



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en

## Veterinaria

PROBIÓTICOS, USO TERAPÉUTICO EN LA DIARREA CRÓNICA EN PERRO

PROBIOTICS, THERAPEUTIC USE IN CHRONIC DIARRHEA IN DOG

Autor/es

ANDREA LIETHOF SÁNCHEZ

Director/es

MANUEL GASCÓN PÉREZ

Facultad de Veterinaria

2016

# Índice

---

 Índice.....	pág. 1
 Resumen.....	pág.2
 Abstract.....	pág.3
 Introducción.....	pág.4
 Justificación y objetivos.....	pág.5
 Revisión bibliográfica	
1. Microbioma .....	pág.5
1.1 Qué es el microbioma.....	pág.5
1.2 Por qué es importante el microbioma y cómo cambia con la enfermedad.....	pág.7
2. Anatomía e inmunidad del intestino.....	pág.8
3. Diarrea crónica en perros.....	pág.10
3.1 Qué es la diarrea crónica.....	pág.10
3.2 Tipos de tratamiento de la diarrea crónica.....	pág.12
4. Probióticos.....	pág.14
4.1 Origen de los probióticos.....	pág.14
4.2 Qué son los probióticos.....	pág.15
4.3 Cómo trabajan los probióticos y cuál es su mecanismo de acción.....	pág.17
4.4 Cuál es su uso en el tratamiento de la diarrea crónica.....	pág.19
4.5 Comparativa de estudios realizados y evidencias sobre su eficacia en los problemas gastrointestinales de los pequeños animales.....	pág.20
 Discusión.....	pág.28
 Conclusiones.....	pág.29
 Conclusions.....	pág.30
 Valoración personal.....	pág.30
 Bibliografía.....	pág.31

# Resumen

---

## **Probióticos, uso terapéutico en la diarrea crónica en perro**

La diarrea es uno de los problemas más comunes hoy en día en la clínica de pequeños animales. Aunque es importante realizar un diagnóstico rápido para instaurar un tratamiento causal lo antes posible, en ocasiones no queda clara la causa y el tratamiento se establece de forma inespecífica. Los probióticos se están introduciendo de forma creciente para evitar un desequilibrio de la flora intestinal e incrementar la inmunidad del sistema.

La salud del tracto digestivo depende de factores como la flora intestinal normal, mecanismos inespecíficos que limitan el número de bacterias y del sistema inmune del tracto intestinal. En el caso de que alguno de estos factores falle se dará a cabo un mal funcionamiento del intestino y en consecuencia, la diarrea.

Llamamos diarrea crónica a aquella la cual persiste 3-4 semanas o más, y es el cuadro intestinal más frecuente en perros adultos. En este caso es muy importante un estudio exhaustivo para llegar al diagnóstico y a un plan terapéutico óptimo.

Como suplemento a este plan terapéutico se están incorporando cada vez más el uso de probióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que ingeridos en cantidades adecuadas producen efectos beneficiosos en la salud de los animales. Los probióticos se utilizan para aumentar la resistencia contra microorganismos patógenos y estimular el sistema inmunológico.

Este trabajo tiene como objetivo revisar esta modalidad terapéutica, poco investigada en perros, de uso creciente, y que, por los resultados preliminares que hemos observado en casos clínicos recibidos en el hospital clínico veterinario de la facultad de veterinaria, puede coadyuvar el tratamiento de la diarrea crónica.

# Abstract

---

## **Probiotics, therapeutic use in chronic diarrhea in dog**

Diarrhea is one of the most common problems today in the small animal clinic. While it is important to make a quick diagnosis to establish a causal treatment early, sometimes not clear the cause and treatment is set so unspecific. Probiotics increasingly being introduced to avoid imbalance of intestinal flora and increase immunity system.

The digestive tract health depends on factors such as the normal intestinal flora, nonspecific mechanisms that limit the number of bacteria and the intestinal tract immune system. In the event that any of these factors fail, it will cause a malfunction of the intestine and thus the diarrhea.

Chronic diarrhea is that which persists 3-4 weeks or more, and is most common intestinal problems in adult dogs. In this case a comprehensive study is very important for diagnosis and optimal treatment plan.

As a supplement to this treatment plan, probiotics are increasingly incorporating. Probiotics are live microorganisms that ingested in adequate amounts are beneficial in animal health. Probiotics are used to increase the resistance against pathogens and stimulate the immune system.

This study aims to look over this therapeutic modality, researched in dogs, increasingly used, and that the preliminary results we observed in clinical cases in the Veterinary Hospital of the Faculty of Veterinary, can assist treatment chronic diarrhea.

# Introducción

---

La mayor parte de la salud de los animales proviene del intestino. La salud del intestino es algo crucial en la fisiología y el bienestar del huésped. El tracto gastrointestinal alberga una comunidad microbiana compleja. Cualquier alteración dentro de la microbiota intestinal puede conducir al desarrollo de una multitud de enfermedades y trastornos, como por ejemplo, diarrea, alergias, obesidad y síntomas de estrés. En el tracto digestivo de los mamíferos predominan las bífidobacterias, que son las que colonizan en primer lugar los intestinos. Además podemos encontrar muchas otras especies, según el estado de salud del sistema digestivo predominarán unas u otras familias bacterianas.

En determinados momentos de la vida de un animal se producen ciertos factores exógenos que provocan la ruptura del equilibrio intestinal y todo el sistema digestivo se ve afectado en mayor o menor grado. El primer síntoma de esta ruptura es la diarrea, signo de la debilidad de las defensas intestinales que posibilita a los gérmenes patógenos implantarse, adherirse y proliferar en las células epiteliales del intestino.

La diarrea puede ser aguda o crónica; es importante saber diferenciarlas ya que cada una exige un diagnóstico y una conducta terapéutica diferentes. La diarrea aguda es más frecuente y suele ser autolimitada, necesitando sólo tratamiento sintomático para su resolución. Aunque en algunos animales el tratamiento sintomático inicial resulta inefectivo y la diarrea se convierte en un problema crónico. El diagnóstico y posterior tratamiento del perro con diarrea crónica es un problema para muchos profesionales. Es aquí donde cada vez más se está incorporando cada vez más el uso de los probióticos como coadyuvantes para tratar las diarreas crónicas.

Los probióticos han sido definidos como "microorganismos vivos, que ingeridos en una cantidad adecuada, ejercen efectos beneficiosos sobre la salud, más allá de la nutrición básica".

El concepto de probiótico fue presentado por primera vez por Elie Metchnikoff en 1907, quién demostró que el consumo de productos lácteos fermentados era responsable de la longevidad de ciertos grupos étnicos y sugirió que estos productos manipulaban la flora intestinal para mantener el equilibrio normal entre las bacterias patógenas y no patógenas.

Una variedad de microorganismos, típicamente bacterias ácido lácticas, tales como lactobacilos, bífidobacterias y enterococos, han sido evaluados como potentes probióticos. El tratamiento con probióticos se está utilizando cada vez más en la medicina humana y

veterinaria. Entre las propiedades de los probióticos se incluyen la capacidad de reducir el uso de antibióticos, el aparentemente alto índice de seguridad, y la percepción positiva del público acerca de las terapias " naturales " o "alternativas". Los probióticos son generalmente considerados como seguros, a diferencia de los antibióticos, de los cuales se han reconocido varios efectos adversos.

Se dispone de preparados probióticos comerciales disponibles para uso humano y animal, sin embargo, se ha investigado muy poco acerca de su eficacia.

Es evidente que un número suficiente de microorganismos viables deberán llegar al tracto intestinal y para que esto suceda, los probióticos deben ser capaces de sobrevivir el tránsito por el ambiente ácido del estómago y resistan a la digestión por la bilis.<sup>[2]</sup>

En este trabajo se hará una recopilación de todo ello junto con la comparación de estudios realizados acerca de la eficacia del uso de los probióticos en enfermedades gastrointestinales de nuestros animales de compañía.

## Justificación y objetivos

---

Los objetivos de este trabajo son:

- Hacer una revisión bibliográfica acerca del uso y la eficacia de los probióticos en los perros con diarrea crónica.
- Ampliar los conocimientos acerca de la microbiota existente en el tracto digestivo del perro y del gato, así como de la anatomía y el sistema inmunológico de éste.
- Realizar un breve repaso de la diarrea crónica, sus causas y su tratamiento.
- Investigar acerca del mecanismo de acción de los probióticos, así como sus características más relevantes, usos y especies bacterianas más utilizadas en problemas gastrointestinales en perros.
- Hacer una recopilación y revisión de los estudios ya publicados con evidencias de la eficacia demostrada por los probióticos en distintas especies animales, mediante distintas cepas probióticas y contra varios patógenos en ambientes distintos.

## Revisión bibliográfica

---

### 1. MICROBIOMA

#### 1.1. Qué es el microbioma

El tracto gastrointestinal del ser humano alberga más de 100 trillones de organismos que comprenden aproximadamente unas 500 especies, muchas de las cuales no han sido

identificadas. Estas bacterias pueden ser parásitos, comensales o mutualistas. A las pocas horas de nacer, el tracto gastrointestinal es colonizado por numerosas especies de bacterias, aunque en los mamíferos predominan las bífidobacterias. El paso a una dieta más compleja después del destete permite que la población bacteriana se diversifique. Existen diferencias cruciales entre las bacterias residentes en los humanos y las de otros animales. Cada cepa parece estar asociada a unos efectos concretos sobre otros microorganismos y el hospedador, y fruto de esta interacción se producen perfiles de citocinas específicos y una serie de efectos biológicos.

Las bacterias gastrointestinales han coevolucionado con su hospedador y con el tiempo se han vuelto altamente especializadas. La composición de la microbiota fecal en cada ser humano y en cada animal es única pero estable a lo largo del tiempo.

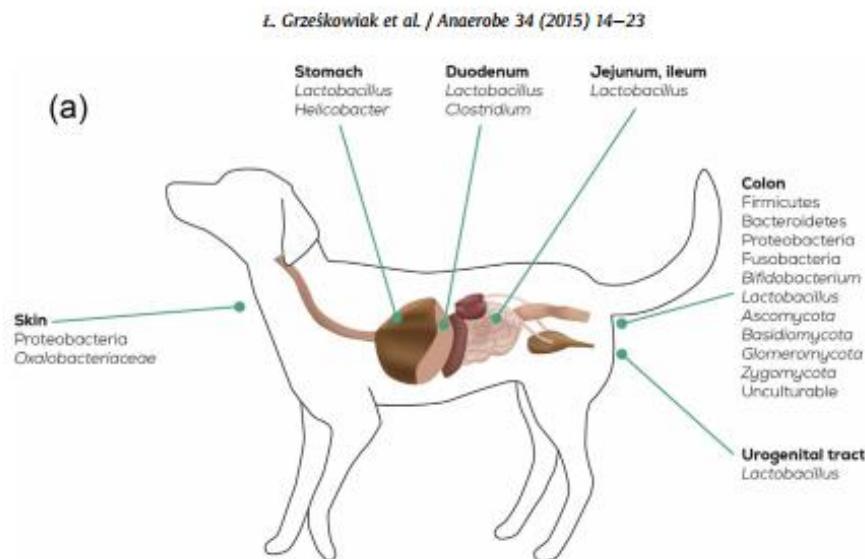
La composición y la actividad de la microbiota se han asociado a varias enfermedades en los animales y sus dueños. Esta interrelación nos sirve para ampliar nuestros conocimientos sobre la microbiota en animales de compañía y la información de cómo la microbiota afecta en la salud de los animales de compañía a largo plazo.

La mayor parte de la salud de los animales proviene del intestino. La salud del intestino es algo crucial en la fisiología y el bienestar del huésped. El tracto gastrointestinal alberga una comunidad microbiana compleja. Este ecosistema microbiano actúa de varias maneras, afectando tanto a la absorción y al metabolismo de los nutrientes, como a nivel trófico y protector del huésped. Cualquier alteración dentro de la microbiota intestinal puede conducir al desarrollo de una multitud de enfermedades y trastornos, como por ejemplo, diarrea, alergias, obesidad y síntomas de estrés.

Los conocimientos acerca de la microbiota intestinal canina y felina se siguen expandiendo. La mayoría de los estudios sobre la comunidad microbiana gastrointestinal del perro y el gato se han realizado mediante técnicas microbiológicas tradicionales, sin embargo, varios informes recientes han estudiado la microbiota utilizando métodos moleculares novedosos como la PCR.

Las familias bacterianas predominantes en el colon y heces tanto de perros como gatos están representadas por *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Fusobacteria*, así como *Eubacterium* en gato. Clostridios predominan en el duodeno y en el yeyuno, y son muy abundantes en íleon y colon, mientras que las bacterias *Fusobacteria* y *Bacteroides* son los más abundantes en el íleon y el colon.

Los lactobacilos habitan comúnmente en todo el intestino del perro, van de las  $10^4$  hasta las  $10^8$  UFC / ml y de entre ellos domina el *Lactobacillus acidophilus*. Además encontramos a *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus fermentum* siendo responsables de la salud intestinal canina. Otros lactobacilos caninos son representados por *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus sanfranciscensis* y *Lactobacillus parapantarum*.<sup>[3,19]</sup>



**Figura 1.** El tracto gastrointestinal canino y sus microorganismos dominantes. (Fuente: L.Grzeskowiak et al.<sup>[3]</sup>)

## 1.2. Por qué es importante el microbioma y cómo cambia con la enfermedad

Estudios recientes ponen en evidencia que una composición saludable de microorganismos en el intestino es necesaria para un desarrollo correcto del sistema inmune gastrointestinal, especialmente para la adecuada producción de IgA mucosal.

La composición del microbioma está muy alterada en ciertas enfermedades tanto en humanos como en perros y gatos. Cuando hay enfermedad, encontramos sobre todo Enterobacterias y *E.coli*, produciéndose un sobre crecimiento de éstas.

De manera específica se ha visto que cambios en la cantidad de enterobacterias se han asociado con la enfermedad inflamatoria intestinal en personas y en perros. Por ello, durante décadas se ha conjecturado que la composición del microbioma puede ser influenciada por una alimentación con probióticos y por tanto desplazando el microbioma hacia una composición más saludable o “normal”. Como se ha dicho ya anteriormente, el microbioma cambia debido

a enfermedades intestinales, como es el caso del IBD, la cantidad de especies será mucho menor.

Los cambios que se producen en las personas con IBD son parecidos a los que padece un perro con IBD. Un perro con IBD su tracto gastrointestinal será rico en enterobacterias y clostridios, y pobre en bacteroidetes y espiroquetas, esto nos servirá como marcador de la salud del intestino. Si no hay un equilibrio se producirá una disbiosis.

Cuando hay diarrea aguda el animal por sí solo puede volver a reequilibrar el microbioma, siempre y cuando el agente que produce la inflamación desaparezca. El problema es cuando se trata de algo crónico, ahí es donde nos preguntamos cómo podemos volver al microbioma sano, y ahí es cuando entran en juego los probióticos.

Sabemos que la composición y el contenido de la alimentación nutricional influyen de forma significativa en la función gastrointestinal, en la composición de la microbiota y sus productos metabólicos en el intestino de los animales. Los buenos piensos ofrecen una buena fuente de todos los nutrientes, vitaminas, minerales y otros componentes necesarios para proporcionar una buena alimentación. A menudo, las preparaciones alimentarias caninas y felinas están enriquecidas con probióticos que ofrecen una modulación de la microbiota y alimentos funcionales dirigidos al bienestar.<sup>[3]</sup>

## 2. ANATOMÍA E INMUNIDAD DEL INTESTINO

El epitelio de la mucosa intestinal está formado por una capa de células formada por: enterocitos, células mucosas “globet”, células endocrinas y células M. En este epitelio se lleva a cabo la absorción de agua, electrolitos y nutrientes, así como la producción de secreciones, enzimas digestivos, inmunoglobulinas y fluidos. Los enzimas tienen una función importante, se encargan de la hidrólisis de los carbohidratos a glucosa, en el caso de alteraciones gastrointestinales se pierde la acción de estos enzimas, se producirá malabsorción y en consecuencia, la diarrea. Además, este epitelio tiene como función mantener una barrera protectora contra todos aquellos agentes que se encuentren en el lumen intestinal.

Esto nos es de gran importancia, ya que enfermedades que producen diarreas, conllevan a lesiones en la superficie del epitelio, alterando así la absorción de fluidos y electrolitos, la mayoría de las veces incrementándose debido al estímulo de origen tóxico o inflamatorio.

El tejido linfoide asociado al intestino se encuentra dentro de la lámina propia y comprende las placas de Peyer. Todo el contenido que llega al aparato gastrointestinal se absorbe a través de los capilares y llega a la circulación portal o a los vasos linfáticos que desembocan en la vena cava.

Hay más actividad inmunitaria en el tejido linfoide asociado al intestino que en cualquier otra parte del organismo. La eficacia de la inmunidad depende de: la eliminación de sustancias dentro del lumen de la mucosa, eliminación o tolerancia a los antígenos que llegan a la mucosa y la regulación de la respuesta inmunitaria. Una vez que el antígeno ha penetrado en el epitelio gastrointestinal induce una respuesta inmunitaria, esta respuesta puede ser de tolerancia o de sensibilidad ante el antígeno. Las células M son enterocitos especializados y actúan como células que presentan antígenos (APC), y los transportan a otros APC como los macrófagos. Así pues, los antígenos que proceden del intestino se procesan y son presentados a los linfocitos por las APC. Los linfocitos serán activados tras reconocer una secuencia específica antigenica, y migrarán desde el tejido linfoide hasta los ganglios mesentéricos y entran en la vena cava. Una vez en la circulación, reconocen unas moléculas específicas en el endotelio de los vasos que les permite volver a la lámina propia. Allí maduran a linfocitos B y células plasmáticas secretoras de IgA. La IgA tiene función protectora, su misión principal es facilitar la eliminación de bacterias, virus y antígenos impidiendo que se adhieran a la superficie de la mucosa.

La presentación de los antígenos a nivel del epitelio intestinal se hace mediante MHC I, y a nivel de las células M mediante MHC tipo II. Los linfocitos T CD8+ (células T citotóxicas) reconocen el antígeno presentado por las células que tienen MHC I y pueden provocar su destrucción. Los linfocitos T CD4+ (células T "helper") reconocen el antígeno presentado por las células con MHC II y promueven el efecto memoria y liberación de citoquinas. Hay varios tipos de linfocitos T "helper": los Th1 secretan IL-2, IFN-, facilitando así la inmunidad mediada por células (activación de macrófagos y efecto citotóxico de las células T). También encontramos Th2 que favorecen la secreción de IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10, que ayudan a las células B a producir anticuerpos. Las citoquinas juegan un papel muy importante, generan un tipo de respuesta inmunitaria para la protección contra agentes infecciosos, además de reducir las respuestas alérgicas o autoinmunes. Los linfocitos T CD4+ juegan un papel muy importante en promover la tolerancia a los antígenos alimentarios, la flora normal del intestino y el desarrollo de la inflamación intestinal. De ahí la importancia que tiene el tratamiento de la inflamación intestinal el regular los linfocitos T CD4+.

La inflamación gastrointestinal es la respuesta celular y vascular del tejido ante una agresión. Es un mecanismo protector mediante el cual macrófagos, complemento, inmunoglobulinas y otras sustancias séricas se concentran en la zona de tejido dañado. El objetivo final de la inflamación es eliminar la causa. Si esto no se consigue la inflamación crónica puede llegar a destruir las células, provocar fibrosis, atrofia de las vellosidades y consecuentemente malabsorción. Además ello conlleva la absorción de antígenos procedentes del lumen intestinal, lo que estimula aún más a la formación de células inflamatorias.<sup>[4]</sup>

### **3. DIARREA CRÓNICA EN PERROS**

#### **3.1. Qué es la diarrea crónica**

En determinados momentos de la vida de un animal se producen ciertos factores exógenos que provocan la ruptura del equilibrio intestinal y todo el sistema digestivo se ve afectado en mayor o menor grado. El primer síntoma de esta ruptura es la diarrea, signo de la debilidad de las defensas intestinales que posibilita a los gérmenes patógenos implantarse, adherirse y proliferar en las células epiteliales del intestino. La diarrea no solo significa un déficit en la absorción del agua, sino también de muchas sustancias nutritivas. De la gravedad de la deshidratación y del desequilibrio electrolítico consiguiente dependerá, incluso, la vida del animal. Si tenemos en cuenta las alteraciones del estado hídrico y las modificaciones a nivel bacteriano de la flora intestinal, esto dará lugar a que nuevos agentes infecciosos puedan asentarse en otros tejidos del organismo.

Como se ha dicho anteriormente la diarrea altera la función normal del tracto digestivo, ello significa que tanto la digestión, como la absorción y la inmunomodulación estarán modificadas.<sup>[4,15]</sup>

Es uno de los problemas más frecuentes en los perros. La diarrea es un aumento en la cantidad de agua en la materia fecal, acompañado de una mayor frecuencia y mayor volumen de las heces. Se ha comprobado que todo cambio brusco de alimentación expone al animal a un síndrome de mal digestión; en este caso, el equilibrio enzimático y la microflora no están en armonía con el sustrato presente en el interior del tracto digestivo.

La diarrea, definida como la emisión de heces blandas o líquidas en mayor frecuencia, es uno de los motivos más comunes en la consulta veterinaria. El diagnóstico y posterior tratamiento del perro con diarrea crónica es un problema para muchos profesionales.

La diarrea puede ser aguda o crónica; es importante saber diferenciarlas ya que cada una exige un diagnóstico y una conducta terapéutica diferentes. La diarrea aguda es más frecuente y suele ser autolimitada, necesitando sólo tratamiento sintomático para su resolución. Aunque en algunos animales el tratamiento sintomático inicial resulta inefectivo y la diarrea se convierte en un problema crónico.<sup>[5,7]</sup>

Hablamos de diarrea crónica cuando una diarrea se prolonga más de dos o tres semanas. Se suele observar síntomas como la pérdida de peso, pelo opaco, apetito variable o vómitos. La diarrea puede ser continua o intermitente. Las causas pueden ser una enfermedad inflamatoria intestinal, un síndrome de mala absorción, desórdenes funcionales del intestino, alteraciones metabólicas o tumores.<sup>[5,15]</sup>

Aquellos animales que padecen diarrea crónica necesitan un diagnóstico específico que permita determinar un pronóstico preciso y así pues poder aplicar después su tratamiento específico.

La diarrea crónica se caracteriza por:

- Desarrollo lento
- El estado general del animal se deteriora paulatinamente
- Dolor abdominal poco marcado
- Grado de hidratación normal o deshidratación leve o moderada
- No suele presentar vómitos
- No responde a tratamientos sintomáticos, hay que tratar la causa.

En general, si la diarrea no ha respondido al tratamiento convencional tras un período de dos a cuatro semanas resulta aconsejable reevaluar el problema e invertir tiempo de nuevo en intentar llegar a un diagnóstico específico. Un diagnóstico específico se basa en la comprensión de la fisiopatología de la diarrea, en una cuidadosa historia clínica, y en la aplicación de una serie de pruebas indicadas para llegar a un diagnóstico concreto.<sup>[5,15]</sup>

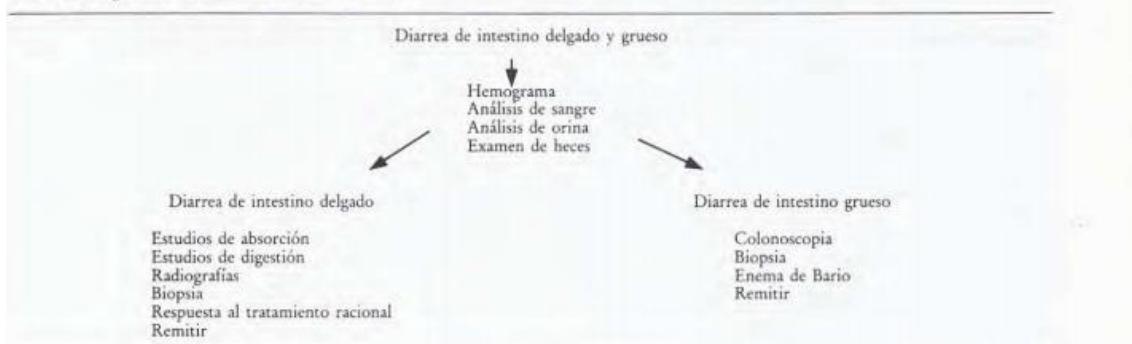
La historia puede indicar la ubicación, la gravedad y la causa probable de la enfermedad. La clasificación de la diarrea en origen en intestino delgado o intestino grueso es de gran ayuda. Una historia meticulosa también debería indicar la presencia de enfermedades extraintestinales como causa subyacente de la diarrea y puede identificar importantes factores predisponentes como la dieta, factores ambientales o la exposición a parásitos, agentes infecciosos, fármacos o toxinas. La historia también debe centrarse en la duración de la

diarrea, la apariencia de las heces, desparasitaciones y vacunas, la frecuencia de defecación, factores agravantes o de alivio, y la urgencia de defecación.

**Tabla 1.** Cuestionario ante una diarrea crónica

1. Duración de la diarrea:	Semanas, meses o años: intermitente o continua.
2. Dieta:	Hipersensibilidades o idiosincrasias dietéticas, cambios dietéticos recientes, acceso a la basura. La diarrea persiste tras el ayuno; efecto de los cambios dietéticos sobre la consistencia fecal.
3. Apetito:	Normal, aumentado, disminuido o voraz. Pica, coprofagia.
4. Aspecto de las heces:	Volumen, color, sangre, moco, flato.
5. Frecuencia de las deposiciones:	Aumentada respecto a lo normal. Accidentes en casa de noche, urgencia.
6. Vómitos:	Presencia o ausencia, frecuencia, naturaleza del vómito, relación con el ritmo prandial.
7. Tenesmo:	Presencia o ausencia; antes, durante o después de la defecación. Descripción del acto de la defecación.
8. Peso corporal y estado general:	Aspecto general del animal; pérdida de peso constatada.
9. Hábitat:	Perro o animal que vive al aire libre o en el interior. Acceso a ambientes infectados o parasitados. Entrenamiento de obediencia, cambio de ambiente, embarque, nuevo animal.
Halitosis en ausencia de patología oral	Presente junto a maldigestión o malabsorción
	Ausente

**Tabla 3.** Diagnóstico secuencial de la diarrea crónica



**Fig. 2 y 3.** Consideraciones diagnósticas sobre la diarrea crónica en perro y en el gato.(Fuente: Burrows et al.<sup>[5]</sup>)

### 3.2. Tipos de tratamiento de la diarrea crónica

Hay tres tipos de tratamientos que podemos utilizar de forma individual o en conjunto. Hablamos pues de modificaciones de la dieta, antibióticos y antiinflamatorios, e inmunosupresores.

La dieta suele ser una parte muy importante en el tratamiento de los procesos que afectan al tracto gastrointestinal. Muchos de los animales suelen mejorar, pero también hay un porcentaje de ellos que no lo hacen o que tienen recaídas durante un periodo de tiempo. Es muy importante realizar una dieta de exclusión estricta, como mínimo durante 60 días. Se necesitan entre 7 y 14 días para que el antígeno de origen alimentario sea eliminado del organismo, y aún más tiempo para que la inflamación disminuya y el aparato gastrointestinal

recupere su función. Podemos utilizar conjuntamente antiinflamatorios al inicio junto con la dieta, y los iremos disminuyendo gradualmente y se retirarán a las 2-3 semanas.

También suele hacerse uso del metronidazol, antibiótico que se usa habitualmente por su actividad antimicrobiana y por sus efectos antiinflamatorios. Pero no hay unos estudios que demuestren exactamente su eficacia a largo plazo. La tilosina es un antibiótico macrólido que se ha descrito como seguro y eficaz como tratamiento. Aunque se desconoce su mecanismo de acción, parece ser eficaz en algunos perros refractarios a otras formas de tratamiento.

Los corticosteroides (prednisona y prednisolona) son medicamentos inmunosupresivos e inmunomoduladores. Los esteroides producen una disminución de la producción de linfocitos a nivel de la medula ósea, así pues la circulación de linfocitos T y B disminuirá. También inhibirán el proceso de presentación del antígeno de las APC y disminuirán la sensibilidad de los linfocitos mediadores de inflamación.<sup>[4,6]</sup>

Pero hay veces que aun haciendo una dieta estricta y llevando a cabo un buen tratamiento con fármacos no se obtienen resultados. Muchas veces tanto los propietarios como los veterinarios acabamos asumiendo como normal que un animal tenga vómito o/y diarreas cada cierto tiempo, pero esto no es normal. Así pues, es importante volver a remarcar que debe realizar en estos casos un diagnóstico completo y detallado. Una vez eliminadas causas como parásitos, enfermedades hepáticas, pancreáticas y endocrinas el siguiente paso será hacer un estudio endoscópico, con el que podremos visualizar y realizar biopsia del estómago e intestinos.<sup>[4,6]</sup>

Por último, la administración de probióticos como *Lactobacillus* spp., pueden complementar la dieta y tienen un efecto modulador en la flora. En medicina humana ya se han realizado varios estudios obteniendo buenos resultados, y aunque empieza a ser más conocido en medicina veterinaria, sobre todo por sus beneficios en los animales con diarrea, aun no se han realizado los suficientes estudios que demuestren su eficacia de forma objetiva.<sup>[4]</sup>

La administración de probióticos a los perros y gatos con enfermedades intestinal inflamatoria por ejemplo, representa una nueva modalidad terapéutica alternativa que exige una mayor investigación. Se ha demostrado que la colitis en los seres humanos y los ratones se asocia a un aumento de los niveles de citoquinas tales como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70 e IL-23. Por lo tanto, es crucial una selección adecuada de las cepas probióticas para el tratamiento de la EII y debe estar basada en la estimación de su capacidad para inducir un patrón de anti-inflamatorio de citoquinas. A parte de los efectos inmunomoduladores, los probióticos tienen un efecto

protector sobre la microflora normal del intestino humano por sus actividades antimicrobianas dirigidas hacia los patógenos intestinales.<sup>[6]</sup>

Los probióticos también se han utilizado para facilitar la erradicación de los parásitos intestinales. Un estudio reciente documentó la capacidad del organismo probiótico *Enterococcus faecium* SF68 (Fortiflora, Nestlé-Purina, St. Luis, MO) para antagonizar la infección por Giardia intestinalis en ratones. La ingestión oral de la cepa de *E. faecium* SF68 desde 7 días antes de la inaculación de trofozoitos de Giardia aumentó significativamente la producción de anticuerpos específicos IgA intestinales y IgG sanguíneos anti-Giardia. Esta respuesta humoral se reflejó a nivel celular con un aumento del porcentaje de linfocitos T CD4+ en las placas de Peyer y en los bazos de los ratones alimentados con SF68. La mejora de las respuestas inmunitarias específicas en ratones alimentados con probióticos se asoció a una disminución del número de trofozoitos activos en el intestino delgado, así como la disminución de la eliminación fecal de antígenos de Giardia.<sup>[1]</sup>

Los probióticos también se han evaluado en guepardos juveniles en cautividad, una población con una incidencia bastante significativa a padecer enteritis bacterianas. La administración de un probiótico específico para la especie que contiene *Lactobacillus* Grupo 2 y *Enterococcus faecium* a 27 guepardos juveniles se asoció con un aumento significativo del peso corporal en el grupo de tratamiento, sin ningún aumento en el grupo de control. Además, la administración del probiótico se asoció con una mejora de la calidad de las heces en el grupo probiótico.<sup>[7]</sup>

## 4. PROBIÓTICOS

### 4.1. Origen

La introducción al mundo de los probióticos se remonta a finales del siglo XIX, principios del siglo XX, en el que un zoólogo y microbiológico ruso llamado Metchnikoff reparó en los efectos beneficiosos que producían algunas bacterias de la flora intestinal. Fijó su atención en el increíble número de personas centenarias que existían en Bulgaria. La razón era que los búlgaros consumían grandes cantidades de yogur, el cual contiene bacterias fermentantes lácticas. Metchnikoff logró aislar la bacteria responsable, y desarrolló un preparado terapéutico utilizando lactobacilo en forma de cápsula, fue entonces cuando se inició la probiótica. Además, Metchnikoff fue defensor del concepto de que la dieta puede proteger al organismo de la invasión de agentes patógenos y mejorar nuestra calidad de vida.

En 1965 Lilly y Stillwell utilizan el término “probiótico” por primera vez, para referirse así a los productos de la fermentación gástrica. La palabra probiótico deriva de dos vocablos, del latín - pro- que significa en favor de, y del griego –bios- que significa vida. Al tiempo se modificó esta definición y se definió al probiótico como a un compuesto de microorganismos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal.<sup>[12]</sup>

En 1989 R. Fuller definió los probióticos como “Aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino”.

Más tarde, en el 1998 el ILSI (International Life Science Institute) de la Unión Europea calificó a los probióticos como microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, no solo efectos nutricionales convencionales, sino que proporcionan un mejor estado de salud y reducen el riesgo de enfermedad.

Desde los inicios de la probiótica con Metchnikoff hasta ahora, han pasado unos 100 años de estudio. Durante todo este tiempo, diversos autores han querido profundizar y conocer más acerca de las funciones de los microorganismos que viven en el tracto digestivo, pero sigue siendo hoy en día una ciencia poco precisa y demostrable.<sup>[8,9]</sup>

#### **4.2. Qué son los probióticos**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a los probióticos como “microbios vivos que administrados al huésped, en las cantidades adecuadas, le confieren una mejora en su salud”. Frecuentemente, aunque no se trata de un requisito obligatorio, son bacterias comensales. Las características probióticas de los microorganismos están vinculadas a la especificidad del hospedador. Por lo tanto, para el uso exitoso de un probiótico, las especies bacterianas deberían ser de origen intestinal del propio hospedador. Por desgracia, la mayoría de los probióticos para animales de compañía no se derivan originalmente de la microbiota gastrointestinal del perro o del gato. Sin embargo, el intestino delgado de ambas especies es rico en microorganismos con potencial probiótico. Los probióticos que se emplean con mayor frecuencia en la clínica de pequeños animales pertenecen a los géneros: *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que forman parte de la flora habitual del colon.<sup>[19]</sup>

Existen varios billones de bacterias que habitan en su mayoría en el tubo digestivo especialmente en el colon. También las encontramos en la boca, intestino delgado, vagina y tracto urinario. Las más importantes son *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, estas nos aportan grandes beneficios.

Como ya hemos dicho, los probióticos son microorganismos vivos, que al ser ingeridos en cantidades adecuadas producen efectos beneficiosos para la salud. Estos efectos sobre la salud están relacionados con la mejoría de enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas intestinales e inmunomodulación. Estos efectos beneficiosos son debidos a que si se ingiere la cantidad adecuada de probióticos produce una modificación del ecosistema de los billones de microorganismos que habitan en el intestino, generando un equilibrio que se manifiesta por un estado de salud, en donde existe competencia por los nutrientes entre los probióticos y los patógenos ingeridos, así como también competencia por los sitios de adherencia, impidiendo la colonización de patógenos y reforzando los mecanismos de defensa estimulando el sistema inmune.<sup>[19]</sup>

Los microorganismos se encuentran en su hábitat natural formando parte de la flora intestinal, componiéndose de infinitas variedades que se encuentran en equilibrio. Cualquier alteración puede producir un desajuste en el equilibrio, lo cual generaría en una serie de reacciones a nivel intestinal cuyos resultados acaban comprometiendo la vida del animal.

Las bacterias residentes en el intestino producen sustancias tanto benéficas como dañinas para el huésped. Las toxinas bacterianas y otros componentes celulares perjudiciales producidos por algunas bacterias, modifican la respuesta inmunológica.

Existen bacterias que ante estímulos estresantes se exacerbán generando un cuadro clínico, es el caso por ejemplo de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. o *Clostridium* spp.

Los principales criterios para la selección de los probióticos son su capacidad para resistir el ácido gástrico y las sales biliares.

#### **Características** de un probiótico:

- Alta concentración de microorganismos viables.
- Estabilidad en condiciones ambientales normales por un periodo no inferior a 30 días.
- Capacidad de las cepas para colonizar el tracto digestivo.
- Influir de modo favorable sobre la flora intestinal y el estado de salud de los animales.

Las características probióticas de los microorganismos están vinculadas a la especificidad del hospedador. Por lo tanto, para el uso exitoso de un probiótico, las especies bacterianas deberían ser de origen intestinal del propio hospedador. Por desgracia, la mayoría de los probióticos para animales de compañía no se derivan originalmente de la microbiota gastrointestinal del perro o del gato. Sin embargo, el intestino delgado de ambas especies es rico en microorganismos con potencial probiótico.<sup>[9]</sup>

EL probiótico ideal debe sobrevivir al tracto gastrointestinal. Llegando intacto al intestino y se alojará allí, donde se adherirá al epitelio para poder colonizar y así aumentar la acidez, lo que impide el desarrollo de agentes patógenos. Debe ser inocuo. La mayoría de los probióticos son bacterias ácido lácticas que forman parte en gran medida de la flora autóctona del intestino. *El Lactobacillus casei* actúa a nivel de intestino delgado, y el *Bifidobacterium* a nivel del colon.<sup>[8]</sup>

También pueden producir problemas de seguridad. Numerosos productos probióticos disponibles en el mercado para el consumo animal de compañía contienen enterococos, como *E. faecium* o *E. faecalis*, habitantes naturales del tracto digestivo del perro y el gato, además de ser cepas específicas que ejercen numerosos beneficios como probiótico en el hospedador. Por otro lado, los enterococos pueden ser patógenos y tienen una gran capacidad para multiplicarse rápidamente.<sup>[3]</sup>

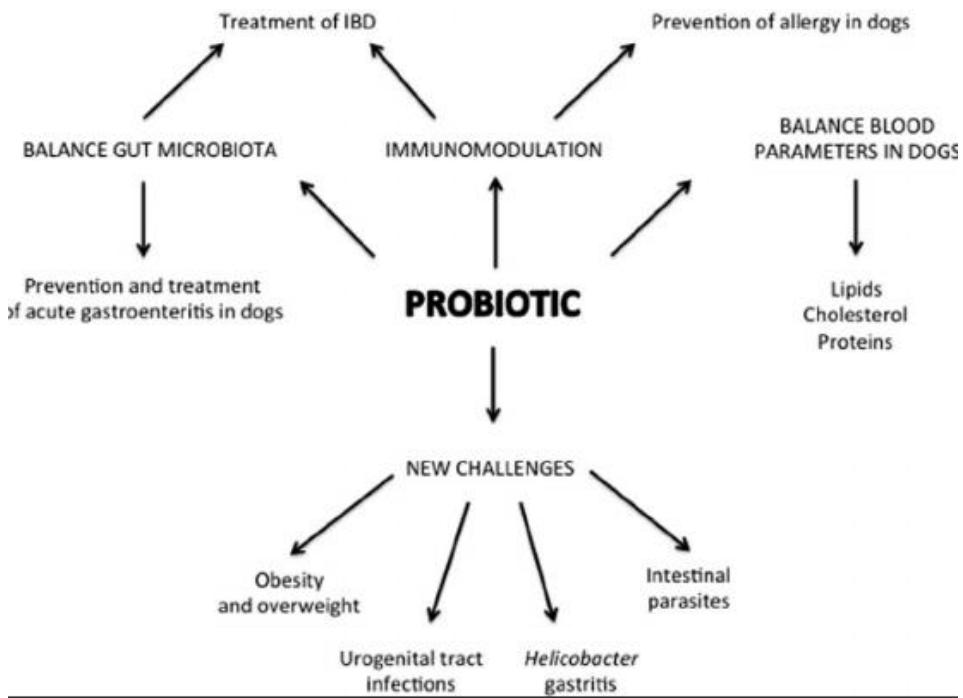
En la Unión Europea los únicos probióticos registrados para ser usados en perros son *Lactobacillus acidophilus* y *Enterococcus (E.) faecium*. Existen grandes variaciones en los controles de calidad de los probióticos que se comercializan. Los problemas pueden ir desde cuestiones de viabilidad a incluir especies que no han sido incluidas en el prospecto. Es importante que las cepas aisladas en el origen hayan sido las que hayan dado lugar a las especies que figuran en la licencia del producto y que existan datos que prueben que sobreviven en el tracto intestinal. Se carece de datos científicos en la mayor parte de los productos, aunque hay un estudio que demuestra que *E.faecium* sobrevive en su paso por el tracto intestinal de los perros en números suficientes (3.3 a 7.3 log<sub>10</sub> CFU/g), incluso en presencia de un 1% de bilis y es la que tiene la mejor tolerancia a pH bajos durante períodos de tiempo prolongados. Su adherencia al moco intestinal canino oscilaba entre el 4% y el 11%.<sup>[19]</sup>

#### **4.3. Cómo trabajan los probióticos y cuál es su mecanismo de acción**

Hay varios modos posibles de acción de los probióticos en el hospedador, en los que se incluyen: producción de compuestos antibacterianos, la competencia por los nutrientes y sitios de adhesión con patógenos potenciales, la alteración del metabolismo microbiano y la estimulación de la inmunidad entre otros.<sup>[8]</sup>

Las posibles ventajas de la utilización de probióticos en animales domésticos incluyen: la modulación del sistema inmune, ayuda en caso de estrés, protección contra las infecciones

causadas por enteropatógenos, mayor crecimiento y desarrollo, control de trastornos alérgicos y recientemente también de la obesidad.<sup>[3]</sup>



**Fig.4.** Beneficios saludables y nuevos retos de los probióticos en la salud de los animales de compañía. (Fuente: L.Greskowiak et al.<sup>[3]</sup>)

Los probióticos son capaces de modular las defensas del hospedador. También pueden afectar directamente a productos microbianos como toxinas, sustancias del hospedador como las sales biliares y sobre ingredientes de la comida. Los probióticos son reconocidos por las células del hospedador y expresan receptores con un patrón de reconocimiento como los receptores de tipo Toll (TLRs) en su superficie. La unión de las bacterias a estos receptores desencadena una cascada de señales intracelulares que lleva a una modulación inmunitaria. La unión a los TLR se ha demostrado ser específica de especie y de actividad. Entre los receptores más importantes de esta familia incluimos los TLR2, TLR9 y NOD2. Independientemente, algunos efectos de los probióticos tanto *in vivo* como *in vitro* demostraron que no necesitaban los TLR. La deficiencia de MyD88 abolió las actividades investigadas. Por ello todavía hay que dilucidar si intervienen otras rutas aparte de las TLR, o una ruta MyD88 dependiente, pero TLR independiente. También se ha sugerido que los probióticos suprimen la activación de la ruta NF- $\kappa$ B. Actúan a nivel de IL-12, del cociente IL-10:IL-12, IL-6, TNF- o IL-8. Varios estudios *in vitro* han demostrado que los probióticos pueden modular el equilibrio entre las citoquinas Th1, Th2 y Th17 en el intestino. En este punto se ha prestado mucha atención a la habilidad de los probióticos para inducir el desarrollo de las células T reguladoras (Tregs).

Por ejemplo, dos cepas de *Lactobacillus* han demostrado que estimulan en humanos las células dendríticas inmaduras (Dcs) derivadas de los monocitos y desencadenan su diferenciación en Dcs reguladoras que entonces podían producir Tregs inducidos por la IL-10.

#### **4.4 Cuál es su uso en el tratamiento de la diarrea crónica**

El origen de los probióticos constituye la base de prevención y tratamiento de los trastornos y las enfermedades de los animales de abasto. Recientemente, se han empezado a destinar también a los animales domésticos, especialmente perros y gatos, además van ganando popularidad cada vez más entre los propietarios, proporcionando los primeros productos con eficacia probada. Por lo tanto, complementar la dieta de los animales con probióticos parece ser una forma esencial para ayudar a mantener y promover una salud gastrointestinal óptima y el bienestar de los animales.<sup>[3]</sup>

Los probióticos en los cánidos se utilizan para aumentar la resistencia contra microorganismos patógenos y estimular el sistema inmunológico principalmente. Son diversas las formas en que los probióticos se utilizan para mejorar la resistencia del huésped contra los microorganismos patógenos, como ya hemos dicho anteriormente sus efectos se basan en el efecto barrera, la competencia por los sitios de adhesión y por nutrientes, las modificaciones del hábitat intestinal por cambios en el pH y la producción de sustancias antimicrobianas, entre otras.

Son varios los microorganismos reconocidos como probióticos, no todos ellos tienen el mismo efecto y mismo mecanismo de acción, como tampoco podemos asumir que se produzcan efectos positivos en todos los casos.

Actualmente se están obteniendo más resultados en este campo como por ejemplo: microorganismos probióticos como *Lactobacillus platarum* 299 y *Lactobacillus rhamnosus* GG inhiben la adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena, eliminando los organismos patógenos de las células epiteliales del intestino, incrementando la mucina intestinal MUC2 y MUC3.<sup>[9]</sup>

Los conocimientos acerca de la utilidad de los probióticos en la enteropatía crónica en los perros son limitados. Sólo dos estudios han evaluado los probióticos *in vivo* en perros con enfermedades gastrointestinales crónicas. Uno usó una combinación de diferentes lactobacilos en los perros con FRD (food responsive diarrhea), en comparación con un grupo tratados con placebo; el otro se trata de un producto que está disponible en el mercado para los seres humanos, contiene ocho cepas diferentes de bacterias.

En el estudio FRD, todos los perros mejoraron clínicamente después del tratamiento, pero los patrones de citoquinas de la mucosa intestinal no se correlacionaron con el resultado clínico o

la suplementación con probióticos. En el segundo estudio, todos los perros mejoraron también, con un aumento de FoxP3 reguladores positivos de linfocitos T (Tregs), así como un aumento de *Faecalibacterium prausnitzii* (supuestamente protectora) en muestras fecales observados.<sup>[16,17,19]</sup>

Estos dos estudios serán profundizados en el siguiente apartado.

#### **4.5. Comparativa de estudios realizados y evidencias sobre su eficacia en los problemas gastrointestinales de los pequeños animales**

Se han realizado varios estudios acerca de la eficacia de los probióticos en distintas especies animales. A partir de ellos se ha querido aplicar estos resultados al estudio de la eficacia en enfermedades gastrointestinales de pequeños animales. A continuación se hará una revisión de algunos de ellos:

- ❖ J. Scott Weese y Mauren E.C. Anderson<sup>[13,20]</sup> realizaron un estudio evaluando la eficacia de *Lactobacillus rhamnosus* cepa GG en perros, del cual obtuvieron estas conclusiones:  
Uno de los probióticos más estudiados en la medicina humana es la cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). Se ha demostrado que esta cepa sobrevive a los ácidos digestivos y la bilis, además de colonizar el tracto gastrointestinal de los seres humanos. También posee propiedades adhesivas de gran alcance, suprime la actividad de la enzima bacteriana, pueden desplazar o eliminar ciertos componentes de la flora intestinal normal, y produce una sustancia antimicrobiana activa contra una variedad de bacterias, incluyendo *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacteroides spp.*.

Estudios recientes utilizando modelos animales han sugerido que la LGG puede ser beneficiosa en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y colitis ulcerosa en seres humanos. Estos resultados sugieren que los probióticos, particularmente LGG, podrían ser de utilidad en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales caninas.

Algunos autores consideran que los organismos probióticos deben ser de origen natural de la misma especie para ser eficaz. Sin embargo, la eficacia de especies cruzadas ha sido demostrada para algunas cepas de probióticos, incluyendo LGG. Por lo tanto, a pesar de ser de origen humano, LGG puede poseer propiedades probióticas en los perros. Sin embargo, antes de evaluar la eficacia de cualquier probiótico, debe ser demostrado que el organismo tiene la capacidad de sobrevivir el tránsito a través del tracto gastrointestinal

del huésped. La supervivencia y la colonización intestinal fecales son un requisito previo para la eficacia.

Este estudio fue diseñado para determinar la capacidad de LGG para sobrevivir adecuadamente el tránsito intestinal en perros, para evaluar su supervivencia intestinal dependiendo de la dosis, y para determinar si se producen efectos adversos después de la administración LGG.

El estudio se hizo con 5 grupos, uno control al que no se le administró LGG, y los otros 4 con concentraciones distintas de LGG durante 5 días.

Resultados: *Lactobacillus rhamnosus* GG no se detectó en las heces de cualquier perro antes de administrarlo. No se observaron efectos adversos. La cepa de *Lactobacillus rhamnosus* GG no estaba presente en las heces de los perros del grupo control en cualquier punto del estudio. Niveles detectables de LGG estaban presentes en las heces en casi todos o todos los perros de cada grupo (dependiendo de la concentración administrada).

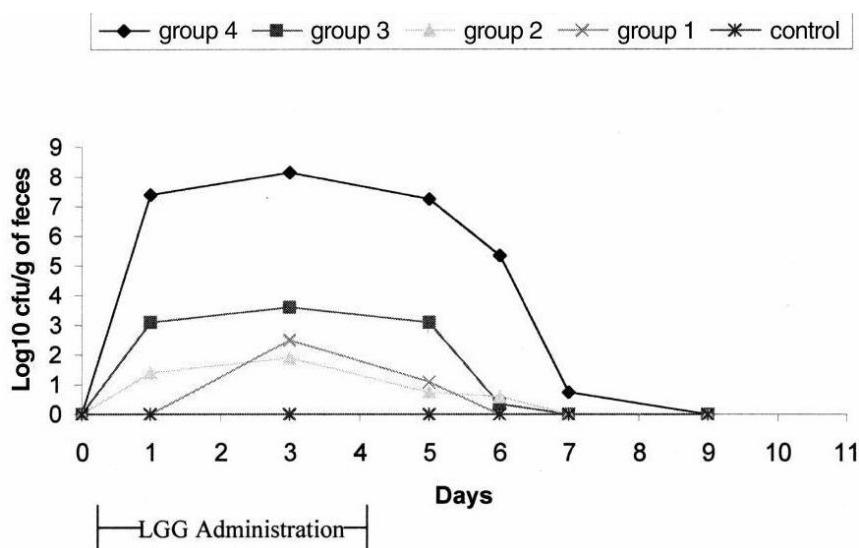


Fig.5. Recuperación fecal tras la administración *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) en perros. (Fuente: Weese and Anderson et al.<sup>[13]</sup>)

Este estudio ha demostrado que LGG puede sobrevivir el tránsito gastrointestinal en perros y hacerlo sin causar efectos adversos clínicamente evidentes. La razón de que se detectó LGG en niveles relativamente altos en las heces de algunos perros, mientras que se detectaron niveles bajos o nulos en otros perros administrados con la misma dosis no está clara. Las diferencias en la microflora gastrointestinal entre los perros podrían desempeñar un papel en la variación que se observó en el estudio. Se cree posible que la cepa LGG, por ser de origen humano, se adapte mucho mejor al tracto gastrointestinal humano en una dosis menor que la requerida en los perros.

- ❖ Lukasz Grezeskowiak y su equipo <sup>[2,12,21]</sup> trabajaron en los probióticos y el bienestar del perro y el gato basado en los siguientes estudios de varias cepas probióticas:

A pesar de que los lactobacilos forman una pequeña parte del microbioma gastrointestinal canino, son de amplia difusión, y han sido varias las cepas aisladas en laboratorio, incluyendo especies de *Lactobacillus*, que demuestran tener actividad antimicrobial *in vitro* y que sobreviven y dominan la pequeña microbiota LAB intestinal durante la alimentación, además de tener la capacidad de modificar el microecosistema intestinal. Además, tres lactobacilos caninos, *L. fermentum* VET9A, *Lactobacillus plantarum* VET14A, *L. rhamnosus* VET16A y la mezcla de ellos, han demostrado una buena capacidad de adhesión a la mucosa intestinal canina y ser capaces de excluir la adhesión de enteropatógenos comunes (*Enterococcus canis*, *C. perfringens*, *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium*) de la mucosa intestinal canina *in vitro*. Por lo tanto, bacterias ácido lácticas específicas, incluyendo lactobacilos, pueden servir como potenciales probióticos para uso canino.

Una nueva cepa probiótica potencial *L. fermentum* AD1, aislada a partir de heces caninas expresa su supervivencia en vitro en un pH 3,0 después de 3 horas y en presencia de 1 % de bilis. La cepa se adhirió a la mucosa intestinal canina.

Además en un estudio en el que se evaluó la calidad de *L. acidophilus* DSM13241 como aditivo en pienso de perros adultos sanos, el probiótico demostró ser estable en la alimentación seca. También sobrevivió por todo el tracto digestivo canino, aumentando así el número de lactobacilos y disminuyendo clostridios en heces, además de mejorar los parámetros sanguíneos e inmunológicos. Se ha demostrado también que tanto *L. animalis* LA4 y *B. animalis* AHC7 reducen la cantidad de *Clostridium difficile* en perros.

En un estudio en perros sanos, se administró durante 18 días el probiótico *E. faecium* NCIB 10415, aumentando la cantidad de *Salmonella* y *Campylobacter*, mientras que los niveles de Clostridium se redujeron significativamente.

La microbiota gastrointestinal canina también puede ser una fuente de bifidobacterias con potencial probiótico. Nuevos aislamientos de la cepa canina de *B.animalis* spp. *lactis* probaron su supervivencia en el ensayo simulado de digestión *in vitro*, y fueron resistentes a las sales biliares y pH bajos, y demostrado una fuerte actividad de auto-agregación . Por lo tanto, estos podrían ser testados como nuevos probióticos potenciales para perros.<sup>[3]</sup>

- ❖ S. Schmitz y colaboradores<sup>[14,23]</sup> realizaron un estudio acerca de la eficacia del probiótico *Enterococcus faecium* del cual no obtuvieron un resultado significativo:

*Enterococcus faecium* NCIMB 10415 E1707 está disponible comercialmente como un probiótico o simbiótico para pequeños animales tanto en Europa como en los EE.UU. (cepa SF68). La cepa ha mostrado buenas propiedades con respecto a la supervivencia en el tracto gastrointestinal superior, adhesión a la mucosa intestinal canina y persistencia en las muestras de heces, pero no ha sido ampliamente probado. No hay información disponible acerca de la eficacia de este probiótico específico en perros con el CE.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el beneficio clínico del tratamiento con un producto simbiótico (con EF) en perros con FRD (food responsive diarrhea). Además, fueron registrados los datos clínicos, las puntuaciones endoscópicas, histologías intestinales y la expresión del gen de la mucosa para una variedad de genes asociados con el reconocimiento microbiano y la modulación del sistema inmunitario en el intestino, evaluados antes y después para ver si EF puede inducir un entorno más antiinflamatoria.

Resultados: de 51 Posibles casos, pero solo 12 acabaron el estudio. Siete perros habían sido asignados al azar para recibir el producto simbiótico y 5 para recibir placebo. No hubo efecto en el tratamiento probiótico. No hubo diferencias significativas en las variables hematológicas y bioquímicas, por ejemplo, las concentraciones de folato en suero entre los 2 grupos, los perros tratados con placebo tenían concentraciones séricas más altas de folato que los perros tratados con el simbiótico. No se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes examinados entre ambos grupos.

En conclusión, este estudio no tiene suficiente potencia como para hacer declaraciones con respecto a un posible efecto adicional de EF en los signos clínicos o la expresión de genes en biopsias intestinales en perros con FRD (food responsive diarrhea).

- ❖ S.N. Sauter y cols. <sup>[11]</sup> hicieron un estudio acerca de la expresión de citoquinas en perros con diarrea crónica tratados con probióticos, obteniendo estos resultados:

Hay evidencias de que los probióticos producen un efecto de modulación sobre la inflamación intestinal durante enteropatías crónicas. En un sistema de cultivo *ex vivo* se investigó la influencia de los probióticos en el ARNm y los niveles de expresión de proteínas de citoquinas en las muestras intestinales de los perros que sufren de la CE.

El mRNA abundante de interleucina IL- 10, IL- 12p40, el interferón (IFN)- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , y factor transformador de crecimiento (TBV)- $\beta$ 1 se analizó por

reacción en cadena polymerasa en tiempo real (RT- PCR). Concentraciones de proteína de IFN- $\gamma$  e IL- 10 se midieron en el sobrenadante de cultivo por ELISA.

Con el fin de probar la capacidad de regulación de citoquinas mediante tres *Lactobacillus* spp. en un intestino canino sano y otro inflamado, añadimos las bacterias probióticas en muestras intestinales de duodeno en un sistema de cultivo *ex vivo*.

Se hizo una hipótesis basada en que el cóctel probiótico influye en la transcripción de citoquinas seleccionadas pro-inflamatorias, en el factor de necrosis tumoral, en la interleucina- 12p40, y la regulación de las citoquinas y en el factor de transformación del crecimiento, lo que potencialmente tienen efectos beneficiosos en la salud intestinal.

Como resultado, no se obtuvieron resultados significativos en los parámetros antes nombrados una vez adicionado el cóctel probiótico.<sup>[2]</sup>

Aunque hubo una regulación general de células pro-inflamatorias así como una regulación de citoquinas, no había una regulación predominantemente de IL- 10 y en menor medida de TGF. Esto afecta en que la producción de IL- 10 y TGF a su vez ayudan a regular a la baja la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en otras células del sistema inmune durante la inflamación crónica.

Pocos estudios han investigado los efectos de las bacterias probióticas en los perros. Por lo que sabemos, este estudio es el primero en utilizar aislamientos caninos específicos de *Lactobacillus* spp. y para analizar los efectos de las bacterias probióticas en la expresión de citoquinas en el CE de pacientes caninos. Los patrones de expresión de citoquinas en muestras de duodeno fueron influenciados por el PC, aunque pocos efectos fueron estadísticamente significativos.

- ❖ K.W. Simpson y su equipo<sup>[9,11,22]</sup> repararon en la influencia del probiótico *Enterococcus faecium* SF68 en Giardiasis en perros. El control de la giardiasis puede ser problemático. Los métodos dietéticos destinados a la disminución o eliminación de los perros infectados por Giardia puede proporcionar un medio valioso para tratar la giardiasis endémica. Los probióticos ofrecen un enfoque no farmacológico para la gestión de varios patógenos gastrointestinales, como la Giardia. *Enterococcus faecium* SF68 y *Lactobacillus casei* han demostrado reducir la carga de Giardia en ratones. El efecto beneficioso de los probióticos en ratones puede reflejar un efecto directo en Giardia, así como mejorar la adaptación y la respuesta inmune innata, como la producción local de inmunoglobulina A (IgA) y el aumento de la fagocitosis. Del mismo modo, *E. faecium* SF68 ha sugerido que poseer propiedades inmunomoduladoras en ratones, gatos, perros y cerdos.

Sin embargo, no hay evidencias de la eficacia contra la Giardia en los animales no roedores.

Trataron de determinar si en los perros adultos con infección crónica por Giardia se producía un aumento de sus respuestas inmunitarias innatas y adaptativas y una disminución del parásito, alimentándolos con una dieta que contenía *E. faecium* SF68. Se realizaron dos grupos, uno al cual se le administraba el probiótico y al otro el placebo.

Resultados: la presencia fecal de quistes de Giardia no difirió entre los períodos. La carga de antígeno de Giardia en heces no fue diferente entre los tratamientos. No había pruebas de la inmunidad adaptativa regulada al alza entre los grupos, las concentraciones de IgA no difirió entre tratamientos, aunque el grupo B (grupo probiótico) los perros tenían concentraciones más altas de IgA que el grupo A. la inmunidad innata según la evaluación de la fagocitosis, no difirió entre los grupos.

Después de 3 semanas de suplementación, no se encontraron cambios en la IgA fecal o sobre la inmunidad innata o adaptativa en perros adultos. Estos datos sugieren que la suplementación con probióticos a corto plazo con SF68 en perros adultos con giardiasis crónica no es válida como complemento a la terapia o para la gestión de la giardiasis.

Este estudio no pudo demostrar ningún efecto de la ingestión a corto plazo del probiótico SF68 en Giardia.<sup>[11,16]</sup>

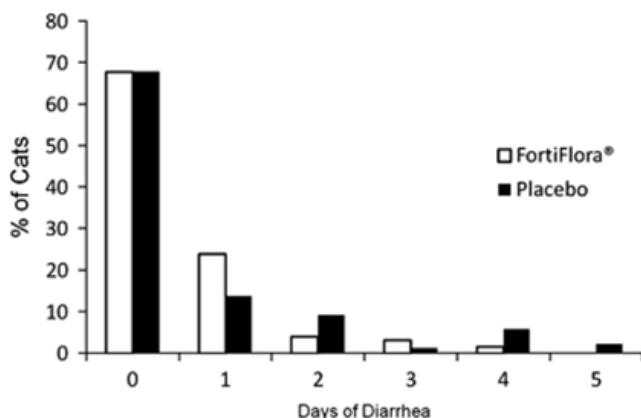
- ❖ S.N Bybee, A.V. Scorza y M.R. Lapin<sup>[1]</sup> trabajaron el efecto del probiótico *Enterococcus faecium* SF68 en perros y gatos con diarrea en un centro de acogida.

*Enterococcus faecium* cepa SF68 es un probiótico administrado con muchos efectos beneficiosos probados. En los estudios de perros, la alimentación con el probiótico llegó a reducir las concentraciones fecales de *C.perfringens*, y aumentó los niveles de las bacterias potencialmente beneficiosas *Bifidobacteria* spp. y *Lactobacilli* spp.

En otro estudio, los gatos alimentados con un placebo tenían baja diversidad de microbiota fecal, comparado con los alimentados con SF68. Aumentos estadísticamente significativos en las concentraciones medias séricas de IgA se detectaron en perros alimentados con SF68 con el tiempo en comparación con un grupo placebo. Por último, cuando se administra de forma continua, este probiótico ha demostrado tener potencial para la modulación de la actividad inmunitaria en perros y gatos.

En este estudio, se plantea la hipótesis de que los perros y los gatos alojados en un refugio de animales alimentados con SF68 serían menos propensos a tener diarrea de más de 2 días de duración en comparación con el grupo placebo. Se realizó el estudio con 217 gatos y 182 perros. Cada especie dividida en dos grupos, uno tratado con probióticos y otro

grupo tratado con placebo. En el grupo de los probióticos se administró 4 semanas E. Faecium, se descansó una semana, y se volvió a dar 4 semanas más. El porcentaje de gatos con diarrea más de dos días fue significativamente más bajo en el grupo de los probióticos (7,4%) que el grupo placebo (20,7%). No se detectaron diferencias en heces o signos clínicos entre ambos grupos.



**Fig.6.** Distribución de frecuencia de la diarrea en base a un grupo de gatos en tratamiento durante un periodo, no hubo diferencias globales entre los grupos. (Fuente: Scorz and Lappin et al.<sup>[1]</sup>)

En los perros, no se observaron diferencias estadísticas pero esto puede estar simplemente relacionado con el bajo número de perros que tenían diarrea más 2 días en el transcurso del estudio. La duración media de la estancia de los grupos SF68 y placebo fue de 2 y 3 días, respectivamente.

Ha habido otros estudios de administración de SF68 a los perros o los gatos alojados en las instalaciones de investigación que sugerían que este probiótico tiene un potencial efecto de mejora del sistema inmune. En el estudio, los cachorros alimentados SF68 se compararon con un grupo placebo y fue estadísticamente demostrado, que estos tenían mayores concentraciones totales de IgA plasmática, altas concentraciones fecales de IgA, y un aumento de las concentraciones de IgG e IgA plasmática específicas de virus del moquillo después de la vacunación.

- ❖ VSL#3<sup>[16]</sup> es un producto probiótico multi-cepa que contiene bacterias liofilizadas viables que consta de 4 cepas de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* y subsp. *Bulgaricus*), 3 cepas de *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve* y *B. infantis*), y 1 cepa de *Streptococcus thermophilus* subsp *sulivarius*. Las cepas de VSL#3 han demostrado

eficacia en humanos para la prevención, el tratamiento y mantenimiento de la remisión de la resrvoritis y la colitis ulcerosa en adultos y niños.

El objetivo del presente estudio fue realizar un ensayo abierto aleatorio para comparar los parámetros microbiológicos, histológicos y efectos inmunomoduladores entre la multi-cepa SIVOY probiótico comercial, un producto probiótico formulado con VSL#3 cepas para los animales domésticos (VSL Pharmaceuticals, Inc., Gaithersburg, MD, EE.UU.) y la terapia de combinación con prednisona y metronidazol en caninos EII.

Los resultados obtenidos sugieren un efecto protector de la mezcla de probióticos en los perros con EII, con una disminución significativa en las puntuaciones clínicas e histológicas, y una disminución en la infiltración de células T CD3 +. La protección se asoció con un aumento de los marcadores de células T reguladoras (FoxP3 + y TGF-β +), observados específicamente en el grupo de tratados con probióticos y no en los animales que recibieron la terapia de combinación. El efecto protector de los probióticos VSL#3 cepas también se asoció con la normalización de la disbiosis, aumentando específicamente en *Faecalibacterium* spp.

En este estudio, 20 perros con EII escogidos de forma aleatoria recibieron un probiótico, durante un tiempo determinado, que contiene VSL#3 cepas (SIVOY) o una terapia de combinación de prednisona y metronidazol. Utilizando un análisis estadístico que tenga en cuenta las diferencias entre los grupos de tratamiento al inicio del estudio (T0), así como de post- tratamiento (T1), observamos diferencias en algunas de las variables evaluadas en función del régimen de tratamiento. Puntuaciones de histología, CIBDAI, y la infiltración de la mucosa con células T CD3 + disminuyeron significativamente en ambos grupos de tratamiento, y no hubo efecto significativo entre los dos tratamientos. Las células T FoxP3 + aumento en los perros tratados con VSL # 3, pero no en el grupo D - CT. Mientras que las células TGF- beta + aumentaron significativamente en ambos grupos de tratamiento, la magnitud del aumento fue significativamente mayor en los perros tratados con VSL#3. La expresión de ocludina y claudina- 2 también fue significativamente diferente entre los perros tratados con VSL probiótico # 3 en comparación con la terapia de combinación.

La terapia probiótica es cada vez más popular en la medicina veterinaria, y ha sido recomendado para el tratamiento o la prevención de una variedad de trastornos

gastrointestinales. Sin embargo, hay pocos estudios objetivos disponibles que acrediten la eficacia clínica de los probióticos para la gastroenteritis. La administración de probióticos a los perros con EII es objeto de nuevas investigaciones. Se ha demostrado que la colitis en los seres humanos y los ratones se asocia con aumento de los niveles de citoquinas tales como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70 e IL-23. Por lo tanto, una selección adecuada de cepas probióticas para el tratamiento de IBD es crucial y debe basarse en su potencial capacidad para inducir un patrón anti-inflamatoria de citoquinas (IL-10high, TGF- $\beta$ high, IL-12p70low, IL-23low, TNF - $\alpha$ low) y atenuar la inflamación intestinal. Aparte de sus efectos inmunomoduladores, se ha sugerido que los probióticos tienen un efecto sobre el microbioma intestinal por sus actividades antimicrobianas dirigidas hacia patógenos intestinales. En los seres humanos, VSL # 3 mostró una eficacia para el mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerosa. Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que investiga los parámetros microbiológicos, histológicos y efectos inmunomoduladores de VSL#3 en perros con EII y comparar estos efectos con una terapia de combinación de uso común con prednisona y metronidazol.

## Discusión

---

¿Qué pueden aportar los probióticos en el tratamiento de intolerancias alimentarias en perros?

En nuestra experiencia hemos utilizado los probióticos en caso de diarreas crónicas por intolerancia alimentaria, y algunos casos de enteritis linfoplasmocitaria, observando mejorías en el acortamiento del tiempo de normalización de la diarrea, aunque no hemos observado una curación completa en ninguno de los casos. Otro objetivo del uso de los probióticos por nuestra parte en los casos de enteritis linfoplasmocitaria, es el observar si al utilizarlos podemos reducir la dosis de corticoide; no hemos encontrado en la bibliografía ningún estudio sobre este aspecto. Por nuestra experiencia hemos tenido resultados contradictorios, hubo dos casos en el que el uso de probióticos permitió llegar a dosis más bajas de metilprednisolona sin signos clínicos de diarrea, pero con el tiempo hubo que subir la dosis del corticoide para evitar las crisis de diarrea.

En el caso de otros tipos de diarreas crónicas no infiltrativas, se ha podido comprobar que la prescripción de un complemento alimenticio probiótico, reduce el tiempo de convalecencia, puede satisfacer las expectativas del propietario para el tratamiento y por lo tanto es de

esperar que contribuye a aumentar el cumplimiento de otras instrucciones del tratamiento, como el ayuno y cambios en la dieta. La terapia probiótica es también una opción prometedora para reducir el uso indiscriminado de antibióticos a menudo se inicia en los casos de enfermedad gastrointestinal aguda en los perros.

## Conclusiones

---

Las alteraciones en la microbiota facilitan la exposición del tracto gastrointestinal a agentes patógenos, así pues, es importante estudiar nuevas herramientas para proteger a los perros y gatos, así como a sus dueños, de estos agentes. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar productos destinados a mejorar el bienestar de los animales de compañía, y los probióticos son excelentes candidatos. La evidencia actual sugiere que las cepas probióticas específicas y/o sus combinaciones pueden ser útiles en la nutrición canina y felina. Los probióticos de origen humano parecen estar entre las nuevas herramientas prometedoras para el mantenimiento de la salud de nuestras mascotas. Sin embargo, los microorganismos derivados del mismo huésped pueden ser la fuente de probióticos más adecuada. La posibilidad de reducir riesgos de seguridad asociados a los nuevos microorganismos probióticos en los nuevos sistemas de bienestar y salud animal serán valorados.

Como hemos podido comprobar en la revisión de estudios aún no se ha llegado a obtener unos resultados significativos acerca de la eficacia de los probióticos en el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales en perros y gatos. Aun así, se ha podido comprobar que varios estudios *in vitro* han demostrado que los probióticos pueden modular el equilibrio entre las citoquinas Th1, Th2 y Th17 en el intestino. En este punto se ha prestado mucha atención a la habilidad de los probióticos para inducir el desarrollo de las células T reguladoras. Así pues, es capaz de desarrollar un patrón anti-inflamatorio de citoquinas, capaz de modular la respuesta inmunitaria mediante un aumento de IgA. Además de mejorar los aspectos clínicos gastrointestinales, es decir, disminuye el número de animales con heces blandas y acorta la duración de la diarrea.

En base a nuestra experiencia y la bibliografía estudiada, el uso de probióticos es interesante en la fase inicial del tratamiento, junto con la dieta y el tratamiento estándar. Por lo que hemos podido comprobar los probióticos más utilizados constan de microorganismos como *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus*.

En definitiva, el uso de probióticos ayuda de forma clara al sistema inmune en unas cuantas especies, incluyendo perros y gatos y parece tener un papel en el tratamiento de algunas enfermedades gastrointestinales, pero se necesitarán realizar estudios más grandes empleando aquellas cepas de probióticos que cuenten con registro con el fin de dar al clínico la información necesaria sobre su eficacia en las diferentes patologías.

## Conclusions

---

Alterations in the microbiota facilitate exposure to pathogens gastrointestinal tract, thus it is important to study new tools to protect dogs and cats and their owners, of these agents.

Therefore, there is a need to develop products to improve the wellness of companion animals, and probiotics are excellent candidates. Current evidence suggests that specific probiotic strains and / or combinations thereof may be useful in canine and feline nutrition. Probiotics of human origin appear to be among the promising new tools for maintaining the health of our pets. However, microorganisms derived therefrom can be the source host most suitable probiotics. The possibility of reducing security risks associated with new probiotic microorganisms in the new systems of welfare and animal health will be assessed.

As we have seen in the review of studies it has not yet come to obtain significant results about the efficacy of probiotics in the treatment of gastrointestinal diseases in dogs and cats. Even so, it has been found that several *in vitro* studies have displayed that probiotics can modulate the balance between Th1, Th2 and Th17 cytokines in the intestine. At this point, it has paid much attention to the ability of probiotics to induce the development of regulatory T cells. So, it is able to develop an anti-inflammatory cytokine pattern, able to modulate the immune response by increasing IgA. In addition to improving gastrointestinal clinical aspects, ie, it decreases the number of animals with loose stools and shortens the duration of diarrhea.

Based on our experience and the literature studied, the use of probiotics is interesting in the initial phase of treatment, along with diet and standard treatment. So we have seen the most commonly used probiotics consist of microorganisms such as *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*.

In short, the use of probiotics helps clear the immune system forms in a few species, including dogs and cats and seems to have a role in treating some gastrointestinal diseases, but they need to make larger studies using those strains of probiotics that have with registration in order to give the clinician the necessary information on their effectiveness in different pathologies.

# Valoración personal

---

Me decidí por este tema porque los problemas gastrointestinales en nuestros animales de compañía están a la orden del día, al igual que sus tratamientos.

El uso de probióticos como tratamiento alternativo o “natural” cada vez es más utilizado por los profesionales. Como hemos visto durante el trabajo, los probióticos aportan un equilibrio a la flora intestinal, también tiene efectos protectores, inmunológicos y reducen el uso de antibioterapia en el tratamiento estándar. Pero a la vez se trata de una rama muy poco estudiada, en la que aún debe de trabajarse mediante estudios ya sea *in vitro* como *in vivo*.

Este trabajo me ha permitido aprender más acerca del funcionamiento de la microbiota, la diarrea y sus tratamientos. He podido profundizar en el origen, mecanismo de acción y usos de los probióticos, así como su eficacia en la diarrea crónica.

Pero ninguno de los estudios antes comentados me ha dado una idea clara y objetiva de la eficacia del uso de probióticos en patologías gastrointestinales en perros, por lo que se necesitará hacer otros ensayos clínicos en perros y gatos que arrojen nueva luz sobre la eficacia de los probióticos en estas enfermedades.

## Bibliografía

---

1. Bybee, S. N., Scorza, A. V. and Lappin, M. R., 2011. Effect of Probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on Presence of Diarrhea in Cats and Dogs Housed in an Animal Shelter. J Vet Intern Med; 25:856-860.
2. Pascher, M., Hellweg, P., Khol-Parisini, A., Zentek, J., 2008. Effects a probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain on feed tolerance in dogs with non-specific dietary sensitivity. Archives of Animal Nutrition, 62:2, 107-116.
3. Grzeskowiak, L., Endo, A., Beasley, S., Salminen, S., 2015. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. Anaerobe 34 14-23.
4. Font Utset, A., Melián, C., Roura López, X., 2007-2011. Diarrea crónica de intestine Delgado y grueso: algo más que cambios de dieta (I y II). Formación continuada AVEPA 27-39.

5. Burrows, C.F., 1988. Consideraciones diagnósticas sobre la diarrea crónica en el perro y el gato. Ponencia presentada en las V Jornadas de AMVAC, Madrid, 61-69.
6. Stanley, L. Marks, BVSc, PhD, DACVIM, DACVN, 2013. Cómo trato perros con enfermedad inflamatoria intestinal. UC Davis School of Veterinary Medicine, Davis, CA 95616. SEVC AVEPA.
7. Stanley, L. Marks, BVSc, PhD, DACVIM, DACVN, 2013. Guía para el diagnóstico y tratamiento de la diarrea crónica en perros. UC Davis School of Veterinary Medicine, Davis, CA 95616. SEVC AVEPA.
8. Gómez, G. J., Los probióticos, una alternativa en el tratamiento de enfermedades. En <http://www.monografias.com/trabajos16/probioticos/probioticos.shtml>.
9. Torres Villar, M., Los probióticos, su uso terapéutico en animales. En <http://www.monografias.com/trabajos79/probioticos-uso-terapeutico-animales/probioticos-uso-terapeutico-animales2.shtml>.
10. Sauter, S.N., Allenspach, K., Gaschen, F., Gröne, A., Ontsouka, E., Blum, J.W., 2005. Cytokine expression in an ex vivo culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: Modulation by probiotic bacteria. Domestic Animal Endocrinology 29: 605-622.
11. Simpson, K.W., Rishniw, M., Bellosa, M., Liotta, J., Lucio, A., Baumgart, M., Czarnecki-Maulden, Benyacoub, J. and Bowman, D. 2009. Influence of *Enterococcus faecium* SF68 Probiotic on Giardiasis in Dogs. J Vet Intern Med, 23:467-481.
12. Kelley, R. L., Minikhiem, D., Kiely, B., O'Mahony, L., O'Sullivan, D., Boileau, T. and Park, S., 2009. Clinical Benefits of Probiotic Canine-Derived *Bifidobacterium animalis* Strain AHC7 in Dogs with Acute Idiopathic Diarrhea. Veterinary Therapeutics, Vol. 10, Nº 3: 121-130.
13. Weese, J.S., Anderson, M. E.C., 2002. Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. Can Vet J Volume 43, 771-774.
14. Schmitz, S., Glanemann, B., Garden, O. A., Brooks, H., Chang, Y.M., Werling, D. and Allenspach, K., 2015. A Prospective, Randomized, Blinded, Placebo-Controlled Pilot Study on the Effect of *Enterococcus faecium* on Clinical Activity and Intestinal Gene Expression in Canine Food-Responsive Chronic Enteropathy. J Vet Intern Med; 29:533-543.
15. Hernandez Cruz, Y., Síndrome Diarreico Canino. En <http://www.monografias.com/trabajos76/sindrome-diarreico-canino/sindrome-diarreico-canino3.shtml>.

16. Rossi, G., Pengo, G., Caldin, M., Palumbo Piccinello, A., Steiner, J.M., Cohen, N.D., Jergens, A.E., Suchodolski, J.S., 2014. Comparision of Microbiological, Histological, and Immnunomodulatory Paraments in Response to Treatment with Either Combination Therapy with Prednisone and Metronidazole or Probiotic VSL#3 Strains in Dogs with Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. En <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094699>
17. Sauter, S.N., Benyacoub, J., Allenspach, K., Gaschen, F., Ontsouka, E., Reuteler, G., Cavadini, C., Knorr, R. and Blum, W., 2006. Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhea treated with an elimination diet. Journal of Animals Physiology and Animal Nutrition 90; 269-277.
18. Herstad, H.K., Nesheim, B.B., L'Abée-Lund, T., Larsen, S. and Skancke, E., 2010. Effects of a probiotic intervention in acute gastroenteritis- a controlled clinical trial. Journal of Small Animal Practice, Vol 51, Issue 1:34-38.
19. Allenspach, K. Prebióticos y probióticos en las enfermedades agudas y crónicas del Sistema Gastrointestinal de pequeños animales. Ponencia presentada en el XXXIII Congresos de AMVAC, Vet Madrid 2016, 259-263.
20. Gorbach S.L.,2000. Probiotics and gastrointestinal health. Am J Gastrenterol; Supple:S1-S4.
21. O'Mahony, D., Murphy, K.B., MAcsharry, J., et al., 2009. Portrait of a canine probiotic *Bifidobacterium*-from gut to gut. Vet Microbiol. [Epub ahead of print].
22. Benyacoub, J., Perez, P.F., Rochat, F., et al.,2005. *Enterococcus faecium* SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. J Nutr 135:1171-1176.
23. German, A.J., Hall, E.J., Day, M.J., 2003. Chronic intestinal inflammation and intestinal disease in dogs. J Vet Intern Med 17:8-20.