

Nutrizione e funzione barriera intestinale nel coniglio da carne

R. Carabaño, J. García, N. Nicodemus, C. de Blas

Departamento de Producción Animal - Universidad Politécnica de Madrid

Corresponding author: Prof. Rosa Carabaño, Departamento de Producción Animal -
Universidad Politécnica de Madrid, Spain – Tel. +34 91 5492219 -
Fax: +34 91 5499763 - Email: rosa.carabano@upm.es

ABSTRACT: Nutrition and gut barrier function in meat rabbits. *The mechanisms of defence of the rabbit against gut pathogens (especially gut barrier function and competitive exclusion) and the nutritional strategies to improve its intestinal health are reviewed in the framework of epizootic rabbit enteropathy. The importance of mucosa integrity derives from the fact that either saprophyte or pathogenic bacteria need the interaction with the intestinal mucosa to exert their beneficial or pathogenic effects. The gut barrier function is exerted in a first step by the protective effect of the mucus layer. Its composition and interaction with the intestinal microbiota are discussed. Once the bacteria or toxins have passed through the mucus layer they enter in contact with the intestinal mucosa and the next defence mechanism is played by the gut associated lymphoid tissue. This mechanism is complex and closely related with the characteristics of the microbiota or other antigens in contact with the mucosa. The balance between saprophyte and pathogen bacteria in the gut is also a key factor for competitive exclusion mechanism. In rabbits just after weaning the gut barrier function is not completely developed so increasing the risk of digestive disorders. Therefore a special diet might be recommended for these animals. The effects of the type of diet on gut barrier characteristics (morphology of mucosa, functionality and immune response) have been summarised from recent results. These studies indicated that mortality increased both under and above 30% dietary neutral detergent fibre. The fibre quality was also important and the inclusion of moderate levels of soluble fibre (10-12%) improved gut barrier function and intestinal health. Similarly, the reduction of ileal flux of nitrogen, obtained by reducing the protein level or using more digestible protein sources, improved rabbit health.*

INTRODUZIONE

Al momento attuale, le malattie infettive del sistema digerente rappresentano circa il 70% del totale delle malattie che colpiscono il coniglio. Questa percentuale, da sempre elevata, è aumentata negli ultimi anni a seguito della comparsa dell'Enteropatia Epizootica del Coniglio (EEC). Nelle condizioni commerciali europee, la EEC può provocare fino al 60% di mortalità e un aumento della morbilità tale da ritardare la fase di ingrasso di 1-2 settimane. Fino a questo momento, il controllo della mortalità da EEC è stato realizzato mediante diffusi trattamenti antibiotici, determinando così un aumento dei costi veterinari (almeno 2-3 volte) e una riduzione del margine di profitto degli allevamenti. Insieme alla EEC sono ancora diffuse anche altre malattie digestive, causate per lo più da ceppi differenti di *Escherichia coli* e diverse specie di Clostridi.

Il divieto europeo relativo all'uso di antimicrobici a scopo auxinico e per la prevenzione di queste malattie ed il numero limitato di molecole autorizzate in coniglicoltura per il

loro trattamento hanno reso necessaria la ricerca di soluzioni alternative ai presidi sanitari che permettano di ridurre l'incidenza e la gravità dell'EEC.

Nel caso della Spagna, di fronte alla situazione critica venutasi a creare in seguito alla diffusione dell'EEC, verso la metà dell'anno 2000 le differenti componenti che rappresentano i diversi settori della cunicoltura - allevatori (CONACUN), macellatori, fabbricanti di gabbie e laboratori veterinari (INTERCUN), mangimisti e ricercatori (ASESCU) - si sono accordate per evidenziare all'Amministrazione Statale la necessità di finanziare un progetto di Ricerca e Sviluppo che potesse fare una qualche luce sulle cause della malattia. In questo progetto, coordinato dal Dr Ignacio Badiola, è stato utilizzato un approccio multi-disciplinare per lo studio dell'eziologia della malattia e dei fattori che possono in qualche modo controllarne o ridurne gli effetti negativi.

Tra questi ultimi fattori, la nutrizione è sempre stata considerata come prioritaria per l'elevata importanza che le si attribuisce in qualunque processo intestinale e l'incidenza delle patologie digestive. In realtà, quando si analizzano i dati di diversi esperimenti di nutrizione, la mortalità attribuibile a EEC in conigli alimentati con lo stesso mangime può variare dallo 0 al 70% a seconda del periodo dell'anno, dell'allevamento, etc. e, naturalmente, in funzione della presenza o meno di medicazione. Su questa base, l'alimentazione non sembra essere il fattore determinante nell'apparizione delle alterazioni digestive, mentre è necessaria la compresenza di altri fattori scatenanti.

I MECCANISMI DI DIFESA E L'EFFETTO BARRIERA

Il principale fattore responsabile delle malattie enteriche è dunque la presenza dell'organismo patogeno. Tuttavia, anche in sua presenza, fattori come la popolazione microbica saprofitica, normalmente presente nel tratto digestivo, e i meccanismi di difesa dell'animale possono impedire o ridurre lo sviluppo del patogeno e la comparsa della malattia. Si capisce, dunque, perché in situazioni sperimentali in cui si provocano infezioni controllate con ceppi molto virulenti, non tutti gli animali muoiono, mentre un'elevata percentuale di animali sopravvive, pur presentando i sintomi della malattia (morbilità).

Tali meccanismi di difesa non sono esclusivi del coniglio e, così come in altre specie (suini ed avicoli) compresa quella umana, ci si è posti l'obiettivo di sviluppare strategie alimentari che favoriscano i processi di "esclusione competitiva" tra i batteri e lo sviluppo di meccanismi di "barriera intestinale".

I processi di **esclusione competitiva** per i quali una specie non patogena può predominare sopra una patogena sono complessi. Secondo Hampson e coll. (2001), questa competizione può essere ottenuta in diverse maniere:

- differenze di accrescimento su un substrato specifico;
- differenze nell'efficacia di colonizzazione della mucosa;
- produzione di sostanze che inibiscono lo sviluppo dei patogeni (acidi grassi a corta catena, acido solfidrico, sali biliari deconiugati e batteriostatici).

In questo ambito, il ruolo dell'alimentazione si concentrerebbe nella regolazione della quantità di substrato che può favorire la crescita di un determinato microrganismo che, a sua volta, possa favorire qualunque meccanismo di esclusione competitiva o che

inibisce direttamente la crescita dei patogeni. A questo scopo, per lo sviluppo di efficaci strategie alimentari, è necessario:

- a) conoscere il flusso di nutrienti nelle aree di maggiore popolazione microbica (tratto terminale dell'intestino tenue e intestino cieco);
- b) caratterizzare la popolazione microbica saprofitica o utile e quella patogena;
- c) precisare i meccanismi di esclusione competitiva in atto fra le popolazioni patogene e non patogene.

Una volta che il patogeno si è impiantato, è la **barriera intestinale** che gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo dei meccanismi di patogenicità dei batteri, impedendo la colonizzazione della mucosa e il passaggio (traslocazione) dei batteri e delle tossine attraverso di essa. I meccanismi per i quali si esercita questa azione sono molteplici e si sviluppano a cascata in modo tale da attivarsi l'uno in successione all'altro.

Come schematizzato nella Figura 1, l'effetto barriera si esercita già a livello del lume intestinale mediante meccanismi di acidificazione e protezione dell'epitelio grazie a un rivestimento di muco secreto dalle cellule mucipare (cellule Goblet). Il muco protegge l'epitelio da danni meccanici, chimici o enzimatici e dall'adesione dei batteri. Una volta che questa protezione viene persa e i batteri o le tossine giungono a contatto con la mucosa, viene attivato il sistema immunitario associato alla mucosa, inizialmente in modo aspecifico e successivamente specifico. L'attivazione aspecifica si realizza ai primi contatti con l'antigene e determina processi infiammatori transitori; successivamente vengono sintetizzate immunoglobuline specifiche contro l'antigene suddetto che normalmente danno luogo a una tolleranza dell'organismo ospite nei confronti dell'antigene o, più raramente, a una iperreattività contro lo stesso (allergia). Il mantenimento della struttura e della funzionalità della mucosa intestinale, oltre che impedire la colonizzazione da parte di batteri patogeni, assicura le funzioni del tratto digestivo, quali digestione, assorbimento, secrezione e metabolismo dei nutrienti. Questo spiega perché le malattie enteriche sono più frequenti nei giovani animali, la cui mucosa è ancora immatura, e nel periodo post-svezzamento, dato che lo svezzamento può produrre danni strutturali a livello della mucosa intestinale.

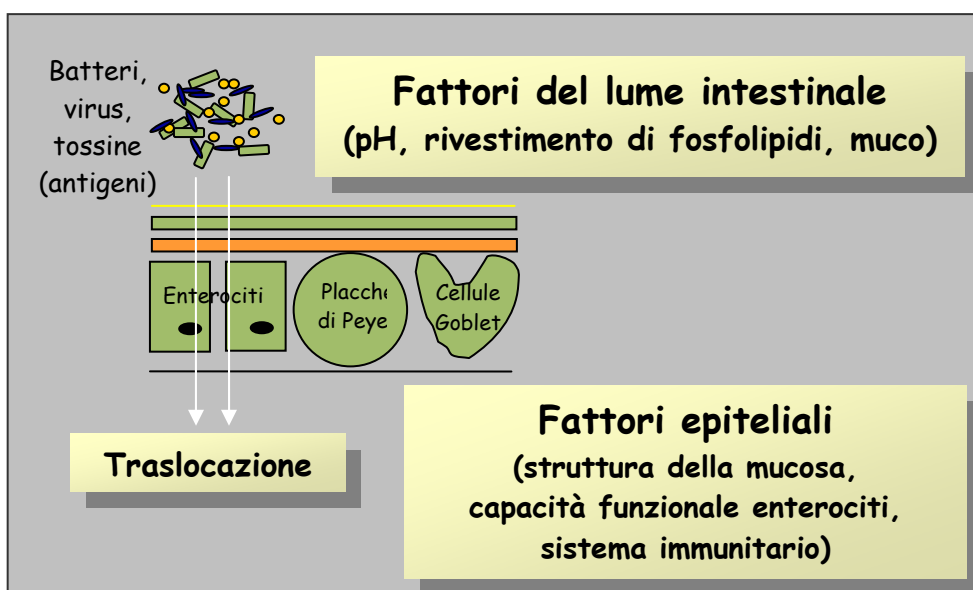


Figura 1. Meccanismi di barriera intestinale che impediscono la traslocazione dei batteri e delle tossine.

Le strategie da sviluppare dal punto di vista dell'alimentazione sono indirizzate a evitare danni alla struttura della mucosa e a favorire i meccanismi di riparazione di tali danni mediante la somministrazione dei nutrienti necessari. Adeguate caratteristiche di barriera della mucosa non solo migliorano la risposta immunitaria, ma anche l'efficienza di digestione e assorbimento, diminuendo i flussi di nutrienti al cieco che possono favorire la crescita di patogeni.

Le strategie di cui sopra non sono facili da mettere a punto, in quanto esistono numerose e complesse interazioni tra i fattori coinvolti nel determinismo delle malattie digestive, ma, con l'avanzare delle conoscenze, tali strategie si rivelano via via più utili nel controllo di tali patologie.

Fatte queste premesse, la presente relazione intende illustrare i risultati sperimentali ottenuti nel coniglio fino a questo momento, soprattutto in relazione alla funzione della barriera intestinale e allo sviluppo dell'enteropatia epizootica, piuttosto che esporre in maniera esaustiva le conoscenze sul ruolo dell'alimentazione sui temi di cui sopra (al momento più sviluppate nella specie umana e in altri monogastrici).

La mucosa intestinale e la popolazione microbica intestinale

L'interazione della mucosa con i microrganismi intestinali sembra essere chiave sia per lo sviluppo dei meccanismi di difesa che per la colonizzazione e traslocazione di batteri e tossine. I principali patogeni dell'apparato gastrointestinale hanno bisogno del contatto con la mucosa per svolgere la loro attività patogena. Numerosi studi dimostrano la necessità dell'aderenza alla mucosa dei ceppi virulenti di *E. coli* per esercitare il loro effetto patogeno. Altri batteri patogeni appartenenti al genere *Clostridium* normalmente non sono aderenti, ma esercitano la propria virulenza mediante la formazione di tossine (*C. spiroforme*, *perfringens*, *difficile*, *sporogenus*, etc). La morte del coniglio per EEC sembra essere determinata da una tossina (ancora non classificata) di un ceppo di *C. perfringens* che produce danni a livello di fegato e reni (Peréz de Rozas e coll., 2005). Tuttavia, affinché queste tossine raggiungano gli organi recettori e svolgano la loro funzione tossica devono oltrepassare anch'esse la mucosa. L'adesione delle tossine di *C. perfringens* alla membrana, così come un danno iniziale alla stessa, sembra necessaria per la loro traslocazione (Mc Clane, 2001).

Allo stesso modo, i batteri saprofiti (Bacteroides, Lattobacilli, Salmonelle saprofite), che svolgono una funzione di esclusione competitiva nella specie umana e in altri monogastrici, sembrano possedere meccanismi di avvicinamento alla mucosa e di riconoscimento della stessa (Toll-like receptors, TLR) che permettono di modulare la risposta immunitaria verso la loro tolleranza nel tratto gastrointestinale (Kelly e coll., 2005).

Il rivestimento di muco

Affinché si verifichi il contatto del patogeno o delle sue tossine con la mucosa è necessario superare le prime barriere intestinali che si incontrano nel lume. Come sopra ricordato, l'epitelio della mucosa è protetto da un rivestimento mucoso. Le mucine sono glicconiugati costituiti da un'unità centrale di proteina unita a catene di zuccheri di lunghezza variabile. Le catene terminali di questi zuccheri possono essere legate con un

gruppo solforato (solfomucine) o con acido sialico (sialomucine), originando così mucine acide che sono più resistenti alla degradazione microbica rispetto a quelle neutre che non possiedono queste terminazioni (Van Dijk e coll., 2002). Nel coniglio, le mucine dell'intestino tenue e del colon sono state purificate separatamente, riscontrando così che le mucine del colon sono meno acide e meno resistenti alla proteolisi (Mantle e Thakore, 1988). La quantità e la composizione di queste mucine dipendono dalla presenza di batteri. Nelle prime fasi di un'infezione, si produce un aumento della produzione di muco e un cambio della sua composizione, con un passaggio da mucine neutre a mucine acide. Nel coniglio, l'infezione controllata con *Yersinia enterocolica* produce un aumento della produzione di mucine, soprattutto nella zona terminale dell'ileo e nel colon prossimale, dove questa malattia enterica è più severa (Mantle e coll., 1989). Tuttavia, variazioni nella composizione e degradazione di queste mucine possono modificare l'adesione dei batteri alla mucosa (Mantle e Husar, 1994). Allo stesso modo, nei primi momenti di infezione con *E. coli* O103 si verifica un aumento della produzione di muco, anche se sembra che la proliferazione di questi batteri e la formazione dei piedistalli di ancoraggio preliminari all'adesione alla mucosa si producano proprio in questo rivestimento di muco (Hezcko e coll., 2000).

Anche i batteri saprofiti hanno la capacità di regolare la sintesi, la composizione e l'utilizzazione delle mucine, ma i loro meccanismi di azione sono meno studiati rispetto a quelli dei microrganismi patogeni. Il genere *Bacteroides*, il maggior componente della popolazione microbica della specie umana e dei conigli, sembra avere una capacità mucinolitica (Hill, 1986, Marounek e coll., 2000, Sirotek e coll., 2003). Nella specie umana, anche il *B. thetaiotaomicron* presenta una certa capacità mucinolitica, che potrebbe permettere un migliore contatto dei batteri saprofiti con la mucosa ed essere correlata all'effetto immuno-soppressivo di questo batterio (Kelly e coll., 2005). Nel coniglio, è stato inoltre segnalato che batteri appartenenti al genere *Bacteriodes* potrebbero agire come probiotici nel caso di infezione da EEC (Pérez de Rozas e coll., 2005).

Oltre al muco, nel lume intestinale si forma una pellicola biologica di immunoglobuline A (IgA) prodotte dal sistema immunitario della mucosa e di peptidi antimicrobici prodotti nelle cripte da cellule specifiche, note come cellule di Paneth (Kelly e coll., 2005). La IgA permette la sopravvivenza dei batteri saprofiti mentre limita l'accrescimento dei batteri patogeni. Al contrario, i peptidi con azione antimicrobica limitano la crescita tanto dei patogeni che della popolazione batterica saprofita. Nella specie umana, la densità delle cellule di Paneth diminuisce dai primi tratti dell'apparato digerente fino al colon, spiegando così la maggiore densità microbica nell'ileo e nell'intestino crasso. L'esclusione competitiva svolta da *B. thetaiotaomicron* potrebbe essere messa in relazione con l'induzione alla produzione di un peptide specifico contro i batteri patogeni da parte delle cellule di Paneth.

Il sistema immunitario associato alla mucosa

Una volta superate le barriere del lume, i batteri si pongono a contatto della mucosa intestinale mediante recettori di membrana. Questi recettori sono quelli che scatenano il segnale rivolto al sistema immunitario situato nella mucosa intestinale. Il sistema immunitario associato alla mucosa, costituito da tessuto linfoide (*Gut associated lymphoid tissue*, GALT), è responsabile della protezione della mucosa nei confronti dei patogeni e regola la risposta infiammatoria. Il sistema immunitario intestinale è

particolarmente complicato in quanto non solo è responsabile della difesa nei confronti di agenti infettivi, ma deve anche essere capace di distinguere gli antigeni della dieta e la flora saprofita dell'intestino e sviluppare un efficace meccanismo di tolleranza nei confronti di questi per evitare l'insorgenza di allergie a certi alimenti e fattori infiammatori. La risposta di tolleranza è prioritaria rispetto a quella di difesa ed è quella che assicura la sopravvivenza dell'animale.

Il tessuto linfoide dell'intestino si distribuisce in due forme distinte:

- forma organizzata: in follicoli linfoidi, distribuiti nelle cosiddette placche del Peyer, l'appendice ciecale e il *sacculus rotundus*;
- forma diffusa: sia nella lamina propria (linfociti della lamina propria) che nelle cellule epiteliali della mucosa intestinale (linfociti intraepiteliali).

Il tessuto linfoide organizzato contiene numerosi follicoli che sono i centri principali nei quali si avvia la risposta immunitaria intestinale. Gli antigeni sono trasportati a questi follicoli mediante alcune cellule specializzate (cellule M) e sono presentati ai linfociti situati nei centri germinali dei follicoli linfoidi dalle stesse cellule M e da altre cellule specializzate dette cellule dendritiche. Dopo la maturazione e la proliferazione dei linfociti specifici nei confronti di un antigene particolare, questi migrano principalmente verso la mucosa intestinale per svolgere la loro attività.

La lamina propria (LP) è il sito di maggiore produzione di anticorpi di tutta la mucosa. Nell'uomo, circa l'80% dei linfociti B attivati (plasmacellule, incaricate di sintetizzare le immunoglobuline) sono presenti nella LP. L'immunoglobulina più importante sintetizzata nell'intestino è la IgA, la cui funzione principale è quella di mantenere l'integrità della mucosa rispetto a possibili infezioni e agenti tossici. Altra immunoglobulina importante a livello intestinale è la IgE, che viene solitamente sintetizzata in situazioni di reazioni allergiche. Nella LP sono presenti anche linfociti T, prevalentemente con attività ausiliaria (T helper, Th).

I linfociti intraepiteliali sono la prima linea di difesa nei confronti di infezioni della mucosa e sono costituiti per la maggior parte da linfociti ad attività citotossica (linfociti Tc).

La risposta immunitaria della mucosa intestinale può essere così schematizzata. In seguito al riconoscimento di un antigene, macrofagi e cellule dendritiche si incaricano di modificare determinate componenti proteiche dello stesso e trasportarle ai linfociti T helper (Th o CD4+). I linfociti Th si occupano della modulazione della risposta, secernendo citochine (proteine solubili) che attiveranno la risposta umorale (complesso di citochine Th2) o una risposta cellulare (complesso di citochine Th1). La risposta umorale, mediata dal complesso di citochine Th2, attiva i linfociti B trasformandoli in plasmacellule secernenti le immunoglobuline (IgA, IgM, IgG) contro antigeni specifici, le quali porteranno ad una risposta di tolleranza. La risposta cellulare, mediata dal complesso di citochine Th1, dà luogo invece all'attivazione dei linfociti T citotossici (Tc o CD8+) e alla morte della cellula che porta l'antigene. Inoltre, i linfociti citotossici possono essere attivati direttamente attraverso cellule della mucosa (enterociti) mediante il complesso di immuno-isto-compatibilità di classe I (MHC-I). Questa risposta è possibile quando si producono danni o aggressioni alla mucosa che facilitano la penetrazione della stessa da parte di batteri, virus o tossine.

L'equilibrio della risposta di tolleranza (risposta umorale, Th2) o aggressività (risposta cellulare, Th1) del sistema immunitario non è stato completamente studiato, ma sembra che i batteri saprofiti, soprattutto alcuni generi, possano influenzare la risposta immunitaria della mucosa verso l'attivazione della via Th2 (Kelly e coll., 2005).

Lo sviluppo del sistema immunitario

Secondo Knight e Crane (1994), lo sviluppo del sistema immunitario, ed in particolare delle cellule B, nel coniglio può essere diviso in tre momenti. Il primo stadio, fetale e neonatale, consiste in una linfopoiesi che creerà il corredo linfocitario neonatale e si svolge principalmente nel fegato e nel midollo osseo. La seconda fase consiste nella creazione di un repertorio primario di anticorpi tra la 3^a e 8^a settimana di vita dell'animale, mediante la proliferazione e diversificazione dei linfociti del GALT. L'ultima tappa corrisponde alla formazione di un secondo corredo di anticorpi nell'età adulta degli animali, che riguarderebbe principalmente la proliferazione di cellule B in organi linfoidei secondari. Il corredo che si crea nel feto dipende da fattori genetici e dall'interazione con il sistema immunitario materno. Diversamente, lo sviluppo del corredo primario dipende fondamentalmente dalla popolazione microbica intestinale.

Vari autori hanno osservato uno sviluppo anormale del GALT e una riduzione del numero di linfociti in animali allevati in assenza di batteri (Stepánkova e Kovaru, 1978; Tlaskalova e Stepánkova, 1980). Una simile variazione dello sviluppo è stata osservata anche nei suini: in animali di 45 giorni liberi da patogeni è stato riscontrato lo stesso sviluppo del sistema immunitario che in animali di 5 giorni, concludendo che per un normale sviluppo del GALT è necessaria non solo la presenza di antigeni presenti negli alimenti, ma anche uno stimolo della flora batterica (Rothkötter e coll., (1994). Diverse revisioni bibliografiche riferite sia al coniglio (Knight e Windstead, 1997, Lanning e coll., 2000) che all'uomo (Kelly e coll., 2005) hanno indicato che la presenza della flora saprofitica, e probabilmente di alcuni generi in particolare, può essere cruciale per lo sviluppo del corredo primario di anticorpi.

L'insediamento della flora intestinale nel coniglio si realizza già durante la lattazione, ma solo con il consumo di mangime inizia a svilupparsi l'attività fermentativa. In accordo con Lebas e Laplace (1972), il peso del contenuto ciecale (espresso in rapporto al peso vivo dell'animale) si duplica fra la terza e la quinta settimana di vita e tale proporzione elevata si mantiene fino alla settima settimana. Giusto nello stesso periodo, tra la terza e la sesta settimana di vita, l'area follicolare nell'appendice ciecale aumenta, mantenendo poi la stessa proporzione fino all'età adulta (Dasso e coll., 2000). Anche la zona proliferativa dei follicoli raggiunge il suo massimo sviluppo alle 6 settimane di vita. Simili risultati sono stati ottenuti anche presso il nostro Dipartimento per lo sviluppo dell'appendice ciecale e delle placche del Peyer. Le variazioni del sistema immunitario in questa fase interessano non solo i centri di proliferazione dei linfociti, ma anche la distribuzione che questi hanno nella lamina propria e pertanto la capacità e la diversità di risposta.

Come rappresentato graficamente, tra i 19 e i 26 giorni di età si realizza sia un aumento della proporzione dei linfociti totali rispetto al numero di cellule della LP (Figura 2) che un aumento della percentuale dei linfociti B rispetto ai linfociti T (Figura 3) (Campín e coll., 2003).

Non essendo ancora disponibili studi con animali di età maggiore, non si conosce la reale capacità di risposta dei giovani animali. Differenti indicatori immunitari suggeriscono che il sistema immunitario non corrisponde ancora a quello di un animale adulto e, pertanto, il coniglio in fase di svezzamento risulterebbe più sensibile all'aggressione di patogeni.

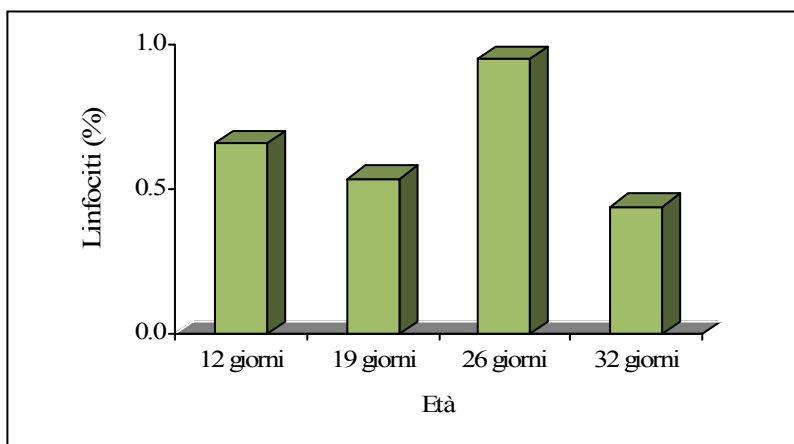


Figura 2. Evoluzione con l'età della proporzione (%) di linfociti rispetto alle cellule totali nella lamina propria (LP) del digiuno in conigli allattanti.

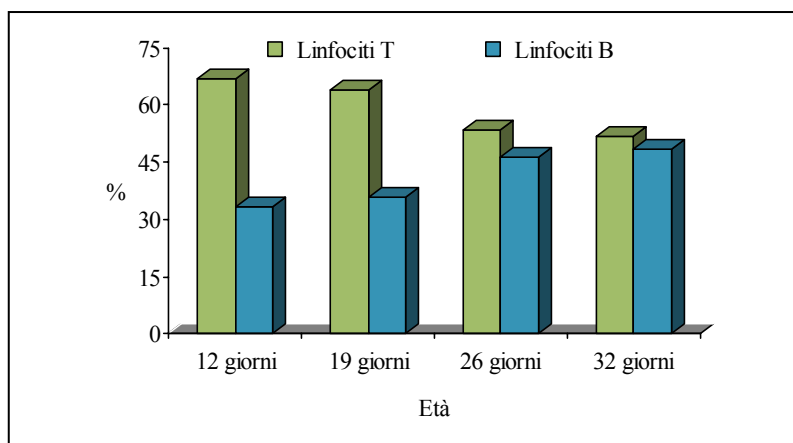


Figura 3. Evoluzione con l'età della proporzione di linfociti T e B rispetto al totale dei linfociti nella lamina propria del digiuno in conigli allattanti.

Conseguenze dello svezzamento

In questa situazione di immaturità immunitaria, lo svezzamento comporta variazioni sostanziali che possono cambiare la capacità di risposta dell'animale. Lo svezzamento presuppone una situazione stressante per il coniglio a causa della separazione dalla madre e, in molti casi, del cambiamento di gabbia e di gruppo sociale. Inoltre, nello stesso periodo, si realizza un passaggio da alimentazione mista (latte e mangime) al solo mangime, che lascia supporre una diminuzione dell'ingestione di immunoglobuline del latte e un ridotto consumo di alcuni nutrienti (Gallois e coll., 2005) che può risultare insufficiente alla copertura dei fabbisogni dell'animale, sia per la crescita che per lo sviluppo dell'intestino e delle sue capacità digestive e immunitarie. D'altra parte, sono anche state osservate alcune situazioni nelle quali lo svezzamento sembra accelerare la maturazione di queste capacità.

A livello dell'intestino tenue, il cambio di alimentazione produce un peggioramento delle caratteristiche della barriera intestinale. Gutiérrez e coll. (2002) hanno osservato un'atrofia intestinale accompagnata da una riduzione dell'attività degli enzimi legati alla mucosa intestinale, indicando non solo un cambio nella struttura della mucosa, ma

anche nella sua funzionalità e tale da facilitare la traslocazione dei batteri. Inoltre, come conseguenza sulla somministrazione di nutrienti, la digeribilità peggiora in questi conigli rispetto agli animali adulti. L'arrivo all'ileo terminale di una maggiore quantità di substrato indigerito può anche cambiare la composizione della microflora batterica, con conseguenze diverse a seconda che si favorisca o meno la flora patogena.

Al contrario di quanto succede per l'intestino tenue, lo sviluppo dell'intestino crasso sembra essere favorito da uno svezzamento precoce (Xiccato e coll., 2001; Gutiérrez e coll., 2002; Gallois e coll., 2005) e, pertanto, potrebbe prodursi una maggiore colonizzazione batterica in grado di favorire lo sviluppo e la diversificazione del sistema immunitario.

Quando è stato studiato l'effetto dello svezzamento sullo sviluppo del tessuto follicolare dell'appendice ciecale e delle placche del Peyer (Carabaño e coll., dati non pubblicati) non sono state osservate variazioni nel numero dei follicoli, mentre è aumentato il loro sviluppo nell'appendice ciecale (Tabella 1). A livello della lamina propria è stato osservato un aumento dei linfociti senza variazioni nel loro profilo, se non per una maggiore proporzione di cellule T indifferenziate che rispondevano alla doppia marcatura CD4+/CD8+ nei conigli svezzati. Sulla base di questi risultati, sembrerebbe che lo svezzamento sia in grado di accelerare la maturazione del sistema immunitario, che tuttavia si presenta ancora immaturo nelle prime fasi post-svezzamento.

Tabella 1. Effetto dello svezzamento (a 25 d) sugli organi linfoidi e i linfociti della lamina propria in conigli a 32 giorni di età (Campin e coll., 2003)

	Conigli ancora allattanti a 32 d	Conigli svezzati con dieta a base di f.e. soia	Conigli svezzati con dieta a base di f.e. girasole	Prob.
<i>Appendice ciecale</i>				
follicoli (n)	32,3	34,4	33,4	NS
area follicolare (mm ²)	3,00 ^b	3,98 ^a	3,92 ^a	0,05
<i>Placche di Peyer</i>				
follicoli (n)	7,32	7,46	6,86	NS
area follicolare (mm ²)	3,62	3,91	3,41	NS
<i>Lamina propria</i>				
linfociti tot. (% cellule)	0.44 ^b	0.94 ^a	1.18 ^a	0.05
linfociti CD8+ (% linf.)	21,5	24,7	28,5	NS
linfociti CD4+ (% linf.)	19,9	14,0	18,9	NS
linfociti CD8+/CD4+ (% linf.)	4,6 ^b	13,0 ^a	12,1 ^a	0,05

NS: non significativo

EFFETTO DELLA DIETA SULLA BARRIERA INTESTINALE

Da quanto sopra riportato si deduce che i meccanismi che permettono ad un animale di sopravvivere in presenza di un'infezione sono molto complessi. Pertanto, formulare diete che tengano conto di tutti i processi simultaneamente implicati non è semplice. Inoltre, sono disponibili pochissimi studi sull'effetto dell'alimentazione sui meccanismi di barriera intestinale e i riflessi sulla flora saprofito o utile e quella patogena, non ancora compiutamente identificata nel caso della EEC.

In questo contesto, nell'ambito del progetto spagnolo prima descritto, è stato deciso di realizzare uno studio per valutare l'effetto della dieta su tutti i fattori coinvolti, scegliendo quei criteri di studio che erano stati più utili per caratterizzare la barriera intestinale e studiare la popolazione microbica. Per la caratterizzazione della barriera intestinale, i migliori risultati in altre specie erano stati ottenuti con lo studio della morfologia della mucosa, dell'attività degli enzimi legati alla mucosa (in quanto indicatori di funzionalità e maturazione) e, a completamento delle informazioni precedenti, con lo studio del profilo linfocitario della lamina propria (come indicatore della risposta immunitaria nell'animale). Per quanto riguarda lo studio della popolazione microbica, sono state utilizzate tecniche molecolari in grado di dare informazioni sulla microflora coltivabile (solo un 30% della totale) e su quella non coltivabile mediante metodi classici.

Per quanto riguarda l'alimentazione durante e dopo lo svezzamento, di fronte alle poche e contraddittorie informazioni esistenti (de Blas e coll., 1999a), si è cercato di minimizzare lo stress prodotto dal cambio di alimentazione dal latte al mangime solido cercando di riprodurre quello che consuma un coniglio al momento dello svezzamento. In accordo con le informazioni bibliografiche (de Blas e coll., 1999a), i conigli a 25 giorni di età consumano una miscela di latte e mangime solido corrispondente all'ingestione di una dieta altamente digeribile, ricca in grasso e proteina e con un contenuto di fibra inferiore rispetto ai mangimi commerciali che normalmente si somministrano ai coniglietti al momento dello svezzamento. Pur tenendo conto delle limitate capacità di digerire alcuni componenti della dieta (soprattutto lipidi e amido), si è deciso di cambiare poco il mangime da accrescimento rispetto agli standard correnti in modo che la dieta fosse anche pratica.

I fattori alimentari che hanno evidenziato una maggior relazione con la comparsa di disturbi digestivi sono il livello e il tipo di fibra (de Blas e coll., 1999b; Gidenne, 2000) e il livello di proteina (Carabaño e coll., 2002).

Ruolo della fibra alimentare

Il ruolo positivo che si è finora attribuito alla fibra nei confronti della prevenzione delle malattie digestive è stato basato prevalentemente sul controllo della microflora intestinale grazie ai suoi effetti sul transito intestinale e all'utilizzazione come substrato di crescita per i batteri. I risultati ottenuti con le fonti di fibra abituali (erba medica, paglia, crusca) hanno evidenziato che una riduzione del contenuto di NDF dal 36 al 30% riduce la mortalità (Figura 5) e migliora le prestazioni produttive (Gutiérrez e coll., 2002) senza produrre variazioni nella struttura della mucosa. Tuttavia, riduzioni dell'NDF fino al 25% finiscono col favorire la comparsa di problemi dovuti a enteropatia epizootica a causa di variazioni della popolazione microbica e aumenti della ritenzione ciecale del materiale digerito (Nicodemus e coll., 2004). Se ne deduce che un livello di fibra elevato in mangimi da svezzamento può superare la capacità fermentativa del cieco, ancora limitata a questa età, e favorire la crescita di patogeni.

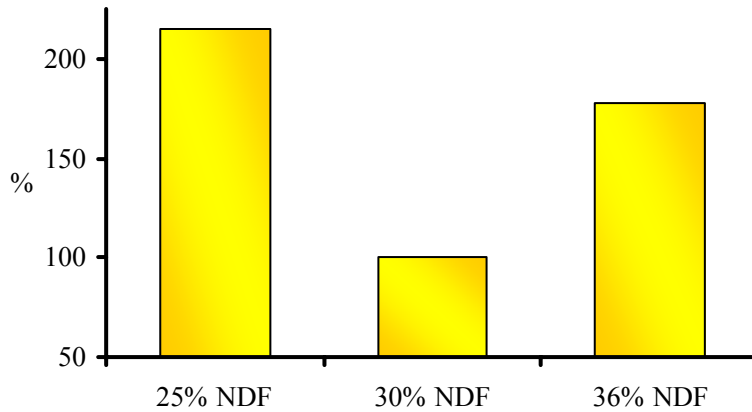


Figura 5. Effetto del livello di NDF in mangimi da svezzamento sulla mortalità (dieta 30% NDF=100) (media di due esperimenti: Gutiérrez e coll., 2002; Nicodemus e coll., 2004)

Secondo i risultati di Marounek e coll. (1995), la popolazione microbica normale nel cieco di un coniglio di 28 giorni di età è limitata rispetto ad un animale adulto ed è in grado di fermentare soprattutto carboidrati come pectine ed emicellulose. Pertanto, se l'intenzione è quella di sviluppare una flora utile per migliorare l'esclusione competitiva, il tipo di fibra alimentare può essere molto importante. Il tipo di fibra può anche modificare la struttura della mucosa e modificare la barriera intestinale. L'inclusione nella dieta di fibre solubili (pectine) ha favorito la crescita dei villi intestinali e l'attività degli enterociti, mentre l'inclusione di fibre lignificate ha prodotto un'atrofia strutturale e una minore attività delle cellule intestinali (Chiou e coll., 1994, García e coll., 1997). I risultati ottenuti con diete da svezzamento hanno evidenziato che il livello di fibra solubile può giocare un ruolo importante nella riduzione della comparsa di EEC (Tabella 2).

Tabella 2. Effetto del livello di fibra solubile in diete isofibrose (30% NDF) su stato della barriera intestinale, flora patogena e mortalità in conigli svezzati a 25 giorni (Gomez-Conde e coll., 2004 e 2005)

	Polpe di bietola (12% fibra solubile)	Erba medica (10% fibra solubile)	Glume di avena (8% fibra solubile)	Prob.
<i>Barriera intestinale</i>				
Digiuno				
lunghezza villi (μm)	721 ^a	567 ^b	492 ^c	0,05
profondità cripte (μm)	89 ^b	115 ^a	113 ^a	0,05
saccarasi (U/mg tessuto)	8500 ^a	7100 ^b	5400 ^c	0,05
<i>Lamina propria</i>				
linfociti CD4+ (% linfociti)	35	33	26	NS
linfociti CD8+ (% linfociti)	21 ^b	27 ^b	31 ^a	0,05
<i>C. perfringens</i> (% positivi)	8 ^b	6 ^b	19 ^a	0,05
Mortalità 25-60 d (%)	5,3 ^b	8,5 ^{ab}	14,4 ^a	0,05

NS: non significativo

L'aumento del livello di fibra solubile (con inclusione del 15% di polpe secche di bietola) migliora la struttura della mucosa, la sua funzionalità e la risposta immunitaria, osservandosi una riduzione della comparsa di *C. perfringens* nel cieco e di patogeni opportunisti come *Campilobacter* sia nell'ileo che nel cieco. Tutto questo comporta una riduzione della mortalità dovuta a EEC con livelli di fibra solubile nel mangime pari al 10-12%.

Dai risultati di cui sopra, si deduce che, così come accade in altre specie con patologie causate da *C. perfringens*, la barriera intestinale può svolgere un ruolo fondamentale nella prevenzione dell'EEC. Mantenere l'integrità della mucosa è, pertanto, un obiettivo prioritario.

Nella pratica queste osservazioni sono molto importanti, in quanto le diete tendono ad avere basse quantità di fibra solubile allo scopo di coprire gli elevati livelli raccomandati di lignina. In Spagna, è molto frequente l'inclusione nella dieta di bucce di girasole o glume di avena, paglia o vinaccioli a discapito delle fonti di fibra più fermentabili. In situazioni nella quali l'erba medica è di scarsa qualità, la situazione può anche aggravarsi.

Ruolo della proteina alimentare

I livelli raccomandati di proteina sono elevati nelle prime fasi di crescita per tutti gli animali, non solo per coprire i fabbisogni di accrescimento (Trocino e coll., 2000) ma anche per quelli di rinnovamento e mantenimento della mucosa intestinale. L'accrescimento intestinale è massimo dalla nascita fino ai 35 giorni di età (Lebas e Laplace, 1972). Nei suini, si stima che l'80% dei fabbisogni di proteina per il mantenimento sia da ascrivere al mantenimento della funzionalità della mucosa digestiva.

Lo svezzamento può inoltre cambiare non solo i fabbisogni proteici totali, ma anche quelli di amminoacidi. A causa del minore accrescimento dei coniglietti nei primi giorni dopo lo svezzamento, la maggiore importanza dei fabbisogni di mantenimento può determinare un aumento dei fabbisogni in amminoacidi essenziali e non essenziali rispetto ai fabbisogni di accrescimento. Inoltre, i meccanismi di difesa della barriera intestinale possono avere uno specifico fabbisogno in amminoacidi. Infatti, la treonina è un componente maggioritario delle proteine della mucina e il glutammato, principale amminoacido utilizzato dagli enterociti come fonte energetica, è essenziale nei meccanismi di riparazione della mucosa (Le Floch e Seve, 2000; Reeds, 2000).

Il cambio di alimentazione allo svezzamento comporta non solo una variazione nel livello di proteina del mangime, ma anche nella fonte proteica utilizzata. Le proteine del latte, facilmente digeribili, sono sostituite dalle proteine vegetali, meno facilmente digerite e in molti casi caratterizzate dalla presenza di fattori antinutrizionali che possono danneggiare la mucosa intestinale e aumentare il flusso di azoto verso il cieco. Nel caso dei conigli, è stato osservato che la sostituzione di proteine vegetali con proteine plasmatiche migliora l'integrità della mucosa durante lo svezzamento (Gutiérrez e coll., 2000). A causa del divieto dell'inclusione di farine di origine animale nelle diete per animali, le uniche alternative possibili per l'inclusione in mangimi da svezzamento restano tuttavia le proteine di origine vegetale.

Le fonti di proteina vegetale incluse nelle diete post-svezzamento hanno evidenziato un certo effetto sulla mortalità da EEC (Gutiérrez e coll., 2003). In diete con lo stesso contenuto di proteina grezza (18%) e digeribilità fecale, un aumento della digeribilità ileale ha determinato una riduzione nel flusso ileale di proteina e contemporaneamente della mortalità. L'aumento del flusso ileale di proteina è stato ottenuto con diete contenenti farina di soia 48% (Figura 6). Tuttavia, al contrario di quello che accade nei lattinzoli, non sono state osservate variazioni della struttura della mucosa e della composizione di linfociti a livello della lamina propria (vedi Tabella 1).

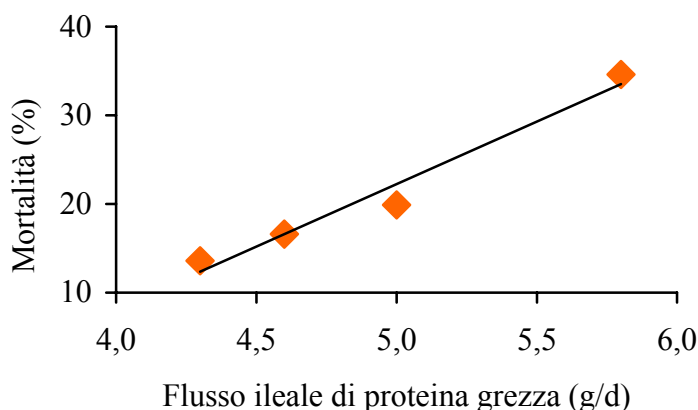


Figura 6. Effetto del flusso ileale di proteina sulla mortalità (%) nel periodo di ingrasso (Gutiérrez e coll., 2003).

L'importanza della riduzione del flusso di proteina nell'ileo (mediante l'utilizzazione di fonti più digeribili o abbassando il livello di proteina) sulla mortalità è stata confermata in diversi esperimenti (García e coll., 2004; Chamorro e coll., 2005). Così come nello studio sopra riportato, non sono stati descritti effetti significativi della dieta sulle condizioni della mucosa intestinale, nonostante l'aumentata presenza di *C. perfringens*. L'elevato apporto di aminoacidi essenziali e di proteina digeribile, assicurato in tutti gli esperimenti sopra descritti, potrebbe spiegare l'assenza di un effetto evidente sulla mucosa intestinale. Tuttavia, è necessario acquisire maggiori informazioni sui fabbisogni di aminoacidi per lo sviluppo dei meccanismi di difesa della barriera intestinale.

PROSPETTIVE

Come già indicato nell'introduzione, è molto difficile sviluppare strategie nutrizionali in grado di migliorare l'efficienza del sistema immunitario del digerente e ridurre l'incidenza e le perdite delle patologie digestive, in quanto esistono numerose interazioni tra tutti i fattori implicati. A man mano che si acquisiscono nuove conoscenze, tuttavia, si osserva che tali strategie possono rappresentare un utile mezzo per il controllo delle malattie digestive.

Oltre che la fibra e la proteina, altri nutrienti, come acidi grassi essenziali, vitamine e minerali possono essere necessari per lo sviluppo del sistema immunitario e della barriera intestinale. E' auspicabile pertanto che ricercatori e nutrizionisti rivolgano maggiore attenzione a questo tema in modo da aumentare le conoscenze di base e ottenere risultati operativi sempre maggiori e ripetibili, e rendere l'alimentazione un

valido supporto e, possibilmente, un'alternativa all'utilizzazione a scopo preventivo degli antibiotici in coniglicoltura.

BIBLIOGRAFIA

- Campin**, J., Eiras, P., Rebollar, P.G., Carabaño, R., 2003. Estudio del tejido linfoide asociado a intestino en gazapos en torno al destete. ITEA 24:660-662. **Carabaño**, R., García, J., De Blas, C., 2002. Nitrogen digestion and digestive disorders at weaning. A review. pp 42-45. In Proc. Joint Scientific Meeting WG1 (Reproduction) and WG4 (Nutrition) – COST Action 848 & ECVAN, Ispra (Varese), Italy. **Chamorro**, S., Gómez-Conde, M.S., Pérez de Rozas, A.M., Badiola, I., Carabaño, R., De Blas, C., 2005. Efecto del nivel y tipo de proteína en piensos de gazapos sobre los parámetros productivos y la salud intestinal. pp. 135-142 in Proc. XXX Symposium de Cunicultura de ASESCU, Valladolid, Spain. **Chiou**, P.W.S., Yu, B., Lin, C., 1994. Effects of different components of dietary fibre on intestinal morphology of domestic rabbits. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 108:629-638. **Dasso**, J.F., Obiakor, H., Bach, H., Anderson, A.O., Mage, R.G., 2000. A morphological and immunohistological study of the human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. *Devlop. Comp. Immunol.* 24:797-814. **De Blas**, J.C., Gutiérrez, I., Carabaño, R., 1999a. Destete precoz en gazapos. Situación actual y perspectivas. In: XV Curso de Especialización FEDNA. Barcelona, pp. 67-81. <http://www.etsia.upm.es/fedna/publi.htm>. **De Blas**, C., García, J., Carabaño, R., 1999 b. Role of fibre in rabbit diets. A review. *Ann. Zootech.* 48:3-13. **Gallois**, M., Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., Le Huerou-Luron, I., Lalles, J.P., 2005. An early stimulation of solid feed intake slightly influences the morphological gut maturation in the rabbit. *Repr. Nutr. Dev.* 45:109-122. **García**, A.I., García, J., de Blas, C., Piquer, J., Carabaño, R., 1997. Efecto de la fuente de fibra sobre la actividad enzimática de la amilasa pancreática y las sacarosas en yeyuno e íleon. ITEA 18(1): 190-192. **García**, J., García, A.I., García-Rebollar, P., de Blas, C., Carabaño, R. 2004. Effects of source of protein and enzyme supplementation on performance of fattening rabbits. pp 427-432 in Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, México. **Gidenne**, T., 2000. Recent advances in rabbit nutrition: emphasis on fibre requirements. A review. *World Rabbit Sci.* 8:23-32. **Gómez-Conde**, M.S., Chamorro, S., Nicodemus, N., de Blas, C., García, J., Carabaño, R., 2004. Efecto del tipo de fibra en la alimentación de gazapos destetados precozmente. pp. 157-162 in Proc. XXIX Simposium de Cunicultura, Lugo. Spain. **Gómez-Conde**, M.S., Chamorro, S., Rebollar, P.G., Eiras, P., García, J., Carabaño, R., 2005. Efecto del tipo de fibra sobre el tejido linfoide asociado a intestino en animales de 35 días de edad. ITEA 26: 415-419. **Gutiérrez**, I., Cachaldora, P., Carabaño, R., de Blas, C., 2000. Effect of supplementation with animal plasma and antibiotics on jejunal morphology of early weaned rabbits. *World Rabbit Sci.* 8(Suppl 1, C): 263-268. **Gutiérrez**, I., Espinosa, A., García, J., Carabaño, R., De Blas, J.C., 2002. Effect of levels of starch, fiber and lactose on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. *J. Anim. Sci.* 80: 1029-1037. **Gutiérrez**, I., Espinosa, A., García, J., Carabaño, R., De Blas, C., 2003.: Effect of source of protein on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. *Anim. Research* 52: 461-472. **Hampson**, D.J., Pluske, J.R., Pethick, D.W., 2001. In: J.E. Lindberg and B. Ogle (eds.) *Digestive physiology of pigs*. CABI Publishing, pp 247-260. **Hezcko**, U., Abe, A., Finlay, B.B., 2000. In vivo interactions of rabbit enteropathogenic Escherichia coli O103 with host: an electron microscopic and histopathologic study. *Microbes and Infection* 2: 5-16. **Hill**, R.R.H., 1986. Digestion of mucin polysaccharides in vitro by

bacteria isolated from the rabbit cecum. *Curr. Microbiol.* 14: 117-120. **Kelly, D.**, Conway, S., Aminov, R., 2005. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends in immunology* (in press). **Knight K.L.**, Crane, M.A., 1994. Generating the antibody repertoire in rabbit. *Adv. Immunol.* 56: 179-218. **Knight, K.L.**, Winstead, C.R., 1997. Generation of antibody in rabbits. *Current Opinion. Immunology* 9: 228-232. **Lanning, D.**, Sethupathi, P., Rhee, K.J., Zhai, S.K., Knight, K.L., 2000. Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire. *J. Immunol.* 165: 2012-9. **Lebas, F.**, Laplace, J.P., 1972. Mensurations viscérales chez le lapin. I. Croissance du foie, des reins et des divers segments intestinaux entre 3 et 11 semaines d'âge. *Ann. Zootech.* 21: 337-347. **Le Floc'h, N.**, Séve, B., 2000. Le devenir des protéines et des acides aminés dans l'intestin du porc : de la digestion à l'apparition dans la veine porte. *Prod. Anim.* 13: 303-314. **Mantle, M.**, Thakore, E., 1988. Rabbit intestinal and colonic mucins: isolation, partial characterization and measurement of secretion using an enzyme-linked immunoassay. *Biochem. Cell Biol.* 66: 1045-1054. **Mantle, M.**, Basaraba, L., Peacock, S.C., Gall, D.G., 1989. Binding *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus and mucin. *Infection and Immunity* 57: 3292-3299. **Mantle, M.**, Husar, S.D., 1994. Binding *Yersinia enterocolitica* to purified, native small intestinal mucins from rabbits and human involves interactions with the mucin carbohydrate moiety. *Infection and Immunity* 62: 1219-1227. **Marounek, M.**, Skrivanova, V., Duskova, D., 2000. In vitro caecal fermentation of nitrogenous substrates in rabbits. *J. Agric. Sci. Camb.* 135: 437-442. **Mc Clane, B.**, 2001. The complex interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin on epithelial tight junctions. *Toxicon.* 39: 1781- 1791. **Nicodemus, N.**, Pérez-Alba, L., Carabaño, R., de Blas, C., Badiola, I., Pérez de Rozas, A., García, J., 2004. Effect of level of fibre and level of ground of fibre sources on digestion and ileal and caecal characterization of microbiota of early weaned rabbits. pp 928-929 in *Proc. 8th World Rabbit Congress*, Puebla, Mexico. **Peréz de Rozas, A.M.**, Carabaño, R., García, J., Rosell, J., Díaz, J.V., Barbé, J., Pascual, J.J., Badiola, I., 2005. Etiopatogenia de la Enteropatía Epizoótica del Conejo. pp 167-174 in *Proc. XXX Symposium de Cunicultura*. Valladolid, Spain. **Reeds, P.J.**, 2000. Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J. Nutr.* 130: 1835S-1840S. **Rothkötter, H.J.**, Kirshoff, T., Pabst, R., 1994. Lymphoid and nonlymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs. *Gut.* 35: 1582-1589. **Sirotek, K.**, Santos, E., Benda, V., Morounek, M., 2003. Isolation, identification and characterization of rabbit mucinolytic bacteria. *Acta Vet. Brno.* 72: 365-370. **Stepankova, R.**, Kovaru, F., 1978. Development of lymphatic tissues in germfree and conventionally reared rabbits. In: P. Malek, V. Bartos, H. Weissleder and M.H. Witte (eds.) *Lymphology*. G. Thieme Publ. pp 290-294. **Tlaskalova-Hogenova, H.**, Stepankova, R., 1980. Development of antibody formation in germfree and conventionally reared rabbits: the role of intestinal lymphoid tissue in antibody formation to *E. Coli* antigens. *Folia Biol.* 26: 81-93. **Trocino, A.**, Xiccato, G., Queaque, P.I., Sartori, A., 2000. Feeding plans at different protein levels: Effects on growth performance, meat quality and nitrogen excretion in rabbits. *World Rabbit Sci.* 8(Supl. 1 C): 467-474. **Van Dijk, J.E.**, Huisman, J., Koninkx, J.F.K.G., 2002. Structural and functional aspects of healthy gastrointestinal tract. In: Black M.C. et al. (eds.) *Nutrition and health of the gastrointestinal tract*. Wageningen Academic Publisher, pp 71-96. **Xiccato, G.**, Trocino, A., Sartori, A., Queaque, P.I., 2001. Influence de l'âge du sevrage précoce et de l'aliment sur le développement des organes digestifs et des fermentations caecales chez le lapin. pp 199-202 in *Proc. 9^{èmes} J. Rech. Cunicole*, Paris, France.