

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

UTILIZZO DI PROBIOTICI E PREBIOTICI NEL
CANE: EFFETTI CLINICI E SUL MICROBIOTA
INTESTINALE

Relatore

dott. Michele Berlanda

Laureanda

Matilde Zanella

Matricola n. 1216597

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

SOMMARIO

1. ABSTRACT	7
2. INTRODUZIONE	10
3. APPARATO GASTROINTESTINALE DEL CANE – CENNI DI ANATOMIA E FISILOGIA.....	12
3.1 BOCCA.....	12
3.2 FARINGE ED ESOFAGO	14
3.3 STOMACO	15
3.4 PICCOLO INTESTINO	16
3.5 GROSSO INTESTINO.....	18
3.6 FEGATO	19
3.7 PANCREAS.....	21
4. MICROBIOTA INTESTINALE.....	24
4.1. ORIGINE DEL MICROBIOTA INTESTINALE E SUA COMPOSIZIONE IN UN ANIMALE SANO.....	26
4.2. LA CARATTERIZZAZIONE DEL MICROBIOTA INTESTINALE.....	29
4.3. INTERAZIONI FRA MICROBIOTA INTESTINALE E ORGANISMO	30
5. DISBIOSI INTESTINALE	36
6. PROBIOTICI E PREBIOTICI	39
6.1. MECCANISMO D’AZIONE DI PROBIOTICI E PREBIOTICI	41
6.2. PROBIOTICI USATI NEL CANE	43
6.3. PROBIOTICI PER RAFFORZARE IL SISTEMA IMMUNITARIO.....	49
6.4. PROBIOTICI E ANTIBIOTICI.....	55

6.5.	PROBIOTICI E PROPAGAZIONE DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA	60
6.6.	PROBIOTICI IN PATOLOGIE ENTERICHE ACUTE	61
6.7.	PROBIOTICI IN PATOLOGIE ENTERICHE CRONICHE.....	67
6.8.	PROBIOTICI E DERMATITE ATOPICA.....	72
6.9.	ALTRI UTILIZZI DI PROBIOTICI E PREBIOTICI	80
7.	CONCLUSIONI	83
8.	Bibliografia.....	86

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

AAD: diarrea associata ad antibiotici

ALT: alanina amino transferasi

ALP: fosfatasi alcalina

APC: antigen-presenting cells

BA: acidi biliari

CADESI: Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index

CADLI: Canine Atopic Dermatitis Lesion Index

CCD: diarrea associata ad infezione da Clostridium difficile

CCECAI: Canine Chronic Enteropathy Clinical Index

DC: cellule dendritiche

FOS: frutto-oligosaccaridi

GABA: acido gamma-amminobutirrico (o γ -amminobutirrico)

GALT: gut-associated lymphoid tissue

IBD: Irritable Bowel Syndrome

IBS: Inflammatory Bowel Disease

IELs: linfociti intraepiteliali

IFN γ : interferone gamma

IgA: immunoglobulina A

IgE: immunoglobuline E

ILCs: cellule linfoidi innate

IL-4: interleukina 4

IL-10: interleukina 10

IL-17: interleukina 17

IL-22: interleukina 22

IL-23: interleukina 23

LPS: lipopolisaccaridi

MALT: mucose-associated lymphoid tissue

PP: placche di Peyer

PRR: Pattern Recognition Receptors (recettori di riconoscimento del pattern)

PSA: polisaccaride A

PVAS: Pruritus Visual Analog Scale

RCTs: randomized controlled trials

SCFA: Short-chain fatty acids (acidi grassi a catena corta)

SFB: batteri filamentosi segmentati

sIgA: IgA secretorie

TGF- β : transforming growth factor β

TJ: tight junctions

TLR: toll-like receptors

TMAO: Trimetilammina N-ossido

TNF- β : tumor necrosis factor-beta

Treg: cellule T regolatorie

VAS: Visual Analog Scale

1. ABSTRACT

L'apparato gastrointestinale dei nostri animali ospita in situazioni fisiologiche un grande quantitativo di organismi fra cui batteri, virus, protozoi, archaea e funghi.

L'insieme di questi microrganismi viene definito microbiota, e svolge numerose azioni all'interno dell'organismo: in particolare, oltre a partecipare alla digestione di numerosi nutrienti, contribuisce alla difesa dell'organismo e al potenziamento del sistema immunitario.

In determinate situazioni patologiche che coinvolgono in maggiore o minore misura l'apparato gastrointestinale, questa popolazione di microrganismi viene alterata, portando a uno stato di disbiosi intestinale. Le cause di disbiosi sono innumerevoli: comprendono situazioni patologiche come patologie enteriche, ma anche alterazioni dell'alimentazione, somministrazione di farmaci (in particolare antibiotici) e stress.

Per risolvere uno stato di disbiosi si può intervenire in vari modi: tra questi c'è l'utilizzo di probiotici e prebiotici. Per probiotico si intende "micro-organismi vivi che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite". I prebiotici sono invece sostanze organiche non digeribili (principalmente fibre insolubili), che solitamente forniscono i nutrienti specifici per favorire la crescita dei batteri buoni intestinali. Per svolgere la loro funzione devono bypassare la digestione e arrivare fino al colon; lì, i microrganismi presenti metabolizzano e fermentano i prebiotici stessi per sopravvivere.

Tramite quindi la somministrazione di probiotici e prebiotici, si può manipolare il microbiota intestinale dell'organismo, sostenendo gli organismi non patogeni residenti dell'apparato intestinale.

Ad oggi, il ruolo del microbiota nella salute dell'uomo non è ancora totalmente conosciuto, e lo è ancora meno nella salute dei nostri animali domestici. Allo stesso modo non è ancora stato studiato approfonditamente il potenziale di successo di probiotici e prebiotici: negli ultimi anni stanno aumentando gli studi a riguardo, portando alla luce sempre più informazioni e possibili utilizzi futuri.

Lo scopo di questa tesi è proprio quello di eseguire una revisione della letteratura riguardante l'utilizzo e l'effetto di probiotici e prebiotici nel cane, e in particolare il loro effetto sulla salute e sul microbiota intestinale dell'animale, per chiarire quali siano le attuali conoscenze a riguardo e quali siano i possibili futuri utilizzi.

In physiological situations the gastrointestinal system of our animals hosts a large amount of organisms including bacteria, viruses, protozoa, archaea and fungi.

The set of these microorganisms is called microbiota, and performs numerous actions within the body: in particular, in addition to participating in the digestion of numerous nutrients, contributes to the defense of the body and the strengthening of the immune system.

In certain pathological situations involving to a greater or lesser extent the gastrointestinal tract, this population of microorganisms is altered, leading to a state of intestinal dysbiosis. The causes of dysbiosis are countless: they include pathological situations such as enteric pathologies, but also alterations in nutrition, drug administration (especially antibiotics) and stress.

To solve a state of dysbiosis we can intervene in various ways: among these is the use of probiotics and prebiotics. Probiotic means "living micro-organisms that, when administered in adequate quantities, bring a benefit to the health of the host". Prebiotics, on the other hand, are non-digestible organic substances (mainly insoluble fibers), which usually provide specific nutrients to promote the growth of good intestinal bacteria. To perform their function they need to bypass digestion and reach the colon; there, the already present microorganisms metabolize and ferment the prebiotics themselves to survive.

Through the administration of probiotics and prebiotics, the organism's intestinal microbiota can be manipulated, supporting non-pathogenic organisms that are resident in the intestinal tract.

To date, the role of the microbiota in human health is not yet fully known, and even less so in the health of our pets. Likewise, the potential for success of probiotics and prebiotics has not yet been thoroughly investigated: in recent years, studies have been increasing, bringing to light more and more information and possible future uses.

The purpose of this thesis is precisely to perform a review of the literature concerning the use and effect of probiotics and prebiotics in dogs, and in particular their effect on the health and intestinal microbiota of the animal, to clarify what the current knowledge is and what possible future uses are.

2. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, l'interesse verso l'impiego di probiotici e prebiotici in medicina veterinaria e umana è cresciuto significativamente, parallelamente alla crescente consapevolezza dell'importanza che ha il microbiota intestinale per la salute dell'organismo.

I probiotici sono definiti come organismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, possono apportare benefici all'ospite; i prebiotici sono invece composti non digeribili da parte dell'organismo ma da parte del microbiota, che stimolano selettivamente la crescita e l'attività dei batteri commensali nell'intestino. L'utilizzo di probiotici e prebiotici nel cane è cominciato più tardi che nell'uomo, e rappresenta un campo di ricerca tuttora in evoluzione.

Il microbiota intestinale del cane è complesso, ed è costituito da una vastissima comunità microbica che comprende batteri, virus, funghi, Archea e protisti; il suo ruolo nella salute dell'organismo è fondamentale, e i probiotici sono uno dei metodi più diretti a nostra disposizione per modularlo.

Probiotici e prebiotici vengono infatti spesso usati con l'obiettivo di migliorare la salute intestinale e prevenire o trattare diverse condizioni patologiche gastrointestinali; tuttavia, mentre alcuni studi suggeriscono effetti positivi, è necessario considerare che le evidenze scientifiche a riguardo sono ancora scarse, e che i meccanismi tramite cui agiscono i probiotici talvolta non sono totalmente chiari. È importante anche tenere conto del fatto che gli effetti dovuti alla somministrazione di probiotici e prebiotici variano spesso in funzione di molteplici fattori, fra cui il ceppo batterico, la dose, la dieta e le condizioni cliniche del soggetto.

Oltre a questo è importante anche notare che, proprio perché lo studio dell'argomento è ancora in crescita, non si possono per ora avere certezze sull'effetto che l'utilizzo di probiotici e prebiotici può avere a lungo termine. Sebbene infatti alcuni dei risultati iniziali paiano promettenti, rimangono ancora molte lacune a riguardo, e molte domande che richiedono ulteriori ricerche per avere una risposta, e per determinare l'impatto complessivo dei probiotici e prebiotici e definire linee guida cliniche più precise di quelle oggi presenti per il loro utilizzo.

Questa tesi si propone di effettuare una revisione della letteratura riguardante i possibili effetti dell'utilizzo di probiotici e prebiotici nella salute del cane, andando oltre le semplici conseguenze dirette che questi prodotti hanno sul microbiota ed esplorando ulteriori possibili applicazioni; analizzando sia i potenziali benefici che le limitazioni della somministrazione di probiotici e prebiotici, ci si pone l'obbiettivo di valutarne i meccanismi d'azione, le applicazioni cliniche e le prospettive future con l'obbiettivo di fornire una panoramica critica ed imparziale sull'argomento.

3. APPARATO GASTROINTESTINALE DEL CANE – CENNI DI ANATOMIA E FISIOLOGIA

L'apparato digerente nei mammiferi ha il compito di ricevere e digerire l'alimento ingerito dall'organismo, e infine di espellere la parte di esso non digerita. Si estende dalla bocca all'ano, e oltre agli organi che compongono il vero e proprio tubo digerente (bocca, faringe, esofago, stomaco, piccolo e grosso intestino) è costituito da altri organi che, tramite la produzione di enzimi, partecipano alla digestione (fra questi ci sono pancreas e fegato).

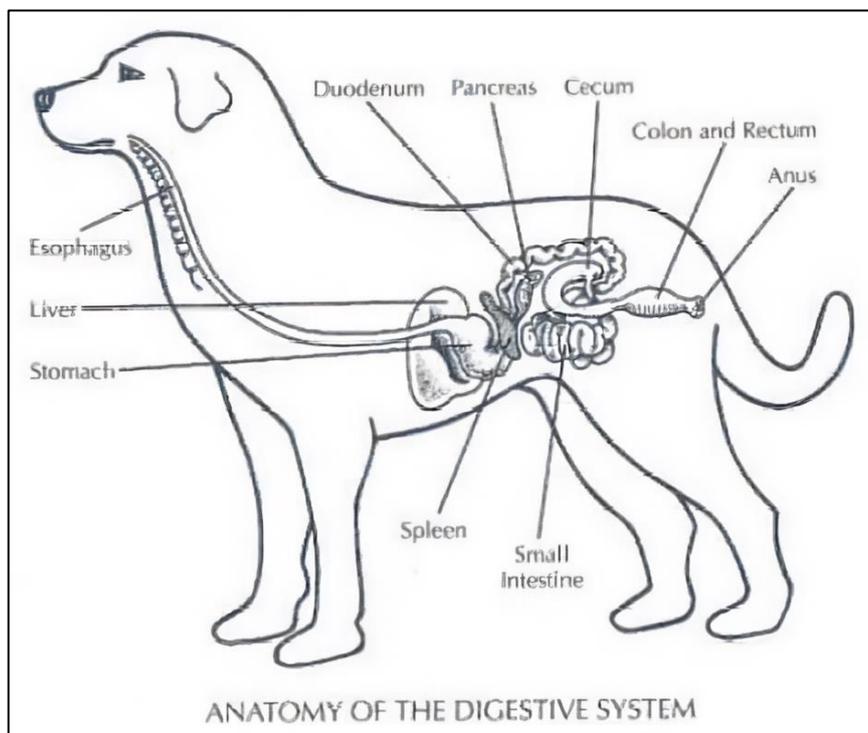


Figura 1: anatomia dell'apparato digerente del cane

3.1 BOCCA

La bocca è la prima parte dell'apparato digerente; la sua cavità viene suddivisa in due parti dai denti e dai processi alveolari: lo spazio tra questi, le guance e le labbra è denominato vestibolo. Lo spazio tra i denti e i processi alveolari è la cavità orale propriamente detta; qui si trova la lingua che, quando la bocca è chiusa, riempie per intero la cavità orale.

La lingua è composta da una membrana mucosa, ghiandole, muscolo e vasi e nervi. La sua struttura può variare tra diverse specie, a seconda dei vari utilizzi che questi ne fanno. Le

funzioni della lingua sono varie: assunzione dell'alimento liquido e solido, è un organo tattile e di gusto, viene utilizzata per afferrare e selezionare l'alimento, partecipa alla mescolazione, alla masticazione e alla deglutizione dell'alimento, ed è infine utile per la pulizia del mantello e della cute in generale.

DENTI

Fondamentali per la masticazione dell'alimento, e quindi per il primo passo della sua digestione, sono i denti. Il cane è classificato come organismo eterodonte, il che vuol dire che i suoi denti si differenziano in diverse forme: incisivi (utilizzati principalmente per afferrare l'alimento), canini (originariamente sviluppati per afferrare e mantenere ferma la preda), premolari (sono importanti per "lacerare" l'alimento) e molari (fondamentali per "macinare" l'alimento, così che possa essere deglutito più facilmente e che la digestione sia facilitata).

GHIANDOLE SALIVARI

Un organo fondamentale per la prima parte della digestione sono le ghiandole salivari. Il loro secreto, la saliva, se mescolato all'alimento ne facilita la masticazione, e quando il bolo deve essere deglutito ne facilita il transito; le ghiandole salivari secernono tutte in cavità orale.

Con l'appellativo di ghiandole salivari ci si riferisce in genere a tre ghiandole principali: la ghiandola parotide (a secrezione esclusivamente sierosa), la ghiandola mandibolare (è una ghiandola a secrezione mista, più piccola nei carnivori rispetto agli erbivori), e la ghiandola sublinguale (è una ghiandola a secrezione mista).

Nell'insieme, queste ghiandole hanno l'importante funzione di produzione della saliva. La saliva, ricca di enzimi e composti antibatterici, svolge svariati ruoli: prima di tutto la difesa contro i patogeni orali; svolge poi una funzione di tampone e un'attività antimicrobica; aiuta inoltre ad avviare la digestione enzimatica dell'alimento prima ancora che questo arrivi allo stomaco. In particolare, gli enzimi presenti nella saliva rompono i carboidrati complessi in disaccaridi.

3.2 FARINGE ED ESOFAGO

Caudalmente alla bocca si trova la faringe: si tratta di una cavità muscolo-membranosa in realtà in comune con l'apparato respiratorio. Rostralmente è delimitata dall'unione di palato duro e palato molle, e per quasi tutta la sua lunghezza è divisa dal palato molle in nasofaringe (dorsale) e orofaringe (ventrale). Caudalmente, la faringe si continua nell'esofago (dorsalmente) e nella laringe (ventralmente). È il ruolo della faringe fare in modo che durante l'inspirazione l'aria si sposti da rostro-dorsale (dalle cavità nasali) a caudoventrale (laringe), e durante la deglutizione il cibo vada da rostroventrale (bocca) a caudodorsale (esofago).

L'esofago è un organo tubulare muscolo-membranoso che si estende dalla faringe allo stomaco, all'interno del quale si immette tramite il cardias. Viene classicamente diviso in una porzione cervicale, una porzione toracica e una breve porzione addominale.

La struttura dell'esofago è simile a quella di altri organi tubulari dell'apparato digerente: internamente è ricoperto da un epitelio pavimentoso stratificato; il livello di cheratinizzazione di questo epitelio dipende della dieta dell'animale (un carnivoro come il cane avrà una maggiore cheratinizzazione rispetto a un erbivoro). Esteriormente all'epitelio si trova una mucosa, separata dalla sottomucosa da un sottile strato muscolare. La sottomucosa è ricca di fibre elastiche, che permettono la distensione dell'organo durante la deglutizione. Continuando verso l'esterno si trova il muscolo striato. Sono presenti due strati muscolari: entrambi sono disposti a spirale, ma rivolti in direzioni opposte rispetto all'esofago. Infine, lo strato più esterno è costituito dall'avventizia, un foglietto di tessuto connettivo lasso che in torace e addome viene sostituito da una sierosa.

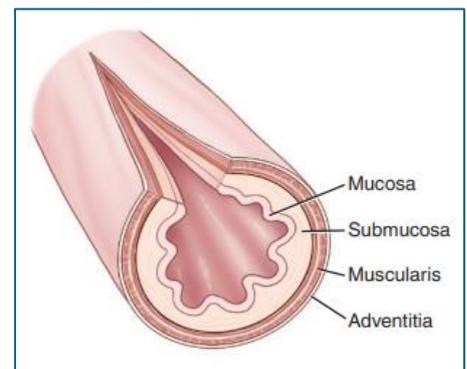


Figura 2: struttura della parete dell'esofago (sezione trasversale).

3.3 STOMACO

Lo stomaco è un organo cavo che riceve il cibo ingerito dall'animale dopo il passaggio in esofago, e che si continua poi nell'intestino tenue; al suo interno, grazie ai succhi gastrici e alle contrazioni muscolari dell'organo stesso, ha inizio la digestione dell'alimento.

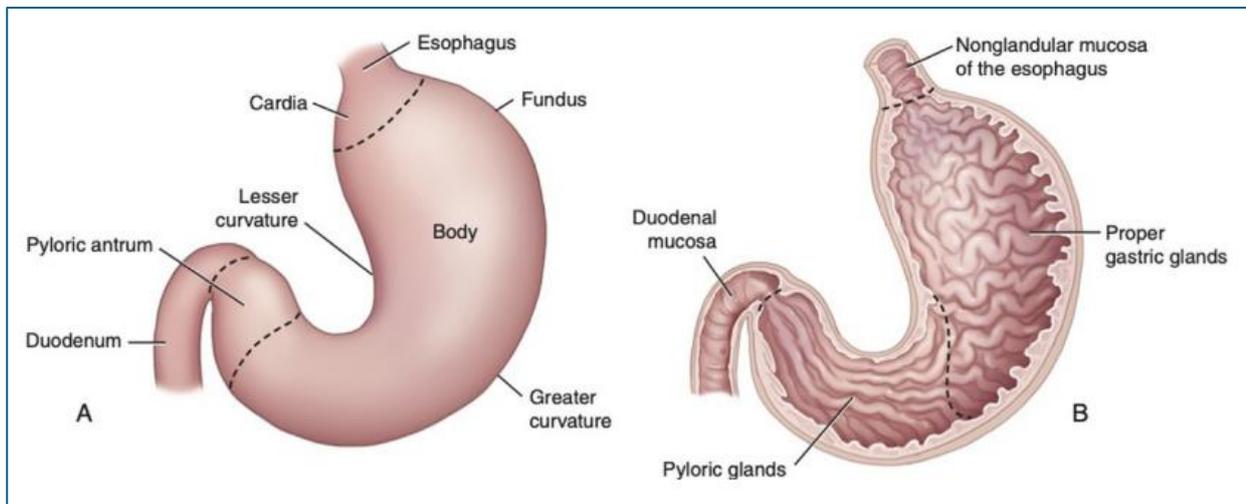


Figura 3: regioni dello stomaco nel cane. Anatomia esterna (A) e divisione della mucosa luminale (B).

Nel cane lo stomaco ha dimensioni ridotte rispetto agli erbivori, così come il suo intestino è più corto e semplice: la dieta più concentrata di una cane è infatti più facilmente digeribile.

Nel cane lo stomaco è classicamente suddiviso in quattro regioni:

- **Cardias:** è la prima parte dello stomaco, quella più vicina all'esofago, posizionata a sinistra dell'asse mediano.
- **Fondo:** si tratta di un recesso cieco che si innalza oltre il cardias.
- **Corpo:** va dal cardias all'angolo più ventrale dello stomaco.
- **Piloro:** è la parte più tubulare, e mette in comunicazione lo stomaco e il duodeno. Si divide a sua volta in un antro pilorico, prossimale, a cui segue il canale pilorico, caratterizzato da una muscolatura più ispessita.

La parete dello stomaco è formata da: un epitelio cilindrico, uno strato di mucosa ghiandolare, un rivestimento muscolare interno composto da tre strati di muscolatura liscia e infine una sierosa esterna (il peritoneo).

La mucosa gastrica del cane è disseminata di ghiandole gastriche; sono di tre tipi e vengono distinte in: cardiache, gastriche propriamente dette (fundiche) e piloriche. Le ghiandole cardiache e piloriche sono deputate principalmente alla produzione di muco, mentre le ghiandole fundiche sono le uniche produttrici di succo gastrico, composto da pepsina e acido cloridrico; grazie alla pepsina e all'acido cloridrico inizia la digestione delle proteine, che continua poi nel primo tratto dell'intestino.

3.4 PICCOLO INTESTINO

Il piccolo intestino (o intestino tenue) è la parte dell'apparato gastrointestinale dove la maggior parte dei nutrienti assunti dall'organismo viene assorbita.

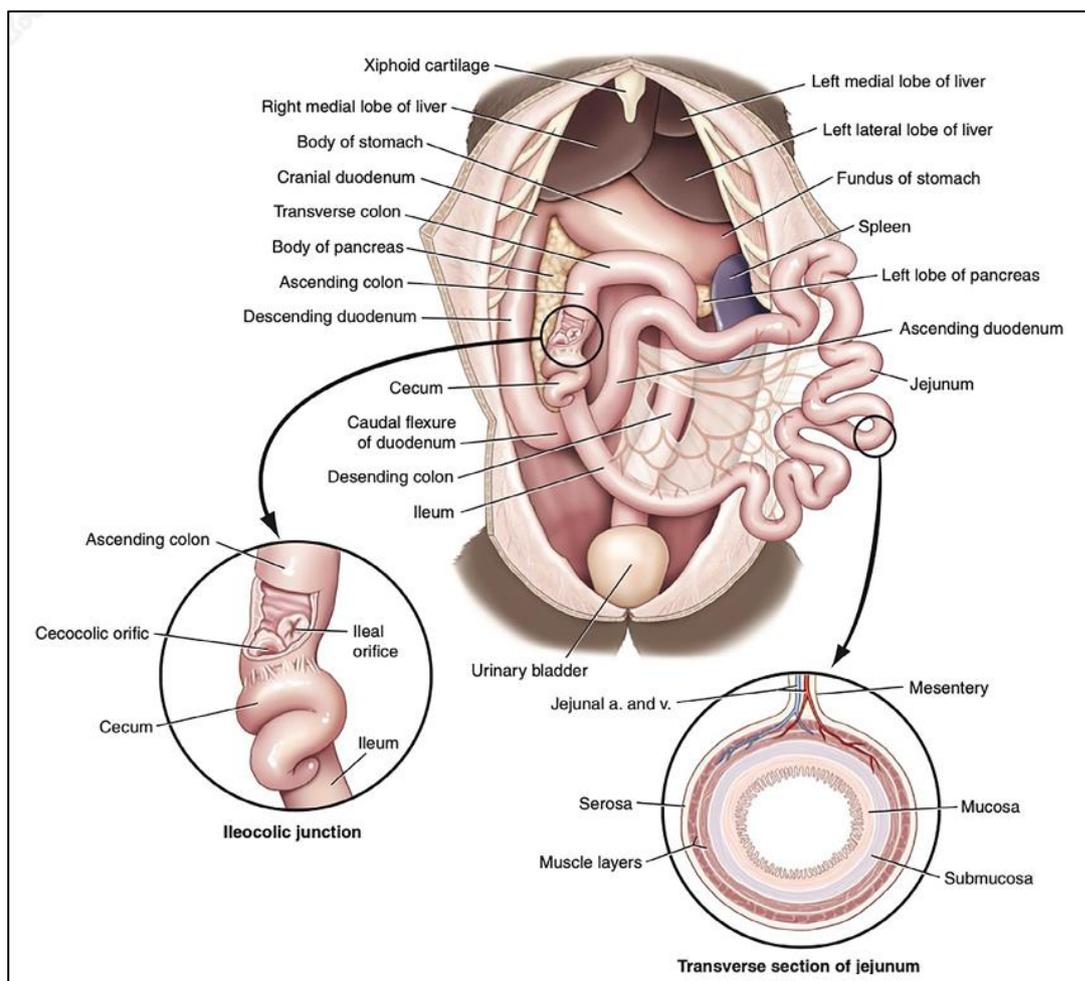


Figura 4: anatomia e rapporti del piccolo intestino nel cane.

Partendo dallo stomaco (dal piloro) e terminando nel grosso intestino, il piccolo intestino è classicamente diviso in: duodeno (qui si trovano i villi intestinali, adibiti all'assorbimento di fluidi e nutrienti); digiuno (è il segmento più lungo dell'intestino tenue; qua avviene l'assorbimento di molecole più piccole rispetto a quelle assorbite nel duodeno); ileo (è il segmento più corto dell'intestino tenue; qua avviene l'assorbimento di vitamine e sali biliari).

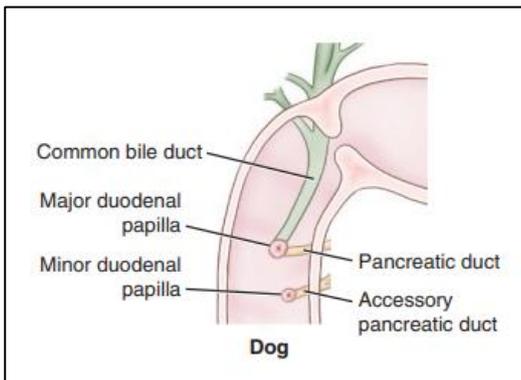


Figura 5: sbocchi dei dotti biliari e pancreatici nel cane.

Nel duodeno riversano i loro secreti sia il fegato che il pancreas: nel cane il dotto biliare e il dotto pancreatico si aprono separatamente in una papilla (la papilla duodenale maggiore) pochi centimetri dopo il piloro, mentre un secondo dotto pancreatico di maggiori dimensioni (dotto pancreatico accessorio) si apre poco dopo in una seconda papilla (papilla duodenale minore).

L'intestino tenue è formato dalle classiche quattro tonache (come anche mostrato in Figura 4 in basso a destra): mucosa, sottomucosa, strato muscolare, sierosa. La superficie luminare è provvista di numerose estroflessioni, i villi intestinali, la cui funzione è quella di aumentare la superficie di assorbimento intestinale.

Alla base dei villi si aprono invece numerose ghiandole (le cripte), la cui funzione è di secrezione di muco ed enzimi per l'ulteriore digestione di metaboliti glucidici e proteici.

Quando l'alimento arriva nel piccolo intestino, la digestione dei carboidrati è già iniziata grazie agli enzimi presenti nella saliva; la digestione proteica è invece iniziata nello stomaco, e nell'intestino prosegue grazie agli enzimi pancreatici secreti all'interno del duodeno. Sempre nel duodeno la bile derivante dal fegato emulsiona i grassi presenti nell'alimento, facendo sì che questi possano essere rotti in acidi grassi ad opera della lipasi pancreatico.

Come precedentemente detto, a livello del piccolo intestino avviene anche buona parte dell'assorbimento dell'alimento: vengono assorbiti zuccheri semplici tramite trasporto attivo, peptidi tramite endocitosi, acqua ed elettroliti.

3.5 GROSSO INTESTINO

È nel grosso intestino (intestino crasso) che avviene il riassorbimento della maggior parte dell'acqua e degli elettroliti, sciolti insieme ai succhi digestivi e ai prodotti di scarto della digestione avvenuta nel piccolo intestino. Sulla superficie luminale del grosso intestino sono assenti i villi, mentre le cripte sono parecchio profonde. La mucosa qua si solleva in pliche longitudinali che scompaiono in caso di occlusione intestinale ed aumentano di due-tre volte la superficie assorbente dell'intestino. Anche qua, come nel piccolo intestino, la peristalsi aiuta a mescolare il contenuto intestinale per massimizzare il riassorbimento dell'acqua e degli elettroliti.

A questo livello si trovano innumerevoli batteri e altri microrganismi (che vanno a formare il microbiota) che si nutrono dei resti della digestione, e proprio loro, insieme ai loro scarti, vanno poi a formare una parte considerevole delle feci che alla fine vengono espulse.

Il grosso intestino del cane è piuttosto corto e solitamente solo poco più largo dell'intestino tenue, e viene classicamente diviso in: cieco, colon e retto.

Il cieco del cane non presenta una diretta connessione con l'ileo. È un tratto di intestino molto breve, caratterizzato da una forma spiralata (a cavatappi). È costituito da un apice e un corpo in contatto con il colon ascendente, di cui può essere considerato un diverticolo. Queste due parti dell'intestino sono infatti in comunicazione tramite l'ostio ciecolico, che si trova poco oltre l'ostio ileale (anch'esso si apre nel colon ascendente).

Il colon comincia dalla giunzione ileocolica: qua, uno sfintere muscolare (sfintere ileocolico), controlla il passaggio dell'alimento e limita il ritorno del materiale verso le porzioni precedenti. Il colon a sua volta viene suddiviso in colon ascendente, colon trasverso e colon discendente (quest'ultima parte è la più lunga).

Il retto inizia in corrispondenza dell'ingresso della pelvi; nel suo percorso si dilata nell'ampolla rettale, proprio nel punto in cui si continua, caudalmente, come canale anale.

3.6 FEGATO

Il fegato è una ghiandola annessa all'apparato digerente che svolge innumerevoli funzioni: in particolare, contribuisce al metabolismo delle proteine, dei carboidrati e dei grassi producendo la bile e secernendola all'interno dell'apparato gastrointestinale. Il fegato svolge anche un importante ruolo nel metabolismo e nell'eliminazione dei farmaci, nella detossificazione del sangue, nell'immagazzinamento di glicogeno e nella produzione di sangue durante la vita fetale; rappresenta inoltre una fonte di calore.

La funzione esocrina del fegato è quella di produzione della bile: gli acidi biliari in essa contenuti favoriscono l'emulsione dei grassi del contenuto intestinale, mentre i pigmenti biliari sono prodotti terminali della degradazione dell'emoglobina. Dopo la sua produzione, la bile scorre nel sistema dei dotti biliari e viene immagazzinata e concentrata nella cistifellea (colecisti), per essere poi riversata nel duodeno in caso di necessità.

SISTEMA DEI DOTTI BILIARI

Il sistema dei dotti biliari inizia a livello dei lobuli epatici con i capillari (canalicoli) biliari, all'interno dei quali viene riversata la bile prodotta dagli epatociti (cellule del fegato); i canalicoli biliari sono privi di una vera e propria parete che li separi dagli epatociti.

I canalicoli biliari convergono unendosi verso canali di maggiori dimensioni, i condotti interlobulari, che a loro volta si uniscono nei duttuli biliari. Nel cane, a differenza che in altre specie, i duttuli biliari sboccano singolarmente nel dotto cistico, che diventa poi dotto coledoco, che sbocca in corrispondenza della papilla duodenale maggiore nel duodeno.

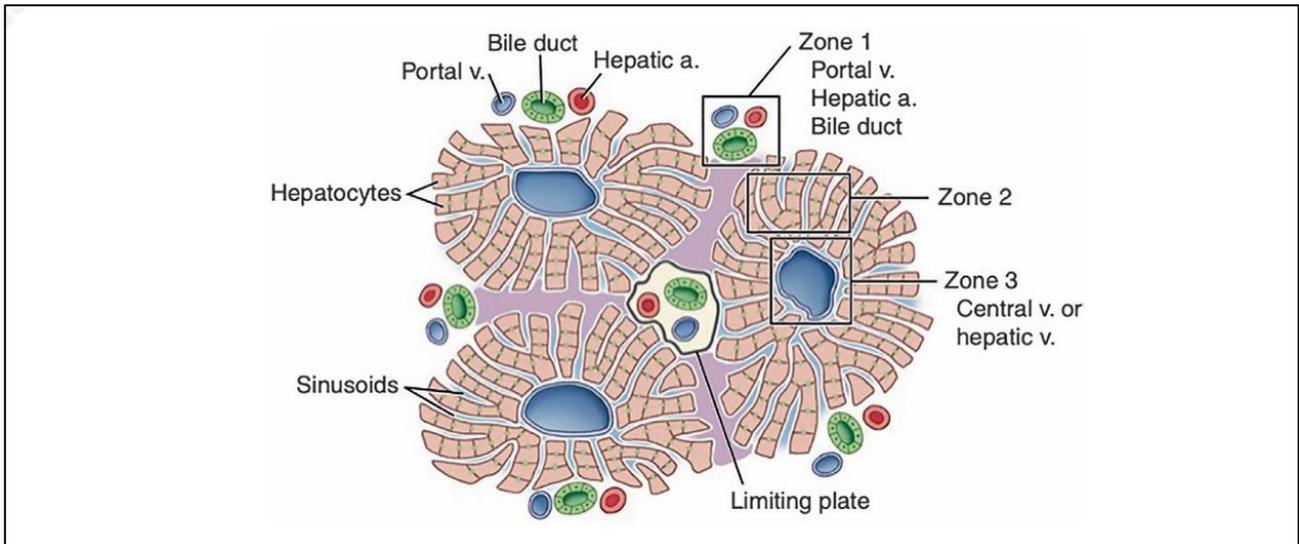


Figura 6: architettura epatica. L'anatomia epatica è descritta in relazione al flusso di sangue attraverso i sinusoidi epatici: regione portale (zona 1), regione dell'acino (zona 2), regione centrolobulare (zona 3).

BILE

Gli acidi biliari che vanno a costituire la bile, fondamentali per la digestione dei lipidi, vengono prodotti dagli epatociti a partire dal colesterolo. Nella bile sono presenti anche fosfolipidi e colesterolo; i primi partecipano alla digestione dei grassi, il colesterolo è invece un prodotto di scarto.

Nella bile si trovano anche i sali biliari, che arrivati in intestino tendono a formare micelle (rivolgono la loro parte idrofoba verso l'interno, lontana dall'acqua e la parte idrofila verso l'esterno, verso l'acqua). A differenza degli acidi biliari, i sali non sono liposolubili; questo fa in modo che vengano più difficilmente riassorbiti dalla parete intestinale una volta escreti nel duodeno, e per questo agiscono lungo tutto il piccolo intestino. I sali riassorbiti vengono ricondotti al fegato tramite la vena porta, per poi essere nuovamente escreti nella bile (circolazione enteroepatica).

Durante l'alimentazione, ancora prima che l'alimento arrivi nello stomaco, viene stimolata l'escrezione di bile da parte degli epatociti e il suo trasporto dalla cistifellea all'intestino. Questo avviene contemporaneamente alla stimolazione della produzione di acido cloridrico e pepsinogeno nello stomaco e di enzimi pancreatici nel pancreas.

3.7 PANCREAS

Il pancreas è una ghiandola esocrina ed endocrina, e svolge un importante ruolo nella regolazione della glicemia (tramite la produzione di insulina e glucagone) e nella digestione (tramite la produzione di enzimi digestivi in grado di degradare lipidi, carboidrati e proteine). È composto da due parti che svolgono funzioni diverse: la parte dominante ha azione esocrina, mentre quella più piccola ha funzione endocrina.

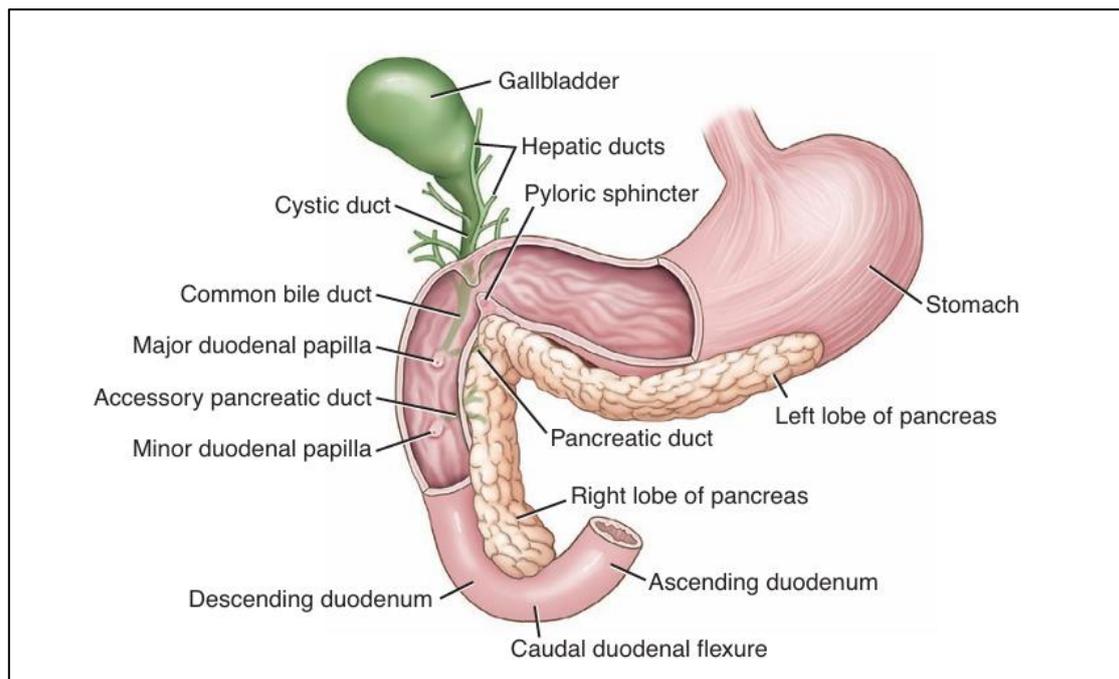


Figura 7: anatomia di sistema biliare extraepatico e pancreas nel cane.

Anatomicamente parlando, il pancreas si trova interposto tra duodeno, stomaco e milza, ed è formato da due lobi (lobo pancreatico destro e lobo pancreatico sinistro). La superficie dell'organo è lobulare e in parte nodulare.

I dotti escretori della parte esocrina presentano uno sviluppo variabile tra diverse specie: nel cane sono presenti il dotto escretore principale (piccolo, a volte assente) e il dotto pancreatico accessorio (più grande). Il dotto pancreatico sbocca insieme con o direttamente accanto al dotto coledoco (dotto biliare comune) sulla principale papilla duodenale nell'area del corpo del pancreas. Il dotto pancreatico accessorio termina pochi centimetri più caudalmente, sulla piccola papilla duodenale, in corrispondenza della parte craniale del lobo pancreatico destro.

Gli enzimi digestivi che vengono secreti attraverso questi dotti partecipano alla digestione di carboidrati, lipidi e proteine. Una parte di questi enzimi viene prodotta come precursori che vengono attivati all'arrivo in intestino da enterochinasi.

In particolare, la digestione delle proteine è catalizzata dalla tripsina, dalla chimotripsina e dalla carbossipeptidasi prodotte dal pancreas. Diversi enzimi come la lipasi pancreatica e la fosfolipasi vengono invece attivati dalla tripsina per partecipare alla digestione dei grassi. Per quanto riguarda la digestione dei carboidrati, questa è facilitata dall'amilasi pancreatica, che idrolizza i carboidrati complessi in disaccaridi e trisaccaridi.

SUCCO PANCREATICO

La struttura microscopica del pancreas è simile a quella delle ghiandole salivari, ed è caratterizzata da gruppi di acini, costituiti da singoli strati cellulari colonnari che circondano il lume dell'acino. Le secrezioni che provengono da gruppi di acini scorrono attraverso piccoli dotti escretori, i dotti intercalati. Il succo pancreatico fluisce quindi in un sistema di dotti di dimensioni via via maggiori fino a un dotto comune che sbocca nel duodeno.

Il secreto delle cellule acinose contiene HCO_3^- in alte quantità e Cl^- (le loro quantità dipendono dalla velocità di secrezione). A causa dell'elevata concentrazione di HCO_3^- il succo pancreatico neutralizza l'acidità delle ingesta che dallo stomaco giungono in duodeno.

Il succo pancreatico contiene enzimi necessari per la digestione di tutte le macromolecole presenti nell'alimento: la lipasi scinde i lipidi in glicerolo e acidi grassi, l'amilasi degrada l'amido principalmente a maltosio (dimero del glucosio), le proteasi scindono le proteine in peptidi e aminoacidi, le nucleasi digeriscono gli acidi nucleici in nucleotidi.

Enzima	Substrato	Effetto
Tripsina, chimotripsina, elastasi	Proteine, peptidi	Digeriscono i legami peptidici interni

Carbossipeptidasi	Proteine, peptidi	Libera gli aminoacidi all'estremità carbossilica
Lipasi	Trigliceridi	Digerisce i legami esterei nelle posizioni 1 e 3, producendo acidi grassi liberi e monogliceridi
Fosfolipasi	Fosfolipidi	Digerisce i legami esterei nella posizione 2 dei fosfolipidi
Amilasi	Polisaccaridi	Digerisce l'amido e il glicogeno liberando maltosio e corte catene di glucosio
Ribonucleasi	RNA	Digerisce l'RNA a nucleotidi
Desossiribonucleasi	DNA	Digerisce il DNA a nucleotidi

Tabella 1: enzimi pancreatici e loro funzioni.

Fonti utilizzate nel capitolo:

- Fisiologia degli animali domestici; O. V. Sjaastad, O. Sand, K. Hove.
- Anatomia degli animali domestici; Konig, Liebich.
- Anatomia veterinaria (parte prima – Anatomia sistematica); K.M. Dyce, W.O. Sack, C.J.G. Wensing.
- Comparative veterinary anatomy – A clinical approach; James A. Orsini, Nora S. Grenager, Alexander de Lahunta.

4. MICROBIOTA INTESTINALE

L'apparato gastrointestinale è colonizzato da una vasta comunità di microrganismi che contribuiscono allo sviluppo del sistema immunitario e alla salute dell'ospite. Questa comunità di microrganismi prende il nome di microbiota, e il loro genoma collettivo prende il nome di microbioma (Stephen & Cummings, 1980).

Il microbiota gastrointestinale ha un ruolo importante sulla salute dell'organismo che spesso viene dimenticato e sottovalutato, tanto che in passato ci si è riferiti a esso con l'appellativo di "organo dimenticato" (O'Hara & Shanahan, 2006). Esso comprende una complessa comunità composta di microrganismi fra cui batteri, funghi, Archea, protisti e virus; si stima che la somma totale di questi si aggiri intorno a un totale di 10^{12} - 10^{14} microrganismi per grammo di feci (in totale circa dieci volte il numero di cellule dell'organismo), che vanno a costituire fino al 60 % della massa fecale finale (O'Hara & Shanahan, 2007).

Il microbiota si concentra quasi totalmente a livello di grosso intestino, mentre è molto scarsa la presenza di batteri a livello di stomaco e piccolo intestino. Questo è dovuto a vari fattori: a livello di stomaco e parte prossimale dell'intestino tenue la secrezione di acidi, succhi pancreatici e bile non permette la sopravvivenza della maggior parte dei microrganismi ingeriti con l'alimento; nella parte più distale dell'intestino tenue la peristalsi non permette la colonizzazione da parte dei batteri. Nel grosso intestino invece la quantità di batteri cresce enormemente. Si trova inoltre, proporzionalmente, una maggiore quantità di batteri ossigeno-tolleranti a livello di piccolo intestino, e una maggiore quantità di patogeni anaerobi a livello di grosso intestino (Francesco & Malagelada, 2003) (Pilla & Suchodolski, 2021).

L'insieme di tutti questi microrganismi esercita un effetto sull'omeostasi intestinale attraverso la trasmissione di segnali regolatori rivolti all'epitelio e guidando la mucosa alla risposta immunitaria. Tra le azioni più importanti svolte dal microbiota si ritrovano infatti attività metaboliche tramite l'interazione con l'energia e i nutrienti ottenuti dall'ingesta, effetti sull'epitelio intestinale e le strutture immunitarie a esso correlate, e protezione dell'organismo colonizzato da parte di altri microrganismi patogeni. Come vedremo in seguito, il microbiota svolge un ruolo essenziale anche in alcune patologie dell'apparato gastrointestinale, come

l'IBS (*Inflammatory Bowel Disease*) e patologie di origine infettiva; per questo attraverso la sua manipolazione si può pensare di trattare o prevenire alcune di queste patologie, promuovendo la salute dell'organismo (Yang & Wu, 2023).

Il microbiota intestinale risulta fondamentale anche per lo sviluppo e il mantenimento del GALT (*gut-associated lymphoid tissue*): studi condotti su topi privati di batteri intestinali e topi in precedenza privi di patogeni intestinali dimostrano che il microbiota influenza anche la distribuzione spaziale del GALT (Falk et al., 1998).

4.1. ORIGINE DEL MICROBIOTA INTESTINALE E SUA COMPOSIZIONE IN UN ANIMALE SANO

Si è sempre pensato che la colonizzazione dell'apparato intestinale da parte dei microrganismi componenti il microbiota iniziasse dopo la nascita dell'individuo. Recenti studi in ambito umano hanno però provato la presenza di batteri già all'interno della placenta, del cordone ombelicale e del fluido amniotico in gravidanze non patologiche. In medicina veterinaria ancora non si sono svolti studi a riguardo, ma si può ipotizzare che, nonostante le differenze con la gravidanza e la placentazione umana, il processo possa essere simile: ci sarebbe quindi un passaggio di microrganismi da parte del microbiota materno, che ancora prima della nascita andrebbero a colonizzare l'apparato gastroenterico fetale (Milani et al., 2017).

Volendo tralasciare queste ipotesi, si sa comunque per certo che la colonizzazione dell'apparato digerente da parte di questi microrganismi inizia subito dopo la nascita dell'individuo, e si completa in pochi giorni. Questa occupazione avviene come risultato dell'incontro random di patogeni ambientali: i primi microrganismi che hanno l'opportunità di occupare l'organismo hanno la capacità di modulare l'espressione di alcuni geni nelle cellule epiteliali dell'ospite e creare così un ambiente a loro favorevole; in questo modo prevengono la crescita e la colonizzazione di altri microrganismi che si possono successivamente incontrare. In particolare, i batteri commensali competono per i siti di legame sulle cellule epiteliali intestinali: batteri aderenti non patogeni impediscono l'attacco e quindi l'entrata di patogeni enteroinvasivi nell'epitelio. I commensali competono per i nutrienti disponibili e mantengono il loro habitat consumando tutte le risorse disponibili: l'ospite fornisce attivamente il nutriente che il commensale necessita, e il commensale indica attivamente all'ospite le quantità in cui lo necessita. In questo modo si previene un'eccessiva produzione del nutriente, che renderebbe possibile la colonizzazione da parte di patogeni esogeni. Infine, i batteri commensali possono inibire la crescita dei patogeni competitori producendo sostanze antimicrobiche come acido lattico e batteriocine; l'ospite può controllare la produzione di batteriocine, dal momento che buona parte di queste può essere degradata da proteasi prodotte dall'organismo. Così, il ruolo delle batteriocine è ristretto e

localizzato dove e quando necessario (Francesco & Malagelada, 2003) (O’Hara & Shanahan, 2007).

La composizione del microbiota di ciascun organismo dipende da diversi fattori, fra cui: l’anatomia e la fisiologia della specie, l’alimentazione dell’animale nei primi giorni di vita, la dieta della madre (nel caso di animali allattati), l’ambiente (riferendosi all’ambiente vero e proprio in cui l’animale cresce, agli individui con cui entra in contatto e all’area geografica), e la genetica dell’animale (Milani et al., 2017). Il microbiota dell’organismo può poi modificarsi col passare del tempo: può infatti essere ulteriormente influenzato dalla dieta dell’animale, una volta che questo comincia a nutrirsi indipendentemente dalla madre, da terapie farmacologiche a cui l’organismo può essere sottoposto (in particolare influiscono le terapie antibiotiche), da stress, da patologie batteriche e virali. Cambiamenti radicali nella composizione del microbiota intestinale possono portare a vere e proprie situazioni di disbiosi intestinale, andando ad alterare la sua funzionalità.

I phyla che più si ritrovano nell’apparato gastrointestinale dei cani comprendono *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* (Yang & Wu, 2023). In particolare, nel cane il microbiota è composto soprattutto da microrganismi parte de *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. (Lee et al., 2022). Nella tabella sottostante (tabella 2) si riportano più nello specifico le specie di alcuni batteri commensali dell’apparato gastrointestinale del cane.

Phylum	Classe	Famiglia	Specie
Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriaceae	Collinsella
Bacteroides	Bacteroides	Prevotellaceae	Prevotella
		Bacteroidaceae	Bacteroides
Firmicutes	Clostridia	Clostridiaceae	Clostridium
	Bacilli	Ruminococcaceae	Faecalibacterium
		Peptostreptococcaceae	prausnitzii
		Lachnospiraceae	Peptostreptococcus

		Veillonellaceae	Blautia
		Streptococcaceae	Megamonas
		Lactobacillaceae	Streptococcus
		Turicibacteraceae	Lactobacillus
			Turicibacter
Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Alcaligenaceae	Sutterella
	Gammaproteobacteria	Enterobacteriaceae	E. coli

Tabella 2: batteri presenti in maggiori quantità nelle feci del cane (Pilla & Suchodolski, 2021).

È importante menzionare che non solo la parte finale dell'apparato gastrointestinale possiede il proprio microbiota: anche altri organi hanno i propri batteri residenti commensali, fra questi le cavità nasali e la cute. In immagine (figura 8) vengono riportati i principali microrganismi che abitano il cane (Lee et al., 2022).

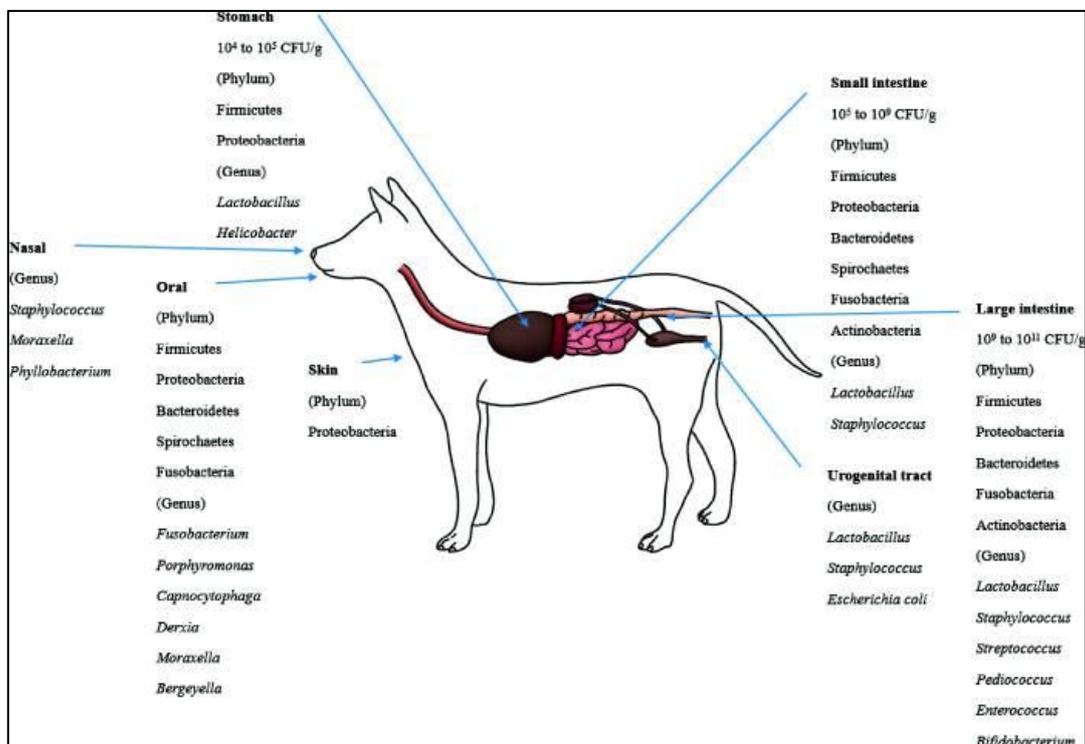


Figura 8: principali microrganismi che abitano il cane (Lee et al., 2022).

4.2. LA CARATTERIZZAZIONE DEL MICROBIOTA INTESTINALE

Al momento, il gold standard dei test per la caratterizzazione del microbiota intestinale si basa su analisi microbiche basate sul gene rRNA 16S. Il gene del rRNA 16S comprende nove regioni variabili differenti, ciascuna fiancheggiata da sequenze altamente conservate del DNA che sono adatte ad essere riconosciute da diversi primer per PCR. Questa tecnica molecolare si concentra sui geni dell'RNA ribosomiale del 16S: questo è infatti comune a tutti i batteri, ma tra le diverse specie batteriche ne variano le precise sequenze, permettendo così l'identificazione e la classificazione dei singoli patogeni (Milani et al., 2017).

Essendo il microbiota complesso e altamente dinamico, è spesso utile affiancare a questa analisi altre metodologie: fra queste, l'amplificazione tramite PCR dello stesso gene rRNA 16S seguita da analisi degli amplificoni attraverso Next Generation Sequencing (NGS), la diretta quantificazione degli specifici taxa batterici tramite PCR quantitativa (qPCR) e l'utilizzo di ibridazione fluorescente in situ (fluorescent in situ hybridization, FISH) per visualizzare lo spostamento dei batteri nella mucosa intestinale. Si possono includere anche misurazioni dei metaboliti batterici come gli acidi biliari fecali e gli SCFA (Short-chain fatty acids), con l'obiettivo di verificare la funzionalità del microbiota e per valutare eventuali cambi nel sistema immunitario dell'ospite. Può essere utilizzata anche la coltura batterica dei patogeni fecali, ma nonostante la sua utilità nel rilevamento delle specie presenti e la possibilità di verificare la sensibilità agli antibiotici dei patogeni trovati, difficilmente si ottiene una caratterizzazione batterica precisa di un ambiente complesso come l'intestino. Infatti molti dei patogeni commensali sono anaerobi e per questo non facilmente coltivabili, favorendo così una sottostima dei batteri presenti; si stima infatti che meno del 20% dei batteri intestinali sia coltivabile con tecniche laboratoriali standard. Un'altra metodologia utile al sequenziamento del microbiota ancora poco utilizzata a causa dei costi elevati è la metogenomica, che consiste nella frammentazione e il sequenziamento random di alcune sequenze di DNA batterico (Suchodolski, 2016).

4.3. INTERAZIONI FRA MICROBIOTA INTESTINALE E ORGANISMO

FUNZIONI METABOLICHE

Il microbiota intestinale viene considerato ormai un organo a sé stante, con sue svariate funzioni metaboliche: i batteri intestinali convertono residui altrimenti non digeribili dell'alimento in loro metaboliti, regolano il sistema immunitario dell'organismo, e difendono l'ospite da batteri patogeni esogeni. Per esempio, i carboidrati derivati dall'alimento sono fermentati dal microbiota intestinale in acidi grassi a catena corta (SCFA), fra cui acetato, propionato e butirato. Reazioni come questa non sarebbero possibili per l'organismo ospite: sono necessari enzimi che solo i patogeni del microbiota sono in grado di sintetizzare. Grazie a quest'attività metabolica, vengono recuperati nutrienti e substrati che prima non erano assorbibili da parte dell'organismo, e vengono forniti energia e nutrienti per l'organismo e per la proliferazione batterica del microbiota (Suchodolski, 2022).

Fonte	Patogeni coinvolti	Metaboliti	Effetti benefici sull'ospite in normali concentrazioni	Potenziati effetti deleteri sull'ospite in concentrazioni anormali
Carboidrati	Vari (fra cui Faecalibacterium, Bifidobacterium)	Fermentazione a acidi grassi a catena corta	Proprietà antinfiammatorie Potenziamento della funzione di barriera intestinale Regolazione della motilità intestinale Riserva di energia sistemica o locale	Rapporti alterati fra i diversi SCFA possono attivare fattori di virulenza di alcuni batteri enteropatogeni (es: geni per l'invasione appartenenti a Salmonella, geni

				relativi alla motilità di Escherichia Coli)
Acidi biliari (AB) primari prodotti dal fegato	Soprattutto Clostridium hiranonis	Trasformazione in acidi biliari secondari	Proprietà antinfiammatorie I BA secondari sono importanti regolatori del microbiota, e inibiscono la crescita di C difficile, C perfringens, E coli	Eccessive quantità di BA primari possono portare a diarrea secretoria
Triptofano (di origine alimentare)	Vari	Metaboliti indolici	Proprietà antinfiammatorie Mantenimento della funzionalità della barriera intestinale	In eccessive quantità i metaboliti indolici sono citotossici
Carnitina e colina (di origine alimentare)	Vari (fra cui Escherichia Coli)	Trimetilamina N-ossido (TMAO)	n/a	Alterazione del metabolismo del colesterolo, associato a patologie cardiache

Tabella 3: contributo dei batteri intestinali ad alcune vie metaboliche e loro influenza sulla salute e su alcune patologie dell'organismo.

I microrganismi commensali svolgono un ruolo fondamentale anche nella sintesi di vitamine e nell'assorbimento di calcio, magnesio e ferro. Possono sintetizzare, a partire dai nutrienti forniti dall'ospite, vitamina B12, riboflavina (vitamina B2), vitamina K, biotina, e acido folico (M. J. Hill, 1997) (Francesco & Malagelada, 2003).

EFFETTO SULL'EPITELIO INTESTINALE

Il microbiota intestinale dei mammiferi è anche fondamentale per lo sviluppo e il mantenimento dell'immunità dell'organismo ospite: è dotato di un vasto repertorio di segnali

e meccanismi attraverso i quali può influenzare l'attivazione del sistema immunitario. Fra questi meccanismi rientrano il rimodellamento epigenetico e l'alterazione dell'espressione genica (Levy et al., 2017). Molteplici derivati e metaboliti del microbiota intestinale possono regolare le funzioni immunitarie dell'intestino influenzando diverse cellule, fra cui cellule epiteliali intestinali, fagociti mononucleari, cellule linfoide innate e linfociti B e T (L. Wang et al., 2019).

In questo modo i microrganismi che colonizzano l'intestino contribuiscono all'integrità della barriera epiteliale dello stesso e ne regolano la risposta immunitaria, mantenendo l'equilibrio tra la difesa messa in atto dall'organismo e la tolleranza che questo deve mostrare nei confronti del microbiota residente.

Per evitare una risposta immunitaria aberrante nei confronti del microbiota sono però le cellule epiteliali intestinali che separano i patogeni residenti dalle cellule immunitarie dell'ospite tramite una barriera fisica e chimica, portando così all'instaurarsi di un rapporto di mutualismo fra ospite e commensale: le cellule immunitarie intestinali partecipano al mantenimento di un sano microbiota, rinforzando ulteriormente la barriera fornita dalle cellule epiteliali (è frequente infatti riscontrare alterazioni del microbiota intestinale in pazienti affetti da patologie autoimmuni o da patologie infiammatorie croniche) e di ritorno il microbiota conferisce molteplici benefici all'ospite, come la produzione di nutrienti e la resistenza alla colonizzazione da parte di patogeni esogeni (Kayama et al., 2020).

Il microbiota agisce inoltre in numerosi modi sia sull'immunità innata che sull'immunità adattativa delle cellule immunitarie intestinali. Innanzitutto, influenza la trascrizione in cellule dell'immunità innata come le cellule linfoide innate (ILC), sulle quali agisce epigeneticamente; può essere influenzata anche l'espressione genica delle cellule mieloidi intestinali, in particolare durante processi infiammatori. Per quanto riguarda i precisi meccanismi tramite i quali ciò succede, il microbiota pare dipendere dai suoi metaboliti: in particolare pare dipendere da metaboliti del triptofano per comunicare con le ILC e da SCFA per comunicare con le cellule mieloidi.

Per quanto riguarda invece le cellule dell'immunità adattativa, in medicina umana è stato provato come determinate specie batteriche influenzano direttamente lo sviluppo e la differenziazione del sistema immunitario.

L'attacco di batteri filamentosi segmentati (SFB) all'epitelio intestinale induce l'azione di cellule T helper antigeno-specifiche tramite l'interleukina 23 (IL-23), IL-22 e proteina A-amiloide sierica e promuove la sintesi di immunoglobulina A (IgA). Il patogeno commensale *Bacteroides fragilis* regola invece l'equilibrio fra cellule T helper 1 e 2, e dirige lo sviluppo di cellule regolatorie (Treg) tramite il polisaccaride A (PSA); le Treg sono in realtà indotte anche da altre specie batteriche, fra cui alcuni ceppi di *Clostridium spp.* Sono i SCFA di derivazione batterica ad essere i mediatori più importanti per l'induzione da parte del microbiota delle cellule Treg. Infine, il microbiota influenza la secrezione di IgA: lo fa regolando l'accumulo di cellule plasmatiche intestinali che producono le IgA e la diversità delle IgA stesse. Un esempio di questi meccanismi si vede nella figura 9: alcuni SFB e *Mucispirillum spp.* si localizzano vicino all'epitelio intestinale, dove provocano una risposta immunitaria mediata dalle IgA e dipendente dalle cellule T (Levy et al., 2017).

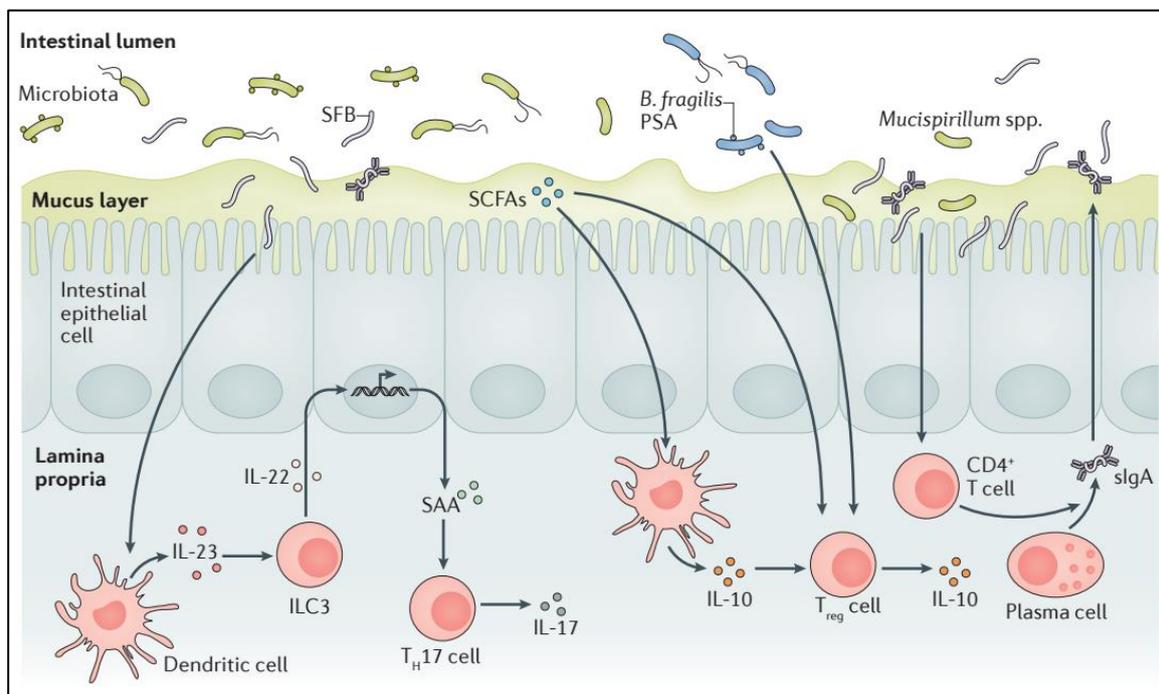


Figura 9: meccanismi di regolazione dell'immunità innata e adattativa da parte del microbiota intestinale (Levy et al., 2017).

‘INTERFERENZE’ DEL MICROBIOTA SULLA MUCOSA INTESTINALE

È importante per l’organismo saper distinguere i microrganismi commensali facenti parte del microbiota e quelli esogeni: un errore nell’interpretazione potrebbe condurre a una risposta immunitaria dell’ospite nei confronti dei patogeni ‘buoni’, e conseguentemente a danni alla mucosa enterica.

Per questo motivo risultano fondamentali delle interazioni precoci fra microbiota e il GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), così che questo possa sviluppare una risposta immunitaria adeguata. Numerose cellule immunitarie e non, infatti, partecipano al riconoscimento dei patogeni commensali per formare un’immunità propria dell’ospite: enterociti superficiali, cellule M (parte del MALT: *mucose-associated lymphoid tissue*) e cellule dendritiche (hanno il ruolo di presentare gli antigeni ai linfociti T e B). Gli enterociti, connessi tra loro tramite *tight-junctions*, sono coperti da un sottile strato di muco che impedisce il passaggio di microrganismi; quando individuano patogeni all’interno del lume intestinale rispondono tramite la secrezione di defensine, IgA e citochine, che avviano la risposta immunitaria (Suzuki et al., 2003) (Stadnyk, 2002). Le cellule M raccolgono antigeni dal lume e li trasmettono alle cellule dendritiche; queste, che a loro volta possono selezionare antigeni dal lume, ingeriscono e trattengono i microrganismi commensali e li trasportano ai linfonodi mesenterici, dove può essere prodotta una risposta immunitaria locale. In questo modo si impedisce l’accesso e la diffusione di patogeni (commensali e non) al resto dell’organismo (Rescigno et al., 2001) (Macpherson & Uhr, 2004).

REGOLAZIONE DEI NEUROTRASMETTITORI DA PARTE DEL MICROBIOTA INTESTINALE

In medicina umana è stato studiato come il microbiota intestinale sia anche in grado di regolare la produzione, il trasporto e il funzionamento di determinati neurotrasmettitori. Usando modelli animali si è evidenziato come i batteri commensali producono e consumano una grande varietà di neurotrasmettitori comuni a tutti i mammiferi, fra cui dopamina, norepinefrina, serotonina e acido gamma-amminobutirrico (GABA). Si ha sempre più

evidenza di come la manipolazione di questi neurotrasmettitori da parte dei batteri commensali può avere un impatto sulla fisiologia dell'ospite, e alcuni esperimenti preliminari condotti in umana dimostrano come intervenendo sul microbiota ne si possano alterare i livelli. Ancora non si conoscono però le possibili implicazioni fisiologiche, sulle quali si necessitano ulteriori studi (Strandwitz, 2018).

Il microbiota intestinale comunica con il sistema nervoso centrale anche tramite citochine infiammatorie, il nervo vago e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene; sempre in medicina umana, si è recentemente rilevato come spesso si possa correlare un disequilibrio della flora batterica intestinale con alcuni disturbi cognitivi e dell'umore, che risultano frequenti durante disordini del tratto gastrointestinale (Karakan et al., 2021).

Basandosi soprattutto sugli studi condotti in medicina umana, dato che in veterinaria l'ambito non è ancora stato esplorato approfonditamente, si può dedurre quanto sia fondamentale il ruolo del microbiota intestinale nella salute dell'organismo, e quanti dei modi in cui questo agisce ancora non sono chiari. Risulta però chiaro come sia necessario un approfondimento e una maggiore conoscenza di questi meccanismi, dal momento che essendo il microbiota così interconnesso alla salute dell'organismo, andando ad agire su questo si può ragionevolmente pensare di operare sull'organismo stesso.

5. DISBIOSI INTESTINALE

La disbiosi intestinale è un'alterazione nella composizione e/o nella ricchezza del microbiota intestinale. In medicina umana e veterinaria è associata con molteplici disturbi del tratto gastrointestinale, come l'IBD (*Inflammatory Bowel Disease*), la colite granulomatosa e l'IBS (*Irritable Bowel Syndrome*). Nonostante non sia sempre chiaro se la disbiosi intestinale sia una causa o una conseguenza di patologie gastroenteriche, è probabile che ci sia una sovrapposizione: l'infiammazione causa disbiosi, e la disbiosi, quando presente, è un fattore di rischio che può esacerbare l'infiammazione in individui già suscettibili geneticamente dal punto di vista immunitario. Per questo, il ripristino di un microbiota non alterato dovrebbe sempre essere uno degli obiettivi durante il trattamento di patologie enteriche. In qualsiasi caso, nonostante sia stato dimostrato che il disequilibrio del microbiota intestinale può essere associato ad una grande varietà di patologie, fra cui disturbi intestinali, sia nell'uomo che nel cane, la ricerca riguardante lo stretto rapporto tra disbiosi e le suddette patologie è ancora scarsa (Suchodolski, 2016) (Sun et al., 2023).

Alcuni studi hanno anche rivelato possibili predisposizioni al dismicrobismo intestinale nel sistema immunitario innato di cani e gatti con IBD, provando ulteriormente l'intricata relazione tra il microbiota dell'ospite e la sua salute. Attualmente, il maggiore ostacolo che permane e che non permette una perfetta e dettagliata comprensione delle interazioni fra ospite e microbiota è il fatto che la maggior parte degli studi sul comportamento del microbiota nelle patologie enteriche analizza la popolazione di microrganismi solo in un determinato momento della patologia, o lo studia in un ristretto numero di animali affetti da patologie (Honneffer et al., 2014).

È stato comunque riscontrato come a diversi patogeni corrispondano solitamente differenti variazioni nel microbiota: ciascuna patologia pare portare sempre a un disequilibrio nella stessa direzione. Per esempio, una riduzione di batteri potenzialmente benefici come *Fusobacterium* e *Faecalibacterium praunitzii* e un contemporaneo aumento di *Clostridium perfringens* sono stati osservati in cani con enteropatie croniche (Pilla & Suchodolski, 2021). Una diminuzione di *Bifidobacterium* e un contemporaneo aumento di *Escherichia coli* sono

stati riscontrati in gatti con IBD. Rimane comunque sempre presente una certa sovrapposizione di pattern fra disbiosi causate da diverse patologie gastroenteriche: ad oggi non sono ancora stati descritti modelli costanti di disbiosi che possano essere usati per fare diagnosi certa di una determinata patologia (Ziese & Suchodolski, 2021) (Suchodolski, 2016).

Numerosi fattori possono quindi portare a uno stato di disbiosi intestinale: fra questi, come già detto, ci sono stati infettivi e infiammatori dell'apparato gastrointestinale, forse tra le prime cause di disequilibrio. La flora intestinale può essere influenzata e alterata anche da dieta, farmaci (in particolare antimicrobici) e predisposizione genetica (Milani et al., 2017).

Come precedentemente detto, uno degli obiettivi fondamentali della terapia di patologie gastroenteriche dovrebbe essere quello di ripristinare l'equilibrio del microbiota intestinale; tuttavia, ancora non esistono studi che accertino il ritorno di questo equilibrio dopo la remissione di un'enteropatia. Per ora, uno studio mostra come il microbiota intestinale si normalizzi solo in parte in media dopo 3 settimane dalla remissione clinica senza terapia o dopo 8 settimane di terapia a base di antibiotico e antinfiammatorio. Questo suggerisce che il microbiota rimane alterato per una certa latenza della patologia o per una persistente infiammazione locale, che impiega più tempo a risolversi rispetto alla sintomatologia. Chiaramente si necessita di ulteriori studi che analizzino ulteriormente come l'esito a lungo termine di animali affetti da patologia gastroenterica si correla con la disbiosi (Rossi et al., 2014a) (Minamoto et al., 2015).

Come già detto precedentemente, il microbiota intestinale è strettamente legato al sistema immunitario dell'organismo, in particolare quello locale intestinale. Per questo motivo, uno stato di disbiosi può portare a gravi conseguenze per la risposta immunitaria dell'organismo ospite. In particolare, i meccanismi tramite i quali il microbiota può dirottare il sistema immunitario includono metaboliti del microbiota stessa, la regolazione di recettori Toll-like (TLR), la degradazione delle IgA secretorie (sIgA), la produzione di peptidi antimicrobici e la regolazione di diverse interleuchine (Levy et al., 2017).

La disbiosi intestinale può inoltre, tramite metaboliti e tossine di sua produzione, influenzare lo sviluppo di patologie nell'intestino, così come in altri organi: in umana sono stati dimostrati

collegamenti fra alterazioni del microbiota intestinale e patologie come IBD, la celiachia, l'artrite reumatoide, l'asma, l'obesità, la sclerosi multipla (Levy et al., 2017).

Proprio per questi innumerevoli legami fra disbiosi intestinale e stati di malattia dell'organismo ospite, può risultare utile verificare le possibilità di azione ed influenza sulla flora batterica intestinale come tramite per agire sulla salute dell'organismo.

6. PROBIOTICI E PREBIOTICI

I probiotici sono microrganismi vivi non patogeni che, se somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite (FAO, 2001; WHO, 2002). Sono utilizzati per modificare e migliorare il microbiota dell'organismo, in particolare quello del tratto gastrointestinale. Esercitano i loro effetti tramite diversi meccanismi: diminuiscono la colonizzazione e l'invasione da parte di organismi patogeni, abbassano il pH intestinale e modificano la risposta immunitaria dell'organismo. Producono inoltre sostanze antibatteriche, competono per i nutrienti e per i siti di adesione con i potenziali patogeni, alterano il metabolismo microbico, e stimolano il sistema immunitario (Walker, 2008) (Sarowska et al., 2013).

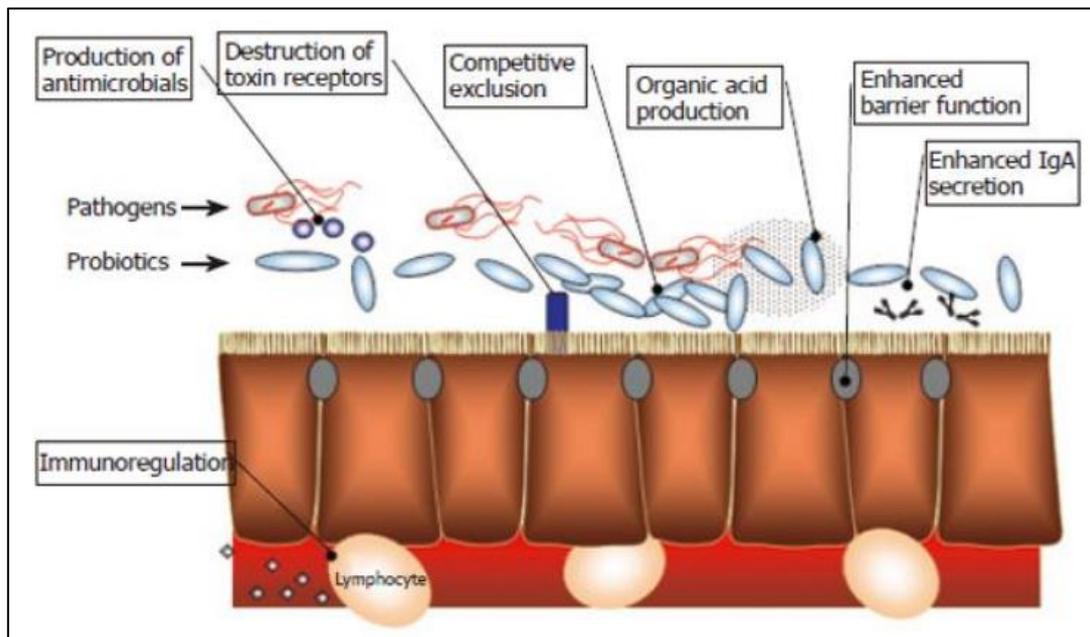


Figura 10: principali azioni dei probiotici a livello intestinale (Ewaschuk & Dieleman, 2006).

In medicina umana e veterinaria si utilizzano molteplici probiotici costituiti da diverse specie e ceppi: quelli più utilizzati nel cane appartengono ai generi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ed *Enterococcus* (Yang & Wu, 2023). I molteplici benefici che possono derivare dalla somministrazione dei diversi generi o ceppi in un individuo non necessariamente sono tali per altri individui: i risultati che si ottengono dalla somministrazione possono essere infatti molto variabili (Toedter Williams, 2010).

L'utilizzo dei probiotici è spesso accompagnato a quello di prebiotici: per prebiotico ci si riferisce a qualsiasi substrato utilizzabile dai microrganismi dell'ospite che possa dare un beneficio alla salute dello stesso. Si tratta generalmente di sostanze non metabolizzabili dall'organismo, e questo permette loro di raggiungere indisturbati la parte finale del grosso intestino per essere fermentati da parte dei probiotici; i prebiotici sono spesso costituiti da polisaccaridi/oligosaccaridi (Ahmad et al., 2019) (C. Hill et al., 2014).

Negli ultimi anni diversi studi hanno voluto dimostrare che i probiotici esercitano attività profilattiche e terapeutiche in molteplici patologie umane e con gradi di efficacia variabili, fra cui: IBD (*Inflammatory Bowel Disease*: il termine comprende un insieme di patologie infiammatorie croniche che colpiscono il tratto gastrointestinale), diarrea associata ad antibiotici, cancro del colon, allergie, diabete di tipo 2 e dermatite atopica (Liao et al., 2021) (Drago, 2019) (Nomoto, 2017) (S. O. Kim et al., 2014) (Gu et al., 2022; Simon et al., 2021). Per questo motivo stanno venendo maggiormente esplorati anche nella medicina veterinaria come possibile alternativa all'uso di antibiotici, in particolare per i loro effetti positivi quali miglioramento delle performance di crescita, miglioramento della salute intestinale e aumento della resistenza contro le infezioni (Yang & Wu, 2023).

Mentre negli ultimi anni sono aumentati gli studi riguardanti gli effetti dei probiotici, ancora sono pochi quelli riguardanti i prebiotici; i pochi condotti sembrano però essere promettenti. Si è per esempio visto come addizionando cicoria (fonte di oligosaccaridi fermentabili) a una dieta a base proteica per cani sani sia aumentata la consistenza del materiale fecale, sia calato il pH fecale, aumentata la quantità di *Bifidobacterium* e diminuita quella di *Clostridium perfringens*, in contrasto con quanto accade in animali alimentati con diete altamente proteiche non addizionate di cicoria (Zentek et al., 2003). Un altro studio riporta invece come, confrontando la composizione fecale di animali alimentati con diete a base di carne aggiunte o meno di inulina (polimero glucidico), si nota che nelle feci dei cani a cui si somministrava l'inulina c'era un aumento di acetato, propionato e SCFA totali, una diminuzione del pH e di *Cl. perfringens*, e un'invariabilità nelle quantità di *Escherichia coli*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Beloshapka et al., 2013).

6.1. MECCANISMO D'AZIONE DI PROBIOTICI E PREBIOTICI

I probiotici inibiscono la colonizzazione dell'apparato gastrointestinale da parte di microrganismi patogeni: lo fanno collaborando col microbiota commensale, interferendo con l'aderenza dei patogeni all'epitelio intestinale e inducendo la produzione di muco o di mucina; producendo molecole antimicrobiche (come le battericine), acidi organici (come l'acido lattico), tossine specifiche per i patogeni o proteasi che possono a loro volta disattivare queste tossine. I probiotici possono poi potenziare le risposte immunitarie innate o adattative delle cellule epiteliali intestinali o nelle cellule immunitarie della lamina propria, e possono regolare in positivo e in negativo alcuni meccanismi cellulari di difesa non specifici, come la produzione di inflammasomi (S. S. Schmitz, 2021).

In particolare, per potenziare la risposta immunitaria adattativa locale, i probiotici stimolano la maturazione e la proliferazione delle cellule T; regolano la quantità di citochine pro- e antinfiammatorie e inducono la produzione di IgA (Yang & Wu, 2023) (S. S. Schmitz, 2021). Quest'ultimo punto risulta essere particolarmente rilevante poiché le IgA, anticorpi sintetizzati localmente, svolgono una importante funzione di protezione delle mucose, in questo caso delle mucose intestinali; le IgA legano e neutralizzano antigeni estranei all'organismo, appartenenti a microrganismi o tossine. È stato recentemente studiato anche come le IgA siano in grado di contribuire attivamente all'inizio dell'infiammazione. (Hansen et al., 2019).

Per simbiotici ci si riferisce invece a prodotti che sono l'unione di probiotici e prebiotici, che insieme agiscono in sinergia; dal momento che i prebiotici forniscono ai probiotici l'energia necessaria per agire, l'azione dei due insieme è potenziata rispetto a quella del singolo probiotico, creando un rapporto di simbiosi (Sharma et al., 2019). In figura 11 si riassumono alcune delle principali attività simbiotiche di probiotici e prebiotici.

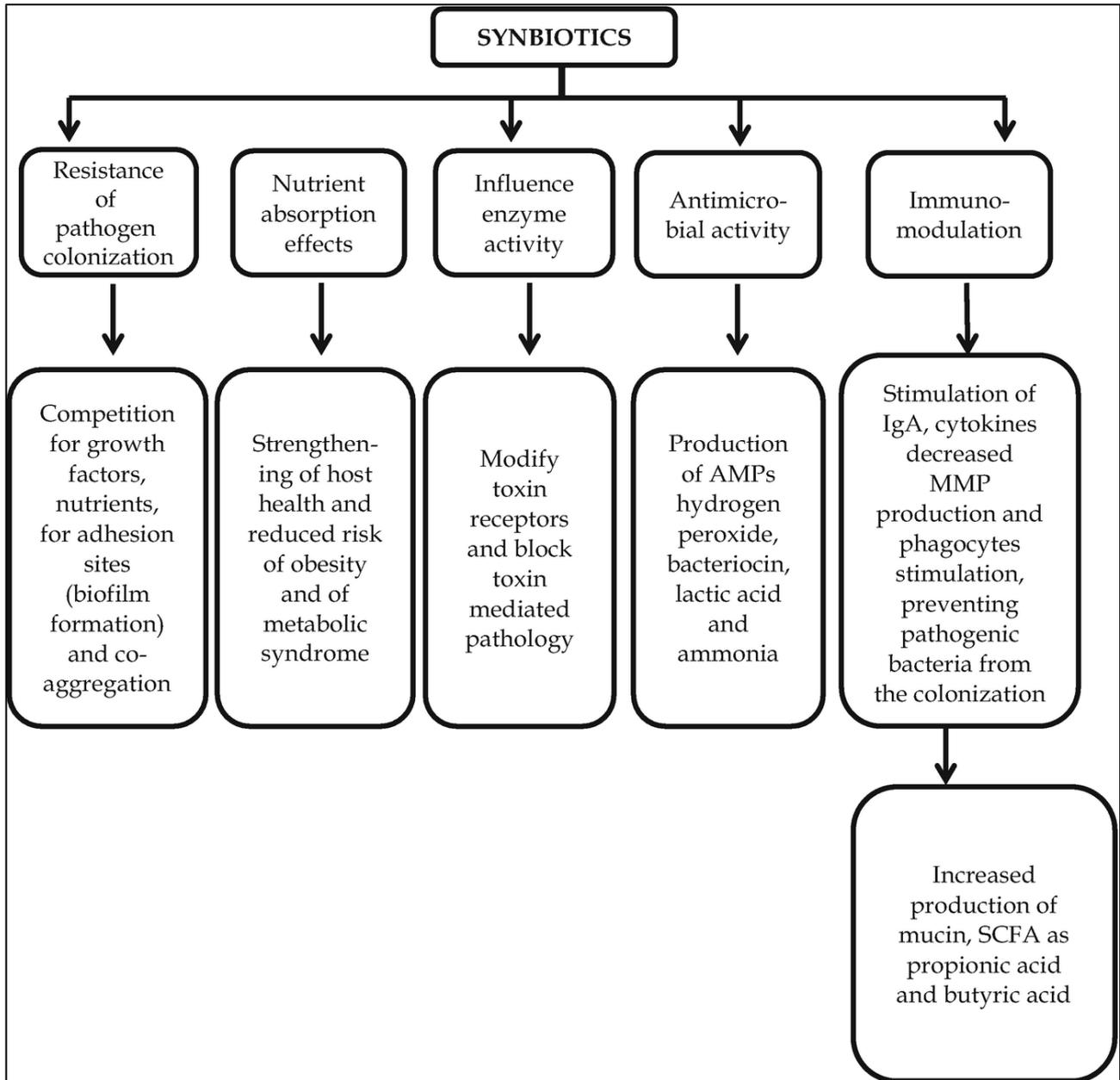


Figura 11: principali azioni simbiotiche di probiotici e prebiotici (Sharma et al., 2019).

Risulta chiaro come i probiotici e i prebiotici vanno ad agire in modo diretto sul microbiota intestinale, potenziandolo; dato che come si diceva in precedenza agendo sul microbiota si può pensare di influenzare la salute dell'ospite, se ne deduce che tramite la somministrazione di probiotici e prebiotici si può condizionare positivamente lo stato fisico dell'organismo.

6.2. PROBIOTICI USATI NEL CANE

Nella tabella sottostante (tabella 4) si riporta una lista di ceppi batterici di origine canina usati come probiotici nei cani. Si distingue l'origine dei ceppi batterici, che in altri casi potrebbero provenire da altre specie animali, dall'uomo, da alimenti, etc.

Ceppi batterici	Gruppo	Testato per	Risultato	Fonte
<i>Bifidobacterium animalis</i> AHC7	Cani giovani con diarrea acuta	Valutazione di gestione di diarrea acuta	Riduzione della diarrea in confronto al gruppo placebo	(Kelley et al., 2009)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> MP01, <i>Lactobacillus plantarum</i> MP02	Cani di 1 mese di età	Valutazione per la prevenzione di infezioni gastrointestinali nei cuccioli	Aumento di <i>Lactobacillus</i> e <i>Faecalibacterium</i> fecali, aumento degli SFCA nelle feci, prevenzione delle infezioni GI	(Fernández et al., 2019)
<i>Lactobacillus murinus</i> LbP2	Cani con diarrea associata a cimurro	Valutazione dello stato fecale e mentale	Miglioramento significativo della consistenza fecale, dello stato mentale e dell'appetito	(Delucchi et al., 2017)
<i>Lactobacillus johnsonii</i> CPN23	Cani, razza Labrador, femmine adulte	Valutazione di gestione di nutrienti e metaboliti fermentanti fecali	Aumento di digestione della fibra cruda, aumento SFCA fecali, riduzione concentrazione ammoniacale fecale	(Kumar et al., 2017)

<i>Lactobacillus fermentum</i> CCM 7421	Cani con disordini gastrointestinali	Valutazione di campioni di sangue e microbioma fecale	Aumento proteine totali, colesterolo e ALT nel sangue, aumento di batteri acido-lattici e diminuzione dei <i>Clostridia</i> , feci di consistenza normale (soggetti con diarrea)	(Strompfová et al., 2017)
<i>Lactobacillus fermentum</i> AD1	Cani sani	Valutazione di campioni di sangue e microbioma fecale	Aumento dei lipidi e delle proteine totali nel sangue, diminuzione glicemia, aumento di <i>Lactobacillus</i> ed <i>Enterococcus</i> fecali	(Strompfová et al., 2006)
<i>Bifidobacterium animalis</i> B/12	Cani sani	Valutazione di campioni di sangue e microbioma fecale	Diminuzione trigliceridi e albumina nel sangue, aumento ALT e ALP, aumento di acido acetico, acetoacetico e valerico nelle feci	(Strompfová et al., 2014)
<i>Lactobacillus johnsonii</i> CPN23	Cani femmine adulte	Valutazione di campioni di sangue	Diminuzione glicemia e colesterolo nel sangue	(Kumar et al., 2016)
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 32820	Cani sani	Valutazione di campioni di sangue	Diminuzione della concentrazione di glucosio sierico	(Strompfová et al., 2019)

Tabella 4: principali probiotici di origine canina usati nel cane.

Dagli studi precedenti si evidenziano numerosi benefici derivanti dall'utilizzo dei probiotici: fra questi ci sono il miglioramento della consistenza fecale, l'aumento di batteri 'buoni' nelle feci, un miglioramento della digestione e la regolazione di alcuni parametri sanguigni.

Nella tabella sottostante (tabella 5) si elencano invece alcuni studi condotti sull'utilizzo di probiotici di origine non canina nel cane.

Ceppi batterici	Origine	Gruppo testato	Testato per	Risultato	Fonte
<i>Lactobacillus casei</i> Zhang, <i>Lactobacillus plantarum</i> P-8, <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> V9	<i>Lactobacillus casei</i> Zhang (kumis) <i>Lactobacillus plantarum</i> P-8 (prodotti latte fermentati di origine cinese) <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> V9 (feci di un bambino sano di origini mongole)	Cani giovani, in addestramento e anziani	Valutazione dello stato di nutrizione, dell'immunità e della composizione microbica fecale	Aumento dell'intake giornaliero di cibo nei cani anziani. Miglioramento dell'aumento di peso giornaliero in tutte le categorie di cane. Aumento del livello di IgG sieriche, IFN- α , e sIgA fecali e contemporanea riduzione del TNF- α .	(Xu et al., 2019)

				Aumento batteri ‘buoni’ e diminuzione di batteri potenzialmente patogeni.	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> D2/CS L	Tratto intestinale di polli sani adulti	Cani sani	Valutazione dello stato di nutrizione e fecale	Aumento del BCS (body condition score) rispetto al gruppo di controllo. Effetto positivo sulla consistenza fecale.	(Marelli et al., n.d.)
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Feci di un neonato umano allattato con latte materno	Cani con diarrea	Valutazione dell’effetto della somministrazione di metronidazolo con <i>Enterococcus faecium</i> SF68 per il	Somministrando sia il metronidazolo che il probiotico si ha avuto un miglioramento dei sintomi maggiore	(Fenimore et al., 2017)

			trattamento della diarrea	che somministrando solo il metronidazolo. Nel gruppo di animali trattati con antibiotico e probiotico sono state eliminate anche le cisti di Giardia.	
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Feci di un neonato umano allattato con latte materno	Cani sani	Valutazione di campioni di sangue	Diminuzione della concentrazione media di colesterolo. Aumento della concentrazione media di trigliceridi.	(Lucena et al., 2019)

Tabella 5: principali probiotici di origine non canina utilizzati nel cane.

Anche nei casi riportati in questa tabella gli effetti derivanti dall'utilizzo di probiotici sono generalmente buoni: oltre al miglioramento della consistenza fecale e di alcuni parametri sanguigni che risultavano anche negli studi citati nella tabella precedente, si nota in questo

caso anche una miglioria della condizione corporea (BCS); particolarmente interessante risulta la prova riportata alla terza riga. Si tratta infatti di uno dei pochi studi riportati in letteratura che analizza l'utilizzo di probiotici contemporaneamente ad altri trattamenti farmacologici: in particolare evidenzia come la terapia a base di probiotico e antibiotico sortisca sulla salute dell'organismo effetti migliori rispetto alla terapia a base di solo antibiotico.

6.3. PROBIOTICI PER RAFFORZARE IL SISTEMA IMMUNITARIO

È ormai noto lo stretto rapporto che intercorre tra il microbiota intestinale e l'immunità adattativa della mucosa intestinale. I microrganismi commensali sono infatti cruciali per lo sviluppo e il mantenimento del sistema immunitario dell'organismo ospite, in particolare per la risposta immunitaria che viene messa in atto dall'intestino stesso.

Per comprendere al meglio l'influenza che il microbiota ha sull'immunità intestinale è importante menzionare che l'immunità adattativa locale è principalmente costituita dal GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), che a sua volta include i follicoli linfoidi (le placche di Peyer (PP)), i linfociti effettori della lamina propria, ovvero i linfociti intraepiteliali (IELs) e tutta una serie di altre molecole fra cui le cellule dendritiche (DC). Come già detto anche in precedenza, l'immunità adattativa locale è fondamentale nel mantenimento della tolleranza immunitaria nei confronti dei microrganismi commensali (Mörbe et al., 2021).

Il microbiota è prima di tutto coinvolto nella differenziazione delle cellule T CD4+ e delle cellule produttrici di IgA (effettrici dell'immunità locale, sono anticorpi prodotti localmente). In particolare, grazie alla stimolazione operata dai microrganismi commensali, le APC (*antigen-presenting cells*, di cui fanno parte anche le cellule dendritiche) presentano gli antigeni alle cellule T CD4+, che si differenziano in Treg e diverse cellule T helper come IFN- γ , IL-4, Th1 produttrici di IL-17, Th2 e Th17. Le cellule Th17 e Treg sono fra le cellule effettrici più operative della risposta immunitaria attiva nell'apparato enterico. Un ruolo importante nell'immunità ce l'hanno anche gli SCFA prodotti dal microbiota: questi, infatti, influenzano le cellule immunitarie tramite modificazioni epigenetiche, modificando la differenziazione e la funzione delle cellule (L. Wang et al., 2019).

Il microbiota comunica con le cellule immunitarie principalmente in due modi: tramite metaboliti batterici e tramite componenti batteriche. I metaboliti prodotti dai microrganismi intestinali, come gli SCFA, influenzano direttamente le funzioni delle cellule immunitarie; per esempio, il butirrato promuove la generazione di cellule Treg (tramite l'inibizione epigenetica dell'istone deacetilasi HDAC), contribuendo in questo modo alla tolleranza

immunitaria e prevenendo l'infiammazione intestinale. I componenti batterici del microbiota invece, che sono spesso componenti delle pareti batteriche come i lipopolisaccaridi (LPS), attivano le cellule immunitarie, inducendo una risposta infiammatoria che, se non regolata, può portare a malattie infiammatorie croniche. Il microbiota può quindi indurre o inibire la risposta immunitaria locale intestinale (Kayama et al., 2020).

A loro volta, oltre a essere influenzate dal microbiota, anche le cellule immunitarie intestinali possono controllare il microbiota. Per esempio, le cellule linfoidi innate (ILC) e altre cellule immunitarie influenzano la diversità batterica promuovendo la crescita di determinati batteri commensali attraverso la secrezione di citochine e altri mediatori. Queste interazioni in entrambe le direzioni fra microbiota intestinale e cellule immunitarie sono fondamentali nella prevenzione da parte dell'organismo di patologie autoimmuni e infiammatorie fra cui l'IBD, e in generale per il mantenimento dell'omeostasi intestinale (Kayama et al., 2020).

Essendo il microbiota così strettamente legato all'immunità locale intestinale, sono molto importanti le conseguenze che la disbiosi intestinale può avere sulla risposta immunitaria. La disbiosi altera infatti il sistema immunitario tramite diversi meccanismi, influenzando sia l'immunità innata che quella adattativa. Sulla prima, la disbiosi agisce modificando i segnali derivanti dal microbiota e dai suoi metaboliti, influenzando l'attivazione della risposta immunitaria: un microbiota alterato può infatti produrre molecole meno immunogeniche (per esempio con forme di LPS meno attivanti), che portano ad un'attivazione differente dei TLR e ad una minore tolleranza nei confronti dei metaboliti batterici. In questo modo, può aumentare la probabilità di sviluppare patologie autoimmuni. Per quanto riguarda l'immunità adattativa, uno stato di disbiosi può alterare l'equilibrio che si trova normalmente fra diverse cellule Th e Treg, aumentando la predisposizione a patologie infiammatorie e autoimmuni. Inoltre, un'alterazione del microbiota può contribuire al mantenimento di uno stato patologico derivante da altre cause: i microrganismi patogeni proliferano in condizioni infiammatorie e aggravano ulteriormente lo stato di disbiosi, portando a un circolo vizioso in cui il sistema immunitario mantiene uno stato di attivazione cronica (Levy et al., 2017).

Anche i probiotici, come il microbiota, possono interagire con le cellule immunitarie intestinali modulando le funzioni del sistema immunitario; sebbene siano ampiamente

riconosciute le proprietà salutari che i probiotici hanno sull'organismo, i meccanismi alla base delle loro interazioni con le cellule immunitarie sono ancora in fase di studio, e sono necessarie ulteriori ricerche per comprenderle perfettamente. In qualsiasi caso, queste interazioni avvengono principalmente in tre modi: i probiotici possono aderire alle cellule epiteliali intestinali e attivarle tramite determinati recettori (PRR, *Pattern Recognition Receptors*, i recettori di riconoscimento del pattern); i probiotici possono poi stimolare la produzione di citochine che attivano le cellule Treg, particolarmente importanti per mantenere l'omeostasi immunitaria intestinale. Infine le cellule dendritiche (DC) appartenenti al GALT possono, captando ed elaborando i probiotici, presentare antigeni alle cellule T per indirizzare la risposta immunitaria verso la produzione e differenziazione di Th1, Th2, Th17 o Treg, a seconda dei segnali provenienti dai probiotici captati e dall'ambiente intestinale. Fra le cellule T, le Th1 promuovono una risposta immunitaria cellulo-mediata attiva contro infezioni intracellulari, le Th2 favoriscono una risposta umorale associata invece alla produzione di anticorpi, le Th17 inducono una risposta pro-infiammatoria che oltre a essere utile nelle infezioni extracellulari, se non regolata può contribuire a infiammazioni croniche; le Treg favoriscono la tolleranza immunitaria e diminuiscono l'infiammazione.

Andando più nello specifico per quanto riguarda l'aderenza dei probiotici alle cellule epiteliali intestinali, questo contatto permette loro di stabilire un rapporto diretto con la mucosa, tramite la quale possono esercitare molti dei loro effetti benefici. Le cellule epiteliali sono dotate di PRR, fra cui i TLR (*Toll-like receptors*); questi recettori riconoscono specifiche componenti dei probiotici (lipopolisaccaridi, peptidoglicani e altre componenti della parete) e attivano la cellula epiteliale. Questa attivazione porta alla produzione di citochine e altri mediatori dell'infiammazione, che possono modulare la risposta immunitaria locale.

Quando le cellule epiteliali vengono attivate rilasciano citochine; queste possono comunicare con le cellule immunitarie favorendo, a livello intestinale, tolleranza immunitaria nei confronti dei probiotici o, al contrario, una risposta immunitaria contro questi. Le citochine rilasciate possono promuovere la differenziazione e l'attivazione delle cellule Treg, con l'obiettivo di mantenere stabile l'omeostasi intestinale tramite la prevenzione di risposte immunitarie eccessive o indesiderate, che potrebbero in alcuni casi arrivare anche a causare

danni alla mucosa intestinale. La maggiore utilità delle Treg a livello intestinale è infatti quello di mantenere l'equilibrio fra tolleranza e risposta immunitaria, al fine di prevenire malattie autoimmuni e infiammazioni croniche (Mazziotta et al., 2023).

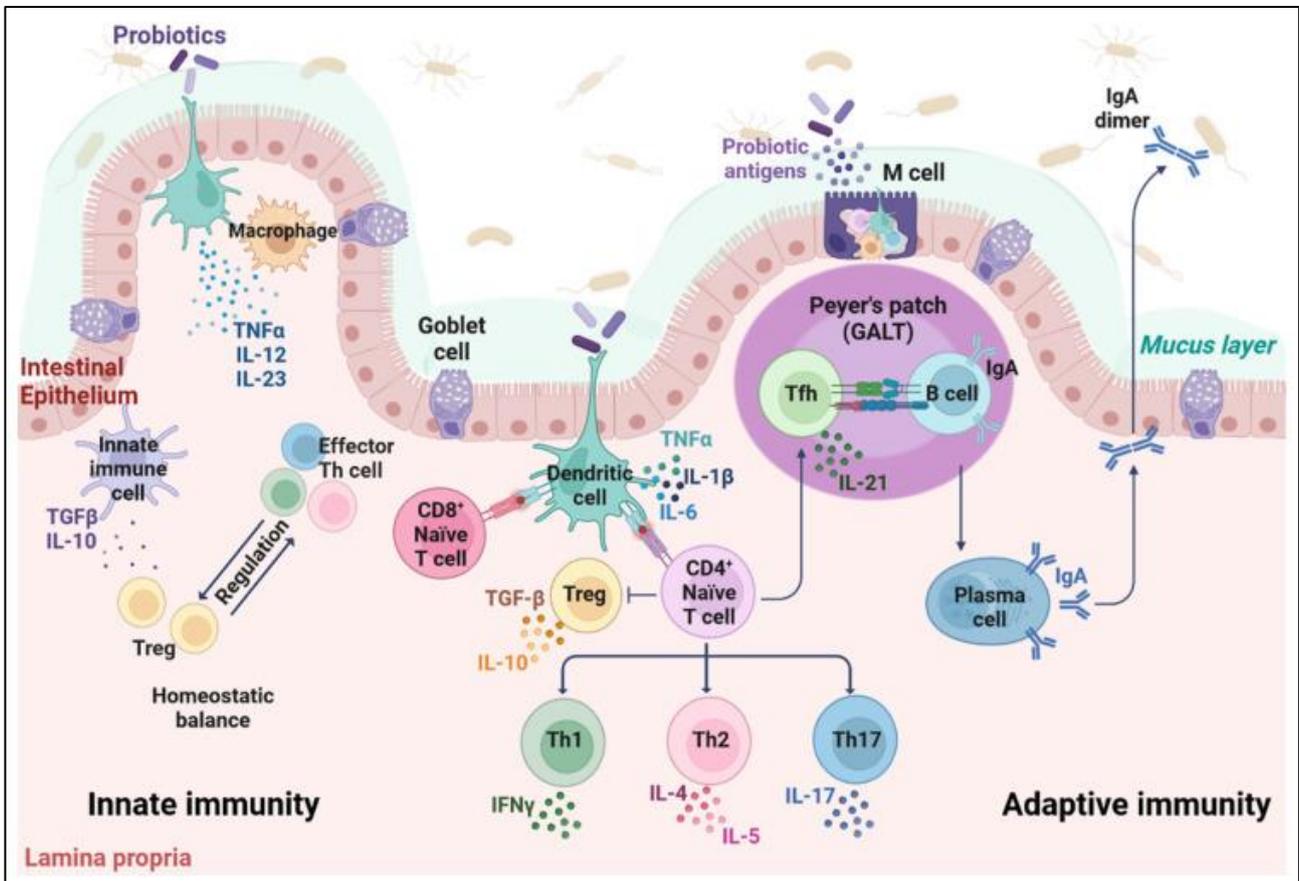


Figura 12: rappresentazione schematica delle interazioni fra probiotici e cellule immunitarie intestinali (Mazziotta et al., 2023).

Altro importante ruolo che i probiotici hanno a livello intestinale è quello di migliorare la funzione della barriera epiteliale modulando le *tight junctions* (TJ). Le tight junctions sono proteine transmembrana che, posizionate nella parte più apicale delle cellule epiteliali intestinali, collegano le cellule epiteliali, formando una membrana extracellulare che impedisce il passaggio non voluto di acqua e soluti attraverso la mucosa intestinale. Quando l'espressione o la localizzazione delle TJ è alterata, la funzionalità della barriera protettiva epiteliale è compromessa, e la permeabilità intestinale modificata: a causa di questa alterazione l'organismo (umano o animale) può sviluppare molteplici condizioni patologiche, fra cui IBD e IBS, entrambe caratterizzate da costante infiammazione e danni ai tessuti. Già

si sa che la dieta può regolare l'espressione delle TJ, e similamente, anche i probiotici paiono in grado di farlo; in particolare, nell'uomo è stato provato che molti ceppi sono in grado di modificare positivamente l'espressione di queste proteine transmembrana (La Fata et al., 2018; Ulluwishewa et al., 2011).

Fra i ceppi studiati, *Lactobacillus rhamnosus* GG è stato provato prevenire i cambi della barriera epiteliale indotti solitamente da *E. coli* enteroemorragico (Johnson-Henry et al., 2008), *Lactobacillus casei* è stato provato proteggere l'epitelio da *E. coli* enteropatogeno e inibire la redistribuzione della TJ ZO-1 normalmente causata da *E. coli* (Parassol et al., 2005). È stato dimostrato anche come *Lactobacillus plantarum* aumenti l'espressione di alcune TJ, fra cui ZO-1 e ZO-2, aumentando l'espressione di alcuni geni coinvolti nelle segnalazioni rivolte alla barriera intestinale (Anderson et al., 2010).

Alcuni probiotici, nell'uomo, sono stati provati modulare l'espressione di TJ senza influire sull'espressione genica, ma agendo invece alterando la fosforilazione delle proteine componenti delle TJ; fra questi, *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus* (La Fata et al., 2018).

Sempre nell'uomo, è stato provato come alcuni probiotici possono regolare la secrezione di mucina da parte delle cellule epiteliali intestinali, influenzando le proprietà dello strato mucoso e quindi indirettamente il sistema immunitario intestinale: fra questi *E. Coli* Nissle, *Lactobacillus casei* GG, *Lactobacillus plantarum*, e altre specie di *Lactobacilli*, alcune specie di *Bifidobacteria* fra cui *infantis*, *breve* e *longum*, e *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermofilus*. Questi ceppi agiscono alterando l'espressione geni che regolano la produzione di muco (Caballero-Franco et al., 2007; Hafez, 2012; Mattar et al., 2002).

Nell'uomo si è verificato anche come alcuni probiotici hanno effetti antimicrobici diretti: *Lactobacillus brevis* influenza il sistema immunitario locale tramite la produzione di una specifica batteriocina (brevicina 925A), e così sembra fare anche *Lactobacillus plantarum* (Wada et al., 2009). Anche *Lactobacillus salivarius* contribuisce secernendo una serie di peptidi agenti come batteriocine (Corr et al., 2007).

In sintesi, i probiotici a livello intestinale interagiscono con il sistema immunitario aderendo alle cellule epiteliali, attivandole (tramite PRR) e condizionando la produzione di citochine. Attraverso il contatto con le cellule epiteliali avviene anche la regolazione delle cellule T, fra le quali sono particolarmente importanti le Treg, con la funzione di mantenere l'omeostasi immunitaria a livello locale. I probiotici sono poi in grado di potenziare la barriera intestinale regolando l'espressione delle tight junctions, aumentando la secrezione di muco e producendo sostanze antibatteriche. Si può in definitiva dire che l'effetto dei probiotici sul sistema immunitario intestinale sia di beneficio, e nonostante buona parte degli studi condotti finora a riguardo siano stati svolti sull'uomo, possiamo dedurre che lo stesso effetto sia presente anche nel cane.

6.4. PROBIOTICI E ANTIBIOTICI

Da quando sono stati scoperti, e soprattutto negli ultimi decenni, l'utilizzo di antibiotici è cresciuto esponenzialmente, sia in medicina umana che in medicina veterinaria. Tuttavia, man mano che il loro utilizzo aumenta, aumentano di pari passo anche i problemi correlati, fra questi l'antibiotico resistenza. Per antibiotico resistenza si intende la capacità di un ceppo batterico di resistere al trattamento con uno specifico antibiotico a causa di una mancata sensibilità a questo. A causa di questa difficoltà e a causa delle conseguenze negative che talvolta gli antibiotici possono avere sull'organismo (fra le principali disturbi enterici come la diarrea), negli ultimi anni si comincia a considerare l'assunzione di probiotici e prebiotici come un'alternativa o un ausilio agli antibiotici, e come una possibilità per combattere l'antibiotico-resistenza. Considerati generalmente privi di pericoli, i probiotici vengono utilizzati come ausilio alla flora batterica già propria dell'ospite per trattare numerose patologie gastroenteriche fra cui la diarrea causata da antibiotici, IBS e IBD, patologie come infezioni vaginali (in medicina umana) e per il potenziamento del sistema immunitario (Huemer et al., 2020) (Nami et al., 2015).

In medicina veterinaria è ancora scarsamente esplorato il rapporto tra probiotici ed antibiotici, e anche in medicina umana si è cominciato ad approfondirlo solo negli ultimi due decenni. Date però le similarità nella composizione del microbiota intestinale e nella sua azione fra la specie umana e canina, si può presumere che gli studi condotti in umana possano essere utilizzati come base iniziale per comprendere la relazione fra antibiotici e probiotici anche nel cane (Deng & Swanson, 2015).

È risaputo come il trattamento con antibiotici causi, nell'uomo e nel cane, un disequilibrio della flora intestinale, diminuendone la diversità e generando così una possibilità di colonizzazione da parte di patogeni esogeni. A seconda dell'antibiotico usato il microbiota può impiegare da settimane a mesi per ripristinare il proprio equilibrio. Per anticipare questa risoluzione pare si possa supplementare l'organismo con dei probiotici: nonostante ancora non si conoscano nello specifico i meccanismi tramite cui lo fanno, nel 2015 si è documentato come in topi sotto terapia antibiotica la contemporanea somministrazione di probiotici portasse a una maggiore diversità nella popolazione batterica intestinale, anche se non

abbastanza importante da essere statisticamente significativa. La somministrazione dei probiotici durante il periodo di guarigione portava invece a risultati significativi: i soggetti che venivano supplementati mostravano una soppressione dell'iperproliferazione di *Enterobacteriaceae* (come *Shigella* ed *Escherichia coli*, notoriamente organismi patogeni), mentre i soggetti che non ricevevano i probiotici mostravano vari gradi di infezione dovuta agli stessi microrganismi. Si è anche notato come la somministrazione di probiotici portasse all'eliminazione dei *Bacteroidetes* (patogeni) e all'aumento dei *Firmicutes* (commensali) nel microbioma fecale (Grazul et al., 2016).

Nel 2006 è stata pubblicata una review in cui sono stati compresi 31 studi randomizzati in doppio cieco condotti in umana sull'utilizzo di probiotici nella prevenzione della diarrea associata ad antibiotici (AAD) e nel trattamento della diarrea associata ad infezione da *Clostridium difficile* (CDD). In 25 di questi RCTs (*randomized controlled trials*) i probiotici hanno ridotto significativamente il rischio di AAD; in altri 6 RCTs i probiotici avevano invece un'efficacia significativa nel trattamento di CDD. Dall'insieme delle prove sono risultati significativamente efficaci sulla prevenzione di AAD tre tipi di probiotici: *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii* e mix di diversi probiotici; solo *S. boulardii* è sembrato efficace su CDD (McFarland, 2006).

Nel 2012 si è poi svolto un altro studio per verificare l'utilità dei probiotici nella prevenzione e nel trattamento della AAD nell'uomo. Due revisori indipendenti hanno identificato diversi studi randomizzati e con gruppi di controllo sull'utilizzo di probiotici (in particolare *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*) per la prevenzione o il trattamento della AAD, e ne hanno estratto i risultati e verificato la qualità. Dagli 82 studi rientrati nella doppia review si evince che la somministrazione di probiotici risulta utile nella riduzione della manifestazione della AAD. Dal momento che nelle diverse prove venivano però utilizzati differenti ceppi, si ritengono necessari ulteriori studi per determinare quali probiotici abbiano maggiore efficacia, e quali ceppi possano essere più utili per pazienti che hanno ricevuto determinati antibiotici (Hempel et al., 2012).

Nel cane fino ad oggi sono stati svolti pochissimi studi riguardo l'effetto dei probiotici sulla AAD, ma uno di questi dimostra l'efficacia di *Saccharomyces boulardii* (un lievito) nel

trattare la diarrea indotta da lincomicina. Durante la prova si sono divisi i soggetti in tre gruppi: a tutti e tre i gruppi è stata somministrata la lincomicina, ma solo al secondo e al terzo gruppo è stato somministrato il probiotico. Nel secondo gruppo il probiotico è stato somministrato dopo la comparsa della diarrea indotta dall'antibiotico, mentre nel terzo il probiotico è stato somministrato insieme all'antibiotico. Durante la prova, l'antibiotico ha causato diarrea solo nei soggetti appartenenti ai primi due gruppi, e nei soggetti del secondo gruppo la durata dei sintomi era significativamente minore (Aktas MS, 2007).

Nonostante gli studi condotti sulla relazione tra probiotici e antibiotici (sull'utilizzo dei probiotici per limitare il danno indotto dagli antibiotici) siano ancora piuttosto scarsi e superficiali, da quelli già condotti (soprattutto sull'uomo) si può intuire qualcosa: la terapia con probiotici risulta essere utile come prevenzione e trattamento di patologie causate da antibiotici, tramite la loro somministrazione contemporanea o successiva al trattamento antimicrobico.

Si è precedentemente citato anche il problema dell'antibiotico resistenza: oltre all'utilizzo dei probiotici per attenuare i danni causati dagli antibiotici sull'organismo, si può considerare una loro ulteriore utilità in questa direzione. Data la sempre maggiore importanza del problema dell'antibiotico resistenza in medicina umana e veterinaria, è necessario nel breve futuro ricercare alternative all'utilizzo di antibiotici. Oltre ad altre sostanze antimicrobiche che si stanno venendo a conoscere (per esempio a base di metalli, piante e nano particelle), si ipotizza che anche l'utilizzo di sostanze a bassi effetti collaterali come i probiotici possa essere una possibilità (Aghamohammad & Rohani, 2023).

Tramite le numerose funzioni antibatteriche che svolgono a livello intestinale (figura 12) i probiotici, in sinergia con i prebiotici, possono inibire la colonizzazione e la crescita dei patogeni esogeni: anche per questo si pensa possano essere sviluppati come una strategia alternativa per combattere l'antibiotico resistenza. Lo farebbero non solo bilanciando i disequilibri che possono colpire la flora intestinale in caso di presenza di patogeni esogeni, ma anche inibendo direttamente la colonizzazione e la crescita di questi e regolando il sistema immunitario dell'organismo (Sharma et al., 2019). Per questo, nonostante gli studi a riguardo

siano ancora molto scarsi, si ipotizza che i probiotici possano in futuro essere usati anche con questo scopo.

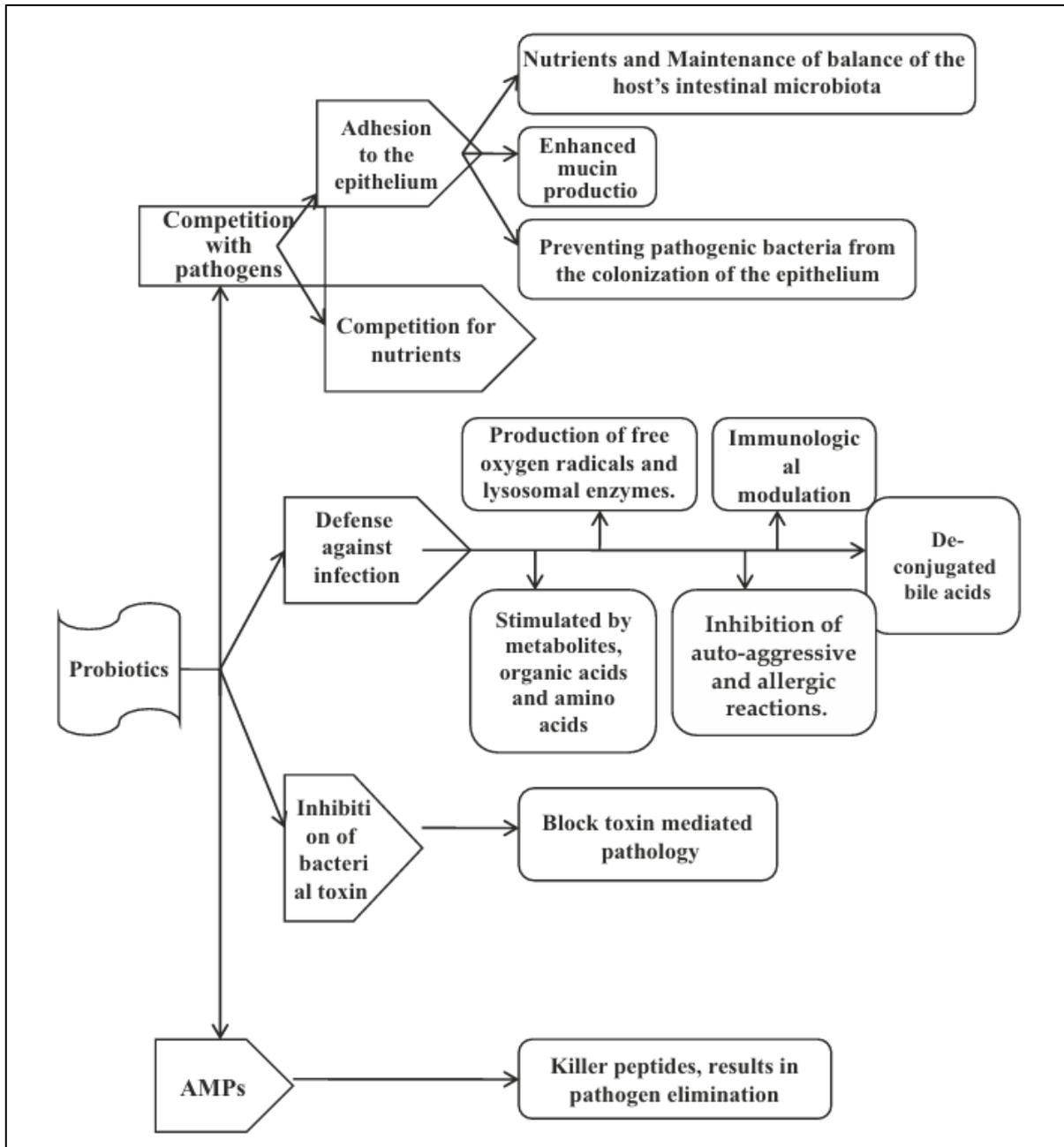


Figura 13: principali meccanismi d'azione antibatterici dei probiotici (Sharma et al., 2019).

In definitiva si può affermare che i probiotici nell'uomo sono in grado di svolgere una grande funzione di ausilio ai trattamenti antibiotici, in particolare diminuendone le conseguenze negative sulla salute dell'organismo: è sicuro, infatti, il loro ruolo nel diminuire la gravità e

la frequenza della diarrea associata ad antibiotici. Si ipotizza anche che siano in grado, interagendo con l'organismo, di contrastare l'antibiotico resistenza (gli studi a riguardo sono ancora troppo scarsi per affermarlo con sicurezza). Inoltre, anche in alcuni degli studi precedentemente riportati si accennava all'utilizzo di probiotici e prebiotici come sostituti degli antibiotici: nelle prove finora condotte, in particolare in quelle sopra descritte, non ci sono indizi del fatto che i probiotici possano essere dei validi sostituti agli antibiotici, come si è in passato ipotizzato, ma non si esclude che in futuro si possano scoprire loro funzioni a questa affini. I risultati ottenuti dalle prove condotte sull'uomo, per la similarità nel meccanismo d'azione dei probiotici e nel funzionamento del microbiota intestinale, possono essere considerati validi anche nel cane; in medicina veterinaria, infatti, ancora non si sono svolti studi a riguardo.

6.5. PROBIOTICI E PROPAGAZIONE DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA

I microrganismi parte del microbiota intestinale sono finora stati sempre considerati innocui per l'organismo, se non benefici. Recentemente, grazie ad alcuni avanzamenti in tecnologie di sequenziamento, è sorto il dubbio che questi microrganismi possano contribuire alla propagazione dell'antibiotico resistenza; questo può accadere in particolare tramite la trasmissione di plasmidi tra commensali e patogeni esogeni, e in particolare è stata identificata la trasmissione genetica tramite questi di resistenza ai β -lattamici. Allo stesso modo, è stata documentata l'acquisizione di resistenza ai chinoloni (Anthony et al., 2021).

Così come i commensali possono trasmettere i geni responsabili dell'antibiotico-resistenza, pare che anche i probiotici possano fare lo stesso, comunicando allo stesso modo con i batteri commensali e con i batteri patogeni. Sia studi in vivo che in vitro hanno provato infatti il ruolo di reservoir di geni di resistenza che i probiotici possono svolgere, andando a falsificare l'idea che fossero totalmente privi di rischi (Daniali et al., 2020). È ancora comunque un'ipotesi poco approfondita, e sarebbero necessarie ulteriori prove per verificarne a pieno la validità.

6.6. PROBIOTICI IN PATOLOGIE ENTERICHE ACUTE

Le patologie enteriche acute su cui è stato testato il trattamento tramite probiotici (o simbiotici, quindi probiotici con l'aggiunta di prebiotici) comprendono patologie infettive e infestive (virali, batteriche, parassitarie / protozoarie), patologie idiopatiche o indefinite (in cui una componente infettiva potrebbe esserci o meno) e diarrea associata ad antibiotici.

Di seguito (tabella 6) si riportano alcuni studi condotti nel cane sul trattamento tramite probiotici della diarrea acuta svolti negli ultimi venti anni.

Probiotico o simbiotico utilizzato	Numero soggetti testati	Patologia	Risultati	Fonte
<i>Bifidobacterium animalis</i> AHC7	121 cani	Diarrea associata a stress da canile	Significativa riduzione del tempo di risoluzione della diarrea (rispetto al gruppo placebo). Riduzione dei cani a cui si è somministrato anche metronidazolo (rispetto al gruppo placebo).	(Kelley et al., 2009)
<i>Enterococcus faecium</i> e FOS (frutto-oligosaccaridi, sono prebiotici)	733 cani	Diarrea associata a canile	Riduzione dei soggetti colpiti da diarrea. Riduzione dei soggetti con diarrea per più di un giorno (18.8% rispetto al 27.2% del gruppo placebo).	(Rose et al., 2017)
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	182 cani (di cui 80 placebo)	Diarrea associata a canile (alcuni	Cani: nessuna differenza significativa nel numero di soggetti colpiti da diarrea	(Bybee et al., 2011)

	217 gatti (di cui 87 placebo)	animali erano positivi per parassiti)	(rispetto al gruppo placebo), ma nessuno dei due gruppi è stato particolarmente colpito. Gatti: riduzione significativa della durata della diarrea (26% rispetto al 32% del gruppo placebo).	
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	20 cani (di cui 10 placebo)	Diarrea associata a Giardia (subclinica)	Nessuna differenza significativa né nell'eliminazione di larve di Giardia né nella quantità di antigeni fecali.	(Simpson et al., 2009)
Derivato del latte contenente <i>Lactobacillus fermentum</i>, <i>Lactobacillus rhamnosus</i>, <i>Lactobacillus plantarum</i>	44 cani (di cui 19 placebo)	Diarrea di diverse cause e intensità	Aumento significativo della consistenza delle feci nel gruppo trattato. Diminuzione significativa della quantità di <i>C. perfringens</i> produttori di α -tossina ed <i>E. faecium</i> nelle feci in sette giorni. Maggiore frequenza di vomito nel gruppo placebo.	(Gómez-Gallego et al., 2016)
Mix di probiotici: <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014,	20 cani (di cui 10 placebo)	Diarrea da Anchilostomi, con contemporanea	Significativa riduzione del 88.8% della quantità di uova nella feci del gruppo trattato (rispetto al 11.8%	(Coêlho et al., 2013)

<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4536, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2B20		eliminazione di uova	del gruppo placebo), ma solo transitoriamente. Significativa riduzione dell'anemia causata dai parassiti nei soggetti trattati (rispetto al gruppo placebo).	
Mix di probiotici: <i>Lactobacillus acidophilus</i> MA 64/4E, <i>Lactobacillus farmicinis</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	36 cani (di cui 21 placebo)	Diarrea acuta (22 soggetti avevano anche vomito)	Riduzione significativa della durata della diarrea rispetto al gruppo placebo. Nessun cambiamento significativo per quanto riguarda la durata del vomito.	(Herstad et al., 2010)
Mix di probiotici: <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> ,	25 cani (di cui 12 placebo)	Diarrea acuta emorragica	Significativa riduzione di <i>C. perfringens</i> , e soprattutto di <i>C. perfringens</i> produttori di enterotossina, nel gruppo trattato (al settimo giorno, rispetto al gruppo placebo). Guarigione al terzo giorno (in media) per il gruppo trattato, al quarto giorno (in	(Ziese et al., 2019)

<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>			media) per il gruppo placebo. Significativo aumento della quantità di <i>Blautia</i> (anaerobi commensali) e <i>Faecalibacterium</i> al settimo giorno nel gruppo trattato (non nel gruppo placebo).	
<i>Saccharomyces boulardii</i>	24 cani	Diarrea associata ad antibiotici (lincomicina)	Significativa diminuzione della durata della diarrea nel gruppo trattato rispetto al gruppo placebo.	(Aktas MS, 2007)
Mix di probiotici: <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus</i>	60 cani	Diarrea acuta	Ritorno a una consistenza fecale normale non significativamente più breve nel gruppo trattato con probiotici (media di 3.5 giorni rispetto ai 4.8 del gruppo placebo).	(Shmalberg et al., 2019)

<i>casei,</i> <i>Lactobacillus</i> <i>brevis,</i> <i>Lactobacillus</i> <i>reuteri,</i> <i>Lactobacillus</i> <i>bulgaricus</i>				
---	--	--	--	--

Tabella 6: prove condotte nel cane sull'effetto dei probiotici nel trattamento della diarrea acuta.

In cani colpiti da diarrea acuta non complicata (diarrea idiopatica dovuta per esempio a convivenze strette in canile o a stress all'introduzione in canile) l'effetto dei probiotici è piuttosto vario. I soggetti trattati con probiotici tendono ad avere una più veloce remissione dei sintomi, ma questo risultato non è costante, nemmeno quando vengono usati gli stessi ceppi: guardando per esempio agli studi riportati in cui si usa *E. faecium* (righe 2, 3 e 4) i risultati non sono costanti. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che nel primo dei tre studi menzionati, che risulta essere quello coi risultati più positivi, insieme al probiotico è stato somministrato anche un prebiotico (Rose et al., 2017) (Bybee et al., 2011) (Simpson et al., 2009).

Particolarmente interessante risulta lo studio svolto nel 2019 sull'utilizzo di probiotici per il trattamento della diarrea acuta emorragica, solitamente associata a una iperproliferazione di *Clostridium perfringens*, in cui in seguito al trattamento con mix di probiotici la quantità di *C. perfringens* e di enterotossine nelle feci diminuisce (Ziese et al., 2019).

Per quanto riguarda gli studi che concernono la diarrea causata da parassiti i risultati sono ambivalenti: nella prova riportata riguardante la parassitosi ad opera di Giardia i probiotici non hanno apportato alcun miglioramento alla situazione clinica degli animali e tantomeno una riduzione dell'espulsione di uova (Simpson et al., 2009); nella prova riportata condotta su cani parassitati da anchilostomi i risultati sono stati migliori, con una diminuzione dell'anemia causata dai parassiti, ma la riduzione di eliminazione delle uova è stata solo transitoria (Coelho et al., 2013).

Dei probiotici come trattamento della diarrea associata ad antibiotici si è già discusso precedentemente, e i risultati delle prove condotte sono piuttosto positivi. Anche nel caso dello studio riportato in tabella sulla diarrea indotta da lincomicina l'assunzione di probiotici si è dimostrata utile nel ridurre la durata della sintomatologia (Aktas MS, 2007).

Il ruolo dei probiotici nel trattamento dei disturbi gastrointestinali ad andamento acuto risulta in definitiva dubbio: i probiotici mostrano spesso di avere degli evidenti benefici ma non sempre questi sono presenti. Per ora si sa per certo che, anche se i probiotici non sembrano avere sempre utilità e talvolta questa utilità risulta limitata, il loro utilizzo è privo di rischi. Non sono infatti riportati casi in cui la somministrazione di probiotici abbia causato danni alla salute dell'organismo: o l'effetto risulta inesistente, o è positivo.

È importante in qualsiasi caso notare che i campioni su cui si sono svolte le precedenti prove sono tutti piuttosto piccoli; le prove sono inoltre state condotte con metodologie che spesso differiscono. Sono quindi fondamentali ulteriori studi per verificare la validità dei risultati ottenuti.

6.7. PROBIOTICI IN PATOLOGIE ENTERICHE CRONICHE

Sono state svolte diverse prove anche sull'utilizzo dei probiotici sulla diarrea cronica, che per definizione si distingue da quella acuta per avere una durata superiore alle due settimane (Marks, 2013), e sono raccolte nella tabella che segue (tabella 7).

Probiotico o simbiotico utilizzato	Numero soggetti testati (cani)	Patologia	Risultati	Fonte
<i>E. faecium</i> DSM 10663 NCIMB 10415, FOS, gomma arabica (prebiotico)	12 (di cui 5 placebo)	Enteropatia cronica responsiva alla dieta	Non è stata verificata nessuna differenza significativa fra lo sviluppo della patologia nei cani trattati con simbiotico e animali trattati con placebo.	(S. Schmitz et al., 2015)
<i>E. faecium</i> DSM 10663 NCIMB 10415, FOS, gomma arabica (prebiotico)	12 (di cui 5 placebo)	Enteropatia cronica responsiva alla dieta	Lieve aumento della diversità batterica fecale nei soggetti trattati con simbiotico (non significativa statisticamente).	(Pilla et al., 2019)
<i>L. acidophilus</i> NCC2628, <i>L. acidophilus</i> NCC2766, <i>L.</i>	21 (di cui 10 placebo, entrambi i gruppi trattati anche tramite dieta)	Enteropatia cronica responsiva alla dieta	Entrambi i gruppi hanno mostrato una significativa riduzione della gravità dei sintomi, senza alcuna differenza significativa.	(Sauter et al., 2006)

<i>johnsonii</i> NCC2767			Aumento del TNF- β (antiproliferativo) solo nel gruppo placebo.	
<i>Saccharomyces boulardii</i>	13 (di cui 7 placebo, entrambi i gruppi trattati anche tramite dieta di eliminazione, tilosina o metronidazolo, prednisolone e a volte un ulteriore immunosoppressore)	IBD (alcuni con enteropatia proteino-disperdente)	CCECAI* migliorato significativamente di più nei soggetti trattati con probiotico. Riduzione significativa della frequenza di defecazione negli animali trattati con probiotico.	(D'Angelo et al., 2018)
Mix di probiotici: <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> spp., <i>B. bulgaricus</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>Sec. salivarius</i> spp.	10 soggetti trattati col mix di probiotici, 10 soggetti trattati con metronidazolo e prednisolone, 10 soggetti trattati con placebo	IBD	Significativa diminuzione dei segni clinici e delle lesioni istologiche nel gruppo trattato con probiotici. Aumento generale delle popolazioni cellulari infiammatorie nei soggetti trattati con probiotici. (diminuzione nel gruppo trattato con metronidazolo e prednisolone).	(Rossi et al., 2014b)

<i>thermophiles</i>			Aumento significativo di <i>Faecalibacterium</i> spp solo nel gruppo trattato con probiotici.	
Mix di probiotici: <i>L. casei</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. acidophilus</i>, <i>L. delbrueckii</i> spp., <i>B. bulgaricus</i>, <i>B. longum</i>, <i>B. breve</i>, <i>B. infantis</i>, <i>Sec. salivarius</i> spp., <i>thermophiles</i>	14 soggetti con trattamento “standard” e probiotici, 12 soggetti con trattamento “standard” e placebo	IBD (tutti i soggetti venivano trattati con dieta di eliminazione e prednisolone)	Nessuna differenza nella guarigione e nell’istopatologia intestinale. Aumento di <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacteria</i> fecali nei soggetti trattati con probiotici.	(White et al., 2017)

Tabella 7: prove condotte nel cane sull'effetto dei probiotici nel trattamento della diarrea cronica.

*Con il termine CCECAI ci si riferisce al *Canine Chronic Enteropathy Clinical Index*, un sistema di punteggi clinici che permette di predire il risultato clinico di un cane affetto da enteropatie croniche.

È innanzitutto importante, per analizzare gli studi precedenti, tenere conto del fatto che in buona parte delle prove svolte i soggetti non erano trattati solo con probiotici, ma anche con altre terapie a base di diete di eliminazione, talvolta antinfiammatori o antibiotici. Questo potrebbe influire sulle conclusioni che si traggono. Allo stesso modo può influire il fatto che le metodologie utilizzate e gli obiettivi posti nelle prove riportate variano molto, e che i campioni sottoposti agli studi sono ristretti.

I risultati ottenuti dalle prove riportate in tabella sono ancora più ambivalenti di quelli ottenuti studiando l'effetto dei probiotici sulle enteropatie acute: nei primi due studi, nei quali viene utilizzata la stessa combinazione di probiotico e prebiotici, il simbiotico non risulta avere importanti effetti positivi sulla guarigione dei soggetti coinvolti, e mostra solo nella seconda prova di portare a un positivo aumento della diversità batterica fecale, ma senza miglioramento della sintomatologia clinica (S. Schmitz et al., 2015) (Pilla et al., 2019).

Al contrario, l'unico studio riportato che comporti l'utilizzo di *Saccharomyces boulardii* indica degli importanti effetti benefici del probiotico, fra cui la riduzione della frequenza di defecazione dei soggetti e il miglioramento statisticamente significativo dei segni clinici. Nei soggetti coinvolti affetti da enteropatie proteino-disperdenti, la somministrazione del probiotico ha portato anche a un significativo aumento dell'albumina sierica (è comunque un risultato da rianalizzare, dal momento che solo tre cani con enteropatia proteino-disperdente sono stati trattati con *Saccharomyces boulardii*) (D'Angelo et al., 2018). Si tiene a far notare che anche nella prova con *Saccharomyces boulardii* riportata nel precedente capitolo, in cui il probiotico veniva utilizzato per il trattamento della diarrea acuta associata ad antibiotici, il risultato ottenuto era positivo.

Negli ultimi due studi menzionati è stato utilizzato lo stesso mix di probiotici: i risultati sono piuttosto divergenti. In entrambi i casi i probiotici hanno portato ad un aumento di batteri commensali nelle feci, ma si tratta di ceppi diversi; perciò, non si può dire con certezza che il beneficio sia dovuto proprio alla somministrazione del mix di probiotici. La prima delle due prove citate mostra anche una migliore remissione dei sintomi e delle lesioni nel gruppo che ha ricevuto i probiotici, ma la seconda non conferma questo risultato, non riconoscendo alcuna differenza nella guarigione e nelle lesioni fra il gruppo trattato con probiotici e il gruppo di controllo (Rossi et al., 2014b) (White et al., 2017). Questo non ci permette quindi di concludere che il mix di probiotici possa avere un effetto positivo sulla salute dei soggetti.

Esaminando i risultati delle prove riportate, l'effetto dei probiotici nel trattamento delle enteropatie croniche risulta scarso: ancora una volta è chiaro che la loro somministrazione non porta ad alcuna conseguenza negativa, ma i risultati positivi che talvolta ne derivano non sono costanti, e tenendo conto della limitazione posta dallo scarso numero di soggetti

sottomessi alle prove non si può escludere che i risultati positivi ottenuti siano frutto del caso. Per questo saranno necessari ulteriori studi per comprendere meglio il ruolo che i probiotici potrebbero (o no) avere sul trattamento delle enteropatie croniche.

Alla stessa conclusione è arrivato un lavoro pubblicato nel 2019, che ha eseguito una revisione sistematica degli studi per verificare l'utilità dei probiotici per il trattamento di patologie intestinali. Si afferma che, nonostante i dati fino a quel momento disponibili non fossero molti (negli anni successivi non sono aumentati significativamente), da questi si può comunque affermare che l'effetto dei probiotici è, per quanto riguarda le enteropatie acute e croniche, limitato e clinicamente non importante. In particolare si afferma che, per le patologie enteriche croniche, l'intervento tramite dieta pare rimanere l'approccio più efficace. Anche in questo caso gli studi presi in considerazione erano condotti su campioni ristretti, ed utilizzando metodologie molto diverse, e perciò si reputano necessarie ulteriori prove per raggiungere una migliore comprensione dall'argomento (Jensen & Bjørnvad, 2019).

6.8. PROBIOTICI E DERMATITE ATOPICA

La dermatite atopica canina è una delle più comuni patologie cutanee del cane. Si tratta di una patologia infiammatoria e pruriginosa con predisposizione genetica, caratterizzata da segni clinici ben definiti e dall'azione delle immunoglobuline E (IgE) diretta solitamente contro allergeni ambientali (Halliwell, 2006). I segni clinici più comuni della dermatite atopica canina sono: prurito (stagionale o non stagionale, o non stagionale con peggioramento stagionale), eritema, papule, pustole, croste ed escoriazioni. Sono solitamente colpite le zone della testa, del gomito, delle articolazioni del carpo e del tarso, le zampe, l'addome ventrale, il perineo e la parte ventrale della coda. La diagnosi si basa sui segni clinici caratteristici e sull'esclusione di altre patologie che causano prurito (Santoro, 2019).

Nonostante, come detto, la dermatite atopica derivi da una certa predisposizione genetica, la predisposizione del singolo animale alla patologia è influenzata anche dall'ambiente in cui questo vive e dalla sua dieta. La dieta agisce soprattutto andando ad influenzare il microbiota intestinale, il cui disequilibrio può portare a patologie anche estranee all'apparato gastrointestinale. Gli studi riguardanti il rapporto fra microbiota intestinale e dermatite atopica non sono ancora tanti, ma si sta provando come il microbiota sia strettamente collegato a fattori coinvolti nella patogenesi della patologia, come la risposta immunitaria e la risposta infiammatoria dell'organismo (Craig, 2016).

Anche in questo caso, gli studi sull'argomento sono ancora più abbondanti sull'uomo che sul cane, ma sapendo quanto il microbiota intestinale delle due specie sia simile per filogenesi e capacità funzionali, ci si può ancora una volta basare sugli studi svolti in umana per comprendere al meglio il ruolo del microbiota nella dermatite atopica anche nel cane (Deng & Swanson, 2015b). Infatti, nell'uomo sono state dimostrate differenze nella composizione microbica fecale tra pazienti affetti da dermatite atopica e soggetti di controllo sani: in particolare, la quantità di Bifidobacteria è stata trovata significativamente più bassa nei soggetti con segni clinici dermatologici più gravi, e la frequenza di comparsa di *Staphylococcus* nelle feci molto più alta in pazienti con dermatite atopica. Se ne deduce quindi che il microbiota intestinale sia strettamente collegato all'insorgenza e al peggioramento dei segni clinici (Watanabe et al., 2003).

Un altro studio condotto in umana ha analizzato e comparato il microbiota fecale di neonati che hanno poi manifestato sintomi di dermatite atopica entro i 18 mesi di vita e di neonati che invece sono rimasti sani nei loro primi 18 mesi di vita. È stato documentato come, nonostante non fossero presenti differenze significative nelle specie batteriche ritrovate fra i diversi soggetti, fosse invece presente una minore diversità batterica nelle feci dei neonati che avrebbero poi manifestato sintomi atopici entro i 18 mesi di vita (M. Wang et al., 2008).

Altri studi, eseguiti nell'uomo, documentano poi come un'esposizione precoce ad antibiotici (che possono indurre disbiosi intestinale) può portare ad un aumentato rischio di dermatite. In particolare, uno studio condotto nel 2013 che comprendeva bambini e giovani tra gli 0 e i 25 anni di età ha analizzato l'impatto dell'esposizione ad antibiotici durante la gravidanza o durante i primi 12 mesi di vita sul successivo rischio di sviluppare dermatite (in questo caso si parla di dermatite in modo più generale, non riferendosi solo alla dermatite atopica). Si è verificato che il rischio di sviluppare dermatite è più alto in persone sottoposte a trattamento antibiotico durante il primo anno di vita, ma non in quelle entrate in contatto con antibiotici durante la gravidanza; in particolare, è stato documentato come questo rischio aumenti di un 7% per ogni ulteriore trattamento antibiotico. La verificata conseguenza di questi trattamenti antibiotici è verosimilmente collegata all'effetto che questi hanno sul microbiota intestinale (Tsakok et al., 2013).

Dagli studi precedenti, e da molti altri, si deduce quanto sia stretto il rapporto tra microbiota intestinale e patologie cutanee, nello specifico la dermatite atopica. Il microbiota intestinale svolge un importante ruolo in molteplici patologie immunitarie, e si suggerisce che ci siano dei meccanismi di regolazione che intercorrono tra la cute e l'intestino, e proprio per queste situazioni di disbiosi intestinale sono frequentemente riportate in casi di dermatite atopica. In particolare, la disbiosi intestinale pare interferire con la funzione di barriera della cute: ciò avviene tramite recettori toll-like (TLR), che riconoscendo batteri presenti sulla cute e nell'intestino agiscono come ponte fra questi organi, regolando la risposta immunitaria innata e adattativa nei confronti di batteri patogeni e commensali (Fang et al., 2021).

Per questo si è approfondito come si possa agire sulla dermatite atopica manipolando il microbiota intestinale tramite diverse strategie fra cui dieta e antibiotici, ma soprattutto

probiotici e prebiotici. Si è infatti visto come alcuni ceppi batterici possiedano delle importanti proprietà di modulazione del sistema immunitario a livello di cute e di intestino (Craig, 2016).

I probiotici in particolare potrebbero essere una valida alternativa per regolare il microbiota intestinale, sopprimendo l'eccesso di microrganismi patogeni, e quindi in via indiretta alleviando i segni clinici della dermatite atopica (per i legami tra patologie cutanee e disbiosi intestinale sopra discussi). Molteplici studi sono stati fatti negli ultimi anni per capire se questa possa essere una valida strategia, e nonostante molti risultati sembrano confermarlo, ancora si ottengono talvolta risultati controversi, alle volte dovuti a un'interferenza di fattori come l'ambiente e la dieta, e sono necessari altri studi più precisi e su campioni più ampi per verificare l'efficacia dei probiotici sulla dermatite atopica (Fang et al., 2021).

In medicina umana sono state svolte numerose prove per individuare una possibile utilità di probiotici e prebiotici nel trattamento della dermatite atopica, e di seguito si analizza una review particolarmente utile. Per sintetizzare alcune prove e risultati sull'efficacia dei probiotici nella prevenzione della dermatite atopica, nel 2008 è stata fatta una revisione sistematica di 13 studi randomizzati (controllati con placebo), 10 dei quali analizzavano i probiotici come trattamento, 3 dei quali come prevenzione, per la dermatite atopica. Quattro di questi studi dimostrano una significativa diminuzione dei sintomi della dermatite atopica nei successivi due mesi dopo la somministrazione di probiotici in bambini patologici, mentre altri due studi mostrano una diminuzione significativa dei sintomi dopo il trattamento con lactobacilli solo in bambini con dermatite atopica strettamente associata ad IgE. Di questi precedenti sei studi, quattro documentano un'associazione fra miglioramento clinico e cambi in alcuni marker di infiammazione. In altri tre studi la diminuzione dei sintomi non è stata statisticamente significativa nei bambini trattati con probiotici rispetto ai bambini parte del gruppo con trattamento placebo, anche se in uno di questi studi i segni clinici erano significativamente diminuiti in bambini con allergie alimentari trattati con probiotici rispetto che placebo.

In due ulteriori studi, bambini ad alto rischio di dermatite atopica trattati con probiotici sviluppavano la patologia nei primi due anni di vita molto meno rispetto ai bambini parte del gruppo placebo. In queste prove, in periodo perinatale era stato somministrato *Lactobacillus*

rhamnosus GG alle madri, e poi il trattamento era proseguito sul neonato per i primi sei mesi di vita. Al contrario, in un ulteriore studio, né la frequenza né la gravità di dermatite atopica nel primo anno di vita dei neonati analizzati mostravano significative differenze tra figli di madri atopiche che avevano ricevuto *Lactobacillus acidophilus* nei primi sei mesi di vita e neonati che avevano ricevuto il trattamento placebo.

La review conclude quindi che la somministrazione di probiotici, in particolare di *Lactobacillus rhamnosus* GG, sembra essere efficace per la prevenzione della dermatite atopica; il probiotico sembra inoltre diminuire la gravità della patologia in circa metà degli studi analizzati. Sono comunque necessari ulteriori studi per approfondire ulteriormente le conoscenze in merito (Betsi et al., 2008).

Anche in medicina veterinaria sono stati svolti alcuni studi sull'effetto dei probiotici sulla dermatite atopica canina, anche se le conoscenze a riguardo rimangono ancora limitate rispetto alla medicina umana. Nel 2009 è stata condotta una prova su due cani di razza Beagle (un maschio e una femmina) affetti da grave dermatite atopica; i due soggetti sono stati fatti accoppiare due volte a distanza di un anno, e solo durante la seconda gravidanza alla cagna è stato amministrato *Lactobacillus rhamnosus* GG; anche ai cuccioli di questa seconda gravidanza è stato amministrato il probiotico. Entrambe le cucciolate sono state sensibilizzate ad acari *Dermatophagoides farinae*, e ogni sei settimane durante lo studio sono stati raccolti dai cuccioli campioni di sangue per misurare i titoli sierici delle IgE allergene-specifiche. A sei mesi di età, tutti i cuccioli sono stati sottoposti ad analisi intradermica per gli allergeni e a prova di campo con *D. farinae*. È risultato che nella seconda cucciolata (trattata col probiotico) i cuccioli avevano un livello significativamente più basso di IgE allergene-specifiche sieriche e una più lieve risposta all'analisi intradermica rispetto alla prima cucciolata, ma non sono state riscontrate significative variazioni nei sintomi clinici. Se ne è concluso che la somministrazione di *L. rhamnosus* GG pare ridurre gli indicatori immunologici di dermatite atopica, senza però effettivamente diminuire le manifestazioni cliniche di questa (Marsella, 2009).

Tre anni dopo questo studio si è svolto un follow-up sui cani delle due cucciolate: la cucciolata sottoposta a trattamento con probiotici (nove cani di tre anni di età) e quella non sottoposta a

trattamento (sette cani di quattro anni di età). I soggetti sono stati messi alla prova con ulteriori allergeni (ambrosia e fleolo) e con *D. farinae*. Si è andato a misurare le IgE allergene-specifiche, IL-10 (interleuchina 10, inibisce la sintesi di citochine pro-infiammatorie) e TGF- β (transforming growth factor β , una citochina) prima e dopo la prova tramite allergeni, e ne è risultato che: IL-10 per tutti gli allergeni era significativamente più alto nel gruppo di controllo che nel gruppo precedentemente trattato con probiotici, le IgE allergene-specifiche e il TGF- β non mostravano differenze fra le diverse cucciolate. È stata documentata però una persistente diminuzione dei segni clinici negli animali appartenenti alla cucciolata trattata con probiotici tre anni prima (Marsella et al., 2012). Il risultato è quindi simile a quello ottenuto negli studi in umana sopra riportati. Dal momento che questo e il precedente studio sono stati eseguiti su un campione di soggetti piuttosto ristretto è necessario, per provare ciò che è stato riscontrato, effettuare ulteriori studi su campioni più ampi.

Esistono pochi altri studi a riguardo in ambito veterinario, ma di seguito li si affronta.

Nel 2015 è stato condotto uno studio della durata di 12 settimane per verificare l'efficacia sulla dermatite atopica canina della somministrazione complementare ad altri farmaci di *Lactobacillus paracasei* K71. Sono stati selezionati 41 soggetti affetti da moderata-grave dermatite atopica: a 20 di questi è stato somministrato il probiotico, e ai restanti 21 cetirizina cloridrato (farmaco antistaminico). È stato concesso a tutti i soggetti già in cura con altri farmaci di continuarne la somministrazione. I cani sono poi stati valutati tramite il sistema CADESI (*Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index*, valuta la gravità e l'estensione delle lesioni cutanee) e un sistema di valutazione dei farmaci somministrati. I proprietari degli animali valutavano il prurito dei soggetti tramite PVAS (*Pruritus Visual Analog Scale*, documenta parametri visivi di valutazione del prurito come la frequenza e l'intensità con cui l'animale si gratta, si morde o si lecca in determinate aree). A 12 settimane i punteggi del CADESI e del PVAS erano migliorati in entrambi i gruppi, anche se mostravano un miglioramento leggermente superiore (ma non statisticamente significativo) nel gruppo trattato con probiotico. La riduzione dei punteggi dei farmaci utilizzati era invece significativamente maggiore nel gruppo trattato con *L. paracasei* K71 (ovvero erano diminuite le dosi necessarie per mantenere la sintomatologia stabile). Continuando la prova

fino a 48 settimane tutti i cani trattati con probiotico sono ulteriormente migliorati, e i corrispettivi punteggi dei farmaci utilizzati a loro volta ulteriormente diminuiti. Se ne è concluso che la somministrazione orale di questo specifico ceppo batterico come probiotico può essere utile nel trattamento della dermatite atopica canina come terapia complementare ad altri farmaci, ma sono necessari ulteriori studi su campioni più ampi per averne la certezza (Ohshima-Terada et al., 2015).

Nello stesso anno è stato svolto uno studio in doppio cieco e placebo-controllato per verificare il potere di *Lactobacillus sakei* Probio-65 nella prevenzione della dermatite atopica canina. Durante la prova il probiotico è stato somministrato ai soggetti selezionati (28 cani, contro i 10 del gruppo placebo) per due mesi; per la valutazione finale si sono valutati la gravità delle lesioni (tramite CADESI) e il prurito mostrato dagli animali (tramite PVAS) e ne è risultata una significativa riduzione della gravità della patologia. Se ne è dedotto che questo particolare ceppo possa essere utile per migliorare la sintomatologia dei cani affetti da dermatite atopica (H. Kim et al., 2015). Anche in questo caso, dal momento che lo studio è stato svolto su un campione piuttosto ristretto, sono necessari ulteriori approfondimenti per valutare l'esattezza dei risultati ottenuti.

Nel 2019 è stato effettuato uno studio per valutare l'utilizzo di *Enterococcus faecium* SF68 come terapia aggiuntiva in cani con dermatite atopica che già rispondeva al trattamento con oclacitinib (farmaco inibitore delle Janus chinasi, normalmente usato per ridurre il prurito nella dermatite atopica e in altre dermatiti di origine allergica). Dei cani compresi nello studio, tutti affetti da prurito non stagionale, alcuni sono stati scelti casualmente per ricevere il probiotico, e i restanti per ricevere placebo, per una durata totale di 12 settimane; tutti i soggetti erano già in terapia con oclacitinib da almeno 6 mesi, e tutti avevano già riscontrato un miglioramento. Dopo 8 settimane di trattamento, è stata ridotta di circa il 25% la dose di oclacitinib, con l'obiettivo di mantenere o ridurre i punteggi clinici della malattia. I punteggi venivano valutati tramite il CADLI (*Canine Atopic Dermatitis Lesion Index*) per la valutazione dei segni clinici, e il PVAS per la valutazione del prurito. Il risultato non è stato indicativo di alcun beneficio dovuto alla somministrazione del probiotico: i cani a cui era stato somministrato *E. faecium* SF68 hanno mostrato una lieve riduzione del dosaggio di

oclacitinib rispetto al gruppo placebo, ma non abbastanza importante da essere statisticamente significativa; nemmeno i punteggi clinici differivano tra i due gruppi (Yamazaki et al., 2019).

Lo studio ha quindi dimostrato la non utilità di questo specifico probiotico nel trattamento della dermatite atopica canina, ma ancora una volta è necessario considerare anche i limiti della prova: il campione era piuttosto limitato (21 soggetti) e la piccola dimensione potrebbe impedire di rilevamento di miglioramenti se non molto importanti; la dose di probiotico utilizzata era bassa rispetto a dosi precedentemente dimostrate efficaci (ancora non si è stabilita una dose ottimale) e il periodo del trattamento non è stato particolarmente lungo. Il risultato dello studio non esclude che altri ceppi batterici in altre dosi, associati con altri farmaci per la terapia della dermatite, possano invece dimostrare una certa utilità.

Nel 2023 si è svolta una prova su 15 cani affetti da dermatite atopica che già ricevevano un trattamento a base di prednisolone: per più di 90 giorni si è aggiunti a questo *Lactobacillus paracasei* M-1 derivato da cibo fermentato (probiotico) e un trisaccaride, il chestosio (prebiotico che stimola soprattutto la crescita di Bifidobacteria e di batteri che producono butirrato), per determinare il loro potere simbiotico sulla dermatite atopica. A 30, 60 e 90 giorni sono stati valutati i segni clinici della patologia tramite il CADLI e il prurito da essa causato tramite il PVAS. Nel frattempo, è stata valutata anche la quantità di prednisolone necessaria per mantenere stabile la gravità della sintomatologia. È stato documentato che la somministrazione simbiotica di probiotico e prebiotico ha ridotto significativamente il CADLI, ovvero le lesioni cutanee, e il PVAS, e ha ridotto la quantità di prednisolone da amministrare in tutti i 15 cani. Se ne è dedotto che l'attività simbiotica di *L. paracasei* e del trisaccaride chestosio può migliorare i sintomi della dermatite atopica nel cane (Kawano et al., 2023).

È però da tenere conto che il campione su cui è stata svolta la prova era piuttosto ristretto, che non era presente un gruppo di controllo e che non è stato provato se la sola somministrazione di probiotico e prebiotico senza prednisolone potesse migliorare la sintomatologia. Per questo non si può affermare con totale sicurezza l'utilità di *L. paracasei* e chestosio nel trattamento della dermatite atopica, e sono necessari altri studi, su campioni più ampi e con gruppi di controllo, per verificarlo.

Traendo delle conclusioni dai precedenti studi, condotti in umana e in veterinaria, si può affermare che l'utilizzo di probiotici e prebiotici nel trattamento e nella prevenzione della dermatite atopica canina potrebbe essere un importante alleato, e forse un sostituto in casi lievi e ben controllati, delle terapie già esistenti. Sono però necessari ulteriori studi per approfondire la conoscenza dell'argomento, che è tuttora compreso piuttosto superficialmente, e per individuare quali ceppi batterici possano essere veramente utili e in che condizioni.

6.9. ALTRI UTILIZZI DI PROBIOTICI E PREBIOTICI

Oltre agli utilizzi di probiotici e prebiotici finora discussi, sono stati esplorati altri impieghi su cui la letteratura è ancora piuttosto scarsa, e di seguito se ne citano alcuni.

GLI EFFETTI DEI PROBIOTICI SUL COLOSTRO DELLA CAGNA

Nel 2007 è stato pubblicato uno studio svolto su delle cagne di razza Beagle a cui, a partire dal trentacinquesimo giorno di gravidanza fino allo svezzamento, è stato somministrato un mix di prebiotici la cui quantità veniva aumentata di una quantità costante ogni settimana. Sono stati raccolti durante tutta la raccolta dello studio campioni di sangue, e sono state misurate le quantità di immunoglobuline presenti nel sangue, nelle secrezioni mammarie e nasali. Tre giorni prima del parto le IgM sieriche del gruppo a cui erano stati somministrati i prebiotici erano più elevate rispetto a quelle del gruppo di controllo, ma non in modo statisticamente significativo; non c'erano differenze significative nei livelli di IgG1, IgG2 e IgA. Nel colostro e nel latte, dopo il parto, le IgM erano significativamente più elevate nel gruppo trattato; il fatto che l'aumento delle IgM nelle secrezioni mammarie non fosse collegato a un aumento sierico porta a pensare che fosse dovuto a una maggiore sintesi di immunoglobuline a livello mammario, e non al filtraggio delle immunoglobuline derivanti dal circolo sanguigno. Si ipotizza che i precursori delle immunoglobuline derivanti dall'intestino si accumulino nella lamina propria dell'intestino stesso e in altri organi fra cui la ghiandola mammaria, dove maturano. È particolarmente significativo che le uniche alterazioni siano state rilevate nel livello di IgM, dal momento che la quantità di queste immunoglobuline specifiche nel colostro e nel latte è considerato un importante parametro immunitario per i neonati; le IgM infatti proteggono l'organismo sistemicamente passando attraverso l'epitelio intestinale e localmente coprendo l'epitelio stesso, quando l'animale non riesce più ad assorbire gli anticorpi. In qualsiasi caso, nessuna differenza nelle quantità di immunoglobuline è stata rilevata nei neonati alla nascita, e tutti hanno poi raggiunto i livelli di anticorpi adeguati a 48 giorni di vita (Adogony et al., 2007).

Nel 2020 è stata poi svolta una prova per verificare il miglioramento che probiotici e prebiotici possono apportare al potere immunologico del colostro nei cani; lo studio è stato svolto su 20 cagne, divise in quattro gruppi, a uno dei quali probiotici e prebiotici non venivano somministrati, mentre i restanti gruppi cominciavano ad assumere la terapia a diversi stadi della gestazione. La terapia comprendeva frutto-oligosaccaridi, mannano-oligosaccaridi, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*; il colostro per le indagini è stato prelevato subito dopo i parti cesarei (eseguiti su tutte le partecipanti allo studio), prima del primo allattamento. Nel colostro, le IgA erano significativamente più alte nel gruppo che per primo aveva cominciato a ricevere il mix di probiotici e prebiotici, e tutti e tre i gruppi che avevano ricevuto la terapia contenevano più IgA del gruppo di controllo. Inoltre, mentre le IgM sono generalmente più alte a livello sanguigno che nel secreto mammario, nel gruppo che aveva ricevuto la terapia più a lungo questo rapporto si era invertito, portando a una maggiore quantità di IgM nel colostro che nel siero; l'aumento era avvenuto solo a livello di secreto mammario. Dei quattro gruppi, quello che aveva ricevuto la terapia più a lungo era quello che mostrava i livelli più alti di IgG, IgA e IgM nel colostro (Alonge et al., 2020).

Pare quindi, nonostante la scarsità degli studi condotti a riguardo, che probiotici e prebiotici abbiano un effetto benefico sulla quantità di anticorpi trasmessi tramite latte e colostro nel cane; non sono però stati evidenziati effetti per i neonati.

GLI EFFETTI DEI PROBIOTICI SUL CANCRO

Un altro ruolo che si suggerisce possano avere i probiotici è quello di soppressione della crescita tumorale; diversi studi sono stati svolti per verificarlo, e di seguito se ne affrontano alcuni.

Nel 2012 è stato pubblicato uno studio condotto su dei topi a cui sono stati somministrati probiotici e impiantate cellule tumorali. Durante lo studio è stato provato che il ceppo *Lactobacillus acidophilus* NCFM era efficace nel sopprimere la crescita di alcune cellule tumorali impiantate negli animali. In particolare, erano state impiantate cellule di carcinoma del colon murino della linea CT26 in due punti degli animali: a livello di mucosa del colon e

nel sottocute, a livello del fianco. I topi a cui prima delle cellule tumorali era stato somministrato il probiotico hanno mostrato una crescita minore del 50% rispetto a quella riscontrata nei topi non trattati tramite probiotico. Il probiotico ha aumentato il tasso di apoptosi sia nelle cellule tumorali a livello del colon che in quelle sottocutanee; nei topi trattati è stata registrata anche la riduzione di un recettore per chemochine coinvolte nella metastatizzazione tumorale (CXCR4) nel cancro del colon e in tumori extraintestinali. C'è stata anche una diminuzione di molecole appartenenti alla famiglia del complesso di istocompatibilità (MHC) I, che suggerisce il ruolo del probiotico nell'indirizzare il sistema immunitario a inibire la crescita tumorale (Chen et al., 2012).

Nel 2016 un'altra prova condotta sempre su topi evidenzia che la somministrazione di un mix di probiotici e prebiotici ha portato ad una alterazione del microbiota già presente, correlato ad una minore incidenza tumorale. Il mix di probiotici comprendeva *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria bifidum*, e *Bifidobacteria infantum*, arricchiti da oligosaccaridi come prebiotici. Il mix somministrato ha portato a una riduzione dell'incidenza tumorale, del volume dei tumori che si sviluppavano, e del numero di questi (Kuugbee et al., 2016).

A supporto dell'utilità dei probiotici contro il cancro al colon, uno stato di disbiosi intestinale è stato spesso associato con il cancro. I probiotici quindi, andando a regolare il microbiota e rafforzando la barriera intestinale (tramite i meccanismi già visti precedentemente), riducendo l'infiammazione e producendo attivamente molecole con effetti antitumorali, contribuiscono a ridurre il rischio di sviluppare cancro al colon. Gli studi a riguardo non sono ancora molti, e nonostante i risultati promettenti, sono necessarie ulteriori indagini per comprovare la validità dei risultati finora ottenuti (Drago, 2019).

A questo si aggiunge un altro possibile utilizzo dei probiotici: il cancro al colon è al giorno d'oggi trattato principalmente tramite chemioterapia, e uno degli effetti collaterali più frequenti causati da questo trattamento è la diarrea. Alcuni studi hanno dimostrato come i probiotici siano efficaci nel trattare anche questa (Renzis et al., 2007).

7. CONCLUSIONI

L'analisi condotta nella presente tesi ha esplorato il ruolo e l'efficacia di probiotici e prebiotici nell'agire sul microbiota intestinale e in generale sulla salute del cane; si è cercato di evidenziare i benefici che si è provato derivare dall'utilizzo di questi prodotti, le limitazioni derivanti dagli stessi, e allo stesso tempo si è sottolineato come siano necessari numerosi ulteriori studi per provare la validità delle conoscenze finora acquisite sull'argomento.

I probiotici, grazie alla loro capacità di modulare il microbiota intestinale, si sono mostrati buona parte delle volte efficaci nel migliorare la salute intestinale e non solo: si è visto come in molti casi siano in grado di migliorare la sintomatologia di molte patologie gastroenteriche, più spesso acute che croniche, e come siano in grado di contribuire positivamente anche a patologie extraintestinali. Probiotici e prebiotici assicurano comunque quasi sempre una regolazione del microbiota intestinale, supportandolo in caso di disbiosi e fortificandolo in caso di situazione fisiologica.

Si è visto però come i risultati positivi ottenuti dalle prove condotte finora non siano costanti, e anzi in alcuni casi siano totalmente assenti; in particolare, i probiotici non sembrano essere utili nella gestione terapeutica delle malattie gastroenteriche croniche. È quindi discutibile il loro utilizzo nel trattamento di tali condizioni patologiche. Rimangono di gran migliori i risultati ottenuti trattando con probiotici e prebiotici patologie acute.

Non si sono comunque mai registrati effetti collaterali correlabili alla somministrazione di probiotici e prebiotici, anche se è necessario ricordare che ancora non esistono studi sulla supplementazione cronica prolungata che documentino l'effetto di queste sostanze a lungo termine.

Si è provato come l'utilizzo di probiotici e prebiotici sia particolarmente utile anche per il sistema immunitario: contribuendo all'omeostasi intestinale e alla funzione di barriera, stimolando la produzione di muco e producendo direttamente sostanze antibatteriche, probiotici e prebiotici garantiscono un'importante funzione di difesa a livello intestinale, sostenendo il sistema immunitario e favorendo la salute generale dell'organismo.

Gli studi condotti sull'utilizzo dei probiotici e prebiotici per contrastare gli effetti negativi del trattamento con antibiotici hanno portato a risultati positivi: probiotici e prebiotici sembrano prevenire e trattare la diarrea associata alla somministrazione di antibiotici, e sembrano cooperare con l'azione antibatterica degli antibiotici stessi.

Fra le poche patologie extra-gastrointestinali analizzate, ottimi sono stati i risultati ottenuti nelle prove condotte sulla dermatite atopica canina: probiotici e prebiotici risultano, nella maggior parte dei casi, utili sia nella prevenzione che nel trattamento della patologia.

Per quanto riguarda i prebiotici nello specifico, fungendo essi da substrato per i batteri derivanti dai probiotici e soprattutto per i batteri commensali intestinali, supportano e stimolano la crescita e l'attività di questi microrganismi, potenziando gli effetti benefici dei probiotici sul microbiota e aiutando a mantenere l'omeostasi intestinale; sostenendo i batteri benefici, favoriscono un ambiente intestinale sano.

Tuttavia, nonostante buona parte dei risultati ottenuti siano incoraggianti, è necessario interpretare tutte queste evidenze con cautela: la variabilità nell'efficacia dei probiotici e prebiotici dipende infatti da numerosi fattori, tra cui i ceppi batterici utilizzati, le dosi somministrate, la durata del trattamento, l'ambiente, la dieta del soggetto e le sue condizioni cliniche. Inoltre negli studi analizzati non c'è una standardizzazione dei protocolli di somministrazione, della durata dei trattamenti, delle dosi somministrate e delle metodologie di valutazione; soprattutto, la gran parte degli studi analizzati sono stati condotti su campioni molto ristretti, rendendo i risultati ottenuti non totalmente affidabili.

Oltre a ciò, le interazioni fra probiotici, prebiotici e altri trattamenti farmacologici veterinari non sono ancora state approfondite, ed è necessaria una maggiore comprensione degli effetti derivanti dalla combinazione di questi trattamenti.

Inoltre, la risposta individuale dei cani ai probiotici e prebiotici può variare: questo potrebbe rendere necessaria una personalizzazione della terapia per ogni soggetto in base alle specifiche esigenze e condizioni cliniche dell'animale. La complessità e la variabilità dell'ecosistema intestinale di ciascun individuo rendono infatti necessaria un'attenta

valutazione e personalizzazione della terapia; purtroppo, ancora non si possiedono le conoscenze per fare ciò.

In conclusione, nonostante i probiotici e prebiotici offrano una promettente strategia, quantomeno complementare, per migliorare la salute gastrointestinale e generale dei cani, è ancora fondamentale proseguire gli studi a riguardo, per comprendere meglio i loro meccanismi d'azione, stabilire i dosaggi ottimali e identificare i ceppi più efficaci per ogni situazione clinica. Gli studi futuri dovrebbero essere condotti su campioni più ampi e con una maggiore standardizzazione dei protocolli sperimentali; dovrebbero inoltre esplorare più approfonditamente le interazioni dei probiotici e prebiotici con gli altri trattamenti veterinari, al fine di garantire un'integrazione sicura ed efficace e al fine di stabilire delle linee guida chiare e basate sull'evidenza. Se in futuro si dovessero seguire tali indicazioni, è possibile che il potenziale dei probiotici e prebiotici possa essere sfruttato a pieno, aiutando a promuovere la salute e il benessere dei pazienti canini.

8. Bibliografia

1. Adogony, V., Respondek, F., Biourge, V., Rudeaux, F., Delaval, J., Bind, J. L., & Salmon, H. (2007). Effects of dietary scFOS on immunoglobulins in colostrums and milk of bitches. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 91(5–6), 169–174. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00688.x>
2. Aghamohammad, S., & Rohani, M. (2023). Antibiotic resistance and the alternatives to conventional antibiotics: The role of probiotics and microbiota in combating antimicrobial resistance. In *Microbiological Research* (Vol. 267). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127275>
3. Ahmad, I., Ahmad, S., & Rumbaugh, K. P. (2019). Antibacterial drug discovery to combat MDR: Natural compounds, nanotechnology and novel synthetic sources. In *Antibacterial Drug Discovery to Combat MDR: Natural Compounds, Nanotechnology and Novel Synthetic Sources*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9871-1>
4. Alonge, S., Aiudi, G. G., Lacalandra, G. M., Leoci, R., & Melandri, M. (2020). Pre- and Probiotics to Increase the Immune Power of Colostrum in Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.570414>
5. Anderson, R. C., Cookson, A. L., McNabb, W. C., Park, Z., McCann, M. J., Kelly, W. J., & Roy, N. C. (2010). *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-316>

6. Anthony, W. E., Burnham, C. A. D., Dantas, G., & Kwon, J. H. (2021). The gut microbiome as a reservoir for antimicrobial resistance. In *Journal of Infectious Diseases* (Vol. 223, pp. S209–S213). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa497>
7. Beloshapka, A. N., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Steiner, J. M., Duclos, L., & Swanson, K. S. (2013). Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 84(3), 532–541. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12081>
8. Betsi, G. I., Papadavid, E., & Falagas, M. E. (2008). Probiotics for the Treatment or Prevention of Atopic Dermatitis A Review of the Evidence from Randomized Controlled Trials. In *Am J Clin Dermatol* (Vol. 9, Issue 2).
9. Bybee, S. N., Scorza, A. V., & Lappin, M. R. (2011). Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 856–860. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0738.x>
10. Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., Chadee, K., & Simone, D. C. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, 315–322. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00265.2006.-Several>
11. Chen, C. C., Lin, W. C., Kong, M. S., Shi, H. N., Walker, W. A., Lin, C. Y., Huang, C. T., Lin, Y. C., Jung, S. M., & Lin, T. Y. (2012). Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. *British Journal of Nutrition*, 107(11), 1623–1634. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004934>
12. Coêlho, M. D. G., Coêlho, F. A. D. S., & Mancilha, I. M. I. De. (2013). Probiotic therapy: A promising strategy for the control of canine hookworm.

Journal of Parasitology Research, 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/430413>

13. Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O, P. W., Hill, C., & M Gahan, C. G. (2007). *Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of Lactobacillus salivarius UCC118*. www.pnas.org/cgi/content/full/
14. Craig, J. M. (2016). Atopic dermatitis and the intestinal microbiota in humans and dogs. In *Veterinary Medicine and Science* (Vol. 2, Issue 2, pp. 95–105). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/vms3.24>
15. D'Angelo, S., Fracassi, F., Bresciani, F., Galuppi, R., Diana, A., Linta, N., Bettini, G., Morini, M., & Pietra, M. (2018). Effect of *Saccharomyces boulardii* in dogs with chronic enteropathies: Double-blinded, placebo-controlled study. *Veterinary Record*, 182(9). <https://doi.org/10.1136/vr.104241>
16. Daniali, M., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2020). Antibiotic resistance propagation through probiotics. In *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* (Vol. 16, Issue 12, pp. 1207–1215). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1825682>
17. Delucchi, L., Fraga, M., & Zunino, P. (2017). *Effect of probiotic Lactobacillus murinus LbP2 on clinical parameters of dogs with distemper-associated diarrhea*. <https://www.researchgate.net/publication/315665069>
18. Deng, P., & Swanson, K. S. (2015). Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. In *The British journal of nutrition* (Vol. 113, pp. S6–S17). <https://doi.org/10.1017/S0007114514002943>
19. Drago, L. (2019). Probiotics and colon cancer. *Microorganisms*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030066>
20. Ewaschuk, J. B., & Dieleman, L. A. (2006). Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 12(37), 5941–5950.

21. Falk, P. G., Hooper, L. V, Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (1998). Creating and Maintaining the Gastrointestinal Ecosystem: What We Know and Need To Know from Gnotobiology. In *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (Vol. 62, Issue 4). <https://journals.asm.org/journal/membr>
22. Fang, Z., Li, L., Zhang, H., Zhao, J., Lu, W., & Chen, W. (2021). Gut Microbiota, Probiotics, and Their Interactions in Prevention and Treatment of Atopic Dermatitis: A Review. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.720393>
23. Fenimore, A., Martin, L., & Lappin, M. R. (2017). Evaluation of Metronidazole With and Without Enterococcus Faecium SF68 in Shelter Dogs With Diarrhea. *Topics in Companion Animal Medicine*, 32(3), 100–103. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2017.11.001>
24. Fernández, L., Martínez, R., Pérez, M., Arroyo, R., & Rodríguez, J. M. (2019). Characterization of lactobacillus rhamnosus MP01 and lactobacillus plantarum MP02 and assessment of their potential for the prevention of gastrointestinal infections in an experimental canine model. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01117>
25. Francesco, G., & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512–519.
26. Gómez-Gallego, C., Junnila, J., Männikkö, S., Hämeenoja, P., Valtonen, E., Salminen, S., & Beasley, S. (2016). A canine-specific probiotic product in treating acute or intermittent diarrhea in dogs: A double-blind placebo-controlled efficacy study. *Veterinary Microbiology*, 197, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.015>
27. Grazul, H., Kanda, L. L., & Gondek, D. (2016). Impact of probiotic supplements on microbiome diversity following antibiotic treatment of mice. *Gut Microbes*, 7(2), 101–114. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1138197>

28. Gu, Q., Yin, Y., Yan, X., Liu, X., Liu, F., & McClements, D. J. (2022). Encapsulation of multiple probiotics, synbiotics, or nutrabiobiotics for improved health effects: A review. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 309). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102781>
29. Hafez, M. M. (2012). Upregulation of Intestinal Mucin Expression by the Probiotic Bacterium *E. coli* Nissle 1917. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(2), 67–77. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9092-0>
30. Halliwell, R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. In *Veterinary Immunology and Immunopathology* (Vol. 114, Issues 3–4, pp. 207–208). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.08.013>
31. Hansen, I. S., Baeten, D. L. P., & den Dunnen, J. (2019). The inflammatory function of human IgA. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 76, Issue 6, pp. 1041–1055). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2976-8>
32. Hempel, S., Newberry, S. J., Maher, A. R., Wang, Z., Miles, J. N. V, Shanman, R., Johnsen, B., & Shekelle, P. G. (2012). *Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated Diarrhea A Systematic Review and Meta-analysis*. <http://jama.jamanetwork.com/>
33. Herstad, H. K., Nesheim, B. B., L'Abée-Lund, T., Larsen, S., & Skancke, E. (2010). Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis - A controlled clinical trial. *Journal of Small Animal Practice*, 51(1), 34–38. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2009.00853.x>
34. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
35. Hill, M. J. (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European Journal of Cancer Prevention*.

36. Honneffer, J. B., Minamoto, Y., & Suchodolski, J. S. (2014). Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(44), 16489–16497. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16489>
37. Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, *21*(12). <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
38. Jensen, A. P., & Bjørnvad, C. R. (2019). Clinical effect of probiotics in prevention or treatment of gastrointestinal disease in dogs: A systematic review. In *Journal of Veterinary Internal Medicine* (Vol. 33, Issue 5, pp. 1849–1864). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/jvim.15554>
39. Johnson-Henry, K. C., Donato, K. A., Shen-Tu, G., Gordanpour, M., & Sherman, P. M. (2008). Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infection and Immunity*, *76*(4), 1340–1348. <https://doi.org/10.1128/IAI.00778-07>
40. Karakan, T., Ozkul, C., Akkol, E. K., Bilici, S., Sobarzo-Sánchez, E., & Capasso, R. (2021). Gut-brain-microbiota axis: Antibiotics and functional gastrointestinal disorders. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 2, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu13020389>
41. Kawano, K., Iyori, K., Kondo, N., Yamakawa, S., Fujii, T., Funasaka, K., Hirooka, Y., & Tochio, T. (2023). Clinical effects of combined Lactobacillus paracasei and kestose on canine atopic dermatitis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *26*(1), 131–136. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2023.145014>
42. Kayama, H., Okumura, R., & Takeda, K. (2020). Interaction Between the Microbiota, Epithelia, and Immune Cells in the Intestine. *IY38CH02_Takeda ARjats.Cls April*, *5*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-070119>

43. Kelley, R. L., Minikhiem, D., Barry Kiely, M., Boileau, T., Soon Park, J., Minikhiem, D., Kiely, B., Boileau, T., & Park, J. S. (2009). *Clinical Benefits of Probiotic Canine-Derived Bifidobacterium animalis Strain AHC7 in Dogs with Acute Idiopathic Diarrhea**.
44. Kim, H., Rather, I. A., Kim, H., Kim, S., Kim, T., Jang, J., Seo, J., Lim, J., & Park, Y. H. (2015). A double-blind, placebo controlled-trial of a probiotic strain *Lactobacillus sakei* probio-65 for the prevention of canine atopic dermatitis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1966–1969. <https://doi.org/10.4014/jmb.1506.06065>
45. Kim, S. O., Ah, Y. M., Yu, Y. M., Choi, K. H., Shin, W. G., & Lee, J. Y. (2014). Effects of probiotics for the treatment of atopic dermatitis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 113(2), 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2014.05.021>
46. Kumar, S., Pattanaik, A. K., Sharma, S., Gupta, R., Jadhav, S. E., & Dutta, N. (2017). Comparative assessment of canine-origin *Lactobacillus johnsonii* CPN23 and dairy-origin *Lactobacillus acidophilus* NCDC 15 for nutrient digestibility, faecal fermentative metabolites and selected gut health indices in dogs. *Journal of Nutritional Science*, 6. <https://doi.org/10.1017/jns.2017.35>
47. Kumar, S., Pattanaik, A. K., Sharma, S., & Jadhav, S. E. (2016). Species-specific probiotic *Lactobacillus johnsonii* CPN23 supplementation modulates blood biochemical profile and erythrocytic antioxidant indices in Labrador dogs. *Indian Journal of Animal Sciences*, 86(8), 918–924. <https://doi.org/10.56093/ijans.v86i8.60815>
48. Kuugbee, E. D., Shang, X., Gamallat, Y., Bamba, D., Awadasseid, A., Suliman, M. A., Zang, S., Ma, Y., Chiwala, G., Xin, Y., & Shang, D. (2016). Structural Change in Microbiota by a Probiotic Cocktail Enhances the Gut Barrier and Reduces Cancer via TLR2 Signaling in a Rat Model of Colon Cancer. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(10), 2908–2920. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4238-7>

49. La Fata, G., Weber, P., & Mohajeri, M. H. (2018). Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. In *Probiotics and Antimicrobial Proteins* (Vol. 10, Issue 1, pp. 11–21). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9322-6>
50. Lee, D., Goh, T. W., Kang, M. G., Choi, H. J., Yeo, S. Y., Yang, J., Huh, C. S., Kim, Y. Y., & Kim, Y. (2022). Perspectives and advances in probiotics and the gut microbiome in companion animals. In *Journal of Animal Science and Technology* (Vol. 64, Issue 2, pp. 197–217). Korean Society of Animal Sciences and Technology. <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e8>
51. Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 17, Issue 4, pp. 219–232). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>
52. Liao, W., Chen, C., Wen, T., & Zhao, Q. (2021). Probiotics for the Prevention of Antibiotic-associated Diarrhea in Adults: A Meta-Analysis of Randomized Placebo-Controlled Trials. In *Journal of Clinical Gastroenterology* (Vol. 55, Issue 6, pp. 469–480). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001464>
53. Lucena, R., Novales, M., Blanco, B., Hernández, E., & Ginel, P. J. (2019). Effect of probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on liver function in healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(6), 2628–2634. <https://doi.org/10.1111/jvim.15625>
54. Macpherson, A. J., & Uhr, T. (2004). Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science*, 303, 1662–1665.
55. Marelli, S. P., Fusi, E., Giardini, A., Martino, P. A., Polli, M., Bruni, N., & Rizzi, R. (n.d.). *Effects of probiotic Lactobacillus acidophilus D2/CSL (CECT 4529) on the nutritional and health status of boxer dogs*. <https://doi.org/10.1136/vetrec-2019-105434>
56. Marks, S. L. (2013). *Diarrhea, Canine and feline gastroenterology*.

57. Marsella, R. (2009). Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG for the prevention of atopic dermatitis in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, *70*(6), 735–740.
58. Marsella, R., Santoro, D., & Ahrens, K. (2012). Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term clinical and immunological effects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *146*(2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.02.013>
59. Mattar, A. F., Teitelbaum, D. H., Drongowski, R. A., Yongyi, F., Harmon, C. M., & Coran, A. G. (2002). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery International*, *18*(7), 586–590. <https://doi.org/10.1007/s00383-002-0855-7>
60. Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., & Rotondo, J. C. (2023). Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. In *Cells* (Vol. 12, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells12010184>
61. McFarland, L. V. (2006). Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *American Journal of Gastroenterology*, *101*(4), 812–822. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00465.x>
62. Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Montes, S. A., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., De Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). *The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota*. <https://doi.org/10.1128/MMBR>
63. Minamoto, Y., Otoni, C. C., Steelman, S. M., Büyükleblebici, O., Steiner, J. M., Jergens, A. E., & Suchodolski, J. S. (2015). Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, *6*(1), 33–47. <https://doi.org/10.1080/19490976.2014.997612>

64. Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., & Agace, W. W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. In *Mucosal Immunology* (Vol. 14, Issue 4, pp. 793–802). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>
65. Nami, Y., Haghshenas, B., Abdullah, N., Barzegari, A., Radiah, D., Rosli, R., & Khosroushahi, A. Y. (2015). Probiotics or antibiotics: Future challenges in medicine. In *Journal of Medical Microbiology* (Vol. 64, Issue 2, pp. 137–146). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.078923-0>
66. Nomoto, K. (2017). Probiotics and allergy. In *Japanese Journal of Allergology* (Vol. 66, Issue 2, pp. 82–85). Japanese Society of Allergology. <https://doi.org/10.1079/pns2005466>
67. O’Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. In *EMBO Reports* (Vol. 7, Issue 7, pp. 688–693). <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
68. O’Hara, A. M., & Shanahan, F. (2007). Gut Microbiota: Mining for Therapeutic Potential. In *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 5, Issue 3, pp. 274–284). <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.12.009>
69. Ohshima-Terada, Y., Higuchi, Y., Kumagai, T., Hagihara, A., & Nagata, M. (2015). Complementary effect of oral administration of *Lactobacillus paracasei* K71 on canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 26(5), 350–e75. <https://doi.org/10.1111/vde.12224>
70. Parassol, N., Freitas, M., Thoreux, K., Dalmaso, G., Bourdet-Sicard, R., & Rampal, P. (2005). *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Research in Microbiology*, 156(2), 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.013>
71. Pilla, R., Guard, B. C., Steiner, J. M., Gaschen, F. P., Olson, E., Werling, D., Allenspach, K., Schmitz, S. S., & Suchodolski, J. S. (2019). Administration of a synbiotic containing *enterococcus faecium* does not significantly alter

- fecal microbiota richness or diversity in dogs with and without food-responsive chronic enteropathy. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(AUG). <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00277>
72. Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2021). The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 51, Issue 3, pp. 605–621). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2021.01.002>
73. Renzis, D., Famularo, G., & Famularo, G. (2007). Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea. *World J Gastroenterol*, 13(6), 912–915. www.wjgnet.com<http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/912.asp>
74. Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.-P., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. <http://immunol.nature.com>
75. Rose, L., Rose, J., Gosling, S., & Holmes, M. (2017). Efficacy of a Probiotic-Prebiotic Supplement on Incidence of Diarrhea in a Dog Shelter: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(2), 377–382. <https://doi.org/10.1111/jvim.14666>
76. Rossi, G., Pengo, G., Caldin, M., Piccionello, A. P., Steiner, J. M., Cohen, N. D., Jergens, A. E., & Suchodolski, J. S. (2014a). Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094699>
77. Rossi, G., Pengo, G., Caldin, M., Piccionello, A. P., Steiner, J. M., Cohen, N. D., Jergens, A. E., & Suchodolski, J. S. (2014b). Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic

- inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, 9(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094699>
78. Santoro, D. (2019). Therapies in Canine Atopic Dermatitis: An Update. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 49, Issue 1, pp. 9–26). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.08.002>
79. Sarowska, J., Choroszy-Król, I., Regulska-Illow, B., Frej-Madrzak, M., & Jama-Kmiecik, A. (2013). The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases. *Advances In Clinical and Experimental Medicine*, 22(5), 759–766.
80. Sauter, S. N., Benyacoub, J., Allenspach, K., Gaschen, F., Ontsouka, E., Reuteler, G., Cavadini, C., Knorr, R., & Blum, J. W. (2006). Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhoea treated with an elimination diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90(7–8), 269–277. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2005.00595.x>
81. Schmitz, S., Glanemann, B., Garden, O. A., Brooks, H., Chang, Y. M., Werling, D., & Allenspach, K. (2015). A Prospective, Randomized, Blinded, Placebo-Controlled Pilot Study on the Effect of *Enterococcus faecium* on Clinical Activity and Intestinal Gene Expression in Canine Food-Responsive Chronic Enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(2), 533–543. <https://doi.org/10.1111/jvim.12563>
82. Schmitz, S. S. (2021). Value of Probiotics in Canine and Feline Gastroenterology. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 51, Issue 1, pp. 171–217). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.09.011>
83. Sharma, S., Bano, A., Gupta, A., Bajpai, P., Lohani, M., & Pathak, N. (2019). Pre- and probiotics: Using functional foods in the fight against microbial resistance to antibiotics. In *Antibacterial Drug Discovery to Combat MDR: Natural Compounds, Nanotechnology and Novel Synthetic Sources* (pp. 397–425). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9871-1_18

84. Shmalberg, J., Montalbano, C., Morelli, G., & Buckley, G. J. (2019). A randomized double blinded placebo-controlled clinical trial of a probiotic or metronidazole for acute canine diarrhea. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(JUN). <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00163>
85. Simon, E., Călinoiu, L. F., Mitrea, L., & Vodnar, D. C. (2021). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Implications and beneficial effects against irritable bowel syndrome. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu13062112>
86. Simpson, K. W., Rishniw, M., Bellosa, M., Liotta, J., Lucio, A., Baumgart, M., Czarnecki-Maulden, G., Benyacoub, J., & Bowman, D. (2009). Influence of *Enterococcus faecium* SF68 probiotic on giardiasis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(3), 476–481. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0283.x>
87. Stadnyk, A. W. (2002). Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 16(4), 241–246. <https://doi.org/10.1155/2002/941087>
88. Stephen, A. M., & Cummings, J. H. (1980). The microbial contribution to human faecal mass. *The Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 13, 45–46.
89. Strandwitz, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. In *Brain Research* (Vol. 1693, pp. 128–133). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>
90. Stropfová, V., Kubašová, I., & Lauková, A. (2017). Health benefits observed after probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 application in dogs. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 101, Issue 16, pp. 6309–6319). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8425-z>
91. Stropfová, V., Kubašová, I., Ščerbová, J., Maďari, A., Gancarčíková, S., Mudroňová, D., Miltko, R., Belzecki, G., & Lauková, A. (2019). Oral administration of bacteriocin-producing and non-producing strains of

- Enterococcus faecium in dogs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(12), 4953–4965. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09847-3>
92. Stropfová, V., Marciňáková, M., Simonová, M., Bogovič-Matijašić, B., & Lauková, A. (2006). Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. *Anaerobe*, 12(2), 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.12.001>
93. Stropfová, V., Pogány Simonová, M., Gancarčíková, S., Mudroňová, D., Farbáková, J., Mad'ari, A., & Lauková, A. (2014). Effect of *Bifidobacterium animalis* B/12 administration in healthy dogs. *Anaerobe*, 28, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.001>
94. Suchodolski, J. S. (2016). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. In *Veterinary Journal* (Vol. 215, pp. 30–37). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>
95. Suchodolski, J. S. (2022). Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. In *Veterinary Clinical Pathology* (Vol. 50, Issue S1, pp. 6–17). American Society for Veterinary Clinical Pathology. <https://doi.org/10.1111/vcp.13031>
96. Sun, Y., Gao, S., Ye, C., & Zhao, W. (2023). Gut microbiota dysbiosis in polycystic ovary syndrome: Mechanisms of progression and clinical applications. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1142041>
97. Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., & Fagarasan, S. (2003). *Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0307317101
98. Toedter Williams, N. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 449–458.
99. Tsakok, T., McKeever, T. M., Yeo, L., & Flohr, C. (2013). Does early life exposure to antibiotics increase the risk of eczema? A systematic review. In *British Journal of Dermatology* (Vol. 169, Issue 5, pp. 983–991). <https://doi.org/10.1111/bjd.12476>

100. Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M., & Roy, N. C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. In *Journal of Nutrition* (Vol. 141, Issue 5, pp. 769–776). <https://doi.org/10.3945/jn.110.135657>
101. Wada, T., Noda, M., Kashiwabara, F., Jeon, H. J., Shirakawa, A., Yabu, H., Matoba, Y., Kumagai, T., & Sugiyama, M. (2009). Characterization of four plasmids harboured in a *Lactobacillus brevis* strain encoding a novel bacteriocin, brevicin 925A, and construction of a shuttle vector for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Microbiology*, *155*(5), 1726–1737. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022871-0>
102. Walker, W. A. (2008). Mechanisms of action of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, *46*(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1086/523335>
103. Wang, L., Zhu, L., & Qin, S. (2019). Gut Microbiota Modulation on Intestinal Mucosal Adaptive Immunity. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/4735040>
104. Wang, M., Karlsson, C., Olsson, C., Adlerberth, I., Wold, A. E., Strachan, D. P., Martriacardi, P. M., Åberg, N., Perkin, M. R., Tripodi, S., Coates, A. R., Hesselmar, B., Saalman, R., Molin, G., & Ahrné, S. (2008). Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *121*(1), 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.09.011>
105. Watanabe, S., Narisawa, Y., Arase, S., Okamatsu, H., Ikenaga, T., Tajiri, Y., & Kumemura, M. (2003). Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *111*(3), 587–591. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.105>
106. White, R., Atherly, T., Guard, B., Rossi, G., Wang, C., Mosher, C., Webb, C., Hill, S., Ackermann, M., Sciabarra, P., Allenspach, K., Suchodolski, J., & Jergens, A. E. (2017). Randomized, controlled trial evaluating the effect of multi-strain probiotic on the mucosal microbiota in canine idiopathic

- inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, 8(5), 451–466.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1334754>
107. Xu, H., Huang, W., Hou, Q., Kwok, L. Y., Laga, W., Wang, Y., Ma, H., Sun, Z., & Zhang, H. (2019). Oral administration of compound probiotics improved canine feed intake, weight gain, immunity and intestinal microbiota. *Frontiers in Immunology*, 10(APR).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00666>
108. Yamazaki, C., Rosenkrantz, W., & Griffin, C. (2019). Pilot evaluation of *Enterococcus faecium* SF68 as adjunctive therapy for oclacitinib-responsive adult atopic dermatitis in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 60(8), 499–506. <https://doi.org/10.1111/jsap.13042>
109. Yang, Q., & Wu, Z. (2023). Gut Probiotics and Health of Dogs and Cats: Benefits, Applications, and Underlying Mechanisms. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11102452>
110. Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T., Ballèvre, O., & Rochat, F. (2003). Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 87(11–12), 397–407. <https://doi.org/10.1046/j.0931-2439.2003.00451.x>
111. Ziese, A. L., & Suchodolski, J. S. (2021). Impact of Changes in Gastrointestinal Microbiota in Canine and Feline Digestive Diseases. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 51, Issue 1, pp. 155–169). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.09.004>
112. Ziese, A. L., Suchodolski, J. S., Hartmann, K., Busch, K., Anderson, A., Sarwar, F., Sindern, N., & Unterer, S. (2019). Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. *PLoS ONE*, 13(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204691>