

## **VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS DIFERENTES FERRAMENTAS MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DA DISBIOSE INTESTINAL EM CÃES E GATOS**

**Resumo:** A microbiota intestinal desempenha importantes funções na saúde e na doença e, essa pode ser alterada através de fatores dietéticos e ambientais. Em condições de saúde, a relação entre o hospedeiro e os microrganismos está em equilíbrio, conhecido como eubiose, que é responsável pela saúde intestinal, crescimento de bactérias benéficas e prevenção do crescimento excessivo de bactérias potencialmente patogênicas. Quando esta condição é alterada, o animal desenvolve disbiose, que é responsável pelo desequilíbrio na composição e atividade bacteriana. O conhecimento das funções da microbiota intestinal tem apontado várias conexões que levam a associações com a saúde, doenças e seus sistemas. A disbiose intestinal está associada a diversas afecções como diarreia aguda, doença inflamatória intestinal, obesidade, entre outras. Porém, para a determinação da disbiose intestinal em cães e gatos não há consenso sobre uma avaliação padrão ouro. A maioria das pesquisas atuais utiliza diferentes ferramentas moleculares para determinar a proliferação bacteriana e, consequentemente, a disbiose intestinal. Diante disso, essa revisão abordou as três diferentes formas de calcular e identificar a disbiose em cães e gatos, suas vantagens e desvantagens. De maneira geral, as ferramentas moleculares utilizadas para determinar a proliferação bacteriana são adequadas, porém, cada qual com suas limitações. Essas podem limitar a determinação da disbiose quando os resultados não identificam bactérias específicas para esta análise. Portanto, é fundamental o conhecimento das técnicas e das bactérias a serem identificadas em cada situação.

**Palavras-chave:** Caninos, bactérias, desequilíbrio intestinal, felinos, técnicas.

## 1. Introdução

A microbiota intestinal desempenha papéis importantes na saúde, nas alterações metabólicas e na nutrição e, pode ser alterada através de fatores dietéticos (Perini et al., 2020; Rentas et al., 2020) e ambientais (Di Gioia & Biavati, 2017). Esta é composta por bactérias, vírus e organismos eucarióticos que habitam o trato gastrointestinal. As bactérias são os organismos de maior abundância e significância para a nutrição de cães e gatos devido às suas funções digestivas e absorptivas, como a fermentação das fibras (Pilla & Suchodolski, 2021). Em condições saudáveis, a relação entre o hospedeiro e os microrganismos desenvolve um equilíbrio homeostático de bactérias, denominado eubiose, que é responsável pela saúde intestinal, crescimento de bactérias benéficas e prevenção do excesso de bactérias potencialmente patogênicas. Quando esta condição é alterada, o animal é acometido pela disbiose, que é responsável pelo desequilíbrio na composição e atividade bacteriana presentes na microbiota, o que gera interação microbioma-hospedeiro nociva e instável. A disbiose apresenta três características específicas: redução da diversidade bacteriana, crescimento excessivo de patógenos e redução de bactérias benéficas (MONDO et al., 2019). Em cães, a proliferação das bactérias anaeróbicas facultativas da família *Enterobacteriaceae* determinam a disbiose (Pilla & Suchodolski, 2021). Já em gatos, a disbiose pode ser caracterizada pela redução de bactérias entéricas (Bugrov et al., 2022).

A expansão do conhecimento nas funções da microbiota intestinal revelou várias conexões que levam às associações com a saúde, doenças e seus sistemas. Porém, para determinarmos a disbiose intestinal em cães e gatos não há uma única avaliação padrão ouro. De maneira geral, a maioria das pesquisas atuais está focada na avaliação da microbiota bacteriana e os métodos estão em otimização para a caracterização das bactérias. A microbiota intestinal, por ser um ambiente dinâmico e complexo, a melhor abordagem diagnóstica seria a combinação de ferramentas moleculares que incluíssem a amplificação por PCR do gene 16S rRNA, seguido por análises de amplicons por sequenciamento de última geração (NGS), quantificação direta de taxa bacteriana por PCR quantitativa (qPCR) e o uso de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (Suchodolski, 2016). Porém, o método padrão ouro para a avaliação da microbiota intestinal é por meio do sequenciamento Illumina®. Ou seja, existem várias ferramentas moleculares e cada laboratório utiliza um método diferente. Diante disso, essa revisão abordou as três diferentes formas de calcular e identificar a disbiose em cães e gatos, suas vantagens e desvantagens.

## 2. Desenvolvimento

### 2.1 Disbiose em cães e gatos

A disbiose, em cães, pode ser caracterizada pelo aumento na abundância de bactérias anaeróbicas facultativas da família *Enterobacteriaceae* (Vazquez-Baeza et al., 2016) e pela redução de *Faecalibacterium*, *Fusobacterium* e *Clostridium hiranonis* (Pilla & Suchodolski, 2021). Esse desequilíbrio pode estar associado a várias afecções como diarreia (GUARD et al., 2015), doença inflamatória intestinal (DUBOC et al., 2013), insuficiência pancreática exócrina (BLAKE et al., 2019), obesidade (Kielar et al., 2017), disfunções neurológicas (Jeffery et al., 2017), entre outras. Porém, para cada alteração metabólica é necessário o conhecimento das famílias de bactérias que são moduladas pela doença, a fim de realizar um diagnóstico coerente e preciso. Sabe-se que cães com diarreia aguda apresentaram maiores populações do gênero *Clostridium* (53,8%) em comparação com cães saudáveis (16,0%) e, menores populações de *Bacteroidetes* (27,9%), *Faecalibacterium* (1,1%) e um gênero não identificado dentro da Ruminococcaceae (0,2%). Já em cães saudáveis, os gêneros mais expressivos foram *Prevotella spp.* (25,1%), *Blautia spp.* (25,2%), *Faecalibacterium spp.* (5,4%), *Eubacterium spp.* (3,8%) e as famílias Ruminococcaceae (0,3%), Lachnospiraceae (6,7%), Clostridia (0,9%) e Coprobacillaceae (2,6%) (GUARD et al., 2015).

Em gatos, há poucos estudos sobre a microbiota e seu desequilíbrio bacteriano. É de conhecimento que, dependendo do grau de disbiose, há mudança no equilíbrio entre os *pools* bacterianos gram-positivos e gram-negativos e na quantidade dessas bactérias. Além disso, um trabalho identificou os fatores etiológicos de acordo com o grau de disbiose (BUGROV et al., 2022). Neste estudo, os autores relataram que em gatos com grau 1 de disbiose intestinal, o fator etiológico era alimentar. Já no grau dois, a disbiose foi consequente a fármacos (43,7%), pós-operação (25,0%), invasão (18,8%) e alimentação (12,5%). Por fim, no grau 3, o fator etiológico era por medicamentos (93,3%). Todavia, os dados comprovaram a redução das bactérias entéricas, Estafilococos, Estreptococos, Pseudomonas, Citrobacteri e enterobactérias, bem como fungos do gênero *Candida*, em amostras fecais de gatos com disbiose intestinal. Não só a identificação do fator etiológico da disbiose, mas também o método de avaliação da disbiose influenciam no manejo dietético.

## 2.2 Métodos para cálculo de disbiose

Atualmente, existem algumas técnicas moleculares para a detecção da microbiota intestinal em cães e gatos como o PCR, sequenciamento por MiSeq Illumina e pirosequenciamento. Em cada uma dessas técnicas, podemos identificar e calcular a disbiose intestinal. Porém, hoje existem quatro métodos para calcular a disbiose e cada um deles com suas vantagens e desvantagens. O que não podemos realizar é a comparação da disbiose intestinal de humanos com animais de companhia devido às divergências na comunidade bacterianas de cada espécie (Vazquez-Baeza et al., 2016). O primeiro método, o qual não é muito utilizado devido a imprecisão na identificação da disbiose pela baixa sensibilidade e falsos negativos, é pela dosagem da cobalamina e folato. Segundo Kather et al. (2020), esse método pode sugerir disbiose intestinal, uma vez que as bactérias produzem ácido fólico e competem com o hospedeiro pela cobalamina ingerida via alimento.

O segundo e o terceiro métodos foram utilizados primeiramente em humanos e, após estudos, foram realizados em animais de companhia. A análise se baseia na avaliação da diversidade de bactérias dentro da amostra ( $\alpha$ -diversidade) e entre amostras ( $\beta$ -diversidade) e na identificação de taxas bacterianas específicas que podem atuar como biomarcadores para o processo biológico em questão. Em humanos com doença inflamatória intestinal (DII) foi identificada redução de *Faecalibacterium prausnitzii* e na relação *Firmicutes/Bacteroidetes*, o que indica a *Faecalibacterium prausnitzii* como biomarcador para essa alteração (Sokol et al. 2009). Esse índice de disbiose (ID) é definido como o logaritmo da relação entre a abundância total em organismos aumentados em uma determinada doença e a abundância total de organismos diminuída na doença (Gevers et al., 2014). As vantagens desse método é que não há a necessidade de ferramentas moleculares de elevado custo, mas, em contrapartida, é necessário conhecimento específico das bactérias que causam o desequilíbrio no processo biológico a ser estudado. Isso pode dificultar o avanço no possível tratamento dietético em doenças que ainda não possuem a identificação das bactérias na disbiose. Já o método conhecido como teste GA-map' utiliza 54 sondas de DNA nas regiões V3 a V7 para a medição de bactérias em vários níveis taxonômicos, a qual avalia de forma algorítmica a abundância e perfil bacteriano fecal. Isso permite o mapeamento do perfil da microbiota intestinal para um conjunto selecionado de bactérias, o qual é usado para identificar e caracterizar a disbiose em um ambiente clínico. Segundo Cansen et al. (2015), as sondas utilizadas nesse teste são extremamente seletivas e específicas, são usadas com um único algoritmo, a fim de facilitar a determinação do nível

de disbiose. Esse método fornece concordância na captura de bactérias, análise rápida e de elevado rendimento de um número grande de amostras fecais individuais. Todavia, os autores verificaram correlações fracas para as seguintes bactérias *Bacteroidetes fragilis*, *Ruminococcus albus/bromii* e *Streptococcus sanguinis/thermophilus*, possivelmente devido à falta de detecção seletiva de espécies pelo sequenciamento MiSeq Illumina.

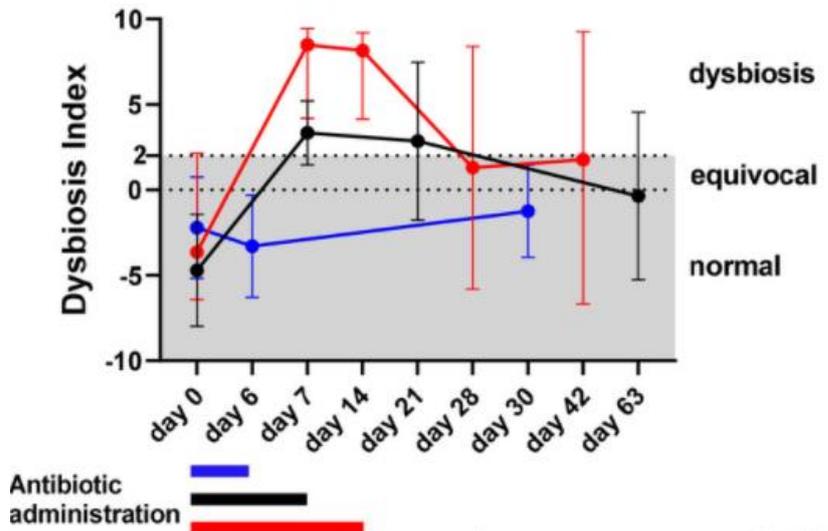
Por fim, o método mais atual é por meio do índice de disbiose (ID), definido como a diferença entre a distância euclidiana entre a amostra teste e o centróide da classe saudável e, distância euclidiana entre a amostra teste e o centróide da classe doente (AlShawaqfeh et al., 2017). O ID se correlaciona com os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA e apresenta correlação negativa com a riqueza das espécies bacterianas, ou seja, um ID mais alto indica menor diversidade microbiana (Suchodolski, 2021). Um único valor numérico é utilizado, que mede a proximidade no modelo matemático 12 à média de cada classe. O cálculo de ID em um teste molecular é definido como:

$$ID (z; \mu_{CD}, \mu_{CH}) = \|z - \mu_{CH}\|_2 - \|z - \mu_{CD}\|_2,$$

Onde  $\mu_{CD}$  e  $\mu_{CH}$  representam o centroide das amostras doentes e saudáveis no conjunto de treinamento, respectivamente. Índices negativos correspondem a normobiose; valores entre zero e dois são considerados inespecíficos e valores positivos maiores que dois são sugestivos de disbiose. Esse método alcançou cerca de 74,0% de sensibilidade e 95% de especificidade em um estudo com cães saudáveis e cães com enteropatias inflamatórias crônicas (AlShawaqfeh et al., 2017). Como vantagens, possui menor tempo de análise (cerca de 1 dia), maior precisão, demonstra melhor separação entre os grupos do que apenas os ensaios individuais. Porém, é uma análise realizada somente nos Estados Unidos e possui um elevado custo operacional.

A representação do ID está ilustrada na figura 1. Além desses métodos, os processos de cultivo às bactérias também podem alterar os resultados. Werner et al. (2020) verificaram que a cultura bacteriana tradicional, realizada em laboratórios de diagnóstico veterinário, subestimam o número de bactérias intestinais devido ao uso de métodos anaeróbicos limitados. Isso porque a maioria das bactérias intestinais são anaeróbios estritos, o que demanda uma combinação de ferramentas moleculares descritas anteriormente para esse cultivo específico.

**Figura 1.** Representação do ID.



Fonte: Suchodolski (2016).

Sem a precisão do tipo de cultura e método para calcular o índice de disbiose, haverá conflitos nos resultados e provavelmente o tratamento dietético e farmacológico da doença não serão efetivos. Portanto, é de suma importância o conhecimento das técnicas utilizadas para determinação da disbiose, além do conhecimento das bactérias que as causam.

### 3. Considerações finais

Existem várias técnicas moleculares para determinar a proliferação bacteriana intestinal e, conseqüentemente a disbiose. Mas para a obtenção de resultados precisos e sensíveis, deve-se conhecer os métodos e as bactérias que provocam esse desequilíbrio. A determinação da disbiose intestinal é fundamental no tratamento de diversas alterações, porém mais estudos são necessários para se determinar a melhor ferramenta molecular para sua identificação.

### 4. Referências

ALSHAWAQFEH, M. K.; WAJID, B.; MINAMOTO, Y.; MARKEL, M.; LIDBURY, J. A.; STEINER, J. M.; ... & SUCHODOLSKI, J. S. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS microbiology ecology*, v. 93, n. 11, 2017.

BLAKE, A. B.; GUARD, B. C.; HONNEFFER, J. B.; LIDBURY, J. A.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Altered microbiota, fecal lactate, and fecal bile acids in dogs with gastrointestinal disease. *PloS one*, v. 14, n. 10, 2019.

BUGROV, N.; RUDENKO, P.; LUTSAY, V.; GURINA, R.; ZHAROV, A.; KHAIROVA, N.; ... & POPOVA, I. Fecal Microbiota Analysis in Cats with Intestinal Dysbiosis of Varying Severity. *Pathogens*, v. 11, n. 2, p. 234, 2022.

CASEN, C.; VEBØ, H. C.; SEKELJA, M.; HEGGE, F. T.; KARLSSON, M. K.; CIEMNIEJEWSKA, E.; ... & RUDI, K. Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 42, n. 1, p. 71-83, 2015.

DI GIOIA, D.; BIAVATI, B. Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety: Conclusive Remarks and Future Perspectives. In: *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*, p. 269–273, 2017.

DUBOC, H.; RAJCA, S.; RAINTEAU, D.; BENAROUS, D.; MAUBERT, M.-A.; QUERVAIN, E.; et al. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut*. v. 62, n. 4, p. 531-9, 2013.

GERMAN, A. J.; DAY, M. J.; RUAUX, C. G.; STEINER, J. M.; WILLIAM, D. A.; HALL, E. J. Comparison of direct and indirect 7 tests for small intestinal bacterial overgrowth and antibioticresponsive diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.17, n.1, p.33-43, 2003

GEVERS, D.; KUGATHASAN, S.; DENSON, L. A.; VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; VAN TREUREN, W.; REN, B.; ... & XAVIER, R. J. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe*, v. 15, n. 3, p. 382-392, 2014.

GUARD, B. C.; BARR, J. W.; REDDIVARI, L.; KLEMASHEVICH, C.; JAYARAMAN, A.; STEINER, J. M.; VANAMALA, J.; SUCHODOLSKI, J. S. Characterization of

microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PLoS one*, v. 10, n. 5, p. e0127259, 2015.

JEFFERY, N. D.; BARKER, A. K.; ALCOTT, C. J.; LEVINE, J. M.; MEREN, I.; WENGERT, J.; ... & SUCHODOLSKI, J. S. The association of specific constituents of the fecal microbiota with immune-mediated brain disease in dogs. *PLoS One*, v. 12, n 1, e0170589, 2017.

KATHER, S., GRÜTZNER, N., KOOK, P. H., DENGLER, F., HEILMANN, R. M. Review of cobalamin status and disorders of cobalamin metabolism in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 34, n. 1, p. 13-28, 2020.

KIELER, I. N.; SHAMZIR KAMAL, S.; VITGER, A. D.; NIELSEN, D. S.; LAURIDSEN, C.; & BJORNVAD, C. R. Gut microbiota composition may relate to weight loss rate in obese pet dogs. *Veterinary medicine and science*, v. 3, n. 4, p. 252-262, 2017.

MONDO, E.; MARLIANI, G.; ACCORSI, P. A.; COCCHI, M.; LEONE, A. D. Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. *Open Veterinary Journal*, v. 9, n. 3, p.253-258, 2019.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. S. The gut microbiome of dogs and cats, and the influence of diet. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 51, n. 3, p. 605-621, 2021.

PERINI, M. P.; RENTAS, M. F.; PEDREIRA, R.; AMARAL, A. R.; ZAFALON, R. V.; RODRIGUES, R.; ... & BRUNETTO, M. A. Duration of prebiotic intake is a key-factor for diet-induced modulation of immunity and fecal fermentation products in dogs. *Microorganisms*, v. 8, n. 12, p. 1916, 2020.

RENTAS, M. F.; PEDREIRA, R. S.; PERINI, M. P.; RISOLIA, L. W.; ZAFALON, R. V. A.; ALVARENGA, I. C.; ... & BRUNETTO, M. A. Galactoligosaccharide and a prebiotic blend improve colonic health and immunity of adult dogs. *PLoS One*, v. 15, n. 8, e0238006, 2020.

SOKOL, H.; SEKSIK, P.; FURET, J. P.; FIRMESE, O.; NION-LARMURIER, I.; BEAUGERIE, L.; ... & DORÉ, J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases*, v. 15, n. 8, p. 1183-1189, 2009.

SUCHODOLSKI, J. S. Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 2021.

SUCHODOLSKI, J. S. Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *The Veterinary Journal*, v. 215, p. 30-37, 2016.

WENER, M.; SUCHODOLSKI, J. S.; LIDBURY, J.A .; STEINER J. M.; HARTMANN, K.; UNTERER, S.; Diagnosis value of fecal cultures in dogs with chronic diarrhea. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 35, n. 1, p. 199-208, 2020.

VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; HYDE, E. R.; SUCHODOLSKI, J. S.; KNIGHT, R. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nature Microbiology*, v. 1, n. 12, 2016.