

LO SVEZZAMENTO TARDIVO È ASSOCIATO AD UNA MAGGIORE DIVERSITÀ MICROBICA ED UNA ABBONDANZA DI *FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII* NEL MICROBIOTA FECALE DEI SUINETTI

LATE WEANING IS ASSOCIATED WITH INCREASED MICROBIAL DIVERSITY AND FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII ABUNDANCE IN THE FECAL MICROBIOTA OF PIGLETS

MASSACCI F.R.^{1,2,3}, BERRI M.⁴, LEMONNIER G.¹, GUETTIER E.⁵, BLANC F.¹,
JARDET D.¹, ROSSIGNOL M.N.¹, MERCAT M.J.⁶, DORÉ J.^{7,8}, LEPAGE P.⁷,
ROGEL-GAILLARD C.¹, ESTELLÉ J.¹

¹GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

²Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati', Perugia, Italy

⁴ISP, INRA, Université Tours, Nouzilly, France

⁵UE PAO, INRA, Nouzilly, France

⁶IFIP-Institut du porc and Alliance R&D, Le Rheu, France

⁷MICALIS, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

⁸MetaGenoPolis, INRA, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

Parole chiave: suinetto, microbiota intestinale, età allo svezzamento

Keywords: piglet, gut microbiota, weaning age

RIASSUNTO

Lo svezzamento rappresenta un momento cruciale nell'allevamento suinicolo ed è caratterizzato da stress nutrizionale, ambientale e sociale. In questa fase, la fisiologia intestinale dei suineti deve adattarsi ai cambiamenti alimentari. I suineti svezzati tardivamente mostrano migliori condizioni di salute, peso e tassi di mortalità ridotti. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'impatto dell'età allo svezzamento sulla diversità e sulla composizione del microbiota fecale dei suineti. Quarantotto suineti sono stati divisi in 4 gruppi, svezzati a diverse età: 14, 21, 28 e 42 giorni (svezzamento tardivo). La composizione del microbiota è stata valutata il giorno dello svezzamento, 7 giorni post-svezzamento e a 60 giorni di età, sequenziando il gene del 16S rRNA. I risultati mostrano differenze nella composizione del microbiota fecale prima e dopo lo svezzamento, confermando come questo modifichi drasticamente il microbiota intestinale. La diversità α e la ricchezza della microflora intestinale sono risultate maggiori nei suineti svezzati a 42 giorni sia il giorno dello svezzamento che 7 giorni dopo. Inoltre, l'abbondanza delle unità tassonomiche operative (OTU) riferibili a *Faecalibacterium prausnitzii* era maggiore nel gruppo svezzato a 42 giorni di età. In conclusione, lo svezzamento tardivo aumenta la diversità del microbiota intestinale e l'abbondanza di *F. prausnitzii*, già riconosciuto positivo per l'uomo, indicando come questa pratica sia favorevole per la salute intestinale dei suineti. La composizione della flora intestinale descritta nei suineti svezzati tardivi potrebbe indirizzare allo sviluppo di probiotici di nuova generazione per mitigare lo stress nella fase di svezzamento.

ABSTRACT

In pig production systems, weaning is a crucial period characterized by nutritional, environmental, and social stresses. In this process, piglets' gut physiology has to adapt from

a milk-based diet to a solid and more complex plant-based feed. It is known that piglets weaned later display improved health, better wean-to-finish growth performance, and lower mortality rates. The aim of this study was to evaluate the impact of weaning age on fecal microbiota diversity and composition in piglets. Forty-eight Large White piglets were divided into 4 groups of 12 animals that were weaned at different ages: 14 days, 21 days, 28 days and 42 days (late weaning). Microbiota composition was assessed by sequencing the 16S rRNA gene using fecal samples taken on the day of weaning, 7 days later, and at 60 days of age. In each group, there were significant differences in fecal microbiota composition before and after weaning, confirming that weaning can drastically change the gut microbiota. Microbiota diversity was positively correlated with weaning age: microbial α diversity and richness were higher in piglets weaned at 42 days of age both on the day of weaning and 7 days later. The abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* operational taxonomic units (OTUs) was also higher in piglets weaned at 42 days of age. Overall, these results show that late weaning increased gut microbiota diversity and the abundance of *F. prausnitzii*, a microorganism with positive effects in humans. Piglets might thus derive a competitive advantage from later weaning because they have more time to accumulate a higher diversity of potentially beneficial microbes prior to the stressful weaning period.

INTRODUZIONE

Lo svezzamento rappresenta un momento cruciale nell'allevamento suinicolo ed è caratterizzato da stress nutrizionale, ambientale e sociale (Colson *et al.*, 2012; Lallés *et al.*, 2007) e da un'anoressia transitoria post-svezzamento con conseguente perdita di peso (Lallés *et al.*, 2007). In questa fase, i suinetti presentano un rischio maggiore di insorgenza di diarrea in quanto la microflora intestinale deve adattarsi ai cambiamenti alimentari legati al passaggio da una dieta lattea ad un alimento solido a base di cereali e più complesso e all'elevata pressione microbica ambientale (Gresse *et al.*, 2017; Lallés *et al.*, 2007) disturbed absorptive–secretory electrolyte balance and altered local inflammatory cytokine patterns after weaning. These responses appear to operate according to two distinct temporal patterns, an acute response followed by a long-lasting adaptation response. Pigs coexist with a diverse and dense commensal microbiota in their gastrointestinal tract. Most of these microbes are beneficial, providing necessary nutrients or protection against harmful pathogens for the host. The microbial colonisation of the porcine intestine begins at birth and follows a rapid succession during the neonatal and weaning period. Following the withdrawal of sow's milk the young piglets are highly susceptible to enteric diseases partly as a result of the altered balance between developing beneficial microbiota and the establishment of intestinal bacterial pathogens. The intestinal immune system of the newborn piglet is poorly developed at birth and undergoes a rapid period of expansion and specialisation that is not achieved before early (commercial).

Il microbiota intestinale suino si compone di una vasta e diversificata popolazione di batteri che svolgono un ruolo significativo nella salute del suino stesso. Nei suini, come negli altri mammiferi, l'impianto del microbiota inizia alla nascita (Thompson *et al.*, 2008) diet and the developmental changes of the host. Denaturing gradient gel electrophoresis was used to follow the individual community dynamics of 24 piglets over the period of 3-36 days after birth. The community of piglets older than 31 days was inferred to show high stability relative to the first 28 days post birth. The stable day 36 community showed significant correlation between cohabiting piglets, but not between siblings. This cohabitation effect was not observable in 1- or 2-week-old piglets but was strongest at either 3 or 4 weeks post birth. The onset of this change after 2 weeks is predicted to be after the development of key induction elements of the immune system and before significant levels of piglet sIgA were observable (4 weeks). Dalla nascita allo svezzamento e al periodo post-svezzamento, il microbiota intestinale risulta dinamico e subisce importanti cambiamenti di composizione in

base all'età, all'esposizione ad agenti patogeni, all'ambiente e alla dieta (Mach *et al.*, 2015) the composition and dynamics of faecal microbiomes were studied for 31 healthy piglets across five age strata (days 14, 36, 48, 60 and 70 after birth). In letteratura è riportato che lo svezzamento di suini allevati in condizioni naturali si verifica tra le 11-12 settimane (Bøe, 1991) e le 17 settimane di età (Jensen and Recén, 1989). Al contrario, nell'allevamento intensivo, lo svezzamento si verifica tra la terza e la quarta settimana di età. Gli studi che hanno confrontato età diverse allo svezzamento hanno dimostrato come ritardare l'età dello svezzamento possa migliorare le condizioni di salute, contrastare la perdita di peso e ridurre i tassi di mortalità dei suinetti (Davis *et al.*, 2006). Tuttavia, sono stati condotti pochi studi su come l'età allo svezzamento influenzi il microbiota intestinale del suinetto. Lo scopo del presente lavoro è stato, dunque, quello di caratterizzare le dinamiche del microbiota intestinale in suinetti *antibiotic-free* svezzati a differenti età e di descrivere le differenze del microbiota fecale tra lo svezzamento precoce e quello tardivo.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Nel nostro studio, abbiamo utilizzato 48 suinetti (23 femmine e 25 maschi) allevati presso l'allevamento sperimentale dell'INRA a Nouzilly (Francia). I suinetti sono stati randomizzati ed assegnati a quattro gruppi svezzati a età diverse: 14 giorni (W14), 21 giorni (W21), 28 giorni (W28) e 42 giorni (W42). Nessuno dei suinetti è stato trattato con antibiotici durante lo studio. I maiali erano privi di agenti patogeni principali e di *E. coli* Enterotossigeno, la cui presenza/assenza è stata testata mediante PCR (Casey and Bosworth, 2009) su campioni fecali. I campioni fecali sono stati collezionati da ampolla rettale il giorno dello svezzamento, 7 giorni post-svezzamento e a 60 giorni di età. Tutti i campioni fecali sono stati congelati direttamente in azoto liquido e poi conservati a -80° C fino al momento dell'analisi.

Estrazione del DNA fecale, sequenziamento del gene 16S rRNA ed elaborazione dei dati bioinformatici

Una versione modificata del protocollo sviluppato da Godon *et al.* (Godon *et al.*, 1997) è stato usato per l'estrazione del DNA (Massacci *et al.*, 2020). Il profilo microbico è stato ottenuto sequenziando le regioni ipervariabili V3-V4 del gene 16S rRNA, utilizzando lo strumento MiSeq Illumina e seguendo le specifiche del protocollo Illumina, avvalendosi dei seguenti primer: PCR1F_343 (5'-CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGGAGGCAGCAG-3') e PCR1R_784 (5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT-3').

Le *reads* generate nel formato FastQ, sono state valutate qualitativamente con il FastQC software e successivamente analizzate utilizzando la pipeline Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) v1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010), seguendo la strategia di *open-reference sub-sampled OTU calling* utilizzando GreenGenes (Rideout *et al.*, 2014) e creando le *Operational Taxonomic Units* (OTUs) con un grado di similarità del 97%. Le OTU con un numero inferiore allo 0,005% del numero totale di sequenze sono state rimosse dal dataset (Bokulich *et al.*, 2012). Le sequenze chimeriche sono state rimosse usando la pipeline QIIME. Tutti i campioni con meno di 10000 reads sono stati eliminati dalla successiva analisi statistica.

Analisi biostatistiche

L'elaborazione è stata effettuata tramite programma R (v. 3.5.1) (TeamCore, 2018). Per l'analisi del microbiota fecale, la tabella delle OTU è stata importata in R con il pacchetto Phyloseq (v. 1.24.2) (McMurdie and Holmes, 2013) genetics, phylogenetics, multivariate statistics, visualization and testing. With the increased breadth of experimental designs now being pursued, project-specific statistical analyses are often needed, and these analyses are often difficult (or impossible). Utilizzando il pacchetto Vegan v. 2.5-2 (Oksanen, 2015) le

diversità α , β e la richness della composizione della microbiota sono state calcolate a livello di OTU. La diversità α è stata calcolata utilizzando l'indice di Shannon, mentre per la diversità β è stato impiegato l'indice di Whittaker. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata calcolata, insieme al Tukey Honest Significant Differences per la α e diversità β dei gruppi sperimentali. La distanza Bray-Curtis è stata utilizzata per l'analisi del Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS), utilizzando il pacchetto Vegan. Inoltre le ipotesi nulle di nessuna differenza all'interno dei gruppi sono state testate tramite la funzione "envfit" e la funzione "adonis" per l'analisi multivariata, usando per entrambi i test la distanza di Bray-Curtis. L'analisi differenziale è stata effettuata a livello di OTU utilizzando il pacchetto metagenomeSeq (Paulson *et al.*, 2013).

RISULTATI

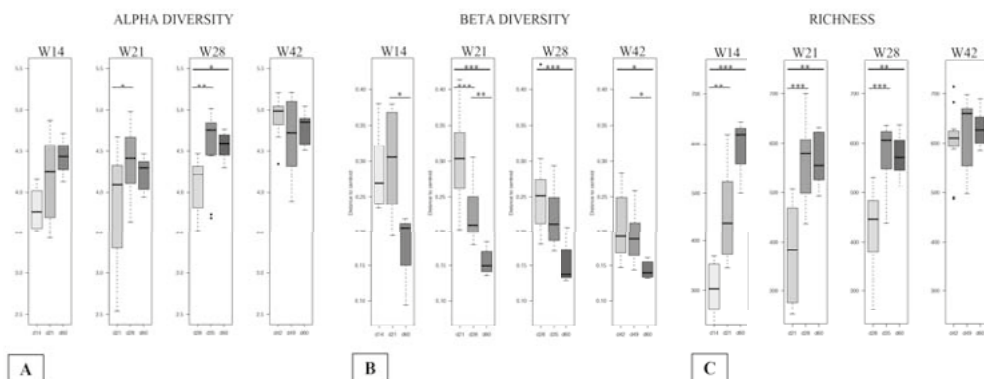
Effetto dell'età di svezzamento sulla diversità e composizione del microbiota fecale

Prendendo in considerazione ogni gruppo sperimentale, abbiamo descritto differenze significative ($p < 0,05$) per la diversità α e la ricchezza microbica tra i diversi momenti di campionamento in ciascun gruppo ad eccezione del gruppo W42. In quest'ultimo, solo la diversità β differiva significativamente. Le differenze descritte erano principalmente tra il campionamento del pre e del post-svezzamento. Inoltre, abbiamo osservato che la diversità β è diminuita tra i 7 giorni post-svezzamento e 60 giorni di età in tutti i gruppi, ad eccezione del gruppo W14 (Figura 1).

Nel plot NMDS, chiare differenze per i gruppi W14, W21 e W28, sono state riportate nei tre punti di campionamento. Al contrario, il gruppo W42 presentava i centroidi sovrapposti dei campioni collezionati 7 giorni post-svezzamento e 60 giorni di età. L'analisi differenziale ha descritto all'interno del gruppo W14 224 OTU differentemente abbondanti (DA), e nel gruppo W21 un totale di 484 OTU DA. Nei gruppi W28 e W42, erano rispettivamente descritte 395 e 461 OTU DA. Complessivamente, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Oscillospira* e *Clostridium* sono stati risultati più abbondanti prima dello svezzamento mentre *Succinivibrio*, *Prevotella* e *Campylobacter* più abbondanti 7 giorni post-svezzamento. *Faecalibacterium prausnitzii* è risultato più abbondante nel post-svezzamento in tutti i gruppi.

Figura 1: Boxplot rappresentanti la diversità alfa (A), diversità beta (B) e ricchezza (C) per ciascun time point dei suinetti svezzati a 14 giorni di età (W14), 21 giorni di età (W21), 28 giorni di età (W28) e 42 giorni di età (W42). Eventuali differenze statistiche sono indicate nella figura (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Figure 1: Boxplots of alpha diversity (A), beta diversity (B), and richness (C) for each sampling point for piglets weaned at 14 days of age (W14), 21 days of age (W21), 28 days of age (W28), and 42 days of age (W42). Any statistical differences are indicated in the figure (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$).

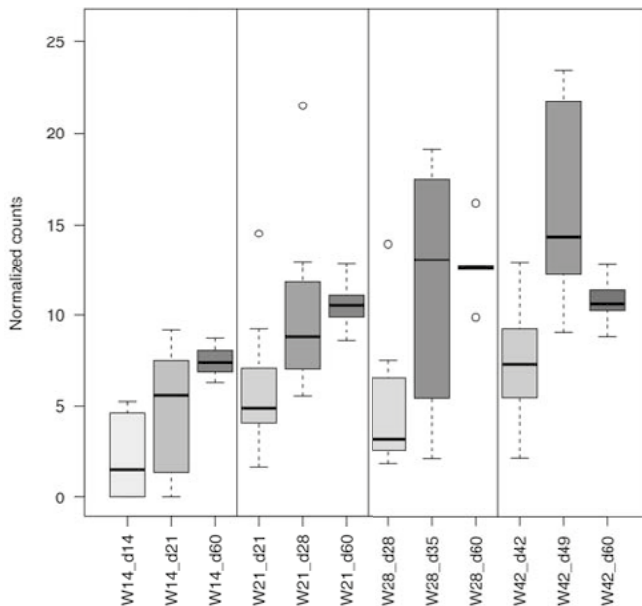


Effetto dell'età di svezzamento sull'abbondanza di *F. prausnitzii*

In tutto il dataset, tre OTU sono state annotate come *F. prausnitzii* (ID OTU 851865, 350121 e 525215). Poiché almeno una di queste OTU era DA nella maggior parte delle analisi, abbiamo deciso di esplorare l'abbondanza complessiva di *F. prausnitzii* sommando le abbondanze delle tre OTU per ciascun campione. In ogni gruppo di svezzamento, si è verificato un chiaro aumento nel tempo dell'abbondanza di *F. prausnitzii* e nel gruppo W42 sono stati osservati i valori maggiori (Figura 2). Nei gruppi W14 e W21, si è assistito ad un marcato aumento dell'abbondanza tra lo svezzamento e il giorno 60, mentre nei gruppi W28 e W42 l'abbondanza tendeva ad essere più stabile 7 giorni post-svezzamento. Allo svezzamento, *F. prausnitzii* era più abbondante nel gruppo W42, equamente abbondante nei gruppi W21 e W28 e meno abbondante nel gruppo W14. Sono state rilevate differenze significative tra i quattro gruppi di svezzamento ($p < 0,05$) e *F. prausnitzii* si è dimostrato più abbondante prima dello svezzamento in suinetti svezzati in età avanzata.

Figura 2: Abbondanza di *F. prausnitzii* in ciascun time point dei suinetti svezzati a 14 giorni di età (W14), 21 giorni di età (W21), 28 giorni (W28) e 42 giorni (W42). Le abbondanze normalizzate delle tre OTU annotate come *F. prausnitzii* (ID OTU 851865, 350121 e 25215) sono state sommate per ogni singolo campione.

Figure 2: Abundance of *F. prausnitzii* at each sampling point for piglets weaned at 14 days of age (W14), 21 days of age (W21), 28 days of age (W28), and 42 days of age (W42). The normalized abundances of the three OTUs annotated as *F. prausnitzii* (OTU IDs 851865, 350121, and 25215) were summed for each individual sample.



Effetto dell'età di svezzamento sulla diversità e composizione del microbiota fecale prima dello svezzamento

Un subset è stato creato includendo solo i campioni collezionati il giorno dello svezzamento di ciascun gruppo e la diversità α è risultata significativamente più elevata nel gruppo W42 rispetto agli altri tre gruppi. Lo stesso trend è stato registrato per la ricchezza microbica, riportando una differenza anche tra il W14 e W28. La diversità β si differenziava tra il gruppo

W42 ed i gruppi W14 e W21. Sono stati descritte 165 OTU DA tra i quattro gruppi. Le OTU appartenevano ai phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* e ai generi *Bacteroides*, *Ruminococcus* e *Prevotella*.

Effetto dell'età dello svezzamento sulla diversità e sulla composizione del microbiota fecale a 7 giorni post-svezzamento

Confrontando i campioni collezionati 7 giorni post-svezzamento di ogni gruppo sperimentale, non vi era alcuna differenza nella diversità α e nella ricchezza microbica. La diversità β era significativamente più elevata nel gruppo W14 rispetto agli altri tre gruppi ed il gruppo W42 presentava una diversità β più bassa rispetto agli altri, e dunque una maggiore omogeneità tra i campioni. Abbiamo descritto 165 OTU DA che appartenevano principalmente ai phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* e ai generi *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Bacteroides* e *Oscillospira*.

Effetto dell'età di svezzamento sulla diversità e composizione del microbiota fecale a 60 giorni di età

Prendendo in considerazione il campionamento effettuato all'età di 60 giorni, la diversità α è risultata significativamente diversa tra i gruppi W21 e W42 ($p < 0,05$) mentre la ricchezza e la diversità β non variavano in base all'età di svezzamento. Allo stesso modo, l'analisi NMDS non ha riscontrato differenze tra i gruppi di svezzamento. Sono state descritte 54 OTU DA appartenenti ai phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* e, per la maggior parte, ai generi *Prevotella*, *Ruminococcus* e *Bacteroides*.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente lavoro presenta il primo confronto della composizione del microbiota fecale in suinetti svezzati a diverse età, da 14 giorni (svezzamento molto precoce) a 42 giorni (svezzamento tardivo). Abbiamo caratterizzato la diversità e la composizione del microbiota da poco prima dello svezzamento fino ai 60 giorni di età dei suinetti dimostrando che i suinetti svezzati tardivamente hanno il tempo di sviluppare un ecosistema batterico ricco di batteri potenzialmente benefici come *F. prausnitzii*, prima di affrontare lo stress dello svezzamento.

Nel nostro studio, le OTU riferibili a *F. prausnitzii* erano presenti in tutti i gruppi, indipendentemente dall'età allo svezzamento, ed erano significativamente più abbondanti nel post-svezzamento, quando il microbiota intestinale si diversifica e matura (Mach *et al.*, 2015) the composition and dynamics of faecal microbiomes were studied for 31 healthy piglets across five age strata (days 14, 36, 48, 60 and 70 after birth). L'abbondanza delle OTU annotate come *F. prausnitzii* ha seguito lo stesso andamento registrato per la diversità α e la ricchezza della composizione del microbiota fecale. Il gruppo W14 ha mostrato la più bassa abbondanza di *F. prausnitzii* in tutti i time point, mentre nei gruppi W28 e W42 abbiamo descritto una maggiore abbondanza nel post-svezzamento. Al contrario dei gruppi W21 e W28, il gruppo W42 risultava essere caratterizzato da una maggior abbondanza di *F. prausnitzii* anche prima dello svezzamento. *F. prausnitzii* è considerato uno dei *next generation probiotic* (NGP) più promettenti nell'uomo. La sua presenza è stata correlata ad una migliore salute intestinale, risultando particolarmente efficace come adiuvante nel trattamento di patologie a carattere infiammatorio (Sokol *et al.*, 2008). Inoltre, *F. prausnitzii* è stato proposto come indicatore della salute intestinale umana (Miquel *et al.*, 2013), una sua minor abbondanza è stata infatti correlata a patologie e disturbi derivanti dalla disbiosi intestinale (Lopez-Siles *et al.*, 2018; Martín *et al.*, 2017; Miquel *et al.*, 2013). Complessivamente, i risultati ottenuti concordano con l'ipotesi che i suinetti potrebbero trarre beneficio dall'aumentata abbondanza di *F. prausnitzii* nel microbiota intestinale prima dello svezzamento, in quanto potrebbe

fornire protezione contro la disbiosi post-svezzamento e aiutare a mantenere uno stato di omeostasi intestinale. Per confermare in via definitiva questa ipotesi, sarà necessario condurre ulteriori studi coinvolgendo un maggior numero di animali e tenendo in considerazione le normali condizioni ambientali degli allevamenti intensivi.

È stato generalmente dimostrato che la diversità e la ricchezza del microbiota intestinale sono positivamente correlate alla salute dell'intestino. Nell'uomo e nei suini, infatti, le malattie enteriche sono spesso associate a una minore ricchezza batterica (Dou *et al.*, 2017; Lozupone *et al.*, 2013) immune system development and long-lasting health. Hence, early microbiota composition is a promising predictive biomarker for health and disease but still remains poorly characterized in regards to susceptibility to diarrhoea. In the present study, we aimed to assess if gut bacterial community diversity and composition during the suckling period were associated with differences in susceptibility of pigs to post-weaning diarrhoea. Twenty piglets from 5 sows (4 piglets / litter. Rispetto ai suinetti svezzati a 14 giorni, gli animali degli altri gruppi sperimentali hanno mostrato una maggiore diversità α prima dello svezzamento. Tale diversità potrebbe aiutare a proteggere ulteriormente l'omeostasi intestinale dallo stress dello svezzamento. La diversità β era la più bassa nel gruppo W42 prima dello svezzamento, dopo lo svezzamento e a 60 giorni di età, indicando che i suinetti di questo gruppo avevano un microbiota intestinale più omogeneo anche prima dello svezzamento. I nostri risultati confermano i risultati di studi precedenti che hanno confrontato il microbiota intestinale dei suinetti prima e dopo lo svezzamento (Mach *et al.*, 2015; Schokker *et al.*, 2014) the composition and dynamics of faecal microbiomes were studied for 31 healthy piglets across five age strata (days 14, 36, 48, 60 and 70 after birth. In particolare, abbiamo anche osservato che i phyla *Bacteroidetes* e *Firmicutes* erano dominanti nel microbiota fecale dei suini svezzati. Questi due taxa rappresentavano oltre il 90% di tutte le sequenze ottenute, dato confermato da studi precedenti che esaminavano il microbiota ileale, cecale e fecale di suini svezzati (Mach *et al.*, 2015; McCormack *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017) the composition and dynamics of faecal microbiomes were studied for 31 healthy piglets across five age strata (days 14, 36, 48, 60 and 70 after birth. Nei suinetti, il microbiota intestinale si diversifica dopo lo svezzamento e viene stabilito un nuovo equilibrio dell'ecosistema di microbiota basato su comunità microbiche stabili (Thompson *et al.*, 2008) diet and the developmental changes of the host. Denaturing gradient gel electrophoresis was used to follow the individual community dynamics of 24 piglets over the period of 3-36 days after birth. The community of piglets older than 31 days was inferred to show high stability relative to the first 28 days post birth. The stable day 36 community showed significant correlation between cohabiting piglets, but not between siblings. This cohabitation effect was not observable in 1- or 2-week-old piglets but was strongest at either 3 or 4 weeks post birth. The onset of this change after 2 weeks is predicted to be after the development of key induction elements of the immune system and before significant levels of piglet sIgA were observable (4 weeks. I nostri risultati hanno confermato che il microbiota fecale dei suinetti si modifica prima e dopo lo svezzamento, e questo è in accordo con studi presenti in bibliografia, che dimostrano come lo svezzamento sia associato a cambiamenti drastici nel microbiota intestinale e vada ad esercitare un impatto massivo sull'intero ecosistema intestinale (Dou *et al.*, 2017; Mach *et al.*, 2015) the composition and dynamics of faecal microbiomes were studied for 31 healthy piglets across five age strata (days 14, 36, 48, 60 and 70 after birth.

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che la salute dell'intestino dei suinetti potrebbe essere migliorata dallo svezzamento tardivo, poiché il microbiota intestinale avrebbe più tempo per la arricchirsi di comunità microbiche e diversificarsi prima

dello svezzamento. L'introduzione dello svezzamento tardivo nella normale pratica dell'allevamento intensivo, ad oggi, potrebbe risultare complessa poiché gli allevamenti di suini sono strutturati per svezzare gli animali a 21 o 28 giorni di età. Tuttavia, potrebbe essere possibile simulare i benefici dello svezzamento tardivo utilizzando strategie nutrizionali e/o probiotici per aumentare la diversità microbica prima dello svezzamento. Infatti, i nostri risultati indicano che *F. prausnitzii* potrebbe rappresentare un probiotico adatto alla prevenzione dei problemi di salute legati a disbiosi intestinale ed alla conseguente perdita economica associata a una riduzione della crescita nella fase di svezzamento. Inoltre, i nostri risultati sottolineano che i suinetti svezzati possono rappresentare un modello adatto allo studio di *F. prausnitzii* e di come questo influenzi la salute intestinale dell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bøe, K., 1991. The process of weaning in pigs: when the sow decides. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 30, 47–59.
2. Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2012. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276
3. Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–6. doi:10.1038/nmeth.f.303
4. Casey, T.A., Bosworth, B.T., 2009. Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine. *Vet Diagn Invest* 21, 25–30.
5. Colson, V., Martin, E., Orgeur, P., Prunier, A., 2012. Influence of housing and social changes on growth, behaviour and cortisol in piglets at weaning. *Physiol. Behav.* 107, 59–64. doi:10.1016/j.physbeh.2012.06.001
6. Davis, M.E., Sears, S.C., Apple, J.K., Maxwell, C. V, Johnson, Z.B., 2006. Effect of weaning age and commingling after the nursery phase of pigs in a wean-to-finish facility on growth, and humoral and behavioral indicators of well-being. *J. Anim. Sci.* 84, 743–756.
7. Dou, S., Gadonna-Widehem, P., Rome, V., Hamoudi, D., Rhazi, L., Lakhil, L., Larcher, T., Bahi-Jaber, N., Pinon-Quintana, A., Guyonvarch, A., Huerou-Luron, I.L.E., Abdennebi-Najar, L., 2017. Characterisation of Early-Life Fecal Microbiota in Susceptible and Healthy Pigs to Post- Weaning Diarrhoea. *PLoS One* 12, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0169851
8. Godon, J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, R.I.C., Biotechnologie, L. De, Environnement, D., National, I., Recherche, D., 1997. Molecular Microbial Diversity of an Anaerobic Digester as Determined by Small-Subunit rDNA Sequence Analysis 63, 2802–2813.
9. Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M.A., Van de Wiele, T., Forano, E., Blanquet-Diot, S., 2017. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends Microbiol.* doi:10.1016/j.tim.2017.05.004
10. Jensen, P., Recén, B., 1989. When to wean - Observations from Free-Ranging Domestic Pigs 23, 49–60. doi:https://doi.org/10.1016/0168-1591(89)90006-3

11. Lallés, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C.R., 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc. Nutr. Soc.* (2007), 66, 260–268. doi:10.1017/S0029665107005484
12. Lopez-Siles, M., Enrich-Capó, N., Aldeguer, X., Sabat-Mir, M., Duncan, S.H., Garcia-Gil, L.J., Martinez-Medina, M., 2018. Alterations in the Abundance and Co-occurrence of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Subjects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fcimb.2018.00281
13. Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2013. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230. doi:10.1038/nature11550.Diversity
14. Mach, N., Berri, M., Estelle, J., Levenez, F., Lemonnier, G., Denis, C., Leplat, J.-J., Chevaleyre, C., Billon, Y., Dore, J., Rogel-Gaillard, C., Lepage, P., 2015. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 554–569. doi:10.1111/1758-2229.12285
15. Martín, R., Miquel, S., Benevides, L., Bridonneau, C., Robert, V., Hudault, S., Chain, F., Berteau, O., Azevedo, V., Chatel, J.M., Sokol, H., Bermúdez-Humarán, L.G., Thomas, M., Langella, P., 2017. Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic Isolation of Novel Extremely Oxygen. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01226
16. Massacci, F.R., Berri, M., Lemonnier, G., Guettier, E., Blanc, F., Jardet, D., Rossignol, M.N., Mercat, M.J., Doré, J., Lepage, P., Rogel-Gaillard, C., Estellé, J., 2020. Late weaning is associated with increased microbial diversity and *Faecalibacterium prausnitzii* abundance in the fecal microbiota of piglets. *Anim. Microbiome* 2, 1–12.
17. McCormack, U.M., Curiao, T., Buzoianu, S.G., Prieto, M.L., Ryan, T., Varley, P., Crispie, F., Magowan, E., Metzler-Zebeli, B.U., Berry, D., O’Sullivan, O., Cotter, P.D., Gardiner, G.E., Lawlor, P.G., 2017. Exploring a possible link between the intestinal microbiota and feed efficiency in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.00380-17
18. McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217.
19. Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Chatel, J.M., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J.M., Langella, P., 2013. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 255–261. doi:10.1016/j.mib.2013.06.003
20. Oksanen, J., 2015. Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. *R Doc.* 1–43. doi:10.1016/0169-5347(88)90124-3
21. Paulson, J.N., Stine, O.C., Bravo, H.C., Pop, M., 2013. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat. Methods.*
22. Rideout, J.R., He, Y., Navas-Molina, J.A., Walters, W.A., Ursell, L.K., Gibbons, S.M., Chase, J., McDonald, D., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Clemente, J.C., Gilbert, J.A., Huse, S.M., Zhou, H.-W., Knight, R., Caporaso, J.G., 2014. Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ* 2, e545. doi:10.7717/peerj.545
23. Schokker, D., Zhang, J., Zhang, L.L., Vastenhouw, S.A., Heilig, H.G.H.J., Smidt, H., Rebel, J.M.J., Smits, M.A., 2014. Early-life environmental variation affects intestinal microbiota and immune development in new-born piglets. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0100040
24. Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J., Corthier, G., Grangette, C.,

- Vasquez, N., Pochart, PhilippePochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H.M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P., 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Gut* 59, 1055–1062.
25. TeamCore, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
 26. Thompson, C.L., Wang, B., Holmes, A.J., 2008. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *ISME J.* 2, 739–748. doi:10.1038/ismej.2008.29
 27. Yang, Q., Huang, X., Zhao, S., Sun, W., Yan, Z., Wang, P., Li, S., Huang, W., Zhang, S., Liu, L., Gun, S., 2017. Structure and Function of the Fecal Microbiota in Diarrheic Neonatal Piglets. *Front. Microbiol.* 8, 502. doi:10.3389/fmicb.2017.00502