

Tutto quello che avreste voluto sapere sul sistema immunitario gastroenterico del cane...

Paola Dall'Ara

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria,
Sezione di Microbiologia e Immunologia Veterinaria, Università degli Studi di Milano

Ontogenesi del sistema immunitario

Lo sviluppo del sistema immunitario di tutti i vertebrati comincia durante la vita fetale e in tutte le specie animali segue un cammino ben preciso: il timo è il primo organo linfoide che si sviluppa ed è seguito in breve tempo dagli organi linfoidi secondari; dopo la comparsa della milza e dei linfonodi, si sviluppano le cellule che contengono le immunoglobuline ma, in genere, non vi è un'efficiente produzione di immunoglobuline sieriche fino alle ultime fasi della vita fetale.

Il cane è una specie pluripara con un periodo di gestazione di 60-63 giorni. Verso il 25°-28° giorno di gravidanza si rende evidente l'abbozzo del timo e, più o meno contemporaneamente, l'abbozzo splenico. In corrispondenza del 35° giorno il timo scende dalla regione cervicale alla cavità toracica anteriore: in questo periodo è composto solo da lobuli epiteliali e stroma mesenchimale. Nei giorni successivi (35°-40°) il timo diventa attivamente linfopoietico e mostra una demarcazione cortico-midollare; i corpuscoli di Hassall diventano visibili a partire dal 38°-40° giorno e dal 45° giorno il timo assume un aspetto istologico perfettamente sovrapponibile a quella del timo di un cane giovane e al suo interno sono rilevabili i primi linfociti. Nella settimana seguente (45°-52° giorno) è evidente la prima infiltrazione linfocitaria di milza e linfonodi e contemporaneamente il midollo osseo diventa densamente popolato e contiene molte cellule staminali emopoietiche. Le placche di Peyer compaiono più tardivamente nell'intestino tenue (45°-55° giorno) e solo in prossimità del parto (60°-63° giorno) si sviluppano delle venule post-capillari prominenti nei tessuti linfoidi periferici. I centri germinativi e le plasmacellule compaiono nella milza e nei linfonodi solo dopo la nascita; il timo va incontro a un rapido accrescimento post-natale e raggiunge la sua taglia massima a 1-2 mesi di età in termini di percentuale sul peso corporeo e a 6 mesi in termini assoluti.

Sebbene i feti canini siano capaci di rispondere a diversi antigeni, è opinione comune che il cane cominci a diventare immunologicamente competente solo in prossimità del parto o successivamente a questo. La differenza tra il periodo fetale, quello neonatale e l'età adulta è in termini di intensità di risposta: i neonati sono sì in grado di rispondere immunologicamente a diversi antigeni, ma la loro risposta è più lenta e minore rispetto a quella di un animale adulto.

Immunità passiva

Nel sangue dei neonati sono presenti naturalmente vari anticorpi, indipendentemente da una stimolazione antigenica. Essi, infatti, sono acquisiti passivamente dalla madre o per passaggio al feto attraverso la placenta, oppure, per

passaggio al neonato mediante l'assunzione di colostro e latte. Lo scopo di questi anticorpi passivi è quello di proteggere il neonato nei confronti degli antigeni con cui la madre è venuta a contatto, quando questi non è ancora in grado di rispondere adeguatamente a una stimolazione antigenica con una risposta immunitaria propria. Infatti, come già accennato, il sistema immunitario di un neonato non è pienamente funzionante e, in ogni caso, la risposta immunitaria conseguente a una stimolazione antigenica di qualsiasi natura è di tipo primario, cioè a lento esordio, di breve durata e di scarsa intensità, e quindi non protettiva. Risulta quindi essenziale un trasferimento di anticorpi già pronti dalla madre alla sua prole, al fine di proteggerla in un periodo così critico, quale quello successivo alla nascita, garantendone la sopravvivenza.

Le due vie attraverso cui gli anticorpi possono raggiungere il neonato sono diverse a seconda della specie animale e dipendono essenzialmente dal tipo di placenta.

La placenta del cane è di tipo endoteliochoriale, cioè l'epitelio del corion è a contatto con l'endotelio dei capillari materni: con questo tipo di placentazione è permesso il passaggio di una certa quantità di anticorpi dalla circolazione materna a quella fetale (circa il 5-12% della concentrazione totale). Gli anticorpi che attraversano la barriera placentare sono rappresentati esclusivamente dalle IgG, che vengono trasferite al feto a partire dal 45° giorno di gestazione sino alla nascita. La restante parte degli anticorpi della classe IgG viene acquisita successivamente mediante l'assunzione del colostro nei primissimi giorni di vita. Il colostro rappresenta le secrezioni accumulate nella ghiandola mammaria durante l'ultimo terzo di gravidanza, insieme alle proteine trasferite dalla circolazione sanguigna, sotto l'influenza di estrogeni e progesterone. Contiene elevati livelli di IgG e IgA, entrambi presenti in concentrazioni più elevate di circa 4 volte rispetto a quelle sieriche della cagna, e livelli inferiori di IgM. Il colostro contiene, inoltre, inibitori della tripsina e fattori antimicrobici quali il lisozima, la lattoferrina e la lattoperossidasi; ha alte concentrazioni di lipidi, vitamina A, proteine (caseina e albumine) e minerali e anche bassi livelli di carboidrati. La presenza dell'inibitore della tripsina gioca un ruolo importante nella trasmissione dell'immunità passiva: riduce infatti l'attività proteolitica degli enzimi digestivi dello stomaco e del duodeno del neonato, permettendo alle immunoglobuline materne di legarsi ai recettori specifici per la porzione Fc presenti sulla superficie intestinale; successivamente, tali immunoglobuline penetrano per pinocitosi e passano nel circolo linfatico e sanguigno. In seguito all'assunzione del colostro, fra le 12 e le 24 ore successive alla nascita nei cuccioli si riscontra un picco di immunoglobuline sieriche: si passa infatti da 1,2 mg/ml di IgG sieriche prima dell'assunzione del colostro a circa 23 mg/ml 12 ore dopo la sua ingestione. L'intestino di questi neonati non è però protetto dalle IgG circolanti: è quindi necessaria l'assunzione del latte materno, ricco di IgA specifiche per quei patogeni che la madre ha avuto modo di incontrare nel suo habitat.

La composizione del latte è considerevolmente differente da quella del colostro. Il latte di cagna ha bassi livelli di IgG e di IgM, mentre la classe predominante è rappresentata dalle IgA a partire dal 3° giorno *post-partum*. Questi anticorpi acquisiti passivamente al contrario delle IgG non vengono assorbiti a livello intestinale, ma si fissano selettivamente alla mucosa, costituendo un'efficacissima "vernice antisettica" in grado di proteggere l'intestino dei neonati nei confronti di quei patogeni a tropismo enterico che hanno stimolato l'immunità materna e che i cuccioli incontrano al momento della nascita nell'ambiente che li circonda.

Vi possono essere variazioni considerevoli da una nidiata a un'altra nell'efficacia dell'assunzione delle immunoglobuline colostrali e ciò può dipendere dalla numerosità

della cucciolata e dal vigore di ogni singolo cucciolo, oltre che dalle capacità materne della cagna e dalla quantità di anticorpi specifici presenti nel colostro.

Immunità neonatale

Il trasferimento dell'immunità passiva può essere considerato un'arma a doppio taglio: da un lato infatti è un processo essenziale senza il quale i neonati andrebbero rapidamente incontro a infezioni spesso letali, mentre dall'altro la presenza di elevate concentrazioni di immunoglobuline materne inibisce lo sviluppo di una risposta immunitaria neonatale endogena fino a quando il livello degli anticorpi passivi non scende a un livello sufficiente da permettere la stimolazione dell'immunità attiva. Il tasso di crescita corporea contribuisce alla velocità di degradazione dell'immunità materna e i cuccioli di grossa taglia eliminano più velocemente le immunoglobuline materne rispetto ai cuccioli di taglia piccola. È stato inoltre dimostrato che i cuccioli colostro-privi sono in grado di rispondere a un antigene già a partire dalle 2 settimane di età.

Il momento in cui un cucciolo diviene realmente immunocompetente è determinato anche dalla concentrazione delle immunoglobuline colostrali ingerite. Non è quindi possibile prevedere con precisione quando un cucciolo sarà in grado di rispondere in maniera efficace agli stimoli antigenici. Dal momento che gli anticorpi trasmessi passivamente dalla madre hanno un'emivita di circa 8,4 giorni, la protezione media garantita dall'immunità passiva materna si aggira intorno alle 8-16 settimane. In seguito al declino degli anticorpi materni, si assiste a un graduale aumento in tutte e 3 le classi anticorpali: livelli sierici paragonabili a quelli di un cane adulto si raggiungono a 2-3 mesi di età per le IgM, a 6-9 mesi per le IgG, e solo intorno all'anno di età per le IgA, del resto come avviene in altre specie. Anche la concentrazione di altre proteine sieriche aumenta con l'età a partire dalla 6 settimane, mentre le α_1 -globuline mostrano una tendenza inversa.

Il fenotipo leucocitario nei cuccioli differisce significativamente da quello di un cane adulto. Nei cuccioli i linfociti aumentano a partire dalla prima settimana di vita mentre il numero dei neutrofili diminuisce. Nei primi 3 mesi di vita i cuccioli hanno una conta linfocitaria più alta rispetto a quella di un cane adulto, ma proporzionalmente tali cellule sono in grande maggioranza linfociti B; dopo le 16 settimane di vita, si ha un graduale calo dei linfociti B periferici contestualmente a un aumento dei linfociti T che raggiungono rapidamente livelli paragonabili a quelli di un animale adulto. Successivamente il rapporto linfociti B-linfociti T rimane pressoché costante per tutta la vita; è comunque da sottolineare che, malgrado il loro numero ridotto, i linfociti T presenti nel periodo neonatale sono perfettamente immunocompetenti.

Un'altra particolarità legata all'età riguarda le sottopopolazioni di linfociti T (T *helper* o CD4⁺ e T citotossici o CD8): nei primi 6 mesi di vita, infatti, si ha una percentuale più elevata di linfociti T CD4, con conseguente rapporto CD4:CD8 più alto; intorno ai 10-12 mesi di età, i linfociti T CD4 calano mentre quelli CD8 aumentano fino a raggiungere i valori normali di un animale adulto e un rapporto CD4:CD8 di circa 1:2.

Nel cucciolo il timo contiene il 12% di linfociti T *helper* e il 3% di linfociti T citotossici: il 69% delle cellule è CD4⁺CD8⁺ mentre il 13% è CD4⁻CD8⁻. Questo organo involge progressivamente durante il primi due anni di età a partire dai 6 mesi di vita.

Durante la maturazione neonatale si assiste a notevoli mutamenti fisiologici e immunologici a livello di sistema immunitario mucosale. Con l'ingestione del colostro, i villi dell'intestino tenue aumentano in dimensione per l'ipertrofia degli enterociti con vacuolizzazioni citoplasmatiche e dilatazione dei vasi chiliferi. Al momento della nascita, i cuccioli possiedono placche di Peyer funzionalmente mature e linfociti intraepiteliali (IEL) con fenotipo simile a quello di un animale adulto e con predominanza di cellule CD8 $\alpha\beta$ + (come nell'uomo e a differenza dei roditori, dove prevalgono cellule CD8 $\alpha\alpha$ +); questo stesso fenotipo prevale, nel cane come nell'uomo, a livello cutaneo, ancora una volta a differenza dei roditori dove a questo livello predominano i linfociti CD8 $\gamma\delta$ +. A livello respiratorio, i cuccioli sembrano avere più mastociti e macrofagi mucosali rispetto ai cani adulti, che hanno invece livelli maggiori di linfociti T, plasmacellule e cellule dendritiche.

Sistema immunitario mucosale

Il sistema immunitario mucosale, presente a livello di tutte le mucose dell'organismo, ma che vede la sua maggiore diffusione e la sua centrale operativa a livello intestinale, ha molte caratteristiche che lo differenziano dal sistema immunitario sistemico e per molti aspetti, come vedremo, la sua funzione è esattamente l'opposto della controparte sistemica, vale a dire sopprimere una risposta immunitaria invece che attivarla: proprio per questo motivo qualsiasi difetto in una qualsiasi sua componente può predisporre allo sviluppo di processi infiammatori intestinali o di allergie alimentari.

La parete dell'apparato digerente è la superficie esposta all'ambiente esterno più grande di tutto l'organismo (circa 200 volte la superficie cutanea). Questo apparato deve essere un grado di distinguere tra sostanze nutritive (che devono essere tollerate) e sostanze potenzialmente dannose (che devono essere combattute ed espulse): basti pensare che ogni anno passa attraverso l'apparato gastroenterico fino a una tonnellata di cibo. Il tessuto linfoide associato all'intestino (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*, GALT) svolge questa duplice funzione ed è composto da 4 diversi compartimenti linfoidi: placche di Peyer e aggregati linfoidi presenti lungo tutta la mucosa intestinale; linfociti e plasmacellule disseminati nella lamina propria; enterociti e linfociti intraepiteliali; linfonodi mesenterici. La principale strategia adottata per svolgere questo doppio compito è quella di evitare che l'antigene interagisca con le cellule epiteliali, chiudendo così una possibile porta d'entrata nell'organismo

Com'è fatto

La barriera mucosale è una struttura complessa composta da elementi cellulari e da componenti non cellulari.

Barriera fisico-chimica

La barriera più efficace che si oppone all'entrata di un antigene è probabilmente la presenza di enzimi presenti nel cavo orale, nello stomaco, nell'intestino tenue e nel colon. Gli enzimi proteolitici gastrici (tripsina, chimotripsina, proteasi pancreatiche)

svolgono la funzione per la quale sono fatti, e cioè la digestione; la rottura di grandi polipeptidi in peptidi più piccoli (di- e tripeptidi) ha un duplice scopo: da un lato permette l'assorbimento di sostanze nutritive, dall'altro rende non immunogene proteine che potenzialmente lo sono (infatti peptidi di piccole dimensioni, composti da meno di 8-10 aminoacidi, sono degli scarsi immunogeni). Se si unisce l'effetto di queste proteasi all'effetto emulsionante dei sali biliari e degli enzimi che scindono i carboidrati, si ottiene un potentissimo sistema che influenza negativamente l'esposizione di un antigene. Se poi si aggiungono l'effetto del pH estremo dello stomaco e dell'intestino tenue prossimale e i prodotti batterici del colon, sembra alquanto strano che la risposta immunitaria a un antigene penetrato per via orale sia ancora possibile. Fortunatamente per noi, questo accade e molte di queste risposte forniscono protezione contro tutti i potenziali patogeni. La decisione di rispondere o al contrario di ignorare un antigene può essere correlata alla via scelta da quest'ultimo per entrare nell'ospite. I patogeni più invasivi, che superano questa barriera, stimolano una risposta aggressiva, mentre quelli che colonizzano il lume richiedono una risposta meno violenta e più tollerante.

Una componente chiave della barriera intestinale è il prodotto dei geni della mucina: questa glicoproteina è l'elemento essenziale del muco che ricopre tutta la superficie epiteliale dalla cavità nasale e dall'orofaringe fino al retto. Le cellule caliciformi che producono muco generano in continuazione una spessa barriera che intrappola particelle estranee, batteri e virus e che li espelle grazie ai movimenti peristaltici. Questa barriera fa sì che i potenziali patogeni e gli antigeni non abbiano accesso all'epitelio sottostante, fenomeno noto con il termine di "esclusione non immunitaria". La mucina serve anche da serbatoio per le IgA secretorie (IgAS), che, come vedremo successivamente, legandosi a batteri e virus, ne impediscono l'adesione a livello epiteliale

Flora microbica

Un'altra componente del sistema immunitario mucosale è rappresentata dalla flora microbica commensale, presente in quantità elevatissime in tutto l'intestino (fino a 10^{14} batteri per grammo di colon): ci sono più batteri nell'intestino che cellule nel corpo! Questa flora ha il compito non solo di tenere sotto controllo i batteri patogeni opportunisti, con sistemi diversi (es., esclusione competitiva, creazione di un ambiente inadatto), ma anche di modellare il sistema immunitario: l'assenza di flora batterica infatti (come avviene negli animali gnotobiotici) è correlata alla presenza di scarsi linfociti nella lamina propria; il ripristino di una flora normale si correla a un rapido reclutamento di linfociti.

Alterazioni della flora in seguito a trattamenti antibiotici o a stati infiammatori possono permettere a questi batteri di moltiplicarsi e produrre tossine: in questi casi la flora normale può venire ristrutturata eliminando i batteri patogeni responsabili mediante adatti antibiotici e ricorrendo all'uso dei probiotici (vedi oltre).

Elementi cellulari

Lo strato sottostante di questa barriera è costituito dalle cellule epiteliali, unite insieme da giunzioni occludenti a livello apicale e basale: in questo modo la membrana e gli spazi paracellulari non sono in genere attraversabili da macromolecole: le

giunzioni occludenti, infatti, prevengono addirittura il passaggio di di- o tripeptidi e solo gli ioni riescono ad attraversarle. Negli stati infiammatori, così come nel periodo perinatale, le giunzioni occludenti sono meno “chiuse” e permettono il passaggio di macromolecole nella lamina propria sottostante ed è proprio in questi casi che gli antigeni alimentari o i microrganismi presenti nel lume possono stimolare una risposta immunitaria. Le stesse cellule epiteliali intestinali (*Intestinal Epithelial Cells*, IECs) possono funzionare da cellule presentanti l'antigene non professioniste: dal lume intestinale “pescano” antigeni parzialmente processati e li presentano ai linfociti T presenti nella lamina propria. In condizioni normali, questa interazione porta all'attivazione selettiva di linfociti T ad azione regolatrice e quindi senza conseguenze negative per l'organismo. In alcuni stati patologici, invece (come ad esempio l'IBD), l'attivazione di queste cellule è deficitaria e questo potrebbe spiegare lo stato di infiammazione persistente.

Essenziale è il ruolo delle placche di Peyer che nel cane hanno zone follicolari (ricche di linfociti B) e zone parafolicolari (ricche di linfociti T) e sono rivestite da un epitelio che esprime molecole MHC di classe II, il che suggerisce un loro ruolo (al pari delle cellule M) nel trasferimento di antigeni dal lume al tessuto linfoide sottostante. Le placche di Peyer sono il maggior sito induttore del GALT insieme ai linfonodi mesenterici: a questo livello infatti si ha la stimolazione (induzione) di linfociti IgA-secerenti antigene-specifici; qui il microambiente dei centri germinativi specializzati (con TGF- β , IL-10) e la presenza di cellule dendritiche e di linfociti T CD4⁺ promuove la commutazione di classe a IgA. I linfociti B IgA⁺ si spostano dalla placche di Peyer ai linfonodi mesenterici drenanti e, attraverso il circolo linfatico ed ematico, raggiungono la lamina propria dell'intestino: in pratica “tornano a casa” con il fenomeno di *homing*. La differenziazione finale delle plasmacellule IgA⁺ avviene nei siti effettori, soprattutto nella lamina propria, che rappresenta il sito principale di produzione delle IgA; questa differenziazione finale è influenzata da diversi fattori presenti nell'ambiente mucosale, tra i quali soprattutto IL-5 e IL-6. La lamina propria, oltre a contenere plasmacellule secernenti soprattutto IgA (ma anche IgG e IgM), contiene anche linfociti T, cellule dendritiche e macrofagi, oltre a eosinofili e mastociti. I siti effettori sono anche i principali responsabili della produzione di IgA in caso di riesposizione a un antigene. Questo continuo traffico da siti induttori a siti effettori è cruciale per la comunicazione tra i vari compartimenti del sistema immunitario mucosale, tanto che si parla di “sistema immunitario mucosale comune”: alcuni compartimenti favoriscono proprio il traffico di cellule effettrici da alcuni siti induttori ad alcuni siti effettori.

A livello di canale anale e retto terminale vi è un elevato numero di aggregati linfoidei (le cosiddette “tonsille rettali”) che si pensa prevengano le infezioni per via ascendente a partire dalla zona perianale.

In animali sani il materiale fecale è presente nella regione post-pelvica solo durante la defecazione e il numero di aggregati linfoidei è di conseguenza basso; le feci sono stoccate nel colon distale prossimalmente alla pelvi, area in cui gli aggregati linfoidei sono molto più numerosi; muovendosi dalla pelvi verso la giunzione ileo-colica la minore presenza di materiale fecale rende ragione del minor numero di aggregati linfoidei.

IgA secretorie (IgAS)

L'ultima componente di questa valida difesa mucosale è rappresentata dall'esercito delle IgA secretorie (IgAS), che rappresenta il principale isotipo anticorpale presente nelle secrezioni mucose.

Le IgA mucosali sono la principale fonte di IgA sieriche nella maggior parte degli animali, incluso il cane: in questa specie il rilascio giornaliero di IgA dai linfonodi mesenterici nella circolazione sanguigna è maggiore della quantità presente nel siero ed è sufficiente a garantire il *pool* circolante di IgA. Prodotte a livello di lamina propria generalmente come IgA dimeriche (ma anche trimeriche e tetrameriche), in cui i monomeri sono tenuti insieme da una catena J, sono trasportate attivamente attraverso l'epitelio, dove acquisiscono una componente in più: si legano infatti a una glicoproteina prodotta dalle cellule epiteliali (il cosiddetto pezzo secretorio) che, circondando la porzione Fc dell'anticorpo, ne nasconde potenziali siti di scissione proteolitica; l'unica altra classe anticorpale in grado di legarsi al pezzo secretorio sono le IgM. Questo sistema di difesa non è pienamente funzionante nel periodo neonatale (nel bambino diventa pienamente maturo intorno ai 4 anni di età). Durante questo sistema di trasporto, le IgA possono anche legarsi a proteine virali appena sintetizzate all'interno delle cellule epiteliali, prevenendo l'assemblaggio dei virioni e neutralizzando la replicazione virale. Questa protezione può anche limitare gli effetti citopatici, risparmiando le cellule e facilitandone la guarigione; inoltre, preservando l'integrità della membrana cellulare la barriera epiteliale viene mantenuta integra e viene ritardata la disseminazione sistemica degli antigeni virali.

Una via alternativa di acquisizione del pezzo secretorio per le IgA è rappresentata dal fegato, che poi rilascia le IgAS nel lume intestinale attraverso le vie biliari; ancora, plasmacellule che popolano l'albero biliare possono sintetizzare IgA che localmente acquisiscono anche il pezzo secretorio.

Mentre le IgAS svolgono la loro funzione nelle secrezioni mucosali come prima linea di difesa limitando l'invasione dei patogeni, le IgA sieriche possono fungere da seconda linea di difesa eliminando i patogeni che sono riusciti a farsi un varco nella superficie mucosale.

Le IgAS sono viste come delle immunoglobuline "benigne", in quanto non fissano in complemento (e quindi non stimolano una risposta infiammatoria), non fungono da opsonine (cioè non inducono la fagocitosi degli immunocomplessi) e funzionano soprattutto come inibitori dell'adesione batterica e/o virale all'epitelio sottostante. Questi anticorpi sono anche capaci di agglutinare gli antigeni, intrappolandoli nello strato mucoso e facilitando la loro espulsione: essendo molecole cariche negativamente e idrofiliche, gli immunocomplessi vengono respinti dalla superficie mucosale. Interferiscono con la capacità di batteri, virus o tossine di aderire e penetrare nella mucosa con un fenomeno noto come "immunoesclosure". Essendo dei polimeri, sono molto più avidi di antigeni delle immunoglobuline monomeriche.

Come già anticipato, a livello mucosale sono presenti anche altre classi anticorpali (IgG, IgM, IgE) ma in quantità molto più basse (<10%) rispetto alle IgA; la loro concentrazione può però aumentare in caso di processi infiammatori o patologici locali e in caso di deficienza di IgA, dove la produzione di IgM mucosali può parzialmente compensare la mancanza di IgA.

Come funziona

Quattro meccanismi diversi assicurano lo svolgimento delle due funzioni contrastanti del sistema immunitario mucosale (tolleranza ed esclusione degli antigeni): la barriera mucosale, la regolazione della risposta immunitaria, l'eliminazione e la tolleranza degli antigeni che riescono a raggiungere la mucosa.

Barriera mucosale

Come già anticipato, l'esclusione di sostanze è assicurata dalle componenti della barriera mucosale, composta da diversi elementi immunitari e non. Il tasso di assorbimento di proteine intatte dipende dall'integrità di questa barriera, cui contribuiscono diversi fattori: morfologia e funzionalità degli enterociti; presenza di IgA, digestione efficace, qualità e composizione del cibo, presenza di infiammazione.

La maturazione degli enterociti dipende dall'età: la maggiore permeabilità caratteristica del periodo neonatale permette l'assorbimento di molecole alimentari e anticorpi colostrali; durante lo sviluppo degli enterociti lungo l'asse cripta-villo, la composizione della membrana cellulare cambia: infatti, le cellule immature delle cripte hanno il doppio di capacità endocitotica rispetto alle cellule mature e questo spiega il calo nell'assorbimento della maggior parte delle sostanze nutritive evidenziato nel cane dalla nascita all'età adulta. La malnutrizione aumenta la permeabilità intestinale alle macromolecole alterando la morfologia e l'attività degli enterociti.

Regolazione della risposta immunitaria

La penetrazione dell'epitelio da parte di un antigene stimola una risposta immunitaria; questo avviene costantemente ma l'organismo è in grado di differenziare tra antigeni "buoni" e "cattivi" per evitare una continua stimolazione immunitaria. Le cellule M, specializzate nella presentazione dell'antigene nelle placche di Peyer, catturano piccole quantità di antigeni e lo presentano al tessuto linfoide sottostante. La reazione immunitaria successiva può essere prevenuta dalla soppressione mediata dai linfociti T, che porta alla tolleranza.

Eliminazione degli antigeni

La barriera mucosale non è del tutto impermeabile alle macromolecole neanche in condizioni normali. Piccole - ma immunologicamente significative - quantità di proteine alimentari attraversano la mucosa intatta e raggiungono il sistema immunitario sistemico. Gli immunocomplessi che si formano vengono eliminati dal sistema fagocitario mononucleato a livello di fegato e di linfonodi mesenterici. Le conseguenze dell'aumentata permeabilità mucosale e dell'aumento di immunocomplessi circolanti sono imprevedibili. Fattori importanti sono specie, età dell'animale, tipo e quantità di antigene assorbito, sito dell'assorbimento, stato fisiopatologico e corredo genetico del soggetto. In alcuni casi, la tolleranza orale a un antigene assorbito viene mantenuta, mentre in altre situazioni la risposta soppressiva del GALT viene by-passata con conseguente infiammazione locale e in questi casi al posto della tolleranza si instaura un'ipersensibilità alle proteine assorbite.

Tolleranza orale

Malgrado l'esistenza di questo accurato sistema di difesa e di questa valida barriera mucosale, circa il 2% degli antigeni alimentari ingeriti viene assorbito e trasportato attraverso il corpo in una forma "immunologicamente intatta", che però in genere non causa sintomatologia clinica in quanto la maggior parte degli individui acquisisce tolleranza.

La tolleranza orale è il fenomeno per cui una prima esposizione a un antigene penetrato per via orale induce una mancata risposta immunitaria specifica (locale e sistemica) a esposizioni sistemiche successive allo stesso antigene. La funzione soppressiva del GALT (immunità cellulo-mediata) è alla base della tolleranza orale. Oltre alla risposta soppressiva, il sistema immunitario intestinale genera IgA, che vengono secrete sulla superficie mucosa e che contribuiscono alla tolleranza. La mancata risposta dei linfociti T alle proteine ingerite è il risultato di anergia o di induzione di una risposta di tipo regolatorio: come già anticipato, le cellule epiteliali intestinali possono fungere da cellule presentanti l'antigene non professionali e insieme alle cellule dendritiche che secernono IL-4 e IL-10, ai linfociti Th3 di tipo regolatorio e alla flora microbica favorire lo sviluppo di tolleranza.

Sebbene questo fenomeno sia essenziale alla vita, gli animali ne nascono privi e la acquisiscono in giovane età: quando i cuccioli vengono svezzati e cominciamo ad assumere cibi nuovi, diventano in grado di sviluppare tolleranza orale e si pensa che ciò avvenga intorno alle 6 settimane di età. Se il nuovo alimento viene consumato prima di questa età, è probabile che non si sviluppi tolleranza, con conseguente possibile allergia per questo alimento. L'induzione della tolleranza orale è più efficace dopo contatti ripetuti con piccole quantità di proteine per diverse settimane. In mancanza di nuove esposizioni all'antigene, la tolleranza risulta ridotta.

Se non funziona

Con il termine di "**reazioni avverse al cibo**", proposto dall'*American Academy of Allergy and Immunology*, si intendono tutte quelle reazioni anormali che si manifestano dopo l'ingestione di un alimento e che possono essere di tipo immunologico (allergia o ipersensibilità alimentare) e non immunologico (intolleranza alimentare). Quest'ultima comprende diverse forme:

- idiosincrasia alimentare: è caratterizzata da una risposta anormalmente elevata a una sostanza alimentare o a un additivo che mima un'allergia ma che non coinvolge meccanismi immunitari; dal momento che non è necessaria una precedente sensibilizzazione (cosa assolutamente tipica invece dell'allergia alimentare), l'idiosincrasia alimentare si può manifestare alla prima esposizione alla sostanza incriminata. La maggior parte delle reazioni agli additivi alimentari sono delle idiosincrasie alimentari.
- intossicazione e avvelenamento alimentare: sono reazioni biologiche causate da un'infezione o dalla presenza di tossine nel cibo, caratteristiche del cibo stesso oppure prodotte da parassiti o da microrganismi (es., aflatossine, tossina botulinica).
- reazione anafilattoide al cibo: mima una reazione anafilattica ma non è immunomediata e si può manifestare dopo ingestione di alcuni cibi (es., tonno) ricchi di istamina; un rilascio non immunomediato di istamina può anche essere

influenzato dalle endorfine cerebrali: ciò spiega come mai un cane comincia a grattarsi quando manifesta segni di euforia.

- reazione metabolica alimentare: è dovuta a una particolare reazione del metabolismo dell'ospite dopo ingestione di un alimento ed è correlata allo stato sanitario, a una malnutrizione o a errori genetici del metabolismo: ne è un esempio l'intolleranza al lattosio, che si può manifestare nei cuccioli che assumono grosse quantità di latte; in caso di vera allergia alimentare al latte, invece, le quantità richieste per scatenare la reazione è molto più bassa.

Allergia alimentare

L'allergia alimentare rappresenta nell'uomo il principale problema di sanità pubblica: nei paesi occidentali l'8% dei bambini e il 2% degli adulti soffre di reazioni allergiche a diversi alimenti; inoltre, la prevalenza di reazioni ad alcuni allergeni (es., arachidi o semi di sesamo) risulta in aumento. Si manifesta in individui geneticamente predisposti quando la tolleranza orale non si sviluppa o viene meno.

Nel cane si ritiene che l'8% della popolazione sia affetto da allergia alimentare e che questa sia responsabile dell'1% delle manifestazioni cutanee: il 10% di tutte le malattie allergiche cutanee (escluse le allergie parassitarie) è dovuto ad allergia alimentare, che si pone al terzo posto come causa dopo allergia alle pulci e atopia; non esistono predisposizioni di sesso, razza o età. Nel gatto l'allergia alimentare sembra essere raramente diagnosticata. Si manifesta in genere in soggetti di età inferiore all'anno

Le più comuni e più studiate reazioni allergiche al cibo nell'uomo sono reazioni di ipersensibilità immediata di tipo I, che prevedono l'intervento delle IgE, con conseguente sviluppo di sintomi clinici in un tempo piuttosto breve (da pochi minuti a qualche ora dopo l'ingestione del cibo). I mastociti attivati dalle IgE, oltre a degranulare e a liberare istamina e altri mediatori del processo infiammatorio, possono rilasciare anche citochine che possono indurre fenomeni di ipersensibilità ritardata (tipo IV), ma in un'allergia alimentare possono essere coinvolte anche reazioni di ipersensibilità di tipo II (citotossica) e di tipo III (da immunocomplessi).

L'ipersensibilità immediata si manifesta dopo pochi minuti o al massimo dopo qualche ora dall'ingestione del cibo ed è l'unica IgE-mediata. In caso di mancata tolleranza orale, un individuo sviluppa nei confronti di un antigene una risposta mediata dalle IgE invece che dalle IgA. Le IgE si legano ai mastociti presenti a livello gastroenterico e in altre zone periferiche, sensibilizzando il soggetto a quel determinato antigene. A un contatto successivo con lo stesso antigene, questo si lega a ponte a due molecole di IgE a loro volta legate alla superficie dei mastociti, con conseguente degranolazione di questi ultimi e liberazione di diversi mediatori chimici dell'infiammazione. Quando i mastociti sensibilizzati sono limitati al tratto gastroenterico, la reazione di ipersensibilità rimane localizzata con perdita di liquidi, proteine plasmatiche e sangue attraverso i capillari nel lume intestinale, e viene stimolata la secrezione di muco e di cloruri, che disturbano la motilità intestinale e l'azione delle disaccaridasi: queste alterazioni portano a sintomi clinici, quali vomito, diarrea e perdita di peso. In alcuni casi degranolazioni ripetute dei mastociti possono portare ad accumulo di eosinofili nella parete intestinale, con conseguente gastroenterite eosinofila. L'aumentato assorbimento di macromolecole conseguente all'ipersensibilità intestinale può peggiorare la reazione allergica o anche portare a

ipersensibilità multiple. Quando l'antigene sfugge dall'intestino e raggiunge i basofili circolanti o i mastociti sensibilizzati presenti a livello cutaneo, si manifestano reazioni più generalizzate, fino a veri fenomeni anafilattici; queste ultime sono anche possibili dopo il rilascio di mediatori mastocitari nella circolazione sistemica.

Nel cane e nel gatto sono molto comuni reazioni di ipersensibilità intermedia, che si manifestano molte ore dopo l'ingestione di un antigene e che probabilmente sono dovute a una risposta ritardata IgE-mediata (tipo I) o a un'ipersensibilità da immunocomplessi (tipo III). I mastociti attivati rilasciano moltissime citochine, che richiamano neutrofili, eosinofili e in misura minore linfociti; queste cellule a loro volta rilasciano altri mediatori, responsabili di un'inflammatione cronica.

Per finire, sono descritte anche nel cane e nel gatto reazioni di ipersensibilità ritardata al cibo, che si manifestano 2-3 giorni dopo l'ingestione di questo e che probabilmente sono dovute a reazioni di ipersensibilità di tipo III e IV. La sintomatologia può essere molto vaga (dolore addominale ricorrente, affaticamento, artropatie, ulcere orali).

Nell'uomo l'allergia alimentare si può manifestare con sintomi, gastroenterici, respiratori o sistemici. Nel cane la sintomatologia cutanea è molto comune, si manifesta in genere dalle 4 alle 24 ore dopo l'ingestione ed è caratterizzata da prurito associato a eritema, pomfi, ulcere e croste che possono rimanere localizzate e muso, zampe e orecchie o interessare tutto il corpo; le manifestazioni gastroenteriche sono invece più rare; sono comunque descritti anche episodi di rinite, congiuntivite, interessamento nervoso, muscolo-scheletrico o urinario e alterazioni comportamentali.

Allergeni alimentari

Malgrado l'enorme diversità degli elementi nutritivi e sebbene tutte le proteine alimentari siano antigeniche (perché estranee all'organismo e quindi considerato *non self* dal sistema immunitario), solo pochi alimenti sono in grado di causare una reazione allergica. La capacità di una proteina di indurre una reazione allergica è influenzata dalla sua immunogenicità e dalla permeabilità dell'intestino a quella proteina. L'immunogenicità dipende dalla stimolazione della produzione di IgE e dal rilascio di istamina da parte dei mastociti dopo il legame dell'allergene a due molecole di IgE fissate sulla membrana cellulare. Nell'uomo gli allergeni alimentari sono quasi esclusivamente glicoproteine con un peso molecolare di 10-70 kD; nel cane e nel gatto non esistono dati equivalenti. Gli allergeni alimentari mantengono la loro immunogenicità anche in seguito a diversi trattamenti: molti allergeni sono infatti parzialmente resistenti alla temperatura e al pH acido e possono quindi superare i processi digestivi; l'allergenicità può poi essere alterata dai processi produttivi di un determinato alimento: la denaturazione proteica ad esempio può distruggere degli epitopi o al contrario farne comparire di nuovi, con diminuzione o al contrario aumento dell'allergenicità. Sembra comunque che l'allergenicità della maggior parte dei cibi non cambi o al limite risulti diminuita (e non aumentata) in seguito alla cottura o a una digestione parziale.

In genere, l'allergia alimentare non è associata a un cambiamento recente della dieta: nella maggior parte dei casi un soggetto ha mangiato l'agente responsabile per almeno 2 anni prima di manifestare problemi

In campo umano, i principali allergeni sono rappresentati da latte vaccino, uova, arachidi, soia, grano e pesce per i bambini (85% dei casi documentati) e da arachidi, altra frutta secca, pesce e crostacei per gli adulti; oltre a questi allergeni, molti allergeni

alimentari polline-correlati presenti nella frutta e nella verdura possono causare manifestazioni cliniche soprattutto di allergia orale soprattutto negli adulti. La maggior parte dei bambini con allergia al latte vaccino manifesta la sintomatologia clinica prima di un mese di età, ma diventa clinicamente tollerante al latte entro i 3 anni; per contro, l'allergia alle arachidi tende a persistere anche in età adulta. È stato inoltre dimostrato che l'allergia alimentare è una delle prime manifestazioni cliniche di un soggetto atopico che più avanti negli anni manifesterà rinite e asma.

In generale, i veterinari ritengono che gli additivi alimentari (coloranti e conservanti) siano i più comuni allergeni per il cane e per il gatto; tuttavia, in letteratura non sono descritti casi di questo tipo per il cane e ne risultano solo due per il gatto: come già anticipato, gli additivi sono infatti le più comuni cause di intolleranza alimentare e non di allergia alimentare. Per il cane e il gatto, i principali allergeni sono rappresentati da carne rossa, latte e derivati, grano, avena, uova, pollo, agnello, soia, maiale e in misura minore pesce e coniglio; bisogna però sottolineare che non è semplice individuare il reale responsabile, in quanto nei cibi commerciali sono presenti ingredienti multipli. Per il latte vaccino e la carne, il principale allergene è rappresentato dagli anticorpi di classe IgG.

Per alcuni gruppi di alimenti, l'allergia a un determinato alimento può causare fenomeni allergici verso un alimento appartenente allo stesso gruppo, data la sua similarità antigenica (cross-reattività). Di fatto nel cane e nel gatto, al pari dell'uomo, l'allergia alimentare è in genere specifica e raramente è necessaria l'eliminazione dalla dieta di un'intera famiglia di alimenti

Ruolo dell'allergia alimentare in alcune patologie gastroenteriche

L'*Inflammatory Bowel Disease (IBD)* è un'infiammazione cronica dell'intestino che nel cane e nel gatto si manifesta soprattutto sotto forma di enterite linfoplasmacellulare o eosinofila. La sua esatta causa è sconosciuta, ma in alcuni casi l'allergia alimentare ne può rappresentare il problema sottostante, tanto è vero che un cambiamento nell'alimentazione può dare qualche beneficio.

L'enteropatia da glutine (celiachia o *Gluten-Sensitive Enteropathy, GSE*) è un'importante patologia cronica intestinale che si presenta, oltre che nell'uomo, anche nel Setter irlandese. L'esatta causa non è nota, ma si pensa sia legata a un'aumentata permeabilità intestinale e, almeno nell'uomo, a una reazione di ipersensibilità ritardata al glutine: il glutine è una miscela grezza di gliadina e glutenina, due peptidi che formano parte della frazione proteica del grano, che viene normalmente digerita dagli enzimi pancreatici nel lume intestinale; la gliadina completamente idrolizzata è innocua. Anche i cani con GSE hanno un aumentato numero di linfociti nella mucosa intestinale e di IgA a livello sierico; al contrario dell'uomo, però, gli anticorpi anti-gliadina sono molto bassi e questo dimostra che tale patologia non è causata da una reazione immunitaria sistemica.

L'enteropatia proteino-disperdente (*Protein-Losing Enteropathy, PLEP*) e la nefropatia proteino-disperdente (*Protein-Losing Nephropathy, PLNP*) rappresentano una sindrome rara che si manifesta nei cani di razza Soft-coated wheaten terrier; anche in questo caso la causa è sconosciuta, ma si pensa che un'allergia alimentare causi enterite che si trasforma in enteropatia; il deposito di immunocomplessi circolanti a livello renale può causare glomerulonefrite che porta a nefropatia.

Come lo si può aiutare

Dato il ruolo cruciale svolto dalla flora batterica nel modulare la difesa immunitaria aspecifica e specifica a livello locale e sistemico, un sistema per incrementare l'efficienza difensiva di un organismo è rappresentato dall'uso di **probiotici**, ossia lattobacilli (*Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*), bifidobatteri (*Bifidobacterium infantis*, *B. bifidum*, *B. animalis*), enterococchi (*E. faecium*) e lieviti vivi che, ingeriti come integratori alimentari, svolgono diverse attività immunomodulanti. Il loro meccanismo d'azione non è noto, ma si pensa possano agire equilibrando la flora microbica intestinale e/o svolgendo un'azione adiuvante sulla produzione di alcune citochine. Lo stress e cambiamenti alimentari sono condizione che alterano la microflora intestinale e per le quali il ricorso ai probiotici può essere molto utile. Notevoli cambiamenti della microflora caratterizzano anche il delicato momento dello svezzamento: bifidobatteri e lattobacilli diminuiscono, mentre *E. coli* e *Cl. perfringens* aumentano, creando una comunità microbica non favorevole; per questo motivo l'aggiunta di probiotici agli alimenti per animali, soprattutto per i cuccioli, è più che giustificato. Situazione analoga si ripropone anche nei pazienti geriatrici, dove *Cl. perfringens* e streptococchi risultano prevalere su batteri benefici

Interessante è anche l'uso di **prebiotici**, cioè di ingredienti alimentari indigeribili che stimolano in modo selettivo la crescita e/o l'attività di alcuni batteri della flora microbica intestinale: tra questi sono da ricordare, oltre alle fibre, diversi carboidrati, quali i fruttoligosaccaridi (FOS), che vengono fermentati di preferenza dai batteri "buoni" presenti a livello intestinale influenzando di conseguenza positivamente la composizione della microflora residente, e i mannanoligosaccaridi (MOS), che fungono da recettori per diversi batteri patogeni, impedendone di l'attacco alla parete intestinale e di conseguenza la temuta colonizzazione. I FOS sembrano anche in grado di influenzare positivamente il contenuto anticorpale del colostro e del latte, e di conseguenza il trasferimento dell'immunità passiva, quando somministrati alle cagne a partire da metà gravidanza fino allo svezzamento dei cuccioli.

Un altro integratore alimentare proposto per il cane è rappresentato dal **colostro bovino**, che si è dimostrato utile nel prevenire e nel curare diverse forme di gastroenterite in soggetti giovani diverse specie animali, uomo compreso. Oltre a fungere da alimento, è ricco di componenti bioattive che possono aiutare a neutralizzare batteri, virus e tossine.

Per finire, un approccio più specifico mirato a migliorare le difese immunitarie locali è il ricorso alla **vaccinazione per via mucosale**. Il motivo principale per scegliere come via di somministrazione di un vaccino la via mucosale è il fatto che la maggior parte delle infezioni interessano o almeno hanno inizio a livello di superfici mucose e che una risposta immunitaria protettiva può essere indotta solo portando *in situ* lo stimolo antigenico. Lo scopo principale di una vaccinazione mucosale è quello di indurre a livello locale un'elevata produzione di IgA secretorie e una buona attivazione dei linfociti T citotossici. I vantaggi legati a questo tipo di approccio sono rappresentati dalla possibilità di somministrare un vaccino senza dover ricorrere a delle iniezioni, riducendo di conseguenza il rischio di reazioni al punto di inoculo, e di vaccinare soggetti molto giovani senza la temuta interferenza degli anticorpi materni. Purtroppo per ora i vaccini disponibili da somministrare per via mucosale in campo veterinario per gli animali da compagnia sono pochissimi e ristretti per ora alla sola via intranasale (per

stimolare l'apparato respiratorio), anche se teoricamente per cane e gatto sarebbero utilizzabili tutte le altre vie (orale, rettale, vaginale, congiuntivale).

Conclusioni

Da tutto quanto esposto, ben si capisce come il sistema immunitario gastroenterico, del cane come di qualsiasi altro essere vivente, sia costantemente esposto a un'infinità di stimoli antigenici, alcuni molto pericolosi e altri, la maggior parte, assolutamente innocui e quindi da non combattere con una battaglia non solo inutile ma anche potenzialmente dannosa.

Le recenti acquisizioni in materia hanno confermato che di fatto il sistema immunitario mucosale è quasi sempre in grado di distinguere tra "buono" e "cattivo" e se non ci riesce l'organismo sviluppa problemi di ordine immunopatologico, primo tra tutti l'allergia alimentare. Gli studi futuri dovranno permettere di meglio capire i meccanismi cellulari e molecolari alla base dell'induzione e della regolazione delle risposte immunitarie a livello di superfici mucose per poter prevenire o per lo meno controllare con successo tutte le possibili situazioni negative.

Bibliografia

Sviluppo sistema immunitario

- **Dall'Ara P., Poli G.** (2005): Immunologia del cane e del gatto. In: **Bo S.** (ed.): "Manuale di malattie infettive del cane e del gatto". Ed. Scivac, Cremona, pg. 7-13
- **Day M.J.** (2007): Immune system development in the dog and cat. *Journal of Comparative Pathology*, 137, S10-S15
- **Faldyna M., Sinkora J., Knotigova P., Leva L., Toman M.** (2005): Lymphatic organ development in dogs: major lymphocyte subsets and activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104, 239-247
- **Felsburg P.J.** (2002): Overview of immune system development in the dog: comparison with humans. *Human & Experimental Toxicology*, 21, 487-492
- **Poli G., Cocilovo A., Dall'Ara P., Martino P.A., Ponti W.** (2005): Microbiologia e immunologia veterinaria, 2^a edizione, *UTET Scienze Mediche*, Torino

Sistema immunitario mucosale

- **Elwood C.M., Garden O.A.** (1999): Gastrointestinal immunity in health and disease. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 29 (2), 471-500
- **Mayer L.** (2003): Mucosal immunity. *Pediatrics*, 111 (6), 1595-1600
- **Snoeck V., Peters I.R., Cox, E.** (2006): The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Veterinary Research*, 37, 455-467
- **Stokes C., Waly N.** (2006): Mucosal defence along the gastrointestinal tract of cats and dogs. *Veterinary Research*, 37, 281-293

Allergia alimentare

- **Beyer K., Teuber S.** (2004): The mechanism of food allergy: what we do know today? *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4, 197-199
- **Day M.J.** (2005): The canine model of dietary hypersensitivity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64, 458-464
- **Helm R.M., Ermel R.W., Frick O.L.** (2003): Nonmurine animal models of food allergy. *Environmental Health Perspectives*, 111 (2), 239-244
- **Sampson H.A.** (2003): Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111 (2), S540-S547
- **Verlinden A., Hesta M., Millet S., Janssens G.P.J.** (2006): Food allergy in dogs and cats: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 259-273

- **Wood R.A.** (2003): The natural history of food allergy. *Pediatrics*, 111 (6), 1631-1637

Come si può aiutare il sistema immunitario mucosale

- **Adogony V., Respondek F., Biourge V., Rudeaux F., Delaval J., Bind J.-L., Salmon H.** (2007): Effects of dietary scFOS on immunoglobulins in colostrums and milk of bitches. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 91, 169-174
- **Benyacoub J., Czarnecki-Maulden G.L., Cavadini C., Sauthier T., Anderson R.E., Schiffrin E.J., von der Weid T.** (2002): Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *Journal of Nutrition*, 132, 1158-1162
- **Biourge V., Vallet C., Levesque A., Sergheraert R., Chevalier S., Robertson J.-L.** (1998): The use of probiotics in the diet of dogs. *Journal of Nutrition*, 128, 2720S-2732S
- **Gerdts V., Mutwiri G.K., Tikoo S.K., Babiuk L.A.** (2006): Mucosal delivery of vaccines in domestic animals. *Veterinary Research*, 37, 487-510
- **Giffard C.J., Seino M.M., Markell P.J., Bektash R.M.** (2004): Benefits of bovine colostrum of fecal quality in recently weaned puppies. *Journal of Nutrition*, 134, 2126S-2127S
- **Newman K., Spring P.** (2004): Manipulating intestinal microflora through nutrition. International Society for Animal Hygiene, Saint-Malo 2004, 231-233
- **Swanson K.S., Grieshop C.M., Flickinger E.A., Bauer L.L., Healy H.-P., Dawson K.A., Merchen N.R., Fahey G.C.Jr** (2002): Supplemental fructoligosaccharides 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