

## **Progetto – immunofenotipizzazione della sepsi negli animali da compagnia**

La sepsi è una sindrome caratterizzata da una risposta sregolata dell'ospite ad un'infezione associata a disfunzione d'organo che mette a rischio la vita del paziente. Nonostante il riconoscimento precoce ed un trattamento appropriato contribuiscano a migliorarne la prognosi, la sepsi rappresenta una delle principali cause di morte tra i pazienti non cardiaci umani ricoverati in terapia intensiva. In medicina veterinaria non esistono stime accurate sulla prevalenza della sepsi nel cane, ma i tassi di mortalità riportati in letteratura sono compresi tra il 20% e il 68%. Il punto chiave nella complicata gestione della sepsi deriva dalla presentazione clinica eterogenea, influenzata non solo dal tipo di infezione, ma anche dalla immunocompetenza e dalla natura dinamica della risposta immunitaria dell'ospite. Nella patogenesi della sepsi risulta infatti centrale la complessa interazione tra il sistema immunitario e il microorganismo patogeno. In corso di sepsi, questa risposta è spesso sbilanciata, portando a eccessiva infiammazione e danno tissutale. Tra le tipologie cellulari implicate nello sviluppo di una risposta infiammatoria sbilanciata, i neutrofili svolgono un ruolo primario e contribuiscono allo stato di "iperinfiammazione" attraverso il rilascio di proteasi, specie reattive dell'ossigeno, e i cosiddetti *neutrophil extracellular traps* (NETs). I NETs si compongono di filamenti di cromatina, la maggior parte dei quali sono organizzati in nucleosomi attraverso il supporto di proteine istoniche o istoni; in aggiunta, si trovano all'interno di queste maglie, DNA extracellulare (cell-free DNA o cfDNA), le proteine dei granuli dei neutrofili stessi, come la mieloperossidasi e l'elastasi neutrofilica. I NETs contribuiscono ai meccanismi di difesa antibatterica mediante intrappolamento e successiva eliminazione dei batteri. Tuttavia, come molti componenti dell'immunità innata, i NET agiscono come arma a doppio taglio nelle infezioni. Una NETosi eccessiva durante la sepsi può essere controproducente, favorendo una condizione di immunotrombosi che esita in insufficienza multiorganica. La valutazione di biomarker di NETosi nell'inquadramento del paziente settico è supportata da numerosi studi in modelli animali e nell'uomo. Una possibile applicazione di biomarker di NETosi in corso di sepsi è documentata anche nel cane da alcuni studi che hanno registrato un significativo incremento della concentrazione plasmatica di cfDNA e di nucleosomi associato ad un loro valore predittivo in termini di sopravvivenza. Nell'ambito di un approccio personalizzato al trattamento del paziente settico, sarebbe importante valutare il bilancio tra un intervento volto a mitigare l'eccessiva risposta infiammatoria e un trattamento volto a stimolare il sistema immunitario in corso di immunodepressione. La variazione di questo equilibrio è cruciale nelle diverse fasi della sepsi ed è influenzata da altre variabili oltre l'infezione come età, competenza immunitaria e comorbidità. L'immunofenotipizzazione del paziente è pertanto cruciale nello sviluppo di un approccio terapeutico su misura, considerando sia la fase della malattia che i fattori individuali del paziente. La citometria a flusso, essendo in grado di rilevare e monitorare più marcatori a livello cellulare, è una tecnica efficace per valutare l'eterogeneità cellulare e ottenere un'immunofenotipizzazione del paziente con la finalità di comprendere il ruolo delle cellule immunitarie innate e adattative in corso di sepsi. La letteratura veterinaria inerente alla valutazione della risposta immunitaria nel cane in condizioni critiche è limitata ad alcuni studi su popolazioni eterogenee di cani ricoverati in terapia intensiva, parvovirosi canina e sepsi, i cui risultati sono preliminari, ma supportano un ulteriore approfondimento in questo campo. In questo contesto, un ruolo importante è svolto dal microbioma intestinale che garantisce l'omeostasi e la difesa dell'ospite contro l'invasione di agenti patogeni. Numerosi studi osservazionali hanno mostrato disbiosi intestinale come causa o effetto della sepsi, associata ad aumentata permeabilità della barriera intestinale e traslocazione dei patogeni verso organi distanti con conseguente diminuzione dell'efficacia della difesa dell'ospite contro l'infezione. Il microbioma intestinale del paziente settico è caratterizzato da una diminuzione della diversità, una minore abbondanza relativa di

*Firmicutes* e *Bacteroidetes* con un numero ridotto di commensali come *Faecalibacterium*, *Blautia* e *Ruminococcus* spp., e una crescita eccessiva di agenti patogeni opportunistici come *Enterobacter*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*.

### **Obiettivi del progetto**

Il progetto si pone come obiettivo principale la valutazione con finalità diagnostiche e prognostiche dei seguenti parametri nel cane con sepsi ricoverato in terapia intensiva:

- 1) Biomarker di NETosi (cfDNA, nucleosomi);
- 2) Immunofenotipizzazione tramite citofluorimetria di differenti sottotipi leucocitari con i seguenti anticorpi: CD45 FITC, CD5 ficoeritrina (PE), CD21 Alexa Fluor 647, CD3 FITC, CD4 Alexa Fluor 64, CD8 PE, CD11b PeCy5, MHCII FITC, CD14 PE;
- 3) Isolamento e fenotipizzazione dei microrganismi patogeni coinvolti;
- 4) Indici di disbiosi intestinale

L'incarico di ricerca prevede pertanto lo svolgimento di attività assistenziale presso la terapia intensiva dell'ospedale veterinario universitario per l'inclusione della casistica relativa al progetto.

### **Bibliografia**

1. Santacroce E, D'Angerio M, Ciobanu AL, et al. Advances and Challenges in Sepsis Management: Modern Tools and Future Directions. *Cells*. 2024 Mar 2;13(5):439. doi: 10.3390/cells13050439.
2. Haak BW, Wiersinga WJ. The role of the gut microbiota in sepsis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017 Feb;2(2):135-143. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30119-4. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28403983.
3. Letendre JA, Goggs R. Determining prognosis in canine sepsis by bedside measurement of cell-free DNA and nucleosomes. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2018 Nov;28(6):503-511. doi: 10.1111/vec.12773. Epub 2018 Oct 9.
4. Hoffman D, Amorim J, DeClue A. Immune Function in Critically Ill Dogs. *J Vet Intern Med*. 2018 Jan;32(1):208-216. doi: 10.1111/jvim.14857. Epub 2017 Nov 13.
5. du Preez K, Rautenbach Y, Hooijberg EH, et al. Oxidative burst and phagocytic activity of phagocytes in canine parvoviral enteritis. *J Vet Diagn Invest*. 2021 Sep;33(5):884-893. doi: 10.1177/10406387211025513. Epub 2021 Jun 19.
6. Vecchiato CG, Golinelli S, Pinna C, et al. Fecal microbiota and inflammatory and antioxidant status of obese and lean dogs, and the effect of caloric restriction. *Front Microbiol*. 2023 Jan 12;13:1050474. doi: 10.3389/fmicb.2022.1050474.
7. Cocca G, Piva S, Magno SD, Scarpellini R, et al. Prevalence and Patterns of Antimicrobial Resistance among *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp. in a Veterinary University Hospital. *Vet Sci*. 2021 Dec 6;8(12):308. doi: 10.3390/vetsci8120308.