi, facilitano la digestione e il metabolismo del colostro e del latte, scompongono le tossine e i farmaci, sintetizzano le vitamine e assorbono diverse tipologie ioniche. Infine, favoriscono la crescita e la differenziazione delle cellule epiteliali che rivestono

il lume intestinale e supportano l'omeostasi del sistema immunitario (Yang, et al., 2016).

Suini

Subito dopo la nascita, i batteri ambientali e materni, compresa la colonizzazione attraverso la vagina, la superficie del capezzolo e il latte, colonizzano rapidamente l'intestino del nascituro e stabiliscono il microbiota iniziale del suino. Un'alterazione della comunità microbica sana durante il periodo neonatale può portare alla crescita eccessiva di patogeni indigeni e all'induzione di uno stato pro-infiammatorio (Mulder, et al., 2009; Schmidt, et al., 2011). È stato ampiamente dimostrato come lo stress, la dieta, pratiche di

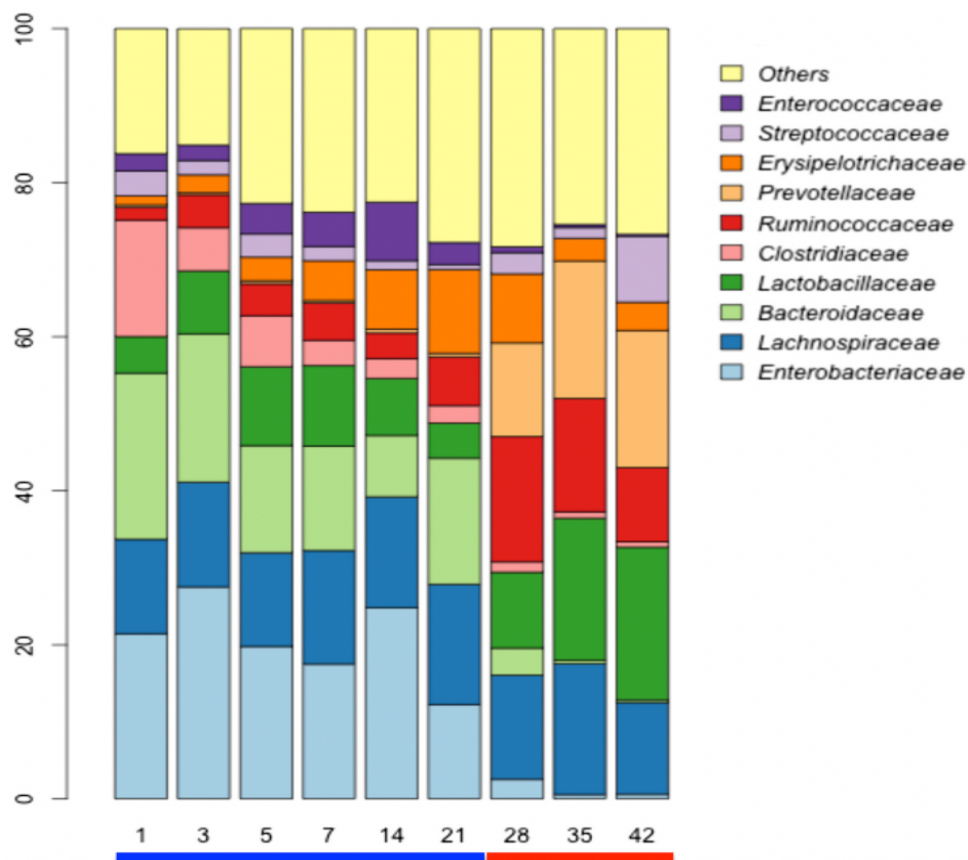


Figura 4 Grafici a barre sovrapposte che mostrano la percentuale media di popolazioni batteriche nelle feci di suino nel tempo, da sinistra a destra, al giorno 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35 e 42. Le barre colorate sotto il grafico indicano la dieta (blu, allattamento; rosso, svezzamento). (Frese, et al., 2015)

gestione e i composti antimicrobici durante il primo periodo di vita possano indurre un impatto duraturo sull'assetto del microbiota intestinale, sulla suscettibilità alle malattie e sulle performance di crescita dei suini da riproduzione (Saladrigas-García, et al., 2022). Ad esempio, sono state pubblicate prove che definiscono differenze nel microbiota fecale dei suinetti già a 7 giorni di vita, determinando l'insorgenza di diarrea post-svezzamento quattro settimane più tardi (Dou, et al., 2017). Nell'allevamento dei suini, lo svezzamento è un evento improvviso che comporta il passaggio da una dieta a base di latte ad una dieta a base di alimenti solidi, il che rappresenta una sfida per i suinetti durante lo sviluppo precoce. Durante la fase di pre-svezzamento, la composizione del microbiota è stabile e condizionata dall'alimentazione, il microbiota è infatti composto da famiglie come *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *LactoBacillaceae* ed *Enterobacteriaceae* (Frese, et al., 2015) (Figura 4).

La composizione cambia rapidamente dopo lo svezzamento, quando viene introdotta una dieta a base di cereali solidi. In questa specifica fase, le popolazioni di *Bacteroides* ed *Enterobacteriaceae* diminuiscono mentre aumentano quelle di *Lactobacillaceae*, *Ruminococcaceae*, *Veillonellaceae* e *Prevotellaceae*. In particolare, l'aumento di *Prevotella* potrebbe essere una risposta al fatto che la dieta dei suini contiene una maggiore quantità di componenti di origine vegetale in questa fase.

Alla fine del periodo di nursery, le diete tipiche cambiano con l'eliminazione delle proteine animali e l'aggiunta di un maggior numero di proteine vegetali. Questo cambiamento nella dieta ha fatto sì che la famiglia *Streptococcaceae* (28,8%) fosse il rappresentante dominante, mentre *Lactobacillaceae* (9,8%), *Lachnospiraceae* (8,8%), *Ruminococcaceae* (8,6%), *Clostridiaceae* (5,6%), *Veillonellaceae* (4,9%) ed *Erysipelotrichaceae* (3,5%) sono stati osservati con abbondanze consistentemente più basse (Aluthge, et al., 2019).

De Rodas e il suo staff (De Rodas, et al., 2018) hanno condotto una ricerca per valutare il microbioma dei suini commerciali nel tempo (dal parto alla fine del ciclo di vita) e in diversi punti di campionamento (intestino tenue, cieco e colon). Questo studio ha incluso un'analisi a livello di unità tassonomica operativa (OTU: *Operational Taxonomic Unit*) per identificare le OTU più abbondanti nel tempo e nei diversi distretti di campionamento. Tra le 50 OTU più abbondanti, spiccano le specie di *Lactobacillus* (ad esempio, *L. johsonii/gasseri*, *L. reuteri* e *L. mucosae*) e le OTU della classe *Clostridia* (ad esempio, *Clostridium*). Questa analisi porta alla conclusione che esiste una comunità batterica dominante in tutto il GIT (*Gastrointestinal Tract*), indipendentemente dal luogo di campionamento.

Ruminanti

Già dal primo giorno di vita, è possibile rilevare nel rumine batteri essenziali per la funzione “matura” del rumine. Si è riscontrato infatti che *Veillonella*, seguita da *Prevotella*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Streptococcus*,

Acidaminococcus, *Clostridium*, *Bifidobacterium* e *Ruminococcus* erano predominanti (88,7%) nel rumine dei vitelli alla nascita (Malmuthuge, et al., 2019). Inoltre, i batteri tipici del rumine *Eubacterium ruminantium*, *Ruminococcus ruminicola*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*, in grado di degradare i polisaccaridi vegetali, colonizzano il rumine durante la prima settimana di vita quando i vitelli sono alimentati solo con latte (Malmuthuge, et al., 2019). La presenza di batteri tipici del rumine durante la prima settimana di vita suggerisce che la colonizzazione dei batteri cellulolitici avviene in assenza di alimenti solidi.

Considerando i diversi studi effettuati, il processo di definizione del microbiota ruminale può essere suddiviso in tre fasi (Figura 5). Nella fase iniziale si registra un passaggio da comunità aerobie o aerobie facoltative a comunità batteriche strettamente anaerobie. Le popolazioni rilevate derivano principalmente dall'alimentazione e dell'ambiente, troviamo i generi *Bacillus* e *Lactococcus*. Nella fase transitoria, nella quale aumenta l'assunzione di latte, il *phylum* dominante diventa *Bacteroidetes*, sostituendo *Proteobacteri*; mentre a livello di genere dominante troviamo *Bacteroides* in quanto capace di utilizzare alcuni componenti del latte. Inoltre, possiamo già riscontrare la presenza di *Prevotella* e *Ruminococcus*, batteri ruminanti che si ritrovano anche nel rumine maturo. Nella terza fase, relativamente stabile, con l'incremento del cibo solido *Bacteroidetes* e *Firmicutes* sono i *phyla* dominanti, mentre a livello di genere si segnala una crescita nelle popolazioni di batteri in grado di

utilizzare amido e fibre, quali *Prevotella*, *Ruminococcus* e *Treponema* (Li, et al., 2023).

In prossimità dello svezzamento, l'aumento dei prodotti di fermentazione e della biomassa microbica determina modifiche strutturali e fisiologiche delle caratteristiche del rumine, con la conseguente costituzione di un rumine pienamente funzionale e di un microbiota simile a quello di un adulto (Amin, et al., 2021).

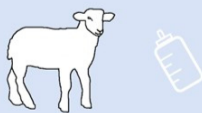
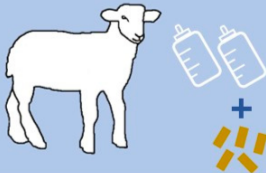

Initial stage	Transition stage	Relative stable stage
		
<p>There is a switch from aerobic or facultative anaerobic to strictly anaerobic bacterial community. The <i>Proteobacteria</i> and <i>Firmicutes</i> were the dominant phylum.</p> <p>The ruminal bacteria come from their dams (including the maternal vaginal, milk, and saliva) and external environments, such as the genera <i>Bacillus</i> and <i>Lactococcus</i>.</p>	<p>With the intake of breast milk gradually increased, <i>Proteobacteria</i> were replaced by <i>Bacteroidetes</i> as the dominant phylum.</p> <p>At the genus level, the dominant genus were <i>Bacteroides</i> (capable of using some components of milk). In addition, some other genera that are commonly found in the mature rumen were already established in the rumens, such as <i>Prevotella</i>, <i>Ruminococcus</i>.</p>	<p>With the intake of solid feed increased, <i>Bacteroidetes</i> and <i>Firmicutes</i> were the dominant phylum.</p> <p>At the genus level, some rumen bacteria that can capable of utilizing starch and fiber gradually increased, and maintained the relative stable abundance in the rumen, such as <i>Prevotella</i>, <i>Ruminococcus</i>, <i>Treponema</i>.</p>

Figura 5 Determinazione dei batteri ruminali in ruminanti non svezzati (Li, et al., 2023)

Per quanto riguarda i ruminanti adulti, vi sono diversi fattori, come l'alimentazione, l'ambiente e la genetica dell'ospite che influiscono sulla composizione del microbiota ruminale. All'interno di questo complesso ecosistema, le comunità microbiche si suddividono in quelle libere nel fluido ruminale, quelle associate alle particelle solide di alimento ingerito e quelle associate alla parete stessa del rumine. Queste tre frazioni differiscono nella

composizione microbica e probabilmente la ragione è da ricercare nei diversi requisiti di crescita dei microrganismi (Pei, et al., 2010). In diversi studi i membri delle *Prevotellaceae* costituivano la famiglia dominante nel microbiota libero nel liquido ruminale, mentre la comunità microbica associata alle particelle solide evidenziavano un'abbondanza di membri di taxa legati alla digestione delle fibre come *Ruminococcaceae* e *Fribrobacter*. Invece *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Desulfobulbaceae*, *Erysipelotrichaceae* e *Rikenellaceae* costituivano il core microbiota associato all'epitelio ruminale (Schären, et al., 2017).

2.3 Ruolo del Microbiota nella Fisiologia Animale

La fisiologia è la disciplina scientifica che si concentra sulla capacità dell'organismo di regolare il proprio ambiente interno studiando le funzioni dei singoli organi, la comunicazione tra organi e la regolazione del sistema. È stato riconosciuto che i segnali derivanti dall'ambiente mutevole in cui vivono gli animali interagiscono con i vari sistemi omeostatici dell'organismo, dando luogo a risultati fisiologici e biologici diversi (Schmidt-Nielsen, 1997).

L'influenza delle comunità microbiche intestinali, o microbiota, sulla fisiologia e sul comportamento degli animali è ormai ampiamente riconosciuta ed assodata. Il microbiota intestinale svolge un'ampia gamma di funzioni di natura protettiva, strutturale e metabolica che influenzano lo stato di salute dell'ospite favorendo l'elaborazione degli alimenti, la sintesi di vitamine (come la B12 e

la K), la prevenzione della colonizzazione di agenti patogeni, la digestione e la raccolta di energia a partire da carboidrati complessi ingeriti ma non digeribili dall'ospite (Clerke, et al., 2014; Montalto, et al., 2009). Basti pensare che il microbioma del tratto gastrointestinale (GIT) dei ruminanti aiuta la digestione di questo materiale vegetale e i prodotti della fermentazione forniscono fino al 70% dell'energia totale della dieta (Flint & Bayer, 2008).

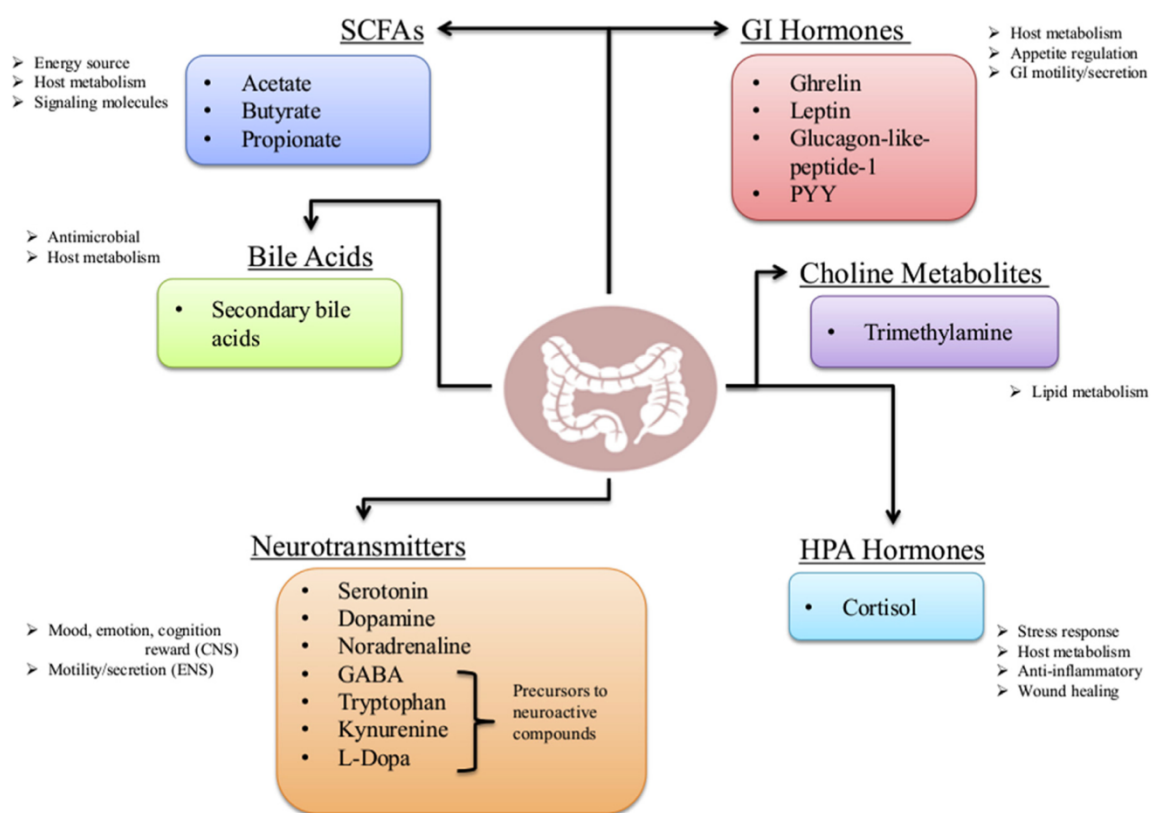


Figura 6 I candidati produttori dal microbiota intestinale. Il microbiota intestinale è in grado di produrre o regolare numerosi prodotti ormonali diversi, che hanno la capacità di influenzare lo stato dell'intestino e, quando vengono assorbiti dal flusso sanguigno e trasportati in tutto il corpo, possono avere un effetto sulla funzione di organi e sistemi remoti. Si tratta di ormoni come il cortisolo e di neurotrasmettitori e dei loro precursori, come la serotonina (5-HT) e il triptofano. La produzione di SCFA batterici è considerata particolarmente importante, non solo come fonte di energia ma anche come molecole di segnalazione. SNC, sistema nervoso centrale; ENS, sistema nervoso enterico; GABA, acido g-aminobutirrico; GI, gastrointestinale; HPA, asse ipotalamo-ipofisi-surrene; SCFA, acidi grassi a catena corta (O'Callaghan, et al., 2016).

Il microbiota intestinale ha anche effetti sull'epitelio intestinale sostenendo la crescita dei microvilli intestinali ed è stato dimostrato come questo svolga un ruolo essenziale nello sviluppo di risposte immunitarie innate e adattative mediate da una serie di molecole di segnalazione e metaboliti derivati dal microbiota (Nicholson, et al., 2005).

È stato inoltre documentato come il microbiota intestinale influisca sulla funzione di sistemi e organi distali attraverso la produzione di potenti ormoni che vengono rilasciati nel flusso sanguigno attraverso il tessuto interstiziale e poi trasportati per agire non solo localmente nel sistema nervoso enterico (ENS: *Enteric Nervous System*), ma anche in siti remoti come il fegato (Gut-Liver Axis) (Milosevic, et al., 2019) e persino il cervello (Gut-Brain Axis) (Wiley, et al., 2017). (Figura 6)

Un importante contributo del microbiota intestinale alla funzione dell'ospite è la produzione di acidi grassi a corta catena (SCFA: *Short-Chain Fatty Acids*), in particolare butirrato, acetato e propionato, attraverso la fermentazione di fibre alimentari, carboidrati e proteine nell'intestino (Kovatcheva-Datchary & Arora, 2013).

I principali SCFA presenti nell'intestino sono l'acetato, il propionato e il butirrato, che costituiscono oltre il 95% di tutto il contenuto di SCFA. È interessante notare come i diversi SCFA varino in diversi siti dell'intero intestino: l'acetato e il propionato si trovano sia nell'intestino tenue che in quello crasso, mentre il butirrato si localizza principalmente nel colon e nel

cieco (Vogt, et al., 2015). I batteri che producono SCFA includono, ma non solo, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Roseburia* e *Prevotella* (Martin-Gallausiaux, et al., 2021).

Questo processo di fermentazione è essenziale per la salute dell'ospite, poiché contribuisce a un'estrazione più efficiente di energia dalla dieta producendo metaboliti che possono essere utilizzati come fonti di energia. Questo ha importanti implicazioni per il controllo del peso corporeo dell'ospite e gli SCFA si sono dimostrati capaci di svolgere diverse altre funzioni benefiche per l'ospite, come le proprietà antinfiammatorie e una cascata di processi legati all'apoptosi e all'immunità innata (Martin-Gallausiaux, et al., 2021).

Il butirrato è un SCFA di particolare importanza per la salute dell'ospite, in quanto viene utilizzato come fonte di energia dalle cellule epiteliali dell'intestino ed è stato dimostrato possedere anche proprietà anticancerogene e antinfiammatorie (Sun, et al., 2017). Il butirrato è noto anche per le sue numerose funzioni fisiologiche nelle cellule eucariotiche, in particolare per i suoi effetti sull'acetilazione degli istoni: l'inibizione dell'istone deacetilasi facilita l'iperacetilazione delle proteine istoniche, favorendo l'accesso degli enzimi di riparazione del DNA (Sun, et al., 2017).

L'acetato è utilizzato come fonte di energia per la sintesi di molecole complesse da parte di muscoli, fegato e altri tessuti periferici.

Il propionato ha un potenziale antinfiammatorio, viene utilizzato dal fegato e dal tessuto adiposo, svolge un ruolo essenziale nella sensazione di sazietà e migliora la sensibilità all'insulina (O'Callaghan, et al., 2016).

L'appetito e i modelli alimentari dell'ospite possono essere anche modificati dal microbiota attraverso l'alterazione dei segnali endocrini prodotti dalle cellule enteroendocrine (EEC: *Enteroendocrine Cells*) nell'epitelio intestinale, che comporta la produzione dell'ormone glucagone-like peptide 1 (GLP1) (Aresti Sanz & El Aidy, 2019).

Un altro contributo del microbiota sono i neurotrasmettitori che può produrre autonomamente o può stimolare l'organismo ospite a produrli. Ad esempio, diversi microrganismi, tra cui *Escherichia spp.*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e le sue specie, sono noti per generare il neurotrasmettitore GABA (*Gamma-Aminobutyric Acid*) (Strandwitz, et al., 2019). È stato dimostrato inoltre che, i batteri sono essenziali per la produzione del neurotrasmettitore serotonina 5-idrossitriptamina (5-HT) (Clarke, et al., 2013). La serotonina è un metabolita di particolare interesse, poiché si ipotizza che svolga un ruolo chiave nella regolazione dell'apprendimento, del sonno, dell'ansia, dell'umore e di altri disturbi psichiatrici legati allo stress (Evans, et al., 2013). È un'importante molecola di segnalazione nell'asse intestino-cervello, con ruoli critici sia a livello del SNC che del sistema nervoso periferico (O'Mahony, et al., 2015; Morris, et al., 2017).

Anche il triptofano, un amminoacido precursore di una ampia serie di metaboliti interessanti per la salute dell'ospite, viene metabolizzato dal microbiota intestinale. Alcuni studi hanno dimostrato che il microbiota intestinale ha anche un effetto regolatore sulla disponibilità di triptofano in circolo (essenziale come rifornimento di triptofano nel SNC per la produzione di serotonina) (Clarke, et al., 2013) e sul metabolismo del triptofano in serotonina nell'ENS (*Enteric Nervous System*) (O'Mahony, et al., 2015; Ullah, et al., 2023).

3. Approcci Omici nell'Analisi del Microbiota

Gli approcci omici, che includono genomica, metagenomica, metatrascrittomica, metaproteomica e metabolomica, sono diventati fondamentali nell'analisi approfondita del microbiota. Questi metodi avanzati consentono una comprensione dettagliata della composizione, della funzione e dell'interazione dei microorganismi presenti all'interno di una determinata nicchia ecologica quale il tratto gastrointestinale. (Figura 7)

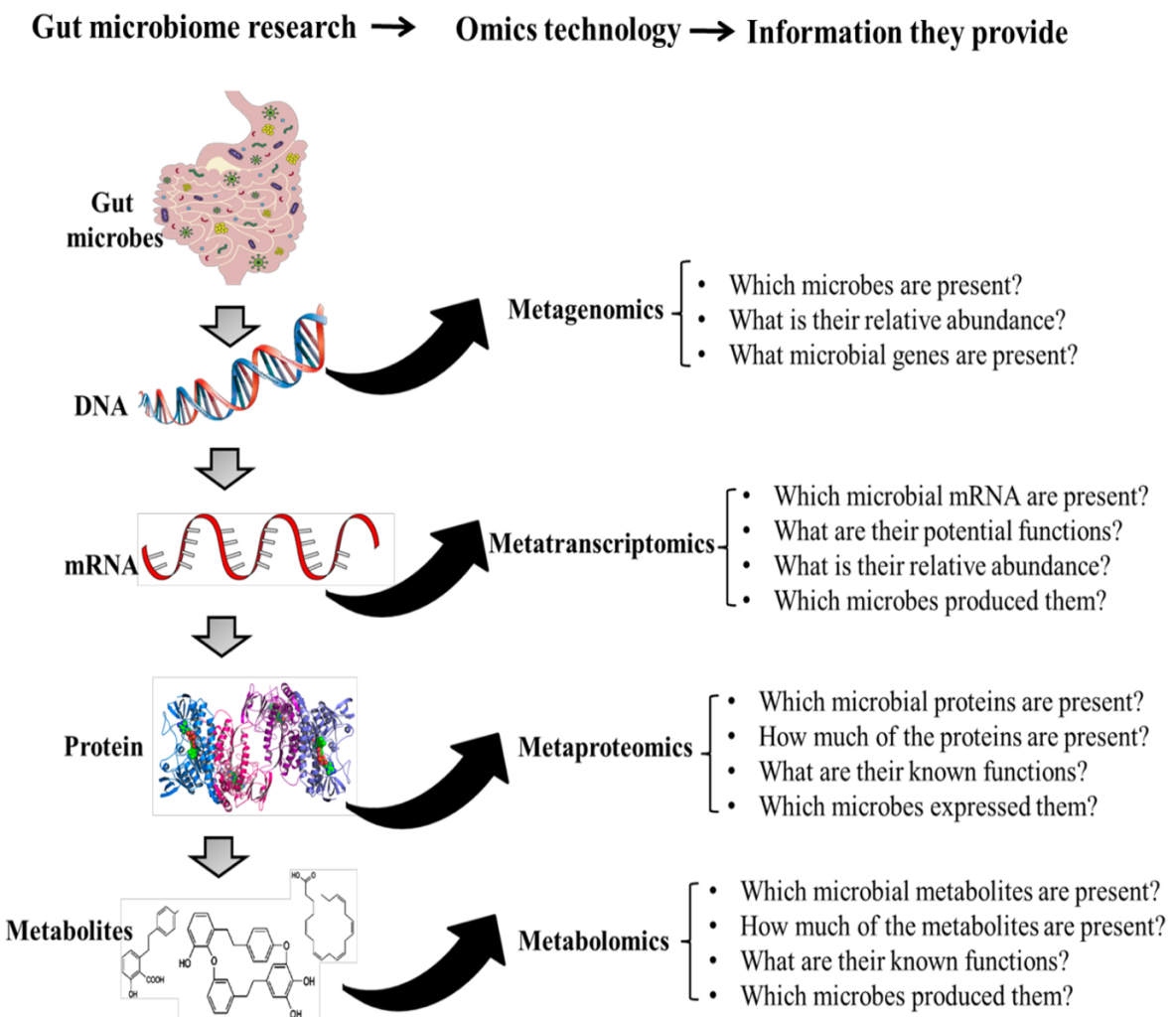


Figura 7 Le tecnologie omiche e le informazioni che forniscono nella ricerca sul microbioma intestinale. (Daliri, et al., 2021)

3.1 Genomica: Sequenziamento del DNA Microbico

“La genomica è la disciplina che si occupa della struttura, sequenza, funzione ed evoluzione del genoma, vale a dire di tutta l’informazione genetica contenuta nel DNA (*DeoxyriboNucleic Acid*) presente nelle cellule di una particolare specie. La grandezza del genoma e il numero dei geni ivi contenuti variano tra gli organismi viventi.” (Cavallaro , 2010)

Con il termine sequenziamento si intende la decodificazione dell’esatta sequenza di nucleotidi di un acido nucleico (DNA o RNA: *RiboNucleic Acid*).

Un filamento di DNA o RNA contiene qualche miliardo di nucleotidi ma, i dispositivi di analisi, hanno una capacità limitata di lettura permettendo di sequenziare soltanto dei frammenti, di lunghezza variabile, denominati “*reads*”; le “*reads*” devono poi essere allineate e assemblate per formare la sequenza di nostro interesse.

Il primo esempio di sequenziamento lo ritroviamo nel 1973 (Gilbert & Maxam, 1973) con l’elaborazione da parte di Maxam e Gilbert di un breve frammento di circa 24bp che poi pubblicarono la loro metodica di sequenziamento cinque anni più tardi (Maxam & Gilbert, 1977). Sempre nel 1977 Sanger pubblica la propria metodica di sequenziamento enzimatico, questa tecnologia fu successivamente automatizzata e commercializzata rimanendo per molti anni il “*gold standard*” per il sequenziamento del DNA sia in campo diagnostico come pure in quello della ricerca (Sanger, et al., 1977).

Nel 1983 fu introdotta la metodica della PCR (Mullis, 1993) e nel 1986 venne introdotto sul mercato il primo sequenziatore automatico.

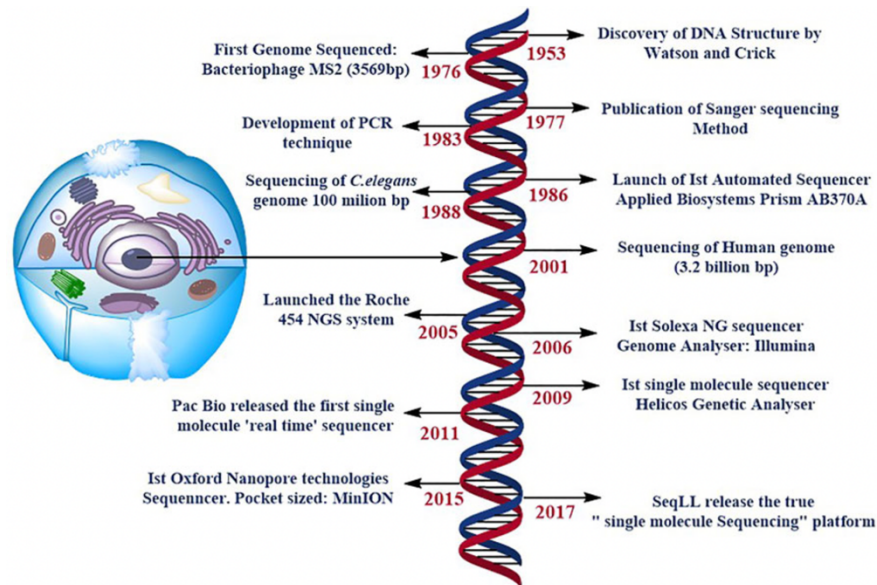


Figura 8 timeline del sequenziamento del DNA. Alcuni degli sviluppi più significativi e innovativi del sequenziamento del DNA. NG sta per next generation e PCR sta per polymerase chain reaction. SMS sta per single molecule sequencing (sequenziamento di una singola molecola) e SeqLL sta per sequence the lower limit (sequenza del limite inferiore). (Bhat, et al., 2022)

Nel 2005 si apre l'era della *Next Generation Sequencing* (NGS) (Figura 8); mentre il sistema di Sanger corrisponde ad un sistema di sequenziamento processivo che consente il sequenziamento di un singolo campione di DNA, caratterizzato da alti costi di esecuzione, tempi lunghi di processazione e uno scarso *throughput*, le tecniche di *Next Generation Sequencing* sono caratterizzate dalla possibilità di eseguire un sequenziamento parallelo e massivo, permettendo di poter analizzare in una seduta fino a 1Gb. Il principale svantaggio delle nuove tecniche è la ridotta lunghezza dei *reads*; ciò comporta, nella fase di allineamento e assemblaggio, la generazione di errori, dei quali, seppur presenti in numero piuttosto basso, occorre assolutamente tener conto.

A seguito della rapida evoluzione nelle tecnologie NGS, si è tentato di fare una classificazione dalle tecnologie di tipo NGS differenziandole in tecniche di seconda generazione (2G) di terza generazione (3G) e le più recenti tecnologie di quarta generazione (4G) (Ku & Roukos, 2013). (Tabella 1)

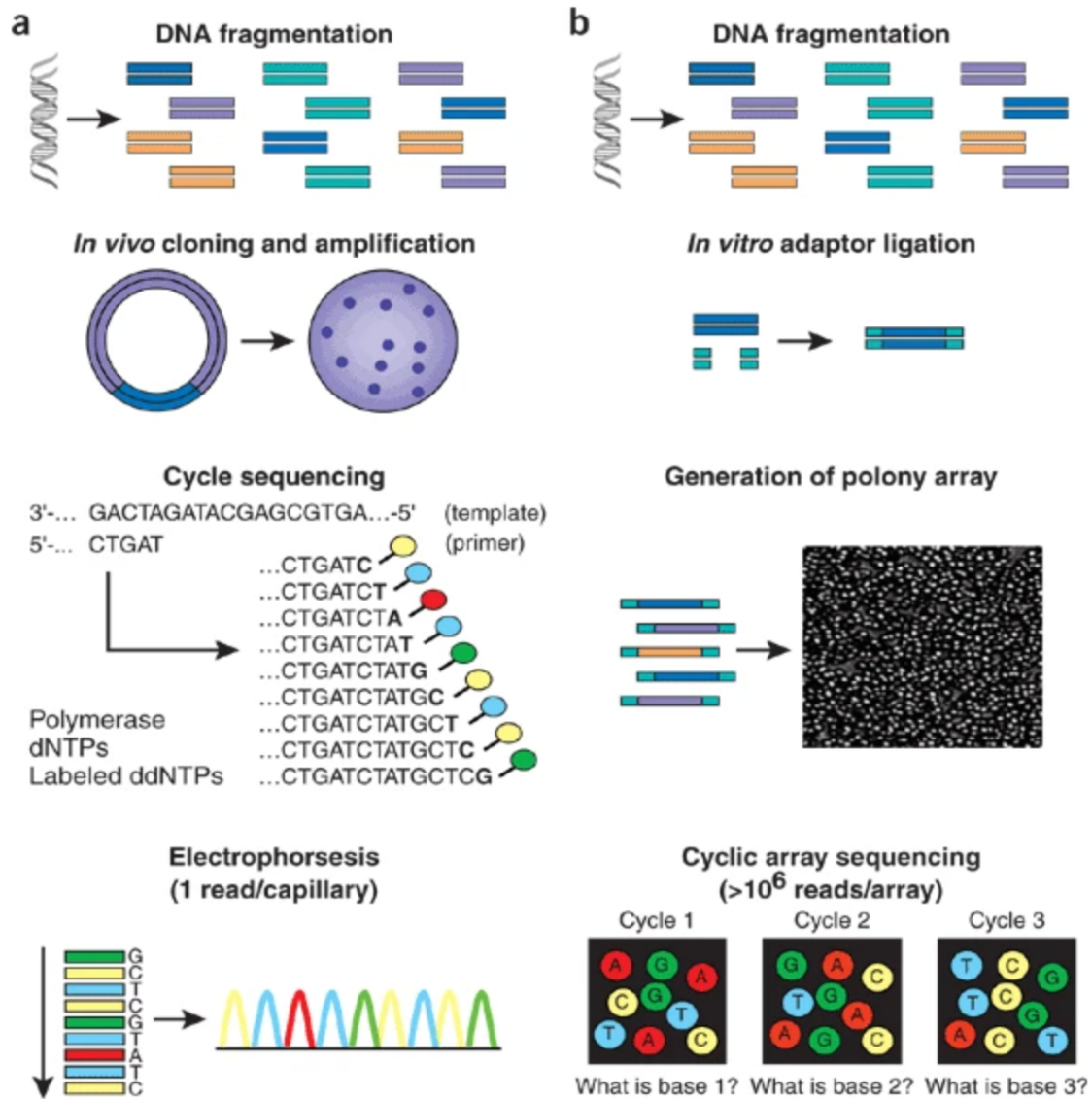


Figura 9 Confronto tra il metodo di Sanger(a) e i metodi NGS(b) (Shendure & Ji, 2008)

Diversi metodi NGS utilizzano diversi processi biochimici, esistono tuttavia delle linee guida comuni. Il primo passo consiste nella preparazione della libreria da andare poi a sequenziare; dopodiché si opera una tecnica di

amplificazione, in modo tale da aumentare di parecchio il numero di copie, con la generazione di un vero e proprio *cluster*. (Figura 9). È proprio questa operazione ad imporre delle limitazioni riguardo alla lunghezza delle *reads*: infatti ciascuna copia dello stesso frammento deve crescere alla stessa velocità delle altre, in modo tale che non vi siano disparità di lunghezza tra esse, fatto che ne comporterebbe una diversificazione, introducendo un errore nel *sequencing*. Infine, c'è il processo di sequenziamento vero e proprio, il quale è fatto solitamente via sintesi, e il conseguente immagazzinamento dei dati (Bhat, et al., 2022).

Tabella 1 Tecnologie di sequenziamento genomico. (Ku & Roukos, 2013)

Platform	Method	Advantages	Disadvantages
First generation	Sanger sequencing		
Sanger	Strands of fragmented DNA are resolved on gel and distributed in order of length, with end base labeled	High accuracy Validate findings of NGS	High cost Low throughput (time consuming)
Second generation	Cyclic array-based sequencing; strands of fragmented DNA are amplified; bases are added sequentially using DNA polymerase; excess reagent is washed out; imaging identifies base incorporated; and process repeats	Higher throughput More economical	Short read length Complex sample preparation Need for amplification Long time to results Significant data shortage and interpretation requirements
HiSeq® (Illumina, CA, USA)	Fluorescent-labeled nucleotides added simultaneously	<1 ug DNA needed Clinical applications	75 (35-100) bp read lengths More false positives Unable for WES, WGS, ChIP-Seq and RNA-seq 10 h per run
Miseq (Illumina)			
Roche Applied Science 454® genome sequencer (Roche, Basel, Switzerland)	Pyrophosphate released at time of base incorporation	1-5 ug DNA needed	400 bp read lengths
Roche 454® GS Junior (Roche, Basel, Switzerland)		Clinical applications	Unable for WES, WGS, ChIP-Seq and RNA-seq 8 h per run
Applied Biosystems SOLiD® 4 (Life Technologies, CA, USA)	Driven by DNA ligase instead of DNA polymerase	2-20 ug DNA needed	35-50 bp read lengths
Complete Genomics®		Clinical applications	
In Torrent PGM (Life Technologies)	Nonoptical DNA sequencing; massively parallel semiconductor senses ions produced as nucleotides are incorporated by DNA polymerase-based synthesis	Less than 200 bases needed High accuracy Short run time (fast) Cheaper	35 bp read lengths Lacks sensitivity Unable for WES, WGS, ChIP-Seq and RNA-seq
Ion Proton (Life Technologies)		2 h per run	Capable for WES, WGS Higher throughput than Ion Torrent
Third generation	Novel technologies	No PC amplification Less starting material Less error prone	
PacBio RS (Pacific BioSciences, CA, USA)	Single-molecule real-time sequencing; imaging of dye-labeled nucleotides as they are incorporated during DNA synthesis by single DNA polymerase molecule	800-1000 bp read lengths	
Heliscope sequencer (Helicos BioSciences)	Single-molecule real-time sequencing; imaging of dye-labeled nucleotides as they are incorporated during DNA synthesis by single DNA polymerase molecule	<2 ug DNA Direct RNA sequencing application	35 bp read lengths
Fourth generation			
Oxford Nanopore	Single molecule sequencing incorporating nanopore technology	Whole-genome scan 15 min Very low cost	

3.2 Metagenomica: Profilazione dell'Intero Microbioma

La metagenomica è una tecnica che sequenzia i genomi dei microrganismi (archei, batteri, virus e funghi) presenti all'interno di un determinato campione (Almeida, et al., 2019).

Due approcci sono comunemente utilizzati: l'analisi dei geni marcatori e il sequenziamento *shotgun*. Nell'analisi dei geni marcatori, i *primer* sono progettati per legarsi a regioni altamente conservate di un gene di interesse al fine di identificare le filogenesi delle comunità microbiche in un campione. Nel caso dei batteri il gene di interesse è il gene 16S rRNA, questo è costituito da circa 1.500 nucleotidi e contiene regioni conservate tra tutti i batteri, intervallate da 9 regioni (da V1 a V9) che sono altamente variabili tra i "filotipi" batterici, definiti come un gruppo di sequenze di 16S rRNA con il 97-99% di identità di sequenza. Le regioni conservate possono essere utilizzate come bersaglio per primer PCR con specificità batterica quasi universale (MacCafferri, et al., 2011). Tuttavia, poiché i primer non presentano la stessa affinità per tutte le sequenze di DNA a causa della variabilità delle regioni amplificate dai *primer*, durante l'amplificazione PCR vengono introdotti molti *bias*. Inoltre, tra i batteri può verificarsi un trasferimento genico orizzontale che può portare al trasferimento di sequenze informative a batteri non correlati. Questo può portare a problemi nella stima corretta della diversità della comunità microbica.

L'analisi dei geni marcatori non fornisce informazioni dettagliate sui geni presenti nei batteri e quindi i ricercatori che utilizzano questa tecnica possono solo fare associazioni tra popolazioni microbiche e condizioni di malattia (Daliri, et al., 2020).

Attualmente, molti microrganismi presenti nell'intestino sono sconosciuti (cioè i loro genomi non sono stati ancora sequenziati) e possono quindi essere privi di marcatori o *primer* informativi (Almeida, et al., 2019) pur contribuendo, nell'individuo, allo stato di salute o malattia.

Nonostante le numerose limitazioni dell'analisi dei geni marcatori, sono disponibili molti strumenti bioinformatici per prevedere le potenziali funzioni dei microrganismi intestinali sulla base dei dati del 16S rRNA. Diverse piattaforme (Ibal, et al., 2022) sono state fondamentali per dedurre le funzioni microbiche sulla base del 16S rRNA e hanno favorito la verifica delle ipotesi.

Il sequenziamento *shotgun* presenta informazioni genetiche e tassonomiche dettagliate sul microbiota intestinale (Knight, et al., 2018), anche se risulta relativamente più costoso e richiede più tempo rispetto all'analisi dei geni marcatori. I profili di sequenziamento *shotgun* possono presentare informazioni sulle potenziali funzioni di un'intera comunità microbica a livello genico, basandosi su database di genomi già sequenziati, ma le informazioni potrebbero non rappresentare accuratamente ciò che accade nell'intestino in un determinato momento. Questo perché tutti i batteri, siano essi metabolicamente attivi e in fase replicativa, dormienti o non vitali (non *viable cells*) al momento della

raccolta del campione, possono essere catturati durante l'analisi (Emerson, et al., 2017). Sapendo che le attività metaboliche di alcuni microrganismi potrebbero essere sopresse dagli antagonisti e quindi non essere attivamente coinvolte in una determinata condizione (fenotipo), la cattura di tali batteri per la loro semplice presenza potrebbe dare un'associazione falsa positiva. Ciò è supportato da diversi studi che hanno riportato come l'abbondanza tassonomica non corrisponda alle attività trascrizionali (Jia, et al., 2019). La costruzione delle librerie, l'assemblaggio e le banche dati di riferimento della metagenomica per l'annotazione impiegano parametri di difficile comprensione (Knight, et al., 2018). Recentemente, la sfida di mappare le letture fino ai trascritti di origine quando si lavora con microrganismi privi di genomi di riferimento è stata ridotta al minimo grazie al sequenziamento profondo dell'intero metagenoma (Hoque, et al., 2019). Tuttavia, man mano che il campo della metagenomica progredisce e vengono scoperti altri batteri, le fasi di annotazione funzionale continueranno a svilupparsi per soddisfare queste esigenze.

3.3 Metatrascrittomica: Espressione Genica Microbica

Poiché i microbi intestinali vivi rispondono allo stress causato da dieta, stati patologici, farmaci e altri fattori esterni, l'analisi del loro RNA fornirebbe un indizio sulle loro attività metaboliche in risposta a questi stress e sul modo in cui tali risposte influenzano il fenotipo dell'ospite (condizioni di salute o di

malattia). La metatranscriptomica sfrutta quindi le sequenze di RNA per rivelare la presenza e la quantità di RNA microbico in un campione biologico in un determinato momento. Tuttavia, poiché gli mRNA costituiscono meno del 5% dell'RNA totale della cellula (Anderson, et al., 2020), l'identificazione e la quantificazione degli mRNA microbici intestinali fornirà indicazioni su quali geni e vie sono attivi nell'ecosistema intestinale e svolgono ruoli critici nello stato di salute e di malattia.

Il processo di generazione dei dati prevede la raccolta dei campioni, l'estrazione dell'RNA, la preparazione delle librerie e il sequenziamento. Segue l'elaborazione bioinformatica dei dati di sequenziamento (Figura 10). Infine, i dati elaborati possono essere utilizzati per studiare l'espressione genica in una comunità e identificarne gli elementi attivi (Filiatrault, 2011; Shakya, et al., 2019; Zhang, et al., 2021). Le alterazioni nelle risposte e nelle attività microbiche possono essere rivelate confrontando l'espressione genica tra condizioni, parametri clinici e nel tempo.

Recentemente, De Fillipis e collaboratori (De Filippis, et al., 2020) hanno scoperto che, nell'uomo, le specie e i ceppi di *Faecalibacterium*, uno dei taxa più promettenti per lo sviluppo di nuovi probiotici, possono variare a seconda dell'età, dello stile di vita e della geografia dei soggetti studiati e che ogni ceppo di *Faecalibacterium* ha funzioni distinte.

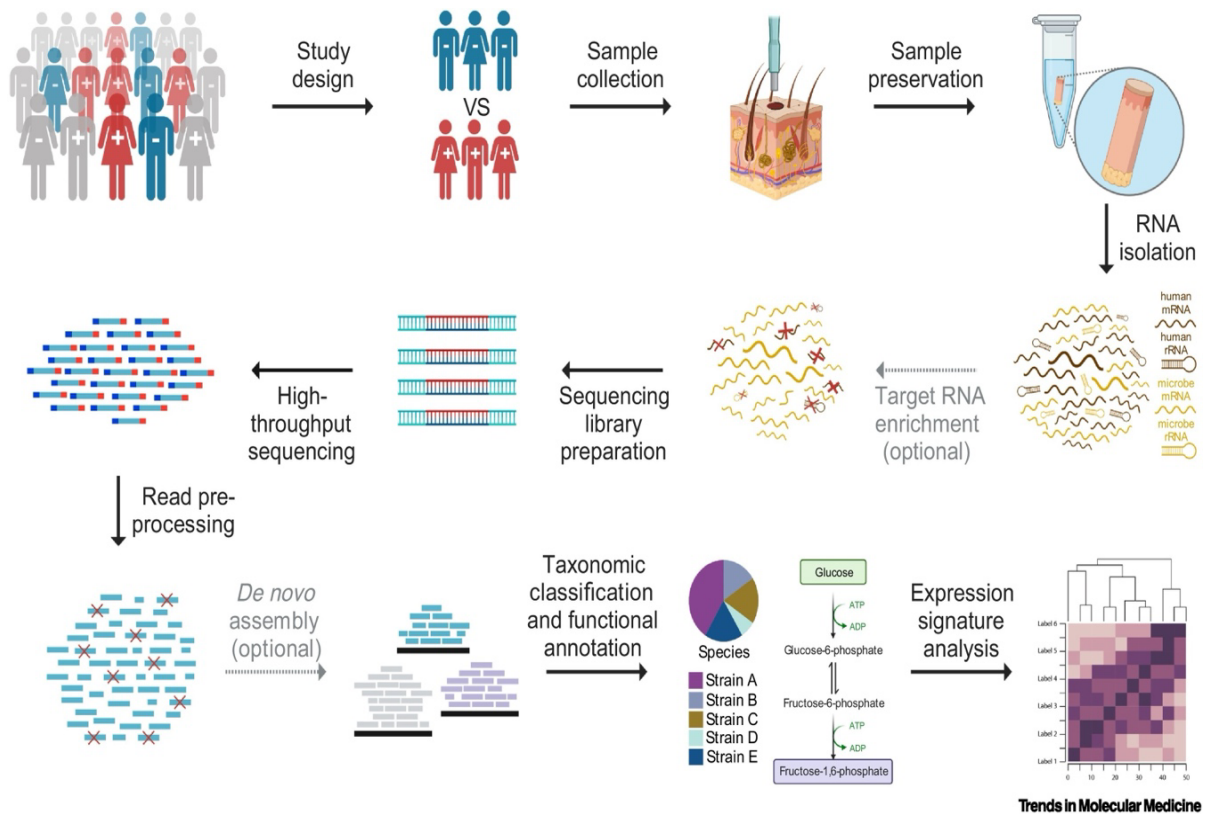


Figura 10 Sintesi di un esperimento di metatranscriptomica. Gli studi di metatranscriptomica iniziano scegliendo un disegno di studio, una dimensione del campione e un gruppo di controllo adeguati al quesito di ricerca. Successivamente, vengono raccolti i campioni e l'RNA totale viene isolato e trattato con DNase per rimuovere il DNA contaminante. Successivamente, la porzione di RNA desiderata viene dedotta mediante sequenziamento shotgun. Per ottenere rappresentazioni accurate delle attività microbiche, i campioni devono essere conservati e/o processati immediatamente dopo la raccolta, poiché l'RNA microbico è instabile e i microbi rispondono rapidamente ai cambiamenti ambientali. L'esperimento può anche comportare l'arricchimento della porzione di RNA desiderata. In genere, gli rRNA dell'ospite e/o del batterio vengono ridotti da oligonucleotidi di cattura specifici per la sequenza. La porzione di mRNA microbico può essere arricchita anche riducendo gli mRNA dell'ospite e/o dell'emoglobina. Nell'analisi computazionale, i dati grezzi del sequenziamento vengono convertiti in informazioni tassonomiche e funzionali e in stime di espressione. Le fasi fondamentali di questo processo comprendono la elaborazione dei dati di sequenziamento, la sottrazione e la rimozione delle letture di rRNA, la sottrazione dell'ospite, l'annotazione tassonomica e funzionale mediante l'interrogazione delle letture rispetto a database di riferimento e il raggruppamento delle letture in famiglie in base alla loro somiglianza di sequenza, alle informazioni tassonomiche e/o funzionali. Facoltativamente, le letture che superano le fasi di preelaborazione possono essere assemblate de novo in trascritti contigui più lunghi e possono essere condotte analisi statistiche per associare le informazioni di espressione ai fenotipi del campione. Per queste analisi sono disponibili diversi software bioinformatici. Le fasi opzionali sono evidenziate in grigio. (Ojala, et al., 2023)

Analogamente, è stato riscontrato come *Ruminococcus gnavus* produca un glucomannano infiammatorio in grado di indurre le cellule dendritiche a

secernere TNF α nei pazienti con malattia di Crohn (Henke, et al., 2019).

Tuttavia, è stato anche riportato che la stessa specie di batterio ha la capacità di rafforzare le funzioni della barriera intestinale modulando la produzione di mucina nell'intestino (Graziani, et al., 2016), il che potrebbe prevenire l'infiammazione della mucosa intestinale (Luissint, et al., 2016). Quest'ultima osservazione è possibile perché il batterio può mostrare attività diverse in base alle condizioni prevalenti (commutazione fenotipica) (Sousa, et al., 2012; Tadrowski, et al., 2018).

Per questo motivo, l'analisi dell'mRNA prodotto da un batterio in un determinato momento sembrerebbe rappresentare un modo migliore per prevedere le attività metaboliche e le potenziali funzioni dell'organismo piuttosto che fare previsioni basate sulla sua semplice presenza.

Utilizzando la metatranscriptomica, Granata ed il suo staff (Granata, et al., 2020) hanno dimostrato che il metabolismo dei carboidrati, degli aminoacidi e dei nucleotidi è gravemente compromesso nel microbiota duodenale dei pazienti obesi rispetto ai pazienti non obesi. Sebbene la tecnica analitica sia orientata verso gli organismi con tassi di trascrizione più elevati, l'assegnazione delle letture di mRNA ai taxa potrebbe svelare le funzioni critiche apportate dai taxa chiave.

Come per altre tecnologie emergenti, restano da affrontare le sfide tecniche e di campionamento. In particolare, la capacità di acquisire una quantità sufficiente di RNA di alta qualità è un fattore limitante (Zhang, et al., 2021).

Come soluzione, si possono raccogliere più campioni per soggetto e grandi volumi di campione. In alternativa, è possibile utilizzare l'amplificazione dell'intero trascrittoma per generare più materiale. Se il campione ha anche un elevato contenuto di RNA umano, l'eliminazione delle molecole di RNA indesiderate con l'ibridazione sottrattiva o un altro metodo di deplezione dell'RNA può aumentare la sensibilità. Anche il sequenziamento di sequenze più lunghe può migliorare la sensibilità, anche se aumenta notevolmente i costi. Inoltre, sebbene i dati metatranscriptomici possano offrire ai ricercatori una visione unica, esiste un'elevata variabilità nel trascrittoma degli individui rispetto ai loro metagenomi (Franzosa, et al., 2014). Studi precedenti hanno dimostrato che alcuni mRNA microbici possono possedere siti di legame ribosomiale deboli e sono quindi scarsamente tradotti, mentre solo quelli con siti di legame ribosomiale forti sono frequentemente tradotti (Liang, et al., 2000). Ciò implica che non tutti gli mRNA microbici di massa (totali) rilevati dalla metatranscriptomica possono essere effettivamente coinvolti in un determinato fenotipo dell'ospite. Inoltre, poiché le proteine microbiche possono avere effetti diretti su altri microbi e influenzare la fisiologia dell'ospite (Morgan, et al., 2018; Schweppe, et al., 2015), l'identificazione e la quantificazione delle proteine microbiche intestinali (metaproteomica) e dei metaboliti (metabolomica) fornirebbe un quadro migliore del ruolo dei microbi intestinali nella salute e nella malattia.

3.4 Metaproteomica: Analisi delle Proteine Microbiche

La metaproteomica impiega la spettrometria di massa ad alta risoluzione per identificare e misurare i livelli di proteine espresse (Mesuere, et al., 2016). Essendo le proteine considerate “i cavalli di battaglia” dei sistemi biologici, il loro studio mette in evidenza gli attori responsabili dello svolgimento di funzioni specifiche, della partecipazione come "mattoni" e del coordinamento dei processi biologici. La metodologia è direttamente derivata dalla proteomica classica di un singolo organismo e prevede l'estrazione delle proteine, la proteolisi con tripsina e l'analisi dei peptidi risultanti mediante spettrometria di massa tandem ad alta risoluzione accoppiata alla cromatografia a fase inversa. I dati vengono interrogati rispetto a un database di sequenze proteiche per identificare le sequenze peptidiche e vengono assegnati loro valori quantitativi (Gouveia, et al., 2020). Le informazioni ottenute vengono elaborate da *pipeline* che alla fine confrontano i peptidi con database metagenomici per individuare i microbi più probabili che potrebbero aver espresso le proteine. Diversi studi hanno utilizzato questo metodo analitico per identificare le proteine microbiche intestinali che influenzano direttamente l'ospite o causano disbiosi. Ad esempio, utilizzando la metaproteomica Zhang (Zhang, et al., 2018) ha dimostrato come l'infiammazione e lo stress ossidativo associati alla malattia infiammatoria intestinale (IBD) inducano quantità significative di proteine fagiche *Caudovirales* che sono collegate alla disbiosi microbica intestinale.

Analogamente, Long (Long, et al., 2020) ha riferito che lo stress ossidativo associato al cancro del colon-retto induce un'eccessiva produzione di batterioferritina nei *Parabacteroides*, che consente loro di operare una selezione nei confronti degli altri batteri presenti nell'intestino con conseguente disbiosi. Inoltre, è stato dimostrato che il consumo di cereali raffinati favorisce la colonizzazione di batteri che degradano il muco del colon e che secernono β -galattosidasi e endo-alfa-N-acetilgalattosaminidasi per degradare la mucina, compromettendo le funzioni della barriera intestinale.

Questi studi sono solo alcuni esempi di come la metaproteomica permetta di identificare chiaramente come le condizioni patologiche (o i loro fattori scatenanti) risultino nella disbiosi microbica intestinale e quali proteine microbiche possano influenzare direttamente l'ospite.

La capacità della metaproteomica di identificare e quantificare le proteine provenienti da fonti microbiche e dall'ospite la rende un approccio potente nello studio delle interazioni microbo-ospite (Zhang, et al., 2018; Gavin, et al., 2018). Tuttavia, la metaproteomica presenta delle specifiche sfide. A parte le variazioni che esistono tra le proteine microbiche ottenute da individui diversi, le proteine microbiche potrebbero essere contaminate da proteine dell'ospite e da proteine alimentari non digerite (Issac, et al., 2019), rendendo difficile l'identificazione dell'origine delle proteine rilevate. Inoltre, poiché non esiste un metodo standardizzato per la preparazione dei campioni per l'analisi metaproteomica, studi simili possono dare risultati diversi (Tanca, et al., 2015;

Xiong, et al., 2015). Inoltre, non tutte le proteine microbiche rilevate possono essere presenti nel database delle proteine utilizzato per l'identificazione (Charubin, et al., 2020) e questo può limitare il numero di peptidi identificati in un determinato campione. Inoltre, vi sono ancora parecchie proteine microbiche che non sono state caratterizzate e non presentano funzioni note (Erickson, et al., 2012) e questo può rendere difficile dare un senso a tali dati durante l'analisi metaproteomica.

Nel corso degli anni, sono state sviluppate diverse *pipeline* bioinformatiche che utilizzano l'algoritmo *Lowest Common Ancestor* per mappare i peptidi microbici ai ranghi tassonomici, al fine di rintracciare le fonti dei peptidi identificati dalla metaproteomica (Mesuere, et al., 2016). Nel frattempo, queste *pipeline* fanno solo inferenze basate sulle banche dati disponibili (Tanca, et al., 2015). Recentemente, alcuni studi hanno dimostrato la tendenza di cellule diverse a fondersi e a scambiarsi materiali cellulari per dare origine a cellule ibride che esprimono elementi appartenenti a entrambe le cellule madri (Erickson, et al., 2012); inoltre, considerando che diversi batteri possono produrre una determinata proteina (Bratlie, et al., 2010), dedurre la fonte di una proteina da un database potrebbe non fornire una buona immagine delle popolazioni dei vari microbi che hanno effettivamente prodotto la proteina. Per questo motivo, molti studi combinano dati metagenomici e metaproteomici per migliorare l'assegnazione delle proteine ai taxa in modo più realistico (Grob, et al., 2015). Nel frattempo, poiché altri metaboliti microbici, oltre alle proteine,

influenzano la salute e la malattia dell'ospite, è indispensabile analizzare tali composti per una migliore comprensione delle interazioni tra microbi e ospite.

3.5 Metabolomica: Profilazione dei Metaboliti Microbici

La metabolomica è l'analisi completa con cui vengono identificati e quantificati tutti i metaboliti, piccole molecole rilasciate dall'organismo nell'ambiente circostante, di un campione (Fiehn, 2002). Il metaboloma è considerato l'indicatore più diretto dello stato di salute di un ambiente o delle alterazioni delle omeostasi, cioè della disbiosi (Bernini, et al., 2009). Le variazioni nella produzione di metaboliti caratteristici sono correlate a cambiamenti nell'attività delle vie metaboliche e, pertanto, la metabolomica rappresenta un approccio applicabile all'analisi dei processi (Krumstiek, et al., 2015). Inoltre, l'applicazione della metabolomica per la scoperta di farmaci e la farmacogenomica rappresenta una strada estremamente promettente per la medicina personalizzata (Mastrangelo, et al., 2014).

Il profilo metabolomico associato al microbioma può mostrare una forte dipendenza da fattori ambientali (ad esempio, dieta, esposizione a xenobiotici e fattori di stress ambientale), fornendo informazioni preziose non solo sulle caratteristiche del microbioma, ma anche sulle interazioni della comunità microbica con l'ambiente ospite (Manor, et al., 2014; Wu, et al., 2016).

E' possibile utilizzare un approccio mirato o non mirato. Nella metabolomica mirata, vengono quantificati i metaboliti coinvolti in percorsi specifici legati a

una determinata condizione patologica (Vignoli, et al., 2019). L'approccio non mirato, invece, tende a misurare il maggior numero possibile di metaboliti dai campioni senza alcun pregiudizio (Commisso, et al., 2013). Si tratta di una tecnica potente che può svelare il modello metabolico del microbiota intestinale in una determinata condizione (Peng, et al., 2015) e anche discriminare tra i metaboliti che possono essere associati a condizioni diverse (Vignoli, et al., 2019). La metabolomica è stata applicata per individuare biomarcatori in grado di distinguere i pazienti affetti da cancro del colon-retto (CRC: *Colorectal cancer*) in fase iniziale da quelli in fase avanzata sulla base dei metaboliti delle urine (Kim, et al., 2019). Analogamente, la metabolomica non mirata ha rivelato che la lattosilceramide è un metabolita chiave in grado di distinguere i bambini con malattia di Crohn da quelli con colite ulcerosa (Daniluk, et al., 2019).

L'aspetto più interessante è che il metaboloma può illustrare i processi di segnalazione coinvolti nella comunicazione tra batteri, come il *quorum sensing*, che mette in relazione le risposte dell'espressione genica con i cambiamenti nella densità della popolazione cellulare (Camilli & Bassier, 2006). Una comprensione più approfondita dei meccanismi di comunicazione all'interno delle comunità microbiche potrebbe rivoluzionare le attuali strategie in aree come il controllo delle malattie infettive e ottimizzare lo sfruttamento agricolo nella conservazione dell'ambiente. Pertanto, la metabolomica completa le

informazioni fornite dalle altre omiche descrivendo non solo i sistemi biologici in sé, ma anche il modo in cui interagiscono internamente ed esternamente.

La generazione di dati metabolomici differisce in modo significativo dalla generazione di dati metagenomici e metatranscriptomici, che si basano fortemente sul sequenziamento. L'identificazione e la quantificazione dei metaboliti avvengono in genere mediante una combinazione di tecniche cromatografiche (cromatografia liquida, LC, e gascromatografia, GC) e metodi di rilevamento, come la spettrometria di massa (MS: *Mass spectrometry*) e la risonanza magnetica nucleare (NMR: *Nuclear Magnetic Resonance*) (Daliri, et al., 2017). Queste tecnologie producono spettri costituiti da pattern di picchi che consentono sia l'identificazione che la quantificazione dei metaboliti. Questi pattern (previsti o ottenuti sperimentalmente) vengono memorizzati in database spettrali, consentendo l'analisi automatizzata e la generazione di profili metabolomici.

Diversi studi hanno dimostrato che i metodi di preparazione dei pazienti e dei campioni possono avere un impatto significativo sul microbiota intestinale (Gorkiewicz, et al., 2013; Shobar, et al., 2016; Drago, et al., 2016) e sui metaboliti analizzati (Nagata, et al., 2019) e questo può causare disparità nei risultati ottenuti in studi simili.

Occorre, tuttavia, sottolineare il fatto che i dati della metabolomica da soli non forniscono alcuna informazione su quali batteri specifici abbiano prodotto un determinato metabolita. Inoltre, sapendo che batteri diversi come le

Ruminococcaceae e le *Lachnospiraceae* possono produrre gli stessi metaboliti (ad esempio, gli acidi grassi a catena corta) (Venegas, et al., 2019), è difficile prevedere con precisione quali batteri specifici abbiano prodotto determinati metaboliti anche quando i dati metabolomici vengono uniti ad altri dati "omici". Poiché nessuna singola strategia "omica" è sufficiente a presentare un meccanismo dettagliato per descrivere l'interazione tra microrganismi intestinali e ospite in salute e malattia, la combinazione di diverse tecniche "omiche" (multiomica) è una strategia potente per trarre conclusioni valide.

4. Applicazioni multi-omiche del microbiota

Le applicazioni multi-omiche nello studio del microbiota offrono un approccio olistico per comprendere in modo più completo la complessità delle interazioni microbiche e il loro impatto sullo stato di salute e su quello di malattia. L'integrazione di dati da diverse piattaforme omiche fornisce un'ampia visione dei vari livelli di funzionamento del microbiota e delle possibili interazioni con l'ospite.

4.1 Valutazione dell'effetto della dieta

Suini

La dieta della scrofa influenza il microbiota del suinetto e il profilo dei prodotti finali della fermentazione (Leblois, et al., 2017). La dieta ha un impatto significativo sulla diversità microbica intestinale ed è estremamente importante per il mantenimento della salute, prevenendo lo sviluppo della disbiosi, un fattore eziologico di molte malattie croniche (Doré & Hervé, 2015). Affinché i nutrienti della dieta siano metabolizzati in modo efficiente, una popolazione microbica sana nel tratto gastro intestinale (GIT) è molto importante, in quanto può portare a una migliore digestione e a un efficiente assorbimento/utilizzo dei nutrienti attraverso la membrana mucosa dell'intestino del suino. Quando il sistema immunitario del tratto gastrointestinale, che rappresenta circa il 70% della popolazione totale di cellule immunitarie, viene attivato in risposta a un

fattore di stress, viene prodotta una serie diversificata di cellule immunitarie specializzate e di molecole di segnalazione, a volte a scapito dell'efficienza digestiva (Liao & Nyachoti, 2017). Uno studio recente (Yang, et al., 2018) ha rilevato che le *Ruminococcaceae spp.* che producono acidi grassi a corta catena (SCFA) e i *Lactobacillus spp.* che producono acido lattico, svolgono un ruolo importante nel sopprimere l'assunzione di mangime da parte dei suini, mentre le *Prevotella* possono avere un effetto opposto. Questi autori, (Yang, et al., 2018) hanno quindi ipotizzato che *Prevotella* possa essere il batterio chiave per il controllo dell'appetito dei suini. Questi risultati suggeriscono che la comunità microbica intestinale dei suini può contribuire in modo vitale al comportamento alimentare dell'ospite; pertanto, la modulazione del microbiota intestinale può risultare estremamente utile per il controllo dell'assunzione di mangime nell'industria suina (Yang, et al., 2018). È interessante notare come un ulteriore studio abbia dimostrato che il cambiamento maggiore nella composizione batterica si verifici nei suini di età compresa tra i 21 e i 33 giorni; questo periodo di tempo corrisponde, di fatto, al momento in cui l'animale passa da una dieta prevalentemente a base di latte ad una contenente mangime solido. Questi risultati sono stati coerenti in tutti i siti GIT esaminati, ovvero duodeno, ileo, cieco e colon (De Rodas, et al., 2018).

La fibra alimentare (DF: *dietary fiber*) è un componente del mangime che non può essere digerito in modo efficiente dagli enzimi digestivi dei monogastrici. Tuttavia, stimola selettivamente la crescita e l'attività di uno o più batteri

all'interno del GIT, dando luogo a DF fermentata dal microbiota nella parte distale del colon. I principali prodotti di questa fermentazione batterica sono gli acidi organici a catena corta (SCOA: *short chain organic acids*), come lattato, acetato, propionato e butirato. Questi SCOA contribuiscono allo sviluppo del tratto digestivo influenzando la proliferazione delle cellule epiteliali intestinali (Montagne, et al., 2003). Inoltre, le proprietà acide associate agli SCOA impediscono la crescita di patogeni batterici enterici come *Salmonella*, *E. coli* e *Clostridi* (Pickard, et al., 2017). I polisaccaridi solubili non amidacei stimolano la crescita di microrganismi intestinali commensali, che aumentano la produzione di SCOA, abbassando così il pH del colon (Knudsen, et al., 2012). Al contrario, l'inclusione nella dieta di polisaccaridi non amidacei insolubili, come pectina, cellulosa, gomme ed emicellulose, può servire ad aumentare la lunghezza dei villi e a ritardare il tempo di transito nel tratto gastrointestinale, consentendo così un periodo più lungo per la degradazione del materiale fibroso da parte del microbiota nel colon (Lindberg, 2014). Lindberg, nel 2014, dopo aver esaminato diverse referenze (Knudsen, et al., 2012; Freire, et al., 2000; Hedemann, et al., 2006), ha suggerito che i vari tipi di carboidrati vegetali si comportano in modo diverso nel tratto gastrointestinale a seconda delle loro caratteristiche strutturali. L'inclusione di polisaccaridi non amidacei (NSP: *non-starch polysaccharides*) solubili nella dieta può stimolare la crescita di microbi intestinali commensali, portando a una maggiore produzione di acidi organici a catena corta (OA: *organic acids*)

e a un abbassamento del pH nell'intestino crasso. Gli NSP insolubili riducono il tempo di transito e forniscono un substrato lentamente degradabile dal microbiota nell'intestino crasso distale e modulano la morfologia intestinale aumentando la lunghezza dei villi (Lindberg, 2014).

È ormai assodato che l'integrazione di lattobacilli nei neonati favorisce lo sviluppo precoce di una microflora intestinale stabile, stimola il sistema immunitario e previene la diarrea (Dowarah, et al., 2016). Recentemente è stato anche riportato che, includendo la xilanasi nella dieta dei suini, è stato possibile aumentare la conta fecale e ileale dei lattobacilli benefici, riducendo contemporaneamente la conta di *E. coli*. (Balasubramanian, et al., 2018). La comunità microbica intestinale si adatta alle variazioni della dieta dell'animale ospite, sebbene quest'ultima influenzi anche la distribuzione del microbiota all'interno del GIT (Leser, et al., 2000).

Il microbiota intestinale è un regolatore ambientale dell'accumulo di grasso e dell'adiposità (Stephens, et al., 2018). I *Bacteroidetes* contengono meno geni per enzimi coinvolti nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi, rispetto ai *Firmicutes*. Pertanto, l'abbondanza di *Firmicutes* è maggiore negli animali obesi (Stephens, et al., 2018). Di conseguenza la riduzione del loro numero in seguito alla somministrazione di DF consolida la comprensione degli effetti positivi che queste fibre mostrano nel controllo dell'obesità nei mammiferi superiori, come il maiale e l'uomo. In un altro studio, quando i suini sono stati alimentati con diete "a basso contenuto di grassi e ad alto contenuto di fibre"

(LF: *low fat and high fiber*) o "ad alto contenuto di grassi e a basso contenuto di fibre" (HF: *high fat and low fiber*), il numero di copie geniche di *Lactobacilli spp*, *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium prausnitzii* è stato osservato essere più alto nei suini alimentati con la dieta LF, mentre i suini alimentati con la dieta HF contenevano più *Enterobacteriaceae* (Heinritz, et al., 2016). La dieta LF contenente maggiori quantità di fibra alimentare è stata in grado di stimolare la crescita di batteri benefici nel microbiota e di aumentare la produzione di SCFA, in particolare di butirrato. Al contrario, la dieta HF ha aumentato il numero di organismi potenzialmente patogeni. Spurlock e Gabler nel 2008 hanno presentato una revisione della letteratura in cui i suini sono stati utilizzati come modello per studiare l'obesità umana. Alcune razze di suini, come la razza *Ossabaw* degli Stati Uniti d'America, diventano facilmente obese in assenza di diete ad alto contenuto di fibre (Spurlock & Gabler, 2008).

Nell'industria suina, i mangimi vengono comunemente integrati con rame (Cu) per le sue proprietà antimicrobiche e per il potenziale di promozione della crescita. Tuttavia, il fabbisogno nutrizionale di rame per i suini varia da 5 mg/kg di mangime nei suinetti a 20 mg/kg nelle scrofe in lattazione (National Research Council, et al., 2012). Quando i suinetti svezzati sono stati alimentati con 175 mg/kg di solfato rameico (CuSO₄), le popolazioni di batteri lattici, lattobacilli e streptococchi nel GIT si sono ridotte (Højberg, et al., 2005). Tali elevate quantità di rame nel mangime possono anche funzionare per aumentare il contenuto di acidi grassi insaturi, che possono risultare in un grasso di maiale

più morbido (Dębski, 2016). Alti livelli di zinco (Zn) e rame nella dieta possono anche servire a diminuire l'impennata comunemente osservata nei livelli plasmatici di cortisolo al 9° e 19° giorno quando i suini sono sottoposti a una competizione. Inoltre, è stato dimostrato che alte concentrazioni di Zn, e in particolare di Cu, riducono significativamente la diversità del microbiota ileale. Tuttavia, questo effetto era reversibile, il che suggerisce che la diversità del microbiota è stata ripristinata dopo la rimozione di Zn e Cu aggiuntivi dalla dieta (Namkung, et al., 2006). È stato dimostrato che gli enterococchi sviluppano resistenza ad antibiotici come macrolidi e glicopeptidi, tra cui la vancomicina, in seguito all'esposizione ad alte concentrazioni di Cu. Questi enterococchi resistenti, che appartengono all'ordine delle *Lactobacillales* e si trovano abbastanza frequentemente nel microbiota intestinale dei mammiferi, compresi i suini, possono essere trasferiti all'uomo che consuma la carne di questi animali (Yazdankhah, et al., 2014).

Ruminanti

Uno studio di confronto globale del microbioma del rumine in 742 campioni di 32 specie provenienti da diverse località geografiche (Henderson, et al., 2015), ha identificato che 30 dei gruppi batterici più abbondanti erano presenti in oltre il 90% dei campioni. I membri dei ceppi metanogeni *Methanobrevibacter gottschalkii* e *Methanobrevibacter ruminantium* sono stati trovati in quasi tutti i campioni e rappresentavano il 74% degli archei. La consistenza dei

microorganismi comuni in un'ampia varietà di ruminanti ha portato Henderson a concludere che le pressioni evolutive globali hanno selezionato componenti microbiche comuni all'interno dei microbiomi fermentativi. Ciò è in linea con la teoria della selezione naturale di Darwin, considerando che una dieta naturale ricca di foraggio è comune tra i ruminanti. Questo studio ha anche concluso che la composizione del microbioma del rumine è guidata principalmente dalla dieta (Henderson, et al., 2015).

In effetti, gli interventi dietetici sono stati storicamente utilizzati per migliorare i fenotipi dei ruminanti grazie alla loro influenza sul microbioma del rumine (Tabella 2).

Le strategie nutrizionali possono influenzare le interazioni tra i gruppi microbici e il loro effetto sulla produzione e sulla qualità dei prodotti. Forse l'area che meglio illustra questo punto è la qualità dei prodotti derivati dai ruminanti in termini di profilo degli acidi grassi. L'integrazione di acidi grassi può influenzare la struttura microbica e la bioidrogenazione degli acidi grassi nel rumine e quindi influenzare gli acidi grassi disponibili per l'assorbimento e la loro comparsa nella carne e nel latte, con effetti apparentemente influenzati dall'origine del liquido del rumine (Carreño, et al., 2019). È noto che i batteri sono in gran parte responsabili della bioidrogenazione degli acidi grassi nel rumine, mentre si ritiene che i protozoi non siano attivamente coinvolti nella bioidrogenazione (Lourenço, et al., 2010).

Tabella 2 Esempi di interventi dietetici utilizzati per modulare il microbioma del rumine (Huws, et al., 2018).

Dietary intervention	Effects	Mode of action	References
High quality forage	Improve milk fat content and quality	Favor fibrolytic microbes and microbial diversity (resilience)	Couvreux et al., 2006
High concentrate diet	Increase animal productivity	Favor propionate production and decrease microbial diversity	Fernando et al., 2010; Belanche et al., 2012
Antibiotics	Increase productivity and decrease rumen acidosis	Favor propionate-producers	Schelling, 1984
Red Clover	Increase productivity	Protein complexing with polyphenol oxidase allowing more protein to by-pass rumen	Broderick, 1995; Lee, 2014; Hart et al., 2016
Bicarbonate	Prevention rumen acidosis	Limit the rumen pH depression and the negative impact on rumen microbes	Keunen et al., 2003; González et al., 2012
Probiotics (Yeast)	Prevention rumen acidosis and increase feed efficiency	Oxygen scavenging	Newbold et al., 1996; Desnoyers et al., 2009
Essential oils	Prevention rumen acidosis	Shift in the microbial community	Calsamiglia et al., 2007; Macheboeuf et al., 2008
Tannins	Improve the flow of digestible rumen by-pass protein	Formation of phenol-dietary protein complexes	Mcsweeney et al., 2001; Patra, 2010
Saponins	Methane inhibition and increased microbial protein synthesis	Antiprotozoal effect	Patra and Saxena, 2009b; Ramos-Morales et al., 2017
Unsaturated fats	Methane inhibition	Antiprotozoal effect	Martin et al., 2010
Methane analogs	Methane inhibition	Inhibition of rumen methanogens	Knight et al., 2011; Abecia et al., 2012; Hristov et al., 2015

Tuttavia, i protozoi influenzano la composizione della popolazione batterica nel rumine e quindi potenzialmente la bioidrogenazione (Newbold, et al., 2015).

Inoltre, i protozoi incorporano direttamente gli acidi grassi insaturi proteggendoli nel rumine dalla bioidrogenazione e consentendo il trasferimento diretto nel latte e nella carne (Lourenço, et al., 2010), illustrando alcuni dei diversi livelli a cui le interazioni microbiche possono influire sulla qualità del prodotto.

Dato l'effetto della dieta sul microbioma del rumine, forse non sorprende che sia stata utilizzata un'ampia gamma di additivi alimentari per manipolare la fermentazione del rumine (Figura 11).

I ruminanti sono tradizionalmente alimentati con diete ad alto contenuto di foraggio per ridurre i costi di alimentazione e per evitare la competizione con le fonti vegetali utilizzabili come cibo per l'uomo. Oltretutto, è stata rilevata una relazione lineare tra la percentuale di erba fresca nella dieta e la composizione del grasso del latte e le proprietà del burro nelle bovine da latte (Couvreur, et al., 2006). In particolare, l'erba fresca rispetto al fieno di graminacee favorisce un'accelerazione della colonizzazione del mangime da parte dei microbi del rumine e della successiva digestione (Belanche, et al., 2017). Si può notare anche che la sintesi proteica microbica aumenta e le emissioni di metano diminuiscono (Belanche, et al., 2016).

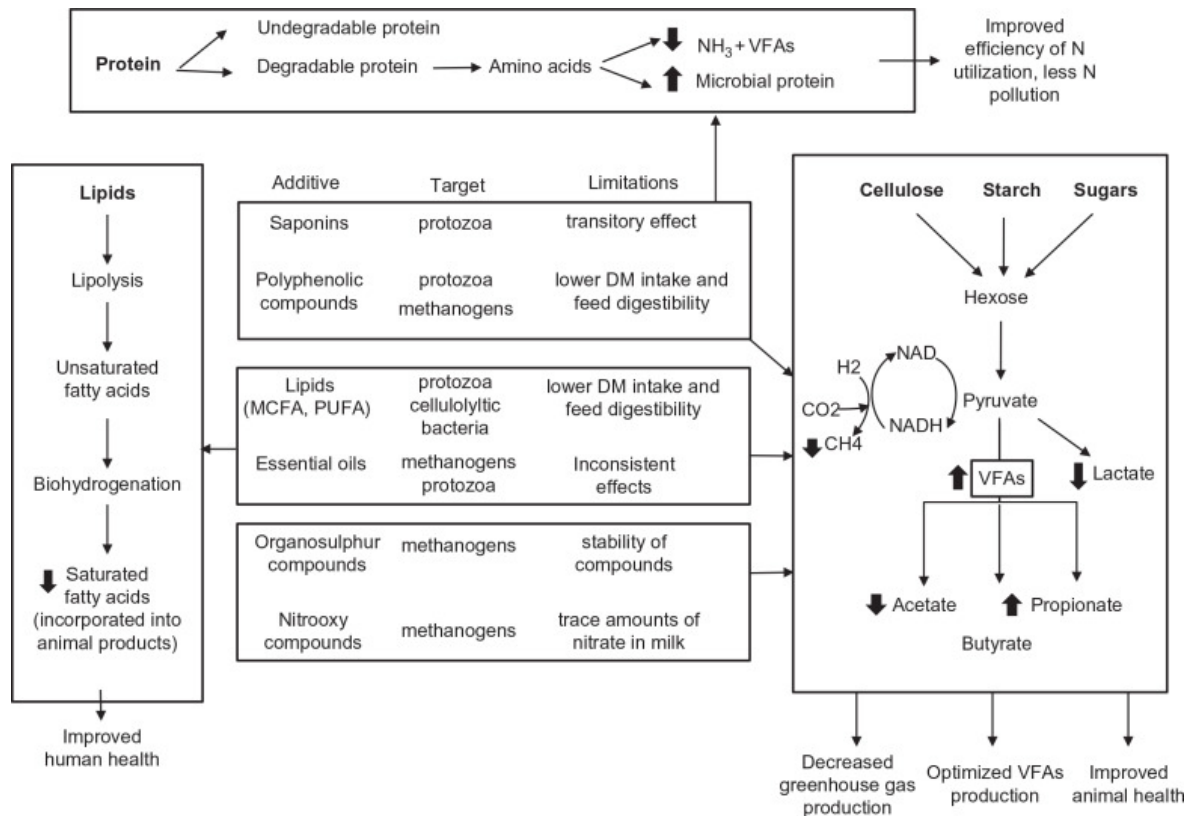


Figura 11 Potenziali effetti degli additivi alimentari sul microbioma del rumine e sulla fermentazione e limiti del loro uso nell'alimentazione animale. MCFA (medium chain fatty acids) = acidi grassi a catena media; PUFA (polyunsaturated fatty acids) = acidi grassi polinsaturi; VFA (volatile fatty acids) = acidi grassi volatili. (Newbold & Ramos-Morales, 2020)

Tuttavia, la maggior parte dei sistemi di produzione intensiva di ruminanti, in particolare i sistemi di allevamento di bovini, utilizzano diete ad alto contenuto di cereali per massimizzare i tassi di crescita e l'efficienza alimentare.

L'integrazione della dieta con carboidrati facilmente digeribili minimizza gli effetti negativi della carenza di proteine nella dieta (Belanche, et al., 2012) e promuove una modifica del microbioma del rumine (Fernando, et al., 2010), dovuta a una semplificazione della comunità microbica ruminale. Di conseguenza, gli animali alimentati con diete ad alto contenuto di cereali tendono ad avere una minore diversità batterica e concentrazioni più basse di microrganismi fibrolitici (cioè protozoi e funghi anaerobi), che sono

generalmente associati a una minore proteolisi del rumine e, in ultima analisi, a una maggiore efficienza alimentare (Belanche, et al., 2012).

In ulteriori studi si è anche dimostrato che una dieta ad alto contenuto di cereali influisce sulla composizione della comunità metanogenica del rumine attraverso il suo effetto sul potenziale redox del rumine, con un effetto specifico sull'ordine delle *Methanomicrobiales* (Friedman, et al., 2017). Tuttavia, questa strategia porta spesso a una diminuzione del pH del rumine a causa dell'elevato accumulo di acidi grassi volatili (VFA: *volatile fatty acids*) e lattato e, in ultima analisi, a disturbi digestivi (acidosi del rumine con accumulo di lattato solo nei casi più gravi) e a reazioni di dispersione energetica (Russell & Strobel, 1993). Per prevenire l'acidosi lattica, nelle diete ad alto contenuto di cereali sono spesso inclusi antibiotici come gli ionofori, che selezionano i batteri Gram positivi che producono lattato. Tuttavia, a livello globale, gli antibiotici e i promotori della crescita sono stati drasticamente ridotti nella produzione zootecnica, con un divieto applicato nell'UE (Russell & Houlihan, 2003). È necessario individuare nuove strategie economicamente vantaggiose per modulare la fermentazione microbica del rumine.

L'alimentazione dei ruminanti con trifoglio rosso determina un aumento dell'efficienza azotata grazie al possesso dell'enzima polifenolossidasi (PPO: *polyphenol oxidase*) (Lee, 2014). La PPO è una metallo-proteina di rame che, in presenza di ossigeno, catalizza l'ossidazione dei fenoli endogeni a chinoni (Lee, et al., 2004). La PPO protegge le proteine vegetali dalla degradazione

ruminale, consentendo alle proteine intatte di passare all'abomaso. Il meccanismo di protezione delle proteine sembra essere legato alla disattivazione delle proteasi vegetali da parte dell'enzima PPO e al legame proteina-chinone mediato dalla PPO (Mayer & Harel, 1979; Lee, 2014). La PPO è localizzata nel cloroplasto e fino a poco tempo fa si pensava che il substrato per l'attivazione della PPO esistesse solo nel vacuolo della pianta. Dati recenti indicano che la PPO protegge preferenzialmente le proteine all'interno dei cloroplasti, suggerendo che anche all'interno dei cloroplasti esistono substrati che attivano la PPO (Hart, et al., 2016; Boeckx, et al., 2017). È inoltre noto che la somministrazione di insilati di trifoglio rosso altera la diversità microbica del rumine rispetto a una dieta a base di insilati di loglio perenne, il che contribuisce ai cambiamenti osservati nel fenotipo animale quando viene somministrato il trifoglio rosso (Huws, et al., 2010).

L'integrazione di bicarbonato di sodio e lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) ha dimostrato un certo successo nella prevenzione dell'acidosi subacuta (SARA: *Subacute ruminal acidosis*) (Keunen, et al., 2003; González, et al., 2012; Ishaq, et al., 2017). Grazie alla sua attività di recupero dell'ossigeno nel rumine (Newbold, et al., 1996), *S. cerevisiae* può aumentare la densità dei batteri fibrolitici e quindi l'efficienza alimentare (Desnoyers, et al., 2009). Ishaq (Ishaq, et al., 2017) ha inoltre dimostrato che le vacche da latte con SARA indotta dalla dieta presentano una maggiore abbondanza di funghi del rumine e una minore abbondanza di protozoi del rumine rispetto alle vacche sane. Ha

inoltre somministrato lievito secco attivo alle vacche da latte con SARA indotta e ha notato un aumento del pH e dell'abbondanza di protozoi del rumine. Negli ultimi anni, una varietà di composti bioattivi vegetali, tra cui saponine, oli essenziali, tannini e flavonoidi, sono stati valutati per la loro capacità di modulare la fermentazione microbica del rumine (Patra & Saxena, 2009; Patra & Saxena, 2009). È stato dimostrato che gli oli essenziali rallentano la degradazione dell'amido e delle proteine, riducendo il rischio di acidosi e causando una lieve riduzione della metanogenesi del rumine (Calsamiglia, et al., 2007). Tuttavia, la loro applicazione è stata limitata a causa dei loro effetti negativi sulla digestione della fibra e sulla fermentazione del rumine (Machaboeuf, et al., 2008).

Anche i composti fenolici, come i tannini condensati e idrolizzabili, possono avere effetti antinutrizionali a causa della loro interazione con gli enzimi e delle loro proprietà antimicrobiche. È stato dimostrato che un estratto di liquirizia ricco di isoflavonoidi ha ridotto la produzione di ammoniaca e metano, effetti attribuiti alla diminuzione del numero di protozoi e della diversità dei batteri, nonché a cambiamenti nella struttura di batteri e archei (Ramos-Morales, et al., 2018). Quando nove composti sono stati sintetizzati dall'alcaloide naturale emantamina e testati in vitro per i loro effetti sui protozoi del rumine e sui parametri di fermentazione, i risultati hanno mostrato che semplici esterificazioni dell'emantamina o del suo derivato diidroemantamina con acetato, butirrato, pivalato o esanoato hanno portato a composti che

differiscono nei loro effetti sulla fermentazione del rumine (Ramos-Morales, et al., 2009).

Le saponine hanno mostrato un potenziale come agenti antiprotozoari per aumentare l'apporto microbico all'ospite e diminuire la produzione di metano (Newbold, et al., 2015). Questo effetto è transitorio a causa della deglicosilazione delle saponine in sapogenine da parte dei batteri del rumine (Wallace, et al., 2002). È stato dimostrato che l'effetto antiprotozoario dei derivati dell'ederoside B, la principale saponina del frutto dell'edera, varia a seconda della composizione e del legame del sostituente con la sapogenina (Ramos-Morales, et al., 2017). Inoltre, risultati più recenti dimostrano che l'attività antiprotozoaria non è una caratteristica intrinseca di tutte le saponine e che piccole variazioni nella struttura di un composto possono avere un'influenza significativa sulla loro attività biologica (Ramos-Morales, et al., 2019). È chiaro quindi che è essenziale capire in che misura le caratteristiche strutturali di un composto possano influenzare l'attività biologica di un estratto vegetale. L'effetto degli estratti vegetali sulla fermentazione del rumine è stato riportato come molto variabile (Newbold & Webster, 2007), ma dato che lo stadio di crescita, il raccolto e le condizioni di conservazione possono tutti alterare la struttura delle molecole bioattive nelle piante, è da chiedersi se gli studi stiano paragonando prodotti simili tra loro.

4.2 Probiotici

Nel corso degli anni, i ricercatori hanno proposto molte definizioni per il termine "probiotico", basate sui risultati benefici e salutari ottenuti in seguito all'applicazione di determinati ceppi microbici in diverse specie ospiti. Kollath, nel 1953 (Kollath, 1953), inizialmente utilizzò il termine "probiotico" per descrivere in generale le sostanze inorganiche e organiche considerate in grado di ripristinare la salute dei pazienti malnutriti. Lilly e Stillwell, nel 1965 (Lilly & Stillwell, 1965), hanno ulteriormente ampliato il termine "probiotico" per indicare "sostanze sconosciute" prodotte da alcuni protozoi ciliati, che migliorano la sopravvivenza e lo sviluppo di altri protozoi. Successivamente, Parker, nel 1974 (Parker, 1974), ha ulteriormente incluso nella sua definizione di probiotici sia gli organismi viventi sia le sostanze non viventi: "organismi e sostanze che contribuiscono all'equilibrio microbico intestinale". La crescente applicazione dei probiotici nell'integrazione dei mangimi nella produzione zootecnica ha portato a riconsiderare i probiotici come "integratore alimentare microbico vivo che influisce beneficamente sull'animale ospite migliorando il suo equilibrio microbico intestinale" (Fuller, 1989). Altri ricercatori hanno definito i probiotici come "colture vive di microrganismi che vengono deliberatamente introdotte nel ruminante per migliorare la salute o la nutrizione degli animali" (Kmet, et al., 1993). Con la produzione e la commercializzazione massiccia di probiotici per l'allevamento, la Food and

Drug Administration degli Stati Uniti richiede ai produttori di mangimi di sostituire il termine "probiotico" con l'espressione "microbico alimentato direttamente" (DFM: *direct-fed microbial*) (Oyarzabal & Conner, 1996). Il DFM è stato definito come "microrganismi vivi, presenti in natura, che sono stati utilizzati per migliorare la funzione digestiva del bestiame" (Krehbiel, et al., 2003; Yang, et al., 2009).

Le prospettive più ampie della definizione e del concetto di DFM includevano un ampio spettro di microrganismi, quali batteri, lieviti, funghi, frammenti di cellule microbiche e secrezioni microbiche (Chaucheyras-Durand & Durand, 2010; Elghandour, et al., 2014). I ceppi microbici utilizzati come DFM "prosperano" nel ruminale e modulano la microflora e le attività fermentative a beneficio dell'ospite (Seo, et al., 2010). Tuttavia, il crescente interesse suscitato dalla scienza probiotica e la progressiva comprensione dell'azione probiotica hanno portato a modificare la definizione di probiotico. La definizione attuale e ampiamente accettata del termine probiotico è stata proposta da un gruppo di lavoro congiunto dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO: *Food and Agriculture Organization*) e dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO: *World Health Organization*), che ha definito i probiotici come "ceppi microbici vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite" (Food and Agriculture Organization, 2002).

Nell'allevamento dei ruminanti, i probiotici specifici utilizzati come DFM includono diverse specie batteriche e fungine come *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Megasphaera elsdenii* e *Prevotella bryantii*, oltre a ceppi di *Aspergillus* e *Saccharomyces*, rispettivamente (Seo, et al., 2010; Ezema, 2013). Tuttavia, i ceppi di batteri lattici (LAB: *lactic acid bacteria*), tra cui *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, hanno guadagnato la predominanza e sono per lo più le specie ampiamente utilizzate come ceppi probiotici nell'integrazione dei mangimi per ruminanti (Vibhute, et al., 2011). È degno di nota aggiungere che molti dei ceppi microbici utilizzati come probiotici per ruminanti esistono naturalmente nel tratto gastrointestinale di animali sani, ma sono spesso perturbati da fattori di stress sia intrinseci che estrinseci alla specie ospite (Vibhute, et al., 2011).

I prodotti probiotici per ruminanti sono solitamente costituiti da mono e/o multi-ceppi o da più specie. Inoltre, microrganismi alloctoni, come i lieviti, normalmente assenti nel tratto gastrointestinale (GIT) dei ruminanti, vengono utilizzati come probiotici, per lo più in combinazione con specie microbiche come *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, considerati abitanti indigeni dell'intestino dei ruminanti (Sharma Bajagai, et al., 2016). I probiotici composti principalmente da batteri sono efficaci nei ruminanti giovani, mentre gli studi hanno dimostrato che i probiotici fungini esercitano i loro effetti benefici soprattutto nei ruminanti adulti (Kruis, et al., 2004).

Anche se non è stato ben chiarito, l'azione dei probiotici all'interno del rumine dipende principalmente dai LAB e dai batteri che utilizzano l'acido lattico (LUB: *lactic acid utilizing bacteria*) (Elghandour, et al., 2015). I LAB producono acidi organici che mitigano beneficamente l'acidosi all'interno del rumine, soprattutto nelle vacche da latte, stimolando la crescita di microbi benefici e dei LUB (Nocek, et al., 2002). I LUB agiscono diminuendo la concentrazione di acido lattico all'interno del rumine, mantenendo quindi un pH costante nel rumine. Quando i ruminanti si nutrono di diete fermentabili, il lattato viene prodotto in grandi quantità nel rumine (Kung, et al., 2003). Alcuni batteri, come *Megasphaera elsdenii*, utilizzano il lattato accumulato, impedendo così l'acidosi, che può essere dannosa per l'animale (Robinson, 2002). I ruminanti ospitano propionibatteri in gran numero all'interno del loro rumine e questi batteri agiscono efficacemente sulle diete dei ruminanti composte principalmente da foraggio e concentrato (Kung, et al., 2003). I ceppi di propionibatteri migliorano la fermentazione con un conseguente aumento della produzione di propionato nel rumine (Stein, et al., 2006). Durante la fermentazione ruminale all'inizio della lattazione, i propionibatteri convertono il lattato in propionato (Kung, et al., 2003), il che porta ad un aumento della produzione di glucosio epatico, rendendo disponibili i substrati per la sintesi del lattosio, riducendo in questo modo la chetosi e migliorando allo stesso tempo l'efficienza energetica (Stein, et al., 2006; Weiss, et al., 2008). Il propionato è responsabile del rilascio di circa il 61-67% del glucosio nelle

vacche in lattazione e nei ruminanti in crescita (Huntington, 2000). È stato riferito che la diminuzione delle emissioni di gas serra, in particolare di metano, da parte dei ruminanti è il risultato di un aumento del propionato ruminale. Sebbene non sia stato ben compreso, Ghorbani (Ghorbani, et al., 2002) ha riportato che l'inclusione di ceppi di *Propionibacteria* come DFM nelle diete dei ruminanti ha diminuito il numero di batteri amilolitici, aumentando al contempo la popolazione di *Entodinium* (protozoi) nel rumine dei manzi da carne.

L'efficienza e la funzionalità complessiva dei ceppi batterici utilizzati come probiotici per i ruminanti, sia come ceppi singoli e/o multipli che, come specie, può essere determinata principalmente dal loro effetto microbiota ruminale (Chiquette, et al., 2012; Beauchemin, et al., 2003). Inoltre, i principali fattori ambientali, tra cui la quantità di acido lattico e di acidi grassi volatili (VFA), nonché il pH, determinano anche la sopravvivenza dei microbi nel rumine (Le, et al., 2017; Nagaraja & Titgemeyer, 2007).

Nel corso degli anni, i ricercatori hanno ampiamente esplorato i benefici esercitati dai batteri probiotici e i loro meccanismi d'azione nel GIT post-ruminale (Seo, et al., 2010).

Esclusione competitiva dei patogeni dall'adesione alla mucosa intestinale.

Uno dei meccanismi considerati più importanti e benefici, esibito dai batteri probiotici, è l'esclusione competitiva dei patogeni (Rolfe, 2000). Questo meccanismo si basa sulla capacità dei batteri di interagire tra loro e di

competere per i nutrienti e i siti di adesione sulla mucosa intestinale. I batteri benefici ottengono un vantaggio competitivo modificando e rendendo il loro microambiente inadatto ai loro concorrenti, per lo più patogeni (La Ragione , et al., 2004). Frizzo (Frizzo, et al., 2010) ha dimostrato come i LAB utilizzati come probiotici aderiscano all'intestino e proteggano gli animali dalla *Salmonella*. Inoltre, l'adesione di *Escherichia coli enteropatogena* e *Klebsiella pneumoniae enterotossica* alla mucosa intestinale è stata significativamente ridotta grazie all'inclusione di *Lactobacillus rhamnosus* (Lcr35) come DFM (Forestier, et al., 2001).

Secrezione di sostanze antimicrobiche.

Una volta che i ceppi probiotici si sono stabiliti nell'intestino, possono sintetizzare sostanze con proprietà batteriostatiche o battericide, come batteriocine, perossido di idrogeno e acidi grassi a catena corta, oltre a diversi acidi organici. Queste sostanze secrete dai probiotici, così come l'abbassamento del pH intestinale, sono dannose e nocive per i patogeni intestinali (Fuller, 2001). Le batteriocine antagonizzano i patogeni all'interno del tratto gastrointestinale interferendo con la replicazione del DNA dei patogeni bersaglio (Dicks & Botes, 2010). La maggior parte delle specie batteriche, tra cui *Bacillus spp*, LAB e bifidobatteri utilizzati come probiotici (Cheikhyoussef, et al., 2008; Flynn, et al., 2002), sono in grado di produrre diversi tipi di batteriocine termostabili (Cotter, et al., 2005) con un'ampia gamma di attività antimicrobiche contro potenziali patogeni animali, tra cui *Bacillus cereus*,

Staphylococcus, *Enterococcus*, *Listeria* e diverse specie di *Salmonella* (Rea, et al., 2007).

Immunomodulazione e immunostimolazione.

La componente del sistema immunitario dell'intestino, che protegge l'ospite da diversi tipi di antigeni presenti nel lume del GIT, può essere influenzata dai probiotici. L'azione dei probiotici all'interno del tratto intestinale modula sia l'immunità innata che quella adattativa dell'animale. La capacità dei probiotici di aderire alla mucosa intestinale crea una barriera naturale contro potenziali agenti patogeni e, in alcuni casi, potenzia l'immunità dell'ospite. I probiotici stimolano il sistema immunitario aumentando la sintesi e la secrezione di immunoglobuline, nonché l'attività dei macrofagi e dei linfociti e stimolando la produzione di γ -interferone (Yang, et al., 2009). Il *Lactobacillus casei* Shirota e il *L. rhamnosus* Lr23 sono ceppi probiotici noti che stimolano i macrofagi a secernere il fattore di necrosi tumorale- α quando vengono utilizzati nei ruminanti (Matsuguchi, et al., 2003). Sebbene l'effetto pro-infiammatorio esercitato dai probiotici possa avere un impatto positivo sull'animale, attenuando i potenziali agenti patogeni dal GIT, potrebbe anche avere un impatto negativo, creando un ambiente pro-infiammatorio che potrebbe danneggiare l'intero animale.

Resistenza alla colonizzazione.

I microrganismi che colonizzano il GIT dei ruminanti neonatali provengono generalmente dall'adulto. Questi giovani ruminanti diventano protetti dai

patogeni intestinali grazie a questi microrganismi colonizzatori. Tuttavia, la produzione intensiva di ruminanti ha ridotto questa naturale colonizzazione microbica dell'intestino, rendendo gli animali più suscettibili alle sfide dei patogeni nel GIT. Nei neonati, i probiotici potrebbero imitare la colonizzazione naturale o colonizzare gli animali adulti, proteggendo così la mucosa intestinale dalla colonizzazione di organismi patogeni. La presenza di proteine idrofobiche dello strato superficiale nella maggior parte dei ceppi probiotici, in particolare *Bifidobacterium* e *Lactobacillus spp*, consente loro di aderire alla superficie degli enterociti dell'ospite (Johnson-Henry, et al., 2007). Questi ceppi probiotici aderenti si legano a determinati siti recettoriali sull'epitelio intestinale, impedendo ai patogeni di accedere e colonizzare le superfici delle cellule epiteliali intestinali (Johnson-Henry, et al., 2007).

Alterazione dell'espressione dei geni di patogenicità e virulenza dei patogeni.

La comunicazione da cellula a cellula nei batteri attraverso gli autoinduttori (segnali chimici secretori) influisce sulla fisiologia batterica (Waters & Bassler, 2005). Il quorum sensing, un processo di comunicazione batterica, è utilizzato anche per la comunicazione tra i batteri e il loro ospite (Hughes & Sperandio, 2008). Attraverso il quorum sensing, i probiotici possono influenzare la virulenza e la patogenicità dei patogeni. È stato riportato che la capacità di *E. coli enteroemorragica*, sierotipo O157:H7, di secernere l'autoinduttore extracellulare-2 è stata inibita in modo sostanziale dai prodotti di fermentazione di *Lactobacillus acidophilus* La-5, che hanno soppresso l'espressione del gene

di virulenza del locus dell'effrazione enterocitaria (LEE: *locus of enterocyte effacement*) in *E. coli* sierotipo O157:H7. Di conseguenza, il quorum sensing può essere interrotto in modo da impedire la colonizzazione e la patogenesi di *E. coli* sierotipo O157:H7 nel tratto gastrointestinale (Medellin-Peña, et al., 2007). Utilizzando ratti da esperimento, il *Lactobacillus salivarius* ha diminuito l'espressione del gene di virulenza di *Listeria monocytogenes*, la listeriolisina O, nei villi intestinali e nelle chiazze di Peyer. Inoltre, sia il *Lactococcus lactis* che il *L. salivarius* hanno ridotto la conta di *Listeria* nella milza (Lukic , et al., 2017). Allo stesso modo, Dong (Dong, et al., 2020) ha riportato la repressione dell'espressione di tre geni di virulenza di *L. monocytogenes*, tra cui InlA, InlB e prfA, dopo il trattamento con *Lactobacillus plantarum* CICC6257.

La somministrazione di probiotici ai ruminanti ha dato risultati significativi, soprattutto per quanto riguarda il miglioramento dello stato di salute, della produttività e delle prestazioni generali. I ricercatori si sono concentrati maggiormente sull'applicazione dei probiotici nei ruminanti in età pre-ruminale e, in una certa misura, nei ruminanti adulti. Nel corso degli anni, gli studi si sono concentrati soprattutto su aspetti della salute dei ruminanti, tra cui il controllo del trasporto di patogeni, l'attenuazione delle malattie infettive (soprattutto entero-malattie e mastiti), la riduzione della gravità della diarrea e parametri economici come la riduzione dell'assunzione di mangime e del rapporto di conversione dei mangimi.

4.3 Trapianto di microbiota fecale (FMT: *Fecal Microbiome Transplantation*)

Il trapianto di microbioma fecale (FMT) è il trapianto di una sospensione fecale da un individuo sano nel tratto gastrointestinale di un altro individuo per curare una malattia specifica (Brandt & Aroniadis, 2013). Recentemente è stato riscontrato un interesse nel ristabilire un microbioma "buono" attraverso l'esclusione competitiva utilizzando la FMT. Un esempio è il caso delle infezioni da *Clostridium difficile* nell'uomo. Le crescite eccessive di *C. difficile* hanno raggiunto proporzioni epidemiche associate principalmente, ma non esclusivamente, all'ospedalizzazione e a specifici trattamenti antimicrobici (Bakken, et al., 2011). Il trattamento del *C. difficile* umano con antibiotici spesso fallisce perché gli antibiotici uccidono i batteri vegetativi ma non le spore. Con l'interruzione del trattamento antibiotico, le spore germinano e si sviluppa una malattia ricorrente da *C. difficile*. Per contrastare questo fenomeno, è stata raggiunta la capacità di ristabilire un microbioma "buono" per escludere competitivamente il *C. difficile* utilizzando la FMT. Questa procedura prevede che le feci di un donatore sano vengano inoculate nel paziente per via orale o tramite clistere (Borody & Khoruts, 2011). L'uso della FMT orale per il trattamento di intossicazioni alimentari o diarrea grave è stato descritto per la prima volta da Ge Hong nella Cina del IV secolo (Brandt & Aroniadis, 2013). In studi recenti, l'uso della FMT per il trattamento delle

malattie enteriche ha indotto cambiamenti duraturi nel microbioma del paziente, con un tasso di successo >90% osservabile entro pochi giorni e senza effetti collaterali negativi. Brandt e Aroniadis (Brandt & Aroniadis, 2013) hanno anche descritto gli effetti benefici della FMT in malattie non enteriche come il morbo di Parkinson, l'insulino-resistenza, la sclerosi multipla e l'autismo regressivo infantile.

Poiché l'uso di antibiotici è una preoccupazione crescente a livello globale, è necessario esplorare lo sviluppo di tecniche non antibiotiche per il trattamento delle malattie animali. Il potenziale dell'applicazione della FMT per controllare le malattie enteriche pre e post-svezzamento nei suini è intrigante. Gli studi di Hu (Hu, et al., 2018) e Xiao (Xiao, et al., 2017) mostrano risultati promettenti per l'uso della FMT nei suini. La somministrazione di 1,5 ml di FMT al giorno a suini da uno a 11 giorni di età ha aumentato il guadagno medio giornaliero, ridotto l'incidenza della diarrea e migliorato la barriera intestinale e la funzione del sistema immunitario (Hu, et al., 2018). Inoltre, sono stati evidenziati risultati positivi nell'esecuzione della FMT da una razza resistente alla colite a una razza a rischio, con conseguente trasferimento della resistenza migliorata (Xiao, et al., 2017). Tuttavia, contrariamente ai risultati di Hu (Hu, et al., 2018) e Xiao (Xiao, et al., 2017), altri hanno dimostrato un effetto negativo nei suinetti che ricevono direttamente la FMT quattro volte durante la lattazione o nei suinetti allevati da scrofe che ricevono la FMT. I suini sono più leggeri a 70 e 155 giorni e presentano una minore capacità di assorbimento e salute

intestinale, come dimostrato dalla morfologia intestinale e dall'espressione genica duodenale (McCormack, et al., 2018). Sebbene i risultati di questi studi siano piuttosto contrastanti, sono promettenti per l'uso della FMT nei suini. È evidente che anche il donatore scelto per la FMT avrebbe un impatto sui risultati ottenuti. Pertanto, è possibile che i risultati negativi osservati nello studio di McCormack (McCormack, et al., 2018) siano dovuti agli animali donatori scelti.

5. Eventi avversi del microbioma (MAEs: *microbiome adverse events*)

Gli eventi avversi del microbioma si riferiscono a cambiamenti negativi o squilibri nel microbiota intestinale o in altri ecosistemi microbici presenti nel corpo umano o in altri organismi. Questi eventi possono essere indotti da diversi fattori, cui l'utilizzo di antibiotici, cambiamenti nella dieta, infezioni, malattie, stress e altri disturbi. Gli eventi avversi del microbioma possono avere effetti significativi sulla salute e possono essere associati ad una serie di condizioni patologiche.

5.1 Disbiosi

Come per altri organi, il corretto funzionamento del microbiota intestinale si basa su una composizione cellulare stabile.

Grandi spostamenti nel rapporto tra questi phyla o l'espansione di nuovi gruppi batterici portano ad uno squilibrio che favorisce le malattie, spesso definito disbiosi. La riduzione della diversità microbica e la crescita dei *Proteobatteri* sono caratteristiche fondamentali della disbiosi (Walker, et al., 2011; Lupp, et al., 2007). Un numero crescente di malattie è associato alla disbiosi intestinale, che in alcuni casi contribuisce allo sviluppo o alla gravità della malattia. La disbiosi è un segno distintivo delle malattie infiammatorie intestinali (IBD: *inflammatory bowel diseases*), come la colite ulcerosa e il morbo di Crohn

(Wlodarska, et al., 2015), ma può anche essere riconducibile a disturbi metabolici (Gérard, 2016), malattie autoimmuni (Knip & Siljander, 2016) e disturbi di tipo neurologico (Tremlett, et al., 2017).

A differenza dei microrganismi infettivi, la patogenicità di specifici batteri intestinali non può essere stabilita attraverso l'applicazione dei postulati di Koch, dato che una frazione importante del microbiota non può essere isolata in coltura pura. Pertanto, l'implicazione di specifici microrganismi patogeni in una malattia si basa in gran parte sull'identificazione di popolazioni batteriche alterate, basata sul sequenziamento ad alta velocità del DNA dei geni 16S rRNA conservati (Cox, et al., 2013). La riproduzione di una malattia attraverso il trapianto del microbiota intestinale da un animale malato a uno sano è spesso utilizzata in una seconda fase per confermare il contributo della disbiosi intestinale alla malattia. Il trapianto di microbiota ha dimostrato il contributo dei batteri intestinali, tra gli altri, all'obesità (Turnbaugh, et al., 2006) e all'aterosclerosi (Gregory, et al., 2015). Tuttavia, nonostante la forte evidenza ottenuta dal sequenziamento del 16S rRNA e dal trapianto di microbiota, la colpevolezza di specifici gruppi batterici arricchiti in uno stato patologico rimane spesso circostanziale. Invece di essere veri e propri colpevoli, i batteri sospetti possono essere solo spettatori di agenti patogeni che rimangono al di sotto della soglia delle attuali tecniche di rilevamento. L'esteso mutualismo che prevale nel microbiota intestinale rafforza le connessioni tra i colpevoli e gli astanti. I microrganismi che producono un'ampia gamma di enzimi digestivi

spesso alimentano altri batteri con capacità di foraggiamento limitate (Rakoff-Nahoum, et al., 2016). La maggiore liberazione di nutrienti può favorire la crescita parallela di batteri innocui e dannosi. Inoltre, il confine tra bene e male è spesso labile, dato che alcuni batteri simbiotici possono diventare patogeni quando sono presenti in numero maggiore nell'intestino. Tali batteri, definiti patobionti (Chow, et al., 2011), possono essere difficili da riconoscere quando la loro espansione avviene contemporaneamente ad altri cambiamenti nella composizione microbica intestinale. Fondamentale è ricordare come, la scoperta dei meccanismi alla base degli spostamenti dei gruppi microbici, risulti essenziale per comprendere i processi che portano alla disbiosi. Di conseguenza, l'identificazione dei fattori che causano forti cambiamenti nel microbiota intestinale è fondamentale per elaborare strategie volte a prevenire la disbiosi intestinale.

Diversi fattori esogeni ed endogeni influenzano la composizione microbica dell'intestino. Gli effetti che ne derivano vanno da quelli transitori a quelli di lunga durata e possono variare da innocui a dannosi. Spesso, un singolo fattore non è sufficiente a indurre disbiosi, poiché il microbiota intestinale ha una resilienza intrinseca, una capacità di adattarsi alle variazioni della disponibilità di nutrienti e alle mutevoli condizioni ambientali. L'azione combinata di più fattori, invece, può portare i gruppi microbici a un punto di rottura, che alla fine si traduce in vasti cambiamenti di significato patologico. I principali fattori che influenzano la composizione del microbiota intestinale sono la dieta, vari

farmaci, la mucosa intestinale, il sistema immunitario e il microbiota stesso. Modesti cambiamenti nella composizione microbica possono quindi fornire una finestra di opportunità per altri fattori aggravanti che amplificano i cambiamenti in specifici gruppi batterici fino al punto di squilibrio. Lo stress ossidativo, i batteriofagi e le batteriocine sono fattori tipici che esacerbano gli spostamenti del microbiota fino a condurre alla disbiosi (Figura 12).

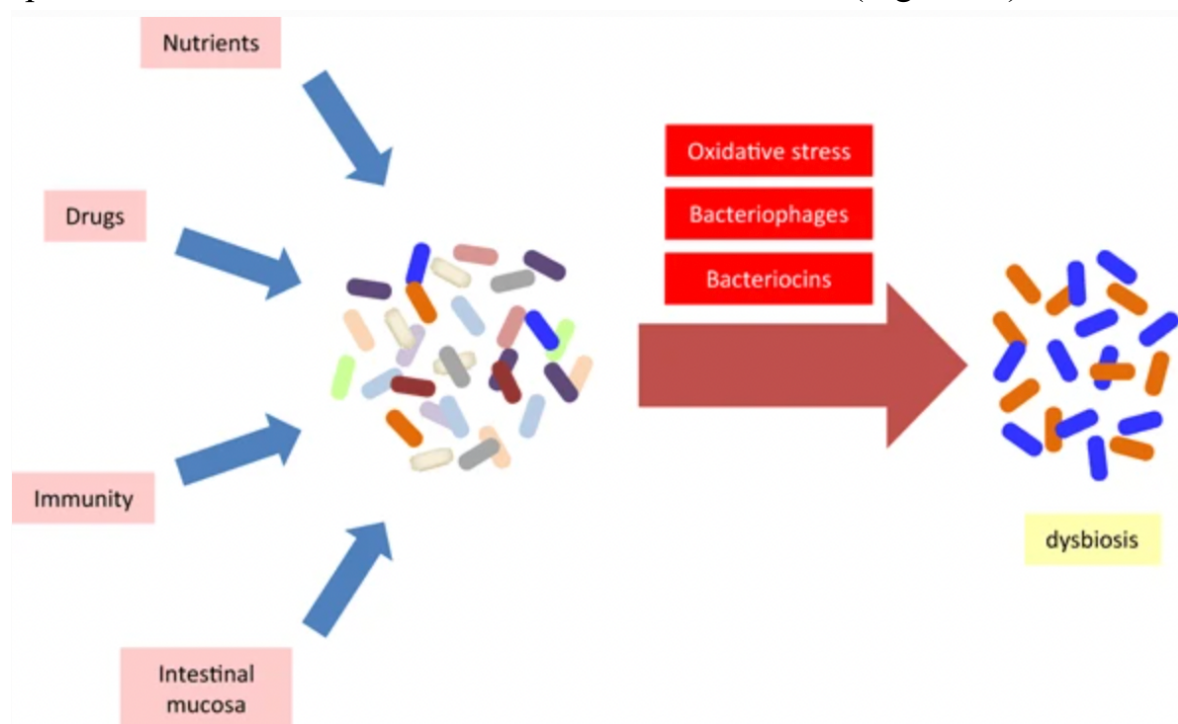


Figura 12 Fattori che contribuiscono alla disbiosi intestinale. Il microbiota intestinale è soggetto a variazioni naturali indotte dal cambiamento dell'apporto di nutrienti, farmaci, sistema immunitario e mucosa intestinale. L'azione di fattori di stress come lo stress ossidativo, l'induzione di batteriofagi e la secrezione di batteriocine amplificano i cambiamenti nella composizione microbica, portando a una diminuzione della diversità e alla crescita di specifici taxa batterici. (Weiss & Hennet, 2017)

La soglia necessaria per innescare la disbiosi dipende in larga misura dai gruppi batterici interessati. Ampii spostamenti nei principali phyla *Bacteroidetes* e *Firmicutes* possono rimanere senza conseguenze patologiche, mentre l'aumento di quantità di gruppi marginali può creare scompiglio. Ad esempio, le *Enterobacteriaceae* rappresentano normalmente una frazione minore del

microbiota intestinale (Tenaillon, et al., 2010). I batteri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* possono espandersi rapidamente in seguito a variazioni delle condizioni ossidative dell'intestino, come quelle che si verificano durante le infiammazioni (Lupp, et al., 2007; Stecher, et al., 2007). A causa della pirogenicità del lipopolisaccaride (LPS) delle *Enterobacteriaceae*, la crescita di questa famiglia batterica di solito intensifica la risposta infiammatoria in corso.

Oltre ai fattori principali introdotti qui sopra, anche altri parametri come la temperatura, la pressione atmosferica e la pressione parziale dell'ossigeno influenzano la composizione microbica dell'intestino.

5.2 Microbiota e stress

Il microbiota intestinale svolge un ruolo fondamentale nel processo di risposta allo stress (Molina-Torres, et al., 2019). “Nutrire” un microbioma intestinale in modo ottimale può innescare effetti positivi e benefici in campo zootecnico; diventa uno strumento estremamente efficace nella gestione di situazioni stressogene aumentando, parallelamente, la produttività degli animali da allevamento (Wiley, et al., 2017).

È noto da tempo che lo stress e l'attività associata dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA: *hypothalamus-pituitary-adrenal axis*) possono influenzare la composizione microbica intestinale (Tannock & Savage, 1974; Sudo, et al., 2004).

L'asse HPA modula la secrezione di cortisolo e corticosterone (Figura 13), mentre il cortisolo o il corticosterone regolano sistematicamente la secrezione di citochine immunitarie circolanti nell'intestino, che possono influenzare ulteriormente la funzione della barriera intestinale e alterare la composizione

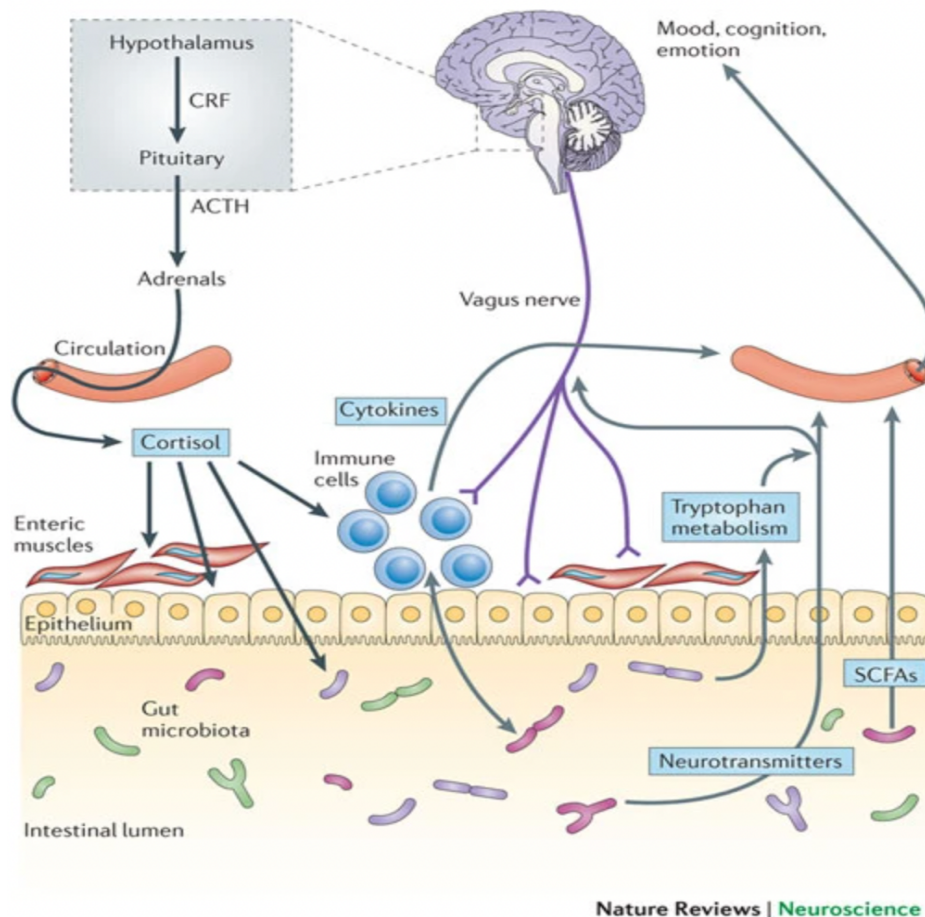


Figura 13 Potenziali vie dirette e indirette attraverso le quali il microbiota intestinale può modulare l'asse intestino-cervello. Queste vie comprendono vie endocrine (cortisolo), immunitarie (citochine) e neurali (sistema nervoso vagale ed enterico). Il cervello recluta questi stessi meccanismi per influenzare la composizione del microbiota intestinale, ad esempio in condizioni di stress. L'asse ipotalamo-ipofisi-surrene regola la secrezione di cortisolo, che può influenzare le cellule immunitarie (compresa la secrezione di citochine) sia localmente nell'intestino che a livello sistemico. Il cortisolo può anche alterare la permeabilità intestinale e la funzione di barriera e modificare la composizione del microbiota intestinale. Al contrario, il microbiota intestinale e gli agenti probiotici possono alterare i livelli di citochine circolanti e ciò può avere un effetto marcato sulla funzione cerebrale. Sia il nervo vago che la modulazione dei livelli sistemici di triptofano sono fortemente implicati nel trasmettere l'influenza del microbiota intestinale al cervello. Inoltre, gli acidi grassi a catena corta (SCFA) sono metaboliti batterici neuroattivi delle fibre alimentari che possono modulare il cervello e il comportamento (Cryan & Dinan, 2012).

del microbiota intestinale attraverso l'asse microbiota-intestino-cervello (Cryan & Dinan, 2012; Lima-Ojeda, et al., 2020).

I progressi nella comprensione del microbiota intestinale e dell'asse HPA sono stati condotti principalmente su animali da laboratorio (Vodička, et al., 2018; Huo, et al., 2017). Una nota ricerca condotta sui topi ha suggerito come il microbiota intestinale abbia alterato la funzione dell'asse HPA sotto stress, accompagnata da un incremento dei livelli plasmatici di ormone adrenocorticotropo e corticosterone; questa situazione è stata invertita dalla ricostituzione operata ricorrendo a *Bifidobacterium infantis* (Sudo, et al., 2004). È stato dimostrato che la separazione materna, in quanto stress precoce, coinvolge l'attività dell'asse HPA in molte specie (O'Mahony, et al., 2011) ed è inoltre noto che provoca una sostanziale diminuzione dei lattobacilli fecali 3 giorni dopo l'inizio della procedura di separazione nelle scimmie *rhesus* (Bailey & Coe, 1999). È stata riscontrata un'alterazione della composizione del microbiota fecale nei ratti adulti sottoposti a separazione materna per 3 ore al giorno fin dai giorni postnatali, rispetto agli individui non separati (O'Mahony, et al., 2009).

Uno studio che ha utilizzato metodi di sequenziamento profondo ha dimostrato che la composizione del microbiota di topi esposti a stress cronico da contenzione (un fattore di stress fisico) differiva da quella di topi di controllo non stressati (Bailey, et al., 2011). In particolare, l'esposizione allo stress psicosociale cronico ha diminuito e aumentato l'abbondanza relativa di

Bacteroides spp. e *Clostridium spp.* rispettivamente nell'intestino cieco dei topi (Bailey, et al., 2011). Analogamente, si è riscontrato come l'esposizione allo stress fisiologico modifichi l'abbondanza, a livello del microbiota intestinale dei gorilla di pianura occidentali, della famiglia *Anaerolineaceae*, del genere *Clostridium* e del genere *Oscillibacter* (Vlčková, et al., 2018). Il microbiota intestinale è anche correlato alla plasticità cerebrale dell'ospite in risposta allo stress nei topi (Neufeld, et al., 2011; Sudo, et al., 2004). Nella bovina da latte, l'esposizione allo stress da calore ha influenzato l'attività HPA, che è associata a cambiamenti del cortisolo plasmatico, della concentrazione di ossitocina e della circolazione di citochine, nonché a una diminuzione della diversità alfa nel microbiota intestinale (Chen, et al., 2018). Analogamente, nei polli, lo stress termico ha portato a un'alternanza della composizione del microbiota intestinale e della diversità alfa (Burkholder, et al., 2008). Uno studio ha suggerito che l'allevamento in gabbia, che induce stress, ha diminuito la diversità alfa del microbiota intestinale e ha “downregolato” le vie legate al sistema immunitario, mentre ha “upregolato” le vie legate ai patogeni (Chen, et al., 2019). In particolare, i posatoi e le lettiere arricchiscono gli ambienti, migliorando le funzioni microbiche intestinali attraverso l'asse HPA (Yan, et al., 2020). Inoltre, il microbiota intestinale mediato da antibiotici o prebiotici controlla l'ipertensione indotta dallo stress modificando l'asse HPA nei ratti (Wu, et al., 2020). Lo stress può anche portare a un'alterazione dell'omeostasi intestinale e a un indebolimento del sistema immunitario, che aumenta il rischio

di colonizzazione da parte di batteri patogeni nella produzione di carne (O'Callaghan, et al., 2016).

L'accumulo di prove indica che il microbiota intestinale è un canale di comunicazione trasversale con il cervello attraverso il sistema neurale, immunitario ed endocrino finalizzato a regolare la funzione cerebrale e il comportamento. Di conseguenza, nonostante le prove siano assai limitate, soprattutto per gli animali da allevamento, il microbiota intestinale è anche un canale trasversale che collega l'HPA (stress), la risposta immunitaria e i comportamenti (Chen, et al., 2021).

5.3 Resistenza agli antibiotici: Resistoma

Sin dagli anni '50, gli antibiotici sono stati utilizzati nella produzione di bestiame per prevenire e curare le malattie, migliorare l'efficienza di conversione dei mangimi e promuovere la crescita (Cogliani, et al., 2011). L'uso complessivo di antibiotici per bovini, suini e polli aumenterà da circa 63.000 tonnellate nel 2010 a circa 105.000 tonnellate entro il 2030, con un incremento fino al 67% (Van Boeckel, et al., 2015). Nell'Unione Europea, nel 2004 sono state utilizzate 8.927 tonnellate di antimicrobici negli animali da produzione alimentare (European Centre for Disease Prevention and Control, et al., 2015). Negli Stati Uniti, le dosi sub-terapeutiche di antimicrobici utilizzate negli animali da produzione alimentare hanno raggiunto circa 14.600 tonnellate nel 2012 (Food and Drug Administration, 2014). In Cina, il più

grande produttore e consumatore di antimicrobici al mondo, nel 2018 sono state utilizzate 29.774,09 tonnellate di antimicrobici negli allevamenti, di cui più della metà per promuovere la crescita degli animali (Hu & Cheng, 2014; Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, 2019). Nonostante i loro benefici, è sempre più evidente che l'utilizzo su larga scala di antibiotici negli animali zootecnici finalizzati alla produzione alimentare, selettioni cloni di antibiotico-resistenza (AMR: *antimicrobial resistance*) nel bestiame (Heuer, et al., 2011; Hao, et al., 2014). La selezione per i batteri AMR non solo aumenta la morbilità e la mortalità negli animali da produzione alimentare, ma aumenta anche il rischio di trasmissione dei batteri AMR all'uomo (Cosgrove, et al., 2003; Hawkey, 2008). Questo perché i geni di resistenza antimicrobica (ARG: *antimicrobial resistance genes*) dei batteri presenti nel tratto digestivo degli animali produttori di alimenti possono essere trasferiti ai batteri che possono entrare in contatto con l'uomo direttamente o dall'ambiente. A questo proposito, nel 2017 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha invitato i Paesi membri a ridurre l'uso di farmaci antimicrobici veterinari (World Health Organization, 2017). Pertanto, la resistenza antimicrobica è una delle sfide più urgenti che il mondo deve affrontare attualmente e rappresenta una minaccia per l'assistenza sanitaria e la sicurezza alimentare.

Sono stati compiuti sforzi per limitare la potenziale diffusione della resistenza antimicrobica dagli animali da produzione alimentare agli esseri umani e all'ambiente. Ad esempio, molti Paesi europei hanno vietato l'uso di antibiotici

negli animali da allevamento per scopi "non terapeutici" (Van Boeckel, et al., 2017). Recentemente, il governo cinese ha varato un regolamento per il ritiro degli additivi per mangimi medicati, in conformità con il Piano d'azione nazionale per la lotta alla resistenza antimicrobica dalle risorse animali (2017-2020) (China Ministry of Agriculture and Rural Affairs, 2017). Oltre a queste politiche, sono state sviluppate diverse strategie (ad esempio, l'uso di batteriofagi, peptidi antimicrobici o vaccini) che potrebbero essere promettenti per sostituire l'uso di antibiotici negli animali da produzione alimentare, che sono state ampiamente recensite (Marquardt & Li, 2018; Nowakiewicz, et al., 2020). Sebbene queste strategie siano cruciali per limitare la prevalenza della resistenza antimicrobica negli animali da produzione alimentare, le ARG possono ancora essere rilevate nei sistemi di produzione animale anche se non vengono somministrati antimicrobici (Xue, et al., 2021).

L'impiego estensivo di antimicrobici nella produzione animale ha un costo: promuove la resistenza agli antimicrobici che minaccia sia la salute degli animali che quella umana. Una delle prime osservazioni sulla resistenza negli animali è stata la segnalazione della resistenza alla streptomina di batteri coliformi provenienti da tacchini alimentati con streptomina nel 1951 (Starr & Reynolds, 1951). L'associazione della resistenza alla tetraciclina nei polli alimentati con questo antimicrobico per promuovere la crescita è stata segnalata alla fine degli anni '50 (Elliott & Barnes, 1959). La resistenza agli antibiotici negli animali da reddito ha un grande impatto sulla salute degli animali e può

essere associata a infezioni resistenti nell'uomo. Negli anni '80 sono emersi in tutto il mondo diversi patogeni resistenti ai farmaci. Negli Stati Uniti, più di due milioni di infezioni e 23.000 decessi sono causati ogni anno da patogeni resistenti agli antimicrobici (Hampton, 2013). In Europa, 25.000 persone muoiono ogni anno a causa di infezioni batteriche multiresistenti, con un costo di 1,5 miliardi di euro (Davies, 2013). La resistenza agli agenti antimicrobici è una significativa minaccia globale per la salute pubblica (World Health Organization (WHO), 2014).

Diffusione della resistenza antimicrobica

Gli antimicrobici utilizzati negli allevamenti sono i principali responsabili della diffusione degli ARG, in particolare per gli antimicrobici somministrati a livelli sub-terapeutici (Xiong, et al., 2018; Kanwar, et al., 2014). Gli antibiotici presenti nei mangimi selezionano gli ARG corrispondenti e aumentano la comparsa di ARG non correlati alla resistenza agli antibiotici somministrati (Looft, et al., 2012). Questa "selezione incrociata" di ARG costituisce un parametro importante che contribuisce all'antibiotico-resistenza e alla corrispondente evoluzione dei meccanismi genetici e di trasferimento genico (Oz, et al., 2014). Gli antibiotici, se presenti anche a concentrazioni infinitamente basse, possono mantenere fenotipi resistenti. Anche gli additivi per mangimi contenenti rame, zinco e arsenico esercitano pressioni co-selettive sulle ARG in ambienti di produzione animale. Il rame e lo zinco sono additivi

per mangimi e possiedono proprietà antimicrobiche. La combinazione di antibiotici e metalli in un ambiente inquinato vicino agli animali potrebbe essere sufficiente a selezionare i batteri che ospitano plasmidi multiresistenza (Gullberg, et al., 2014).

I tratti intestinali degli animali da reddito sono importanti serbatoi di ARG. Tuttavia, queste ARG sono presenti negli animali sani indipendentemente dalla precedente esposizione agli antimicrobici (Looft, et al., 2012). Negli animali sono stati identificati geni per la resistenza a tetracicline, sulfonamidi, chinoloni, β -lattamici, aminoglicosidi e vancomicina (Zhu, et al., 2013; Wichann, et al., 2014). In effetti, anche con il divieto globale di utilizzare il cloramfenicolo nei mangimi, sono stati rilevati geni di resistenza al cloramfenicolo negli allevamenti e nei mangimi (He, et al., 2014; Li, et al., 2013).

I batteri resistenti agli antibiotici e le corrispondenti ARG circolano continuamente nelle piante, nel suolo e negli animali. I patogeni resistenti e le ARG possono passare all'uomo per via alimentare e attraverso il suolo, l'acqua, le colture e le proteine animali contaminate (Xiong, et al., 2015). Esistono numerosi esempi della presenza di batteri resistenti agli antibiotici negli ambienti di produzione animale. Tra questi, l'*Enterococco* resistente alla vancomicina (VRE: *vancomycin-resistant Enterococcus*), lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA: *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), i batteri produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL: *extended-*

spectrum β -lactamase), l'*E. coli* multifarmaco e la *Salmonella* (Barton, 2014). È importante notare che tipi di ARG come KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2), NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase-1) e MCR-1 (resistenza alla colistina mediata da plasmidi) negli animali da reddito e negli allevamenti rappresentano una grave minaccia per la salute umana e animale (Liu, et al., 2016; Munoz-Price, et al., 2013; Wang, et al., 2017).

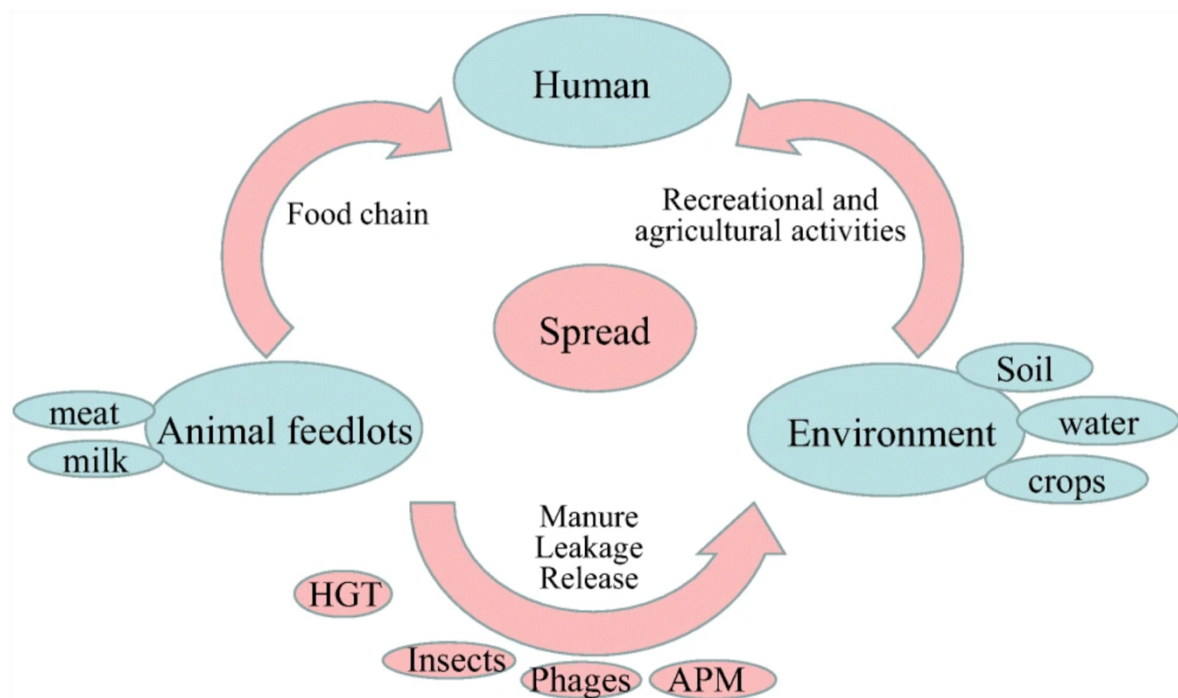


Figura 14 Diffusione dei geni di resistenza agli antimicrobici e dei batteri resistenti agli antimicrobici dagli allevamenti animali all'ambiente e all'uomo. (Xiong, et al., 2018)

Recentemente, gli insetti presenti negli allevamenti hanno diffuso gli ARG dagli allevamenti agli ambienti urbani (Zurek & Ghosh, 2014). I batteriofagi sono molto probabilmente i principali veicoli per il trasferimento di ARG nell'ambiente (Balcazar, 2014). Inoltre, il particolato atmosferico derivante dagli allevamenti di bovini da carne ha facilitato la diffusione di ARG (McEachran, et al., 2015). Rispetto ai veicoli tradizionali, questi veicoli

emergenti possono rappresentare un rischio maggiore per la salute umana, poiché il controllo è problematico (Figura 14).

Sebbene gli animali siano importanti serbatoi di ARG, non ci sono prove sufficienti per concludere che le ARG cliniche provengano dagli animali (Allen, 2014). Le sequenze geniche identiche trovate negli animali e negli esseri umani dimostrano che lo stesso condotto genetico può essere aperto a più di un microrganismo.

Ad esempio, questo processo è stato documentato tra *Bacteroides spp.* dell'uomo e *Prevotella ruminicola* presente nel ruminante e nell'intestino del bestiame (Durso & Cook, 2015). I batteri associati al bestiame possono anche contribuire alla resistenza clinica senza causare direttamente l'infezione umana e la trasmissione zoonotica di batteri resistenti si verifica frequentemente (Smillie, et al., 2011). Le infezioni umane da *E. coli* resistenti alle cefalosporine a spettro espanso hanno avuto origine da animali da produzione, in particolare dal pollame (Lazarus, et al., 2015). La produzione zootecnica ad alta densità è stata associata a infezioni umane da MRSA e la trasmissione zoonotica è stata confermata (Casey, et al., 2013; Casey, et al., 2014; Harrison, et al., 2013). Tuttavia, ci sono molte meno prove che gli animali da produzione siano le fonti originarie della resistenza batterica nell'uomo (Bonten & Mevius, 2015). Il gene CTX-M-5 ESBL del commensale umano e animale *Kluyvera ascorbata* è stato originato nell'uomo (Humeniuk, et al., 2002). Inoltre, sebbene gli MRSA isolati dagli animali siano stati segnalati sporadicamente prima del 2005, diversi ceppi

di MRSA associati agli animali provengono dall'uomo (Smith & Pearson, 2011; Lowder, et al., 2009).

I progressi tecnici raggiunti nelle metodologie analitiche hanno anche aumentato la consapevolezza dei possibili serbatoi animali di ARG. Il sequenziamento dell'intero genoma è attualmente un'alternativa economica ai metodi tradizionali basati sulle colture ed è diventato un potente strumento epidemiologico. Ad esempio, la recente trasmissione clonale di *E. coli* resistente alle cefalosporine dal pollame all'uomo è stata smentita grazie al sequenziamento dell'intero genoma (de Been, et al., 2014). Questi dati hanno messo in discussione le attuali opinioni sul contributo dei serbatoi animali locali come fonti di *S. Typhimurium* (Mather, et al., 2013). Inoltre, gli stessi ceppi batterici resistenti che circolano tra gli animali e gli esseri umani possono essere geneticamente distinti. Pertanto, gli animali da reddito non sono necessariamente all'origine della resistenza agli antimicrobici nell'uomo (Hunter, et al., 2010; Allen, 2014). Gli ambienti naturali possono contenere le fonti originali di ARG, poiché l'antibiotico-resistenza è un fenotipo ubiquitario e antico (D'Costa, et al., 2011; Finley, et al., 2013). Il "resistoma" del suolo è un fenomeno ecologico naturale che precede l'era dell'uso degli antimicrobici nell'uomo e negli animali (Blair, et al., 2015; D'Costa, et al., 2011). L'ambiente del suolo presenta la maggiore diversità apparente di determinanti ARG, soprattutto tra i campioni complessi come il letame animale, i fanghi attivi e le feci umane (Nesme, et al., 2014).

Tuttavia, esistono prove che correlano l'uso di antimicrobici negli animali all'aumento di batteri resistenti agli antimicrobici nell'uomo e sono ben riconosciute e ampiamente confermate dalla letteratura scientifica (Schechner, et al., 2013). Gli antibiotici utilizzati negli animali da reddito favoriscono la comparsa e la persistenza di specifici batteri resistenti. Il livello di utilizzo di uno specifico antibiotico è stato fortemente correlato con il livello di resistenza corrispondente in isolati di *E. coli* commensali in suini, pollame e bovini (Chantziaras, et al., 2014). Anche i dati metagenomici a livello di popolazione hanno dimostrato che l'uso di antimicrobici negli animali contribuisce allo sviluppo di resistenza nei batteri commensali umani (Forslund, et al., 2013). Le cefalosporine di terza generazione utilizzate nel pollame possono contribuire ai decessi umani causati da *E. coli* resistenti (Collignon, et al., 2013). Tuttavia, queste prove non dimostrano che le ARG cliniche provengano dagli animali. È difficile concludere che l'uso di antimicrobici negli animali abbia causato la comparsa, la diffusione e la persistenza di ARG nell'uomo. Ciò è dovuto alla complessità delle vie di trasmissione coinvolte nella diffusione tra bestiame e uomo, tra uomo e uomo e tra bestiame.

Le misure per controllare la resistenza agli antimicrobici sono, fondamentalmente, due:

- riduzione dei volumi di antimicrobici attualmente utilizzati dall'uomo e dal bestiame e limitazione dell'uso di antimicrobici ad ampio spettro e di quelli di particolare importanza critica;

- divieto di scaricare rifiuti antimicrobici nell'ambiente ed eliminazione dei residui di antimicrobici che superano il limite standard negli alimenti e nell'acqua.

Abbiamo bisogno dell'aiuto di tutti i settori che utilizzano gli antimicrobici per controllarne l'uso e limitare la diffusione di batteri resistenti agli antimicrobici a livello locale e internazionale.

6. Conclusione. Prospettive Future per la Ricerca e l'Applicazione dell'Approccio Multi-omico

L'obiettivo finale della ricerca sul microbioma è quello di facilitare la gestione della salute e delle malattie. Le alterazioni del microbioma intestinale sono state associate a un elenco crescente di malattie e la modifica selettiva del microbiota intestinale ha dimostrato di “alleviare” o meglio condizionare lo sviluppo di alcune malattie, tra cui il diabete e la colite. Questi risultati evidenziano l'importanza di introdurre il microbioma nel quadro della medicina di precisione, attraverso la stratificazione dei pazienti guidata dal microbioma o interventi che mirano specificamente a specie/pattern microbici. Tuttavia, è ancora una sfida aperta identificare rapidamente bersagli specifici e perseguibili all'interno dei microbiomi. Fortunatamente, l'aggiunta di metatranscriptomica, metaproteomica e metabolomica alla metagenomica sta migliorando la nostra comprensione funzionale del microbioma. Sebbene siano ancora necessari strumenti bioinformatici più potenti e convenienti, la meta-omica funzionale integrativa sta diventando uno degli approcci più importanti per la dissezione delle vie metaboliche microbiche nei microbiomi. Inoltre, lo sviluppo di farmaci mirati al microbioma è altrettanto impegnativo. Pertanto, sono in corso sforzi per sviluppare nuovi saggi ex vivo mirati a pannelli di singoli batteri, semplici comunità microbiche o interi microbiomi. È probabile che questi test aumentino rapidamente la nostra comprensione di come i

microbiomi interagiscono con farmaci, componenti alimentari e composti naturali. I saggi ex vivo sul microbioma saranno probabilmente utili nella medicina di precisione, consentendo di esaminare i singoli microbiomi rispetto a gruppi di farmaci/composti per selezionare il trattamento più efficace.

Bibliografia

Allen, H., 2014. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. *Current Opinion in Microbiology*, Volume 19, pp. 25-29.

Almeida, A. et al., 2019. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*, 568(7753), pp. 499-504.

Aluthge, N. D. et al., 2019. Board Invited review: The pig microbiota and the potential for harnessing the power of the microbiome to improve growth and health. *Journal of Animal Science*, 97(9), pp. 3741-3757.

Amin, N. et al., 2021. Evolution of rumen and oral microbiota in calves is influenced by age and time of weaning. *Animal Microbiome*, 3(1).

Anderson, A. J. et al., 2020. Messenger RNA enrichment using synthetic oligo(T) click nucleic acids. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 56(90), pp. 13987-13990.

Aresti Sanz, J. & El Aidy, S., 2019. Microbiota and gut neuropeptides: a dual action of antimicrobial activity and neuroimmune response. *Psychopharmacology*, 236(5), pp. 1597-1609.

Bager, P., Wohlfahrt, J. & Westergaard, T., 2008. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: Meta-analyses. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(4), pp. 634-642.

Bailey, M. T. & Coe, C. L., 1999. Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 35(2), pp. 146-155.

Bailey, M. T. et al., 2011. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(3), pp. 397-407.

- Bakken, J. S. et al., 2011. Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9(12), pp. 1044-1049.
- Balasubramanian, B., Lee, S. I. & Kim, I.-H., 2018. Inclusion of dietary multi-species probiotic on growth performance, nutrient digestibility, meat quality traits, faecal microbiota and diarrhoea score in growing-finishing pigs Inclusion of dietary multi-species probiotic on growth performance, nutrient d. *Italian Journal of Animal Science*, 17(1), pp. 100-106.
- Balcazar, J. L., 2014. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS pathogens*, 10(7), p. e1004219.
- Barton, M. D., 2014. Impact of antibiotic use in the swine industry. *Current opinion in microbiology*, Volume 19, pp. 9-15.
- Beauchemin, K. A. et al., 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 81(6), p. 1628–1640.
- Belanche, A. et al., 2012. Shifts in the Rumen Microbiota Due to the Type of Carbohydrate and Level of Protein Ingested by Dairy Cattle Are Associated with Changes in Rumen Fermentation 1-3. *The Journal of nutrition*, Volume 142, pp. 1684-1692.
- Belanche, A., Kingston-Smith, A. H. & Newbold, C. J., 2016. An integrated multi-omics approach reveals the effects of supplementing grass or grass hay with vitamin E on the rumen microbiome and its function. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), p. 198076.
- Belanche, A. et al., 2017. A systems biology approach reveals differences in the dynamics of colonization and degradation of grass vs. Hay by rumen microbes with minor effects of vitamin E supplementation. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), p. 278012.
- Berg, G. et al., 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1).

- Bernini, P. et al., 2009. Individual human phenotypes in metabolic space and time. *Journal of Proteome Research*, 8(9), pp. 4264-4271.
- Bhat, G. R. et al., 2022. Innovative in Silico Approaches for Characterization of Genes and Proteins. *Frontiers in genetics*, Volume 13.
- Blair, J. et al., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13(1), pp. 42-51.
- Boeckx, T., Winters, A., Webb, K. J. & Kingston-Smith, A. H., 2017. Detection of potential chloroplastic substrates for polyphenol oxidase suggests a role in undamaged leaves. *Frontiers in Plant Science*, Volume 8, p. 233169.
- Bonten, M. & Mevius, D., 2015. Less evidence for an important role of food-producing animals as source of antibiotic resistance in humans. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 60(12), pp. 1867-1867.
- Borody, T. J. & Khoruts, A., 2011. Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(2), pp. 88-96.
- Brandt, L. J. & Aroniadis, O. C., 2013. An overview of fecal microbiota transplantation: techniques, indications, and outcomes. *Gastrointestinal Endoscopy*, 78(2).
- Bratlie, M. S., Johansen, J. & Drabløs, F., 2010. Relationship between operon preference and functional properties of persistent genes in bacterial genomes. *Bmc Genomics*, 11(1), pp. 1-22.
- Burkholder, K. et al., 2008. Influence of Stressors on Normal Intestinal Microbiota, Intestinal Morphology, and Susceptibility to Salmonella Enteritidis Colonization in Broilers. *Poultry Science*, 87(9), pp. 1734-1741.
- Calsamiglia, S. et al., 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), pp. 2580-2595.
- Camilli, A. & Bassier, B. L., 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311(5764), pp. 1113-1116.

Carreño, D. et al., 2019. Rumen bacterial community responses to DpA, epA and DHA in cattle and sheep: A comparative in vitro study. *Scientific reports*, 9(1), p. 11857.

Casey, J. et al., 2013. High-density livestock operations, crop field application of manure, and risk of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Pennsylvania. *JAMA internal medicine*, 173(21), pp. 1980-1990.

Casey, J. et al., 2014. High-density livestock production and molecularly characterized MRSA infections in Pennsylvania.. *Environmental health perspectives*, 122(5), pp. 464-470.

Cavallaro , S., 2010. *TRECCANI - GENOMICA E GENOMICA FUNZIONALE*. [Online]

Available at: https://www.treccani.it/enciclopedia/genomica-e-genomica-funzionale_%28XXI-Secolo%29/

Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B. & Dewulf, J., 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3), pp. 827-834.

Charubin, K., Modla, S., Caplan, J. L. & Papoutsakis, E. T., 2020. Interspecies Microbial Fusion and Large-Scale Exchange of Cytoplasmic Proteins and RNA in a Syntrophic *Clostridium* Coculture. *mBio*, 11(5), pp. 1-20.

Chaucheyras-Durand, F. & Durand, H., 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes*, Volume 1, pp. 3-9.

Cheikhyoussef, A., Pogori, N., Chen, W. & Zhang, H., 2008. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), pp. 215-222.

Chen, S., Luo, S. & Yan, C., 2021. Gut Microbiota Implications for Health and Welfare in Farm Animals: A Review. *Animals (Basel)*, 12(1), p. 93.

- Chen, S. et al., 2018. Exposure to heat-stress environment affects the physiology, circulation levels of cytokines, and microbiome in dairy cows. *Scientific reports*, 8(1), p. 14606.
- Chen, S. et al., 2019. Rearing system causes changes of behavior, microbiome, and gene expression of chickens. *Poultry Science*, 98(9), pp. 3365-3376.
- China Ministry of Agriculture and Rural Affairs, 2017. *National action plan to combat animal resources antimicrobial resistance (2017-2020)*. [Online] Available at: http://www.moa.gov.cn/nybgb/2017/dqq/201801/t20180103_6133925.htm
- Chiquette, J., Allison, M. & Rasmussen, M., 2012. Use of *Prevotella bryantii* 25A and a commercial probiotic during subacute acidosis challenge in midlactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Volume 95, p. 5985–5995.
- Chow, J., Tang, H. & Mazmanian, S. K., 2011. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Current Opinion in Immunology*, 23(4), pp. 473-480.
- Clarke, G. et al., 2013. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular psychiatry*, 18(6), pp. 666-673.
- Clerke, G. et al., 2014. Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ. *Molecular Endocrinology*, 28(8), pp. 1221-1238.
- Cogliani, C., Goossens, H. & Greko, C., 2011. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microbe*, 6(6), p. 274.
- Collignon, P., Aarestrup, F., Irwin, R. & McEwen, S., 2013. Human deaths and third-generation cephalosporin use in poultry, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), pp. 1339-1340.
- Commisso, M. et al., 2013. Untargeted metabolomics: an emerging approach to determine the composition of herbal products. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 4(5), p. e201301007.

- Cosgrove, S. E. et al., 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases*, 36(1), pp. 53-59.
- Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Food microbiology*, Volume 3, p. 777–788.
- Couvreur, S. et al., 2006. The Linear Relationship Between the Proportion of Fresh Grass in the Cow Diet, Milk Fatty Acid Composition, and Butter Properties. *Journal of Dairy Science*, 89(6), pp. 1956-1969.
- Cox, M. J., Cookson, W. O. & Moffatt, M. F., 2013. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human molecular genetics*, 22(R1), pp. R88-R94.
- Cryan, J. F. & Dinan, T. G., 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews neuroscience*, 13(10), pp. 701-712.
- Dębski, B., 2016. Supplementation of pigs diet with zinc and copper as alternative to conventional antimicrobials. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(4), pp. 917-924.
- Daliri, E. B. M. et al., 2021. Challenges and perspective in integrated multi-omics in gut microbiota studies. *Biomolecules*, 11(2), pp. 1-10.
- Daliri, E. B. M., Wei, S., Oh, D. H. & Lee, B. H., 2017. The human microbiome and metabolomics: Current concepts and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), pp. 3565-4576.
- Daliri, E. B.-M. et al., 2020. Influence of fermented soy protein consumption on hypertension and gut microbial modulation in spontaneous hypertensive rats. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 39(4), pp. 199-208.
- Daniluk, U. et al., 2019. Untargeted Metabolomics and Inflammatory Markers Profiling in Children With Crohn's Disease and Ulcerative Colitis—A Preliminary Study. *Inflammatory Bowel Diseases*, 25(7), pp. 1120-1128.
- Davies, S., 2013. *Annual report of the chief medical officer, volume two, 2011, infections and the rise of antimicrobial resistance*, London: Department of Health.

- D'Costa, V. et al., 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), pp. 457-461.
- de Been, M. et al., 2014. Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS genetics*, 10(12), p. e1004776.
- De Filippis, F., Pasoli, E. & Ercolini, D., 2020. Newly Explored Faecalibacterium Diversity Is Connected to Age, Lifestyle, Geography, and Disease. *Current Biology*, 30(24), pp. 4932-4943.
- De Rodas, B. et al., 2018. Microbiome profiling of commercial pigs from farrow to finish. *Journal of Animal Science*, 96(5), pp. 1778-1794.
- Desnoyers, M. et al., 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *Journal of Dairy Science*, 92(4), pp. 1620-1632.
- Di Maio, S. & Mereta, F., 2021. *Microbiota, l'amico invisibile per il tuo benessere a tutte le età*. Prima Edizione a cura di Milano: Gribaudo.
- Dicks, L. & Botes, M., 2010. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes*, Volume 1, p. 11–29.
- Dominguez-Bello, M. G. et al., 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), pp. 11971-11975.
- Dong, Q. et al., 2020. Influence of *Lactobacillus plantarum* individually and in combination with low O2-MAP on the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* in cabbage. *Food Control*, Volume 107, p. 106765.
- Doré, J. & Hervé, B., 2015. The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health. *Current opinion in biotechnology*, Volume 32, pp. 195-199.
- Dou, S. et al., 2017. Characterisation of early-life fecal microbiota in susceptible and healthy pigs to post-weaning diarrhoea. *PLoS ONE*, 12(1).

- Dowarah, R. et al., 2016. Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower-finisher crossbred pigs. *Livestock Science*, Volume 195, pp. 74-79.
- Drago, L. et al., 2016. Persisting changes of intestinal microbiota after bowel lavage and colonoscopy. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28(5), pp. 532-537.
- Durso, L. M. & Cook, K. L., 2015. Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks?. *Current opinion in microbiology*, Volume 19, pp. 37-44.
- Elghandour, M. M. Y. et al., 2014. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on in vitro gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. *Italian Journal of Animal Science*, 13(2).
- Elghandour, M. M. Y. et al., 2015. Direct-fed microbes: a tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(3), pp. 526-533.
- Elliott, S. D. & Barnes, E. M., 1959. Changes in serological type and antibiotic resistance of Lancefield group D streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline. *Microbiology*, 20(2), pp. 426-433.
- Emerson, J. B. et al., 2017. Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome*, 5(1), p. 86.
- Erickson, A. R. et al., 2012. Integrated Metagenomics/Metaproteomics Reveals Human Host-Microbiota Signatures of Crohn's Disease. *PLoS ONE*, 7(11).
- Esser, D. et al., 2019. Functions of the Microbiota for the Physiology of Animal Metaorganisms. *Journal of Innate Immunity*, 11(5), pp. 393-404.
- European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority & European Medicines Agency, 2015. ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*, 13(1), p. 4006.

- Evans, J. M., Morris, L. S. & Marchesi, J. R., 2013. The gut microbiome: The role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *Journal of Endocrinology*, 218(3).
- Ezema, C., 2013. Probiotics in animal production: a review. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 5(11), pp. 308-316.
- Fernando, S. C. et al., 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), pp. 7482-7490.
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, Volume 48, pp. 155-171.
- Filiatrault, M. J., 2011. Progress in prokaryotic transcriptomics. *Current Opinion in Microbiology*, 14(5), pp. 579-586.
- Finley, R. et al., 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical infectious diseases*, 57(5), pp. 704-710.
- Flint, H. J. & Bayer, E. A., 2008. Plant Cell Wall Breakdown by Anaerobic Microorganisms from the Mammalian Digestive Tract. *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 280-288.
- Flynn, S. et al., 2002. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology*, 148(4).
- Food and Agriculture Organization, 2002. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. In: *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ontario, Canada: s.n.
- Food and Drug Administration, 2014. *FDA Annual Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed in 2012 for Use in Food-Producing Animals*. [Online]
Available at: <https://www.aasv.org/news/story.php?id=7555>
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C. & Joly, B., 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology*, 152(2), pp. 167-173.

- Forslund, K. et al., 2013. Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. *Genome research*, 23(7), pp. 1163-1169.
- Franzosa, E. A. et al., 2014. Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), pp. E2329-E2338.
- Freire, J. P. B., Guerreiro, A. J. G., Cunha, L. F. & Aumaitre, A., 2000. Effect of dietary fibre source on total tract digestibility, caecum volatile fatty acids and digestive transit time in the weaned piglet. *Animal Feed Science and Technology*, 87(1-2), pp. 71-83.
- Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C. & Mills, D. A., 2015. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome*, 3(1).
- Friedman, N., Jami, E. & Mizrahi, I., 2017. Compositional and functional dynamics of the bovine rumen methanogenic community across different developmental stages. *Environmental Microbiology*, 19(8), pp. 3365-3373.
- Frizzo, L. S. et al., 2010. Lactic acid bacteria to improve growth performance in young calves fed milk replacer and spray-dried whey powder. *Animal Feed Science and Technology*, 157(3-4), pp. 159-167.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), pp. 365-378.
- Fuller, R., 2001. The Chicken Gut Microflora and Probiotic Supplements. *The Journal of Poultry Science*, 38(3), pp. 189-196 .
- Gavin, P. G. et al., 2018. Intestinal Metaproteomics Reveals Host-Microbiota Interactions in Subjects at Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 41(10), pp. 2178-2186.
- Gérard, P., 2016. Gut microbiota and obesity. *Cellular and molecular life sciences*, 73(1), pp. 147-162.
- Ghorbani, G. R., Morgavi , D. P., Beauchemin, K. A. & Leedle , J. A. Z., 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables,

and the microbial populations of feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 80(7), p. 1977–1985.

Gilbert, W. & Maxam, A., 1973. The Nucleotide Sequence of the lac Operator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), pp. 3581-3584.

González, L. A. et al., 2012. Ruminant acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). *Animal Feed Science and Technology*, Volume 172, pp. 66-79.

Gorkiewicz, G. et al., 2013. Alterations in the colonic microbiota in response to osmotic diarrhea. *PloS one*, 8(2), p. e55817.

Gouveia, D., Grenga, L., Pible, O. & Armengaud, J., 2020. Quick microbial molecular phenotyping by differential shotgun proteomics. *Environmental Microbiology*, 22(8), pp. 2996-3004.

Granata, I. et al., 2020. Duodenal metatranscriptomics to define human and microbial functional alterations associated with severe obesity: A pilot study. *Microorganisms*, 8(11), pp. 1-22.

Graziani, F. et al., 2016. *Ruminococcus gnavus* E1 modulates mucin expression and intestinal glycosylation. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), pp. 1403-1417.

Gregory, J. C. et al., 2015. Transmission of Atherosclerosis Susceptibility with Gut Microbial Transplantation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(9), pp. 5647-5660.

Grob, C. et al., 2015. Combining metagenomics with metaproteomics and stable isotope probing reveals metabolic pathways used by a naturally occurring marine methylotroph. *Environmental Microbiology*, 17(10), pp. 4007-4018.

Gullberg, E. et al., 2014. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *MBio*, 5(5), pp. 10-1128.

Højberg, O. et al., 2005. Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), pp. 2267-2277.

- Hammer, T. J., Sanders, J. G. & Fierer, N., 2019. Not all animals need a microbiome. *FEMS Microbiology Letters*, 366(10).
- Hampton, T., 2013. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. *Jama*, 310(16), pp. 1661-1663.
- Hao, H. et al., 2014. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in microbiology*, Volume 5, p. 288.
- Harrison, E. et al., 2013. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO molecular medicine*, 5(4), pp. 509-515.
- Hart, E. H. et al., 2016. The effects of PPO activity on the proteome of ingested red clover and implications for improving the nutrition of grazing cattle. *Journal of Proteomics*, Volume 141, pp. 67-76.
- Hawkey, P. M., 2008. The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(suppl_1), pp. i1-i9.
- Hedemann, M. S. et al., 2006. Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties. *Journal of Animal Science*, 84(6), pp. 1375-1386.
- Heinritz, S. N. et al., 2016. Intestinal Microbiota and Microbial Metabolites Are Changed in a Pig Model Fed a High-Fat/Low-Fiber or a Low-Fat/High-Fiber Diet. *PLoS ONE*, 11(4), p. 154329.
- He, L.-Y. et al., 2014. Dissemination of antibiotic resistance genes in representative broiler feedlots environments: identification of indicator ARGs and correlations with environmental variables. *Environmental science & technology*, 48(22), pp. 13120-13129.
- Henderson, G. et al., 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, Volume 5, p. 14567.
- Henke, M. T. et al., 2019. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory

polysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(26), pp. 12672-12677.

Heuer, H. et al., 2011. Accumulation of Sulfonamide Resistance Genes in Arable Soils Due to Repeated Application of Manure Containing Sulfadiazine. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), pp. 2527-2530.

Hoque, M. N. et al., 2019. Metagenomic deep sequencing reveals association of microbiome signature with functional biases in bovine mastitis. *Scientific reports*, 9(1).

Hughes, D. T. & Sperandio, V., 2008. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 6, p. 111–120.

Hu, L. et al., 2018. Exogenous Fecal Microbiota Transplantation from Local Adult Pigs to Crossbred Newborn Piglets. *Frontiers in Microbiology*, Volume 8, p. 2663.

Humeniuk, C. et al., 2002. β -Lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(9), pp. 3045-3049.

Hunter, P. et al., 2010. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(5), p. 1078.

Huntington, G. B., 2000. High-starch rations for ruminant production discussed. *Feedstuffs*, Volume 12, p. 13–23.

Huo, R. et al., 2017. Microbiota Modulate Anxiety-Like Behavior and Endocrine Abnormalities in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, Volume 7, p. 489.

Huws, S. A. et al., 2018. Addressing Global Ruminant Agricultural Challenges Through Understanding the Rumen Microbiome: Past, Present, and Future. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP).

Huws, S. A. et al., 2010. Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(2), pp. 396-701.

- Hu, Y. & Cheng, H., 2014. Research Opportunities for Antimicrobial Resistance Control in China's Factory Farming. *Environmental science & technology*, 48(10), pp. 5364-5365.
- Ibal, J. C. et al., 2022. Review of the Current State of Freely Accessible Web Tools for the Analysis of 16S rRNA Sequencing of the Gut Microbiome. *International Journal Of Molecular Science*, 23(8).
- Ishaq, S. L., AlZahal, O., Walker, N. & McBride, B., 2017. An investigation into rumen fungal and protozoal diversity in three rumen fractions, during high-fiber or grain-induced sub-acute ruminal acidosis conditions, with or without active dry yeast supplementation. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), p. 281256.
- Issac, N. I. et al., 2019. Metaproteomics of the human gut microbiota: Challenges and contributions to other OMICS. *Clinical Mass Spectrometry*, Volume 14, pp. 18-30.
- Jia, Y. et al., 2019. Rare Taxa Exhibit Disproportionate Cell-Level Metabolic Activity in Enriched Anaerobic Digestion Microbial Communities. *mSystems*, 4(1).
- Jiménez, E. et al., 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile?. *Research in Microbiology*, 153(3), pp. 187-193.
- Johnson-Henry, K. C. et al., 2007. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular microbiology*, 9(2), pp. 356-367.
- Kanwar, N. et al., 2014. Impact of treatment strategies on cephalosporin and tetracycline resistance gene quantities in the bovine fecal metagenome. *Scientific Reports*, 29(4), p. 5100.
- Keunen, J. E. et al., 2003. Short Communication: Effects of Subacute Ruminal Acidosis on Free-Choice Intake of Sodium Bicarbonate in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, Volume 86, pp. 954-957.
- Kim, E. R. et al., 2019. Urine-NMR metabolomics for screening of advanced colorectal adenoma and early stage colorectal cancer. *Scientific Reports*, 9(1), p. 4786.

- Kmet, V., Flint, H. J. & Wallace, R. J., 1993. Probiotics and manipulation of rumen development and function. *Arch Tierernahr*, 44(1), pp. 1-10.
- Knight, R. et al., 2018. Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), pp. 410-422.
- Knip, M. & Siljander, H., 2016. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(3), pp. 154-167.
- Knudsen, K. E. B., Hedemann, M. S. & Lærke, H. N., 2012. The role of carbohydrates in intestinal health of pigs. *Animal Feed Science and Technology*, Volume 173, pp. 41-53.
- Kollath, W., 1953. The increase of the diseases of civilization and their prevention. *Munch Med Wochenschr*, Volume 95, p. 1260–1262.
- Kovatcheva-Datchary, P. & Arora, T., 2013. Nutrition, the gut microbiome and the metabolic syndrome. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1), pp. 59-72.
- Krehbiel, C., Rust, S., Zhang, G. & Gilliland, S., 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action. *Journal of Animal Science*, Volume 81, p. E120–E132.
- Kruis, W. et al., 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, Volume 53, pp. 1617-1623.
- Krumsiek, J. et al., 2015. Gender-specific pathway differences in the human serum metabolome. *Metabolomics*, Volume 11, pp. 1815-1833.
- Ku, C. S. & Roukos, D. H., 2013. From next-generation sequencing to nanopore sequencing technology: paving the way to personalized genomic medicine. *Expert review of medical devices*, 10(1), pp. 1-6.
- Kung, L., Taylor, C. C., Lynch, M. P. & Neylon, J. M., 2003. The Effect of Treating Alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on Silage Fermentation, Aerobic Stability, and Nutritive Value for Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, Volume 86, p. 336–343.

- La Ragione , R., Narbad , A., Gasson , M. & Woodward, M., 2004. In vivo characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Letters in Applied Microbiology*, 38(3), p. 197–205.
- Lazarus, B., Paterson, D., Mollinger, J. & Rogers, B., 2015. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. *Clinical Infectious Diseases*, 60(3), pp. 439-452.
- Leblois, J. et al., 2017. Modulation of piglets' microbiota: differential effects by a high wheat bran maternal diet during gestation and lactation. *Scientific reports*, 7(1), p. 7426.
- Lee, M. R., 2014. Forage polyphenol oxidase and ruminant livestock nutrition. *Frontiers in Plant Science*, 5(DEC), p. 104341.
- Lee, M. R. et al., 2004. Plant-mediated lipolysis and proteolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(13), pp. 1639-1645.
- Le, O. T. et al., 2017. Effect of probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* strain H57 on productivity and the incidence of diarrhoea in dairy calves. *Animal Production Science*, 57(5), pp. 912-919.
- Leser, T. D. et al., 2000. Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), pp. 3290-3296.
- Liang, S.-t., Dennis, P. & Bremer, H., 2000. mRNA Composition and Control of Bacterial Gene Expression. *Journal of bacteriology*, 182(11), pp. 3037-3044.
- Liao, S. F. & Nyachoti, M., 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition*, 3(4), pp. 331-343.
- Li, J. et al., 2013. Occurrence of chloramphenicol-resistance genes as environmental pollutants from swine feedlots. *Environmental science & technology*, 47(6), pp. 2892-2897.

- Li, K., Shi, B. & Na, R., 2023. The Colonization of Rumen Microbiota and Intervention in Pre-Weaned Ruminants. *Animals*, 13(6).
- Lilly, D. M. & Stillwell, R. H., 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), pp. 747-748.
- Lima-Ojeda, J., Rupprecht, R. & Baghai, T., 2020. Darmflora und Depression. *Nervenarzt*, Volume 91, p. 1108–1114.
- Lindberg, J. E., 2014. Fiber effects in nutrition and gut health in pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5(1), pp. 1-7.
- Liu, Y.-Y. et al., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), pp. 161-168.
- Long, S. et al., 2020. Metaproteomics characterizes human gut microbiome function in colorectal cancer. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 6(1), p. 14.
- Loof, T. et al., 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), pp. 1691-1696.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E. & Wallace, R. J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, 4(7), pp. 1008-1023.
- Lowder, B. et al., 2009. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(46), pp. 19545-19550.
- Luissint, A. C., Parkos, C. A. & Nusrat, A., 2016. Inflammation and the Intestinal Barrier: Leukocyte–Epithelial Cell Interactions, Cell Junction Remodeling, and Mucosal Repair. *Gastroenterology*, 152(4), pp. 616-632.
- Lukic, J. et al., 2017. *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus salivarius* differently modulate early immunological response of Wistar rats co-administered with *Listeria monocytogenes*. *Beneficial Microbes*, 8(5), pp. 809 - 822.

- Lupp, C. et al., 2007. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell host & microbe*, 2(2), pp. 119-129.
- MacCafferri, S., Biagi, A. & Brigidi, P., 2011. Metagenomics: Key to Human Gut Microbiota. *Digestive Disease*, 29(6), pp. 525-530.
- Machaboeuf, D. et al., 2008. Dose–response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), pp. 335-350.
- Mackowiak, P. A., 2013. Recycling Metchnikoff: Probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in Public Health*, 1(52).
- Malmuthuge, N., Liang, G. & Guan, L. L., 2019. Regulation of rumen development in neonatal ruminants through microbial metagenomes and host transcriptomes. *Genome Biology*, 20(1).
- Manor, O., Levy, R. & Borenstein, E., 2014. Mapping the inner workings of the microbiome: Genomic- and metagenomic-based study of metabolism and metabolic interactions in the human microbiome. *Cell Metabolism*, 20(5), pp. 742-752.
- Marquardt, R. R. & Li, S., 2018. Antimicrobial resistance in livestock: advances and alternatives to antibiotics. *Animal Frontiers*, 8(2), pp. 30-37.
- Martin-Gallausiaux, C. et al., 2021. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. *Proceedings of the Nutrition Society*, pp. 37-49.
- Mastrangelo, A., Armitage, E. G., Garcia, A. & Barbas, C., 2014. Metabolomics as a tool for drug discovery and personalised medicine. A review.. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(23), pp. 2627-2636.
- Mather, A. et al., 2013. Distinguishable epidemics of multidrug-resistant Salmonella Typhimurium DT104 in different hosts. *Science*, 341(6153), pp. 1514-1517.
- Matsuguchi, T. et al., 2003. Lipoteichoic Acids from Lactobacillus Strains Elicit Strong Tumor Necrosis Factor Alpha-Inducing Activities in Macrophages through Toll-Like Receptor 2. *Clinical and Vaccine Immunology*, Volume 10, p. 259–266.

- Maxam, A. M. & Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), pp. 560-564.
- Mayer, A. M. & Harel, E., 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18(2), pp. 193-215.
- McCormack, U. M. et al., 2018. Fecal Microbiota Transplantation in Gestating Sows and Neonatal Offspring Alters Lifetime Intestinal Microbiota and Growth in Offspring. *mSystems Journal*, 3(3), pp. e00134-17.
- McEachran, A. et al., 2015. Antibiotics, bacteria, and antibiotic resistance genes: aerial transport from cattle feed yards via particulate matter. *Environmental health perspectives*, 123(4), pp. 337-343.
- Medellin-Peña, M. J. et al., 2007. Probiotics Affect Virulence-Related Gene Expression in Escherichia coli O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), p. 4259–4267.
- Mesuer, B. et al., 2016. Unipept web services for metaproteomics analysis. *Bioinformatics*, 32(11), pp. 1746-1748.
- Milosevic, I. et al., 2019. Gut-liver axis, gut microbiota, and its modulation in the management of liver diseases: A review of the literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2).
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, 2019. Report on the use of veterinary antibiotics of China in 2018. *Veterinary Bulletin*, Volume 21, pp. 57-9.
- Molina-Torres, G. et al., 2019. Stress and the gut microbiota-brain axis. *Behavioural Pharmacology*, 30(2-3), pp. 187-200.
- Montagne, L., Pluske, J. R. & Hampson, D. J., 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*, Volume 108, pp. 95-117.
- Montalto, M. et al., 2009. Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*, 3(2), pp. 30-34.

- Morgan, X. et al., 2018. A bacterial immunomodulatory protein with lipocalin-like domains facilitates host-bacteria mutualism in larval zebrafish. *eLife*, Volume 7, pp. 1-26.
- Morris, G. et al., 2017. The Role of the Microbial Metabolites Including Tryptophan Catabolites and Short Chain Fatty Acids in the Pathophysiology of Immune-Inflammatory and Neuroimmune Disease. *Molecular neurobiology*, 54(6), pp. 4432-4451.
- Mulder, I. E. et al., 2009. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology*, 7(79).
- Mullis, K. B., 1993. *Nobel Lecture: The Polymerase Chain Reaction*. [Online] Available at: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/lecture/>
- Munoz-Price, L. et al., 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet infectious diseases*, 13(9), pp. 785-796.
- Nagaraja , T. & Titgemeyer, E., 2007. Ruminant Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. *Journal of Dairy Science*, Volume 90, pp. E17-E38.
- Nagata, N. et al., 2019. Effects of bowel preparation on the human gut microbiome and metabolome. *Scientific Reports* , 9(1), p. 4042.
- Namkung, H., Gong, J., Yu, H. & De Lange, C. F. M., 2006. Effect of pharmacological intakes of zinc and copper on growth performance, circulating cytokines and gut microbiota of newly weaned piglets challenged with coliform lipopolysaccharides. *Canadian Journal of Animal Science*, 86(4), pp. 511-522.
- National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Board on Agriculture and Natural Resources & Committee on Nutrient Requirements of Swine, 2012. *Nutrient Requirements of Swine*. Eleventh Revised Edition a cura di Washington (D.C.): National Academies Press.
- Nesme, J. et al., 2014. Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Current biology*, 24(10), pp. 1096-1100.

- Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J. & Foster, J. A., 2011. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology & Motility*, 23(3), pp. 255-e119.
- Newbold, C. J. et al., 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology*, 6(NOV), p. 164310.
- Newbold, C. J. & Ramos-Morales, E., 2020. Review: Ruminant microbiome and microbial metabolome: effects of diet and ruminant host. *Animal*, 14(1), pp. s78-s86.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J. & McIntosh, F. M., 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition*, 76(2), pp. 249-261.
- Newbold, C. J. & Webster, J., 2007. Feed supplements for dairy cattle. In: *Achieving sustainable production of milk Volume 3*. Cambridge, UK: Burleigh Dodds Science Publishing, pp. 295-328.
- Nicholson, J. K., Holmes, E. & Wilson, I. D., 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*, 3(5), pp. 431-438.
- Nocek, J. E., Kautz, W. P., Leedle, J. A. & Allman, J. C., 2002. Ruminant supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, Volume 85, p. 429–433.
- Nowakiewicz, A., Zięba, P., Gnat, S. & Matuszewski, Ł., 2020. Last Call for Replacement of Antimicrobials in Animal Production: Modern Challenges, Opportunities, and Potential Solutions. *Antibiotics*, 9(12), p. 883.
- O'Callaghan, T. F., Ross, P. R., Stanton, C. & Clarke, G., 2016. The gut microbiome as a virtual endocrine organ with implications for farm and domestic animal endocrinology. *Domestic Animal Endocrinology*, Volume 56, pp. S44-S55.
- Ojala, T., Kankuri, E. & Kankainen, M., 2023. Understanding human health through metatranscriptomics Molecular Medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 29(5).
- O'Mahony, S. M. et al., 2015. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, Volume 277, pp. 32-48.

- O'Mahony, S. M., Hyland, N. P., Dinan, T. G. & Cryan, J. F., 2011. Maternal separation as a model of brain–gut axis dysfunction. *Psychopharmacology*, Volume 214, pp. 71-88.
- O'Mahony, S. M. et al., 2009. Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses. *Biological Psychiatry*, 65(3), pp. 263-267.
- Oyarzabal, O. A. & Conner, D. E., 1996. Application of Direct-Fed Microbial Bacteria and Fructooligosaccharides for Salmonella Control in Broilers During Feed Withdrawal. *Poultry Science*, 75(2), pp. 186-190.
- Oz, T. et al., 2014. Strength of selection pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution. *Molecular biology and evolution*, 31(9), pp. 2387-2401.
- Parker, R. B., 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*, Volume 29, pp. 4-8.
- Patra, A. K. & Saxena, J., 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(4), pp. 363-375.
- Patra, A. K. & Saxena, J., 2009. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*, 22(2), pp. 204-219.
- Pei, C. X., Mao, S. Y., Chen, Y. F. & Zhu, W. Y., 2010. Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle. *Animal*, 4(1), pp. 20-29.
- Peng, B., Li, H. & Peng, X.-X., 2015. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. *Protein & cell*, 6(9), pp. 628-637.
- Perlman, D. et al., 2022. Concepts and Consequences of a Core Gut Microbiota for Animal Growth and Development. *Annual Review of Animal Biosciences*, Volume 10, pp. 177-201.

- Piccini, F., 2018. *Microbiota, intestino e salute. Come prevenire, riconoscere e curare le disbiosi intestinali*. Milano: Edizioni LSWR.
- Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R. & Núñez, G., 2017. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological Reviews*, 279(1), pp. 70-89.
- Rakoff-Nahoum, S., Foster, K. R. & Comstock, L. E., 2016. The evolution of cooperation within the gut microbiota. *Nature*, 533(7602), pp. 255-259.
- Ramos-Morales, E. et al., 2017. Antiprotozoal effect of saponins in the rumen can be enhanced by chemical modifications in their structure. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), p. 399.
- Ramos-Morales, E. et al., 2019. Not all saponins have a greater antiprotozoal activity than their related sapogenins. *FEMS Microbiology Letters*, 366(13).
- Ramos-Morales, E. et al., 2018. The effect of an isoflavonoid-rich liquorice extract on fermentation, methanogenesis and the microbiome in the rumen simulation technique. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(3).
- Ramos-Morales, E. et al., 2009. Slight changes in the chemical structure of haemanthamine greatly influence the effect of the derivatives on rumen fermentation in vitro. *Scientific reports*, 9(1).
- Rea, M. C. et al., 2007. Antimicrobial activity of lacticin 3147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 56(7), p. 940–946.
- Robinson, P. H., 2002. Yeast products for growing and lactating dairy cattle: impact on rumen fermentation and performance. *Dairy Rev*, Volume 9, pp. 1-4.
- Rolfe, R. D., 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition*, 130(2), pp. 396S-402S.
- Russell, J. B. & Houlihan, A. J., 2003. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(1), pp. 65-74.

- Russell, J. B. & Strobel, H. J., 1993. Microbial energetics. *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.*, pp. 165-186.
- Saladrigas-García, M. et al., 2022. An insight into the commercial piglet's microbial gut colonization: from birth towards weaning. *Animal Microbiome*, 4(1).
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp. 5463-5467.
- Schären, M. et al., 2017. Alterations in the rumen liquid-, particle- and epithelium-associated microbiota of dairy cows during the transition from a silage- and concentrate-based ration to pasture in spring. *Frontiers in Microbiology*, 8(744).
- Schechner, V. et al., 2013. Epidemiological interpretation of studies examining the effect of antibiotic usage on resistance. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), pp. 289-307.
- Schmidt, B. et al., 2011. Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions. *PLoS ONE*, 6(12).
- Schmidt-Nielsen, K., 1997. *Animal physiology: adaptation and environment.*. Quinta edizione a cura di Cambridge: Cambridge university press.
- Schweppe, D. K. et al., 2015. Host-Microbe Protein Interactions during Bacterial Infection. *Chemistry and Biology*, 22(11), pp. 1521-1530.
- Seo, J. K. et al., 2010. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(12), pp. 1657-1667.
- Shakya, M., Lo, C. C. & Chain, P. S. G., 2019. Advances and challenges in metatranscriptomic analysis. *Frontiers in Genetics*, 10(904).
- Sharma Bajagai, Y., Klieve, A., Dart, P. & Bryden, W., 2016. *Probiotics in Animal Nutrition: Production, Impact and Regulation*. Roma: FAO.
- Shendure, J. & Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), pp. 1135-1145.

- Shobar, R. M. et al., 2016. The Effects of Bowel Preparation on Microbiota-Related Metrics Differ in Health and in Inflammatory Bowel Disease and for the Mucosal and Luminal Microbiota Compartments. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7(2), p. e143.
- Smillie, C. et al., 2011. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*, 480(7376), pp. 241-244.
- Smith, T. C. & Pearson, N., 2011. The emergence of Staphylococcus aureus ST398. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(4), pp. 327-339.
- Sousa, A. M., Machado, I. & Pereira, M. O., 2012. Phenotypic switching: an opportunity to bacteria thrive. In: *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, pp. 252-262.
- Spurlock, M. E. & Gabler, N. K., 2008. The Development of Porcine Models of Obesity and the Metabolic Syndrome 1,2. *The Journal of nutrition*, 138(2), pp. 397-402.
- Starr, M. P. & Reynolds, D. M., 1951. Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 41(11_Pt_1), pp. 1375-1380.
- Stecher, B. et al., 2007. Salmonella enterica Serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Compete with the Intestinal Microbiota. *PLoS biology*, 5(10), p. e244.
- Stein, D. R. et al., 2006. Effects of Feeding Propionibacteria to Dairy Cows on Milk Yield, Milk Components, and Reproduction. *Journal of Dairy Science*, 89(1), pp. 111-125.
- Stephens, R. W., Arhire, L. & Covasa, M., 2018. Gut Microbiota: From Microorganisms to Metabolic Organ Influencing Obesity. *Obesity*, 26(5), pp. 801-809.
- Strandwitz, P. et al., 2019. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nature microbiology*, 4(3), pp. 396-403.

- Sudo, N. et al., 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *The Journal of physiology*, 558(1), pp. 263-275.
- Sun, M., Wu, W., Liu, Z. & Cong, Y., 2017. Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Journal of Gastroenterology*, 52(1).
- Tadrowski, A. C., Evans, M. R. & Waclaw, B., 2018. Phenotypic Switching Can Speed up Microbial Evolution. *Scientific Reports*, 8(1).
- Tanca, A. et al., 2015. Enrichment or depletion? The impact of stool pretreatment on metaproteomic characterization of the human gut microbiota. *Proteomics*, 15(20), pp. 3474-3485.
- Tannock, G. W. & Savage, D. C., 1974. Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infection and immunity*, 9(3), pp. 591-598.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. & Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 8, p. 207–217.
- Tremlett, H. et al., 2017. The gut microbiome in human neurological disease: A review. *Annals of neurology*, 81(3), pp. 369-382.
- Turnbaugh, P. J. et al., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), pp. 1027-1031.
- Ullah, H. et al., 2023. The gut microbiota–brain axis in neurological disorder. *Frontiers in Neuroscience*, Volume 17.
- Van Boeckel, T. P. et al., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), pp. 5649-5654.
- Van Boeckel, T. P. et al., 2017. Reducing antimicrobial use in food animals. *Science*, 357(6358), pp. 1350-1352.

- Venegas, D. P. et al., 2019. Short chain fatty acids (SCFAs) mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology*, Volume 10, p. 277.
- Vibhute, V. M., Shelke, R. R., Chavan, S. D. & Nage, S. P., 2011. Effect of probiotics supplementation on the performance of lactating crossbred cows. *Veterinary World*, 4(12), p. 557.
- Vignoli, A. et al., 2019. High-Throughput Metabolomics by 1D NMR. *Angewandte Chemie - International Edition*, 58(4), pp. 968-994.
- Vi, Y. et al., 2021. Multiomics analysis reveals the presence of a microbiome in the gut of fetal lambs. *Gut*, 70(5), pp. 853-864.
- Vlčková, K. et al., 2018. Impact of stress on the gut microbiome of free-ranging western lowland gorillas. *Microbiology*, 164(1), pp. 40-44.
- Vodička, M. et al., 2018. Microbiota affects the expression of genes involved in HPA axis regulation and local metabolism of glucocorticoids in chronic psychosocial stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, Volume 73, pp. 615-624.
- Vogt, S. L., Peña-Díaz, J. & Finlay, B. B., 2015. Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe*, Volume 34, pp. 106-115.
- Walker, A. W. et al., 2011. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC microbiology*, 11(1), pp. 1-12.
- Wallace, R. J. et al., 2002. Natural Products as Manipulators of Rumen Fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(10), pp. 1458-1468.
- Walter, J. & Hornef, M. W., 2021. A philosophical perspective on the prenatal in utero microbiome debate. *Microbiome*, 9(1).
- Wang, Y. et al., 2017. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nature microbiology*, 2(4), pp. 1-7.

- Waters, C. M. & Bassler, B. L., 2005. QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Volume 21, p. 319–346.
- Weiss, G. A. & Hennet, T., 2017. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Volume 74, p. 2959–2977.
- Weiss, W. P., Wyatt, D. J. & McKelvey, T. R., 2008. Effect of feeding propionibacteria on milk production by early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Volume 91, p. 646–652.
- Wichann, F., Udikovic-Kolic, N., Andrew, S. & Handelsman, J., 2014. Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. *mBio*, 5(2), pp. 10-1128.
- Wiley, N. C. et al., 2017. The microbiota-gut-brain axis as a key regulator of neural function and the stress response: Implications for human and animal health. *Journal of Animal Science*, 95(7), p. 3225–3246.
- Wlodarska, M., Kostic, A. D. & Xavier, R. J., 2015. An Integrative View of Microbiome-Host Interactions in Inflammatory Bowel Diseases. *Cell host & microbe*, 17(5), pp. 577-591.
- World Health Organization (WHO), 2014. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014*, Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO).
- World Health Organization, 2017. *World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals*, s.l.: s.n.
- Wu, G. D. et al., 2016. Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut*, 65(1), pp. 63-72.
- Wu, Q. et al., 2020. Gut microbiota modulates stress-induced hypertension through the HPA axis. *Brain Research Bulletin*, Volume 162, pp. 49-58.
- Xiao, Y. et al., 2017. Early Gut Microbiota Intervention Suppresses DSS-Induced Inflammatory Responses by Deactivating TLR/NLR Signalling in Pigs. *Scientific Reports*, 7(1), p. 3224.

- Xiong, W. et al., 2015. Development of an enhanced metaproteomic approach for deepening the microbiome characterization of the human infant gut. *Journal of Proteome Research*, 14(1), pp. 133-141.
- Xiong, W. et al., 2015. Responses of plasmid-mediated quinolone resistance genes and bacterial taxa to (fluoro) quinolones-containing manure in arable soil. *Chemosphere*, Volume 119, pp. 473-478.
- Xiong, W., Sun, Y. & Zeng, Z., 2018. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environmental Science and Pollution Research*, Volume 25, p. 18377–18384.
- Xiong, W. et al., 2018. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome*, 6(34).
- Xue, M.-Y. et al., 2021. Ruminal resistome of dairy cattle is individualized and the resistotypes are associated with milking traits. *Animal microbiome*, 3(1), pp. 1-17.
- Yan, C. et al., 2020. Adaptive response to a future life challenge: consequences of early-life environmental complexity in dual-purpose chicks. *Journal of Animal Science*, 98(11), p. skaa348.
- Yang, H. et al., 2018. Evaluating the profound effect of gut microbiome on host appetite in pigs. *BMC Microbiology*, 18(1), pp. 1-10.
- Yang, I. et al., 2016. The infant microbiome: Implications for infant health and neurocognitive development. *Nursing Research*, 65(1), pp. 76-88.
- Yang, Y., Iji, P. A. & Choct, M., 2009. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World's Poultry Science Journal*, Volume 65, p. 97–114.
- Yazdankhah, S., Rudi, K. & Bernhoft, A., 2014. Zinc and copper in animal feed – development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 25(1), p. 25862.

Zhang, X. et al., 2018. Metaproteomics reveals associations between microbiome and intestinal extracellular vesicle proteins in pediatric inflammatory bowel disease. *Nature Communications*, 9(1).

Zhang, Y. et al., 2021. Metatranscriptomics for the Human Microbiome and Microbial Community Functional Profiling. *Annual Review of Biomedical Data Science*, Volume 4, pp. 279-311.

Zhu, Y.-G. et al., 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), pp. 3435-3440.

Zurek, L. & Ghosh, A., 2014. Insects represent a link between food animal farms and the urban environment for antibiotic resistance traits. *Applied and environmental microbiology*, 80(12), pp. 3562-3567.