

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE

Ciclo XXX

Settore Concorsuale: 07/G1

Settore Scientifico Disciplinare: AGR/18

SACCHAROMYCES BOULARDII E PREBIOTICI: EFFETTI SUL
BENESSERE INTESTINALE DEL CANE ADULTO

Presentata da: Dott.ssa Carla Giuditta Vecchiato

Coordinatore Dottorato

Supervisore

Chiar.mo Prof. Arcangelo Gentile

Chiar.mo Prof. Giacomo Biagi

Esame finale anno 2018

Abstract	1
Abbreviazioni	4
1. Il microbiota intestinale del cane	5
1.1. Introduzione	5
1.2. Tecniche di caratterizzazione del microbiota intestinale	6
1.2.1. Tecniche di coltura tradizionale	6
1.2.2. Tecniche di biologia molecolare.....	6
1.3. La composizione del microbiota intestinale del cane	8
1.4. Ruolo e funzioni del microbiota intestinale del cane	13
1.5. Effetti della dieta sul microbiota intestinale del cane	16
1.6. Alterazioni del microbiota intestinale del cane in corso di patologie gastroenteriche	18
1.6.1. La disbiosi intestinale nel cane.....	19
1.6.2. Disbiosi e patologie intestinali	20
2. Utilizzo di prebiotici e probiotici nel cane	23
2.1. I prebiotici	23
2.1.1. Frutto-oligosaccaridi	24
2.1.2. Lattitolo	25
2.1.3. Mannano-oligosaccaridi.....	25
2.1.3.1. β -glucani	25
2.2. Utilizzo di prebiotici nel cane: stato dell'arte	27
2.3. I probiotici	31
2.4. Utilizzo di probiotici nel cane: stato dell'arte	32
2.5. <i>Saccharomyces boulardii</i>	34
2.6. Impiego di <i>S. boulardii</i> in disordini gastrointestinali del cane	37
2.7. I simbiotici	39
3. Scopo della ricerca	41
4. Valutazione in vitro degli effetti di un ceppo di <i>S. boulardii</i> impiegato in associazione con frutto-oligosaccaridi e lattitolo sul microbiota intestinale del cane	42
4.1. Materiali e metodi	42
4.1.1. Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni	44
4.1.2. Analisi statistica dei dati	47
4.2. Risultati	47
4.3. Discussione	53
5. Valutazione degli effetti di due prodotti a base di parete cellulare di lievito e di un ceppo di <i>S. boulardii</i> sul microbiota intestinale del cane.	56
5.1. Impiego di un modello in vitro	56
5.1.1. Materiali e metodi	56
5.1.1.1. Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni	58
5.1.1.2. Analisi statistica dei dati	60
5.1.2. Risultati	60
5.1.3. Discussione	71
5.2. Sperimentazione in vivo	74
5.2.1. Materiali e metodi	74
5.2.1.1. Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni	75
5.2.1.2. Analisi statistica dei dati	77
5.2.2. Risultati e Discussione	78
6. Conclusioni	86
7. Bibliografia	88

Abstract

La composizione del microbiota intestinale del cane ed il ruolo che esso esercita nei confronti dell'organismo ospite é di notevole interesse scientifico; in maniera analoga la ricerca di possibili strategie nutrizionali in grado di modularlo, prevenendo o trattando terapeutamente stati patologici che lo contraddistinguono, rende la ricerca scientifica su prebiotici, probiotici e simbiotici un tema attuale ed in costante sviluppo.

La presente tesi di dottorato, articolata in due diversi studi, si è proposta di indagare gli effetti sul microbiota intestinale del cane adulto sano di diverse sostanze ad azione prebiotica, da sole o in associazione ad un ceppo di *Saccharomyces boulardii*, lievito noto per la sua azione probiotica.

Il primo studio si proponeva di valutare, mediante un modello *in vitro*, gli effetti sulla composizione ed il metabolismo del microbiota fecale del cane adulto sano di un ceppo di *Saccharomyces boulardii* (SB; 0,25 g/L di inoculo fecale), e la sua associazione con sostanze prebiotiche quali i frutto-oligosaccaridi (FOS) ed il lattitolo (LAC), ciascuno addizionato a 1,5 g/L. Le feci di 5 cani adulti sono state utilizzate come inoculo per la fermentazione *in vitro* del lievito e dei substrati oggetto della prova (SB, FOS e LAC). Il liquido di fermentazione, prelevato a 6 e a 24 ore, è stato sottoposto ad analisi chimiche (pH, ammoniaca, acidi grassi volatili (AGV), amine biogene) e microbiologiche. FOS e LAC hanno confermato la loro potenzialità prebiotica, inducendo un abbassamento del pH, dell'ammoniaca e degli isoacidi, ed aumentando la produzione di acido acetico, propionico e butirrico; l'aumento di questi ultimi due AGV per LAC è stato parziale, evidenziandosi solo al termine delle 6h di fermentazione; a questo tempo di prelievo sono risultate diminuite anche le concentrazioni di amine biogene, per entrambi i prebiotici testati. Riguardo alle popolazioni batteriche, al termine della fermentazione FOS e LAC hanno indotto l'aumento di bifidobatteri, mentre sono diminuiti gli enterococchi ed i clostridi. SB, al contrario, non ha prodotto alcun decremento del pH e dell'ammoniaca degli inoculi, né aumenti delle concentrazioni totali di acidi grassi volatili ad eccezione della diminuzione dell'acido *n*-butirrico e dell'aumento dell'acido isobutirrico, rispettivamente a 6 e a 24 ore di fermentazione; inoltre, SB non ha indotto cambiamenti rilevanti di nessuna popolazione batterica presa in esame né dei metaboliti di derivazione batterica.

Scopo del secondo studio è stato quello di valutare gli effetti di due estratti di parete di lievito (MOS e CW) e di un ceppo di *Saccharomyces boulardii* sul microbiota intestinale del cane del cane adulto sano. Nella prima parte, condotta mediante prova *in vitro*, le feci di 4 cani adulti sono state impiegate come inoculo per la fermentazione di MOS (0,2 g/L di inoculo fecale), CW (0,08 g/L), FOS (0,5 g/L), SB (0,01 g/L) e CW+FOS (0,08 + 0,5 g/L). Il liquido di fermentazione, prelevato a 6 e a 24 ore, è stato sottoposto ad analisi chimiche (pH, ammoniaca, AGV, amine biogene, principali composti organici volatili (COV)) e microbiologiche. A conferma del ruolo di prebiotici, FOS e CW+FOS hanno portato ad una riduzione del pH di fermentazione, degli AGV totali, degli isoacidi e delle principali popolazioni batteriche, e quest'ultimo risultato è comune a tutti i trattamenti testati; tuttavia i FOS hanno anche diminuito alcuni alcoli (isopentanololo e *n*-esanololo per i FOS) ed aumentato le concentrazioni di cadaverina e spermina, mentre CW+FOS e CW impiegato singolarmente hanno aumentato la concentrazione di un composto solforato (dimetil-solfuro) e aumentato tutte le amine biogene prese in esame. MOS e CW non hanno indotto variazioni significative del pH di fermentazione e della concentrazione di ammoniaca e hanno ridotto la quota di AGV totali al termine della fermentazione, sebbene CW abbia anche stimolato la crescita di tutte le popolazioni batteriche analizzate. SB non ha ridotto il pH di fermentazione, né l'ammoniaca ed ha diminuito la produzione di AGV totali e isoacidi; inoltre, sembra aver svolto un'azione antibatterica parziale, diminuendo la produzione di acetone, fenolo ed indolo, pur tuttavia inducendo un aumento delle popolazioni batteriche e di cadaverina.

Nella seconda parte della prova, 16 cani adulti sani sono stati alimentati con una dieta secca commerciale, addizionata di tre fra i trattamenti precedentemente testati *in vitro* (MOS=2g/kg di dieta; CW=0,8g/kg; SB=0,1g/kg); per ogni fase della prova 8 cani hanno assunto la sola dieta (CTRL), mentre altri 8 animali la dieta associata a un trattamento sperimentale per 28 giorni; un campione di feci da ciascun soggetto è stato prelevato ai giorni 0, 21, 28 di ciascuna fase di trattamento. Fra un trattamento e l'altro gli animali hanno assunto la sola dieta per 14 giorni (periodo di wash-out). Sui campioni di feci sono state svolte analisi chimiche (pH, ammoniaca, AGV e principali COV) e microbiologiche per la determinazione delle principali popolazioni batteriche. Non si sono riscontrate variazioni significative di pH e concentrazione di ammoniaca nei campioni fecali dei cani riceventi i trattamenti. Relativamente alla concentrazione di AGV e popolazioni batteriche nelle feci, i risultati di questo studio *in vivo* non hanno confermato quanto era stato precedentemente osservato nella prova *in vitro*, con

la sola eccezione dei MOS che hanno indotto un aumento dell'acido acetico. Per quanto concerne i COV esaminati, i risultati ottenuti indicano una possibile crescita dell'attività batterica intestinale per effetto stimolante dei diversi trattamenti. Infatti, chetoni, alcoli e, solo per SB il dimetil-trisulfide, sono aumentati; lo stesso è accaduto per l'acetaldeide con CW. Parte dei risultati ottenuti da entrambe le prove che componevano questa sperimentazione sono risultati controversi; in parte ciò può trovare spiegazione nel fatto che prove *in vitro* costituiscono un modello di studio dell'animale, tuttavia subiscono il limite della mancanza di variabilità individuale del microbiota intestinale del singolo animale.

Abbreviazioni

AGV	Acidi grassi volatili
BCS	Indice di valutazione della condizione corporea
CCECAI	Indice di attività clinica di enteropatia cronica canina
CIBDAI	Indice di attività clinica di malattia infiammatoria cronica intestinale
COV	Composti organici volatili
CTRL	Dieta di controllo
CW	Estratto cellulare di parete di lievito
DNA	Acido desossiribonucleico
ds DNA	DNA a doppio filamento
EM	Energia metabolizzabile
EFSA	Autorità europea per la sicurezza alimentare
FISH	Ibridazione fluorescente <i>in situ</i>
FOS	Frutto-oligosaccaridi
GOS	Galatto-oligosaccaridi
HPLC	Cromatografia liquida ad alta prestazione
HS-SPME	Microestrazione in fase solida
IBD	Malattia infiammatoria cronica intestinale
Ig	Immunoglobuline
IMO	Isomalto-oligosaccaridi
IL	Interleuchina
LAC	Lattitolo
MOS	Mannano-oligosaccaridi
NDO	Oligosaccaridi non digeribili
NGS	Sequenziamento massivo parallelo
OF	Oligofruttani
OTU	Unità tassonomica operativa
PCR	Reazione a catena della polimerasi
PLE	Enteropatia proteinodisperdente
qPCR	PCR quantitativa
RFLP-T	Polimorfismo da lunghezza dei frammenti di restrizione
rRNA	Acido ribonucleico ribosomiale
RT-qPCR	PCR quantitativa in tempo reale
SB	Saccharomyces boulardii
SS	Sostanza secca
ss DNA	DNA a singolo filamento
SOS	Oligosaccaridi della soia
STQ	Sul tal quale
TNF- α	Fattore di necrosi tumorale α
UFC	Unità formanti colonia
XOS	Xilo-oligosaccaridi

1. Il microbiota intestinale del cane

1.1. Introduzione

I mammiferi ospitano nei loro singoli compartimenti corporei una quantità di cellule microbiche almeno dieci volte superiore a quella delle cellule costituenti il loro stesso organismo, con un insieme genomico che è stimato essere circa un migliaio di volte superiore al genoma dell'ospite (Gibson e Roberfroid, 1995).

Con il concetto di microbiota, ipotizzato per la prima volta da Lederberg e McCray agli inizi del nuovo millennio, si faceva riferimento ad un insieme comunitario di microrganismi ad azione commensale, simbiotica e patogena che condividono lo stesso distretto corporeo con l'ospite (Lederberg e McCray, 2001).

In termini più appropriati, attualmente con il termine microbiota si fa riferimento ad un insieme di comunità batteriche presenti sulle superfici mucose (ma comprendendo anche batteri liberi nel lume intestinale) o su altri distretti corporei, primo fra tutti la cute.

Invece, con il termine microbioma si intende nello specifico l'intero genoma dei microrganismi riscontrabili nei singoli distretti corporei dei mammiferi (Oever e Netea, 2014), appartenenti al regno degli eucarioti, degli archeobatteri, dei batteri, dei virus e dei funghi.

Per una più completa denominazione, si può procedere ad un ulteriore livello di suddivisione, che comprenda comunità omogenee di microrganismi: il batterioma comprende dunque l'insieme di popolazioni batteriche (Schmitz e Suchodolski, 2016), mentre il termine micobioma è stato coniato per esigenza di raggruppamento dell'ecosistema fungino (Foster *et al.*, 2013).

1.2. Tecniche di caratterizzazione del microbiota intestinale

1.2.1. Tecniche di coltura tradizionale

Prima della diffusione e dell'utilizzo delle più recenti tecniche d'indagine biomolecolare, l'identificazione e la quantificazione delle specie batteriche che popolano l'apparato digerente dei mammiferi avveniva solamente tramite coltura su terreni adattati a supportare la crescita e le caratteristiche metaboliche dei vari generi batterici.

Questa metodica si dimostra tuttora utile per la caratterizzazione di specifici ceppi batterici con nota azione patogena a livello intestinale (*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Yersinia* spp.), permettendo così, mediante l'isolamento di batteri vitali, l'identificazione di infezioni in corso e la successiva individuazione di molecole ad azione antibatterica mirata; quanto finora detto trova collocazione anche in contesti di studi epidemiologici, finalizzati all'ottenimento di dati sulla prevalenza di infezioni di origine batterica dell'apparato digerente dei mammiferi. Tuttavia, le tecniche di coltura batterica risultano poco adatte alla caratterizzazione completa di ecosistemi complessi quali il microbiota del tratto gastrointestinale dei mammiferi, poiché poco si conosce sulle reali esigenze di crescita delle specie che lo compongono; inoltre, la maggior parte dei batteri che vivono nell'apparato digerente di cane e gatto richiedono strette condizioni di anaerobiosi, non facili da ottenere con tecniche di laboratorio standard (Greetham *et al.*, 2002; Hooda *et al.*, 2012). Inoltre, molti batteri sopravvivono grazie ad interazioni mutualistiche con altre popolazioni batteriche, o con l'ospite stesso, e queste condizioni non sono riproducibili con terreni di coltura (Greetham *et al.*, 2002).

Si ritiene dunque che con i comuni terreni selettivi si sia potuto isolare solo il 10-50% del totale dei batteri che caratterizzano il microbiota intestinale (Langendijk *et al.*, 1995; Harmsen *et al.*, 2000).

1.2.2. Tecniche di biologia molecolare

Le tecniche di biologia molecolare attualmente in uso per la caratterizzazione del microbiota intestinale del cane si basano su metodiche di sequenziamento del DNA batterico proveniente da campioni intestinali (fecali, bioptici, o contenuto luminale).

Ciò avviene mediante l'utilizzo di *primers* specie-specifici che permettono l'amplificazione (mediante PCR quantitativa real-time, qPCR) di una porzione di DNA specifica per una data specie batterica, costituita in genere dal marker primario 16S rRNA, un gene della piccola subunità ribosomiale RNA, comune a tutti i batteri ed archeobatteri. Esso contiene sia regioni

di sequenze variabili, sia conservate, permettendo dunque una distinzione tra organismi di diverso livello filogenetico (Deng e Swanson, 2015); tuttavia, il gene 16S rRNA è presente in un numero vario di copie (da 1 a 15 operoni) nelle diverse specie batteriche, pertanto i risultati ottenuti mediante tecnica di quantificazione con qPCR non possono essere riconducibili in termini assoluti alla conta batterica totale, poiché popolazioni batteriche contenenti più operoni risultano sovrastimate (Rastogi *et al.*, 2009).

Inoltre, è noto come alcuni *primers* comunemente utilizzati sottostimino determinate popolazioni batteriche (ad esempio *Bifidobacterium spp.*) comprendenti un elevato contenuto in guanina e citosina (Suchodolski *et al.*, 2008).

Attualmente per quantificare le popolazioni batteriche la metodica ritenuta più accurata è la cosiddetta ibridazione fluorescente *in-situ* (FISH), tecnica che si basa sulla conta mediante microscopio di cellule batteriche fluorescenti. Mediante FISH è possibile inoltre localizzare i batteri, cioè capire se si caratterizzano per colonizzazione mucosale o luminale, e comprenderne possibili caratteri di invasività, quali la tendenza ad aderire all'endotelio o alla mucosa (Suchodolski, 2011).

Più recentemente sono stati sviluppati nuovi metodi caratterizzati dalla capacità di sequenziare molti frammenti di DNA contemporaneamente, aprendo così una nuova era del sequenziamento, seppur con il limite di costi elevati. Queste metodiche di nuova concezione, definite "next generation sequencing" (NGS), prevedono un sequenziamento ad elevato parallelismo. Fra queste, il "pirosequenziamento-454" e la tecnica "Illumina" permettono di ottenere informazioni utili sulla distribuzione di tutte le popolazioni batteriche confrontate sul totale del microbiota del singolo animale; tuttavia, in caso di popolazioni batteriche presenti in numero esiguo rispetto al microbiota totale (è il caso di alcune specie patogene), anche le metodiche NGS potrebbero fallire nella loro identificazione, se non precedentemente amplificate mediante primers altamente specifici (Suchodolski, 2015).

1.3. La composizione del microbiota intestinale del cane

La maggior parte degli studi presenti in letteratura, volti alla caratterizzazione del microbiota intestinale del cane, è stata condotta a partire da campioni fecali, poiché facilmente ottenibili senza pratiche invasive per l'animale (Garcia-Mazcorro *et al.*, 2011; Handl *et al.*, 2011, 2013; Swanson *et al.*, 2011; Suchodolski *et al.*, 2012a; Honneffer *et al.*, 2014; Minamoto *et al.* 2014). Un numero ridotto di studi sono stati condotti mediante l'utilizzo di materiale biotico proveniente dalle diverse sedi del tratto digerente (Suchodolski *et al.*, 2009, 2010, 2012b). E' importante distinguere la tipologia di campione analizzato ed il sito di prelievo delle biopsie quando si comparano i risultati dei diversi studi, in quanto le popolazioni batteriche differiscono notevolmente a seconda del substrato analizzato e del sito di campionamento (Momozawa *et al.*, 2011).

I batteri rappresentano la componente più numerosa del microbiota intestinale dei mammiferi, con un numero stimato di cellule batteriche (10^{12} - 10^{14}) circa dieci volte maggiore del totale di cellule del mammifero ospite; le reali proporzioni batteriche di tale ecosistema nel cane sono ancora poco chiare, principalmente a causa delle difficoltà tecniche che si riscontrano nello studio della completa caratterizzazione di questo ecosistema così complesso (Garcia-Mazcorro *et al.*, 2012).

Studi ad oggi svolti per identificare il microbiota intestinale del cane hanno evidenziato come, in termini generali, la composizione non differisca molto fra uomo, cane e gatto (Handl *et al.*, 2011; Suchodolski *et al.*, 2012b).

Nel cane, in particolare, si stima la presenza di circa 200 filotipi batterici colonizzanti l'intestino tenue, con aumento notevole fino a qualche migliaia di filotipi dei batteri del colon. La microflora intestinale è costituita in gran parte da anaerobi obbligati ed in minor misura da aerobi facoltativi, lieviti e muffe (Balish *et al.*, 1977).

I batteri colonizzano il tratto digerente per tutta la sua lunghezza, aumentando sia in termini di conta batterica totale, che per numero di popolazioni, procedendo in senso oro-caudale. Recentemente sono state rivalutate le considerazioni riguardanti la sterilità del tratto digerente al momento della nascita. Studi condotti nell'uomo e nel topo evidenziano chiaramente l'esistenza di un microbiota colonizzante l'intestino prima della nascita del feto (Jiménez *et al.*, 2005; Rautava *et al.*, 2012); non sono attualmente noti studi analoghi effettuati in feti di cane o gatto, ma vista la somiglianza per certi aspetti anatomici e fisiologici agli altri mammiferi, anche per questi animali è ipotizzabile una situazione analoga all'uomo.

Buddington (2003) ha condotto uno studio sui cambiamenti qualitativi e quantitativi della microflora intestinale del cane dalla nascita fino all'età adulta; nello stomaco il numero di batteri anaerobi, molto elevato nel neonato, decresce visibilmente nei primi 20 giorni di vita del cucciolo a causa dell'aumentata secrezione di acido cloridrico e pepsina. Nel piccolo intestino il più alto numero di batteri aerobi ed anaerobi si riscontra il primo giorno dopo la nascita, in seguito decresce fino a stabilizzarsi dopo il secondo mese di vita del cane, rimanendo pressoché invariato anche in età adulta; il numero di clostridi a livello luminale diminuisce progressivamente entro i 42 giorni di vita, mentre per i lattobacilli non sono state rilevate differenze significative legate all'età. Al contrario, il numero di batteri appartenenti al genere *Bacteroides* spp. aumenta significativamente nei primi due mesi di vita (Buddington, 2003). Nel colon, invece, dopo la terza settimana si assiste a una riduzione del numero di batteri aerobi, a differenza degli anaerobi che rimangono invariati di numero, ma subiscono delle modificazioni nella distribuzione dei generi, con una diminuzione del numero di clostridi ed un aumento del genere *Bacteroides* spp. (Buddington, 2003).

Nell'animale adulto, la carica batterica totale a livello gastrico è relativamente bassa (10^5 log₁₀ ufc/g di contenuto), se paragonata a quella dei tratti successivi; inoltre, in questo distretto, anaerobi facoltativi quali *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. e lieviti sono presenti in una quantità pari a circa 100 ufc/ml di contenuto gastrico (Rastall, 2004). Le sequenze evidenziate dal gene 16S rRNA, secondo quanto riportato da Garcia-Mazcorro *et al.* nel 2012, dimostrano una totale prevalenza dei *phyla* Proteobatteri (99%) e Firmicutes (0,3%); il genere principalmente identificato, *Helicobacter* spp., è presente nel 99% delle sequenze evidenziate. La microflora fecale non rispecchia perfettamente la composizione microbica del piccolo intestino. Ci sono infatti differenze significative nel rapporto fra batteri aerobi ed anaerobi nel digiuno e nelle feci: nel digiuno aerobi ed anaerobi si presentano in proporzioni pressoché uguali, mentre, come già descritto, nel colon predominano gli anaerobi. Infine, nel piccolo intestino assistiamo a variazioni notevoli delle conte batteriche, mentre nel colon i gruppi tassonomici dei batteri maggiormente rappresentati (Fusobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria) si presentano costanti nel tempo (Mentula *et al.*, 2005; Suchodolski *et al.*, 2008).

Studi condotti mediante conta batterica su chimo intestinale hanno evidenziato come la numerosità batterica si attesti in un range compreso fra 10^2 - 10^5 ufc/g; a livello di colon, invece, la conta batterica totale si attesta su valori di 10^9 - 10^{11} (ufc/g) (Hoffmann *et al.*, 2016).

Simpson et al. (2002) hanno caratterizzato la microflora del cane tramite metodi di coltura tradizionali su campioni di feci, identificando i seguenti generi batterici come i più numerosi (circa 4×10^{10} ufc/g di feci): *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* e, in misura minore con circa 10^7 batteri/g di feci, enterococchi, clostridi, bifidobatteri ed eubatteri. Tecniche di biologia molecolare hanno permesso di evidenziare come i *phyla* Firmicutes e Bacteroidetes siano quelli maggiormente presenti in intestino (Xenoulis et al. 2008; Hoffmann et al., 2016); Suchodolski et al., (2009) hanno evidenziato 6 *phyla* principali, includendo anche Proteobacteria, Spirochaetes, Fusobacteria ed Actinobacteria.

I Firmicutes comprendono importanti famiglie e generi batterici produttori di acidi grassi a corta catena, fra i quali vengono riportati *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Dorea* (tutti rientranti nel cluster Clostridium XIVa e IV) (Suchodolski et al., 2009).

Xenoulis et al., 2008 hanno evidenziato Lactobacillales a livello di duodeno e digiuno (rispettivamente nel 22% e 10% di campioni esaminati).

Riscontrabili in misura minore a livello digiunale (<0.1%) si collocano Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Fusobacteria, Tenericutes, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, e Chloroflexi (Suchodolski et al., 2008).

Nell'ileo Fusobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes sono i *phyla* batterici più rappresentati; la presenza di Fusobacteria (prevalenti nel 30% delle sequenze di analisi di campioni ileali provenienti da cani sani) e di Clostridiales (20%), e l'apparente minor presenza di *Lactobacillus* spp. si discosta da quanto precedentemente descritto per l'intestino tenue (Suchodolski et al., 2008).

Il colon, con una popolazione totale di 10^{11} - 10^{12} ufc/ml di contenuto intestinale, è il tratto dell'apparato digerente che ospita il maggior numero di batteri anaerobi obbligati, quali *Bacteroides* spp., la classe Clostridia (comprendente generi quali *Ruminococcus* spp., *Butyrovibrio* spp., *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp., e *Peptostreptococcus*), *Bifidobacterium* spp., *Atopobium* spp., e peptococchi (Rastall, 2004).

Gli anaerobi facoltativi, che includono lattobacilli, enterococchi, streptococchi ed enterobatteriacee, risultano essere circa mille volte inferiori agli anaerobi obbligati. L'alta carica di microrganismi nel colon dipende anche dal fatto che l'ambiente è favorevole per la crescita di batteri (benefici e dannosi) a causa del pH prossimo alla neutralità, all'ampia disponibilità di nutrienti, così come al lento transito dell'ingesta (Corzo, 2015).

Nei campioni del colon Suchodolski *et al.* (2008) hanno evidenziato, in cani sani, una co-dominanza di *phyla* costituita da Fusobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes (ognuno rappresentava circa il 30% del totale delle sequenze d'analisi). A seguire in termini di numerosità, si riscontrava l'ordine dei Clostridiales (18%), con il cluster Clostridium XIVa come membro predominante (50%); questo cluster include *Eubacterium*, *Roseburia* e *Ruminococcus* spp. che sono fermentatori della fibra della dieta. I Proteobacteria, inclusi gli organismi simili ad *E. coli*, erano presenti in proporzioni scarse (1,4%), mentre i lattobacilli erano presenti a livelli simili alle concentrazioni nel digiuno (10%).

Il tratto gastroenterico dei mammiferi include anche comunità complesse di miceti, archibatteri, protozoi e virus (Suchodolski, 2011).

Come evidenziato da Swanson *et al.* (2011) i batteri costituiscono circa il 98% delle sequenze evidenziate mediante pirosequenziamento-454 da campioni fecali, con un 2% rappresentato dalla somma di funghi e archeobatteri.

Studi condotti con metodiche tradizionali hanno evidenziato che lieviti e muffe risiedono nell'intestino del 25% di Beagle sani, con concentrazioni di 10^1 ufc/g nel digiuno e 10^5 ufc/g nelle feci (Davis *et al.*, 1977; Rastall, 2004; Mentula *et al.*, 2005). Benno *et al.* (1992) mediante metodo coltura-dipendente di liquido prelevato da tutti i tratti dell'apparato digerente hanno riscontrato la presenza di miceti a livello di stomaco, ileo, colon e retto.

In un altro studio condotto mediante la stessa metodica, la presenza di miceti è risultata maggiore (27% vs. 5%) in campioni di chimo intestinale rispetto a campioni fecali degli stessi soggetti (Mentula *et al.*, 2005)

Studi più recenti basati su tecniche molecolari hanno permesso di acquisire maggiori conoscenze sul micobiota; Swanson *et al.* (2011) hanno evidenziato la presenza di 5 *phyla* di miceti su feci di 19 cani, in buono stato di salute e con diarrea acuta non emorragica, ed in particolare Ascomycota e Basidiomycota erano presenti nella metà dei soggetti. Altri *phyla* identificati sono stati Chytridiomycota, Neocallimastigomycota e Microsporidia.

Del *phylum* Ascomycota, Dothideomycetes e Saccharomycetes sono risultate le classi meglio rappresentate, con *Candida* come genere più numeroso (Swanson *et al.* (2011).

La composizione tassonomica e la struttura filogenetica delle comunità fungine che risiedono nell'intestino del cane, evidenziate a livello fecale da Foster *et al.* (2013), espresse come OTU, denotano una minore variabilità di popolazioni rispetto a quanto già noto per le popolazioni batteriche (dove centinaia di OTU batteriche sono state caratterizzate da Handl *et al.* (2011).

A livello di classificazione, nello studio di Foster *et al.* (2013) non sono state evidenziate differenze significative per quanto concerne il microbioma di cani in buono stato di salute e con patologia intestinale.

In accordo con quanto già precedentemente descritto, anche Swanson *et al.* (2011) riporta come Ascomycota e Basidiomycota, evidenziati mediante metodo di sequenziamento shotgun, siano i *phyla* meglio rappresentati nei campioni fecali di cani sani (6 soggetti in questo caso).

Gli archeobatteri, da un punto di vista evolutivo, sono distinti dai batteri e dagli eucarioti; sono organismi anaerobi obbligati e rientrano anche nella composizione della flora microbica ruminale e di quella intestinale umana, con la classe principale costituita dai Metanobatteri (Swanson *et al.*, 2011). Essi rappresentano circa l'1% delle sequenze geniche identificate nel microbiota del cane, e durante un'analisi comparativa sul gene 16S rRNA con primers universali specifici sono stati individuati altri due *phyla*: Crenarchaeota ed Euryarchaeota (Suchodolski, 2011).

Per studi di identificazione del genoma virale che caratterizza il microbiota intestinale del cane non è possibile ricorrere all'utilizzo di primers universali; i virus fino ad oggi classificati appartengono ai generi *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Parvovirus*, *Norovirus*, *Astrovirus*, e *Morbillivirus* (Suchodolski, 2011). Swanson *et al.* (2011) hanno rilevato virus a ssDNA in campioni fecali di cane e gatto, e circa lo 0,38% di tutte le sequenze esaminate rappresentava virus dsDNA, la maggior parte rappresentati da batteriofagi.

1.4. Ruolo e funzioni del microbiota intestinale del cane

La componente batterica endogena ed esogena, ovvero microrganismi batterici che raggiungono l'intestino, ad esempio, tramite l'alimento o l'assunzione di probiotici, ricoprono un importante ruolo nelle funzioni metaboliche, immunitarie e protettive dell'ospite, con un impatto notevole sul suo stato nutrizionale e di salute in termini più generali; tuttavia, il grado di queste connessioni rimane ancora da chiarire del tutto (Laparra e Sanz, 2010).

L'epitelio intestinale è ricoperto da uno strato di muco, formato da glicoproteine dette mucine, che assieme a peptidi ad azione antibatterica, e alla presenza di sostanze irritanti come la bile, svolgono un'efficace azione di difesa locale. Questa barriera è deputata alla regolazione del transito trans-cellulare e para-cellulare di sostanze esogene, e a limitare, se integralmente conservata, il passaggio della maggior parte di antigeni dal lume intestinale.

Anche i batteri intestinali sono impiegati in questa prima linea di difesa locale, poiché sono coinvolti nel meccanismo che regola la permeabilità paracellulare, così come nell'espressione dei geni che regolano la produzione di mucina e la secrezione di peptidi come defensine ed angiotensine, ad azione antimicrobica.

Il microbiota intestinale è inoltre coinvolto nello sviluppo del sistema immunitario dell'animale ospite, regolando la composizione della lamina propria delle cellule T, delle IgA e dei livelli sierici di immunoglobuline (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004).

Il microbiota intestinale regola anche il metabolismo dell'ospite, fornendo enzimi coinvolti nell'utilizzo di carboidrati non digeribili, e glicoproteine (come la mucina), intervenendo nella deconiugazione e deidrossilazione degli acidi biliari, così come nella biosintesi di vitamine dei gruppi B e K, degli isoprenoidi, e nel metabolismo di aminoacidi e xenobiotici (Laparra e Sanz, 2010).

Nell'uomo sono noti numerosi generi batterici, in particolar modo presenti a livello colico, che risultano coinvolti nel metabolismo ed assorbimento dei carboidrati; questo ruolo è tutt'altro che marginale, dal momento che si ipotizza che dal metabolismo batterico si generi oltre il 10% della fonte energetica giornaliera dell'uomo (Flint *et al.*, 2008); rispetto al microbiota dell'uomo e di altre specie domestiche, quello del cane non è strettamente correlato alla produzione di energia, rappresentando in questo caso solo il 2-7% del mantenimento energetico dell'ospite (Wynn, 2009; Deng e Swanson, 2015).

La fermentazione di polisaccaridi complessi ad opera dei batteri intestinali porta alla formazione di acidi grassi volatili (AGV) a corta catena e gas (biossido di carbonio e idrogeno).

I principali acidi grassi volatili vengono metabolizzati in distretti diversi e svolgono funzioni distinte; il butirrato viene metabolizzato a livello di epitelio del colon, dove svolge una funzione trofica ed antinfiammatoria a livello cellulare, promuovendo inoltre la sintesi di cellule T immunoregolatorie (T_{reg}) (Hamer *et al.*, 2008; Arpaia *et al.*, 2013). A conferma del ruolo anti-infiammatorio ricoperto dagli AGV, studi in medicina umana hanno riscontrato una significativa alterazione nel numero dei batteri produttori di butirrato nel colon di pazienti con disordini infiammatori (Dwivedi *et al.*, 2016).

Fra gli acidi grassi volatili, acetato e propionato vengono assorbiti dall'intestino, e tramite il circolo portale sono metabolizzati rispettivamente a livello di muscolo e fegato, dove svolgono un ruolo opposto nel metabolismo lipidico: l'acetato contribuisce alla sintesi del colesterolo a livello epatico, mentre il propionato ne inibisce la produzione (Hamer *et al.*, 2008).

La formazione di acidi grassi volatili contrasta la liberazione di acidi grassi a catena ramificata, tra cui l'isobutirrato e l'isovalerato, oltre a quella di tioli, amine e fenoli e di altri cataboliti dei processi della fermentazione putrefattiva batterica (Rosendale *et al.*, 2015).

Alcuni batteri intestinali, tra cui *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., enterobatteri, bifidobatteri e lattobacilli partecipano alla degradazione degli aminoacidi aromatici fenilalanina, tirosina e triptofano, durante la quale producono composti fenolici. Tali sostanze vengono assorbite dal colon, metabolizzate a livello epatico ed escrete con le urine; bassi livelli di fenoli nel tratto distale del colon sono ritenuti fisiologici, e sembrano stimolare la crescita batterica (Hughes *et al.*, 2000). Altre metaboliti batterici di cui è noto un ruolo positivo nei confronti dell'ospite troviamo gli acidi biliari secondari e l'indolo (un prodotto di degradazione del triptofano), che contribuiscono a mantenere l'omeostasi immunitaria e a rinforzare la barriera di difesa intestinale. Gli acidi biliari secondari inoltre interferiscono con la sintesi di citochine pro-infiammatorie quali il TNF- α a livello di monociti e macrofagi (Duboc *et al.*, 2013).

Dal metabolismo dei substrati dietetici compiuto dai batteri per l'ottenimento di energia derivano anche alcune sostanze ritenute dannose per l'ospite, fra cui alcuni cataboliti del metabolismo proteico; nel colon infatti endopeptidasi pancreatiche residue, proteasi e peptidasi batteriche depolimerizzano i residui di nitrogeno, producendo piccoli peptidi e aminoacidi disponibili per la fermentazione batterica (Hughes *et al.*, 2000).

Uno dei principali cataboliti proteici di derivazione batterica è l'ammoniaca (NH_3), che viene utilizzata in parte dai batteri durante la fermentazione dei carboidrati per la sintesi di proteina microbica. L'ammoniaca prodotta viene in gran parte assorbita e, attraverso il sistema portale

epatico raggiunge il fegato, dove viene convertita ad urea ed in seguito escreta con le urine (Blachier *et al.*, 2007).

Clostridi, bifidobatteri e *Bacteroides* spp. sono fra i batteri implicati anche nella produzione di amine biogene (agmatina, tiramina, pirrolidina, istamina, piperidina, cadaverina, putrescina e 5-idrossitriptamina), cataboliti che nell'intestino e nel fegato vengono trasformati in composti non tossici ad opera di monoaminossidasi e diaminossidasi (Drasar e Hill, 1974). Hughes *et al.* (2000) hanno dimostrato come nell'uomo la putrescina svolga un compito importante nella regolazione della crescita e della differenziazione cellulare intestinale, tuttavia ipotizzandone anche un ruolo della stessa come precursore di N-nitroso-composti coinvolti nella carcinogenesi del cancro del colon-retto (Hughes *et al.*, 2000).

I batteri riduttori del solfato inorganico in solfuro di idrogeno sono anaerobi appartenenti al genere *Desulfovibrio* (Pitcher e Cummings, 1996); tali batteri riducono gli aminoacidi solforati, tra cui la cisteina, ed utilizzano il solfato o lo ione solfito come accettore terminale di elettroni. Il solfuro è rilasciato nel lume intestinale, ed a pH acido è idrolizzato nella forma biologicamente attiva del solfuro d'idrogeno (H₂S), il quale ha vari effetti indesiderati, alcuni correlati all'insorgenza della colite ulcerativa (Pitcher e Cummings, 1996). Le concentrazioni di solfuro d'idrogeno nel colon sembrano essere correlate, nell'uomo, all'apporto proteico della dieta (Blachier *et al.*, 2007).

1.5. Effetti della dieta sul microbiota intestinale del cane

L'ampia gamma di alimenti commerciali formulati per cani e gatti disponibile in commercio differisce notevolmente per composizione (distribuzione di macronutrienti), tipo e livello di fibre incluse, eventuale presenza di ingredienti funzionali (prebiotici, probiotici, condroprotettori, antiossidanti, acidi grassi essenziali, ecc.); in termini generali, i mangimi estrusi contengono un'elevata quota di carboidrati (30-60% sulla SS), nettamente inferiore negli alimenti umidi (<10% sulla SS), i quali contengono livelli maggiori di proteine e lipidi (Hill *et al.*, 2009). Questa variabilità nella concentrazione dei nutrienti della dieta può facilmente alterare a livello fecale le popolazioni microbiche e le concentrazioni dei prodotti di fermentazione batterica, come dimostrato da studi condotti *in vitro* ed *in vivo* (McBurney *et al.*, 1988; Hiele *et al.*, 1991; Kerr *et al.*, 2013).

Le popolazioni batteriche costituenti il microbiota intestinale possono essere categorizzate in saccarolitiche ed in proteolitiche, sulla base della loro capacità di degradare le diverse classi di composti, cui fa seguito la formazione di metaboliti, per ricavarne energia. La corretta proporzione di queste due categorie di batteri intestinali è uno dei fattori contribuenti ad uno stato di equilibrio del microbiota, e dell'ospite nel suo complesso (Case *et al.*, 2011).

Un microbiota stabile, nel cane così come nell'uomo, è costituito prevalentemente da specie saccarolitiche che fermentano i carboidrati; nello specifico, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Ruminococcus*, sono generi comunemente coinvolti nella degradazione di oligosaccaridi della glicoproteina mucina, attraverso l'azione delle glicosidasi extracellulari (de Graaf e Venema, 2007). I polisaccaridi complessi sono la fonte energetica primaria per il microbiota del colon (Laparra e Sanz, 2010), e questo spiega la prevalenza dei saccarolitici rispetto ai proteolitici; la fermentazione dei polisaccaridi della dieta ad opera di enzimi batterici, come le glucosidasi e le glucuronidasi, porta alla produzione di acidi grassi volatili quali acetato, butirato e propionato, oltre che alla formazione di gas (anidride carbonica e idrogeno), ed all'aumento della massa batterica fecale. Ne consegue dunque che diete povere di carboidrati inducano le popolazioni batteriche intestinali a fermentare aminoacidi e ammoniaca per produrre energia (Nery *et al.*, 2012). Le specie batteriche proteolitiche si ritrovano in condizioni normali nelle porzioni distali del colon, in quanto la quota di carboidrati fermentescibili è maggiore nelle porzioni prossimali di questo distretto; in condizioni patologiche, o se aumenta la quota di proteine parzialmente digerite a livello di intestino crasso, cresce il substrato disponibile per le specie proteolitiche, le quali proliferano e possono produrre eccessive quantità di cataboliti

potenzialmente tossici per l'ospite (Case *et al.*, 2011). Hang *et al.* (2013) hanno valutato per 3 settimane gli effetti di tre diete diverse per concentrazioni di macronutrienti, riscontrando durante la somministrazione di una dieta ad alto contenuto proteico e lipidico, formulata con farina di carne di bassa qualità, un aumento del pH del colon ed una diminuzione di acido propionico ed acido acetico.

Specie ascrivibili alla categoria dei proteolitici nell'intestino crasso, sono i generi *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, e *Streptococcus* (de Graaf e Venema, 2007).

Si ipotizza che nell'uomo i metaboliti batterici derivanti dalla fermentazione di substrati proteici siano coinvolti nella patogenesi del cancro del colon-retto, anche in virtù del fatto che nel tratto più distale del colon l'effetto potenzialmente tossico di tali metaboliti pare amplificato, poiché maggiore è il contatto dell'epitelio intestinale con i contenuti del lume, a causa della loro natura più solida e del più lento transito in questo segmento dell'intestino (de Graaf e Venema, 2007).

Altro substrato dietetico utile per alcuni batteri, e la cui funzione è ritenuta virtuosa per l'ospite, è la fibra. Questa viene definita come l'insieme di tutti i costituenti dietetici di origine vegetale indigeribili da parte degli enzimi dell'ospite (Case *et al.*, 2011); non è né idrolizzata né assorbita nell'intestino tenue, e può dunque essere fermentata nel colon (Dwivedi *et al.*, 2016). La fibra è composta da carboidrati vegetali strutturati e da lignina; i maggiori componenti della fibra nella dieta degli animali da compagnia includono cellulosa, emicellulosa, lignina, pectina, gomma, e mucillagini (Case *et al.*, 2011). Ai fini di una corretta digestione e salute intestinale è importante il tipo e la quantità di fibra disponibile, nonché i sottoprodotti che ne derivano. Tra i batteri in grado di fermentare la fibra sono stati riconosciuti i generi *Eubacterium* spp., *Roseburia* spp. e *Ruminococcus* spp. (Suchodolski *et al.*, 2009; Swanson *et al.*, 2011). Tipi di fibra facilmente fermentescibili sono la pectina e la gomma guar; risultano meno fermentescibili la polpa di barbabietola e la crusca di riso ed in misura ancora inferiore la cellulosa, la gomma karaya e la gomma xanthan (Case *et al.*, 2011).

A favore del ruolo positivo esercitato dalla fibra vegetale sul microbiota intestinale, uno studio di Middelbos *et al.* (2010) ha evidenziato come una quota pari al 7,5% di polpa di barbabietola utilizzata come supplemento di una dieta commerciale nel cane, ha comportato una diminuzione delle popolazioni fecali dei *phyla Actinobacteria* e *Fusobacteria*, in confronto a cani alimentati senza tale supplemento prebiotico.

1.6. Alterazioni del microbiota intestinale del cane in corso di patologie gastroenteriche

In maniera analoga a quanto si verifica nella specie umana, alterazioni in termini quantitativi e qualitativi delle comunità batteriche intestinali possono contribuire alla patogenesi di disordini del tratto gastroenterico. Con questo si fa riferimento sia a patologie che occorrono a seguito della colonizzazione di specie enteropatogene, che anche a stati patologici imputabili ad alterazioni dei meccanismi di interazione fra microbiota intestinale ed ospite; fra questi rientrano il metabolismo degli acidi biliari ed i processi fermentativi batterici di componenti dietetiche (come carboidrati non digeribili e proteine).

Bell *et al.* (2008), utilizzando una tecnica di fingerprinting genetico chiamata tecnica di polimorfismo da lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP-T), hanno valutato le variazioni in termini di popolazioni batteriche in cani con diarrea confrontati con soggetti sani, e hanno evidenziato come *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* fossero maggiormente presenti nei soggetti con diarrea.

Jia *et al.* (2010), mediante metodica FISH, ha caratterizzato il microbiota intestinale di 9 cani con diarrea cronica, evidenziando un aumento significativo di *Bacteroides* ed una simultanea riduzione di *Lactobacillus* ed *Enterococcus* rispetto agli 8 soggetti di controllo.

Studi condotti in cani affetti da malattia infiammatoria intestinale (inflammatory bowel disease, IBD) hanno mostrato che i soggetti malati presentavano una riduzione di Bacteroidetes ed un aumento di Proteobacteria; ad esempio, Chaban *et al.* (2012), mediante metodica di pirosequenziamento-454 del gene universale chaperonina 60 (cpn60) su campioni fecali di cani con IBD, hanno evidenziato una riduzione di Bacteroidetes (principalmente *B. vulgatus*) rispetto a campioni fecali di cani sani. Suchodolski *et al.* (2010, 2012b) hanno indagato la composizione del microbiota intestinale su campioni biotici, mediante tecniche di amplificazione e pirosequenziamento del gene 16S rRNA, evidenziando in cani con IBD un aumento di Proteobacteria (*Diaphorobacter* e *Acinetobacter*) e una riduzione di Clostridia, Fusobacteria, Bacteroidaceae Prevotellaceae. In accordo con i risultati ottenuti da Suchodolski *et al.*, (2010, 2012b), Xenoulis *et al.* (2008) hanno confermato che in cani con IBD si riscontra comunemente una diminuzione del numero di specie batteriche intestinali, oltre che una riduzione di Bacteroidetes ed un aumento nel numero di Enterobacteriaceae e Clostridiaceae. Il confronto sulla composizione del microbiota intestinale che emerge dai diversi studi spesso porta a risultati molto variabili, in virtù dell'influenza di diversi fattori, fra cui la metodica

utilizzata ed i numerosi parametri che caratterizzano l'individualità dei soggetti impiegati (razza, età, dieta assunta, condizioni ambientali, stato della patologia e terapie in atto).

Le complesse relazioni di causa-effetto che caratterizzano il microbiota intestinale e lo stato generale dell'ospite restano ancora da chiarire completamente, anche in virtù del fatto che le metodiche di biologia molecolare sono in grado di indagare la composizione del microbiota in termini di popolazioni batteriche, ma non forniscono informazioni sull'attività ed il ruolo dei batteri. Per ampliare tali conoscenze si rendono necessarie informazioni sul trascrittoma ed il metaboloma batterico, oltre che maggiori certezze sui meccanismi fisiologici e patologici degli organismi ospiti.

1.6.1. La disbiosi intestinale nel cane

Alterazioni della composizione del microbiota intestinale, e conseguenti disequilibri fra le diverse popolazioni batteriche che lo compongono, possono avere conseguenze negative a livello intestinale ed extra-intestinale, ancora oggi non del tutto chiarite (Sekirov *et al.* 2010).

Per disbiosi si intende un'alterazione nella composizione e/o variabilità (intesa come numero di specie batteriche) del microbiota intestinale. Studi condotti sia sulla specie umana che in specie di interesse veterinario hanno correlato situazioni di disbiosi intestinale con disordini gastrointestinali, fra i quali IBD, colite granulomatosa e sindrome del colon irritabile (Suchodolski *et al.*, 2012a, b; Honneffer *et al.*, 2014, 2015; Minamoto *et al.*, 2014).

Per quanto non sia stato ancora chiarito se la disbiosi rientri nella patogenesi di patologie gastrointestinali, o ne sia il risultato, l'ipotesi ad oggi ritenuta più probabile è che sia una condizione concomitante. Alcuni studi hanno infatti evidenziato come l'infiammazione intestinale cronica frequentemente causi disbiosi, e come questa condizione sia essa stessa un fattore di rischio per lo sviluppo di patologie intestinale a carattere infiammatorio in individui geneticamente predisposti (Mizoguchi e Mizoguchi, 2010; Mondot *et al.*, 2011; Well *et al.*, 2011). Pertanto, il raggiungimento di uno stato di normobiosi dovrebbe costituire un traguardo terapeutico nelle affezioni del tratto gastrointestinale (Kathrani *et al.*, 2012).

Gli studi volti a caratterizzare le forme di disbiosi che si verificano nelle diverse patologie infiammatorie croniche intestinali sono ancora agli albori, e non si hanno attualmente a disposizione informazioni specifiche sulle alterazioni del microbiota intestinale, tali da poter essere utilizzati come marker prognostici; tuttavia, sono stati riconosciuti degli indici di

disbiosi correlati ad alterazioni metaboliche in corso di patologie infiammatorie intestinali, utili in futuro come aiuto diagnostico e terapeutico (Kathrani *et al.*, 2012).

Poiché il microbiota intestinale è un sistema dinamico e complesso, il miglior approccio diagnostico alla disbiosi prevede un utilizzo combinato di metodiche di biologia molecolare (amplificazione del gene batterico 16S rRNA mediante l'utilizzo di primers universali), seguito dall'analisi degli amplificati con metodiche NGS, quantificazione diretta di specifici taxa batterici con qPCR in associazione all'utilizzo di FISH per visualizzare la traslocazione batterica dal lume intestinale alla mucosa epiteliale. Studi futuri potranno beneficiare anche di ulteriori conoscenze sui metaboliti batterici, come acidi grassi a corta catena e acidi biliari fecali, per comprenderne *in toto* le funzioni, e quali conseguenze sul sistema immunitario dell'ospite possano derivare da loro modificazioni (Suchodolski, 2016).

Attualmente si ritiene che condizioni patologiche che si accompagnano a disbiosi intestinale derivino da alterazioni della funzionalità batterica (come riduzioni della produzione di acidi grassi volatili ed altri metaboliti), piuttosto che alterazioni della composizione del microbiota intestinale. Le conseguenti alterazioni di carattere funzionale e/o immunologico derivanti da disbiosi intestinale non sono ad oggi facilmente descrivibili, poiché la completa caratterizzazione del microbiota intestinale non è nota; è comunque probabile che le conseguenze di disbiosi intestinale giochino un ruolo cruciale negli intricati meccanismi comunicativi fra i batteri ed il sistema immunitario dell'ospite, e che queste relazioni concorrano alla patogenesi di affezioni croniche intestinali (Suchodolski, 2016). Inoltre, va tenuto in considerazione che la composizione del microbiota non è fisiologicamente costante lungo il tratto gastrointestinale, e che esistono differenze evidenti fra i batteri che popolano il lume intestinale e che quelli che vivono a livello mucosale (Suchodolski *et al.*, 2004, 2005; Manchester *et al.*, 2013; White *et al.*, 2015).

1.6.2. Disbiosi e patologie intestinali

Quadri di disbiosi sono stati descritti in cani con disordini gastrointestinali acuti, cronici, oppure conseguenti ad infezione parassitaria da *Giardia duodenalis* (Suchodolski *et al.*, 2012b, 2015; Guard *et al.*, 2015; Minamoto *et al.*, 2015; Slapeta *et al.*, 2015).

Analogamente a quanto si riscontra nella specie umana, anche nei cani affetti da IBD si verifica a livello intestinale un aumento di Proteobacteria (di cui fanno parte i generi *Escherichia coli*, *Diaphorobacter* spp.), assieme ad una diminuzione di Fusobacteria, Bacteroidetes, e alcuni

batteri appartenenti ai Firmicutes (*Faecalibacterium* spp., Ruminococcaceae, *Turicibacter* spp., *Blautia* spp.); queste variazioni delle popolazioni batteriche sono state descritte a livello duodenale da Xenoulis *et al.* (2008), Suchodolski *et al.* (2010, 2012a), e in campioni fecali da Suchodolski *et al.* (2012b), Honneffer *et al.* (2014), Minamoto *et al.* (2014, 2015). In base a quanto descritto, modificazioni di popolazioni batteriche riscontrabili in concomitanza a patologie dell'intestino tenue possono essere identificate anche in campioni fecali.

Generalmente, le disbiosi che si verificano a seguito di patologie acute possono presentare quadri simili a quanto accade durante infiammazioni croniche, seppur con alcune differenze; ad esempio, in campioni fecali di cani affetti da diarrea acuta Suchodolski *et al.* (2012b) hanno descritto un aumento delle popolazioni di *Clostridium perfringens* e di Fusobacteria, batteri che si ritiene possano risultare diminuiti in campioni di feci di cani con IBD. Un aumento di *Clostridium perfringens* in soggetti con diarrea è ritenuto in genere essere la causa della patologia stessa, sebbene nel 2014 Minamoto *et al.* abbiano descritto un aumento di questo genere batterico come secondario a disbiosi intestinale in corso di diarrea cronica.

Ad oggi, non sono state indagate differenze in quadri di disbiosi che occorrono in corso di patologie infiammatorie croniche intestinali, enteropatie dieto-responsive e antibiotico-responsive, e mancano studi a lungo termine che valutino se, e come, il microbiota intestinale possa riacquisire una condizione di normobiosi in caso di remissione clinica della patologia intestinale. Rossi *et al.* (2014) e Minamoto *et al.* (2015) hanno descritto parziali modificazioni delle popolazioni batteriche intestinali, dopo rispettivamente 8 settimane e 3 settimane di terapia per IBD, in cani che mostravano miglioramenti clinici; sembrerebbe pertanto che le alterazioni del microbiota rimangano tali a causa della patologia sottostante, o per la residua infiammazione intestinale evidenziabile a livello istologico, anche quando è presente evidenza di miglioramento clinico.

Quadri di disbiosi intestinale si verificano anche durante antibiotico-terapie, specialmente con l'utilizzo di molecole ad ampio spettro come il metronidazolo; in questi casi la composizione del microbiota intestinale si modifica a tal punto da mimare situazioni che caratterizzano patologie intestinali croniche. Pertanto, va tenuto in considerazione che somministrazioni prolungate di antibiotici potrebbero causare disbiosi intestinale erroneamente interpretabile come secondaria alla patologia intestinale per la quale la terapia farmacologica con antibiotici è in corso.

Un microbiota intestinale alterato potrebbe portare a conseguenze negative sull'ospite, fra cui una ridotta formazione di metaboliti batterici ad azione anti-infiammatoria; queste dipendono anche dal tipo di disbiosi verificatasi (ovvero quali gruppi batterici sono coinvolti) e da che parte di intestino rimane coinvolta (Suchodolski, 2016).

Ad esempio, i batteri che appartengono a *Lactobacillus* spp. e *Clostridium* spp. (*C. hiranonis* e *C. scindens*) sono deputati alla deconiugazione degli acidi biliari; pertanto una loro riduzione potrebbe avere un impatto importante sulla capacità dell'ospite di digerire ed assimilare la componente lipidica della dieta.

Altre conseguenze negative che si potrebbero riflettere sulla salute dell'ospite comprendono la deidrossilazione degli acidi grassi, la competizione per alcuni nutrienti (come la vitamina B12), ed il danneggiamento dei villi intestinali; a questo segue la conseguente riduzione della capacità assorbente e l'aumento della permeabilità intestinale con possibile traslocazione batterica dalla mucosa intestinale. Infatti, i batteri che colonizzano l'intestino tenue vi sono spesso adesi e tramite questa interagiscono con l'ospite in modo molto stretto, come importanti stimolatori dell'immunità mucosale. Fra le principali cause di disbiosi a questo livello intestinale vanno incluse repentini cambi dietetici ed alterazioni strutturali e funzionali dell'organo (conseguenti ad interventi chirurgici, sindrome-dell'intestino-corto, resezione della valvola ileo-cieco-colica).

Anche l'insufficienza pancreatica cronica era stata associata, già nel 1989, da Simpson *et al.* ad una sovracrescita batterica (intesa come aumento della conta batterica totale) del duodeno.

Le disbiosi che coinvolgono batteri colonizzanti il grosso intestino sono tipicamente caratterizzate da una diminuzione di batteri (fra cui *Blautia* spp., *Faecalibacterium* spp., Ruminococcaceae e *Turicibacter* spp) che producono acidi grassi volatili, indolo ed altri metaboliti ad azione immunomodulatoria. Pertanto, le conseguenze derivanti da alterazioni a questo livello possono avere impatto notevole per l'ospite; la riduzione di Ruminococcaceae e *Faecalibacterium* spp. è stata correlata, a livello fecale, alla diminuzione della concentrazione di propionato ed aumento di butirato in cani con diarrea acuta (Guard *et al.*, 2015) ed IBD (Minamoto *et al.*, 2015).

2. Utilizzo di prebiotici e probiotici nel cane

L'equilibrio del microbiota intestinale può essere alterato da stati patologici a carattere diarroico acuti o cronici, o da trattamenti antibiotici; a tal proposito, la scelta di utilizzare alimenti supplementari con il fine di stimolare la flora microbica benefica ha ottenuto negli ultimi anni un consenso sempre maggiore (Gibson e Kolida, 2008). Nell'uomo l'impiego di prebiotici e probiotici è consolidato da tempo; in medicina veterinaria questi supplementi nutrizionali si sono impiegati inizialmente negli animali da reddito allo scopo di migliorarne l'indice di conversione alimentare, mentre negli ultimi vent'anni il campo d'applicazione si è allargato e ha incluso anche animali d'affezione quali il cane ed il gatto, il cui benessere e l'allungamento della vita media risultano ormai prioritari per i proprietari (Loo e Vancraeynest, 2008).

2.1.1 prebiotici

Secondo la definizione proposta da Roberfroid (2007), un prebiotico è una sostanza fermentescibile che induce specifiche modificazioni riguardo la composizione e/o l'attività batterica intestinale ed apporta benefici al benessere ed alla salute dell'ospite.

La maggior parte dei prebiotici è costituita da oligosaccaridi non digeribili (NDO), formati da catene di unità monosaccaridiche (di galattosio, glucosio e fruttosio) con un grado di polimerizzazione basso (DP <10). Vengono ricavati principalmente da fonti vegetali mediante estrazione con acqua calda (come l'inulina da cicoria, ma anche da carciofo, banana, frumento; o i SOS, oligosaccaridi estratti dai semi di soia), o da sintesi enzimatiche come i frutto-oligosaccaridi (FOS) derivanti dal saccarosio, e i galatto-oligosaccaridi (GOS) ottenuti invece dal lattosio per azione delle β -galattosidasi (Fujita *et al.*, 1992; Spiegel *et al.*, 1994).

Infine, si possono ottenere dalla parziale idrolisi enzimatica di oligosaccaridi (per es. idrolisi dell'inulina a FOS, e di polimeri di xilano a xilo-oligosaccaridi (XOS) grazie all'azione delle xilanasi) (Imaizumi *et al.*, 1991; Debruyne *et al.*, 1992).

Nonostante sia stata riconosciuta un'attività prebiotica a vari oligosaccaridi, polisaccaridi e ad alcune fibre della dieta, non tutti i carboidrati indigeribili, né tutte le fibre possono essere considerati prebiotici, se non soddisfano determinati requisiti (Roberfroid, 2008). Perché possa essere definita "prebiotico" una sostanza deve rispondere a tre requisiti fondamentali (Gibson *et al.*, 2004; Roberfroid, 2007):

- 1) Capacità di resistere all'acidità gastrica, all'attività di idrolisi da parte degli enzimi digestivi e all'assorbimento intestinale: la resistenza nei confronti dell'acidità gastrica non implica necessariamente che il prebiotico sia completamente indigeribile, ma deve essere in grado di rendersi disponibile nel grosso intestino in quantità sufficiente, tale da rappresentare un substrato per le fermentazioni batteriche.
- 2) Possibilità di essere fermentato dalla flora batterica intestinale: tali fenomeni vanno dimostrati sia in vitro che in vivo.
- 3) Capacità di stimolare in modo selettivo la crescita e/o l'attività di specifici ceppi batterici considerati benefici per la salute dell'ospite.

Sempre secondo Roberfroid (2007) solo quattro NDO soddisfano a pieno le caratteristiche di una sostanza prebiotica. Questi sono l'inulina (compresa quella idrolizzata enzimaticamente), i frutto-oligosaccaridi, i galatto-oligosaccaridi e il lattulosio. I dati tuttora disponibili riguardo MOS, gluco-oligosaccaridi, isomalto-oligosaccaridi (IMO), lattosaccarosio, polidestrosio, SOS e XOS, non dimostrano l'effettiva appartenenza alla classe dei prebiotici (Roberfroid, 2007); sono infatti carenti gli studi che dimostrano l'effettiva capacità di resistere all'acidità gastrica, all'attività di idrolisi da parte degli enzimi digestivi e all'assorbimento intestinale, requisito fondamentale per un prebiotico. Altri studiosi invece considerano facenti parte la categoria anche MOS, gluco-oligosaccaridi e GOS (Flickinger e Fahey, 2002).

Di seguito vengono descritti i carboidrati ad azione prebiotica impiegati nella sezione sperimentale del presente progetto di ricerca.

2.1.1. Frutto-oligosaccaridi

I FOS sono costituiti da catene di fruttosio (con legame β -1 \rightarrow 2) unite a un glucosio terminale (con legame α -1 \rightarrow 1).

I FOS e l'inulina sono naturalmente presenti in molti vegetali come cicoria, carciofo, frumento, banana, topinambur. In aggiunta a ciò, si ottengono o per idrolisi dell'inulina presente in prodotti vegetali, utilizzando endo-inuline per ottenere oligofruttosio (FOS) oppure mediante transfruttosilazione enzimatica a partire dal saccarosio, utilizzando l'enzima fruttosiltransferasi.

Grazie alla loro configurazione chimica gli inulina-fruttani resistono alla digestione del primo tratto gastrointestinale; si ritiene inoltre che essi non vengano assorbiti, fungendo così, a livello di colon, da fonte di carbonio per il metabolismo batterico. Studi *in vitro* e *in vivo* confermano che i batteri del grosso intestino fermentano tali fruttani producendo acido lattico e acidi grassi volatili (Roberfroid, 2000).

Test *in vitro* condotti da Vickers *et al.* (2001) hanno messo in evidenza come FOS e inulina siano più facilmente utilizzabili dal microbiota intestinale rispetto ad altre fibre comunemente impiegate in alimenti per cani (polpa di barbabietola, cellulosa, fibra proveniente dalla soia, MOS).

2.1.2. Lattitolo

Un disaccaride dalle note proprietà prebiotiche è il lattitolo (β -galattosido-sorbitolo). È prodotto dall'idrogenazione del lattosio e si presenta sotto forma di polvere cristallina altamente solubile in acqua (Patil *et al.*, 1987a). Date le sue proprietà organolettiche, nell'uomo è preferito al saccarosio ed all'analogo lattulosio. Nonostante sia impiegato anche come dolcificante, l'uso prevalente resta quello prebiotico (Patil *et al.*, 1987b).

2.1.3. Mannano-oligosaccaridi

I mannano-oligosaccaridi sono i principali costituenti della parete del lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Tale parete costituisce circa il 15-30% del peso secco della cellula, ed è costituita principalmente da questi polisaccaridi; lo scheletro della parete è formato da β -D-glucani e chitina, che conferiscono rigidità alla parete cellulare, mentre gli α -D-mannani costituiscono la componente amorfa della matrice cellulare, oltre a ritrovarsi sullo strato superficiale della parete cellulare (Kogan e Kocher, 2007).

I MOS sembrano essere in grado di influenzare la popolazione batterica del colon, agendo sia direttamente come substrato disponibile per le fermentazioni, che indirettamente influenzando la risposta immunitaria del cane (Vickers *et al.*, 2001).

Caratteristica peculiare dei MOS è anche quella di prevenire la colonizzazione intestinale di certi tipi di batteri patogeni, specialmente *E. coli* e *Salmonella*, grazie alla loro capacità di legarsi alle fimbrie batteriche (Shane, 2001; Middelbos *et al.*, 2007b).

2.1.3.1. β -glucani

I β -glucani costituiscono un complesso polisaccaridico presente nella parete cellulare di diverse specie batteriche e fungine (fra cui *S. cerevisiae*), il cui potenziale immunostimolante

è oggetto di studio recente, anche in medicina veterinaria. I β -glucani, somministrati per bocca o per via intragastrica stimolano i meccanismi innati di difesa anticorpale legandosi a specifici recettori su macrofagi, neutrofili, monociti e cellule dendritiche, aumentando le concentrazioni di IgG e IgA sieriche e nei fluidi corporei (Brown *et al.*, 2003; Stuyven *et al.*, 2010). I β -glucani derivanti da *S. cerevisiae* sono ritenuti avere il miglior potere immunostimolante (Li *et al.* 2005); in campo veterinario sono stati testati nel trattamento e nella prevenzione di patologie contagiose di tipo batterico, virale e fungino (Szymańska-Czerwińska, 2008).

Uno studio eseguito da Malewska *et al.* (2011), ha indicato che in caso di cani affetti da IBD e trattati con levamisolo, o idrossimetilbutirrato o β -1,3/1,6-D-glucani, i migliori risultati si sono ottenuti dall'impiego di quest'ultimo. Infatti, una supplementazione con β -glucani alla dose di 7 mg/kg p.c. induceva la più rapida soppressione del processo infiammatorio, secondo la scala CIBDAI, un recupero ottimale delle condizioni della mucosa intestinale ed un calo importante nei livelli di IL-6 ed aumenti nei livelli di IL-10 (Malewska *et al.*, 2011).

Stuyven *et al.* (2010) hanno testato gli effetti di β -1,3/1,6-D-glucani da *S. cerevisiae* in 15 cani beagle sani, verificando come dopo 4 settimane di somministrazione orale a dosaggio di 150 mg/giorno, le IgA sieriche totali e le IgA nella saliva e nelle lacrime erano diminuite rispetto ai cani di controllo, mentre le IgG sieriche erano aumentate; tale effetto è stato transitorio e le alterazioni di immunoglobuline valutate sono rientrate una settimana dopo la cessazione della somministrazione (Stuyven *et al.*, 2010).

2.2. Utilizzo di prebiotici nel cane: stato dell'arte

Molti autori hanno valutato gli effetti esercitati da sostanze ad azione prebiotica sul microbiota intestinale del cane, ottenendo risultati per certi versi contrastanti. Ad esempio, in uno studio condotto su beagle adulti, Flickinger *et al.* (2003b) hanno evidenziato come la somministrazione di oligofruttani (OF) a dosi differenti (3, 6 e 9 g/kg di dieta) aumentasse in modo lineare il numero delle popolazioni batteriche aerobiche e diminuiva la concentrazione di *C. perfringens* nelle feci (rispettivamente +0,8 e -0,3 log₁₀ ufc/g di feci espresse sulla SS, con 9 g/kg di dieta di OF), senza però influenzare in alcun modo le popolazioni batteriche fecali di lattobacilli e bifidobatteri; quest'ultimo dato risulta in accordo con quanto è stato evidenziato anche da Swanson *et al.* nel 2002(c), con l'inclusione dietetica di FOS a 2g/giorno. In un altro studio, Howard *et al.* (2000) hanno evidenziato che la somministrazione di FOS a corta catena (inclusi a 15g/kg di dieta) aumentava le popolazioni di batteri aerobici nel colon distale di cani adulti (+1,8 log₁₀ ufc/g di feci espresse sulla SS), in confronto ad una dieta contenente 60 g di cellulosa per kg di dieta. In un altro studio, Barry *et al.* (2009) non hanno osservato alcun effetto sul microbiota fecale del cane derivante dalla somministrazione di basse concentrazioni (2 e 4 g/kg di dieta) di FOS a corta catena ed inulina. Invece, Vanhoutte *et al.* (2005) hanno sottolineato alcun effetto derivante dall'integrazione combinata di oligofruttosio (4,5 g/giorno) ed inulina (5,6 g/giorno) sull'aumento della popolazione di streptococchi dei 7 cani impiegati nello studio.

In uno studio di Grieshop *et al.* (2004), la somministrazione a cani adulti di cicoria e mannano-oligosaccaridi (10g/kg di dieta) ha portato ad un incremento di bifidobatteri fecali (+0.4 e +0.5 log₁₀ ufc/g di feci espresse sulla SS, rispettivamente), ed i MOS hanno indotto una riduzione della concentrazione fecale di *E. coli*. Strickling *et al.* (2000) avevano impiegato FOS e MOS in concentrazione di 5g/kg di SS nella dieta di cani adulti, non riscontrando alcuna variazione nelle popolazioni di bifidobatteri fecali, ma una riduzione della concentrazione fecale di *E. coli* (-0,68 log₁₀ ufc/g di feci espresse sulla SS). In uno studio di Swanson *et al.* (2002a), un supplemento di 1 g/giorno di MOS ha portato a una diminuzione dei batteri aerobi fecali ed a un aumento dei lattobacilli.

In uno studio condotto da Biagi *et al.* (2010) sono state testate diverse fonti di fibre con possibile ruolo prebiotico, sia *in vitro* che *in vivo*; mediante l'impiego del modello *in vitro* i FOS, l'inulina ed il lattitolo, assieme ad altri substrati, sono stati fermentati rapidamente dai batteri fecali che hanno portato ad una riduzione del pH del liquido di fermentazione. Il lattitolo, nella

prova *in vivo*, si è dimostrato in grado di ridurre le concentrazioni di batteri coliformi e di *C. perfringens* (-2,2 e -1,0 log₁₀ ufc/g di feci, rispettivamente), somministrato per 30 giorni alla dose di 10 g/kg di dieta.

Middelbos *et al.* (2007a) hanno testato due combinazioni di FOS a corta catena e MOS (derivanti da parete di lieviti), entrambi addizionati al 2,5% della dieta, evidenziando un aumento delle popolazioni fecali di bifidobatteri e lattobacilli e una conseguente riduzione del pH fecale; gli autori hanno riscontrato anche una tendenza alla riduzione di *E. coli*, evidenziando la possibilità che i MOS siano in grado di legarsi alle fimbrie batteriche.

Beloshapka *et al.* (2013) hanno valutato l'effetto della supplementazione di inulina e MOS (entrambi 14g/kg di dieta) in diete a base di carne cruda, evidenziando come l'aggiunta di inulina abbia determinato, a livello fecale, una riduzione di *Enterobacteriaceae* e di *E. coli*, oltre che un aumento di lattobacilli; i MOS invece hanno indotto aumento di bifidobatteri fecali.

I prebiotici sembrano in grado di ridurre le concentrazioni di ammoniaca che si originano nell'intestino, a seguito dei fenomeni fermentativi dei substrati proteici operati dai batteri proteolitici; inoltre, aumentano il numero di batteri lattici (e dunque la quota di AGV prodotti e la riduzione del pH intestinale conseguenti) (Howard *et al.* 2000).

Terada *et al.* (1992) hanno descritto come la supplementazione dietetica con 1,5 g/giorno di lattosaccarosio avesse portato ad una significativa riduzione di ammoniaca fecale (-60%); anche Flickinger *et al.* (2003b) hanno descritto una riduzione della concentrazione di ammoniaca nelle feci, a seguito della somministrazione di dosi crescenti di OF (3, 6 e 9 g/kg di dieta).

Zentek *et al.* (2002) hanno riportato questo risultato a seguito della somministrazione di MOS a cani adulti (1g/kg di peso corporeo dell'animale).

Nello studio di Biagi *et al.* (2010), tuttavia, FOS e lattitolo non hanno esercitato alcun effetto sulla concentrazione di ammoniaca, così come riportato anche da altri autori (Strickling *et al.*, 2000; Beynen *et al.*, 2002; Swanson *et al.*, 2002b, Hesta *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2009).

Propst *et al.* (2003) hanno evidenziato una riduzione nella concentrazione di fenolo accanto ad aumento di ammoniaca, isovalerato e amine biogene, a seguito della somministrazione di oligo-fruttani ed inulina in cani adulti (addizionati alla dieta in misura di 0,3; 0,6; 0,9%).

Swanson *et al.* (2002b) hanno descritto una riduzione della concentrazione di indolo fecale a seguito della supplementazione dietica con FOS; Beloshapka *et al.* (2012) ne hanno evidenziato la riduzione mediante supplementazione con polidestrosio.

La riduzione del pH a livello intestinale rispecchia la quota di AGV prodotti dai batteri; nello studio di Biagi *et al.* (2010), la produzione totale di AGV era aumentata in alcuni inoculi fecali, compresi quelli contenenti lattitolo (+18%) ed inulina (+17%). Anche Flickinger *et al.* (2003b) avevano riscontrato un aumento di propionato (+55%) e AGV totali (+31%) a seguito della supplementazione dietetica con oligo-fruttani (6g/kg di dieta); anche Propst *et al.* (2003) avevano testato nel cane oligo-fruttani ed inulina a diversi livelli di inclusione (0,3; 0,6; 0,9% della dieta), riscontrando maggiori concentrazioni di acido acetico, propionico e butirrico.

Twomey *et al.* (2003) avevano sperimentato la somministrazione di FOS a 30 e 60 g/kg di dieta, evidenziando un aumento lineare delle concentrazioni fecali di lattato.

Anche la somministrazione di polidestrosio si è dimostrato in grado di aumentare la concentrazione di acetato, propionato e AGV totali (Beloshapka *et al.*, 2012).

Diversamente, Barry *et al.* (2009) hanno evidenziato una riduzione di acido acetico, propionico e di AGV totali in cani a cui era stata somministrata inulina (a 2 e 4 g/kg di dieta).

I prebiotici sono in grado di esercitare effetti anche a livello di sistema immunitario, come descritto da Lomax e Calder (2009); in uno studio di Swanson *et al.* (2002b), i FOS, utilizzati con combinazione con i MOS (entrambi somministrati a 1 g/giorno) hanno portato ad un aumento della concentrazione di IgA a livello ileale, mentre Swanson *et al.* (2002c) hanno indotto, in cani alimentati con FOS 2g/giorno + MOS 1g/giorno, un aumento dei linfociti ematici e la riduzione dei neutrofili.

L'associazione di cicoria e MOS (entrambi somministrati a 10 g/giorno) è risultata nella riduzione della concentrazione di linfociti periferici senza altri effetti sul sistema immunitario (Grieshop *et al.*, 2004). Anche Middelbos *et al.* (2007b) hanno riscontrato effetti limitati sul sistema immunitario a seguito della somministrazione di estratto di parete cellulare di lievito.

I risultati, a volte anche contrastanti, ottenuti dai numerosi studi volti ad indagare gli effetti dei prebiotici sulla salute intestinale e sul rafforzamento del sistema immunitario dell'ospite non sono di facile interpretazione. Le diverse concentrazioni e tipologie di fibre solubili che caratterizzano la dieta di base potrebbero influenzarne il risultato, così come le tipologie di prebiotici testati ed i diversi livelli di inclusione nella dieta; in particolare, i FOS sembrano

esercitare un valido effetto prebiotico se presente in concentrazioni maggiori di (10 g/kg di dieta).

Inoltre, la maggior parte delle valutazioni viene effettuata su campioni fecali, pertanto le concentrazioni di metaboliti batterici, ammoniaca ed AGV individuate a questo livello potrebbero non rispecchiare esattamente la situazione a livello intestinale (Stevens e Hume, 1998).

Una considerazione analoga può essere fatta per la descrizione delle popolazioni batteriche riscontrate a livello fecale; ad esempio, alcuni autori hanno ritrovato elevate concentrazioni di bifidobatteri (Flickinger *et al.*, 2003a; Middelbos *et al.*, 2007a), mentre Willard *et al.* (2000), Greetham *et al.* (2002), Apanavicius *et al.* (2007), Biagi *et al.* (2006, 2010) non li hanno descritti.

Tra le conoscenze relative ai benefici apportati dai prebiotici, quelle inerenti alla modulazione del sistema immunitario richiedono ulteriori approfondimenti.

2.3.1 probiotici

I probiotici sono organismi vivi che, se somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite (FAO/WHO, 2002).

In molte occasioni, tuttavia, il termine probiotico viene utilizzato, in riferimento ad un microrganismo, anche se non esiste comprovata efficacia in termini di miglioramenti della salute dell'ospite al riguardo di una determinata patologia.

Nella pratica comune, i probiotici somministrati a cani e gatti comprendono specie batteriche proprie o estranee all'ospite, ma in grado di interagirvi.

Vengono utilizzati come probiotici microrganismi vivi non patogeni, come varie specie di *Bifidobacterium* e di *Lactobacillus*, e l'*Enterococcus faecium*, oltre che organismi non batterici come il lievito non patogeno *Saccharomyces boulardii*.

Un organismo, perché possa essere classificato come probiotico, deve resistere alle condizioni di acidità gastrica, aderire alla mucosa intestinale ed avere la capacità di colonizzare e replicarsi nel colon. Inoltre, deve svolgere un'azione antibatterica nei confronti di microrganismi patogeni ed avere la capacità di modulare il sistema immunitario. Essi devono inoltre essere privi di effetti patogeni, tossici, mutageni e carcinogeni (Wynn, 2009).

I lattobacilli sono anche in grado di sintetizzare vitamine del gruppo B (niacina, acido pantotenico, piridossina, biotina ed acido folico), oltre che alcuni enzimi digestivi ad azione lipolitica e proteolitica.

I probiotici interferiscono con la colonizzazione intestinale da parte di altri microrganismi potenzialmente patogeni, inibendone l'aderenza alla mucosa grazie alla stimolazione della produzione di muco (Collado *et al.*, 2007a, b). I batteri probiotici possono produrre metaboliti ad azione antibatterica, come l'acido acetico e l'acido lattico (Saarela *et al.*, 2000); alcuni batteri *Lactobacillus* spp. hanno dimostrato *in vitro*, di poter ridurre l'espressione genica e la produzione di tossine da parte di salmonelle, *E. coli* e *C. perfringens* (Medellin-Peña *et al.*, 2007; Allaart *et al.*, 2011; Bayoumi e Griffiths, 2012), o di inattivare le tossine generate da questi batteri mediante delle proteasi (Castagliuolo *et al.*, 1999).

2.4. Utilizzo di probiotici nel cane: stato dell'arte

Ad oggi, sono quattro i ceppi batterici per i quali l'EFSA ha svolto un'indagine sulla loro efficacia e sicurezza come ceppi probiotici o additivi alimentari nel cane; fra questi vi rientrano due ceppi di *Enterococcus faecium* (*E. faecium* NCIMB 10415 E1705, *E. faecium* NCIMB 10415 E1707), il *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241 25 ed il *Bifidobacterium sp. animalis*. L'unico ceppo probiotico che attualmente ha ottenuto l'autorizzazione dall'EFSA, cioè che è stato ritenuto valido e sicuro per l'uso nei cani e per la specie umana che ha contatti con gli animali trattati, è l'*E. faecium* SF68 (NCIMB 10415 E1707).

Sono attualmente disponibili in commercio supplementi probiotici contenenti il ceppo di *E. faecium* autorizzato, talvolta in associazione ad altri ceppi batterici, come *Lactobacillus* spp. (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. lactis*, *L. rhamnosus*, *S. salivarius*), *Bifidobacterium* spp. (*B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. bifidum*) e *Bacillus subtilis*, o in alcuni casi lieviti (*S. cerevisiae*) o miceti (*Aspergillus oryzae*) (Schmitz e Suchodolski, 2016).

Ad oggi, solamente pochi studi hanno valutato la complessa interazione fra batteri probiotici e cellule dell'ospite cane o gatto, il ruolo esercitato sul sistema immunitario e gli effetti sulla modulazione del microbiota intestinale.

Il ceppo *E. faecium* SF68 è stato testato da Benyacoub *et al.* (2003) durante una prova su cuccioli di cane di diverse razze. È stata somministrata una dieta industriale secca completa a tutti i cuccioli oggetto dello studio, e alla metà dei soggetti della prova è stato fornito in aggiunta tale supplemento probiotico; solo i soggetti trattati presentavano maggiori livelli fecali e sierici di IgA. I risultati sostengono dunque l'ipotesi a favore dell'effetto immunomodulatore di alcuni probiotici (Benyacoub *et al.*, 2003). Allo stesso ceppo di *E. faecium* è stata riconosciuta la capacità di inibire la crescita e l'eliminazione fecale di *E. coli* emolitica e non emolitica (Schmitz e Suchodolski, 2016). *E. faecium* SF68 è stato anche testato per 6 settimane in 20 cani con giardiosi cronica subclinica, senza manifestare alcun risultato positivo in termini di riduzione della presenza del parassita a livello fecale e della concentrazione di antigeni fecali (Simpson *et al.*, 2009).

In uno studio di Sauter *et al.* (2006) condotto su cani con diarrea dieto-responsiva, è stato testato l'effetto di una dieta in associazione, o meno, di ceppi probiotici. I risultati hanno mostrato effetti di modulazione del microbiota intestinale e riduzione della formazione di citochine infiammatorie; infatti, tutti i cani sono migliorati clinicamente a seguito del trattamento dietetico, mentre la somministrazione della miscela di probiotici non ha sortito

in vivo effetti di miglioramento clinico rispetto ai cani che avevano solo assunto il trattamento dietetico. Al contrario, *in vitro* il pattern di citochine infiammatorie aveva subito modifiche in risposta al trattamento con i ceppi probiotici.

Da una prova eseguita su campioni biotici di cani con IBD e sani, si è osservato come la concentrazione di citochine duodenali non variava tra i due gruppi se si somministravano singolarmente i seguenti probiotici: *Lactobacillus acidophilus* NCC2628, *L. acidophilus* NCC2766 e *L. johnsonii* NCC2767. In caso di utilizzo combinato dei tre, invece, si osservava una diminuzione delle citochine e anche un miglioramento delle condizioni generali dei pazienti rispetto ai pazienti placebo. Le differenze risultavano però minime, inoltre le concentrazioni di enterobatteriacee erano diminuite sia prima che dopo il trattamento placebo o prebiotico. I risultati, in questo caso non sono stati attribuiti al trattamento probiotico (Wynn, 2009).

Una miscela probiotica con ceppi di VSL#3® (composto da *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *Streptococcus thermophilus*) è stata sperimentata in cani con IBD, in alternativa al comune trattamento a base di metronidazolo e prednisolone. Nei cani trattati col probiotico miglioravano i sintomi clinici e diminuivano i linfociti T totali (CD3+) nel tessuto intestinale (Rossi *et al.*, 2014). Risultati altrettanto positivi si sono ottenuti dalla prova eseguita su cani con IBD e PLE (forme di enteropatia cronica), trattati con terapia antibiotica standard e supplemento di *S. boulardii*; i cani che hanno ricevuto il trattamento con il lievito hanno manifestato un miglioramento delle condizioni cliniche ed hanno registrato un aumento della concentrazione di albumine sieriche rispetto ai soggetti di controllo trattati con placebo (D'Angelo *et al.*, 2017).

2.5. *Saccharomyces boulardii*

Saccharomyces boulardii è un lievito non patogeno utilizzato come probiotico nell'uomo ed in diverse specie animali; i suoi effetti benefici sono stati osservati nella prevenzione e nel trattamento di patologie intestinali quali la diarrea associata ad antibiotici, l'infezione da *Clostridium difficile*, la diarrea del viaggiatore, il morbo di Crohn, la colite ulcerosa, e la sindrome dell'intestino irritabile (McFarland *et al.*, 1994; Kirshhelle *et al.*, 1996).

S. boulardii possiede determinate caratteristiche che lo rendono un valido probiotico: sopravvive all'ambiente acido dello stomaco, giungendo vitale nel tratto intestinale, è termotollerante e ha un optimum di temperatura di 37 °C, inibisce la crescita di alcuni batteri patogeni. In quanto cellula eucariote, a differenza dei ceppi batterici probiotici che sono procarioti, è resistente agli acidi biliari e agli antibiotici, ed è impossibilitato ad acquisire geni di antibiotico resistenza (Czerucka *et al.*, 2007).

Nel cane *S. boulardii* raggiunge lo stato stazionario (steady-state), definito da McFarland (2010) per la medicina umana uguale a 10×10^7 ufc/g di feci, in 5 giorni, e risulta completamente eliminato dopo 4 giorni dalla sospensione della somministrazione (D'Angelo *et al.*, 2017).

La tassonomia del genere *Saccharomyces* spp. ha subito varie revisioni nel corso degli anni; nel 1994 Cardinali e Martini, mediante uno studio comparativo di cariotipizzazione elettroforetica, hanno caratterizzato *S. boulardii* come specie estranea a *S. cerevisiae*.

Una più recente tipizzazione del DNA mediante elettroforesi ha dimostrato che *S. boulardii*, pur essendo distinto dal *S. cerevisiae*, mostra una certa somiglianza con lo stesso, ed è stata quindi proposta la denominazione *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Mallié *et al.*, 2001).

Negli anni successivi, il rapido sviluppo di tecniche molecolari ha permesso di includere *S. boulardii* all'interno della specie *S. cerevisiae* (Mitterdorfer *et al.*, 2002), fino a quando Edwards-Ingram *et al.* (2007), mediante ibridazione genomica comparativa su microarray, hanno classificato *S. cerevisiae* e *S. boulardii* come generi appartenenti alla stessa specie.

Tuttavia, *S. boulardii* e *S. cerevisiae* differiscono tra loro geneticamente, per tipologia di metabolismo e fisiologia (Hennequin *et al.*, 2001). Il genoma di *S. boulardii* presenta la trisomia del cromosoma 9, numeri alterati di copie di geni che potenzialmente contribuiscono ad un aumentato tasso di crescita e ad una migliore sopravvivenza in ambiente acido (Edwards-Ingram *et al.*, 2007).

A differenza di *S. cerevisiae*, *S. boulardii* si è dimostrato capace di sopravvivere più a lungo in modelli di topo (10 giorni vs. <1 giorno) (Pecquet *et al.*, 1991).

I meccanismi d'azione su cui può contare *S. boulardii* per svolgere la sua azione probiotica possono essere classificati in 3 aree principali: azione a livello luminale, azione trofica e proprietà antinfiammatorie a livello mucosale. Nel lume intestinale *S. boulardii* è in grado di interferire con tossine patogene, preservare la fisiologia cellulare, impedire l'adesione di patogeni, interagire con il microbiota dell'ospite e contribuire al ripristino dei livelli di acidi grassi a corta catena. *S. boulardii* esercita anche un'azione immunomodulatoria, sia a livello intestinale che sistemico (Boirivant e Strober, 2007; Ng *et al.*, 2009).

L'effetto antibatterico svolto nel lume intestinale consiste nella capacità di bloccare i siti recettoriali di tossine batteriche, fungendo da recettore bersaglio per la tossina patogena, o eliminando la tossina stessa (Pothoulakis *et al.*, 1993; Brandao *et al.*, 1998). Ha inoltre azione diretta volta ad impedire la crescita di patogeni intestinali come *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, e *Aeromonas hydrophila* (Ducluzeau e Bensaada, 1982; Altwegg *et al.*, 1995; Zbinden *et al.*, 1999).

I risultati di studi condotti su topi (Barc *et al.*, 2008) e pazienti umani (Swidsinski *et al.*, 2008) con diarrea acuta, o indotta da antibiotici, ai quali veniva somministrato *S. boulardii*, hanno evidenziato come in questi soggetti il ritorno ad un microbiota stabile avvenisse in tempi più rapidi rispetto alle 6-8 settimane ritenute necessarie dopo prolungate terapie antibiotiche (Dethlefsen *et al.*, 2008). E' interessante notare come la modulazione del microbiota intestinale da parte di *S. boulardii* non sia stata altrettanto efficace nei soggetti sani utilizzati come controllo (Swidinski *et al.*, 2008).

Gli effetti probiotici di *S. boulardii* nel maiale sono stati testati *in vitro* da Breves *et al.* (2000), risultando in un aumento della produzione di acidi grassi volatili. Analogamente, *S. boulardii* aveva stimolato le fermentazioni batteriche in pazienti ospedalizzati e sottoposti a nutrizione parenterale (Schneider *et al.*, 2005).

La parete cellulare di *S. boulardii* è composta di glucani, mannoproteine e chitina, che servono come substrati per la fermentazione microbica, soprattutto per i batteri produttori di AGV. Dopo la somministrazione di *S. boulardii*, infatti, si è riscontrato un incremento di butirrato e di altri AGV prodotti nel colon di pazienti umani ospedalizzati (Schneider *et al.*, 2005). *S. boulardii* ha un effetto trofico sulle cellule dell'epitelio intestinale: è capace, infatti, di

sintetizzare e secernere poliamine, le quali possono essere assorbite dagli enterociti e favorirne la maturazione; esse giocano, infatti, un ruolo importante nella proliferazione e differenziazione cellulare (McFarland, 2010).

Le cellule del lievito sono un'eccellente fonte di β (1,3) D-glucano. I β -glucani sono componenti della parete dei funghi che agiscono come modificatori della risposta biologica ed hanno la capacità di attivare il sistema immunitario. Si legano a specifici recettori sulle cellule dendritiche (dectina-1) così come a recettori sulle cellule del sistema immunitario innato (recettori toll-like e recettore3 del complemento) e controllano la distruzione di patogeni in stadi precoci (Moré e Swidsinsky, 2015).

Numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che *S. boulardii* è capace di modulare il sistema immunitario ed influisce sia sulla risposta immunitaria innata che su quella adattativa. Interferisce con le vie di segnalamento cellulare dell'ospite e diminuisce l'espressione di citochine infiammatorie, tra cui l'IL-8, l'IL-6, l'IL-1 β , il TNF- α e l'interferone- γ (Dalmasso *et al.*, 2006; Mummy *et al.*, 2007). Il lievito si è mostrato capace anche di stimolare il sistema immunitario adattativo: è coinvolto, infatti, nella secrezione di fattori immunitari (Rodrigues *et al.*, 2000). In uno studio di Buts *et al.* (1990), nel lume duodenale di ratti trattati con il lievito, si era verificato un aumento della secrezione di IgA del 56,9% rispetto ai ratti di controllo.

L'impiego di *S. boulardii* come probiotico nell'uomo è ritenuto sicuro, per il fatto che è impossibilitato ad acquisire geni di antibiotico resistenza e grazie al suo eccellente profilo di sicurezza. Affinché un microrganismo, proposto come probiotico, venga considerato sicuro deve essere infatti caratterizzato per i seguenti test: determinazione dell'antibiotico-resistenza, valutazione della patogenicità (produzione tossine e/o metaboliti tossici), induzione di reazioni immunologiche (Huys *et al.*, 2013).

S. boulardii viene generalmente somministrato in forma liofilizzata e funge da commensale del tratto gastroenterico colonizzando le superfici mucose in modo transitorio. Tuttavia, nell'uomo *S. boulardii* è stato identificato in forme di infezioni mucosali locali (vaginiti) e in forme di fungemia in pazienti in trattamento con fluconazolo (Arendrup *et al.*, 2011); infezioni sistemiche riconducibili a questo lievito sono state riportate anche in pazienti immunodepressi (Munoz *et al.*, 2005; Thygesen *et al.*, 2012), anche di origini nosocomiali (Graf e Gavazzi, 2007). In medicina umana l'utilizzo di tale probiotico è pertanto discusso in casi di

ricovero in unità intensive, pazienti neutropenici, o con catetere venoso centrale (Arendrup *et al.*, 2013).

2.6. Impiego di *S. boulardii* in disordini gastrointestinali del cane

La diarrea indotta dall'assunzione di antibiotici è una condizione piuttosto frequente sia nell'uomo che nel cane, con una durata variabile da alcune ore fino a diversi mesi dopo la sospensione della terapia (Coté e Buchman, 2006). La presentazione clinica nell'uomo varia da diarrea moderata a colite o colite pseudomembranosa (McFarland, 2006).

In un lavoro di meta-analisi compiuto da Szajewska e Kolodziej nel 2015, i due autori hanno valutato l'efficacia dell'impiego di *S. boulardii* nel trattamento della diarrea indotta da antibiotici in adulti e bambini, individuando una riduzione del rischio di diarrea dal 18,7% all'8,5%.

Ad oggi, l'unico studio effettuato nel cane sull'impiego di *S. boulardii* nel trattamento della diarrea indotta da antibiotico è di Aktas *et al.* (2007); i cani sottoposti a terapia antibiotica con lincomicina avevano presentato diarrea, eccetto quelli trattati con *S. boulardii* somministrato contemporaneamente all'antibiotico. Nei cani cui *S. boulardii* è stato somministrato all'insorgenza della diarrea, la sintomatologia ha avuto una durata inferiore rispetto ai soggetti non trattati con il lievito. In questo studio sono state valutate anche le diverse concentrazioni di AGV totali fecali; il trattamento antibiotico ha ridotto la produzione di AGV totali in tutti i soggetti, eccetto che nel gruppo trattato con *S. boulardii* somministrato insieme all'antibiotico, che non ha evidenziato differenze in termini di concentrazioni di AGV fecali pre e post antibiotico terapia. Nel gruppo di cani trattati con *S. boulardii* all'insorgenza della sintomatologia diarroica, la concentrazione di AGV fecali ha raggiunto solo dopo una settimana i livelli precedenti alla somministrazione di antibiotico, a differenza del gruppo che non ha ricevuto *S. boulardii*, in cui la concentrazione di AGV fecali dopo una settimana risultava inferiore rispetto a quanto era stato riscontrato prima della somministrazione dell'antibiotico (Aktas *et al.*, 2007).

L'utilizzo di *S. boulardii* come probiotico in ambito veterinario è recente stato impiegato nel cavallo in disturbi diarroici antibiotico dipendenti ed in corso di colite acuta (Desrochers *et al.*, 2005; Boyle *et al.*, 2013), in corso di endotossicosi da *E. coli* nel maiale (Collier *et al.*, 2011) e come stimolante immunitario nei polli da carne (Rajput *et al.*, 2013).

Ad oggi, *S. boulardii* è stato valutato come probiotico nel cane in corso di patologia cronica intestinale solo da D'Angelo *et al.* (2017); 20 cani con diagnosi istologica di IBD/PLE sono stati inclusi in questo studio, ed in tutti è stata impostata una terapia farmacologica con antibiotico (tilosina e/o metronidazolo) e immunosoppressori (prednisone e/o azatiprina e/o clorambucile). I cani sono stati quindi suddivisi in due gruppi, a 10 soggetti è stato associato alla terapia farmacologica il *S. boulardii* (1×10^9 ufc/kg *bid*), gli altri sono stati trattati con un placebo in associazione a terapia farmacologica, per 60 giorni in entrambi i casi. D'Angelo *et al.* (2017) hanno riscontrato miglioramenti nello score clinico CCECAI, per quanto concerne i parametri relativi alla frequenza di defecazione e alla consistenza fecale, nei soggetti trattati con *S. boulardii* in associazione a tradizionale terapia farmacologica, confrontati con i cani ricevuti il placebo; inoltre, al termine del trattamento (60 giorni), il BCS dei cani trattati con *S. boulardii* presentava un punteggio maggiore rispetto ai soggetti che avevano ricevuto il placebo.

Da questo primo studio *in vivo* su cani con enteropatia cronica sembra quindi che *S. boulardii*, in associazione a terapia farmacologica tradizionale, contribuisca a migliorare i segni clinici senza manifestare effetti collaterali.

2.7.1 simbiotici

I simbiotici sono combinazioni di un probiotico esogeno con un prebiotico, nelle quali il probiotico prolifera metabolizzando il substrato prebiotico che, a sua volta, ha il compito di stimolarne la crescita e/o l'attività. Secondo alcuni autori la denominazione simbiotico deve essere riferita esclusivamente a quelle preparazioni in cui il prebiotico costituisce un substrato altamente selettivo ed esclusivo per il probiotico abbinato (Wells *et al.*, 2008). La scelta di combinare prebiotici e probiotici in un'unica soluzione è relativamente recente, e sono dunque ancora pochi gli studi effettuati per testarne la validità.

Garcia-Mazcorro *et al.* (2011) hanno valutato l'effetto di una preparazione simbiotica (composta da 7 diverse specie batteriche, frutto-oligosaccaridi e arabino-galattani) su cani sani; dopo pochi giorni dall'inizio della somministrazione i ceppi batterici probiotici venivano riscontrati nelle feci dei cani testati, senza tuttavia indurre significative variazioni nella concentrazione dei principali gruppi batterici intestinali in cani sani.

Strompfová *et al.* (2013) hanno testato l'effetto del probiotico *Lactobacillus fermentum* in cani sani, e l'associazione simbiotica del medesimo ceppo batterico con inulina (addizionata all'1% della dieta); gli effetti derivanti dalla somministrazione del simbiotico non hanno mostrato differenze significative nella modulazione del microbiota intestinale dei cani rispetto alla sola somministrazione di *L. fermentum*, la cui somministrazione ha portato ad un aumento della concentrazione di batteri lattici fecali.

Gagné *et al.* (2013) hanno condotto uno studio su due gruppi di cani da slitta, animali che frequentemente presentano sintomatologia diarroica, secondo alcuni indotta da stress mentale e fisico che potrebbe influenzare la permeabilità e la motilità intestinale. I cani, suddivisi per gruppi ed alimentati con la stessa dieta, hanno ricevuto una preparazione simbiotica (composta da 3 diverse specie batteriche, frutto-oligosaccaridi, mannano-oligosaccaridi e vitamine) o un placebo. La somministrazione del simbiotico ha indotto un modesto aumento di lattobacilli, che potrebbe aver migliorato la funzionalità degli enterociti nel contrastare il focolaio di diarrea (di sospetta origine virale) che si era sviluppato nella muta di cani durante la prova; infatti, il numero di cani trattati con il simbiotico che ha presentato sintomatologia diarroica è stato inferiore rispetto al gruppo trattato con il placebo, e la durata della sintomatologia diarroica nei cani ammalati è stata di qualche giorno inferiore rispetto al gruppo placebo. In conclusione, il simbiotico potrebbe aver migliorato la ripresa della funzionalità gastrointestinale a seguito dell'insulto virale, ma altri studi sono necessari per

confermare l'utilità della somministrazione di preparazioni simbiotiche in episodi di diarrea acuta.

3. Scopo della ricerca

La composizione del microbiota intestinale del cane ed il ruolo che esso esercita nei confronti dell'organismo ospite è di notevole interesse scientifico; in maniera analoga la ricerca di possibili strategie nutrizionali in grado di modularlo, prevenendo o trattando terapeutamente stati patologici che lo contraddistinguono, rende la ricerca scientifica su prebiotici, probiotici e simbiotici un tema attuale ed in costante sviluppo.

La presente tesi di dottorato, articolata in due diversi studi, si è proposta di indagare gli effetti sul microbiota intestinale del cane adulto sano di diverse sostanze ad azione prebiotica, da sole o in associazione ad un ceppo di *Saccharomyces boulardii*, lievito noto per la sua azione probiotica.

In particolare, gli obiettivi del presente lavoro sono stati:

- valutare *in vitro* gli effetti di un ceppo di *S. boulardii* impiegato singolarmente o in associazione con frutto-oligosaccaridi, o con lattitolo, sul microbiota fecale di cani adulti sani, alimentati con una dieta commerciale estrusa. Più precisamente, sui campioni oggetto della fermentazione *in vitro* sono state effettuate analisi chimiche e microbiologiche (misurazione del pH, determinazione di ammoniaca, amine biogene e AGV, caratterizzazione della popolazione microbica intestinale).
- mediante l'impiego di un modello *in vitro* e di una sperimentazione *in vivo*, testare gli effetti sulla salute intestinale del cane di alcuni supplementi nutrizionali: mannano-oligosaccaridi, un prodotto a base di parete cellulare di lievito purificato, un ceppo di *Saccharomyces boulardii* e frutto-oligosaccaridi. I frutto-oligosaccaridi e l'associazione di questi e il ceppo di *Saccharomyces boulardii* sono stati testati solo *in vitro*. In particolare, sui campioni oggetto della fermentazione *in vitro* sono state effettuate analisi chimiche e microbiologiche (misurazione del pH, determinazione di ammoniaca, amine biogene, AGV e composti organici volatili, caratterizzazione della popolazione microbica intestinale); sui campioni derivanti dalla sperimentazione *in vivo* sono state condotte le stesse analisi chimiche e microbiologiche precedentemente elencate, eccezion fatta per la determinazione delle amine biogene.

4. Valutazione in vitro degli effetti di un ceppo di *S. boulardii* impiegato in associazione con frutto-oligosaccaridi e lattitolo sul microbiota intestinale del cane

4.1. Materiali e metodi

Cinque cani adulti e in buono stato di salute (4 maschi e una femmina, peso medio 18 kg; età media 4 anni), di proprietà di privati e viventi in appartamento, sono stati alimentati per quattro settimane con una dieta secca commerciale per cani adulti (Effeffe Pet Food S.p.A., Pieve di Porto Morone, Italia), formulata con i seguenti ingredienti: mais, glutine di mais, proteine di patata, grasso animale, sali minerali, seme di lino, olio di pesce, olio di girasole, polpa di barbabietola essiccata, lieviti essiccati, polpa di cicoria essiccata, fruttoligosaccaridi, *Yucca schidigera*. La composizione chimica della dieta è riportata nella Tabella 1.

Tabella 1 - Composizione chimica dell'alimento (% sulla SS)

S.S.	95,4
Proteine grezze	21,9
Lipidi grezzi	13,0
Fibra grezza	2,25
Amido	36,1
Ceneri grezze	5,20
EM (kcal/1000g)*	3.880

* EM calcolata utilizzando i fattori di Atwater modificati

La quantità di alimento che ciascun cane ha ricevuto giornalmente è stata calcolata individualmente sulla base dei fabbisogni energetici dell'animale, che sono stati calcolati secondo la seguente equazione:

$$EM \text{ (kcal al giorno)} = 132 \times \text{kg peso corporeo}^{0,75} \text{ (NRC, 2006)}$$

attribuendo alla dieta, secondo i fattori di Atwater modificati per il cane, 3,5 kcal per grammo di proteine e amido e 8,5 kcal per grammo di lipidi.

Metodica di fermentazione *in vitro*

Nel giorno prestabilito al termine delle quattro settimane, le feci dei cani sono state condotte al laboratorio entro 20 minuti dall'escrezione, dove sono state mescolate tra loro e diluite 1:10 p/v in Wilkins Chalgren Anaerobe Broth (WCAB 0.5x; Oxoid, Basingstoke, UK). L'inoculo fecale

così ottenuto è stato ulteriormente diluito in terreno di arricchimento (100 ml/L), secondo quanto proposto da Sunvold *et al.* (1995) e dispensato in 5 bottiglie da 30 mL per ciascun trattamento.

Tutte le componenti del terreno di arricchimento, con l'eccezione delle soluzioni vitaminiche, sono state sterilizzate in autoclave (121 °C per 15 minuti) prima del loro impiego; le soluzioni vitaminiche sono state sterilizzate per filtrazione. Ciascuna bottiglia conteneva il residuo indigerito della stessa dieta precedentemente somministrata ai cani donatori, sottoposto a digestione *in vitro* secondo la metodica proposta da Vervaeke *et al.* (1989) e modificata da Biagi *et al.* (2016).

Tale metodica prevede che l'alimento, precedentemente essiccato in stufa ad una temperatura di 65°C e macinato finemente, subisca l'azione di due fasi enzimatiche, atte a simulare i processi digestivi gastrici ed intestinali, rispettivamente. La digeribilità *in vitro* della dieta si è rivelata essere pari a 81,24 %. La composizione chimica del residuo indigerito così ottenuto è riportata in Tabella 2.

Tabella 2 - Composizione chimica della frazione indigerita della dieta (% sulla SS)

Proteine	13,0
Lipidi	3,16
Ceneri	44,4
Amido	3,23

Sono stati valutati, mediante fermentazione *in vitro*, gli effetti di 6 trattamenti, ciascuno eseguito in 5 replicati:

- dieta di controllo (CTRL) senza nessuna aggiunta di substrati sperimentali;
- *Saccharomyces boulardii* (SB) (*Gnosis Bioresearch, Sant'Antonino, Switzerland*);
- Fruttooligosaccaridi (FOS) Beneo OPS (*Beneo GmbH, Mannheim, Germany*);
- Lattitolo (LAC) (*Giusto Faravelli SpA, Milano, Italy*);
- FOS + SB;
- LAC + SB.

Le sostanze prebiotiche oggetto della prova sono state aggiunte all'inoculo fecale ad una concentrazione finale di 1,5 g/L, mentre *S. boulardii* è stato aggiunto all'inoculo ad una concentrazione finale di 0,25 g/L. Il residuo indigerito della dieta è stato aggiunto all'inoculo fecale in ragione di 10 g/L. La scelta di queste concentrazioni rispecchia l'ammontare di

sostanze prebiotiche e di lievito che dovrebbero raggiungere il grosso intestino, posto che il cane assuma una dieta commerciale secca addizionata di prebiotici e lieviti alla concentrazione di 1,5 g/kg e 0,5 g/kg, rispettivamente.

Infatti, considerando un coefficiente di digeribilità di un alimento “superpremium” pari a 0,9 e assumendo che i supplementi addizionati raggiungano il colon, il rapporto tra la quota indigerita della dieta e il supplemento nel grosso intestino sarà approssimativamente pari a 10:1.

Inoltre, per ciascuno studio, 5 ulteriori bottiglie sono state allestite quale controllo negativo, contenenti il solo inoculo fecale e senza l’aggiunta di alcun substrato sperimentale o di frazione indigerita della dieta. Il pH degli inoculi fecali è stato regolato a 6,7; le bottiglie sono state quindi sigillate ermeticamente e poste ad incubare in atmosfera controllata (85% N₂, 10% CO₂ e 5% H₂) per 24 h a 39 °C all’interno di una camera anaerobica (Anaerobic System; Forma Scientific Co., Marietta, OH, USA). Campioni di liquido di fermentazione sono stati raccolti da ciascuna bottiglia a 6 e 24 h, immediatamente congelati a -80 °C e destinati alle successive analisi per la determinazione del pH, dell’ammoniaca, degli acidi grassi volatili, delle amine biogene e delle principali popolazioni batteriche.

4.1.1. Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni

L’analisi centesimale sul mangime e sulla corrispondente frazione indigerita sono state condotte secondo le metodiche standard A.O.A.C. (A.O.A.C., 2000; Metodo 954.01 per la proteina grezza, Metodo 920.39 per i lipidi grezzi, Metodo 920.40 per l’amido, Metodo 942.05 per le ceneri grezze, Metodo 962.09 per la fibra grezza).

Il pH è stato determinato dalla media aritmetica di due letture ripetute per ciascun campione, eseguite mediante strumento pHmetro Seven Multi (Mettler Toledo, Milano, Italia).

L’ammoniaca è stata determinata mediante l’impiego di un apposito kit commerciale (Urea/BUN–Color, BioSystem S.A., Barcellona, Spagna).

Per la determinazione delle amine biogene, i campioni sono stati dapprima diluiti 1:5 (v/v) in acido perclorico 0,3 M (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); in seguito, le amine biogene sono state separate mediante HPLC e quantificate tramite fluorimetria, secondo quanto descritto da Stefanelli *et al.* (1986).

Gli acidi grassi volatili sono stati determinati mediante gascromatografia, secondo la metodica descritta da Biagi *et al.* (2006). La separazione dei diversi acidi grassi volatili è stata realizzata utilizzando una colonna impaccata 80/120 Carboxen B-D/4% CW 2M (Supelco, Sigma

Aldrich, St. Louis, MO, USA). L'analisi gascromatografica è stata condotta utilizzando un gascromatografo Varian 3400 (Varian Analytical Instruments, Sunnyvale, CA, USA). L'acido 3-metil-butirrico è stato aggiunto in qualità di standard interno.

Per la caratterizzazione della popolazione microbica intestinale, l'estrazione del DNA batterico è stata condotta sui campioni di liquido di fermentazione prelevati a 6 e 24 h, secondo la metodica descritta da Condezo-Hoyos *et al.* (2014). Brevemente, 2 mL di liquido di fermentazione sono stati centrifugati a 15000 giri per 5 min a 4° C allo scopo di raccogliere il pellet contenente le cellule batteriche e separare il surnatante da destinare all'analisi dei composti volatili, secondo la metodica sopra descritta. Il DNA batterico è stato estratto dal pellet mediante un apposito kit commerciale (Stool DNA Isolation Kit, Norgen Biotek Corp., ON, Canada), seguendo il protocollo del produttore. La concentrazione e la purezza del DNA estratto sono state misurate mediante spettrofotometro (DeNovix DS-11 spectrophotometer, DeNovix, Wilmington, DE, USA); si è quindi proceduto ad uniformare tutti i campioni alla medesima concentrazione di DNA (50 ng/μl).

Le popolazioni batteriche di *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. ed *Enterococcus* spp. sono state quantificate mediante qPCR attraverso l'uso di primers specifici (Tabella 3). L'amplificazione e la quantificazione del DNA genomico sono state eseguite mediante termociclatore CFX96 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). L'amplificazione è stata eseguita in duplicato per ciascun gruppo batterico; il protocollo è stato ottimizzato per un volume di reazione di 15 μl, contenente 7,5 μl di 2X SensiFAST No-ROX PCR Master Mix (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany), 4,8 μl di acqua *nuclease free*, 0,6 μl di ciascun primer (concentrazione di 10 pmol) e 1,5 μl di DNA genomico.

Il ciclo di amplificazione è stato il seguente: denaturazione a 95°C per 2 min, 95°C per 5 s, appaiamento dei primers a 55–61°C per 10 s ed estensione a 72°C per 8 s. Il ciclo è stato ripetuto 40 volte.

Tabella 3 - Primers utilizzati nell'esecuzione della qPCR

Target	Primer	Sequenza (5'-3')	Fonte
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> F	GTTAATACCTTTGCTCATTGA	(Malinen, 2003)
	<i>E. coli</i> R	ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>g-Bifid</i> -F	CTCCTGGAAACGGGTGG	(Matsuki <i>et al.</i> , 2002)
	<i>g-Bifid</i> -R	GGTGTTCTTCCCGATATCTACA	
<i>Lactobacillus</i> spp.	Lab-0159	GGAAACAG(A/G)TGCTAATACCG	(Collier <i>et al.</i> , 2003)
	Univ-0515	ATCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA	
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterof</i>	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	(Rinttilä <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Enteror</i>	ACTCGTTGTACTIONCCATTGT	
<i>Clostridium perfringens</i>	CP1	AAAGATGGCATCATCATTCAAC	(Wang <i>et al.</i> , 1994)
	CP2	TACCGTCATTATCTTCCCCAAA	

4.1.2. Analisi statistica dei dati

I risultati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA a 2 vie, con prebiotico e lievito come effetti principali. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante il test di Newman-Keuls e ritenute significative per $P < 0,05$. Ciascuna bottiglia ha rappresentato una singola unità sperimentale. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Statistica 10.0 (Stat Soft Italia, Padova, Italia).

4.2. Risultati

I valori di pH e le concentrazioni fecali di ammoniaca sono riportati nella Tabella 4.

Dopo 6 ore di incubazione, frutto-oligosaccaridi e lattitolo hanno determinato una riduzione significativa del pH rispetto al controllo (-14,9% FOS, -15,3% per LAC; $P < 0,001$).

Risultati simili sono stati osservati anche dopo 24 ore di fermentazione nei gruppi trattati con i prebiotici (-10,1% FOS, -11,1% LAC; $P < 0,001$). L'impiego di *S. boulardii* non ha prodotto diminuzioni significative del pH al termine delle 24 ore di fermentazione ($P > 0,05$).

A 24 ore dall'inizio della fermentazione, i trattamenti prebiotici hanno determinato una riduzione significativa delle concentrazioni di ammoniaca (-15,7% FOS; -16% LAC; $P < 0,001$).

L'impiego di *S. boulardii*, a 24 ore dalla fermentazione non ha determinato diminuzioni significative delle concentrazioni di tale sostanza, neppure se impiegato in associazione con frutto-oligosaccaridi o lattitolo.

In Tabella 5 sono riportati i valori relativi alle concentrazioni di amine biogene alle 6 e alle 24 h di incubazione. Sei ore dopo il termine della prova, sono diminuite le concentrazioni di putrescina ad opera dei frutto-oligosaccaridi e del lattitolo (-22,5% FOS. -25,2% LAC; $P < 0,001$). Si è evidenziato, inoltre, alle 6 ore dal trattamento a base di FOS, un aumento del 73% delle concentrazioni di cadaverina ($P = 0,038$). A 6 ore dal trattamento è stata osservata una tendenza all'aumento delle concentrazioni di cadaverina negli inoculi contenenti SB ($P = 0,065$). Anche a 24 ore dall'incubazione la presenza di FOS e LAC ha indotto un aumento significativo delle concentrazioni di cadaverina negli inoculi (+48,6% FOS, +23% LAC; $P = 0,003$). I livelli di spermidina e spermina non sono risultate significativamente diminuite dai trattamenti durante tutta la fermentazione.

In Tabella 6 sono presentati i valori relativi agli effetti dei prebiotici testati sulle concentrazioni degli AGV, i cui andamenti per alcuni composti valutati sono risultati concordi nei due tempi di prelievo; infatti gli AGV totali sono aumentati significativamente dai trattamenti a base di

FOS e LAC (+65,6% FOS, +54,8% LAC dopo 6h e +29% FOS, +36% LAC dopo 24h; $P < 0,001$). I FOS hanno indotto un aumento di acido acetico (+32,3% dopo 6h e +1% dopo 24h; $P < 0,001$), ed entrambi i prebiotici testati hanno determinato un aumento della concentrazione di propionato (+151% FOS, +176% LAC dopo 6h e +72% FOS, +116% LAC dopo 24h; $P < 0,001$), nonché una riduzione delle concentrazioni degli acidi isobutirrico (-67% FOS, -63% LAC dopo 6h e -13% FOS, -25% LAC dopo 24h; $P < 0,001$) ed isovalerico (-72% FOS, -48% LAC dopo 6h e -15% FOS, -20% LAC dopo 24h; $P < 0,001$).

SB dopo 6 h ha ridotto significativamente le concentrazioni fecali di acido n-butirrico (3,21 vs. 3,30 per CTRL vs. lievito; $P = 0,036$).

A 24 h, i FOS impiegati nella prova hanno determinato aumenti significativi dell'acido n-valerico (+92% FOS, +23% LAC; $P < 0,001$), mentre SB ha determinato un aumento significativo degli acidi isobutirrico (+ 11,5%; $P = 0,018$) ed isovalerico (+9%; $P = 0,059$). L'impiego di *S. boulardii* e lattitolo ha diminuito le concentrazioni di acido acetico al termine della fermentazione (-8,2% $P = 0,030$) e più che raddoppiato quelle di acido propionico al medesimo tempo di prelievo (+101%; $P = 0,039$).

I risultati relativi alle conte delle diverse popolazioni batteriche sono riportati in Tabella 7. SB non ha esercitato alcun effetto sulle conte delle popolazioni batteriche durante tutta la sperimentazione. Diversamente, già dopo 6 ore i prebiotici avevano determinato un aumento dei bifidobatteri (+15,7% FOS, +2% LAC; $P = 0,009$), dei clostridi (+31,7% FOS, +3,8% LAC; $P = 0,028$), e di *E. coli* (+9% FOS, +5% LAC; $P = 0,019$). Alle 24 ore, entrambi i substrati prebiotici hanno portato all'aumento dei bifidobatteri (+17,8% FOS, +11% LAC; $P < 0,001$) e alla riduzione di enterococchi (-8,7% FOS, -8,3% LAC; $P = 0,006$) e di clostridi (-12% FOS, -10% LAC; $P = 0,005$).

Tabella 4 - Valori di pH e concentrazioni di ammoniaca (mmol/L) a 6 e 24 h di incubazione di un inoculo fecale di cane con *S. boulardii* ed in presenza di substrati prebiotici ¹

	CTRL	FOS	LAC	<i>S. boulardii</i>	<i>S. boulardii</i> + FOS	<i>S. boulardii</i> + LAC	ANOVA P			Pooled SEM
							Lievito	Prebiotico	Lievito x Prebiotico	
6h										
pH	6,19±0,01	5,27±0,02	5,24±0,01	6,18±0,01	5,31±0,02	5,24±0,01	0,143	<0,001	0,001	0,01
NH3	39,6±4,69	32,9±6,25	38,4±5,02	37,0±5,30	42,8±4,16	33,4±3,38	0,658	0,521	0,004	2,18
24h										
pH	5,82±0,02	5,23±0,01	5,17±0,02	5,70±0,24	5,27±0,02	5,17±0,00	0,508	<0,001	0,203	0,04
NH3	30,5±2,15	25,7±1,78	25,6±1,52	29,2±3,10	26,5±1,96	27,6±1,47	0,564	<0,001	0,210	0,92

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento ± SD.

Tabella 5 - Concentrazioni di amine biogene (nmol/mL) a 6 e 24 h di incubazione di un inoculo fecale di cane con *S. boulardii* ed in presenza di substrati prebiotici ¹

	CTRL	FOS	LAC	<i>S. boulardii</i>	<i>S. boulardii</i> + FOS	<i>S. boulardii</i> + LAC	ANOVA P			Pooled SEM
							Lievito	Prebiotico	Lievito x Prebiotico	
6h										
Putrescina	333±61,1	258±35,9	249±41,8	329±62,5	234±13,0	273±58,1	0,950	0,001	0,569	21,7
Cadaverina	69,4±17,8	120±7,5	68,8±19,6	115±97,4	144±13,4	92,8±35,5	0,065	0,038	0,825	19,7
Spermidina	47,6±59,0	15,1±13,4	13,8±7,5	21,0±20,7	10,2±18,4	73,8±95,0	0,588	0,340	0,127	21,2
Spermina	8,4±38,1	19,7±16,9	5,8±18,2	28,6±15,7	0,9±17,6	22,4±10,2	0,993	0,483	0,259	17,6
24h										
Putrescina	451±120,3	377±75,8	404±78,2	478±222,4	403±63,8	297±68,1	0,679	0,115	0,367	53,1
Cadaverina	144±117,5	214±19,4	177±46,0	125±77,2	286±86,6	132±29,7	0,921	0,003	0,179	31,9
Spermidina	55,6±54,6	15,5±6,8	41,1±24,8	33,8±36,5	22,0±22,9	13,4±6,0	0,210	0,173	0,418	13,6
Spermina	41,2±43,0	20,7±38,7	9,46±5,2	31,48±46,2	11,9±18,0	4,04±2,5	0,491	0,118	0,987	14,0

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento ± SD.

Tabella 6 - Concentrazioni di acidi grassi volatili (mmol/L) a 6 e 24 h di incubazione di un inoculo fecale di cane con *S. boulardii* ed in presenza di substrati prebiotici ¹

	CTRL	FOS	LAC	<i>S. boulardii</i>	<i>S. boulardii</i> + FOS	<i>S. boulardii</i> + LAC	ANOVA P			Pooled SEM
							Lievito	Prebiotico	Lievito x Prebiotico	
6h										
A. acetico	7,31±0,38	9,67±0,17	7,33±0,46	7,57±0,49	8,53±0,45	8,25±0,49	0,939	<0,001	<0,001	0,19
A. propionico	4,86±0,13	12,2±0,29	13,4±0,64	4,91±0,23	11,3±0,32	14,8±0,46	0,141	<0,001	<0,001	0,17
A. isobutirrico	0,27±0,05	0,09±0,02	0,1±0,02	0,22±0,03	0,06±0,04	0,13±0,02	0,16	<0,001	0,019	0,01
A. <i>n</i> -butirrico	2,71±0,07	3,8±0,09	3,11±0,11	2,7±0,13	3,92±0,15	3,29±0,14	0,036	<0,001	0,239	0,05
A. isovalerico	0,46±0,09	0,13±0,08	0,24±0,04	0,42±0,05	0,15±0,02	0,29±0,02	0,749	<0,001	0,201	0,02
A. <i>n</i> -valerico	0,06±0,14	0,12±0,06	0,14±0,02	0,02±0,04	0,21±0,12	0,15±0,02	0,529	0,006	0,232	0,04
AGV totali	15,7±0,78	25,1±0,41	25,6±1,19	15,8±0,91	24,2±0,58	26,9±1,03	0,301	<0,001	<0,001	0,38
24h										
A. acetico	10,92±0,59	11±0,37	10,5±0,43	11,5±0,41	11,2±0,55	10±0,3	0,612	<0,001	0,03	0,2
A. propionico	8,66±1,10	14,9±0,24	18,7±0,72	10,4±2,6	14,2±1,39	17,4±0,72	0,842	<0,001	0,039	0,6
A. isobutirrico	0,52±0,07	0,45±0,03	0,39±0,04	0,58±0,05	0,46±0,04	0,44±0,02	0,018	<0,001	0,523	0,02
A. <i>n</i> -butirrico	3,84±0,47	4,43±0,06	3,62±0,10	4,26±0,3	4,6±0,46	3,43±0,13	0,238	<0,001	0,097	0,14
A. isovalerico	1,17±0,15	0,99±0,05	0,94±0,04	1,28±0,14	1,05±0,11	0,98±0,04	0,059	<0,001	0,75	0,04
A. <i>n</i> -valerico	1,01±0,16	1,94±0,04	1,24±0,03	1,31±0,48	2,1±0,26	1,27±0,05	0,069	<0,001	0,463	0,1
AGV totali	26,12±2,42	33,7±0,61	35,5±1,18	29,3±2,93	33,7±2,74	33,5±1,2	0,596	<0,001	0,03	0,91

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento ± SD.

Tabella 7 - Conte delle popolazioni batteriche selezionate (log cellule/mL) a 6 e 24 ore di incubazione di un inoculo fecale di cane con *S. boulardii* ed in presenza di substrati prebiotici ¹

	CTRL	FOS	LAC	<i>S. boulardii</i>	<i>S. boulardii</i> + FOS	<i>S. boulardii</i> + LAC	ANOVA P			Pooled SEM
							Lievito	Prebiotico	Lievito x Prebiotico	
6h										
Batteri totali	9,7±0,57	10,2±0,47	9,89±0,4	9,86±0,74	10,2±0,46	10,2±0,22	0,425	0,245	0,805	0,22
<i>Lactobacillus</i> spp.	9,45±0,52	10,1±0,44	9,35±0,42	9,67±0,8	10,1±0,5	9,92±0,15	0,187	0,059	0,406	0,23
<i>Enterococcus</i> spp.	7,12±0,6	7,5±0,56	7,28±0,64	7,31±0,87	7,52±0,42	7,73±0,25	0,318	0,454	0,724	0,26
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4,39±0,54	5,08±0,41	4,48±0,33	4,57±0,74	5,27±0,3	4,97±0,25	0,102	0,003	0,691	0,2
<i>E. coli</i>	7,65±0,38	8,35±0,4	8,03±0,32	7,86±0,7	8,25±0,4	8,41±0,26	0,308	0,019	0,461	0,19
Cl cluster IV	3,44±0,64	4,53±0,4	3,57±0,63	3,82±0,85	4,32±0,82	4,07±0,31	0,346	0,023	0,437	0,29
24h										
Batteri totali	10,2±0,4	9,87±0,32	9,76±0,37	9,97±0,22	9,88±0,38	9,75±0,36	0,582	0,129	0,733	0,15
<i>Lactobacillus</i> spp.	10,1±0,41	9,75±0,44	9,77±0,36	9,83±0,27	9,58±0,42	9,61±0,33	0,173	0,168	0,942	0,17
<i>Enterococcus</i> spp.	7,24±0,4	6,61±0,3	6,64±0,31	6,94±0,27	6,5±0,5	6,68±0,36	0,358	0,006	0,584	0,16
<i>Bifidobacterium</i> spp.	5,24±0,36	6,17±0,23	5,81±0,21	5,16±0,23	5,89±0,36	5,74±0,4	0,211	<0,001	0,71	0,14
<i>E. coli</i>	8,18±0,3	8,01±0,26	7,98±0,22	7,83±0,4	7,93±0,4	8,13±0,4	0,466	0,842	0,259	0,15
Cl cluster IV	5,66±0,25	4,98±0,37	5,07±0,32	5,26±0,24	4,96±0,27	5,13±0,4	0,313	0,005	0,223	0,14

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento ± SD.

4.3. Discussione

L'analisi dei risultati ottenuti ha permesso di esprimere alcune considerazioni.

Sia i FOS sia il lattitolo hanno ridotto il pH del liquido di fermentazione, a differenza di *Saccharomyces boulardii* che non ha influenzato il pH. Per quanto concerne le concentrazioni di ammoniaca, i prebiotici testati, ma non il ceppo di *S. boulardii*, hanno ridotto le concentrazioni di tale sostanza, esclusivamente nel secondo prelievo dopo 24 ore di incubazione. Analogamente a quanto osservato nel corso della presente prova, in uno studio di Flickinger *et al.* (2003b), l'aggiunta di oligofruzzosio alla dieta di cani adulti sani ridusse le concentrazioni fecali di ammoniaca. Nello stesso studio, invece, la somministrazione di FOS non comportò variazioni nelle concentrazioni di tale sostanza.

Sulla base dei dati disponibili in letteratura, si suppone che il calo del pH sia dovuto all'incremento degli acidi grassi volatili liberati dai batteri durante le fermentazioni dei substrati prebiotici; secondo vari autori, tra cui Twomey *et al.* (2003) e Rosendale *et al.* (2015), infatti, la fermentazione di carboidrati indigeribili da parte della flora batterica genera AGV. In aggiunta, il calo del pH che ne consegue contribuisce alla stabilità del microbiota poiché ostacola l'ingresso di batteri potenzialmente patogeni (Deng e Swanson, 2015; Corzo, 2015; Dwivedi *et al.*, 2016).

Nello studio in esame, gli AGV totali sono aumentati in misura significativa ($P < 0,001$) nei substrati contenenti i due prebiotici, in accordo con quanto precedentemente evidenziato da Biagi *et al.* (2010) in una sperimentazione *in vitro* volta a testare gli effetti di alcune sostanze prebiotiche (fra cui cicoria, pectina da mela, fibra di psyllium e gomma di guar). Fra gli AGV esaminati in questa sperimentazione, FOS e LAC hanno indotto un aumento di acido acetico e propionico, analogamente a quanto riportato da Propst *et al.* (2003), i quali avevano testato nel cane oligo-fruttani ed inulina a diversi livelli di inclusione (0,3; 0,6 e 0,9%).

Differentemente da quanto osservato per i prebiotici impiegati, *S. boulardii* non ha prodotto alcun aumento significativo nelle concentrazioni totali di acidi grassi volatili, ed i minimi effetti prodotti sono talvolta opposti a quelli indotti dai due substrati prebiotici, come l'aumento delle concentrazioni di isoacidi, metaboliti derivanti dall'attività proteolitica compiuta dai batteri intestinali. Tuttavia, una prova di Schneider *et al.* (2005), condotta su pazienti umani ospedalizzati e sottoposti a dieta enterale, ha dimostrato come l'impiego di *S. boulardii* potesse indurre un aumento significativo degli AGV totali nel liquido intestinale.

I FOS e LAC, in entrambi i tempi di prelievo, hanno manifestato il loro potere prebiotico inducendo anche un aumento delle concentrazioni di *n*-valerato e contribuendo a ridurre in maniera significativa le concentrazioni degli isoacidi. Tale risultato concorda con quanto sostenuto da Wynn (2009), ovvero che i prebiotici favoriscono un incremento di batteri produttori di AGV e riducono, invece, la liberazione di acidi grassi a catena ramificata (isobutirrato ed isovalerato).

I risultati prodotti dalla fermentazione del lattitolo impiegato singolarmente hanno portato ad un aumento del propionato e dell'acido *n*-valerico, e ad aumenti parziali (verificatisi solo al prelievo delle 6 ore) di acido acetico ed *n*-butirrico. In uno studio di Patil *et al.* (1987b), le fermentazioni del lattitolo da parte del microbiota intestinale umano producevano la liberazione di vari AGV, e le quote maggiori erano di acido acetico. Uno studio di Biagi *et al.* (2010), invece, aveva dimostrato che il lattitolo impiegato in prove *in vitro* ed *in vivo* su cani sani, e testato in associazione con altri prebiotici, aumentava prevalentemente le concentrazioni di butirrato.

Per quanto concerne l'analisi sulle variazioni delle popolazioni batteriche fecali prese in esame, il trattamento con FOS e LAC ha indotto un aumento significativo del numero di bifidobatteri, stimolando dunque la crescita selettiva di questi batteri ritenuti benefici, pur tuttavia riducendo il numero di enterococchi, gruppo di batteri lattici la cui crescita è in genere stimolata dai prebiotici. Un incremento delle conte fecali di bifidobatteri è stato osservato anche da Grieshop *et al.* (2004) in cani riceventi cicoria (10g/kg di dieta), ma non da Strickling *et al.* (2000) che non riscontrarono variazioni nelle conte di bifidobatteri a seguito della supplementazione della dieta di cani adulti con FOS. Nel lavoro di Biagi *et al.* (2010), l'impiego del lattitolo *in vivo* aveva ridotto le concentrazioni fecali di coliformi e di *Cl. perfringens*; tali popolazioni si sono ridotte anche al termine di questa prova in entrambi i trattamenti con i prebiotici, sebbene siano risultate aumentare al prelievo delle 6 ore, in modo difficilmente giustificabile. La presenza di SB non ha indotto in questa prova cambiamenti rilevanti di nessuna popolazione batterica presa in esame. Tali risultati concordano con quelli di Moré e Swidsinski (2015), i quali avevano testato *S. boulardii* in persone sane, senza riscontrare variazioni rilevanti di popolazioni batteriche costituenti un microbiota stabile.

Le amine biogene costituiscono cataboliti derivanti dalla fermentazione di substrati proteici; Seidel *et al.* (1984) hanno dimostrato nell'uomo l'importanza della putrescina nella regolazione della crescita e della differenziazione cellulare intestinale, tuttavia è stato in

seguito ipotizzato un ruolo della stessa come precursore di N-nitroso-composti coinvolti nella carcinogenesi del cancro del colon-retto (Hughes et al., 2000).

La cadaverina è associata a processi putrefattivi con conseguenze negative per la salute intestinale dell'ospite (Barry *et al.*, 2014). Nella prova in esame, FOS e lattitolo hanno determinato una riduzione di putrescina e di cadaverina (quest'ultima ad opera solo di LAC); entrambe queste amine sono però diminuite solo dopo 6 h di fermentazione. Al termine della fermentazione, FOS e LAC hanno invece indotto un aumento di cadaverina; questo risultato potrebbe trovare parziale giustificazione nell'aumentata produzione di amine biogene da parte dei batteri lattici qualora questi si ritrovino in condizioni di stress acidico (Spano *et al.*, 2010). Secondo questi Autori, numerosi ceppi di batteri lattici, in condizioni di elevata acidità ambientale, sarebbero capaci di produrre amine biogene attraverso reazioni di decarbossilazione di alcuni aminoacidi. La maggiore acidificazione che si verifica nel lume intestinale in seguito alla utilizzazione di substrati fermentescibili da parte dei batteri lattici potrebbe contribuire a inibire la flora batterica proteolitica e conseguentemente a ridurre le concentrazioni di ammoniaca; tuttavia, la concentrazione di amine biogene potrebbe aumentare in conseguenza all'attivazione di specifici meccanismi di tolleranza dei batteri lattici ai bassi livelli di pH (Spano *et al.*, 2010).

Lo studio di Flickinger *et al.* (2003b) aveva ottenuto risultati piuttosto differenti da quelli della prova oggetto della discussione. L'impiego di oligo-fruttani non aveva determinato variazioni nei livelli di putrescina e spermidina (diminuiti, invece, nei replicati del trattamento con FOS), quanto piuttosto aveva diminuito le concentrazioni di cadaverina. Pur essendosi impiegati fruttani in entrambi gli studi, nello studio di Flickinger *et al.* (2003b) si erano testati sia FOS che oligofruzzoso; nella prova in discussione invece esclusivamente i FOS, ovvero fruttani ad un più basso grado di polimerizzazione. Diverse forme di fruttani possono determinare effetti tra loro differenti sul microbiota dei cani (Flickinger *et al.*, 2003b); a conferma di ciò, dalla prova di Flickinger *et al.* (2003b) emergeva che, quando erano impiegati i FOS invece che l'oligofruzzoso, diminuivano i livelli di spermina ed aumentavano quelli di cadaverina, analogamente al risultato ottenuto al prelievo finale della prova in esame. Inaspettatamente, anche nel gruppo FOS si è osservato un aumento importante dei livelli di cadaverina al primo prelievo (6 ore).

S. boulardii in questa prova non è sembrato influenzare in modo significativo le concentrazioni di amine biogene.

5. Valutazione degli effetti di due prodotti a base di parete cellulare di lievito e di un ceppo di *S. boulardii* sul microbiota intestinale del cane.

5.1. Impiego di un modello *in vitro*

5.1.1. Materiali e metodi

Quattro cani adulti e clinicamente sani (3 maschi ed una femmina, di età compresa fra 2 e 7 anni, di peso corporeo compreso fra 6 e 17 kg) di proprietà di privati e viventi in appartamento sono stati alimentati per 4 settimane con una dieta commerciale secca di mantenimento per cani adulti (Effeffe Pet Food S.p.A., Pieve di Porto Morone, Italia) formulata con i seguenti ingredienti: farina di pollo, riso, mais, grasso animale, farina di pesce, semi di lino, olio di semi di girasole, minerali e vitamine. La composizione chimica della dieta è riportata nella Tabella 8.

Tabella 8 - Composizione chimica dell'alimento (% STQ)

Proteine grezza	25
Lipidi grezzi	15
Fibra grezza	1,5
Ceneri grezze	6,5
EM (kcal/1000g)*	3.650

* EM calcolata utilizzando i fattori di Atwater modificati

La quantità di alimento che ciascun cane ha ricevuto giornalmente è stata calcolata individualmente sulla base dei fabbisogni energetici dell'animale, che sono stati calcolati secondo la seguente equazione:

$$\text{EM (kcal al giorno)} = 132 \times \text{kg peso corporeo}^{0,75} \text{ (NRC, 2006)}$$

attribuendo alla dieta, secondo i fattori di Atwater modificati per il cane, 3,5 kcal per grammo di proteine e amido e 8,5 kcal per grammo di lipidi.

Metodica di fermentazione *in vitro*

Nel giorno prestabilito al termine delle quattro settimane, le feci dei cani sono state condotte al laboratorio entro 20 minuti dall'escrezione, dove sono state mescolate tra loro e diluite 1:10 1:10 p/v in Wilkins Chalgren Anaerobe Broth (WCAB 0.5x; Oxoid, Basingstoke, UK). L'inoculo fecale così ottenuto è stato ulteriormente diluito in terreno di arricchimento (33 ml/L),

secondo quanto proposto da Sunvold *et al.* (1995) e dispensato in 5 bottiglie da 30 mL per ciascun trattamento.

In ogni bottiglia è stato aggiunto (in misura di 10 g/L) il residuo indigerito della dieta commerciale secca di mantenimento per cani adulti precedentemente somministrata ai cani, ottenuto a seguito di digestione chimica enzimatica *in vitro* secondo la procedura proposta da Biagi *et al.*, 2016.

Tale metodica prevede che l'alimento, precedentemente essiccato in stufa ad una temperatura di 65°C e macinato finemente, subisca l'azione di due fasi enzimatiche, atte a simulare i processi digestivi gastrici ed intestinali, rispettivamente.

La digeribilità *in vitro* della dieta si è rivelata essere pari a 80,26 %.

La composizione chimica (% sulla SS) del residuo indigerito così ottenuto è riportata in Tabella 9.

Tabella 9 - Composizione chimica della frazione indigerita della dieta (% sulla SS.)

Proteine grezza	16,19
Lipidi grezzi	9,96
Ceneri grezze	23,84
Estrattivi inazotati	1,71

Sono stati valutati gli effetti di 6 trattamenti forniti da Lallemand (Blagnac, Midi-Pyrénées, France), ciascuno eseguito in 5 replicati:

- dieta di controllo (CTRL) senza nessuna aggiunta di substrati sperimentali
- mannano-oligosaccaridi (MOS = 0,2 g/L)
- estratto di parete cellulare di lievito purificato (CW = 0,08 g/L)
- frutto-oligosaccaridi (FOS = 0,5 g/L)
- un ceppo di *Saccharomyces boulardii* (SB = 0,01 g/L)
- CW + FOS (0,08 + 0,5 g/L, rispettivamente)

I supplementi nutrizionali oggetto della prova sono stati aggiunti all'inoculo fecale considerando il coefficiente di digeribilità di un alimento "superpremium", che è pari a 0,9, e assumendo che i supplementi addizionati raggiungano il colon con un rapporto fra la quota indigerita della dieta ed il supplemento approssimativamente pari a 10:1.

Inoltre, per ciascuno studio, 5 ulteriori bottiglie sono state allestite quale controllo negativo, contenenti il solo inoculo fecale, senza l'aggiunta di alcun substrato sperimentale o di frazione indigerita della dieta. Il pH degli inoculi fecali è stato regolato a 6,7; le bottiglie sono state quindi sigillate ermeticamente e poste ad incubare in atmosfera controllata (85% N₂, 10% CO₂ e 5% H₂) per 24 h a 39 °C all'interno di una camera anaerobica (Anaerobic System; Forma Scientific Co., Marietta, OH, USA). Campioni di liquido di fermentazione sono stati raccolti da ciascuna bottiglia a 6 e 24 h, immediatamente congelati a -80 °C e destinati alle successive analisi per la determinazione di analisi chimiche (pH, ammoniaca e amine biogene, acidi grassi volatili e composti organici volatili) e microbiologiche.

5.1.1.1. *Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni*

Le analisi sull'alimento e sulla corrispondente frazione indigerita sono state condotte secondo le metodiche standard A.O.A.C. (A.O.A.C., 2000; Metodo 954.01 per la proteina grezza, Metodo 920.39 per i lipidi grezzi, Metodo 920.40 per l'amido, Metodo 942.05 per le ceneri grezze, Metodo 962.09 per la fibra grezza).

Il pH è stato determinato dalla media aritmetica di due letture ripetute per ciascun campione, eseguite mediante strumento pHmetro Seven Multi (Mettler Toledo, Milano, Italia).

L'ammoniaca è stata determinata mediante l'impiego di un apposito kit commerciale (Urea/BUN-Color, BioSystem S.A., Barcellona, Spagna). Gli acidi grassi volatili sono stati determinati mediante gascromatografia, secondo la metodica descritta da Biagi *et al.* (2006). La separazione dei diversi acidi grassi volatili è stata realizzata utilizzando una colonna impaccata 80/120 Carbopack B-DA/4% CW 2M (Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). L'analisi gascromatografica è stata condotta utilizzando un gascromatografo Varian 3400 (Varian Analytical Instruments, Sunnyvale, CA, USA). L'acido 3-metil-butirrico è stato aggiunto in qualità di standard interno.

L'estrazione del DNA batterico è stata condotta sui campioni di liquido di fermentazione prelevati a 6 e 24 h, secondo la metodica descritta da Condezo-Hoyos *et al.* (2014). Brevemente, 2 mL di liquido di fermentazione sono stati centrifugati a 15000 giri per 5 min a 4° C allo scopo di raccogliere il pellet contenente le cellule batteriche e separare il surnatante da destinare all'analisi dei composti volatili, secondo la metodica sopra descritta. Il DNA batterico è stato estratto dal pellet mediante un apposito kit commerciale (Stool DNA Isolation Kit, Norgen Biotek Corp., ON, Canada), seguendo il protocollo del produttore. La concentrazione e la purezza del DNA estratto sono state misurate mediante spettrofotometro

(DeNovix DS-11 spectrophotometer, DeNovix, Wilmington, DE, USA); si è quindi proceduto ad uniformare tutti i campioni alla medesima concentrazione di DNA (50 ng/μl).

Le analisi microbiologiche hanno indagato le popolazioni batteriche su diversi livelli filogenetici (batteri totali; *phyla* Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria; generi *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp.; specie *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli*). Le popolazioni batteriche sono state quantificate mediante qPCR attraverso l'uso di primers specifici (Tabella 10). L'amplificazione e la quantificazione del DNA genomico sono state eseguite mediante termociclatore CFX96 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). L'amplificazione è stata eseguita in duplicato per ciascun gruppo batterico; il protocollo è stato ottimizzato per un volume di reazione di 15 μl, contenente 7,5 μl di 2X SensiFAST No-ROX PCR Master Mix (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany), 4,8 μl di acqua nuclease free, 0,6 μl di ciascun primer (concentrazione di 10 pmol) e 1,5 μl di DNA genomico.

Il ciclo di amplificazione è stato il seguente: denaturazione a 95°C per 2 min, 95°C per 5 s, appaiamento dei primers a 51–60°C per 10 s ed estensione a 72°C per 8 s. Il ciclo è stato ripetuto 40 volte.

Per la determinazione delle amine biogene, i campioni sono stati dapprima diluiti 1:5 (v/v) in acido perclorico 0,3 M (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); in seguito, le amine biogene sono state separate mediante HPLC e quantificate tramite fluorimetria, secondo quanto descritto da Stefanelli et al. (1986).

I composti organici volatili sono stati determinati mediante HS-SPME GC/MS, secondo la metodica descritta da Pinna et al. (2017).

Tabella 10 - Primers utilizzati nell'esecuzione della qPCR

Target	Primer	Sequenza	Temp. di annealing (°C)	Fonte
Firmicutes	Firm350f Firm814r	GGCAGCAGTRGGGAATCTTC ACACYTAGYACTCATCGTTT	60	Muhling <i>et al.</i> , 2008
<i>Cl. perfringens</i>	CPerf165F CPerf269R	CGCATAACGTTGAAAGATGG CCTTGGTAGGCCGTTACCC	58	Wise e Siragusa, 2005
Total bacteria	UniF UniR	CCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	59	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
Bacteroidetes	CFB555f CFB968r	CCGGAWYATTGGGTTTAAAGGG GGTAAGGTTCTCGCGTA	60	Muhling <i>et al.</i> , 2008
Fusobacteria	Fuso-F Fuso-R	KGGGCTCAACMCMGTATTGCGT TCGCGTTAGCTTGGGCGCTG	51	Suchodolski <i>et al.</i> , 2012a
<i>Lactobacillus</i>	LacF LacR	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	58	Malinen <i>et al.</i> , 2005
<i>Bifidobacterium</i>	BifF BifR	TCGCGTCYGGTGTGAAAG CCACATCCAGCRTCCAC	60	Rinttilä <i>et al.</i> , 2004
<i>E. coli</i>	E coli Fw E coli Rv	GTTAATACCTTTGCTCATTGA ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60	Malinen <i>et al.</i> , 2003

5.1.1.2. Analisi statistica dei dati

I risultati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA a una via, con test di Dunnett come post-test. Le differenze sono state ritenute significative per $P < 0,05$. Ciascuna bottiglia ha rappresentato una singola unità sperimentale. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Statistica 10.0 (Stat Soft Italia, Padova, Italia).

5.1.2. Risultati

I valori di pH, le concentrazioni fecali di ammoniaca ed i principali AGV sono riportati nella Tabella 11 per i risultati dopo 6 ore, e nella Tabella 12 per i risultati delle 24 ore post-fermentazione.

Dopo 6 ore di incubazione in camera anaerobica, tutti i trattamenti eccetto l'estratto di parete di lievito purificato hanno determinato una riduzione significativa ($P < 0,001$) del pH del liquido di fermentazione rispetto al controllo (6,54 vs. 6,44; 6,39; 6,45; 6,37 per CTRL vs. MOS, FOS, SB e CW + FOS, rispettivamente).

Dopo 24 ore di fermentazione soltanto i gruppi trattati con FOS e CW + FOS hanno visto un'ulteriore riduzione significativa del pH del liquido di fermentazione (6,08 vs. 5,94 e 6,01 per CTRL vs. FOS e FOS + C; $P < 0,001$). L'impiego di mannano-oligosaccaridi, estratto di parete di lievito e *S. boulardii* non hanno prodotto diminuzioni significative del pH al termine delle 24 ore di fermentazione ($P > 0,05$).

Le concentrazioni di ammoniaca dopo 6 e 24 ore di fermentazioni degli inoculi fecali contenenti i diversi trattamenti non hanno portato a differenze significative delle concentrazioni di tale sostanza rispetto al CTRL.

Dopo 6 ore di incubazione in camera anaerobica, gli AGV totali risultavano fortemente ridotti nei gruppi trattati con SB e con l'associazione CW + FOS (13,8 vs. 7,75 e 7,29 mmol/L per CTRL vs. SB e CW + FOS); al termine della fermentazione in vitro la concentrazione degli AGV totali, così come quelle degli isoacidi (isobutirrico ed isovalerico), risultavano ridotti in tutti i trattamenti.

I diversi trattamenti non hanno esercitato alcun effetto sulle popolazioni batteriche selezionate dopo 6 ore di incubazione ($P > 0,05$); diversamente, nella maggior parte delle popolazioni batteriche selezionate si è assistito ad un aumento delle conte batteriche dopo 24 ore di incubazione, con la sola eccezione dei replicati fermentanti il substrato a base di MOS (Tabella 13).

L'area assoluta dei COV ottenuta mediante analisi HS-SPME-GC/MS eseguita sugli inoculi fecali dopo 6 e 24 ore di fermentazione sono esposti rispettivamente in Tabella 14, Tabella 15 e Tabella 16, Tabella 17. Dopo 6 ore di incubazione si era evidenziato un aumento significativo del dimetil-disolfuro prodotto nelle bottiglie contenenti i substrati CW (+299,4%) e CW + FOS (+270,5%).

Per quanto concerne gli alcoli, dopo 24 ore di incubazione i trattamenti contenenti SB hanno mostrato una diminuzione di *n*-butanolo (-51,6%), isopentanololo (-52,5%), *n*-pentanololo (-52,1%) e *n*-esanolo (-49,8%). In maniera analoga, una riduzione di isopentanololo (-38%) e *n*-esanolo (-42,7%) è stata registrata nei replicati contenenti i FOS.

I trattamenti contenenti SB hanno evidenziato una diminuzione di acetone prodotto dopo 24 ore (-56,7%), così come di fenolo (-46,2%) e di indolo (-43,9%).

In Tabella 18 sono riportati i valori relativi alle concentrazioni di amine biogene alle 6 e alle 24 h di incubazione.

Dopo 6 ore di incubazione si è evidenziato un aumento significativo di cadaverina nel trattamento a base di FOS (+9,6%; $P < 0,05$) e di SB e CW + FOS (+15,8% e +22,4% rispettivamente; $P < 0,01$). Anche a 24 ore dall'incubazione la presenza di FOS ha indotto un aumento significativo di cadaverina e spermina (+32,7% e +33,8% rispettivamente; $P < 0,05$). L'associazione CW + FOS ha indotto, dopo 24 ore di fermentazione, un aumento significativo di tutte le amine biogene prese in considerazione: putrescina (+18%) e cadaverina (+33,9%) significative per $P < 0,05$, spermidina (+53%) e spermina (+70%) significative per $P < 0,01$.

Tabella 11 - Valori di pH, concentrazioni di ammoniaca e acidi grassi volatili (AGV) (mmol/L) a 6 h di incubazione in vitro di un inoculo fecale con una dieta di controllo addizionata di diversi supplementi nutrizionali¹.

		CTRL	MOS	CW	FOS	SB	CW + FOS	P-value
pH		6,54±0,07	6,44±0,05*	6,48±0,04	6,39±0,02*	6,45±0,06*	6,37±0,03*	< 0,001
ammoniaca	mmol/L	39,3±7	38,7±5,23	36,0±6,82	39,8±8,38	35,6±7,09	36,4±2,82	0,833
A. acetico	mmol/L	6,36±0,61	6,40±0,48	5,84±0,33	6,12±0,23	3,46±0,46*	3,15±0,24*	< 0,001
A. propionico	mmol/L	4,73±0,25	4,85±0,36	4,54±0,15	4,94±0,10	2,66±0,29*	2,51±0,11*	< 0,001
A. isobutirrico	mmol/L	0,17±0,04	0,15±0,03	0,20±0,01	0,23±0,01*	0,13±0,02*	0,12±0,01*	< 0,001
A. butirrico	mmol/L	2,18±0,11	2,37±0,16*	2,17±0,06	2,33±0,05	1,25±0,13*	1,17±0,03*	< 0,001
A. isovalerico	mmol/L	0,38±0,03	0,33±0,06	0,36±0,02	0,44±0,06	0,25±0,02*	0,24±0,03*	< 0,001
AGV totali	mmol/L	13,8±0,99	14,1±1,05	13,1±0,53	14,1±0,30	7,75±0,91*	7,19±0,38*	< 0,001
A. acetico	% mmol	46,0±1,19	45,4±0,57	44,5±0,77	43,5±0,84*	44,6±1,18	43,7±1,23*	< 0,005
A. propionico	% mmol	34,3±0,78	34,4±0,36	34,6±0,43	35,1±0,24	34,3±0,62	35,0±0,46	0,064
A. isobutirrico	% mmol	1,25±0,30	1,05±0,17	1,53±0,09*	1,63±0,05*	1,67±0,07*	1,70±0,09*	< 0,001
A. butirrico	% mmol	15,8±0,55	16,8±0,32*	16,6±0,45	16,6±0,39	16,1±0,50	16,2±0,63	< 0,05
A. isovalerico	% mmol	2,74±0,19	2,32±0,25	2,76±0,15	3,16±0,50	3,20±0,16	3,35±0,48*	< 0,001

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento ± SD.

*Differenze ritenute significative dal CTRL (P < 0,05).

Tabella 12 - Valori di pH, concentrazioni di ammoniaca e acidi grassi volatili (AGV) (mmol/L) a 24 h di incubazione in vitro di un inoculo fecale con una dieta di controllo addizionata di diversi supplementi nutrizionali¹.

		CTRL	MOS	CW	FOS	SB	CW + FOS	P-value
pH		6,08±0,01	6,02±0,01	6,06±0,02	5,94±0,03*	6,08±0,02	6,01±0,08*	< 0,001
ammoniaca	<i>mmol/L</i>	38,5±2,01	38,7±2,29	39,6±2,36	40,1±4,25	41,6±3,56	40,4±1,39	0,526
A. acetico	<i>mmol/L</i>	14,9±1,82	12,6±0,65*	12,0±1,03*	12,2±0,17*	11,6±0,40*	12,0±0,17*	< 0,001
A. propionico	<i>mmol/L</i>	10,5±1,27	9,44±0,54	9,00±0,56*	10,1±0,16	8,82±0,34*	10,0±0,26	< 0,001
A. isobutirrico	<i>mmol/L</i>	0,96±0,12	0,64±0,06*	0,65±0,04*	0,65±0,02*	0,65±0,03*	0,64±0,02*	< 0,001
A. butirrico	<i>mmol/L</i>	4,26±0,54	3,62±0,21*	3,34±0,15*	3,45±0,01*	3,31±0,14*	3,42±0,11*	< 0,001
A. isovalerico	<i>mmol/L</i>	1,56±0,22	1,20±0,14*	1,35±0,10	1,23±0,09*	1,30±0,13*	1,23±0,10*	0,004
AGV totali	<i>mmol/L</i>	32,2±3,95	27,5±1,52*	26,3±1,77*	27,6±0,22*	25,7±1,00*	27,4±0,57*	< 0,001
A. acetico	<i>% mmol</i>	46,3±0,57	45,9±0,48	45,5±0,93	44,1±0,35*	45,2±0,40*	44,0±0,36*	< 0,001
A. propionico	<i>% mmol</i>	32,7±0,24	34,3±0,25*	34,2±0,44*	36,5±0,41*	34,3±0,11*	36,6±0,51*	< 0,001
A. isobutirrico	<i>% mmol</i>	2,98±0,04	2,31±0,09*	2,46±0,07*	2,36±0,07*	2,52±0,06*	2,34±0,05*	< 0,001
A. butirrico	<i>% mmol</i>	13,2±0,22	13,1±0,25	12,7±0,37*	12,5±0,10*	12,9±0,13	12,5±0,21*	< 0,001
A. isovalerico	<i>% mmol</i>	4,85±0,17	4,37±0,43	5,12±0,44	4,47±0,33	5,06±0,37	4,49±0,31	0,006

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento ± SD.

*Differenze ritenute significative dal CTRL (P < 0,05).

Tabella 13 - Popolazioni batteriche (Log 16S DNA copie/mL) dopo 6 e 24 h di incubazione in vitro di un inoculo fecale con una dieta di controllo addizionata di diversi supplementi nutrizionali¹.

6 h	CTRL	MOS	CW	FOS	SB	CW + FOS	P-value
Batteri totali	10,0±0,4	10,4±0,2	10,4±0,4	10,1±0,3	10,1±0,6	10,2±0,4	0,521
Firmicutes	4,6±0,5	4,9±0,2	4,9±0,6	4,4±0,4	4,4±0,7	4,8±0,4	0,458
Bacteroidetes	6,7±0,5	7,1±0,3	7,2±0,5	6,7±0,4	6,9±0,7	7,1±10,4	0,373
Fusobacteria	9,0±0,5	9,3±0,2	9,3±0,3	8,9±0,3	9,0±0,6	9,1±0,3	0,632
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4,4±0,5	4,7±0,2	4,8±0,5	4,4±0,4	4,5±0,6	4,7±0,4	0,419
<i>Lactobacillus</i> spp.	3,7±0,4	4,0±0,3	4,1±0,5	3,6±0,4	3,7±0,6	3,9±0,4	0,449
<i>Clostridium perfringens</i>	3,8±0,6	4,0±0,2	4,1±0,7	3,4±0,4	3,7±0,6	3,9±0,4	0,504
<i>Escherichia coli</i>	6,3±0,4	6,6±0,2	6,8±0,4	6,2±0,4	6,4±0,7	6,4±0,3	0,367
24 h	CTRL	MOS	CW	FOS	SB	CW + FOS	P-value
Batteri totali	10,3±0,1	10,5±0,3	10,8±0,1*	10,9±0,1*	10,9±0,2*	10,8±0,2*	< 0,001
Firmicutes	7,1±0,1	7,2±0,3	7,6±0,2*	7,7±0,2*	7,7±0,2*	7,8±0,2*	< 0,001
Bacteroidetes	9,4±0,1	9,5±0,3	9,9±0,2*	10,0±0,1*	9,9±0,2*	9,9±0,2*	< 0,001
Fusobacteria	8,9±0,1	9,1±0,3	9,4±0,2*	9,5±0,2*	9,6±0,2*	9,4±0,2*	< 0,001
<i>Bifidobacterium</i> spp.	5,9±0,4	6,3±0,2	6,7±0,3*	6,8±0,2*	6,6±0,5*	6,7±0,3*	0,002
<i>Lactobacillus</i> spp.	4,8±0,1	5,1±0,3	5,4±0,1*	5,6±0,1*	5,2±0,4	5,3±0,1*	< 0,001
<i>Clostridium perfringens</i>	5,1±0,1	5,1±0,4	5,7±0,2*	5,9±0,1*	5,7±0,3*	5,6±0,2*	< 0,001
<i>Escherichia coli</i>	6,6±0,1	6,7±0,2	7,1±0,1*	7,1±0,2*	7,0±0,2*	7,1±0,1*	< 0,001

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento ± SD.

*Differenze ritenute significative dal CTRL (P < 0,05).

Tabella 14 - Area assoluta dei COV ottenuti da analisi HS-SPME-GC/MS dopo 6 h di incubazione in vitro di un inoculo fecale con una dieta di controllo addizionata di diversi supplementi nutrizionali¹.

	CTRL	MOS	CW	FOS	SB	CW + FOS	P-value
Idrogeno solfuro	6147±2680	6713±2372	8043±1084	7103±1137	6227±2471	7665±2488	0,896
Carbonio disolfuro	24100±9011	17756±8682	40447±928	30407±20258	31222±4675	38865±13091	0,277
Dimetil disolfuro	51670±31205	39161±28300	206360±3069**	105465±79456	83443±23020	191459±114523**	0,045
Dimetil trisolfuro	564911±468263	272853±394587	1775146±26171	1142480±786935	953094±475089	1471557±955379	0,141
Carbonio diossido	19766±14536	10535±9950	7211±0	15048±10771	12106±6182	12240±9430	0,788
Etanolo	332512±157017	394272±140864	364588±35343	244551±106908	334748±33048	328985±113530	0,720
Isopropanolo	18785±13994	24114±0	22150±9385	40541±15760**	10015±4702	11721±8816	0,043
1-Butanolo	594523±235454	710791±216437	737495±43166	592563±221926	710391±55168	710758±232982	0,897
Isobutanolo	46821±16766	33915±14209	54454±2454	39792±13560	42792±7182	48587±12403	0,549
Isopentanololo	731499±266639	596113±189487	873835±5666	649683±208228	770231±112390	799350±222634	0,640
1-Esanolo	209393±80160	191244±36448	259230±32501	183396±56324	204006±66352	191204±50602	0,768
n-Eptanolo	36156±12645	34533±2883	41528±9629	39998±15261	46855±5834	44788±10908	0,683
Alcol feniletilico	111069±11386	104043±7780	111195±34679	108495±18103	138670±26411	111916±22885	0,430
Acetone	29528±13088	22991±12475	39525±5768	30081±10268	33696±8045	34518±14251	0,687
Benzaldeide	36288±13088	27762±7704	35584±1250	36133±5011	34485±11376	31725±3798	0,775
Butanale, 2-metil-	15205±2467	15517±6047	16200±3318	15836±9400	14102±1531	15095±4430	0,998
Isopentanale	73458±7465	70592±15667	79285±6777	71534±34582	90239±38931	72684±11460	0,910
Esanale	26854±5599	15083±7634	29441±2304	27795±10051	27888±4035	24759±6316	0,207
Etil acetato	25155±5579	29891±15372	43612±3200	31563±19276	25791±3846	55965±26770	0,215
Acido acetico	70253±72876	89876±17205	54238±18104	280972±208778	304072±280534	144556±85199	0,309
Acido propionico	133307±91324	130926±36440	67225±20333	355154±238748	300791±240760	227819±107766	0,318
Acido isobutirrico	55494±28757	63713±14281	57457±15132	107779±54354	108236±51592	104894±12667	0,249
Acido butirrico	261259±255104	382931±109412	199355±62469	874088±487938	653214±464682	678161±295673	0,212
Acido isovalerico	135435±105384	125442±28277	84882±29563	372741±170388	274122±191325	348256±157412	0,121
Acido valerico	tracce	tracce	tracce	tracce	tracce	tracce	-
Fenolo	6445561±1231492	6082874±516662	6870098±907308	6644857±706596	7532419±1425764	6360997±1119772	0,639
Indolo	6043970±1048464	5751132±339018	6601372±648256	6053434±1156630	6961840±989276	6235337±1359162	0,741

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento ± SD .

* Differenze ritenute significative dal CTRL (P < 0,05).

** 0,10 < P > 0,05

Tabella 15 - Area relativa dei COV ottenuti da analisi HS-SPME-GC/MS dopo 6 h di incubazione in vitro di un inoculo fecale con una dieta di controllo addizionata di diversi supplementi nutrizionali¹.

	CTRL	MOS	CW	FOS	SB	CW + FOS	P-value
Idrogeno solfuro	0,037±0,010	0,043±0,013	0,045±0,010	0,040±0,008	0,030±0,011	0,043±0,010	0,652
Carbonio disolfuro	0,157±0,067	0,117±0,055	0,215±0,024	0,160±0,008	0,157±0,014	0,207±0,051	0,471
Dimetil disolfuro	0,317±0,158	0,257±0,187	1,110±0,115*	0,543±0,392	0,423±0,125	1,000±0,422*	0,018
Dimetil trisolfuro	3,467±2,624	1,793±2,596	9,545±0,985	5,923±3,621	4,860±2,404	7,637±3,857	0,113
Carbonio diossido	0,133±0,120	0,073±0,074	0,040±0	0,087±0,076	0,063±0,036	0,073±0,060	0,787
Etanolo	2,003±0,799	2,577±0,814	1,965±0,363	1,350±0,539	1,703±0,159	1,763±0,309	0,255
Isopropanolo	0,123±0,110	0,157±0,014	0,120±0,061	0,223±0,080	0,050±0,026	0,070±0,059	0,074
1-Butanolo	3,597±0,948	4,620±1,049	3,975±0,583	3,290±1,141	3,603±0,133	3,820±0,503	0,510
Isobutanolo	0,287±0,058	0,217±0,072	0,295±0,039	0,223±0,071	0,217±0,024	0,263±0,022	0,362
Isopentanolo	4,447±1,057	3,877±0,940	4,695±0,385	3,583±0,971	3,897±0,343	4,327±0,4	0,592
1-Esanolo	1,267±1,057	1,260±0,274	1,385±0,051	1,000±0,215	1,030±0,292	1,037±0,118	0,377
n-Eptanolo	0,223±0,040	0,227±0,003	0,220±0,032	0,217±0,068	0,240±0,025	0,243±0,039	0,951
Alcol feniletilico	0,693±0,071	0,687±0,072	0,585±0,133	0,610±0,128	0,697±0,095	0,613±0,051	0,585
Acetone	0,180±0,057	0,150±0,078	0,210±0,012	0,160±0,040	0,170±0,034	0,183±0,044	0,825
Benzaldeide	0,220±0,041	0,180±0,036	0,190±0,010	0,207±0,040	0,170±0,052	0,177±0,027	0,598
Butanale, 2-metil-	0,097±0,023	0,103±0,031	0,090±0,026	0,080±0,045	0,073±0,004	0,083±0,011	0,769
Isopentanale	0,460±0,039	0,460±0,068	0,430±0,074	0,387±0,162	0,457±0,185	0,400±0,067	0,940
Esanale	0,167±0,011	0,100±0,050	0,160±0,026	0,153±0,050	0,143±0,023	0,137±0,029	0,343
Etil acetato	0,157±0,011	0,193±0,082	0,235±0,038	0,167±0,097	0,127±0,013	0,297±0,085	0,091
Acido acetico	0,490±0,572	0,590±0,107	0,290±0,071	1,503±1,082	1,613±1,584	0,863±0,568	0,436
Acido propionico	0,883±0,725	0,857±0,223	0,355±0,077	1,910±1,223	1,587±1,372	1,337±0,751	0,464
Acido isobutirrico	0,367±0,249	0,427±0,126	0,305±0,054	0,580±0,254	0,560±0,301	0,597±0,162	0,543
Acido butirrico	1,830±2,016	2,500±0,574	1,060±0,241	4,697±2,389	3,427±2,663	3,963±1,112	0,356
Acido isovalerico	0,927±0,862	0,820±0,141	0,450±0,119	1,997±0,744	1,433±1,087	2,040±2,792	0,221
Acido valerico	tracce	tracce	tracce	tracce	tracce	tracce	-
Fenolo	39,943±2,155	39,920±1,034	36,705±1,608	37,150±5,255	38,053±5,364	34,877±0,244	0,527
Indolo	37,533±1,595	37,800±1,319	35,325±0,344	33,750±6,210	35,217±3,010	33,963±1,128	0,503

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento ± SD.

* Differenze ritenute significative dal CTRL ($P < 0,05$).

** $0,10 < P > 0,05$

Tabella 16 - Area assoluta dei COV ottenuti da analisi HS-SPME-GC/MS dopo 24 h di incubazione in vitro di un inoculo fecale con una dieta di controllo addizionata di diversi supplementi nutrizionali¹.

	CTRL	MOS	CW	FOS	SB	CW + FOS	P-value
Iidrogeno solfuro	7904±1804	8046±1967	7673±2654	7473±1599	7749±1499	8706±2306	0,980
Carbonio disolfuro	15544±6351	20580±14165	14538±10691	10720±4991	4254±1211	15662±11246	0,416
Dimetil solfuro	20274±22991	32575±31464	15929±2185	8400±8313	2222±1211	35053±28689	0,342
Dimetil disolfuro	327037±240243	431745±324169	275968±207539	213431±208540	111927±1325	313231±219636	0,627
Dimetil trisolfuro	1129989±734100	1388375±583026	1023534±681686	734533±593715	585829±34201	1103424±645247	0,625
Metilciclopentano	17069±12453	15827±9155	24664±16229	22734±24455	9645±91564	31707±22267	0,660
Carbonio diossido	16302±4955	15694±4897	5638±1528	10188±5818	8549±5633	11014±4030	0,141
Etanolo	202141±13234	237893±113914	230376±33053	148369±33936	83510±6916	142918±47875	0,054
Isopropanolo	13515±14277	9313±4310	11056±3373	13406±10836	5987±60090	12165±8659	0,877
Isobutanolo	58845±16504	49125±16431	60544±15502	40601±12436	30981±2966	39516±8211	0,143
n-Butanolo	905060±132842	994527±340963	952573±140775	607986±159243	438056±13865**	618620±168477	0,034
Isopentanolo	789779±88529	690558±189602	753019±62087	489497±123786**	374971±238733*	537315±133742	0,020
n-Pentanolo	33027±7951	31861±3860	28072±7169	24489±1219	15837±188232*	24401±8226	0,057
n-Esanolo	102189±15337	94041±25445	96171±7325	58593±15853*	51289±6280*	69595±15800	0,016
1-Eptanolo	28772±4959	25722±3013	23331±2614	18335±4362	17121±21181	23297±12626	0,334
Alcol feniletilico	89524±9066	96113±15536	130019±40560	77628±38433	58007±7311	86699±22658	0,109
Etil acetato	26344±3770	38967±17361	25302±11485	18982±3565	10606±21054	30428±11514	0,066
Propil acetato	112405±26615	191029±55108	122323±65538	73213±17369	48131±2875	120316±37118	0,017
Butil acetato	53579±13641	76178±32203	64012±42707	36755±18165	23984±14630	59618±26655	0,238
Acetone	12759±2553	11662±5415	10807±2541	7528±1286	5527±4810*	8604±1925	0,082
Isopentanale	8762±1497	14342±5737	9953±1742	7017±1676	5901±2097	7852±2753	0,047
Esanale	9643±4828	14511±2981	6459±2338	7628±2347	6848±1332	4326±1304	0,011
Acido acetico	192072±49892	250597±57331	189941±70222	134015±93539	84471±587	126986±69196	0,083
Acido propionico	255101±64935	346447±69216	283486±94557	207785±164855	118234±14984	186472±73648	0,115
Acido isobutirrico	97759±17287	130888±31937	116503±26217	74697±60511	44335±14642	75574±14085	0,054
Acido butirrico	600109±105237	925848±175277	703630±213838	485804±387580	274175±5499	398443±160280	0,030
Acido isovalerico	534866±75847	749401±159084	661004±186240	424439±350802	249704±37165	364597±77107	0,046
Acido valerico	20935±4503	38908±8637*	22556±7277	18676±8733	12136±4233	15991±6143	0,007
Fenolo	2901418±65798	3266908±189639	3947988±667648	2599002±758013	1561907±663569**	2556964±903378	0,011
Indolo	2519581±278093	2599018±283210	2932353±395438	1606673±278604	1414509±598225*	1822254±735238	0,009

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento ± SD.

* Differenze ritenute significative dal CTRL (P < 0,05).

** 0,10 < P > 0,05

Tabella 17 - Area relativa dei COV ottenuti da analisi HS-SPME-GC/MS dopo 24 h di incubazione in vitro di un inoculo fecale con una dieta di controllo addizionata di diversi supplementi nutrizionali¹.

	CTRL	MOS	CW	FOS	SB	CW + FOS	P-value
Idrogeno solfuro	0,07±0,02	0,06±0,02	0,06±0,02	0,09±0,02	0,15±0,08	0,11±0,06	0,132
Carbonio disolfuro	0,14±0,04	0,16±0,09	0,12±0,08	0,13±0,06	0,08±0,01	0,16±0,10	0,729
Dimetil solfuro	0,17±0,18	0,24±0,22	0,12±0,01	0,11±0,10	0,04±0,02	0,34±0,27	0,336
Dimetil disolfuro	2,84±1,83	3,25±2,17	2,16±1,54	2,63±2,61	2,11±0,77	3,20±1,89	0,955
Dimetil trisolfuro	9,88±5,49	10,7±3,51	8,07±5,20	9,11±7,38	11,2±3,77	11,7±4,87	0,956
Metilciclopentano	0,15±0,10	0,12±0,06	0,20±0,13	0,29±0,30	0,21±0,19	0,32±0,19	0,707
Carbonio diossido	0,15±0,03	0,12±0,03	0,04±0,01	0,14±0,12	0,13±0,07	0,12±0,02	0,392
Etanolo	1,84±0,22	1,82±0,74	1,83±0,39	1,84±0,15	1,35±0,55	1,60±0,09	0,671
Isopropanolo	0,13±0,14	0,07±0,04	0,09±0,03	0,16±0,09	0,13±0,09	0,14±0,09	0,838
Isobutanolo	0,54±0,19	0,38±0,09	0,48±0,14	0,50±0,08	0,54±0,07	0,47±0,11	0,599
n-Butanolo	8,27±1,77	7,66±1,98	7,53±1,35	7,49±0,45	7,39±1,59	7,07±0,56	0,938
Isopentanolo	7,21±1,36	5,34±0,99	5,97±0,97	6,02±0,37	6,36±1,15	6,16±0,48	0,356
n-Pentanolo	0,30±0,10	0,25±0,03	0,23±0,08	0,32±0,09	0,27±0,03	0,27±0,02	0,588
n-Esanolo	0,94±0,22	0,73±0,15	0,76±0,09	0,72±0,11	0,89±0,07	0,80±0,11	0,312
1-Eptanolo	0,26±0,03	0,20±0,01	0,18±0,02	0,23±0,06	0,31±0,11	0,25±0,08	0,238
Alcol feniletilico	0,82±0,15	0,76±0,17	1,01±0,27	0,92±0,22	1,02±0,08	0,99±0,10	0,390
Etil acetato	0,24±0,03	0,30±0,11	0,21±0,12	0,24±0,03	0,19±0,02	0,34±0,04	0,142
Propil acetato	1,01±0,15	1,48±0,30	1,00±0,63	0,90±0,08	0,86±0,07	1,36±0,01	0,114
Butil acetato	0,48±0,08	0,58±0,19	0,52±0,40	0,44±0,19	0,44±0,09	0,65±0,13	0,794
Acetone	0,12±0,03	0,09±0,03	0,09±0,03	0,09±0,01	0,10±0,02	0,10±0,01	0,713
Isopentanale	0,08±0,02	0,11±0,05	0,08±0,02	0,09±0,01	0,11±0,04	0,09±0,02	0,582
Esanale	0,09±0,05	0,12±0,03	0,05±0,02	0,09±0,02	0,13±0,06	0,05±0,02	0,107
Acido acetico	1,74±0,45	1,99±0,60	1,49±0,51	1,53±0,64	1,57±0,36	1,74±1,56	0,970
Acido propionico	2,31±0,63	2,75±0,77	2,21±0,63	2,35±1,22	2,22±0,58	2,45±1,80	0,987
Acido isobutirrico	0,89±0,21	1,04±0,34	0,91±0,13	0,83±0,45	0,86±0,38	0,92±0,35	0,976
Acido butirrico	5,45±1,10	7,35±1,96	5,46±1,34	5,45±2,84	5,09±1,10	5,26±3,92	0,842
Acido isovalerico	4,86±0,87	5,96±1,73	5,14±1,15	4,74±2,62	4,55±0,69	4,59±2,47	0,921
Acido valerico	0,19±0,06	0,31±0,09	0,18±0,05	0,22±0,04	0,22±0,07	0,19±0,08	0,226
Fenolo	26,3±2,33	25,6±1,28	30,9±3,14	32,1±4,67	27,0±2,45	28,5±1,86	0,088
Indolo	22,7±1,01	20,5±3,75	22,9±0,85	20,2±3,80	24,5±2,16	20,0±2,76	0,288

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento.

* Differenze ritenute significative dal CTRL (P < 0,05).

** 0,10 < P > 0,05

Tabella 18 - Concentrazione di amine biogene ($\mu\text{mol/L}$) dopo 6 e 24 h di incubazione in vitro di un inoculo fecale con una dieta di controllo addizionata di diversi supplementi nutrizionali¹.

6 ore	CTRL	MOS	CW	FOS	SB	CW + FOS	P-value	pooled SEM
Putrescina	666±109	618±59,6	655±105,5	556±83,1	640±50,7	688±55,7	0,189	36,1
Cadaverina	82,5±5,6	84,9±2	88,1±2,2	90,4±4,8*	95,5±2,4**	101±7,7**	<0,001	2,07
Spermidina	59,9±10,4	57,2±9,4	62,8±12,2	54,4±13,6	69,0±11	83,2±5,7	0,004	4,78
Spermina	8,80±0,6	8,86±1,6	7,86±1,6	7,80±2,1	8,16±0,6	8,94±1,3	0,625	0,62

24 ore	CTRL	MOS	CW	FOS	SB	CW + FOS	P-value	pooled SEM
Putrescina	792±77,6	799±61,2	808±122,2	779±47,2	764±94,3	934±86*	0,050	37,9
Cadaverina	87,4±4,4	109±21,1	112±11,8	116±24,4*	112±6,1	117±4,6*	0,037	6,48
Spermidina	73,8±4,8	78,5±18,5	77,3±8,4	84,4±11,3	87,0±5,2	113±17,4**	<0,001	5,45
Spermina	6,76±0,6	7,08±0,5	7,72±0,6	8,90±1*	8,46±0,6	11,5±2,4**	<0,001	0,52

¹ I valori si riferiscono alla media di cinque bottiglie per trattamento \pm SD.

* Differenze ritenute significative dal CTRL (P < 0,05).

** Differenze ritenute significative dal CTRL (P < 0,01).

5.1.3. Discussione

Sulla base dei risultati ottenuti nel corso di questa prova *in vitro* è possibile esprimere alcune considerazioni sull'effetto che i supplementi nutrizionali testati hanno esercitato sul microbiota fecale dei cani donatori.

Si è osservata una diminuzione del pH del liquido di fermentazione a 6 e 24 ore dopo il termine della prova, nei gruppi FOS e CW + FOS. Il lievito *S. Boulardii* e l'estratto di parete di lievito hanno prodotto una riduzione significativa del pH degli inoculi solo nelle prime 6 ore.

La riduzione del pH a livello intestinale è desiderabile, in quanto contribuisce a contrastare lo sviluppo di specie batteriche con potenziale patogeno (McQuaid, 2005). La riduzione del pH negli inoculi fecali è stata mantenuta durante tutta la fase fermentativa solo nei trattamenti contenenti frutto-oligosaccaridi, da soli ed in associazione all'estratto di parete di lievito. La riduzione del pH in inoculi fecali di cane da parte di FOS è stata osservata in precedenza anche da Biagi *et al.* (2010). È noto come la fermentazione dei carboidrati esiti nella formazione di AGV ed acido lattico, che contribuiscono a ridurre il pH del lume intestinale, inducendo anche uno shift da ammoniacale a ione ammonio e limitandone l'assorbimento dalla mucosa intestinale (McQuaid, 2005; Gibson *et al.*, 2007).

Per quanto concerne la produzione di AGV, si è assistito, al termine delle 24 ore di fermentazione, ad un decremento degli stessi in tutti i trattamenti; a tal proposito sembra pertanto che i substrati testati abbiano sortito un effetto antibatterico, evidenziabile dalla riduzione di questi metaboliti derivanti dal metabolismo batterico.

Il potenziale antibatterico e di modulatore intestinale di *S. boulardii* è noto (Sanders e Tribble, 2001; McFarland, 2006; Zanello *et al.*, 2009; Morè e Swidsinski, 2015), sorprende invece la riduzione dell'attività batterica esercitata dai FOS, che sono substrati comunemente utilizzati dai batteri a fini trofici e che in genere stimolano un aumento della produzione di metaboliti batterici.

Diversamente, al termine della fermentazione, la concentrazione degli isoacidi, che sono metaboliti risultanti dal processo di deaminazione di valina, isoleucina e leucina, è risultata fortemente diminuita in tutti gli inoculi fecali, e ciò potrebbe significare una minor attività compiuta ad opera dei batteri proteolitici; tuttavia, una diminuzione dei processi proteolitici non può del tutto essere confermata a causa della mancata riduzione delle concentrazioni di ammoniacale, che è il principale metabolita che origina dalla degradazione batterica di substrati proteici.

I risultati ottenuti con la qPCR indicano che tutte le popolazioni batteriche fecali esaminate sono risultate aumentate dopo 24 ore di fermentazione, in presenza di tutti i substrati testati, eccezion fatta per i MOS. Tale aumento riguarda sia popolazioni batteriche considerate virtuose, come lattobacilli e bifidobatteri, che batteri il cui aumento risulta indesiderato, per il possibile ruolo patogeno (ad esempio *C. perfringens* ed *E. coli*); questa crescita batterica totale risulta di non facile comprensione, in virtù del fatto che batteri saccarolitici (quelli per cui si cerca di stimolarne l'attività mediante la somministrazione di substrati fermentescibili) tendono ad acidificare l'ambiente intestinale, creando un ambiente intestinale sfavorevole alla crescita di batteri a metabolismo proteolitico.

L'area assoluta dei picchi cromatografici dei COV ottenuta mediante analisi HS-SPME-GC/MS eseguita sugli inoculi fecali dopo 6 ore di incubazione, rispetto a quanto misurato nel CTRL, ha evidenziato un aumento significativo del dimetil-disolfuro, negli inoculi fecali contenenti CW e l'associazione CW + FOS. Il dimetil-disolfuro è un composto volatile che deriva dal catabolismo degli aminoacidi solforati; sebbene in questo studio i composti solforati rilevati costituissero rispettivamente solo il 6,49% ed il 13,3% dell'area totale dei COV dopo 6 e 24 h di incubazione, la loro presenza è comunque ritenuta responsabile dell'odore sgradevole delle feci.

La minor produzione di acetone e alcoli (*n*-butanolo, isopentanololo, *n*-pentanololo e *n*-esanololo) riscontrata negli inoculi fecali fermentati con SB sembra suggerire un'azione antibatterica esercitata dal lievito testato; infatti, l'acetone deriva dal catabolismo microbico degli acidi grassi, mentre gli alcoli si formano probabilmente durante la fermentazione batterica di glucosio, o di acidi organici (de Lacy Costello *et al.*, 2014).

In aggiunta, il trattamento con SB ha portato ad una riduzione della formazione di fenolo ed indolo, metaboliti di esclusiva derivazione batterica, che si formano durante il catabolismo di aminoacidi aromatici (tirosina, fenilalanina e triptofano), e vengono anche utilizzati come markers per stimare l'entità delle fermentazioni proteolitiche che avvengono nel colon (Geypens *et al.*, 1997). Tuttavia, i composti fenolici ed indolici sembrano agire, nell'uomo, come sostanze cancerogene a livello di colon; in tal senso, il fenolo sembra fungere da co-carcinogenetico, stimolando la formazione di amine secondarie (dimetilamina) a partire dai nitriti, mentre l'indolo, che deriva dalla degradazione batterica del triptofano, non sembra avere una diretta azione mutagenica. Favorisce invece la reazione di nitrosazione delle amine

secondarie, da cui si originano composti cancerogeni detti nitrosamine (Nowak e Libudzisz, 2006).

Recentemente, Berstad *et al.* (2015) hanno descritto alcune funzioni positive che l'indolo sembra esercitare nell'intestino dell'ospite. Infatti, oltre a costituire uno dei principali responsabili del cattivo odore fecale, studi condotti in vitro su colture cellulari di epitelio intestinale di uomo evidenziano come tale composto sia in grado di rinforzare la mucosa intestinale, migliorandone la funzione di barriera (che può risultare compromessa a seguito di patologie parassitarie e a carattere infiammatorio, come la sindrome dell'intestino irritabile). Infine, i risultati ottenuti dall'analisi dei COV hanno confermato la riduzione operata da SB al termine della fermentazione (prelievo delle 24 ore) nei confronti della concentrazione di metaboliti derivanti dal metabolismo batterico, sostenendo la tesi di un potenziale ruolo antibatterico di SB; alla luce di ciò non è tuttavia semplice motivare l'aumento di tutte le popolazioni batteriche selezionate sortite dai trattamenti con SB al termine delle 24 ore di fermentazione.

5.2. Sperimentazione *in vivo*

5.2.1. Materiali e metodi

La sperimentazione *in vivo* è stata condotta avvalendosi di 16 cani adulti e in buono stato di salute, regolarmente vaccinati e sottoposti a trattamento antiparassitario (Drontal Plus, Bayer S.p.A., Milano, Italia), di età compresa tra 1 e 8 anni e di peso corporeo medio di 17,4 kg. Tutti i soggetti in prova non avevano manifestato problematiche di tipo gastroenterico e non avevano assunto sostanze antibiotiche nel mese precedente l'inizio della sperimentazione. Gli animali, di proprietà di privati, durante la prova hanno continuato a vivere presso la propria abitazione.

Gli animali sono stati alimentati con la stessa dieta commerciale secca di mantenimento per cani adulti, precedentemente descritta nella prova *in vitro*.

La quantità di alimento che ciascun cane ha ricevuto giornalmente è stata calcolata individualmente sulla base dei fabbisogni energetici dell'animale, che sono stati calcolati secondo la seguente equazione:

$$EM \text{ (kcal al giorno)} = 132 \times \text{kg peso corporeo}^{0,75} \text{ (NRC, 2006)}$$

attribuendo alla dieta, secondo i fattori di Atwater modificati per il cane, 3,5 kcal per grammo di proteine e amido e 8,5 kcal per grammo di lipidi.

Sono stati testati i 3 trattamenti (MOS, CW e SB), precedentemente descritti nella prova *in vitro*, addizionati alla dieta in misura di: MOS (2g/kg di alimento); CW (0,8g/kg di alimento); SB (0,1g/kg di alimento).

I cani impiegati in questo studio sono stati suddivisi in due gruppi da 8 soggetti ciascuno:

gruppo CTRL= 8 cani che hanno assunto la sola dieta per tutta la durata della prova.

gruppo trattato= 8 cani che hanno ricevuto la dieta in associazione ai 3 trattamenti (MOS, CW e SB).

Di seguito viene presentato il disegno sperimentale:

per 28 giorni tutti gli animali hanno assunto la sola dieta (periodo di adattamento); in seguito, per 28 giorni (1° fase di trattamento) il gruppo CTRL ha ricevuto la sola dieta, mentre il gruppo trattato ha ricevuto la dieta addizionata di MOS. Per i successivi 28 giorni (2° fase di trattamento) il gruppo CTRL ha ricevuto la sola dieta, mentre il gruppo trattato ha ricevuto la dieta addizionata di CW. Infine, per ulteriori 28 giorni (3° fase di trattamento) il gruppo CTRL ha ricevuto la sola dieta, mentre il gruppo trattato ha ricevuto la dieta addizionata di SB. Fra

ciascuna fase di trattamento i cani del gruppo trattato hanno effettuato un periodo di wash-out di 14 giorni, ricevendo la sola dieta, senza l'aggiunta di trattamenti, così come il gruppo CTRL.

Da ogni animale è stato raccolto un campione di feci nei giorni 0, 21, 28 di ciascuna fase di trattamento.

I campioni fecali sono stati raccolti in appositi contenitori sterili e congelati entro 15 minuti dalla loro escrezione.

Sui campioni di feci sono state svolte analisi chimiche (pH, ammoniaca, AGV e principali COV) e microbiologiche per la determinazione delle principali popolazioni batteriche.

5.2.1.1. *Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni*

Il pH è stato determinato solubilizzando una quantità nota di campione fecale in acqua distillata (diluizione 1:10 p/v); il dato è stato ricavato dalla media aritmetica di due letture ripetute per ciascun campione, eseguite mediante strumento pHmetro Seven Multi (Mettler Toledo, Milano, Italia).

L'ammoniaca è stata determinata mediante l'impiego di un apposito kit commerciale (Urea/BUN-Color, BioSystem S.A., Barcellona, Spagna). Gli acidi grassi volatili sono stati determinati mediante gascromatografia, secondo la metodica descritta da Biagi *et al.* (2006).

La separazione dei diversi acidi grassi volatili è stata realizzata utilizzando una colonna impaccata 80/120 Carbopack B-DA/4% CW 2M (Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

L'analisi gascromatografica è stata condotta utilizzando un gascromatografo Varian 3400 (Varian Analytical Instruments, Sunnyvale, CA, USA). L'acido 3-metil-butirrico è stato aggiunto in qualità di standard interno.

I composti organici volatili sono stati determinati mediante HS-SPME GC/MS, secondo la metodica descritta da Pinna *et al.* (2017).

Per la caratterizzazione della popolazione microbica intestinale, il DNA batterico è stato estratto dai campioni fecali mediante un apposito kit commerciale (Stool DNA Isolation Kit, Norgen Biotek Corp., ON, Canada), seguendo il protocollo del produttore. La concentrazione e la purezza del DNA estratto sono state misurate mediante spettrofotometro (DeNovix DS-11 spectrophotometer, DeNovix, Wilmington, DE, USA); si è quindi proceduto ad uniformare tutti i campioni alla medesima concentrazione di DNA (50 ng/μl).

Le analisi microbiologiche hanno indagato le popolazioni batteriche su diversi livelli filogenetici (batteri totali; *phyla* Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria; generi

Bifidobacterium spp., *Lactobacillus* spp.; specie *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli*). Le popolazioni batteriche sono state quantificate mediante qPCR attraverso l'uso di primers specifici (Tabella 19). L'amplificazione e la quantificazione del DNA genomico sono state eseguite mediante termociclatore CFX96 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). L'amplificazione è stata eseguita in duplicato per ciascun gruppo batterico; il protocollo è stato ottimizzato per un volume di reazione di 15 µl, contenente 7,5 µl di 2X SensiFAST No-ROX PCR Master Mix (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany), 4,8 µl di acqua nuclease free, 0,6 µl di ciascun primer (concentrazione di 10 pmol) e 1,5 µl di DNA genomico.

Il ciclo di amplificazione è stato il seguente: denaturazione a 95°C per 2 min, 95°C per 5 s, appaiamento dei primers a 51–60°C per 10 s ed estensione a 72°C per 8 s. Il ciclo è stato ripetuto 40 volte.

Tabella 19 - Primers utilizzati nell'esecuzione della qPCR

Target	Primer	Sequenza	Temp. di annealing (°C)	Fonte
Firmicutes	Firm350f Firm814r	GGCAGCAGTRGGGAATCTTC ACACYTAGYACTCATCGTTT	60	Muhling <i>et al.</i> , 2008
<i>Cl. perfringens</i>	CPerf165F CPerf269R	CGCATAACGTTGAAAGATGG CCTTGGTAGGCCGTTACCC	58	Wise e Siragusa, 2005
Total bacteria	UniF UniR	CCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	59	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
Bacteroidetes	CFB555f CFB968r	CCGGAWTYATTGGGTTTAAAGGG GGTAAGGTTCTCGCGTA	60	Muhling <i>et al.</i> , 2008
Fusobacteria	Fuso-F Fuso-R	KGGGCTCAACMCMGTATTGCGT TCGCGTTAGCTTGGGCGCTG	51	Suchodolski <i>et al.</i> , 2012a
<i>Lactobacillus</i>	LacF LacR	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	58	Malinen <i>et al.</i> , 2005
<i>Bifidobacterium</i>	BifF BifR	TCGCGTCYGGTGTGAAAG CCACATCCAGCRTCCAC	60	Rinttilä <i>et al.</i> , 2004
<i>E. coli</i>	E coli Fw E coli Rv	GTTAATACCTTTGCTCATTGA ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60	Malinen <i>et al.</i> , 2003

5.2.1.2. Analisi statistica dei dati

I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA ad una via, con test di Dunnett come post-test. Le differenze sono state ritenute significative per $P < 0,05$. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Statistica 10.0 (Stat Soft Italia, Padova, Italia).

5.2.2. Risultati e Discussione

Tutti i 16 soggetti inclusi sono giunti al termine della sperimentazione senza manifestare alcuna problematica di tipo gastrointestinale.

Nella Tabella 20 vengono riportati i valori di pH fecale, nonché le concentrazioni di ammoniaca e di acidi grassi volatili riscontrati nei campioni fecali prelevati. Per quanto riguarda i primi due parametri, non si sono riscontrate variazioni significative di pH e concentrazione di ammoniaca nei campioni fecali dei cani riceventi i trattamenti rispetto a quelli del gruppo di CTRL.

Relativamente alla concentrazione di AGV nelle feci, i risultati di questo studio *in vivo* non hanno confermato quanto era stato precedentemente osservato nella prova *in vitro*; infatti, le concentrazioni AGV fecali non hanno mostrato variazioni significative fra i diversi trattamenti, con la sola eccezione dell'acido acetico che è risultato significativamente aumentato (+24,8%; $P < 0,05$) nei soggetti trattati con MOS.

Le concentrazioni di AGV che si riscontrano nel chimo intestinale variano lungo i diversi tratti enterici poiché questi metaboliti vengono rapidamente assorbiti dalla mucosa intestinale (Stevens e Hume, 1998; Romero-Gómez *et al.*, 2009): infatti, secondo Topping e Clifton (2001), di tutti gli acidi grassi volatili derivanti dalle fermentazioni batteriche in intestino solamente il 5% può essere determinato nelle feci. Questa considerazione può spiegare le discrepanze tra i diversi risultati ottenuti fra i due diversi studi.

In Tabella 21 sono riportati i valori relativi alla numerosità dei batteri totali e delle singole popolazioni prese in esame, che non hanno mostrato alcuna variazione statisticamente significativa fra i gruppi di cani trattati con MOS, CW e SB.

In un precedente studio di Swanson *et al.* (2002a), i MOS erano stati somministrati a cani adulti sani, di peso medio pari a 22,5 kg, nella misura di 1g/giorno, risultando in una riduzione di batteri aerobi totali e una tendenza alla riduzione di lattobacilli fecali; *Bifidobacterium* spp. e *Cl. perfringens* erano rimasti invariati, a differenza di quanto riportato da Strickling *et al.* (2000) che con la somministrazione di MOS (5g/kg di dieta) avevano evidenziato una tendenza alla riduzione di *Cl. perfringens* rispetto a soggetti trattati con XOS e FOS.

Nello studio di Swanson *et al.* (2002c), i bifidobatteri ed i lattobacilli fecali in cani adulti sani aumentarono a seguito della supplementazione con FOS (2g/giorno) e MOS (1g/giorno); l'aumento della concentrazione di bifidobatteri fecali a seguito della supplementazione di una

dieta a base di carne cruda con MOS (14g/kg di dieta) fu riportata anche da Beloshapka *et al.* (2013).

In questa sperimentazione i MOS sono stati testati in cani sani a dosaggi inferiori rispetto ai lavori precedentemente descritti, e sono state riscontrate concentrazioni fecali molto basse di lattobacilli e bifidobatteri, come precedentemente descritto nel corso di prove con cani adulti anche da altri autori (Willard *et al.* 2000, Greetham *et al.* 2002, Apanavicius *et al.* 2007, Lamendella *et al.* 2008).

Valutazioni comparative dei risultati ottenuti nei diversi studi *in vivo* sul microbiota intestinale del cane non sono semplici, per il fatto che ogni cane ne possiede uno proprio, determinato da caratteristiche sia intrinseche, quali specie, razza, età, tipo di alimentazione, che estrinseche (fra cui l'ambiente circostante); inoltre, le diverse metodologie utilizzate per identificare e quantificare il microbiota contribuiscono all'eterogeneità dei dati ottenuti (Suchodolski, 2011).

L'area assoluta dei COV ottenuta mediante analisi HS-SPME-GC/MS eseguita sui campioni di feci dei cani riceventi i trattamenti sono descritti nella Tabella 22.

Il dimetil-trisulfide rientra fra i metaboliti derivanti dal catabolismo di alcuni composti solforati da parte di batteri anaerobi (Hussein e Sunvold, 2000), e comunemente viene evidenziato nelle feci (Garner *et al.*, 2007); questo composto volatile è risultato aumentato nei cani trattati con SB (+217%; $P < 0,05$). Questo metabolita costituisce la forma metilata del solfuro di idrogeno (H_2S), che rappresenta il principale prodotto del catabolismo della cisteina ad opera di batteri solfatoriduttori e che per la sua azione tossica viene metilato dalle cellule epiteliali del colon (e si ipotizza anche da alcuni batteri) (Weiseger *et al.* 1980; Roediger *et al.* 1993). Infatti, elevate concentrazioni di H_2S sono state associate, nell'uomo, a mutazioni del DNA genomico (Attene-Ramos *et al.*, 2007; 2010) e all'insorgenza di stati infiammatori dovuti ad un'alterazione dell'effetto barriera dei colonociti (Pitcher e Cummings, 1996).

I composti solforati rientrano inoltre fra i principali responsabili del cattivo odore fecale (basti pensare che 6 fra i 10 composti situati appena sopra la soglia minima di percezione umana contengono zolfo) (Hesta *et al.*, 2005).

I composti volatili appartenenti ai gruppi dei chetoni e degli alcoli hanno evidenziato un andamento crescente nei gruppi trattati con i supplementi nutrizionali, ad indicare una possibile crescita dell'attività batterica intestinale; i chetoni derivano infatti dal catabolismo

microbico degli acidi grassi, mentre gli alcoli dalla fermentazione di glucosio e acidi organici (de Lacy Costello *et al.*, 2014).

Più precisamente, i MOS hanno portato ad un aumento del 3-octanone (+367%; $P < 0,01$) ed un aumento del 2-esadecanolo (+106%; $P < 0,05$) e dell'alcol-*n*-pentilico (+157%; $P < 0,01$); CW ha aumentato la concentrazione di metil-propil-dichetone (+835%; $P < 0,001$) e dell'alcol isobutilico (+83%; $P < 0,05$). SB ha indotto un aumento di 2-octanone (+92%; $P < 0,001$), acetone (+132%; $P < 0,001$) e una tendenza all'aumento dell'alcol benzilico (+47%; $0,10 < P > 0,05$).

Per quanto riguarda i COV ascrivibili al gruppo delle aldeidi, CW ha indotto un aumento di acetaldeide (+250%; $P < 0,05$), mentre il trattamento con SB ha ridotto significativamente la concentrazione di butiraldeide (-80%; $P < 0,05$). Alcune aldeidi sono di origine dietetica (ad esempio 2- e 3-metil-propanaldeide, *n*-nonaldeide e benzaldeide si trovano nella patata, mentre *n*-esanaldeide anche nella carota), ma risulta improbabile che questi composti non subiscano alterazioni a livello intestinale e si ritiene più probabile che nelle feci vengano identificate aldeidi biosintetizzate dai microrganismi batterici (per ossidazione di acidi grassi insaturi) (Garner *et al.*, 2007).

L'acetaldeide si ritrova comunemente nelle feci dell'uomo, e a causa del suo potere mutageno, è ritenuta coinvolta nella patogenesi del tumore dell'intestino (de Lacy Costello *et al.*, 2014).

Tabella 20 - Valori di pH, concentrazioni di ammoniaca e acidi grassi volatili (AGV) ($\mu\text{mol/g}$ di feci) nelle feci di cani riceventi i trattamenti MOS, CW e SB per 28 giorni¹.

		CTRL	MOS	CW	SB	P-value	pooled SEM
pH		6,68±0,1	6,70±0,1	6,61±0,6	6,46±0,8	0,257	0,09
ammoniaca	$\mu\text{mol/g}$	37,2±17,9	36,1±8,1	38,5±8,7	35,1±5,1	0,941	3,96
A. acetico	$\mu\text{mol/g}$	63,7±1730	79,5±9,0*	57,0±11,8	55,7±11,8	0,017	5,35
A. propionico	$\mu\text{mol/g}$	40,3±13,6	46,2±2,37	34,8±6,48	35,1±11,6	0,214	4,17
A. isobutirrico	$\mu\text{mol/g}$	2,10±1,1	2,33±0,23	1,76±0,47	1,74±0,44	0,432	0,30
A. butirrico	$\mu\text{mol/g}$	11,1±4	12,3±1,21	10,6±1,63	9,81±1,89	0,555	1,18
A. isovalerico	$\mu\text{mol/g}$	3,08±1,42	3,31±0,67	2,70±0,69	2,58±0,75	0,588	0,43
AGV totali	$\mu\text{mol/g}$	120,3±34,33	143,6±144	106,9±18,22	104,9±24,82	0,061	10,5

¹ I valori si riferiscono alla media dei soggetti trattati (N=8) ± SD.

*Differenze ritenute significative dal CTRL (P<0,05).

Tabella 21 - Popolazioni batteriche (Log 16S DNA copie/g di feci) nelle feci di cani riceventi i trattamenti MOS, CW e SB per 28 giorni¹.

	CTRL	MOS	CW	SB	<i>P-value</i>	<i>pooled SEM</i>
Batteri totali	9,93±0,98	9,78±0,76	9,85±0,97	9,73±1,03	0,948	0,34
Firmicutes	7,53±1,01	7,15±0,99	7,56±0,95	7,66±0,89	0,766	0,35
Bacteroidetes	8,01±1,74	8,01±1,25	8,05±1,88	7,88±1,86	0,997	0,61
Fusobacteria	7,73±1,07	7,58±0,79	7,79±1,26	7,80±1,07	0,977	0,38
<i>Bifidobacterium</i> spp.	3,21±1,28	2,53±1,54	3,88±1,18	3,85±0,77	0,128	0,44
<i>Lactobacillus</i> spp.	3,51±2,17	3,40±1,72	3,04±1,16	2,18±1,44	0,420	0,68
<i>Clostridium perfringens</i>	5,12±1,75	5,33±1,62	5,42±1,47	4,97±1,88	0,946	0,61
<i>Escherichia coli</i>	3,84±1,58	3,92±1,13	4,07±1,15	4,11±1,00	0,953	0,50

¹ I valori si riferiscono alla media dei soggetti trattati (N=8) ± SD.

Tabella 22 - Area assoluta dei COV ottenuti da analisi HS-SPME-GC/MS da feci di cani riceventi i trattamenti MOS, CW e SB per 28 giorni¹.

		CTRL	MOS	CW	SB	P-value
Aldeide	2-Furaldeide	6,6E+04±4,32E+04	8,0E+04±3,52E+04	3,2E+04±8,01E+03*	6,9E+04±2,14E+04	0,073
	Acetaldeide	7,5E+04±3,11E+04	7,0E+04±1,19E+04	2,6E+05±4,62E+05 ^a	8,8E+04±4,20E+04	0,067
	Benzaldeide	5,0E+05±4,57E+05	4,1E+05±1,31E+05	3,9E+05±1,75E+05	6,3E+05±3,08E+05	0,660
	Benzeneacetaldeide	1,3E+05±59265,2	1,2E+05±36635,8	1,3E+05±61806,2	2,0E+05±104352,7*	0,129
	Butiraldeide	6,6E+05±5,59E+05	6,5E+05±4,00E+05	3,2E+05±1,17E+05	1,3E+05 ±8,48E+04 ^a	0,041
	Butiraldeide, 2-metil-	1,1E+05±8,83E+04	9,1E+04±3,61E+04	1,1E+05±4,09E+04	1,7E+05±1,30E+05	0,414
	Caproaldeide	2,1E+05±2,17E+05	2,0E+05±1,39E+05	2,0E+05±2,08E+05	2,3E+05±1,37E+05	0,996
	Crotonaldeide, 2-metil-	9,2E+04±1,45E+05	1,5E+05±7,12E+04	1,7E+05±1,82E+05	9,7E+04±8,09E+04	0,504
	Isovaleraldeide	1,8E+05±1,32E+05	1,5E+05±4,39E+04	1,8E+05±6,76E+04	2,9E+05±2,15E+05	0,236
	n-Caprilaldeide	4,2E+04±4,37E+04	3,2E+04±2,70E+04	2,5E+04±2,07E+04	4,9E+04±2,47E+04	0,597
	n-Decaldeide	3,3E+04±4,59E+04	2,8E+04±2,17E+04	2,8E+04±9,89E+03	4,9E+04±5,38E+04	0,778
	n-Eptaldeide	4,2E+04±4,82E+04	6,2E+04±6,39E+04	4,4E+04±5,22E+04	3,9E+04±2,60E+04	0,786
	n-Nonaldeide	6,9E+04±6,86E+04	6,1E+04±5,30E+04	4,8E+04±3,76E+04	9,1E+04±5,93E+04	0,632
	Chetoni	2-Butanone	1,7E+05±1,42E+05	1,3E+05±4,33E+04	1,8E+05±9,01E+04	2,6E+05±1,01E+05
2-Decanone		5,2E+04±5,31E+04	4,6E+04±1,04E+04	3,5E+04±2,64E+04	3,4E+04±1,59E+04	0,670
2-Dodecanone		5,8E+04±3,22E+04	6,7E+04±2,66E+04	6,0E+04±3,57E+04	8,2E+04±8,05E+04	0,596
2-Eptanone		3,4E+04±1,98E+04	2,5E+04±1,51E+04	3,1E+04±1,22E+04	3,6E+04±1,20E+04	0,601
2-Nonanone		2,6E+04±2,62E+04	2,4E+04±6,87E+03	2,5E+04±5,30E+03	3,2E+04±1,68E+04	0,912
2-Octanone		2,2E+04±1,29E+04	2,3E+04±8,26E+03	2,0E+04±8,26E+03	4,3E+04 ±8,62E+03 ^c	0,002
2-Pentanone		2,9E+05±2,77E+05	2,7E+05±9,71E+04	3,2E+05±7,70E+04	3,0E+05±7,64E+04	0,973
3-Octanone		7,0E+04±6,37E+04	3,3E+05±5,24E+05 ^b	7,7E+04±9,58E+04	6,6E+04±3,73E+04	0,021
4-Nonanone		3,4E+04±5,69E+04	2,5E+04±1,47E+04	3,2E+04±3,60E+04	6,5E+04±6,71E+04	0,528
4-Undecanone		2,5E+06±5,84E+05	1,6E+06±7,09E+05	2,4E+06±1,01E+06	2,1E+06±1,03E+06	0,914
5-Epta-2-one, 6-metil-		3,5E+04±2,06E+04	3,1E+04±1,45E+04	3,3E+04±1,75E+04	3,6E+04±2,42E+04	0,950
Acetone		2,6E+05±1,63E+05	2,2E+05±5,39E+04	3,6E+05±2,53E+05	6,0E+05±2,40E+05 ^c	0,001
Esilico propilico chetone		1,9E+05±5,44E+05	2,4E+05±1,98E+05	7,4E+04±3,45E+04	6,9E+04±5,35E+04	0,804

	Metilico nonilico chetone	3,9E+04±2,14E+04	4,1E+04±1,26E+04	3,9E+04±1,77E+04	4,2E+04±1,46E+04	0,982
	Metilico propilico dichetone	1,7E+05±1,83E+05	1,5E+05±7,55E+04	1,6E+06±2,13E+06 ^c	2,0E+05±1,10E+05	0,001
Alcoli	1-Eptanolo	8,4E+04±5,95E+04	1,0E+05±7,67E+04	8,5E+04±3,37E+04	8,2E+04±4,33E+04	0,890
	1-Esanolo	3,8E+05±1,66E+05	4,1E+05±3,17E+05	3,4E+05±1,83E+05	3,6E+05±1,55E+05	0,955
	2-Esadecanolo	4,4E+04±3,61E+04	9,1E+04±1,51E+04 ^a	3,2E+04±4,01E+04	2,7E+04±3,93E+04	0,015
	2-Nonanolo	3,8E+06±3,63E+06	4,3E+06±1,82E+06	3,8E+06±2,02E+06	3,8E+06±2,21E+06	0,978
	Amilico vinilico carbinolo	1,6E+05±1,77E+05	1,9E+05±8,77E+04	1,5E+05±9,09E+04	1,4E+05±1,31E+05	0,821
	Alcol benzilico	3,2E+04±1,43E+04	4,1E+04±1,27E+04	3,3E+04±1,39E+04	4,7E+04±2,51E+04*	0,127
	Alcol butilico	3,9E+05±2,16E+05	4,4E+05±1,03E+05	5,3E+05±1,87E+05	5,7E+05±2,57E+05	0,145
	Etanolo	1,7E+05±3,57E+05	1,0E+05±3,00E+04	1,3E+05±4,12E+04	1,1E+05±3,68E+04	0,905
	Etilsanolo	5,4E+04±2,63E+05	4,9E+04±2,79E+05	3,0E+04±1,62E+05	6,6E+04±2,06E+05	0,547
	Alcol isobutilico	2,4E+04±1,73E+04	3,2E+04±2,13E+04	4,4E+04±2,30E+04 ^a	3,9E+04±1,70E+04	0,038
	Alcol isoetilico	1,6E+04±1,10E+04	3,4E+04±4,97E+04	5,5E+04±1,13E+05	5,4E+04±7,09E+04	0,164
	Alcol isopentilico	2,8E+05±1,59E+05	3,8E+05±2,38E+05	3,7E+05±1,43E+05	3,7E+05±1,16E+05	0,276
	Alcol isopropilico	2,3E+05±3,68E+05	1,2E+05±4,96E+04	5,7E+04±1,95E+04	7,0E+04±2,39E+04	0,335
	Alcol pentilico	1,8E+05±1,14E+05	4,5E+05±5,11E+05 ^b	2,5E+05±1,38E+05	2,1E+05±1,32E+05	0,027
	Alcol feniletilico	3,2E+05±1,75E+05	3,5E+05±1,45E+05	3,8E+05±2,07E+05	4,9E+05±2,70E+05	0,246
Esteri	Acido-2-Propenoico, 2- etilesil estere	1,3E+04±8,36E+03	2,0E+04±2,31E+04	1,4E+04±8,59E+03	1,3E+04±4,02E+03	0,492
	Acido acetico, butilico estere	9,2E+04±9,98E+04	8,2E+04±4,99E+04	1,0E+05±5,94E+04	1,4E+05±5,29E+04	0,536
	Acido Butirrico, butilico estere	2,5E+05±2,05E+05	1,6E+05±1,51E+05	4,2E+05±1,55E+05	1,4E+05±1,98E+04	0,454
	Acido Butirrico, propilico estere	1,2E+06±2,46E+06	6,3E+05±7,82E+05	1,7E+06±2,15E+06	5,5E+05±4,76E+05	0,673
	Acido isovalerico, propilico estere	1,8E+05±2,05E+05	2,4E+05±1,51E+05	1,9E+05±1,55E+05	3,3E+04±1,98E+04	0,197
	Acido propionico, propilico estere	7,1E+05±1,32E+06	6,0E+05±6,08E+05	8,2E+05±7,48E+05	4,2E+05±2,13E+05	0,913
	Acido valerico, 4-metil-	1,7E+05±2,85E+05	1,6E+05±1,92E+05	1,2E+05±1,06E+05	1,1E+05±9,17E+04	0,918
S-composti	Disulfide, dimetile	1,2E+05±1,53E+05	6,5E+04±3,23E+04	1,6E+05±1,26E+05	2,4E+05±2,34E+05	0,188

	Trisulfide, dimetile	8,3E+04±1,29E+05	4,5E+04±1,87E+04	1,3E+05±9,46E+04	2,6E+05 ±2,79E+05 ^a	0,030
Acidi organici	Acido acetico	2,3E+06±1,73E+06	2,6E+06±1,32E+06	2,4E+06±1,70E+06	2,1E+06±8,49E+05	0,944
	Acido valerico	1,2E+06±1,78E+06	2,3E+06±2,44E+06	2,1E+06±1,81E+06	1,1E+06±9,15E+05	0,416
	Acido isovalerico	5,7E+06±2,05E+05	6,0E+06±1,51E+05	6,0E+06±1,55E+05	6,1E+06±1,98E+04	0,994
	Acido propionico	4,2E+06±3,39E+06	4,3E+06±1,78E+06	4,0E+06±2,44E+06	3,7E+06±1,81E+06	0,982
	Acido butirrico	8,0E+06±4,23E+05	8,0E+06±1,22E+05	8,7E+06±3,98E+05	7,0E+06±9,86E+04	0,962
	Acido isobutirrico	1,1E+06±8,25E+05	1,2E+06±4,75E+05	1,1E+06±4,73E+05	1,1E+06±5,41E+05	0,997
	Acido erucico	7,5E+04±2,19E+05	8,9E+05±2,27E+06	1,7E+06±4,66E+06	3,5E+04±1,64E+04	0,184
Fenoli	p-Cresolo	5,4E+05±1,03E+06	8,7E+05±1,40E+06	1,2E+06±1,53E+06	1,0E+06±2,12E+06	0,529
	p-Cresolo, 2,6-di-tert-butirrico-	8,7E+04±3,87E+04	8,2E+04±3,35E+04	8,1E+04±2,17E+04	5,9E+04±2,10E+04	0,357
	Fenolo	4,4E+06±4,27E+06	4,7E+06±5,39E+06	4,7E+06±4,07E+06	5,8E+06±3,42E+06	0,902
	Fenolo, 2-(1,1-dimetiletilico)-4-metossilico-	2,0E+05±1,19E+05	1,7E+05±6,60E+04	1,7E+05±5,10E+04	2,8E+05±8,71E+04	0,207
	Fenolo, 2,4-di-tert-butirrico-	3,1,E+04±1,60E+04	2,6E+04±8,91E+03	3,3E+04±1,57E+04	1,9E+04±7,22E+03	0,241
	Fenolo, 5-amino-2-metossilico-	5,4E+04±5,72E+04	9,5E+04±7,62E+04	2,7E+04±1,26E+04	2,0E+04±1,47E+04	0,046
N-composti	Isochinolina, 1-metilica-	1,9E+05±1,96E+05	2,1E+05±1,82E+05	2,4E+05±1,55E+05	2,0E+05±1,09E+05	0,896
	Chinolina	8,3E+05±5,83E+05	8,6E+05±6,82E+05	6,9E+05±5,07E+05	9,1E+05±8,69E+05	0,913
	Indolo	1,3E+07±6,72E+06	1,1E+07±4,51E+06	1,3E+07±5,97E+06	1,3E+07±4,23E+06	0,908
	Tetraidrossichinolina	2,2E+05±2,46E+05	2,4E+05±2,06E+05	1,9E+05±1,72E+05	2,0E+05±2,04E+05	0,981

¹ I valori si riferiscono alla media dei soggetti trattati (N=8) ± SD.

^aDifferenze ritenute significative dal CTRL (P<0,05).

^bDifferenze ritenute significative dal CTRL (P<0,01).

^cDifferenze ritenute significative dal CTRL (P<0,001).

*0,10<P>0,05

6. Conclusioni

Valutazione *in vitro* degli effetti di un ceppo di *S. boulardii* impiegato in associazione con frutto-oligosaccaridi e lattitolo sul microbiota intestinale del cane

La presente ricerca sembrerebbe confermare gli effetti benefici che i frutto-oligosaccaridi ed il lattitolo possono esercitare sulla salute intestinale del cane. Tali prebiotici hanno indotto variazioni positive nella composizione e nel metabolismo del microbiota fecale canino, riducendo le concentrazioni di composti putrefattivi, favorendo la produzione di AGV e riducendo il pH degli inoculi fecali.

L'interesse della comunità scientifica per il *Saccharomyces boulardii* è relativamente recente e, sia in medicina umana che veterinaria, le ricerche sono volte maggiormente a valutarne l'efficacia come probiotico in forme croniche di patologia gastroenterica (IBD/PLE); al contrario, lo scopo di questa prova era quello di valutarne gli effetti sul microbiota di cani sani. I risultati ottenuti nel presente esperimento *in vitro* potrebbero suggerire che *S. boulardii* non abbia agito come probiotico, in quanto non ha indotto variazioni nelle concentrazioni dei prodotti metabolici presi in esame o nel pH degli inoculi.

Anche altri studi condotti per testare gli effetti *in vitro* del lievito sul microbiota umano sano hanno ottenuto risultati analoghi a questo; al contrario studi *in vivo* eseguiti sull'uomo o su cani affetti da patologie gastroenteriche croniche hanno invece ottenuto risultati riconducibili ad un effetto antibatterico, antinfiammatorio ed immunomodulatore. A tal proposito, è possibile che tale lievito non eserciti un effetto probiotico in condizioni di eubiosi intestinale, e che invece sia in grado di agire in modo incisivo prevalentemente in condizioni di disbiosi intestinale, favorendone il ripristino delle funzioni fisiologiche.

Si rendono dunque necessari ulteriori approfondimenti, sia in medicina umana che in veterinaria, per stabilire l'effettivo ruolo probiotico di *S. boulardii* in quadri intestinali caratterizzati da un microbiota eubiotico.

Valutazione degli effetti di due prodotti a base di parete cellulare di lievito e di un ceppo di *S. boulardii* sul microbiota intestinale del cane.

I risultati ottenuti nel corso delle due sperimentazioni condotte in tale ambito sembrerebbero confermare che i supplementi nutrizionali testati hanno influito sulla composizione e sulla funzionalità del microbiota intestinale del cane.

Tuttavia, i risultati ottenuti dal modello *in vitro* non sono di facile interpretazione; per certi aspetti sembrerebbe che si sia verificata una stimolazione dell'attività del microbiota fecale, secondo altre valutazioni risulterebbe emergere maggiormente un ruolo inibitorio nei confronti dei batteri fecali.

I supplementi testati *in vivo*, al contrario, non sembrano aver sortito effetti particolari sulla composizione del microbiota fecale. Inoltre, l'enorme variabilità individuale che caratterizza le diverse popolazioni batteriche osservate nei soggetti partecipanti alla prova, rende complessa la valutazione dei risultati.

Le interpretazioni sui diversi composti organici volatili rilevati sia *in vitro* che *in vivo* soffrono del limite rappresentato dalla scarsa conoscenza riguardo i meccanismi di interazione fra questi metaboliti e l'ospite; di conseguenza le considerazioni circa il loro ruolo nel mantenimento della salute intestinale del cane sono limitate.

Le concentrazioni di metaboliti di origine batterica riscontrabili a livello fecale potrebbero inoltre risultare sottostimate, poiché la maggior parte di essi viene riassorbita dalla mucosa intestinale. Di fatto, ciò rappresenta un limite comune agli studi condotti su cani sani, nei quali l'analisi su feci spontaneamente emesse costituisce l'unica possibilità per indagare il complesso, e ancora in gran parte ignoto, mondo del microbiota intestinale.

7. Bibliografia

- Aktas, M. S., Borku, M. K., Ozkanlar, Y., 2007. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in dogs. *Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy*. 51, 365–369.
- Allaart, J., G., van Asten, A., J., A., M., Vernooij, J., C., M., Grone, A., 2011. Effect of *Lactobacillus fermentum* on beta2 toxin production by *Clostridium perfringens*. *Applied and Environment Microbiology*. 77, 4406–4411.
- Altwegg, M., Schnack, J., Zbinden, R., 1995. Influence of *Saccharomyces boulardii* on *Aeromonas hemolysin*. *Medical Microbiology Letters*. 4, 417-425.
- Apanavicius, C. J., Powell, K. L., Vester, B. M., Karr-Lilienthal, L. K., Pope, L. L., Fasting, N. D., Wallig, M. A., Tappenden, K. A., Swanson, K. S., 2007. Fructan supplementation and infection affect food intake, fever, and epithelial sloughing from Salmonella challenge in weanling puppies. *The Journal of Nutrition*. 137, 1923-1930.
- Arendrup, M. C., Sulim, S., Holm, A., Nielsen, L., Dam Nielsen, S., Knudsen, J. D., Drenck, N. E., Christensen, J. J., Johansen, H. K., 2011. Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. *Journal of Clinical Microbiology*. 49, 3300–3308.
- Arendrup, M. C., Boekhout, T., Akova, M., Meis, J. F., Cornely, O. A., Lorand, O., and on behalf of the ESCMID EFISG study group and ECMM, 2013. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 20, 76-98.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J., Rudensky, A. Y., 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 504, 451–455.
- Attene-Ramos, M. S., Wagner, E. D., Gaskins, H. R., Plewa, M. J., 2007. Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. *Molecular Cancer Research*. 5, 455–459.
- Attene-Ramos, M. S., Nava, G. M., Muellner, M. G., Wagner, E. D., Plewa, M. J., Gaskins, H. R., 2010. DNA damage and toxicogenomic analyses of hydrogen sulfide in human intestinal epithelial FHs 74 Int cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 51, 304–14.
- Bayoumi, M. A., Griffiths, M. W., 2012. In vitro inhibition of expression of virulence genes responsible for colonization and systemic spread of enteric pathogens using

- Bifidobacterium bifidum* secreted molecules. *International Journal of Food Microbiology*. 156, 255–263.
- Balish, E., Cleven, D., Brown, J., Yale, C. E., 1977. Nose, throat, and fecal flora of beagle dogs housed in "locked" or "open" environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 34, 207-221.
- Barc, M. C., Charrin-Sarnel, C., Rochet, V., Bourlioux, F., Sandré, C., Boureau, H., Doré, J., Collignon, A., 2008. Molecular analysis of the digestive microbiota in a gnotobiotic mouse model during antibiotic treatment: Influence of *Saccharomyces boulardii*. *Anaerobe*. 14, 229-233.
- Barry, K. A., Hernot, D. C., Middelbos, I. S., Francis, C., Dunsford, B., Swanson, K. S., Fahey Jr, G. C., 2009. Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. *Journal of Animal Science*. 87, 3244-3252.
- Barry, K. A., Hernot, D. C., Middelbos, I. S., Francis, C., Dunsford, B., Swanson K. S., Fahey Jr., G. C., 2014. Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. *Journal of Animal Science*. 2009. 87, 3244-3252.
- Bell, J. A., Kopper, J. J., Turnbull, J. A., Barbu, N. I., Murphy, A. J., Mansfield, L. S., 2008. Ecological characterization of the colonic microbiota of normal and diarrheic dogs. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 149–694.
- Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G. L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R. E., Schiffrin, E. J., von der Weid, T., 2003. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *Journal of Nutrition*. 133, 1158–1162.
- Beynen, A. C., Baas, J. C., Hoekemeijer, P. E., Kappert, H. J., Bakker, M. H., Koopman, J. P., Lemmens, A. G., 2002. Faecal bacterial profile, nitrogen excretion and mineral absorption in healthy dogs fed supplemental oligofructose. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 86, 298-305.
- Beloshapka, A. N., Wolff, A. K., Swanson, K. S., 2012. Effects of feeding polydextrose on faecal characteristics, microbiota and fermentative end products in healthy adult dogs. *British Journal of Nutrition*. 108, 638-644.
- 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, 532-541.
- Benno, Y., Nakao, H., Uchida, K., Mitsuoka, T., 1992. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 54, 703-706.
- Berstad, A., Raa, J., Valeur, J., 2015. Indole—the scent of a healthy ‘inner soil’. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 26, 27997.
- Biagi, G., Piva, A., Moschini, M., Vezzali, E., Roth, F. X., 2006. Effect of gluconic acid on piglet growth performance, intestinal microflora, and intestinal wall morphology. *Journal of Animal Science*. 84, 370–378.
- Biagi, G., Cipollini, I., Grandi, M., Zaghini, G., 2010. Influence of some potential prebiotics and fibre-rich foodstuffs on composition and activity of canine intestinal microbiota. *Animal Feed Science and Technology*. 159, 50-58.
- Biagi, G., Cipollini, I., Grandi, M., Pinna, C., Vecchiato, C.G., Zaghini, G., 2016. A new in vitro method to evaluate digestibility of commercial diets for dogs. *Italian Journal of Animal Science*. 15:4, 617-625.
- Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, F. J., Tomé, D., 2007. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids*. 33, 547–62.
- Boirivant, M., Strober, W., 2007. The mechanism of action of probiotics. *Current opinion in gastroenterology*. 23, 679-692.
- Boyle, A. G., Magdesian, K. G., Durando, M. M., Gallop, R., Sigdel, S., 2013. *Saccharomyces boulardii* viability and efficacy in horses with antimicrobial-induced diarrhoea. *The Veterinary Record*. 172, 128.
- Brandao, R. L., Castro, I. M., Bampirra, E. A., Amaral, S. C., Fietto, L. G., Tropaia, M. J., Neves, M. J., Dos Santos, R. G., Gomes, N. C., Nicoli, J. R., 1998. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 564-568.
- Breves, G., Walter, C., Burmester, M., Schröder, B., 2000. In vitro studies on the effects of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on nutrient transport in pig jejunum. *Journal of Animal Physiology*. 84, 9-20.

- Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S., Gordon, S., 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *Journal of Experimental Medicine*. 197, 1119–1124.
- Buddington, R. K., 2003. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 64, 646–651.
- Buts, J. P., Bernasconi, P., Vaerman, J. P., Dive, C., 1990. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Digestive Disease and Sciences*. 35, 251-256.
- Buts, J. P., Stilmant, C., Bernasconi, P., Neirinck, C., De Keyser, N., 2008. Characterization of alpha,alpha-trehalase released in the intestinal lumen by the probiotic *Saccharomyces boulardii*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 43, 1489-1496.
- Cardinali, G., Martini, A., 1994. Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44, 791–797.
- Case, L. P., Daristotle, L., Hayek, M. G., Raasch, M. F., 2011. Canine and Feline Nutrition: A Resource for Companion Animal Professionals. Mosby Elsevier.
- Castagliuolo, I., Riegler, M., F., Valenick, L., LaMont, J., T., Pothoulakis, C., 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infection and Immunity*. 67, 302–307.
- Chaban, B., Links, M. G., Hill, J. E., 2012. A molecular enrichment strategy based on cpn60 for detection of epsilonproteobacteria in the dog fecal microbiome. *Microbial Ecology*. 63, 348–357.
- Collado, M. C., Grzeskowiak, Ł., Salminen, S., 2007a. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Current Microbiology*. 55, 260–265.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S., 2007b. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*. 45, 454–460.
- Collier, C. T., Smiricky-Tjardes, M. R., Albin, D. M., Wubben, J. E., Gabert, V. M., Deplancke, B., Bane, D., Anderson, D. B., Gaskins, H. R., 2003. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. *Journal of Animal Science*. 81, 3035–3045.

- Collier, C. T., Carroll, J. A., Ballou, M. A., Starkey, J. D., Sparks, J. C., 2011. Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae boulardii* reduces mortality associated with immune and cortisol responses to *Escherichia coli* endotoxin in pigs. *Journal of Animal Science*. 89, 52-58.
- Condezo-Hoyos, L., Mohanty, I. P., Noratto, G. D., 2014. Assessing non-digestible compounds in apple cultivars and their potential as modulators of obese faecal microbiota *in vitro*. *Food Chemistry*. 161, 208–215.
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F. J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M. L., Clemente, A., 2015. Prebiotics: Concept, properties and beneficial effects. *Nutricion Hospitalaria*. 31, 99–118.
- Coté, G. A., Buchman, A. L., 2006. Antibiotic associated diarrhoea. *Expert Opinion on Drug Safety*. 5, 361–72.
- Czerucka, D., Rampal, P., 2002. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection*. 4, 733–9.
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P., 2007. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 26, 767-778.
- D'Angelo, S., Fracassi, F., Bresciani, F., Galuppi, R., Diana, A., Linta, N., Bettini, G., Morini, M., Pietra, M., 2017. Effect of *Saccharomyces boulardii* in dog with chronic enteropathies: double-blinded, placebo-controlled study. *Veterinary Record*. Published Online First: 06 December 2017. doi: 10.1136/vr.104241.
- Dalmaso, G., Cottrez, F., Imbert, V., Lagadec, P., Peyron, J. F., Rampal, P., Czerucka, D., Groux, H., Foussat, A., Brun, V., 2006. *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymphnodes. *Gastroenterology*. 131, 1812–1825.
- Davis, C. P., Cleven, D., Balish, E., Yale, C. E., 1977. Bacterial Association in the Gastrointestinal Tract of Beagle Dogs. *Applied and Environmental Microbiology* 34, 194–206.
- de Graaf, A. A., Venema, K., 2007. Gaining Insight into Microbial Physiology in the Large Intestine: A Special Role for Stable Isotopes. In: *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press. 53, 73–314.

- de Lacy Costello, B., Amann, A., Al-Kateb, H., Flynn, C., Filipiak, W., Khalid, T., Osborne, D., Ratcliffe, N. M., 2014. A review of the volatiles from the healthy human body. *Journal of Breath Research*. 8, 14001.
- Debruyne, A., Alvarez, A. P., Sandra, P., De Leenheer, L., 1992. Isolation and identification of O- β -D-fructofuranosyl-(2,1)-D-fructose, a product of the enzymatic hydrolysis of the inulin from *Cichorium intybus*. *Carbohydrate Research*. 235, 303-308.
- Deng, P., Swanson, K. S., 2015. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *British Journal of Nutrition*. 113, 6–17.
- Desrochers, A. M., Dolente, B. A., Roy, M. F., Boston, R., Carlisle, S., 2005. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* for treatment of horses with acute enterocolitis. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 27, 954-959.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., Relman, D. A., 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*. 6, e280.
- Drasar, B. S. Hill, M. J. 1974. Human intestinal flora. *Academic Press*, London.
- Duboc, H., Rajca, S., Rainteau, D., Benarous, D., Maubert, M., Quervain, E., Thomas, G., Barbu, V., Humbert, L., Despras, G., Bridonneau, C., Dumetz, F., Grill, J., Masliah, J., Beaugier, L., Cosnes, J., Chazouillères, O., Poupon, R., Wolf, C., Mallet, J., Langella, P., Trugnan, G., Sokol, H., Seksik, P., 2013. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut*. 62, 531–539.
- Ducluzeau, R., Bensaada, M., 1982. Comparative effect of a single or continuous administration of "*Saccharomyces boulardii*" on the establishment of various strains of "*candida*" in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Annales de microbiologie (Paris)*. 133, 491-501.
- Dwivedi, M., Kumar, P., Laddha, N. C., Kemp, E. H., 2016. Induction of regulatory T cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 15, 379–392.
- Edwards-Ingram, L., Gitsham, P., Burton, N., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, D., Oliver, S. G., Stateva, L., 2007. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*. 73, 2458-2467.

- FAO/WHO, 2002. working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario.
- Flickinger, E. A., Fahey, G. C. Jr, 2002. Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. *British Journal of Nutrition*. 87, 297S–300S.
- Flickinger, E. A., Van Loo, J., Fahey Jr, G. C., 2003a. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43, 19-60.
- Flickinger, E. A., Schreijen, E. M. W. C., Patil, A. R., Hussein H. S., Grieshop, C. M., Merchen, N. R., Fahey, G. C. Jr., 2003b. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *Journal of Animal Sciences*. 81, 2008–2018.
- Flint, H. J., Bayer, E. A, Rincon, M. T., Lamed, R., White, B. A., 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*. 6:121–31.
- Foster, M. L., Dowd, E. S., Stephenson, C., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S., 2013. Characterization of the Fungal Microbiome (Mycobiome) in Fecal Samples from Dogs. *Veterinary Medicine International*. Article ID 658373, 1-8.
- Fujita, K., Kitahata, S., Kozo, H., Hotoshi, H., 1992. Production of lactosucrose and its properties. In: M.A. Clarke (ed.) Carbohydrates in industrial synthesis. Verlag Bartens, Berlin, Germany, pp 68-76.
- Gagné, J. W., Wakshlag, J. J., Simpson, K. W., Dowd, S. E., Latchman, S., Brown, D. A., Brown, K., Swanson, K. S., Fahey Jr, G. C., 2013. Effects of a synbiotic on fecal quality, short-chain fatty acid concentrations, and the microbiome of healthy sled dogs. *BMC Veterinary Research*. 9, 246.
- Garcia-Mazcorro, J. F., Lanerie, D. J., Dowd, S. E., Paddock, C. G., Grützner, N., Steiner, J. M., Ivanek, R., Suchodolski, J. S., 2011. Effect of a multi-species symbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology* 78, 542–554.
- Garcia-Mazcorro, J. F, Dowd, S. E., Poulsen, J., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S., 2012. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. *Microbiology Open*. 1, 340–347.

- Garner, C. E., Smith, S., de Lacy Costello, B., White, P., Spencer, R., Probert, C. S., Ratcliffe, N. M., 2007. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *The FASEB Journal*. 21, 1675–88
- Geypens, B., Claus, D., Evenepoel, P., Hiele, M., Maes, B., Peeters, M., Rutgeerts, P., Ghoois, Y., 1997. Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut*. 41, 70-76.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*. 125, 1401-1412.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J. A. E., Roberfroid, M. B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17, 257–25.
- Gibson, G. R., McCartney, A. L., Rastall, R. A., 2007. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *British Journal of Nutrition*. 93, S31–S34.
- Gibson, G. R., Kolida, S., 2008. The Prebiotic Effect: Review of Experimental and Human Data. In: *Handbook of prebiotics*, ed. Glenn R. Gibson e M. Roberfroid. 4, 69-88.
- Graf, C., Gavazzi, G., 2007. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an immunocompromised patient not treated with *Saccharomyces boulardii* preparation. *Journal of Infection*. 54, 310–311.
- Greetham, H. L., Giffard, C., Hutson, R. A., Collins, M. D., Gibson, G. R., 2002. Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach. *Journal of Applied Microbiology*. 93, 640–646.
- Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bruce, K. J., Patil, A. R., Czarnecki-Maulden, G. L., Fahey Jr., G. C., 2004. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides. *Archives of Animal Nutrition*. 58, 483-493.
- Guard, B. C., Barr, J. W., Reddivari, L., Klemashevich, C., Jayaraman, A., Steiner, J. M., Vanamala, J., Suchodolski, J. S., 2015. Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PLoS ONE* 10, e0127259.
- Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., 2008. The role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2, 104–19.
- Handl, S., Dowd, S. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S., 2011. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiology Ecology*. 76, 301–310.

- Handl S., German A. J., Holden S. L., Dowd S. E., Steiner J. M., Heilmann R. M., Grant, R. W., Swanson, K. S., Suchodolski, J. S., 2013. Faecal microbiota in lean and obese dogs. *FEMS Microbiology Ecology*. 84, 332–343.
- Hang, I., Heilmann, R. M., Grützner, N., Suchodolski, J. S., Steiner, J. M., Atroshi, F., Sankari, S., Kettunen, A., de Vos, W.M., Zentek, J., Spillmann, T., 2013. Impact of diets with a high content of greaves-meal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin concentrations in healthy dogs. *BMC Veterinary Research*. 9, 201.
- Harmsen, H. J. M., Wildeboer-Veloo, A. C. M., Grijpstra, J., Knol, J., Degener, J. E., Welling, G. W., 2000. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 4523–4527.
- Hennequin, C., Thierry A., Richard G. F., Lecoindre G., Nguyen H. V., Gaillardin C., Dujon B., 2001. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Journal of clinical microbiology*. 39, 551–559.
- Hesta, M., Janssens, G., P., J., Millet, S., De Wilde, R., 2003. Prebiotics affect nutrient digestibility but not faecal ammonia in dogs fed increased dietary protein levels. *British Journal of Nutrition*. 90, 1007-1014.
- Hesta, M., Hoornaert, E., Verlinden, A., Janssens, G. P. J., 2005. The effect of oligofructose on urea metabolism and faecal odour components in cats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 89, 208–214.
- Hiele, M., Ghos, Y., Rutgeerts, P., Vantrappen, G., Schoorens, D., 1991. Influence of nutritional substrates on the formation of volatiles by the fecal flora. *Gastroenterology*. 100, 1597-1602.
- Hill, R. C., Choate, C. J., Scott, K. C., Molenberghs, G., 2009. Comparison of the guaranteed analysis with the measured nutrient composition of commercial pet foods. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 234, 347–351.
- Hoffmann, A. R., Proctor, L. M., Surette, M. G., Suchodolski, J. S., 2016. The microbiome: the trillions of microorganisms that maintain health and cause disease in humans and companion animals. *Veterinary Pathology*. 53, 10-21.

- Hooda, S., Minamoto, Y., Suchodolski, J. S., Swanson, K., S., 2012. Current state of knowledge: the canine gastrointestinal microbiome. *Animal Health Research Reviews*. 13, 78–88.
- 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, 16489–16497.
- Honneffer, J., Guard, B., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S., 2015. Untargeted metabolomics reveals disruption within bile acid, cholesterol, and tryptophan metabolic pathways in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. Proceedings of the 46th Annual Digestive Disease, Washington, DC, USA, 16–19 May 2015.
- Howard, M. D., Kerley, M. S., Sundvold, G. D., Reinhart, G. A., 2000. Source of dietary fiber fed to dogs affects nitrogen and energy metabolism and intestinal microflora populations. *Nutrition Research*. 20, 1473-1484.
- Huys, G., Bootteldoorn, N., Delvigne, F., Vuyst, L de., Heyndrickx, M., Pot, B., Dubois, J. J., Daube, G., 2013. Microbial characterization of probiotics-advisory report of the Working Group "8651 Probiotics" of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Molecular Nutrition and Food Research*. 57, 1479-1504.
- Hughes, R., Magee, E. A., Bingham, S., 2000. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Current issues in intestinal microbiology*. 1, 51-58.
- Hussein, H., Sunvold, G., 2000. Dietary strategies to decrease dog and cat faecal odour components. In: G. Reinhart, D. Carey, Recent Advances in Canine and Feline Nutrition. Orange Frazer Press, Ohio, USA, pp. 153–168.
- Imaizumi, K., Nakatsu, Y., Sato, M., Sedarnawati, Y., Sugano, M., 1991. Effects of xylooligosaccharides on blood glucose, serum and liver lipids and cecum short-chain fatty acids in diabetic rats. *Agricultural and Biological Chemistry*. 55, 199-205.
- Jia, J., Frantz, N., Khoo, C., Gibson, G. R., Rastall, R. A. McCartney, A. L., 2010. Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhea. *FEMS Microbiology Ecology*. 71, 304–312.
- Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J. M., 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology*. 51, 270-274.

- Kathrani, A., Holder, A., Catchpole, B., Alvarez, L., Simpson, K., Werling, D., Allenspach, K., 2012. TLR5 risk-associated haplotype for canine inflammatory bowel disease confers hyper-responsiveness to flagellin. *PLoS ONE*. 7, e30117.
- Kerr, K. R., Beloshapka, A. N., Swanson, K. S., 2013. 2011 and 2012 early careers achievement awards: Use of Genomic Biology to Study Companion Animal Intestinal microbiota. *Journal of Animal Science*. 91, 2504–2511.
- Kirchhelle, A., Frühwein, N., Tobüren, D., 1996. Treatment of persistent diarrhea with *S. boulardii* in returning travelers: results of prospective study. *Fortschritte der Medizin*. 114, 136–140.
- Kogan, G., Kocher, A., 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science*. 109, 161–165.
- Lamendella, R., Santo Domingo, J. W., Kelty, C., et al. 2008. Bifidobacteria in feces and environmental waters. *Applied Environmental Microbiology*. 74, 575-584.
- Langendijk, P. S., Schut, F., Jansen, G. J., Raangs, G. C., Kamphuis, G. R., Wilkinson, M. H. F., Welling, G. W., 1995. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Applied and environmental microbiology*. 61, 3069-3075.
- Laparra, J. M., Sanz, Y., 2010. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Nutraceuticals and Functional Foods*. 61, 219–225.
- Lederberg, J., McCray, A. T., 2001. ‘Ome Sweet ‘Omics- -A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*. 15, 8.
- Li, J., Xing, J., Li, D., Wang, X., Zahao, L., Lv, S., Huang, D., 2005. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on humoral and cellular immunity in weaned pig. *Archives of Animal Nutrition*. 59, 303-312.
- Lomax, A., R., Calder, P., C., 2009. Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. *British Journal of Nutrition*. 101, 633-658.
- Loo, J. V., Vancaeynest, D., 2008. Prebiotics and Animal Nutrition. In *Handbook of prebiotics*, ed. Glenn R. Gibson e M. Roberfroid. 21, 428-429.
- Malewska, K., Rychlik, A., Nieradka, R., Kander, M., 2011. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD) in dogs and cats. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 14, 165-170.

- Malinen, E., 2003. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*. 149, 269–277.
- Malinen, E., Rinttila, T., Kajander, K., Matto, J., Kassinen, A., Krogius, L., Saarela, M., Korpela, R., Palva, A., 2005. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *The American Journal of Gastroenterology*. 100, 373–382.
- Mallié, M., Van, P. N., Bertout, S., Vaillant, C., Bastide, J. M., 2001. Genotypic study of *Saccharomyces boulardii* compared to the *Saccharomyces sensu stricto* complex species. *Journal de Mycologie Medicale*. 1, 19–25.
- Manchester, A. C., Hill, S., Sabatino, B., Armentano, R., Carroll, M., Kessler, B., Miller, M., Dogan, B., McDonough, S. P., Simpson, K. W., 2013. Association between granulomatous colitis in French bulldogs and invasive *Escherichia coli* and response to fluoroquinolone antimicrobials. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27, 56–61.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., Tanaka, R., 2002. Development of 16S rRNA-Gene-Targeted Group-Specific Primers for the Detection and Identification of Predominant Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 5445–5451.
- McBurney, M. I., Thompson, L. U., Cuff, D. J., Jenkins, D. J. A., 1988. Comparison of ileal effluents, dietary fibers, and whole foods in predicting the physiological importance of colonic fermentation. *American Journal of Gastroenterology*. 83, 536-540.
- McFarland, L. V., Surawicz, C. M., Greenberg, R. N., Fekety, R., Elmer, G. W., Moyer, K. A., Melcher, S. A., Bowen, K. E., Cox, J. L., Noorani, Z., Harrington, G., Rubin, M., Greenwald, D., 1994. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA*. 271, 1913–1918.
- 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, 812–22.
- McFarland, L. V., 2010. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*. 16, 2202-2222.

- McKay, D. M., Perdue, M. H., 1993. Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. *Digestive Diseases and Sciences*. 38, 1377–1387.
- McQuaid, T. S., 2005. Medical management of a patent ductus venosus in a dog. *The Canadian Veterinary Journal*. 46, 352–356.
- Medellin-Peña, M., J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., Griffiths, M., W., 2007. Probiotics affect virulence related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environment Microbiology*. 73, 4259–4267.
- Mentula, S., Harmoinen, J., Heikkil, M., Westermarck, E., Rautio, M., Huovinen, P., Könönen, E., 2005. Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in beagle dogs. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 4169–4175.
- Middelbos, I. S., Fastinger, N. D., Fahey, G. C., 2007a. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. *Journal of Animal Science*. 85, 3033–3044.
- Middelbos, I. S., Godoy, M. R., Fastinger, N. D., Fahey Jr., G. C., 2007b. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. *Journal of Animal Science*. 85, 3022-3032.
- Middelbos, I. S., Vester Boler, B. M., Qu, A., White, B. A., Swanson, K. S., Fahey Jr., G. C., 2010. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. *PLoS ONE*. 5:e9768.
- Minamoto, Y., Dhanani, N., Markel, M. E., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S., 2014. Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Veterinary Microbiology*. 174, 463–473.
- Minamoto, Y., Otoni, C. C., Steelman, S. M., Buyukleblebici, 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, 33–47.
- Mitterdorfer, G., Mayer, H. K., Kneifel, W., Viernstein, H., 2002. Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. *Journal of applied microbiology*. 93, 521-530.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., 2010. Animal models of IBD: linkage to human disease. *Current opinion in Pharmacology*. 10, 578-587.

- Momozawa, Y., Deffontaine, V., Louis, E., Medrano, J.F., 2011. Characterization of bacteria in biopsies of colon and stools by high throughput sequencing of the V2 region of bacterial 16S rRNA gene in human. *PLoS ONE* 6, 16952.
- Mondot, S., Kang, S., Furet, J. P., Aguirre de Carcer, D., McSweeney, C., Morrison, M., Marteau, P., Doré, J., Leclerc, M., 2011. Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflammatory bowel disease*. 17, 185-192.
- Moré, M. I, Swidsinski, A., 2015. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis—a review. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 11, 237–255.
- Muhling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J. C., Joint, I., 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME Journal*. 2, 379–392.
- Mumy, K. L., Chen, X., Kelly, C. P., McCormick, B. A., 2007. *Saccharomyces boulardii* interferes with *Shigella* pathogenesis by post-invasion signaling events. *American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology*. 294, 599-609.
- Munoz, P., Bouza, E., Cuenca-Estrella, M., Eiros, J. M., Pérez, M. J., Sanchez-Somolinos, M., Rincón, C., Hortal, J., Peláez, T., 2005. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clinical Infectious Disease*. 40,1625–1634.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 695-700.
- Nery, J., Goudez, R., Biourge, V., Tournier, C., Leray, V., Martin, L., Thorin, C., Nguyen, P., Dumon, H., 2012. Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance. *Journal of Animal Science*. 90, 2570–2580.
- Ng, S., C., Hart, A., L., Kamm, M., A., Stagg, A., J., Knight, S., C., 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases*. 15, 300-310.
- Nowak, A., Libudzisz, Z., 2006. Influence of phenol, *p*-cresol and indole on growth and survival of intestinal lactic acid bacteria. *Anaerobe*. 12, 80-84.
- National Research Council, NRC, 2006. Nutrient Requirements of dogs and cats, The national academies press, Washington, D.C.

- Oever, J., Netea, M. G., 2014. The bacteriome-mycobiome interaction and antifungal host defense. *European Journal of Immunology*. 27, 3182–3191.
- Patil, D. H., Grimble, G. K., Silk, D. B. A., 1987a. Intestinal absorption and laxative threshold of lactitol - a new hydrogenated derivative of lactose. *The British journal of nutrition*. 57, 195-199.
- Patil, D. H., Westaby, D., Mahida, Y. R., Palmer, K. R., Rees, R., Clark, M. L., Dawson, A. M., Silk D. B. A., 1987b. Comparative modes of action of lactitol and lactulose in the treatment of hepatic encephalopathy. *Gut*. 28, 255-259.
- Pecquet, S., Guillaumin, D., Tancrede, C., Andremont, A., 1991. Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial colonization in gnotobiotic mice. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 3049-3051.
- Pinna, C., Vecchiato, C. G., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M. T., Stefanelli, C., Grandi, M., Gatta, P. P., Biagi, G., 2017. An in vitro evaluation of the effects of a *Yucca schidigera* extract and chestnut tannins on composition and metabolic profiles of canine and feline faecal microbiota. *Archives of Animal Nutrition*.
- Pitcher, M., Cummings, J., 1996. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* 39, 1–4.
- Pothoulakis, C., Kelly, C. P., Joshi, M. A., Gao, N., O’Keane, C. J., Castagliuolo, I., Lamont, J. T., 1993. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology*. 104, 1108-1115.
- Propst, E. L., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Merchen, N. R., Fahey Jr, G. C., 2003. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. *Journal of Animal Science*. 81, 3057-3066.
- Rajput, I. R., Li, L. Y., Xin, X., Wu, B. B., Juan, Z. L., Cui, Z. W., Yu, D. Y., Li, W. F., 2013. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poultry Science*. 92, 956–65.
- Rastall, R. A., 2004. Bacteria in the Gut: Friends and Foes and How to Alter the Balance. *The Journal of nutrition*. 134, 2022–2026

- Rastogi, R., Wu, M., DasGupta, I., Fox, E., G., 2009. Visualization of ribosomal RNA operon copy number distribution. *BMC Microbiology*. 9, 208.
- Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S., Isolauri, E., 2012. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature Reviews: Gastroenterology and Hepatology*. 9, 565-576.
- Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., Palva, A., 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 97, 1166–1177.
- Roberfroid, M. B., 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition*. 71, 1682S-1687S.
- Roberfroid, M. B., 2007. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*. 137, 830S-837S.
- Roberfroid, M. B., 2008. Prebiotics: Concept, Definition, Criteria, Methodologies, and Products. In: Handbook of prebiotics, ed. Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., Taylor& Francis Group, Boca Raton. pp. 40-60.
- Rodrigues, A. C., Cara, D. C., Fretez, S. H., Cunha, F. Q., Vieira, E. C., Nicoli, J. R., Vieira, L. Q., 2000. *Saccharomyces boulardii* stimulates IgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology*. 89, 404–414.
- Roediger, W. E., Duncan, A., Kapaniris, O., Millard, S., 1993. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 104, 802–809.
- Romero-Gómez, M., Jover, M., Galán, J. J., Ruiz, A., 2009. Gut ammonia production and its modulation. *Metabolic Brain Disease*. 24, 147-157.
- Rosendale, D., Vetharanim, I., Cookson, A. L., Roy, N., 2015. Modelling the effect of undigested dietary carbohydrate on the health and function of the large bowel. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 5, 86–98.
- Rossi, G., Pengo, G., Caldin, M., Piccionello, A. P., Steiner, J. M., Cohen, N. D., Jergens, A. E., Suchodolsky, J. S., 2014. 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, 2-10.

- Round, J. L., Mazmanian, S. K., 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 9, 313-323.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 84, 197–215.
- Sanders, J. W., Tribble, D. R., 2001. Diarrhea in the returned traveler. *Current Gastroenterology Reports*. 3, 304-314.
- 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, 269–277.
- Schmitz, S., Suchodolski, J.S., 2016. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? *Veterinary Medicine and Science*. 2, 71-94.
- Schneider, S. M., Girard-Pipau, F., Filippi, J., Hebuterne, X., Moyse, D., Calle Hinojosa, G., Pompei, A., Rampal, P., 2005. Effects of *Saccharomyces boulardii* on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition. *World Journal of Gastroenterology*. 11, 6165–6169.
- Seidel, E. R., Haddox, M. K., Johnson, L. R., 1984. Polyamines in the response to intestinal obstruction. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 246, 649–653.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., Finlay, B. B., 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiological Review*. 90, 859-904.
- Shane, S. M., 2001. Mannan oligosaccharides in poultry nutrition, mechanisms and benefits. In: Science and Technology in the Feed Industry, ed. Lyons, T.P., Jacques, K.A. Proc. Alltech's 17th Annual Symposium. Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 65–77.
- Simpson, K. W., Morton, D. B., Batt, R. M., 1989. Effect of exocrine pancreatic insufficiency on cobalamin absorption in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 50, 1233–1236.

- Simpson, J. M., Martineau, B., Jones, W. E., Ballam, J. M., Mackie, R. I., 2002. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microbial Ecology*. 44, 186–97.
- 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, 476–481.
- Slapeta, J., Dowd, S. E., Alanazi, A. D., Westman, M. E., Brown, G. K., 2015. Differences in the faecal microbiome of non-diarrhoeic clinically healthy dogs and cats associated with *Giardia duodenalis* infection: Impact of hookworms and coccidia. *International Journal for Parasitology*. 45, 585–594.
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Ladero, V., Alvarez, M., Fernández, M., Lopez, P., de Palencia, P. F., Corbi, A., Trip, H., Lolkema, J. S., 2010. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 64, S95–100.
- Spiegel, J. E., Rose, R., Karabell, P., Frankos, V. H., Schmitt, D.F., 1994. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technology*. 48, 85-89.
- Stefanelli, C., Carati, D., Rossoni, C., 1986. Separation of N1- and N8-acetylspermidine isomers by reversed-phase column liquid chromatography after derivatization with dansyl chloride. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Application*. 375, 49–55.
- Stevens, C. E., Hume, I. D., 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiological Reviews*. 78, 393–427.
- Strickling, J. A., Harmon, D., L., Dawson, K., A., Gross, K., L., 2000. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. *Animal Feed Science and Technology*. 86, 205-219.
- Strompfová, V., Lauková, A., Cilik, D., 2013. Synbiotic administration of canine-derived strain *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 and inulin to healthy dogs. *Canadian Journal of Microbiology*. 59, 347–352.
- Stuyven, E., Verdonck, F., Van Hoek, I., Daminet, S., Duchateau, L., Remon, J. P., Goddeeris, B. M., Cox, E., 2010. Oral administration of β -1,3/1,6- glucan to dogs temporally changes total and antigen-specific IgA and IgM. *Clinical and vaccine immunology*. 17, 281-285.

- Suchodolski, J. S., Ruaux, C. G., Steiner, J. M., Fetz, K., Williams, D. A., 2004. Application of molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial diversity in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 42, 4702–4708.
- Suchodolski, J. S., Ruaux, C. G., Steiner, J. M., Fetz, K., Williams, D. A., 2005. Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *American Journal of Veterinary Research* 66, 1556–1562.
- Suchodolski, J.S., Camacho, J., Steiner, J.M., 2008. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*. 66, 567–578.
- Suchodolski, J. S., Dowd, S. E., Westermarck, E., Steiner, J. M., Wolcott, R. D., Spillmann, T., Harmoinen, J. A., 2009. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiology*. 9, 1–16.
- Suchodolski, J. S., Xenoulis, P. G., Paddock, C.G., Steiner, J.M., Jergens, A.E., 2010. Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Veterinary Microbiology*. 142, 394-400.
- Suchodolski, J. S., 2011. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 41, 261–272.
- Suchodolski, J.S., Markel, M.E., Garcia-Mazcorro, J.F., Unterer, S., Heilmann, R.M., Dowd, S.E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E.M., Steiner, J.M., Cook, A.K., Toresson, L., 2012a. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea an idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* 7, 51907.
- Suchodolski, J. S., Dowd, S. E., Wilke, V., Steiner, J. M., Jergens, A. E., 2012b. 16S rRNA gene pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* 7, 39333.
- Suchodolski, J.S., Foster, M.L., Sohail, M.U., Leutenegger, C., Queen, E.V., Steiner, J.M., Marks, L.M., 2015. The fecal microbiome in cats with diarrhea. *PLoS ONE* 10, 5.
- Suchodolski, J.S., 2016. Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *The Veterinary Journal*. 215, 30-37.
- Sunvold, G. D., Fahey, G. C., Merchen, N. R., Reinhart, G. A., 1995. In vitro fermentation of selected fibrous substrates by dog and cat fecal inoculum: influence of diet

- composition on substrate organic matter disappearance and short-chain fatty acid production. *Journal of Animal Science*. 73, 1110–1122.
- Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Healy, H. P., Dawson, K. A., Merchen, N. R., Fahey Jr, G. C., 2002a. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *Journal of Nutrition*. 132, 980-989.
- Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Chow, J., Wolf, B. W., Garleb, K. A., Fahey Jr., G. C., 2002b. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. *The Journal of Nutrition*. 132, 3721-3731.
- Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, Healy, H., P., Dawson, K., A., Merchen, N., R., Fahey Jr, G., C., 2002c. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adult dogs. *Archives of Animal Nutrition*. 56, 309-318.
- Swanson, K. S., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Middelbos, I. S., Vester, B. M., Barry, K. A., Nelson, K. E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, Cann, I. K, White, B. A., Fahey, G. C. Jr., 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*. 5, 639–649.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Verstraelen, H., Osowska, S., Doerffel, Y., 2008. Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology*. 135, 568-579.
- Szajewska, H., Kolodziej, M., 2015. Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 22, 365–372.
- Szymańska-Czerwińska, M., Bednarek, D., 2008. Effect of prebiotics on immunological processes in animals. *Medycyna weterynaryjna*. 64, 262-264.
- Terada, A., Hara, H., Oishi, T., Matsui, T., Mitsuoka, T., Nakajyo, S., Fujimori, I., Hara, K., 1992. Effect of dietary lactosucrose on faecal flora and faecal metabolites of dogs. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 5, 87-92.

- Thygesen, J. B., Glerup, H., Tarp, B., 2012. *Saccharomyces boulardii* fungemia caused by treatment with a probioticum. *BMJ Case Report*. doi: 10.1136/bcr. 06.2011.4412
- Tlaskalová-Hogenová, H., Stepánková, R., Hudcovic, T., Tucková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Zádníková, R., Kozáková, A., Rossmann, P., Bártová, J., Sokol, D., Funda, D. P., Borovská, D., Reháková, Z., Sinkora, J., Hofman, J., Drastich, P., Kokesová, A., 2004. Comensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*. 93, 97–108.
- Topping, D., Clifton, P. M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and non-starch polysaccharides. *Physiological Reviews*. 81, 1031-1064.
- Twomey, L. N., Pluske, J. R., Rowe, J. B., Choct, M., Brown, W., Pethick, D. W., 2003. The effects of added fructooligosaccharide (Raftilose®P95) and inulinase on faecal quality and digestibility in dogs. *Animal Feed Science and Technology*. 108, 83–93.
- Vanhoutte, T., Huys, G., De Brandt, E., Fahey Jr, G. C., Swings, J., 2005. Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiology Letters*. 249, 65-71.
- Vervaeke, I. J., Dierick, N. A., Demeyer, D. I., Decuypere, J. A., 1989. Approach to the energetic importance of fibre digestion in pigs. II. An experimental approach to hindgut digestion. *Animal Feed Science and Technology*. 23, 169–194.
- Vickers, R. J., Sunvold, G. D., Kelley, R. L., Reinhart, G. A., 2001. Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora. *American Journal of Veterinary Research*. 62, 609–615.
- Wang, R. F., Cao, W. W., Franklin, W., Campbell, W., Cerniglia, C. E., 1994. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. *Molecular and Cellular Probes*. 8, 131–137.
- Weiseger R, Pinkus L, Jakoby W. 1980. Thiol-S-methyltransferase: suggested role in detoxification of intestinal hydrogen sulphide. *Biochemical Pharmacology*. 29, 2885–2887.
- Well, J. M., Rossi, O., Meijerink, M., van Barleen, P., 2011. Epithelial crosstalk at the microbiota mucosal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108, 4607-4614.

- Wells, A. L., Saulnier, D. M. A., Gibson, G. R., 2008. Gastrointestinal Microflora and Interactions with Gut Mucosa. In *Handbook of prebiotics*, ed. Glenn R. Gibson e M. Roberfroid. 2, 19-29.
- White, R. S., Atherly, T., Webb, C., Hill, S., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S., Jergens, A. E., 2015. Effect of VSL#3 probiotic strains on the intestinal microbiota in canine inflammatory bowel disease. Research Communications of the 24th European College of Veterinary Internal Medicine-Companion Animals (ECVIM-CA) Congress, Rheingoldhalle, Mainz, Germany, 4–6 September 2014. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29, 433.
- Willard, M. D., Simpson, R. B., Cohen, N. D., Clancy, J. S., 2000. Effects of dietary fructooligosaccharide on selected bacterial populations in feces of dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 61, 820–825.
- Wise, M. G., Siragusa, G. R., 2005. Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. *Applied and Environment Microbiology*. 71, 3911–3916.
- Wynn, S. G., 2009. Probiotics in veterinary practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 234, 606–613.
- Xenoulis, P. G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J. M., Van House, A. M., Suchodolski, J. S., 2008. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiology Ecology*. 66, 579–589.
- Zanello, G., Meurens, F., Berri, M., Salmon, H., 2009. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Current Issues in Molecular Biology*. 11, 47-58.
- Zbinden, R., Bonczi, E., Altwegg, M., 1999. Inhibition of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.) on cell invasion of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica*. *Microbial ecology in health and disease*. 11, 158-162.
- Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T., 2002. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. *The Journal of Nutrition*. 132, 1682S-1684S.