

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Der Einfluss eines *Saccharomyces cerevisiae*
Fermentationsproduktes auf die fäkale Mikrobiota
und das Immunsystem bei Rennpferden**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Alexandra Lucassen
Fritzlar

Hannover 2022

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Hans-Joachim Schuberth
Institut für Immunologie
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Joachim Schuberth
Institut für Immunologie
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

2. Gutachter*in: PD Dr. Maike Heppelmann
Klinik für Rinder
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der mündlichen Prüfung: 01.11.2022

Dieses Forschungshaben wurde dankenswerterweise von BBhorses GmbH & Co.KG,
Siegen, Deutschland, unterstützt.

Für mich.

Publikationen:

1. Alexandra Lucassen, Christa Finkler-Schade and Hans-Joachim Schuberth
A *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation Product (Olimond BB) Alters the Early Response after Influenza Vaccination in Racehorses
Animals 2021, 11 (9), 2726; <https://doi.org/10.3390/ani11092726>

2. Alexandra Lucassen, Julia Hankel, Christa Finkler-Schade, Lisa Osbelt, Till Strowig, Christian Visscher and Hans-Joachim Schuberth
Feeding a *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation Product (Olimond BB) Does Not Alter the Fecal Microbiota of Thoroughbred Racehorses
Animals 2022, 12(12), 1496; <https://doi.org/10.3390/ani12121496>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Nutrazeutika	8
1.2	Prä-, Pro- und Postbiotika	8
1.3	Intestinale und fäkale Mikrobiota	9
1.4	Beeinflussung der Mikrobiota durch SCFP	10
1.5	Klinisch-immunologische Effekte einer SCFP-Supplementation	11
1.6	Ziele der Studie	13
2	Publikation I.....	14
3	Publikation II.....	27
4	Diskussion	42
4.1	Versuchsdesign	42
4.2	Die SCFP-Fütterung veränderte nicht die Homöostase von leukozytären Blutzellen.....	44
4.3	Die SCFP-Fütterung veränderte die Reaktion auf einen immunologischen Reiz	46
4.4	Die SCFP-Fütterung veränderte nicht die fäkale Mikrobiota.....	50
4.5	Die SCFP-Fütterung nimmt Einfluss auf die impf-induzierte Änderung der Alpha-Diversität	52
5	Zusammenfassung.....	54
6	Summary.....	56
7	Literaturverzeichnis	58
8	Danksagung	64

Abkürzungen

BLS	Bakterienlysate
EPS	Exopolysaccharide
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
IL-1	Interleukin 1
IL-10	Interleukin 10
IL-6	Interleukin 6
ISCOM	Immunstimulierender COMplex
LPS	Lipopolysaccharid
MOS	Mannan-Oligosaccharide
OTU	Operational Taxonomic Unit
PRR	Pattern Recognition Receptors
SAA	Serum Amyloid A
SCFP	Saccharomyces cerevisiae Fermentationsprodukt
Ssp.	Subspezies
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

Einen maßgeblichen Einfluss auf die Gesundheit und das Wohlbefinden von Pferden nimmt der Umgang, die Haltung, die Fütterung und die Bewegung ein. Werden artspezifische Bedürfnisse nicht gedeckt, gefährdet dies die physische und psychische Verfassung der Pferde und führt zu einer erhöhten Inzidenz von Erkrankungen des Bewegungs-, Atmungs-, und Verdauungsapparates sowie von Verhaltensstörungen [1]. Zentral für die Überwachung und Steuerung vieler physiologischer und pathologischer Prozesse ist das Immunsystem, welches über komplexe Wechselbeziehungen mit der Haltung, der Fütterung, der Bewegung und der Psyche in Verbindung steht. Dafür rückt die enorme Bedeutung des Darm-Mikrobioms, das größte symbiotische Ökosystem mit dem Wirt, immer stärker in den Vordergrund.

Die Interaktion zwischen der Gesamtheit der Darm-Mikroorganismen, dem enterischen Nervensystem und den Immunzellen reguliert und steuert immunologische Prozesse im ganzen Körper [2, 3].

Aufgrund dieser zentralen Bedeutung steht das intestinale Mikrobiom immer stärker im Fokus einer prophylaktischen, metaphylaktischen und begleitenden therapeutischen Beeinflussung des Immunsystems [4]. Die Beeinflussung des Darm-Mikrobioms kann speziell über das Futter oder durch Supplementation des Futters mit speziellen Zusatzstoffen erreicht werden. Im Lichte neuerer Erkenntnisse über das Zusammenspiel zwischen Darmkeimen und lokalen Darm- und Immunzellen ist nicht immer klar, ob die beobachteten Effekte auf einer direkten Wirkung der Futterbestandteile, auf körpereigenen Zellen oder indirekt auf einer Beeinflussung der Darmkeimzusammensetzung beruhen [3]. Diese Arbeit griff neuere Erkenntnisse über dieses Zusammenspiel auf. Ziel war es, den Nachweis zu führen, ob eine Supplementation mit einem *Saccharomyces-cerevisiae*-Fermentationsprodukt (SCFP) zu einer Änderung der fäkalen Mikrobiota führt und ob im Blut zirkulierende Immunzellen in ihrer zentralen Funktion sowie im Zirkulationsverhalten bei Pferden beeinflusst werden.

1.1 Nutrazeutika

Die Futtermittelindustrie verfolgt viele Ziele, die über die Basis der Ernährung hinausgehen. Futterzusätze sollen leistungssteigernd sein, die Gesundheit fördern, Krankheiten vermeiden und eine Alternative zum Einsatz von antimikrobiellen Mitteln bieten [5]. Produkte, die neben der Ernährung gesundheitsfördernde Aspekte haben, werden Nutrazeutika oder funktionelle Lebensmittel genannt. Trotz großer Bedeutung für die Veterinär- und die Humanmedizin wurde für beide Begriffe bisher keine offizielle Definition festgelegt [6]. Nutrazeutika bestehen aus natürlichen Verbindungen, wie Phytonährstoffen und/oder aus Mikroben (Probiotika), bzw. aus deren Bestandteilen (Präbiotika) oder deren Stoffwechselprodukten (Postbiotika). Die verschiedenen Klassen besitzen individuelle Wirkmechanismen, die sich unterschiedlich auf das Immun-, Hormon-, Nerven-, Kreislauf- und das Verdauungssystem auswirken [5]. SCFP sind nutrazeutische Produkte, deren funktionellen Zellwandbestandteile wie Beta-Glucane, Mannan-Oligosaccharide (MOS), organische Säuren, Aminosäuren und Peptide, durch ein doppeltes Fermentationsverfahren aktiviert werden und sowohl präbiotische als auch postbiotische Eigenschaften haben [7-9].

1.2 Prä-, Pro- und Postbiotika

Präbiotika sind als Substanzen definiert, die bestimmten kommensalen Mikroorganismen im Darm als Nahrung dienen. Präbiotika beeinflussen die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms und deren Stoffwechselwege und erzielen dadurch einen positiven Effekt auf den Wirt [7]. Die bestuntersuchten Präbiotika sind Mannan-Oligosaccharide und Beta-Glucane [5, 7]. Präbiotika üben nicht nur einen indirekten Effekt über das Darm-Mikrobiom aus, sondern haben auch einen direkten Effekt auf den Organismus. So zeigen Präbiotika Einflüsse auf das lokale und systemische Immunsystem, indem sie mit Darm-Epithelzellen oder mit residenten Immunzellen über Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRR) und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) interagieren [10]. Weiterhin unterstützen Präbiotika die Darmbarrierefunktion über die Verringerung der Permeabilität und schützen damit vor dem Eindringen von Bakterien und Toxinen sowie vor Entzündungsprozessen und der Induktion von Autoimmunerkrankungen

[10]. Hefezellwandbestandteile mit MOS können an Typ-1-Fimbrien von pathogenen Keimen, wie *Escherichia coli* und *Salmonella ssp.* binden und deren Besiedlung im Magen-Darm-Trakt verhindern [5].

Probiotika sind laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2002 lebende Mikroorganismen, die oral vom Wirt aufgenommen werden und in ausreichender Menge einen positiven Effekt auf den Wirt ausüben [11]. Die kommerziell eingesetzten Probiotika stammen von *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Bacillus sp.* und *Saccharomyces sp.*. Sie besiedeln den Gastrointestinal-Trakt (GIT) und konkurrieren als vorteilhafte Mikroorganismen mit pathogenen Keimen um Lebensraum und Nährstoffe. Insgesamt können sie die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft regulieren. Außerdem interagieren Probiotika mit dem Immunsystem, in dem sie die kurzkettige Fettsäure Butyrat produzieren, die die Migration von neutrophilen Granulozyten in die Darmschleimhaut erhöhen und die Darmbarriere schützen. Butyrat haben zudem entzündungshemmende, antioxidative und Epithelzell-fördernde Eigenschaften [5].

Postbiotika sind durch mikrobielle Stoffwechselaktivität gewonnene Metaboliten oder Produkte, die ebenfalls direkt mit lokalen Darmepithel- und Immunzellen interagieren [7]. Sie üben nicht nur lokal eine Wirkung aus, sondern modulieren darüber hinaus verschiedene Immunmechanismen und Zelldifferenzierungsprozesse in der Peripherie des Wirtes [2]. Die funktionellen Einheiten sind entweder zellfreie Überstände, Exopolysaccharide (EPS), Zellwandfragmente, kurzkettige Fettsäuren, Bakterienlysate (BLs), Vitamine oder Enzyme. Über die Interaktion von Postbiotika mit residenten Darmzellen und peripheren Immunzellen wird die Sekretion entzündungsregulierender Zytokine (Tumornekrosefaktor, TNF, Interleukin 10, IL-10) moduliert und damit entzündliche Reaktionen abgemildert [12].

1.3 Intestinale und fäkale Mikrobiota

Futtermittel, die im Magen zunächst durch Säure abgebaut werden, gelangen in den Dünndarm, wo Eiweiß, Stärke und Kohlenhydratverbindungen enzymatisch verdaut werden [13]. Nachfolgend werden unverdaute Substrate in den Dickdarm (Zäkum,

Kolon) weiter transportiert. Im Zäkum und Kolon entstehen durch mikrobielle Fermentation von pflanzlicher Zellulose und Hemizellulose flüchtige Fettsäuren (z.B. Acetat, Butyrat, Propionat) und Milchsäuren, die dem Wirt als wichtigste Energiequelle zu Verfügung stehen [13-15]. Diese Art der Energiegewinnung macht beim Pferd 60-70 % der Energieversorgung aus [16]. Jeder Darm-Abschnitt beherbergt eine komplexe Vielfalt an Mikroorganismen, bestehend aus Protozoen, Bakterien, Pilzen, Bakteriophagen und Archaeen. In jedem gastrointestinalen Kompartiment besteht ein individuelles und dynamisches Ökosystem, welches sich in seiner Zusammensetzung, Diversität und Funktionalität unterscheidet [14]. Die Population aller Mikroorganismen in einem Bereich wird als Mikrobiota bezeichnet. Die Gesamtheit des mikrobiellen Genmaterials wird als Mikrobiom definiert [3]. Die Mikroben und deren Metaboliten (z.B. kurzkettige Fettsäuren, Polysaccharide, α -Galactosylceramide, Tryptophan-Metaboliten) sind nicht nur für die Verdauungsprozesse von besonderer Bedeutung, sondern haben ebenso eine immunmodulierende Wirkung [17]. Die fäkale Mikrobiota ist eine repräsentative Methode zur Bestimmung der Diversität und Zusammensetzung der Hinterdarm-Mikrobiota beim Pferd und kann zur Analyse des Darm-Mikrobioms herangezogen werden [18]. Die dominierenden Phyla beim Pferd sind *Firmicutes* und *Bacteroidetes* [16, 19, 20]. *Firmicutes* haben mit 40 % bis 90 % den größten Anteil [15, 21]. Neben diesen beiden Hauptphyla gehören zum bakteriellen Kernmikrobiom von Pferden *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Euryarchaeota*, *Fibrobacteres* und *Spirochaetes* [15, 22]. Die Kerngemeinschaft ist definiert durch die Operational Taxonomic Unit (OTU) und beschreibt alle Proben mit einer relativen Abundanz von $> 0,1$ % [14].

1.4 Beeinflussung der Mikrobiota durch SCFP

Die Fermentationsprodukte von *Saccharomyces cerevisiae* wirken sich auf die Zusammensetzung und Funktionen der intestinalen Mikrogen-Gemeinschaft aus. Bei Milchkühen führte ein SCFP zur Erhöhung der relativen Häufigkeiten von *Prevotella brevis*, *Ruminococcus flavefaciens*, Ciliatenprotozoen und *Bifidobacterium spp.* und zur Verringerung der Häufigkeit von *Bacteroidetes* und Flimmerprotozoen. Das durch SCFP-Zufütterung veränderte Pansenmilieu stabilisierte den Pansen-pH und

verringerte die Inzidenz von subakuten Pansenazidosen [23]. Bei Kälbern führte eine SCFP-Supplementation zur Erhöhung der relativen Häufigkeit von *Pretvotella* und zu einer Verminderung der Häufigkeit von *Shuttleworthia* und *Desulfovibrio* [9]. Eine weitere Studie bei Kälbern berichtete über eine SCFP-vermittelte Zunahme von *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae* im Pansen und im Dickdarm, was mit einer positiven Leistungs- und Wachstumskurve der Kälber korrelierte [24]. Bei Hunden wurde nach SCFP-Fütterung eine größere relative Häufigkeit von *Bifidobacterium* und eine niedrigere Häufigkeit von *Fusobacterium* in der fäkalen Mikrobiota beobachtet [25]. Zusätzlich wurde von einer sinkenden Abundanz pathogener Keime berichtet. Im Blut führte die SCFP-Fütterung zu einem höheren prozentualen Anteil von B-Lymphozyten und Monozyten. Zudem exprimierten die Zellen mehr MHC-Klasse-II-Moleküle [25]. Bei adulten Katzen kam es zur Reduzierung in der Abundanz von *Clostridium perfringens* in der fäkalen Mikrobiota [8]. Zur Wirkung der SCFP-Fütterung auf die fäkale Mikrobiota von Pferden gibt es bisher keine Studien.

1.5 Klinisch-immunologische Effekte einer SCFP-Supplementation

Viele Studien haben sich mit den Effekten einer SCFP-Supplementation auf das angeborene Immunsystem befasst. Zellen dieses Teils des Immunsystems (z.B. Epithelzellen, Makrophagen, dendritische Zellen) erkennen potenzielle Gefahren über Mustererkennungsrezeptoren, was zu einer koordinierten Bildung von Zytokinen, Chemokinen und Entzündungsregulatoren führt. SCFP dienen kommensalen Bakterien als Nahrung, die wiederum Metaboliten freisetzen, die – ähnlich wie die initial reagierenden Immunzellen nach Kontakt mit Gefahrensignalen – über Mustererkennungsrezeptoren (PRR) oder G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)

ein Spektrum an Mediatoren und Zytokinen modulieren und auf das lokale und systemische Immunsystem wirken. SCFP haben außerdem eine Mikrobiom-unabhängige Wirkung und nehmen Einfluss auf Darmepithelzellen sowie auf die Signalwege von Immunzellen [10]. So zeigt eine SCFP-Bindung an Mannoserezeptoren bspw., dass die Wundheilung von asthmatisch belasteten Bronchialepithelzellen unterstützt wird [26]. *In vivo* führte die SCFP-Supplementation bei einer Reihe von Spezies zu Änderungen des Phänotyps, der Funktion und des Zirkulationsverhaltens von Immunzellen. Färsen, die während der letzten 60 Tage der Trächtigkeit mit SCFP gefüttert wurden, wiesen eine tendenzielle Änderung des Phänotyps (CD62L-Expression) zirkulierender neutrophiler Granulozyten auf. Gleichzeitig zeigten diese Zellen eine erhöhte Fähigkeit Bakterien zu phagozytieren [27]. Bei Hunden kam es nach SCFP-Gabe zu einer signifikanten Verringerung in der Anzahl von Leukozyten und zu einem Anstieg des Serum-IgE-Spiegels bei zunehmender SCFP-Dosis [25]. In einer weiteren Fütterungsstudie kam es bei Hunden zu einem Anstieg der Zahl neutrophiler Granulozyten und zu einem Abfall der Lymphozytenzahl im peripheren Blut [28]. Bei Sauen führte eine SCFP-Fütterung wiederum zu einer erniedrigten Gesamtzahl von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten [29]. SCFP-Fütterungsstudien, die sich auf klinische Ergebnisse fokussierten, zeigten signifikant positive Einflüsse auf die Gesundheit von Mensch und Tier. So wurde bei Menschen der Verlauf von Infektionserkrankungen und allergischen Reaktionen positiv beeinflusst [30, 31] und bei Kälbern die Inzidenz von Lungenpathologien und bakteriellen Sekundärinfektionen gesenkt [32]. Kälber, die unter einer SCFP-Supplementation mit LPS belastet wurden zeigten eine geringere Akute-Phase-Reaktion und wiesen verringerte Serum-TNF-Konzentrationen auf [33]. Bei Pferden führte die SCFP-Supplementation zu einer Senkung des Prostaglandin-E2-Spiegels in der synovialen Flüssigkeit nach intraartikulärer Lipopolysaccharid-Injektion (LPS) [34]. Nach dem Training stiegen Belastungs-anzeigende Parameter wie Cortisol und Serum Amyloid A (SAA) nach SCFP-Fütterung von Pferden in geringerem Maße an und erreichten in kürzerer Zeit wieder Basalwerte als nicht supplementierte Pferde [35]. Erst wenige Studien befassten sich mit den Folgen einer SCFP-Supplementation für die Reaktionen des

adaptiven Immunsystems. Bei Rindern wurde eine tendenziell geringere Gesamtkonzentration an Serum-Interleukin-8 und Haptoglobin nach einer *Mannheimia-haemolytica*-Impfung nachgewiesen [36] und beim Geflügel eine geringere spezifische Antikörperbildung nach einer *Newcastle-Disease*-Virus-Impfung [37]. Inwiefern diese Beeinflussungen von Impfreaktionen auf direkten immunmodulatorischen Effekten von SCFP beruhen, oder indirekt über ein verändertes intestinales Mikrobiom bewirkt wurden, ist nicht untersucht worden.

1.6 Ziele der Studie

Das Hauptziel der vorliegenden Forschungsstudie war, modulatorische Effekte einer SCFP-Supplementation auf das Immunsystem bei Rennpferden nachzuweisen. Dafür wurden im ersten Schritt die Zusammensetzungen und das Zirkulationsverhalten der Blutleukozyten und der Retikulozyten im Verlauf der Fütterung durchflusszytometrisch erfasst. Außerdem wurde die frühe sowie die anamnestiche Immunantwort nach einer Impfung mit einem inaktivierten Influenza-Impfstoff analysiert. Im zweiten Schritt wurde der Einfluss von einer SCFP-Supplementation zum einem fütterungs- und zum anderen impf-assoziiert auf die fäkale Mikrobiota ermittelt. Damit sollte geprüft werden, ob sich die immunmodulatorischen Effekte eines SCFP über ein verändertes Darm-Mikrobiom erklären lassen.

Article

A *Saccharomyces Cerevisiae* Fermentation Product (Olimond BB) Alters the Early Response after Influenza Vaccination in Racehorses

Alexandra Lucassen ¹, Christa Finkler-Schade ² and Hans-Joachim Schuberth ^{1,*} 

¹ Institute of Immunology, University of Veterinary Medicine Foundation, 30559 Hannover, Germany; alexandra.lucassen@tiho-hannover.de

² Schade & Partner, 27283 Verden, Germany; cs@schadeundpartner.de

* Correspondence: hans-joachim.schuberth@tiho-hannover.de; Tel.: +49-511-953-7921

Simple Summary: Vaccination is one of the most important prophylactic methods for the prevention of disease in veterinary medicine. The initial post-vaccination events are dominated by innate immune mechanisms leading to a coordinated activation of specific adaptive immune responses. Thus, antibody production and induction of specific T cells depend on early post-vaccination events, triggered by vaccine ingredients and guided by factors released from initially targeted tissues and cells. The aim of this study was to analyse whether feeding a pre- and postbiotic feed supplement modulates such early immune responses after vaccination. Horses were fed a supplement (Olimond BB) based on products of fermented yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) for 8 weeks and subsequently vaccinated against influenza. Circulating leukocyte counts and their subpopulations were determined before and 24 h after vaccination. In absence of vaccination-induced side effects, horses receiving the supplement differed from control horses in the composition of neutrophilic granulocytes, CD4⁺ cells, and reticulocytes. Thus, the pre- and post-biotic feed supplement modulated early innate immune mechanisms after vaccination.



Citation: Lucassen, A.; Finkler-Schade, C.; Schuberth, H.-J. A *Saccharomyces Cerevisiae* Fermentation Product (Olimond BB) Alters the Early Response after Influenza Vaccination in Racehorses. *Animals* **2021**, *11*, 2726. <https://doi.org/10.3390/ani11092726>

Received: 30 August 2021

Accepted: 14 September 2021

Published: 18 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) fermentation products (SCFP) are used in animal husbandry as pre- and postbiotic feed supplements. A variety of immunomodulatory effects are noted in many species. The purpose of this study was to test the hypothesis that horses fed with SCFP containing feed additive Olimond BB display a modulated early immune response after influenza vaccination. Six horses received Olimond BB pellets (OLI) and five horses were fed placebo pellets (PLA) for 56 days. On day 40 all horses were vaccinated with a recombinant influenza A/equi-2 vaccine. At the day of vaccination, the groups did not differ in the composition of leukocyte subpopulations and reticulocytes. Twenty-four hours after vaccination total leukocyte counts and numbers of CD4⁺ T-cells significantly increased in both groups. In PLA horses, the numbers of neutrophil granulocytes significantly increased and numbers of CD8⁺ T-cells decreased, whereas the numbers of these cell types remained unchanged in OLI horses. Only OLI horses displayed a significant increase in reticulocyte percentages after vaccination. The numbers of lymphocytes, monocytes, CD21⁺ B-cells, and serum amyloid A levels remained unaffected in both groups after vaccination. Sixteen days after vaccination, PLA and OLI horses differed significantly in their enhanced ELISA IgG titres against Newmarket and Florida Clade 1 influenza strains. The observed differences after vaccination suggest that feed supplementation with Olimond BB leads to modulated early immune responses after influenza vaccination, which may also affect the memory responses after booster vaccination.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; prebiotics; postbiotics; vaccination response; neutrophilic granulocytes; T cells; B cells; reticulocytes; influenza vaccination; horses

1. Introduction

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) fermentation products (SCFP) are considered as nutraceuticals. Many studies report immunomodulatory and health benefits for SCFP applications in monogastric and ruminant mammalian species as well as in chicken [1,2]. The mechanisms of action of SCFP are manifold and include direct interaction of pre- and probiotic ingredients with local gut epithelial [3,4] and immune [5] cells, as well as the modulation of gut microbiota composition [6,7]. However, immunomodulatory effects of SCFP are not restricted to the gut.

In dogs, feeding of *S. cerevisiae* mannan oligosaccharides (5–6 g/day for 24 days) increased blood neutrophil and decreased blood lymphocyte concentrations [8]. SCFP supplementation (125–500 mg/day for 28 days [9]; 0.65% of daily feed for 14 days, [10]) resulted in lower total WBC counts of dogs and pigs (0.2% of daily feed [11]; 12–15 g/day [12]).

In adult cows, SCFP supplementation (20–90 g/animal/day for up to 60 days) altered the phenotype of circulating neutrophilic granulocytes, their phagocytosing capacity, and the gene expression of circulating leukocytes [13,14]. In calves, SCFP supplementation (1–5 g/day/animal) modulated both systemic and mucosal immune responses, resulting in reduced lung pathology, and a reduced incidence of secondary bacterial infection [15]. In beef calves challenged intravenously with LPS, SCFP-fed animals (12 g/day for 21 days) showed a reduced acute phase response and lower serum TNF levels [16]. In humans, SCFP supplementation (500 mg/day for 12 weeks) reduced the mean severity of specific allergic rhinitis symptoms, increased salivary IgA levels [17] and decreased incidences of cold or flu-like symptoms [18].

In horses, information concerning systemic effects of SCFP supplementation is still scarce. Valigura et al. [19] reported a stress-mitigating effect following prolonged exercise in young horses. Compared to a control group, horses that were SCFP dietary supplemented (21 g/d) for eight weeks showed no increase in serum amyloid A (SAA) values 6 h after a standardized submaximal exercise test and their cortisol levels returned quicker to pre-stress levels than in the control group. Dietary SCFP supplementation (21 g/day for 84 days) also decreased synovial prostaglandin E2 levels after an experimental LPS injection into the carpal joint of 10 month old Quarter horses [20].

Effects of SCFP supplementation on vaccination responses are scarcely reported. Following vaccination with a *Mannheimia haemolytica* vaccine, SCFP-fed beef cattle responded with a reduced acute phase response when compared to a control group [21]. In poultry, feeding of dietary yeast fermentate decreased antibody titers after Newcastle disease virus vaccination [22].

The immunomodulatory effects of SCFP feeding in several species and the horse implies that animals fed with SCFP display an altered response towards infectious challenges and vaccinations. The aim of our study was to address this hypothesis in racehorses vaccinated against equine influenza. Hence, SCFP were fed for eight weeks before horses were vaccinated with an inactivated influenza vaccine. To analyse early and late responses we determined the composition of blood leukocytes within 24 h after vaccination and titres of influenza-specific antibodies 2 weeks after vaccination.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The study was conducted at a stud farm in North Rhine Westphalia, Germany. The experiment was approved by the state of North Rhine Westphalia, Germany in accordance with § 8 (1) of the Animal Protection Act in conjunction with § 33 of the Animal Protection Experimental Animal Regulations (File number: 81-02.04.2020.A177). Approval for participation in this study in form of a signed declaration was obtained from the owner of the horses prior to the study.

The study was conducted with 11 English thoroughbreds (10 mares, 1 gelding) aged 2 years, with a mean body weight of 445 ± 32 kg. All horses were kept in one facility in individual boxes (3.50 m × 3.50 m) and different training courses. They received high-

quality hay and concentrate 3 times a day as well as water ad libitum at all times. The horses were allocated to two groups. One group (6 animals) received Olimond BB (OLI) pellets and the other group (5 animals) received placebo (PLA) pellets (Table 1). OLI and PLA pellets were fed daily (10 pellets/day) during the routine evening feeding for a total period of 41 days.

Table 1. Placebo and Olimond BB feed supplement ingredients.

Ingredient	PLA ¹	OLI
Tocopherol extract	0.05 g	0.05 g
Coconut oil	0.15 g	0.15 g
Vitamin C	0.15 g	0.15 g
Dextrose	1.00 g	-
Corn cob meal	0.75 g	-
Linseed cake	0.75 g	-
Microcrystalline cellulose	1.03 g	1.43 g
Minerals	1.13 g	1.23 g
inactivated yeasts	-	2.00 g
Pellet	5.01 g	5.01

¹ Feed supplements were fed as pellets: PLA, placebo; OLI, Olimond BB (g per pellet). Each horse received 10 pellets/day.

2.2. Blood Samples

Immediately before each blood sampling, the horses were clinically examined according to good veterinary practice. This included the examination of oral and eye mucous membranes, lymph nodes, and the cardiovascular system. Rectal body temperature was recorded daily at 6 a.m. using a digital thermometer (Microlife[®] Vet-Temp Thermometer, Covetrus, Hamburg, Germany). At 14-day intervals (days 1, 14, and 28) and at days 40 and 41 (day of vaccination and 24 h after vaccination, see Section 2.7), blood was collected from the jugular vein by puncture with a 20G × 1 Vacuette[®] Multiple Use Drawing Needle (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Heparinized blood was collected in BD Vacutainer[®] Sodium Heparin Tubes (Medicalis Medizintechnologie, Hannover, Germany). Blood for serum extraction was collected in BD Vacutainer[®] CAT Tubes (Medicalis Medizintechnologie, Hannover, Germany). All blood samples were collected at the same day hour and in the same individual order. Analysis of samples took place within 24 h at the Institute of Immunology, University of Veterinary Medicine Foundation, Hanover, Germany.

2.3. Leukocyte Preparation and Subpopulation Determination

Total blood leukocyte counts and quantifications of major cell subpopulation fractions (lymphoid cells, granulocytes, monocytes) among blood leukocytes were determined as described [23]. Using a flow cytometer (BD Accuri[™] C6 Flow Cytometer, Becton Dickinson Inc., Holdrege, NE, USA), 20,000 events were acquired. Viable granulocytes, monocytes and lymphocytes were identified in forward (FSC)/side scatter (SSC) density plots according to their characteristic FSC/SSC profiles (Figure 1c). Fractions of cellular subpopulations among viable leukocytes were multiplied with the total leukocyte count to obtain total cell counts.

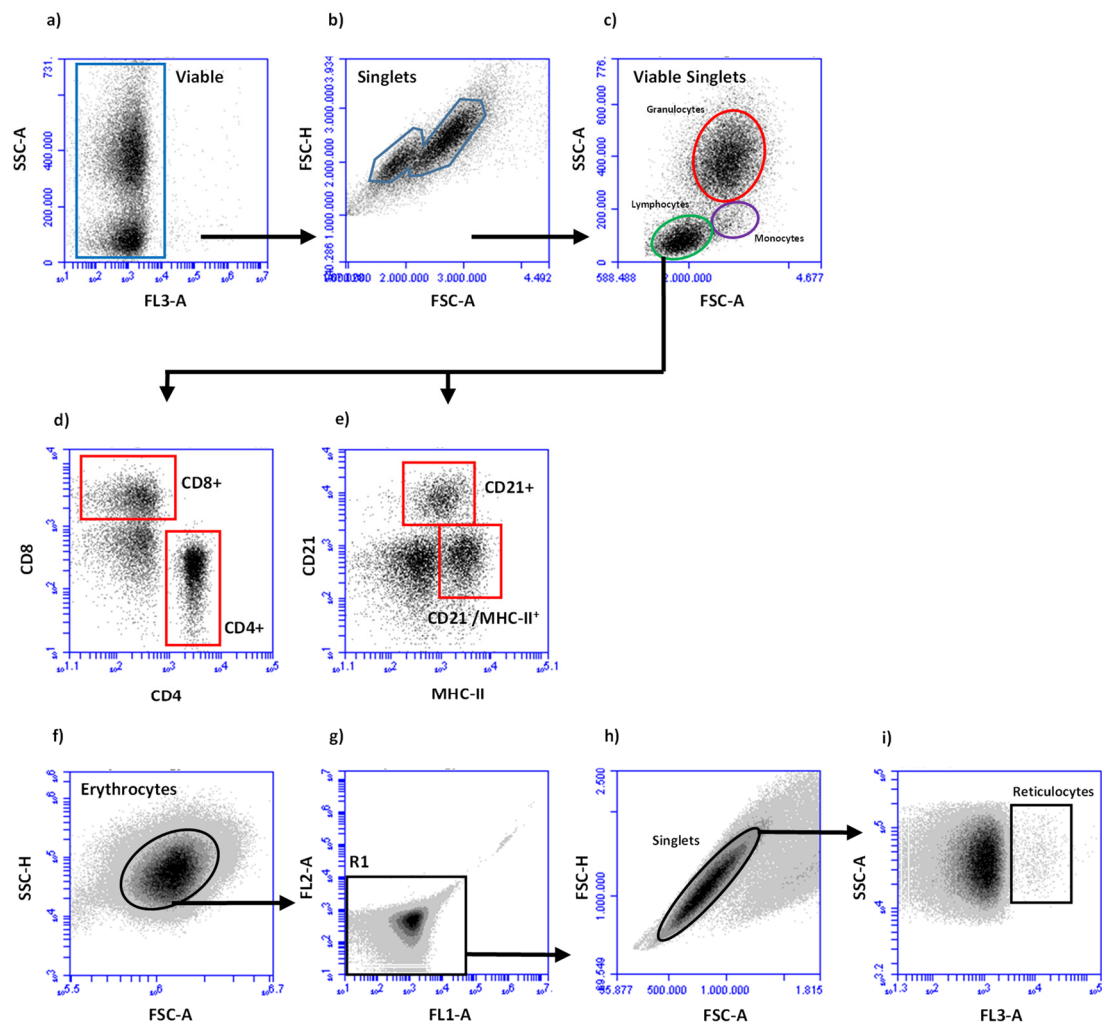


Figure 1. Gating strategy to determine fractions of leucocytes (a–e) and reticulocytes (f–i). (a) Viable, propidium iodide-negative cells were determined in FL3 versus SSC-A density plots.; (b) Single cells among viable cells were identified in FSC-A versus FSC-H density plots; (c) A region of granulocytes, lymphocytes, and monocytes were identified in FSC-A versus SSC-A density plots. Fractions of lymphoid cell subpopulations were determined after dual staining with antibodies specific for CD4 and CD8 or MHC II and CD21 to identify CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes (d) or CD21⁺ B-cells and CD21⁻MHC-II⁺ lymphocytes. Erythrocytes were identified in FSC/SSC density plots (f) and gated for FL1-/FL2- events (region R1, (g)). After gating on single cells (h), reticulocyte fractions were determined in FL3/SSC density plot (i).

2.4. Flow Cytometric Determination of Lymphocyte Subpopulations

Leukocytes (0.3×10^6 /well) were incubated with monoclonal antibodies (mAK) in 96-well round bottom plates (Corning™Costar™ 96 well cell Culture Cluster, Round Bottom) for 30 min on ice. The monoclonal antibodies were pre-assembled in two sets (30 μ L each). Set 1 contained anti eqCD4-FITC (Bio-Rad, MCA1078F, IgG1 0.1 mg/mL, 1:100), anti-canine CD21-AlexaFluor® 647 (cross-reacting with horses, BIO-RAD, MCA1781A647, IgG1 0.05 mg/mL, 1:200) and anti eqMHC-II-RPE (BIO-RAD, MCA1085PE, IgG1, 100 tests, 1:10). Set 2 contained eqCD4-FITC and eqCD8-RPE (BIO-RAD, MCA1080PE, IgG2a 100 tests/mL, 1:10). Set 3 included isotype controls (BIO-RAD, MCA1209F, IgG1-FITC; BIO-RAD, MCA929PE, IgG2a-PE) of equal concentrations to ensure that no nonspecific reaction of the applied monoclonal antibodies with equine leukocytes occurred.

After incubation, cells were washed twice with 200 μ L PBS containing bovine serum albumin 5.0 g/L, sodium azide 0.1 g/L (membrane immunofluorescence (MIF) buffer) for 4 min at $400 \times g$. The final cell pellet was suspended in 100 μ L MIF buffer containing 2 μ g/mL propidium iodide and subjected to flow cytometric analysis after gating on

lymphoid cells (Figure 1c). All analyses were performed with the Accuri™ C6 Flow Cytometer software. Fractions of lymphoid cells (CD4⁺ T-cells, CD8⁺ T-cells, CD21⁺ B-cells, and CD21⁻/MHC-II⁺ lymphoid cells) were multiplied with the absolute number of lymphoid cells/mL blood.

2.5. Flow Cytometric Determination of Reticulocytes

Reticulocyte percentages were determined essentially according to the procedure described by Viana et al. [24]. In brief, heparinized blood (5 µL) was mixed with 2 mL PBS and 20 µL acridine orange solution (5 µg/mL PBS, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). An unstained sample served as control. Samples were incubated at room temperature in the dark for 30 min. Subsequently, the fraction of reticulocytes among erythrocytes were determined flow cytometrically (Figure 1f–i).

2.6. Vaccination

On day 40, horses of both groups were vaccinated with a commercial vaccine against influenza (PROTEQFLU™ (1 mL Influenza A/eq/Ohio/03 [H3N8] recombinant of canary pox virus (strain vCP2242) and influenza A/eq/Richmond/1/07 [H3N8] recombinant of canary pox virus (strain vCP3011), with carbomer as the adjuvant, Boehringer-Ingelheim Vetmedica GmbH, Deutschland). The vaccination was administered intramuscularly on the left side of the neck with a disposable needle (1 × 20G, Neoject®, Dispodem Witt, Germany) after cleaning according to standard practice. In addition to rectal body temperature and a general examination, the animals were also examined 24 h after vaccination for vaccination side effects, such as pain and swelling of the injection site.

2.7. Determination of Serum-Amyloid A and Influenza-Specific Antibodies

For photometric analysis of the major acute-phase serum amyloid A (SAA) and determination of influenza-specific antibody titers, blood serum was collected on days 40 and 41. Samples were analyzed in an external laboratory (Laboklin, GmbH & Co. KG, Bad Kissingen, Germany). The ELISA was performed with equine influenza virus strains: A/eq/Prague/56, A/eq/South Africa/04/2003, A/eq/Ohio/03, A/eq/Newmarket/1/93, A/eq/Newmarket/2/93.

2.8. Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SEM and the number of subjects as n. Comparison of all parameters between the two time points in each group was performed using a paired *t*-test (SAS Enterprise Guide 7.1). In advance, the variables per group were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises, and Anderson-Darling tests. If there was no normal distribution in the OLI group with *n* = 6, the sign rank test was applied. If there was no normal distribution or log-transformed normal distribution in the PLA group with *n* = 5, a paired *t*-test was performed for descriptive purposes. The following parameters were not normally distributed in the PLA: Serum amyloid A, Florida clade 1 strain-specific and Newmarket strain-specific antibodies, reticulocytes, CD4⁺, CD8⁺, and CD21⁺ cells. Differences were considered statistically significant at a *p* value of < 0.05.

3. Results

3.1. Clinical Response and Serum Amyloid A Concentrations

At the day of vaccination, the general condition of all horses was normal and inconspicuous. Before vaccination, the rectal body temperature in both groups was within the physiological range (OLI: 37.86 ± 0.15 °C; PLA: 38.04 ± 0.05 °C). Horses of both groups showed no local vaccination side effects such as swelling, pain, or warmth at the injection site 24 h after vaccination. Twenty-four hours after vaccination the body temperature in both groups did not change significantly (OLI 37.84 ± 0.11 °C; PLA 38.06 ± 0.05 °C). Serum

amyloid A concentrations showed a >2-fold increase in 2/5 and 1/6 horses of the PLA and OLI group, respectively (Table 2).

Table 2. Serum Amyloid A concentrations before and 24 h after vaccination.

Group	Horse	SAA (µg/mL)		Fold Increase ¹
		D40	D41	
OLI	#1	8.8	69.8	7.9
	#2	10.7	11.8	1.1
	#3	10.5	13.5	1.3
	#4	233.7	141.9	0.6
	#5	9.2	16.1	1.8
	#6	10.9	11.0	1.0
PLA	#7	9.7	31.0	3.2
	#8	9.5	11.8	1.2
	#9	11.0	14.8	1.3
	#10	10.4	11.4	1.1
	#11	10.9	58.9	5.4

¹ ratio between day (D) 41/40 SAA values.

3.2. Blood Leukocyte Numbers and Reticulocyte Percentages

Before vaccination (day 40), both groups displayed the same numbers of leukocytes, leukocyte subpopulations, and reticulocytes except for a tendency ($p < 0.1$) for lower numbers of CD8⁺ T cells in the OLI group (Table 3).

Table 3. Concentrations of blood cellular subpopulations on the day of vaccination.

Cell Type	OLI	PLA	<i>p</i>
Leucocytes (G/L)	8.35 ± 1.79	8.88 ± 0.80	0.557
PMN (G/L)	3.69 ± 0.74	3.67 ± 1.45	0.971
Monocytes (G/L)	0.38 ± 0.09	0.36 ± 0.09	0.752
Lymphocytes (G/L)	4.28 ± 1.30	4.85 ± 1.12	0.460
CD8 ⁺ T cells (G/L)	1.51 ± 0.33	1.76 ± 0.51	0.086
CD4 ⁺ T cells (G/L)	1.11 ± 0.28	1.27 ± 0.45	0.471
CD21 ⁺ B cells (G/L)	0.49 ± 0.20	0.59 ± 0.47	0.633
CD21 ⁻ /MHCII ⁺ cells (G/L)	0.87 ± 0.52	0.78 ± 0.43	0.782
Reticulocytes (%)	0.34 ± 0.13	0.42 ± 0.15	0.371

Mean ± SEM of cell types after 40 days of OLI, Olimond BB (6 horses) or PLA, Placebo (5 horses) supplementation. *p*: *p*-value.

Twenty-four hours after vaccination, the number of total leukocytes and CD4⁺ cells increased significantly in both groups (Figure 2a,f). In the PLA group neutrophil counts increased ($p = 0.033$) and CD8⁺ cells decreased ($p = 0.031$), whereas in the OLI group these cell populations remained unchanged (Figure 2c,g). A vaccination-induced rise in reticulocyte percentages was only apparent in the OLI group ($p < 0.005$, Figure 2b). In neither group the vaccination altered the numbers of lymphocytes, monocytes, CD21⁺ cells or CD21⁻/MHCII⁺ cells (Figure 2d,e,h,i).

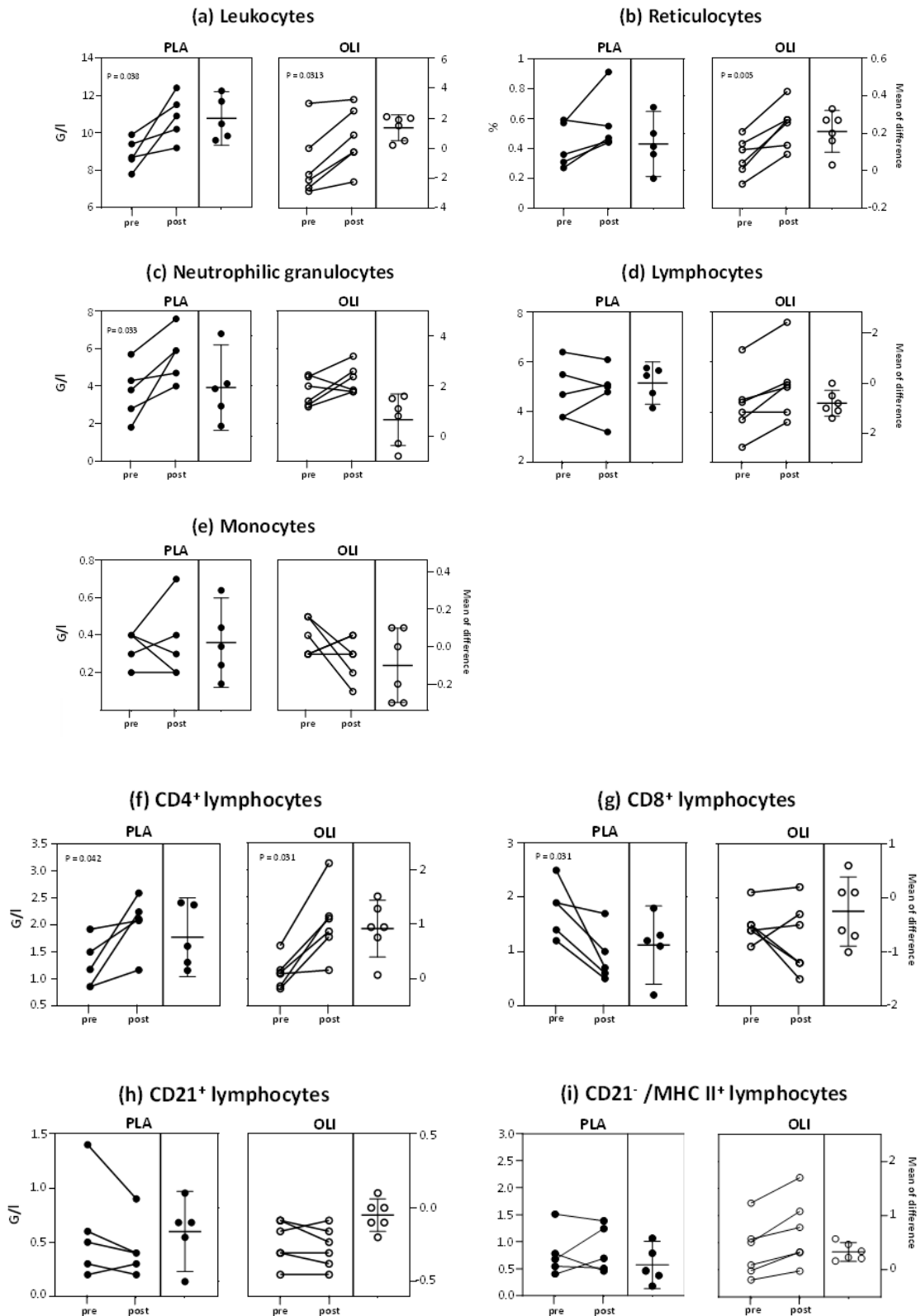


Figure 2. Vaccination-induced changes in leukocyte counts and reticulocyte proportions in blood. Cell counts and proportions of reticulocytes were determined by flow cytometry on the day of vaccination (pre) and 24 h after vaccination (post). Shown are individual responses and mean differences of vaccinated horses (OLI, $n = 6$; PLA, $n = 5$). p values were determined by paired t -test or signed-rank test and describe significances before and after vaccination within a group.

The observed changes in blood leukocyte and cell subpopulation numbers ranged between a 0.5-fold decrease (Figure 3, PLA, CD8⁺ T cells) and a 1.9-fold increase in CD4⁺ T-cells (Figure 3, OLI, CD4⁺ T cells).

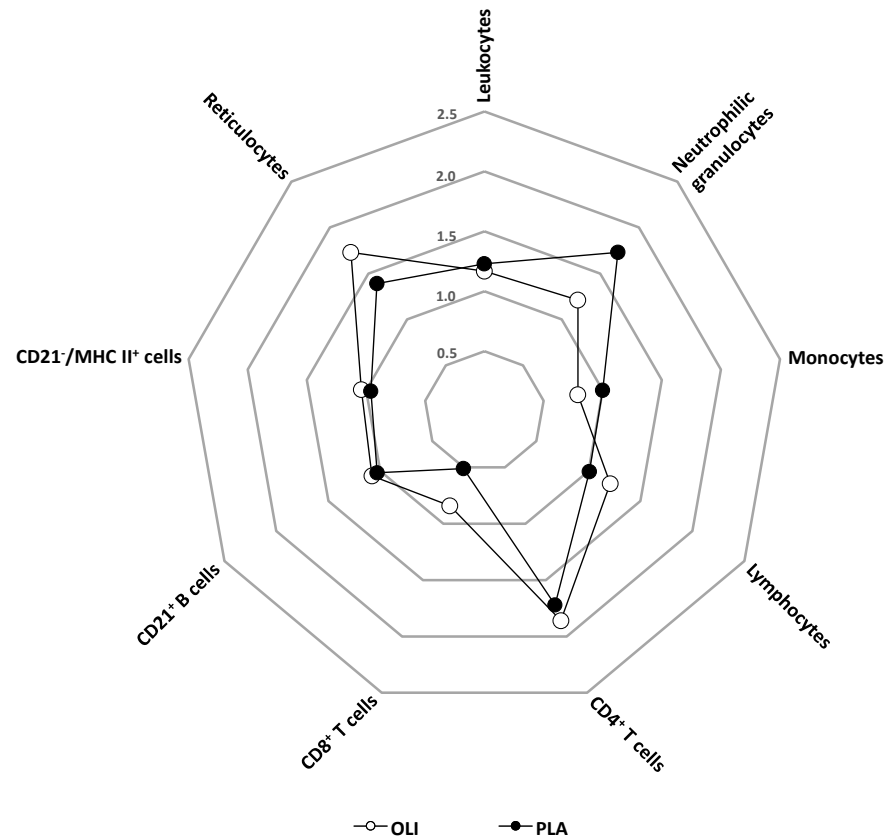


Figure 3. Spider diagram showing fold changes of blood cell populations within 24 h after vaccination.

3.3. Vaccination-Induced Influenza-Specific Antibodies

On the day of challenge (d40), horses of both groups had comparable ELISA antibody levels against H3/N8 influenza. Before and after vaccination antibodies against a H7/N7 strain were not detectable (Table 3). Sixteen days after vaccination horses of both groups showed a numerical increase in ELISA titers against H3/N8 strains. In the OLI group the increase reached significance for antibodies against Florida Clade 1 (H3/N8), in the PLA group a significant titer increase was noted for antibodies against Newmarket 2/93 (H3/N8) (Table 4).

Table 4. ELISA titer of Influenza-specific antibodies.

Group	Antigen ¹								
	Florida Clade 1 (H3N8)			Newmarket (H3N8)			Prague (H7N7)		
	D40	D56	<i>p</i>	D40	D56	<i>p</i>	D40	D56	
OLI	5.13 ± 0.62 ^{a2}	5.96 ± 1.05 ^a	0.033	4.71 ± 1.33 ^a	5.27 ± 0.79 ^a	0.373	n.d. ³	n.d.	
PLA	5.41 ± 0.58 ^a	6.24 ± 0.49 ^a	0.108	4.30 ± 0.58 ^a	5.68 ± 0.31 ^a	0.003	n.d.	n.d.	

¹ strains used for the ELISA: Florida clade 1 (A/eq/South Africa 04/2003, A/eq/Ohio/03), Newmarket (A/eq/Newmarket/1/93, A/eq/Newmarket/2/93), Prague (A/eq/prague/56). ² log-transformed (natural logarithm) titer means ± SEM. Group differences at days 40 and 56 were tested with the student's *t*-test. Means in columns with the same small letter superscript indicate no significant statistical difference. Statistical differences between days 40 and 56 were determined with the paired student's *t*-test. ³ not detectable.

4. Discussion

The period of six weeks in which feed was supplemented with SCFP did not result in an altered composition of circulating immune cells as at the day of vaccination both groups (PLA, OLI) did not differ significantly in any of the measured parameters (Table 2). This is in line with findings in calves and lambs where the SCFP feeding had no influence on the fraction of circulating immune cells subpopulations [15,25]. In contrast, according to the literature, SCFP supplementation raised the numbers of circulating leukocytes and neutrophils in heat-stressed cows [26] and the fraction of monocytes and B-cells in adult dogs [9]. These effects of SCFP supplementation on circulating immune cell populations indicate that SCFP feeding may not always lead to an altered blood immune cell composition and that species, age of the animals, feeding regimes, housing and other conditions affect the outcome of an SCFP supplementation. In the present study with racehorses, a changed leukocyte composition could not serve as an indicator of assessing a possible immunomodulatory effect induced through SCFP feeding.

Vaccinated horses in this study did not show any side effects after vaccination. None of the horses of either group displayed an enhanced (>38.5 °C) body temperature or swelling at the site of injection 24 h after vaccination. This may be due to the low number of vaccinated horses, since transient fever after vaccination against influenza was reported for several of 34 race horses when analysing the effects of 3 different influenza vaccines [27]. Concomitant with absent clinical side effects, serum amyloid A values remained largely unchanged after vaccination (Table 2). Thus, vaccinations induced only a weak or absent acute phase response (APR). Only two of five (PLA) and one of five (OLI) horses displayed a two-fold increase of SAA concentrations 24 h after vaccination (Table 2). This is in contrast to prominent acute phase responses with up to 100-fold higher SAA values as reported after vaccination with equine influenza vaccines containing ISCOMS (immune stimulating complexes) or a vector virus [28], or after booster vaccinations against EHV 1/4 within 24 h after injection [29]. The lack of an APR in the PLA group precludes speculations, whether SCFP supplementation in horses would lead to a reduced APR as reported for SCFP-fed beef steers following vaccination with a *Mannheimia haemolytica* vaccine [21].

Strong APRs after vaccination of horses were associated with an increased number of white blood cells between 9 and 48 h after vaccination [28]. Our observation of a vaccination-induced changed blood cell composition (Figures 2 and 3) indicates that a strong APR does not seem to be a prerequisite for such changes. Therefore, although we did not determine serum cytokine concentrations, the observed changes in blood leukocyte composition are most likely not due to high concentrations of vaccination-induced inflammatory cytokines (e.g., IL-1 β , IL-6, TNF). The effects reported in the racehorses may be due to a low level induction of cytokines, chemokines and other mediators, as observed after vaccination of humans against influenza [30] and more recently when analyzing the innate immune transcriptional signatures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) one day after vaccination of humans [31,32].

The differences between PLA and OLI horses regarding the vaccination-induced change in blood cell composition indicates that SCFP-fed horses release a different set of systemically acting mediators after vaccination. This is indicated by the selective and significant rise of reticulocytes after vaccinating OLI group horses (Figure 2). Raised reticulocyte fractions are the result of an increased erythropoiesis [33], an altered maturation of erythrocytes [34] or a differential activity of liver and spleen macrophages. An enhanced generation of reticulocytes after vaccination has/has not been described yet. Erythropoiesis normally takes place in the bone marrow [20,21]. Under specific conditions, e.g., stress situations or after vaccination, extramedullary erythropoiesis can also take place in the spleen and liver [35,36]. Whether vaccination of horses leads to the upregulated expression of genes encoding erythropoiesis-involved transcription factors and other erythroid proteins, or whether vaccination-induced mediators modulated the function of macrophages involved in erythrocyte turn-over [37] is unknown. In the present study, the observed differential changes in peripheral blood leukocyte composition may serve as a surrogate for

immune responses taking place in the muscle at the site of vaccination. An altered tissue responsiveness after SCFP feeding has been reported for human bronchial epithelium [38], the bovine udder [13,39], the bovine uterus [40], and equine joints [20].

Early (18–48 h post vaccination) changes in PBMC gene expression involve a multitude of genes including those coding for chemokines, chemokine receptors, and adhesion molecules [41,42]. A putative altered leukocyte expression of these molecules after vaccination of horses could lead to enhanced emigration from blood into tissues, or an enhanced release from primary and secondary immune organs, thus explaining the altered leukocyte composition in peripheral blood. The observed fold-changes up to 1.9 (e.g., CD4⁺ T cells, Figure 3) are in line with findings in healthy human volunteers vaccinated intramuscularly with an adjuvanted swine flu vaccine. This resulted in an average 1.6-fold increase of the blood monocyte fraction, while whole blood cells numbers slightly decreased [42]. Interestingly, such early changes are very useful to predict post-vaccination (antibody) responses. This has been shown in humans vaccinated with seasonal and pandemic H1N1 (pH1N1) vaccines [43].

For all horses the vaccination represented a booster vaccination with the aim to raise the pool of circulating, influenza-specific antibodies. The booster response was detectable at day 14 post vaccination with a selective increase of antibody titers against H3N8 strains (Table 4). Interestingly, the increase of antibody titers against several influenza strains was significantly different between PLA and OLI horses (Table 4). Whether these differences in antibody titer increases also translate into different levels of protection against equine influenza still needs to be determined. The single radial hemolysis assay, offering a stronger correlation of antibody titers with protection [44], was not performed. At least, the observed differential antibody responses towards a booster vaccination and whether the differential changes in circulating leukocyte numbers and reticulocytes are indicative for a modulated memory response is still speculative. At least in humans, early vaccination-induced patterns of gene expression predicted antibody titers against influenza or correlated with the humoral immune response to influenza vaccination [45,46].

5. Conclusions

The different changes in blood leukocyte composition and reticulocyte fractions of PLA and OLI racehorses after an influenza booster vaccination indicate that feeding of *S. cerevisiae* fermentation products alters initial vaccination-induced responses including the release of systemically acting mediators. The SCFP-induced systemic immune modulation may not only affect vaccination-induced responses but also initial events after pathogen contact. Initial innate immune responses towards vaccines and pathogens are decisive for the induction of adaptive immune responses. As we only studied the response to a booster vaccination, the question remains, whether SCFP feeding also modulates the generation of memory T and B cell pools of naïve horses and how the feeding-induced immune modulation affects the response to different classes of vaccines. In sum, the observed immunomodulatory effects of SCFP in horses suggest that SCFP-fed horses may display an altered response towards infectious challenges and vaccinations.

Author Contributions: A.L.: Conceptualization, data curation, formal analysis, methodology, investigation, software, writing—original draft, writing—review and editing, visualization. H.-J.S.: conceptualization, data curation, formal analysis, methodology, investigation, writing—original draft, writing—review and editing, supervision, project administration. C.F.-S.: conceptualization, investigation, review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by BB horses GmbH&Co.KG. This publication was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft and University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation within the funding programme Open Access Publishing.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) (81-02.04.2020.A177, 15 July 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: None of the data were deposited in an official repository. The data that support the study findings are available upon reasonable request.

Acknowledgments: The skillful help and support of Udo Rabe and Lennart Golbeck is highly acknowledged.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chou, W.K.; Park, J.; Carey, J.B.; McIntyre, D.R.; Berghman, L.R. Immunomodulatory Effects of *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation Product Supplementation on Immune Gene Expression and Lymphocyte Distribution in Immune Organs in Broilers. *Front. Vet. Sci.* **2017**, *4*, 37. [[CrossRef](#)]
2. Lopreiato, V.; Mezzetti, M.; Cattaneo, L.; Ferronato, G.; Minuti, A.; Trevisi, E. Role of nutraceuticals during the transition period of dairy cows: A review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2020**, *11*, 96. [[CrossRef](#)]
3. De Marco, S.; Sichetti, M.; Muradyan, D.; Piccioni, M.; Traina, G.; Pagiotti, R.; Pietrella, D. Probiotic Cell-Free Supernatants Exhibited Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity on Human Gut Epithelial Cells and Macrophages Stimulated with LPS. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2018**, *2018*, 1756308. [[CrossRef](#)]
4. Pujari, R.; Banerjee, G. Impact of prebiotics on immune response: From the bench to the clinic. *Immunol. Cell. Biol.* **2021**, *99*, 255–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ballou, M.A.; Davis, E.M.; Kasl, B.A. Nutraceuticals: An Alternative Strategy for the Use of Antimicrobials. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2019**, *35*, 507–534. [[CrossRef](#)]
6. Pinheiro, I.; Robinson, L.; Verhelst, A.; Marzorati, M.; Winkens, B.; den Abbeele, P.V.; Possemiers, S. A yeast fermentate improves gastrointestinal discomfort and constipation by modulation of the gut microbiome: Results from a randomized double-blind placebo-controlled pilot trial. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 441. [[CrossRef](#)]
7. Klemashevich, C.; Wu, C.; Howsmon, D.; Alaniz, R.C.; Lee, K.; Jayaraman, A. Rational identification of diet-derived postbiotics for improving intestinal microbiota function. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *26*, 85–90. [[CrossRef](#)]
8. Grieshop, C.M.; Flickinger, E.A.; Bruce, K.J.; Patil, A.R.; Czarnecki-Maulden, G.L.; Fahey, G.C., Jr. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides. *Arch. Anim. Nutr.* **2004**, *58*, 483–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lin, C.Y.; Alexander, C.; Steelman, A.J.; Warzecha, C.M.; de Godoy, M.R.C.; Swanson, K.S. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult dogs¹. *J. Anim. Sci.* **2019**, *97*, 1586–1599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Middelbos, I.S.; Godoy, M.R.; Fastinger, N.D.; Fahey, G.C., Jr. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 3022–3032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Burdick Sanchez, N.C.; Carroll, J.A.; Broadway, P.R.; Bass, B.E.; Frank, J.W. Modulation of the acute phase response following a lipopolysaccharide challenge in pigs supplemented with an all-natural *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product. *Livest. Sci.* **2018**, *208*, 1–4. [[CrossRef](#)]
12. Shen, Y.B.; Carroll, J.A.; Yoon, I.; Mateo, R.D.; Kim, S.W. Effects of supplementing *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in sow diets on performance of sows and nursing piglets. *J. Anim. Sci.* **2011**, *89*, 2462–2471. [[CrossRef](#)]
13. Ryman, V.E.; Nickerson, S.C.; Kautz, F.M.; Hurley, D.J.; Ely, L.O.; Wang, Y.Q.; Forsberg, N.E. Effect of dietary supplementation on the antimicrobial activity of blood leukocytes isolated from Holstein heifers. *Res. Vet. Sci.* **2013**, *95*, 969–974. [[CrossRef](#)]
14. Wu, Z.H.; Yu, Y.; Alugongo, G.M.; Xiao, J.X.; Li, J.H.; Li, Y.X.; Wang, Y.J.; Li, S.L.; Cao, Z.J. Short communication: Effects of an immunomodulatory feed additive on phagocytic capacity of neutrophils and relative gene expression in circulating white blood cells of transition Holstein cows. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 7549–7555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mahmoud, A.H.A.; Slate, J.R.; Hong, S.; Yoon, I.; McGill, J.L. Supplementing a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product modulates innate immune function and ameliorates bovine respiratory syncytial virus infection in neonatal calves. *J. Anim. Sci.* **2020**, *98*, skaa252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Burdick Sanchez, N.C.; Carroll, J.A.; Broadway, P.R.; Edrington, T.S.; Yoon, I.; Belknap, C.R. Some aspects of the acute phase immune response to a lipopolysaccharide (LPS) challenge are mitigated by supplementation with a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in weaned beef calves. *Transl. Anim. Sci.* **2020**, *4*, txaa156. [[CrossRef](#)]
17. Moyad, M.A.; Robinson, L.E.; Kittelsrud, J.M.; Reeves, S.G.; Weaver, S.E.; Guzman, A.I.; Bubak, M.E. Immunogenic yeast-based fermentation product reduces allergic rhinitis-induced nasal congestion: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Adv. Ther.* **2009**, *26*, 795–804. [[CrossRef](#)]
18. Moyad, M.A.; Robinson, L.E.; Zawada, E.T.; Kittelsrud, J.; Chen, D.G.; Reeves, S.G.; Weaver, S. Immunogenic yeast-based fermentate for cold/flu-like symptoms in nonvaccinated individuals. *J. Altern. Complement. Med.* **2010**, *16*, 213–218. [[CrossRef](#)]

19. Willemse, E.; Bobel, J.M.; Russell, K.; Ferguson, D.; Clausen, S.; Warren, L.K. Impact of endurance exercise on fecal indicators of equine gut health. *J. Eq. Vet. Sci.* **2019**, *76*, 48. [[CrossRef](#)]
20. Martinez, R.; Leatherwood, J.; Valigura, H.; Arnold, C.; Glass, K.; Much, M.; Owen, R.; Warzecha, C.; White, S. Responses to an intra-articular lipopolysaccharide challenge following dietary supplementation of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in young horses. *J. Eq. Vet. Sci.* **2019**, *76*, 80. [[CrossRef](#)]
21. Deters, E.L.; Stokes, R.S.; Genter-Schroeder, O.N.; Hansen, S.L. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in receiving diets of newly weaned beef steers. II. Digestibility and response to a vaccination challenge1. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 3906–3915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Cortés-Coronado, R.F.; Gómez-Rosales, S.; Angeles, M.d.L.; Casaubon-Huguenin, M.T.; Sørensen-Dalgaard, T. Influence of a yeast fermented product on the serum levels of the mannan-binding lectin and the antibodies against the Newcastle disease virus in Ross broilers. *J. Appl. Poultry Res.* **2017**, *26*, 38–49. [[CrossRef](#)]
23. Ahmed, M.H.; Wilkens, M.R.; Moller, B.; Ganter, M.; Breves, G.; Schuberth, H.J. Blood leukocyte composition and function in periparturient ewes kept on different dietary magnesium supply. *BMC Vet. Res.* **2020**, *16*, 484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Viana, K.A.; Carvalho, M.d.G.; Dusse, L.M.S.A.; Fernandes, A.C.; Avelar, R.S.; Avelar, D.M.V.; Carvalho, B.; Ribeiro, C.M.F.; Antonelli, L.R.d.V.; Teixeira, A.; et al. Flow cytometry reticulocyte counting using acridine orange: Validation of a new protocol. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **2014**, *50*, 189–199. [[CrossRef](#)]
25. Mahmoud, M.M.; Youssef, I.M.I.; Abd El-Tawab, M.M.; Bakr, H.A.; Eissa, N.A.; Hassan, M.S.; Giadinis, N.D.; Milewski, S.; Baumgartner, W.; Sobiech, P. Influence of probiotic and yeast culture supplementation on selected biochemical and immunological parameters of growing lambs. *Pol. J. Vet. Sci.* **2020**, *23*, 5–12. [[CrossRef](#)]
26. Al-Qaisi, M.; Horst, E.A.; Mayorga, E.J.; Goetz, B.M.; Abeyta, M.A.; Yoon, I.; Timms, L.L.; Appuhamy, J.A.; Baumgard, L.H. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on heat-stressed dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 9634–9645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Entenfellner, J.; Gahan, J.; Garvey, M.; Walsh, C.; Venner, M.; Cullinane, A. Response of Sport Horses to Different Formulations of Equine Influenza Vaccine. *Vaccines* **2020**, *8*, 372. [[CrossRef](#)]
28. Andersen, S.A.; Petersen, H.H.; Ersbøll, A.K.; Falk-Rønne, J.; Jacobsen, S. Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses. *Vet. J.* **2012**, *191*, 199–202. [[CrossRef](#)]
29. Duran, M.C.; Dumrath, C.A.C.; Bartmann, C.P.; Medina Torres, C.E.; Moschos, A.; Goehring, L.S. Serum Amyloid A (SAA) Concentration after Vaccination in Horses and Mules. *J. Eq. Vet. Sci.* **2020**, *92*, 103165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Tsai, M.Y.; Hanson, N.Q.; Straka, R.J.; Hoke, T.R.; Ordovas, J.M.; Peacock, J.M.; Arends, V.L.; Arnett, D.K. Effect of influenza vaccine on markers of inflammation and lipid profile. *J. Lab. Clin. Med.* **2005**, *145*, 323–327. [[CrossRef](#)]
31. Andersen-Nissen, E.; Fiore-Gartland, A.; Ballweber Fleming, L.; Carpp, L.N.; Naidoo, A.F.; Harper, M.S.; Voillet, V.; Grunenberg, N.; Laher, F.; Innes, C.; et al. Innate immune signatures to a partially-efficacious HIV vaccine predict correlates of HIV-1 infection risk. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009363. [[CrossRef](#)]
32. Pulendran, B.; Arunachalam, P.S. Systems biological assessment of human immunity to BNT162b2 mRNA vaccination. *Res. Sq.* **2021**, rs.3.rs-438662. [[CrossRef](#)]
33. Khuhapinant, A.; Bunyaratvej, A.; Tatsumi, N.; Pribwai, M.; Fucharoen, S. Number and maturation of reticulocytes in various genotypes of thalassaemia as assessed by flow cytometry. *Acta Haematol.* **1994**, *91*, 119–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Balan, M.; McCullough, M.; O'Brien, P.J. Equine blood reticulocytes: Reference intervals, physiological and pathological changes. *Comp. Clin. Pathol.* **2019**, *28*, 53–62. [[CrossRef](#)]
35. Delic, D.; Wunderlich, F.; Al-Quraishy, S.; Abdel-Baki, A.S.; Dkhal, M.A.; Araúzo-Bravo, M.J. Vaccination accelerates hepatic erythroblastosis induced by blood-stage malaria. *Malar J.* **2020**, *19*, 49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Alamo, I.G.; Kannan, K.B.; Loftus, T.J.; Ramos, H.; Efron, P.A.; Mohr, A.M. Severe trauma and chronic stress activates extramedullary erythropoiesis. *J. Trauma Acute Care Surg.* **2017**, *83*, 144–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Klei, T.R.L.; Meinderts, S.M.; van den Berg, T.K.; van Bruggen, R. From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 73. [[CrossRef](#)]
38. Michael, C.F.; Waters, C.M.; LeMessurier, K.S.; Samarasinghe, A.E.; Song, C.Y.; Malik, K.U.; Lew, D.B. Airway Epithelial Repair by a Prebiotic Mannan Derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Immunol Res.* **2017**, *2017*, 8903982. [[CrossRef](#)]
39. Rowson, A.D.; Wang, Y.Q.; Aalseth, E.; Forsberg, N.E.; Puntenney, S.B. Effects of an immunomodulatory feed additive on the development of mastitis in a mouse infection model using four bovine-origin isolates. *Animal* **2011**, *5*, 220–229. [[CrossRef](#)]
40. Yuan, K.; Mendonca, L.G.; Hulbert, L.E.; Mamedova, L.K.; Muckey, M.B.; Shen, Y.; Elrod, C.C.; Bradford, B.J. Yeast product supplementation modulated humoral and mucosal immunity and uterine inflammatory signals in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 3236–3246. [[CrossRef](#)]
41. Fuller, C.L.; Brittingham, K.C.; Porter, M.W.; Hepburn, M.J.; Pettitt, P.L.; Pittman, P.R.; Bavari, S. Transcriptome analysis of human immune responses following live vaccine strain (LVS) *Francisella tularensis* vaccination. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 3173–3184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sobolev, O.; Binda, E.; O'Farrell, S.; Lorenc, A.; Pradines, J.; Huang, Y.; Duffner, J.; Schulz, R.; Cason, J.; Zambon, M.; et al. Adjuvanted influenza-H1N1 vaccination reveals lymphoid signatures of age-dependent early responses and of clinical adverse events. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 204–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Tsang, J.S.; Schwartzberg, P.L.; Kotliarov, Y.; Biancotto, A.; Xie, Z.; Germain, R.N.; Wang, E.; Olnes, M.J.; Narayanan, M.; Golding, H.; et al. Global analyses of human immune variation reveal baseline predictors of postvaccination responses. *Cell* **2014**, *157*, 499–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Chambers, T.M.; Reedy, S.E. Equine Influenza Serological Methods. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2123*, 401–412. [[CrossRef](#)]
45. Nakaya, H.I.; Wrammert, J.; Lee, E.K.; Racioppi, L.; Marie-Kunze, S.; Haining, W.N.; Means, A.R.; Kasturi, S.P.; Khan, N.; Li, G.-M.; et al. Systems biology of vaccination for seasonal influenza in humans. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 786–795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bucasas, K.L.; Franco, L.M.; Shaw, C.A.; Bray, M.S.; Wells, J.M.; Niño, D.; Arden, N.; Quarles, J.M.; Couch, R.B.; Belmont, J.W. Early patterns of gene expression correlate with the humoral immune response to influenza vaccination in humans. *J. Infect. Dis.* **2011**, *203*, 921–929. [[CrossRef](#)]

Article

Feeding a *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation Product (Olimond BB) Does Not Alter the Fecal Microbiota of Thoroughbred Racehorses

Alexandra Lucassen ^{1,†}, Julia Hankel ^{2,†} , Christa Finkler-Schade ³, Lisa Osbelt ^{4,5} , Christian Visscher ²  and Hans-Joachim Schuberth ^{1,*} 

- ¹ Institute of Immunology, University of Veterinary Medicine Foundation, 30559 Hannover, Germany; alexandra.lucassen@tiho-hannover.de
- ² Institute of Animal Nutrition, University of Veterinary Medicine Foundation, 30559 Hannover, Germany; julia.hankel@tiho-hannover.de (J.H.); christian.visscher@tiho-hannover.de (C.V.)
- ³ Schade & Partner, 27283 Verden, Germany; cs@schadeundpartner.de
- ⁴ Helmholtz Center for Infection Research, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Germany; lisa.osbelt@helmholtz-hzi.de (L.O.); till.strowig@helmholtz-hzi.de (T.S.)
- ⁵ Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Straße 1, 30625 Hannover, Germany
- * Correspondence: hans-joachim.schuberth@tiho-hannover.de; Tel.: +49-511-953-7921
- † These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products (SCFP) are feed supplements and are widely used in animal nutrition to promote health. The biological effects of SCFP are based on prebiotic mechanisms that directly influence the microbial community of the gut microbiome or postbiotic factors that directly interact with host cells. To show whether the immunomodulatory effects of SCFP feeding are due to an altered composition of gut microbiota, we analyzed the fecal microbiota of racehorses. Horses were fed either the SCFP (Olimond BB) or a placebo product for six weeks, and fecal samples were collected for 16S rRNA gene sequencing. During this period, SCFP feeding only subtly affected the fecal microbiota in bacterial composition and diversity. SCFP and placebo horses differed significantly in the fecal bacterial diversity directly after intramuscular influenza vaccination. Altogether, the findings argue against a strong prebiotic effect of SCFP in racehorses. In contrast, the modulation of vaccine- and host-induced alterations of the microbiome suggests that the main effects of SCFP are due to contained or induced postbiotic components.

Abstract: Feed supplements such as *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products (SCFP) alter immune responses in horses. The purpose of this study was to analyze whether a prebiotic activity of the SCFP alters the gut microbiome in horses. Racehorses were fed either SCFP (Olimond BB, OLI, $n = 6$) or placebo pellets (PLA, $n = 5$) for 43 days. Fecal microbiota analysis was performed using 16S rRNA gene sequencing. The numbers and function of circulating immune cell subpopulations were analyzed by flow cytometry. SCFP supplementation resulted in non-consistent differences in fecal microbiota between the PLA and OLI during the feeding period. Rather, the individual animal had the highest impact on fecal microbiota composition. OLI and PLA horses displayed the same changes in numbers of blood leukocyte subpopulations over time. One day after a booster vaccination against equine influenza during the feeding period, the alpha diversity of fecal microbiota of PLA horses was significantly higher compared to OLI horses. This suggests that SCFP feeding altered the vaccination-induced spectrum of released mediators, potentially affecting gut microbiota. The overall non-consistent findings argue against a strong prebiotic effect of Olimond BB on the microbiota in racehorses. Fecal microbiota differences between the groups were also noticed outside the feeding period and, hence, are most likely not caused by the SCFP additive.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; prebiotics; postbiotics; microbiome; neutrophilic granulocytes; vaccination; horses



Citation: Lucassen, A.; Hankel, J.; Finkler-Schade, C.; Osbelt, L.; Strowig, T.; Visscher, C.; Schuberth, H.-J. Feeding a *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation Product (Olimond BB) Does Not Alter the Fecal Microbiota of Thoroughbred Racehorses. *Animals* **2022**, *12*, 1496. <https://doi.org/10.3390/ani12121496>

Academic Editor: Markku Saastamoinen

Received: 25 April 2022

Accepted: 6 June 2022

Published: 8 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In symbiosis with the host, gut microbiota provide energy and other essential nutrients by metabolizing host-indigestible cellulose and hemicellulose feed components [1]. Microorganisms interact with resident immune cells, intestinal epithelial cells, and neurons of the enteric nervous system [2] and release immunomodulatory molecules affecting the functional polarization of the resident immune cells [3]. Metabolic products of the germs (postbiotics) are also resorbed and distributed in the body and modulate various immune mechanisms and cell differentiation processes in the periphery [4]. Changes in the intestinal microbiome can lead to altered immune mechanisms in various parts of the body [2]. The composition of the gut microbiome can be altered via feed or by supplementing the feed with distinct additives [2]. One class of feed supplements is based on fermentation products of *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP, *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products). SCFPs were reported to have effects on the microbiota of the digestive tract with positive consequences for the health of the organism. In lactating dairy cows, SCFP feeding promoted the relative abundances of certain bacterial communities of the rumen milieu and attenuated the negative effects of subacute rumen acidosis [5]. In calves, SCFP feeding altered the microbial species richness in the rumen and colon [6] and favored the gut development and morphology [7]. Such prebiotic effects with an expansion of commensal bacteria and a reduced abundance of pathogenic bacteria were also seen in SCFP-fed dogs [8]. Adult cats showed a prebiotic effect by reducing *Clostridium perfringens* in the fecal microbiota [9]. So far, the effect of SCFP feeding on the equine gut or fecal microbiota has not been investigated.

Data for feed-induced changes in the equine microbiome are available for highly concentrated grain feed [10,11], high-starch feed [11], haylage [12], and grass-based diets [10]. Whether food supplements induce changes in the equine gut microbiome is less well studied. Feeding multi-strain probiotics to foals caused limited changes in the relative abundance of bacterial families, with the enrichment of *Lactobacillus* in the probiotic group [13]. In adult horses, a combination supplement of yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) and microalgae (*Aurantiochytrium limacinum*) increased the activity of fibrolytic bacteria, which counteracted the dysbiosis caused by high starch intake [14]. Other studies reporting on the questionable or lacking evidence of positive clinical effects of probiotic feed supplements in horses did not analyze gut or fecal microbiota-altering effects [15,16].

In horses, SCFP feeding exerted immunomodulatory effects. Ponies fed for 8 weeks with an SCFP product displayed a more rapid decrease in cortisol levels after exercise and little or no exercise-increased serum amyloid A or cytokine levels [17]. The SCFP feeding of young horses for 84 days resulted in lower prostaglandin E2 levels in the synovium after LPS injection into the carpal joint [18]. Previously, we reported that feeding SCFP to racehorses altered the circulation behavior of blood leukocyte subpopulations after an influenza booster [19]. Functional interactions between the gut microbiome and the vaccination response were first described in humans and mice [20–23]. In piglets, the composition of the microbiota before vaccination was predictive of the quantitative response after influenza A virus vaccination [24]. In bovines, a significant association was observed between bacterial communities of the bovine fecal microbiota and the immune response after parenteral vaccination against *E. coli* O157:H7 [25].

Whether the SCFP-induced changed immune response towards vaccination in racehorses was due to a gut microbiome-altering prebiotic effect or whether it was dominated by postbiotic SCFP components or SCFP-induced postbiotic products is still unclear.

The main aim of this study was to analyze putative SCFP feed-induced changes in the gut microbiome based on the characterization of the fecal microbiota composition over a ten-week trial with a six-week period of SCFP supplementation. Further, we analyzed whether SCFP feeding alters the leukocyte homeostasis in blood and a putative vaccine challenge-induced alteration of the fecal microbiota.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Eleven horses of the English Thoroughbred breed participated in the trial, which was conducted at a stud farm in North Rhine-Westphalia, Germany. The trial was approved by the State of North Rhine-Westphalia (Ref: 81-02.04.2020.A177) in accordance with §8 (1) of the Animal Welfare Act in conjunction with §33 of the Animal Welfare Experimental Animal Ordinance. The owner of the horses agreed to their participation in the form of a signed declaration prior to the study. The horses (10 mares and 1 stallion aged two to three years) had a mean body weight of $442 \text{ kg} \pm 34 \text{ kg}$. The horses were kept in individual stalls ($3.50 \text{ m} \times 3.50 \text{ m}$) and received ad libitum grass hay and water access as well as oats (2.7 kg average daily amount), a concentrate (0.9 kg average daily amount), and minerals (0.2 kg daily amount), in three meals/day for moderate exercise. The grain-based concentrate contained 12.8 MJ DE, 20% crude protein, 8.5% crude fiber, and 7% oils. The horses were exercised every day. The training was performed at different intensities: walking in a horse walker, trotting on the racetrack, slow canter on the racetrack, brisk canter on the racetrack, or simulation of a race on the racetrack. All of the horses underwent the same training at different frequencies so that, on average, they were trained for the same length of time and with the same mean intensity throughout the study.

2.2. Supplementation

The animals were randomly divided into two groups. Five horses (PLA group) were fed placebo pellets (10 pellets/day), and six horses (OLI group) were additionally fed Olimond BB pellets (10 pellets/day). The composition of the PLA and OLI pellets (5.01 g each) is given in Table S1. Both pellets contained equal amounts of tocopherol extract, coconut oil, and vitamin C. The content of microcrystalline cellulose (PLA 1.03 g) and minerals (PLA 1.13 g) was slightly higher in OLI pellets (1.43 g, 1.23 g). OLI pellets contained 2 g of inactivated yeast and yeast fermentation products. In PLA pellets, yeast products were replaced by dextrose, corncob meal, and linseed cake (Table S1). The OLI and PLA pellets were of the same size and color. The study was double-blinded. The pellets were given daily at the same time (evening) as the basic diet. The feeding period lasted 43 days (Figure 1).

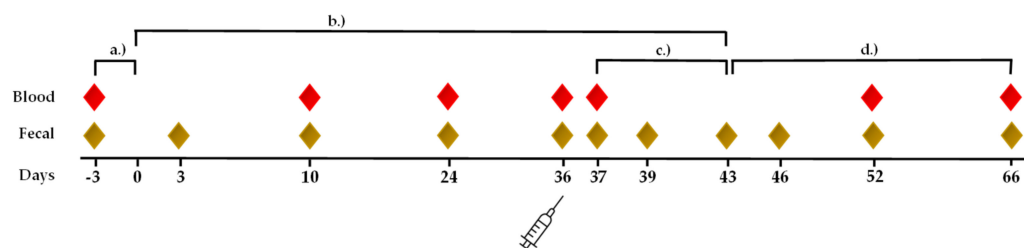


Figure 1. Timeline and sampling days of the trial. Blood samples (red diamond) and fecal samples (brown diamond) were collected on the indicated days. (a) day -3 to 0 before supplementation. (b) day 1 – 43 , the horses received the SCF product (OLI, $n = 6$) or a placebo (PLA, $n = 5$) during supplementation. (c) day 37 – 43 after vaccination. (d) day 43 – 66 , the horses received no supplementation (after supplementation period). On day 36 , the horses were vaccinated parenterally against equine influenza.

2.3. Blood Samples and Body Temperature

The blood was collected by venipuncture (external jugular vein) in BD Vacutainer[®] sodium heparin tubes (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) as described [19] (Figure 1). The samples were processed and analyzed within 24 h after collection. Prior to the blood collection, all of the horses were examined for general health. Rectal body temperature was measured daily in the morning with a digital thermometer (Microlife[®] Vet-Temp Thermometer, Covetrus, Hamburg, Germany).

2.4. Blood Leukocyte Preparation and Subpopulation Determination

The recording of the total numbers of blood leucocytes and the flow cytometric determination of dominant subpopulations among leucocytes (lymphoid cells, granulocytes, monocytes) and reticulocytes have been described in detail [1,19]. In brief, after the hypotonic lysis of heparinized blood, nucleated blood cells were identified as lymphoid cells, granulocytes, or monocytes based on their characteristic scatter characteristics after flow cytometric acquisition. Their relative fraction among the leucocytes was multiplied by the total numbers of leucocytes/mL blood to obtain the absolute values for each major subpopulation.

2.5. Flow Cytometric Determination of Lymphocyte Subpopulations and Reticulocytes

To determine lymphoid subpopulations, leucocytes were incubated with equine-specific and equine cross-reactive monoclonal antibodies, as described in detail in [19]. In brief, leucocytes obtained after the hypotonic lysis of heparinized blood were incubated in separate setups on ice for 10 min with antibody mixtures: Mixture 1: anti-eqCD4-FITC, anti-caCD21-AlexaFluor[®] 647, anti-eqMHC-II-RPE. Mixture 2: anti-eqCD4-FITC, anti-eqCD8-RPE. Mixture 3: murine IgG isotype controls IgG1-FITC, IgG2a-PE). All monoclonal antibodies were from BIO-Rad (Fedlkirchen, Germany). After labeling, the washed cells were flow cytometrically analyzed, and after gating on the viable and single cells [19], the fractions of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD21⁺ B cells, and CD21⁻/MHC-II⁺ lymphoid cells were determined. To obtain total numbers/mL, the fraction of the subpopulation among lymphoid cells was multiplied by the absolute number of lymphoid cells/mL in the blood. The determination of the reticulocyte fractions among erythrocytes was conducted according to (2) as detailed in [19]. In brief, the heparinized blood was mixed with 2 mL of PBS and 20 µL of acridine orange solution (5 µg/mL of PBS) for 30 min in the dark. Reticulocytes among erythrocytes were identified based on their higher fluorescence signal in the FL1 channel.

2.6. Vaccination and Determination of Influenza-Specific Antibodies

Five horses from the PLA group and 6 horses of the OLI group were vaccinated intramuscularly on day 36 with an influenza vaccine (PROTEQFLU[™], Boehringer-Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany) containing influenza A/eq/Ohio/03 [H3N8] recombinant canary virus (strain vCP2242) and influenza A/eq/Richmond/1/07 [H3N8] recombinant canary virus (strain vCP3011), with carbomer as adjuvant). All horses were of the same age (2 years) (PLA: 1 stallion, 4 mares; OLI: 6 mares). On the day of vaccination and 24 h after vaccination, the horses were examined for health and side effects (pain, swelling at the injection site). Influenza-specific blood serum antibody titers were determined in an external laboratory (LABOklin GmbH & Co.KG, Bad Kissingen, Germany) in samples taken on the day of vaccination and one day later. The details of the influenza strains used for the ELISA are mentioned in [19].

2.7. Fecal Samples for Microbiota Analysis

To determine the fecal microbiota, samples from fresh feces were taken on days −3, 3, 10, and 24 after the start of supplementation, on the day of vaccination (day 36), day 37 (1 day after vaccination), and day 39 (3 days after vaccination). After the end of the supplementation period (day 43), further fecal samples were taken on days 46, 52, and 66 (3, 9, and 23 days after the end of supplementation) (Figure 1). For this purpose, 5 g of feces was taken from the inside of the feces balls with sterile spoons and stored in tubes filled with RNase-Inhibitor (RNAsepar[®], Biosepar GmbH, Simbach am Inn, Germany) until further analysis.

2.8. DNA Extraction

The samples were first purified (ZymoBIOMICS 96 MagBead DNA Kit, Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Germany) before the hypervariable region V4 of the 16S rRNA

gene was amplified in accordance with previously described protocols [26]. Therefore, the primer F515/R806 was used. The amplicons were sequenced on the Illumina MiSeq platform (PE300). The Usearch8.1 software package was used to assemble, quality control, and cluster the obtained reads, and `-fastq_mergepairs -with fastq_maxdiffs 30` was used to merge the reads. Chimeric sequences were identified and removed with the help of `cluster_otus (-otu_radius_pct 3)` and the Uchime command included in the Usearch8.1 workflow. Quality filtering was set up with the `fastq_filter (-fastq_maxee 1)`; minimum read length, 200 bp. The reads were clustered into 97% ID operational taxonomic units (OTUs). The OTU clusters and representative sequences were determined with the UPARSE algorithm [27]. Silva database v128 [28] and the RDP Classifier [29] were used for taxonomic assignment with a bootstrap confidence cutoff of 70%.

The samples with fewer than 999 total reads were removed. Chloroplast and Mitochondria as well as OTUs that were not present in at least more than one sample and OTUs with an abundance <0.02% were pruned. After this filtering step, a total of 121 samples were included in the statistical analyses. Six samples stand out because of their high dissimilarity to all other samples. It was noticeable that these samples differed from other samples due to the increased presence of archaea. Therefore, nine taxa belonging to the kingdom archaea were excluded, and only the taxa belonging to the kingdom bacteria were kept. The dataset contained 2,807,473 reads (mean number of reads: 23,202; range: 8569–144,591) mapped to 677 operational taxonomic units (OTUs).

2.9. Statistical Analysis

R (version 4.1.2, R Core Team, Vienna, Austria) and the R-package “phyloseq” (version 1.36.0) [30] were used for data visualization and analyses. Selected alpha diversity indices (Observed, Chao 1, and Shannon) were measured with the R-package “phyloseq”. The means of the alpha diversity estimates were compared with the aim of evaluating the influence of the factor supplementation at each time point (Table S2). The data were checked for normality by analyzing the model residuals with the Shapiro–Wilk normality test implemented in the package “rstatix” (version 0.7.0) [31]. The normally distributed data were further tested for equal variance with Levene’s test of the “car” package (version 3.0.12) [32]. Subsequent pairwise comparisons were conducted with the package “rstatix”. Statements of statistical significance were based upon p -values < 0.05. The total community structure and composition of samples were assessed during the administration of the supplements (3 days after the introduction of the supplement until 7 days after vaccination = discontinuation of the supplement) for changes in relation to supplementation and animal by permutational multivariate analysis of variance using the Bray–Curtis distance (PERMANOVA) via the `adonis` function of the “vegan” package (version 2.5.7) [33]. Ordination was performed using the Bray–Curtis dissimilarity-based principal coordinate analysis (PCoA). Differentially abundant OTUs between both groups at different time points were identified with the help of the R package “DESeq2” (version 1.32.0), which uses tests based on the negative binomial distribution [34] (Table S3). To detect OTUs that are differentially abundant in fecal samples of horses after vaccination compared to the time before vaccination, the R package “edgeR” (version 3.34.1) [35] for paired samples was used (Tables S4 and S5). Raw p -values were adjusted using the method of Benjamini and Hochberg [36] to control a false discovery rate (FDR) of 5%. Additionally, a cutoff for the log₂ fold change of ± 1 was set. A Venn diagram was generated using the package “rstatix”.

The data of blood cells are expressed as mean \pm SEM and the number of subjects as n . The data were tested for normal distribution using the SAS Enterprise Guide 7.1 program (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) with Shapiro–Wilk, Kolmogorov–Smirnov, Cramer–von Mises, and Anderson–Darling tests. If no normal distribution was present, the data were transformed to achieve a normal distribution. A comparison of all of the parameters between the time points in each group was performed with a paired T -test for the normally distributed data. For non-normally distributed data, a Wilcoxon test was used. Previously,

the variables per group were tested for normal distribution. To check which effects influence the data, a two-way analysis of variance was applied after testing the normal distribution, as described above, or a Wilcoxon test in the case of non-normally distributed data. For the data on the feeding process per group, a normal distribution was assumed for descriptive purposes, and a one-way analysis of variance of repeated measurements was performed. For all statistical methods, a p -value < 0.05 indicates significance.

3. Results

3.1. Fecal Microbiota Diversity

No consistent picture was identified in terms of the possible effects of the dietary supplement on bacterial richness and diversity in fecal samples of horses (Figure 2). Shannon's diversity index was statistically significantly different between the placebo and Olimond on the day after vaccination (Figure 2 and Table S2).

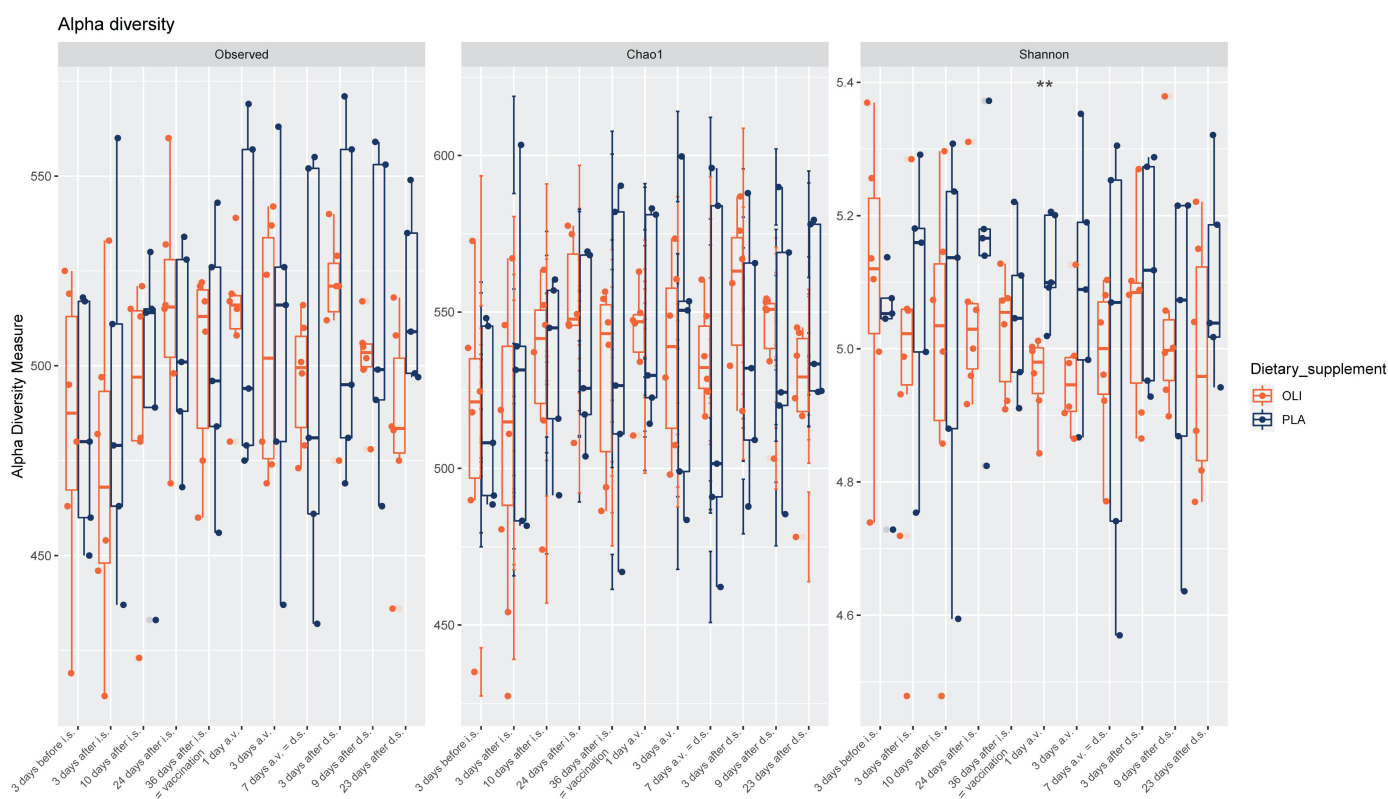


Figure 2. Box-plots showing Observed, Chao1 and Shannon index in fecal samples of horses depending on groups (OLI = Olimond, PLA = Placebo) separately for each sampling time (i.s. = introduction of the supplement, a.v. = after vaccination, d.s. = discontinuation of the supplement). **: p -value < 0.01 .

3.2. Heterogeneity of the Gut Microbial Community of the Individual Horse

Both dietary supplementation and sampled animals had a significant effect on the bacterial composition of the samples (Table 1).

Table 1. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) results based on Bray—Curtis dissimilarities.

	DF	SumsOfSqs	F.Model	R ²	Pr (>F)
Dietary_supplement	1	0.485	7.097	0.055	0.001
Animal_No	9	4.296	6.980	0.484	0.001
Residuals	60	4.103			
Total	70	8.884			

Testing the prediction that microbiota would cluster after supplementation yielded a significant p -value; however, the R^2 value was low (0.055), suggesting poor separation of the communities by this variable alone. Instead, the samples separated more clearly by the individual animal ($p = 0.001$, $R^2 = 0.484$). The separation between microbiota composition of samples is visualized as PCoA in Figure 3.

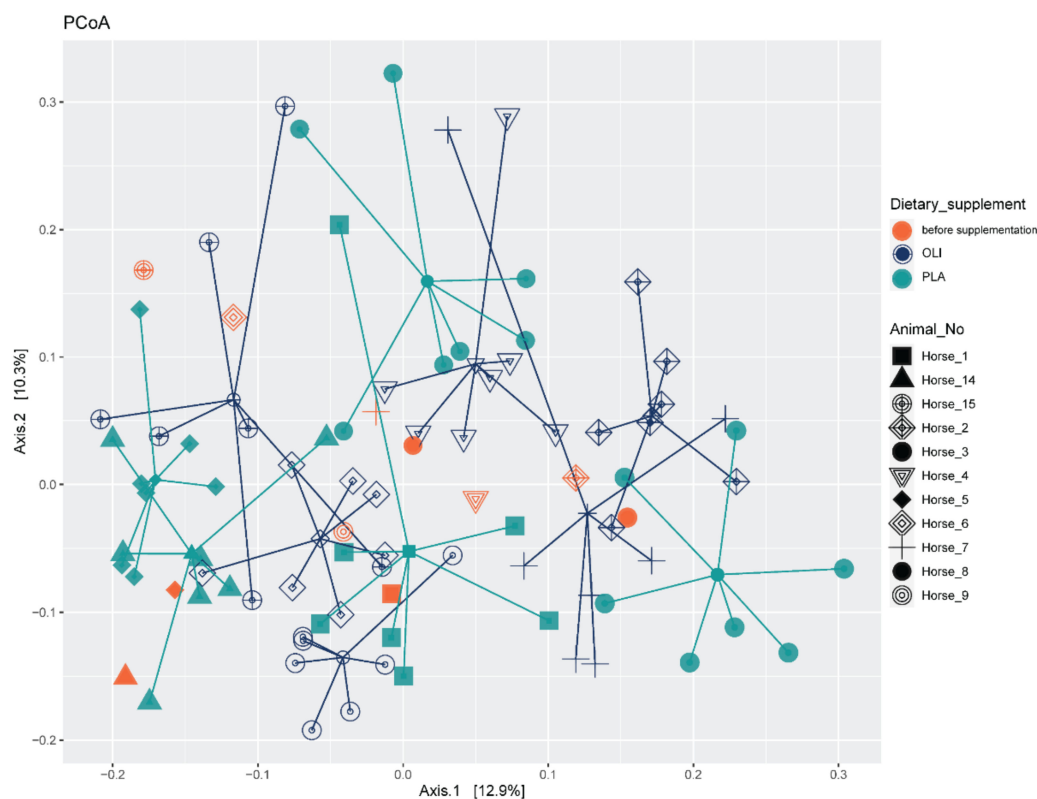


Figure 3. Bray–Curtis dissimilarity-based principal coordinate analysis (PcoA) was performed on fecal samples of horses. Different point shapes represent samples of a different horse; lines connect samples obtained from horses with the start of the experiment. Colors indicate the group membership (OLI = Olimond, PLA = Placebo). Samples marked in orange were taken before the start of the experiment.

3.3. Identification of Specific Taxa Associated with the Feeding Measures

Fecal microbiota was dominated at the phylum level by *Bacteroidetes* (average: 41.7%) and *Firmicutes* (33.3%), followed by *Verrucomicrobia* (12.6%), *Spirochaetae* (average: 6.20%), and *Fibrobacteres* (average: 4.11%). The relative abundances of bacterial phyla in every sample are shown in Figure S1.

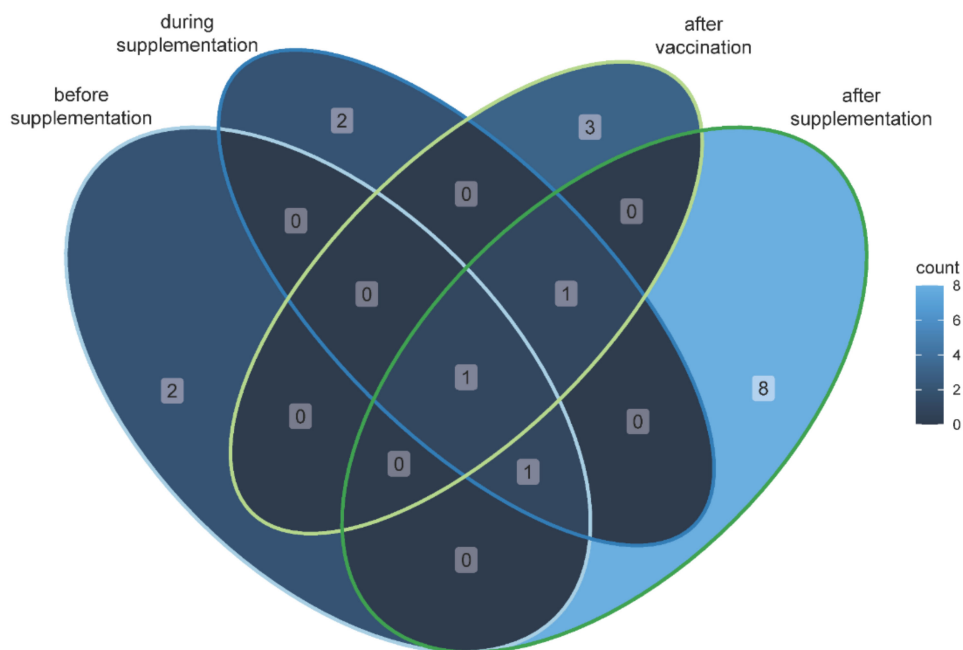
The number of differentially abundant OTUs in the pairwise comparisons of the two groups are shown in Table 2. The differentially abundant OTUs between both groups at different time points are listed in Table S3.

A Venn diagram showing significantly different OTUs between OLI and PLA horses that are shared from day -3 to 0 (before supplementation), day $1-36$ (six horses received the SCF product during supplementation), day $37-43$ (the SCF product is still offered, but all horses were vaccinated at day 36, after vaccination), and day $43-66$ (the horses received no supplementation, after supplementation) (Figure 4). Significantly different OTUs in the intersections of the Venn diagram seem to be influenced by the animals themselves (therefore appearing as significantly different in more than one experimental phase) rather than by administering the supplement.

Table 2. Number of differentially abundant features in the pairwise comparisons of the two groups at different time points during the experiment.

Samples	Comparison	$p < 0.05$	$p\text{FDR} < 0.05 \ \& \ \text{abs}(\log_2\text{FC}) > 1$
Day −3	PLA vs. OLI	53	4
Day 3	PLA vs. OLI	39	0
Day 10	PLA vs. OLI	35	1
Day 24	PLA vs. OLI	31	3
Day 36 ¹	PLA vs. OLI	37	2
Day 37 ²	PLA vs. OLI	49	0
Day 39 ³	PLA vs. OLI	47	3
Day 43 ⁴	PLA vs. OLI	54	2
Day 46 ⁵	PLA vs. OLI	43	8
Day 52 ⁶	PLA vs. OLI	30	0
Day 66 ⁷	PLA vs. OLI	49	1

¹ day of vaccination; ² 24 h after vaccination; ³ 3 days after vaccination ⁴ 7 days after vaccination/ discontinuation of the supplement; ⁵ 3 days after discontinuation of the supplement; ⁶ 9 days after discontinuation of the supplement; ⁷ 23 days after discontinuation of the supplement. Raw p -values were adjusted using the method of Benjamini and Hochberg [36] to control a false discovery rate (FDR) of 5%. Additionally, a cutoff for the log₂ fold change of ± 1 was set. PLA = Placebo, OLI = Olimond.

**Figure 4.** Venn diagram showing significantly different OTUs (selected with a criterion of FDR-adjusted p -values < 0.05 and absolute log₂ fold change > 1) between horses belonging to the two groups PLA and OLI that are shared among the experimental phases.

OTU₅₄ was repeatedly identified in all experimental phases as significantly different between the PLA and OLI horses. OTU₅₄ was enriched in the samples from the PLA horses already before supplementation, the 10th and 24th day of offer, seven days after vaccination, and finally with the third day until the ninth day after the discontinuation of the supplementation (Table S3). OTU₅₄ represents a bacterial species that is assigned to the genus *Fibrobacter*, which belongs to the family *Fibrobacteraceae* within the phylum *Fibrobacteres*. Two OTUs (OTU₁₂₀₅ and OTU₂₀₃₄) were found to be significantly different between both groups exclusively during the offer of the supplements. Both OTUs were enriched in samples of PLA horses only once, 24 days after the introduction of the supplement. None of the OTUs identified as significantly different in abundance between the feeding groups up to the day of vaccination significantly changed its abundance in response to vaccination (Tables S4 and S5).

Three OTUs were identified as being significantly different between both groups exclusively three and seven days after vaccination: OTU_346 (phylum: *Spirochaetae*, family: *Spirochaetaceae*, genus *Treponema* 2), OTU_28 (phylum: *Bacteroidetes*, family: *Porphyromonadaceae*), and OTU_258 (phylum: *Verrucomicrobia*). Counts of OTU_28 in OLI horses showed a significant enrichment 3 days after vaccination. On the same day, this out was additionally identified as being significantly different between PLA and OLI horses, with higher read counts in PLA horses.

3.4. SCFP Feeding Does Not Alter Time-Dependent Changes of Blood Leukocyte Subpopulations

The number of leukocytes, neutrophilic granulocytes, monocytes, CD4⁺/CD8⁺ T cells, CD21⁺ B cells, CD21⁻ MHCII⁺ cells, and the fraction of reticulocytes did not differ between the groups on sampling days -3 to 36 (with the exception on sampling day 28 for lymphocyte numbers, $p = 0.036$). Between sampling days, day 36 (day of vaccination) and day 66, time-dependent changes in leukocyte subpopulation numbers were the same in both groups, except for the apparent disparate kinetics of leukocytes and neutrophilic granulocyte numbers (Figure 5a,b). Factor time had the strongest effect on all cell populations (except CD21⁻/MHCII⁺ lymphocytes, Table 3). The interaction of group and time had a significant effect on leukocyte and neutrophilic granulocyte numbers. The group had no influence on any of the determined parameters (Table 3).

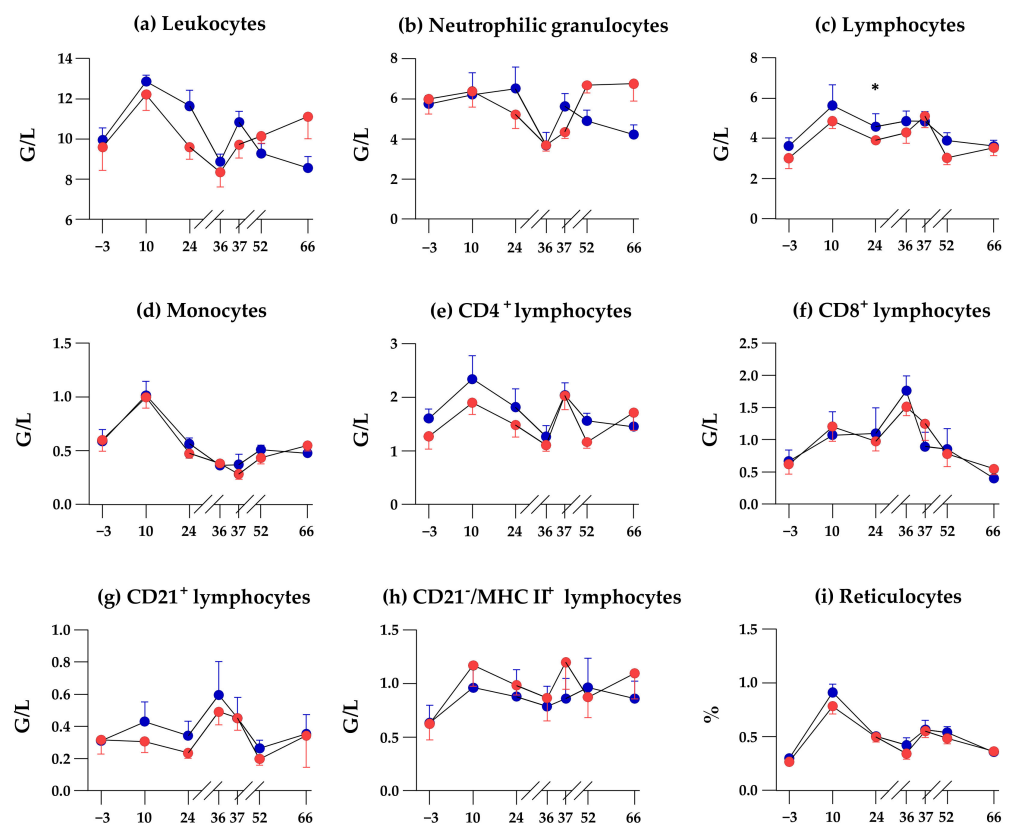


Figure 5. Changes in leukocyte counts ((a), blood leukocytes subpopulations; (b), neutrophilic granulocytes; (c), lymphocytes; (d), monocytes; (e), CD4⁺ T cells; (f), CD8⁺ T cells; (g), CD21⁺ B cells; (h) CD21⁻ MHC II⁺ lymphocytes) and reticulocyte percentages (i) in the blood due to feeding. Cell counts of (a) and percentage of reticulocytes were determined by flow cytometry on days -3 (before supplementation), 10, 24 (during supplementation), 36 (during supplementation and day of vaccination), 37 (after vaccination), 52 and 66 (after supplementation). Shown are the responses per group (OLI in red, $n = 6$; PLA in blue, $n = 5$). The p -value was determined with the two-sample-test or the Wilcoxon test and describe the significance between the two groups per sampling day. Significance is present if the p -value is < 0.05 .

Table 3. Two-way analysis of variance (ANOVA).

	Point in Time	Group	Group * Point in Time ¹
	Pr (>F)	Pr (>F)	Pr (>F)
Leukocytes	<0.0001	-	0.002
Neutrophilic granulocytes	<0.0001	-	0.002
Lymphocytes	<0.0001	-	-
Monocytes	<0.0001	-	-
CD4 ⁺ lymphocytes	<0.0001	-	-
CD8 ⁺ lymphocytes	<0.0001	-	-
CD21 ⁺ lymphocytes	0.006	-	-
CD21 ⁻ /MHC II ⁺ lymphocytes	-	-	-
Reticulocytes	<0.0001	-	-

The data were tested for normal distribution. If normal distribution was present, a two-way analysis of variance was performed. If not normally distributed, a Wilcoxon test was applied. Significance is present if the p -value is < 0.05. ¹*: Interaction between group and point in time.

On the day of vaccination and at any time point after vaccination, OLI and PLA horses did not differ significantly in the number of neutrophilic granulocytes. However, changes in the numbers of neutrophilic granulocytes after vaccination appeared to be different between the PLA and OLI horses. In the OLI group, the numbers significantly rose between day 36 and day 66, whereas in the PLA group, the numbers significantly dropped from day 37 to day 66 after a significant rise between day 36 and day 37 (Figure 6).

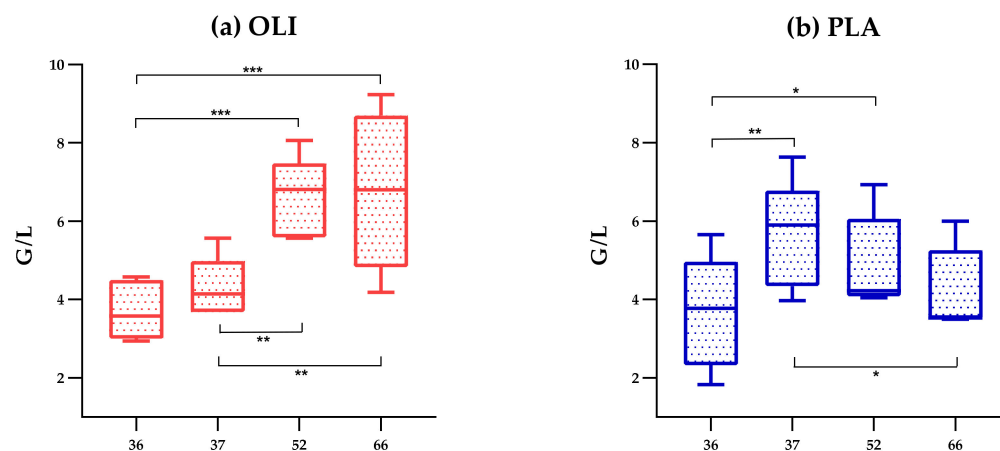


Figure 6. Changes in neutrophilic granulocytes per group ((a), OLI, $n = 6$; (b), PLA, $n = 5$) from day 36 to day 66 in the blood after vaccination. Cell counts were determined by flow cytometry on days 36 (during supplementation and before vaccination), 37 (during supplementation and after vaccination), 56, and 70 (after supplementation). One-way analysis of variance for repeated measurements (assumed normal distribution). * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.02$), *** ($p < 0.01$). There is no significance between the two groups at any time point shown.

4. Discussion

Diet has significant effects on the fecal microbiota of healthy horses [37]. We first addressed the question of whether SCFP feeding leads to an altered composition of fecal microbiota.

The trial was designed to allow for representative sampling. We investigated both short-term and long-term effects by taking samples before the start of supplementation and six samples during the 43-day feeding period (Figure 1). A similar duration of the feeding phase has been used in other studies on fecal microbiota [11,37,38]. The number of horses ($n = 11$) was in the range of other studies (between six and seventeen [11,37–39]). Our design largely excluded random influences on the microbiota that can occur on each sample

day despite identical experimental conditions [40]. Changes in the bacterial community due to dietary components can be detected in the fecal microbiota after only a few days [12,40]. A dietary change in foals in response to pasture grass was visible in the fecal microbiota within 4 days [41].

No significant, consistent effect on fecal microbiota could be attributed to SCFP feeding. Despite the subtle differences in distinct OTUs, OLI, and PLA the animals did not differ in their alpha diversity during the feeding period up to the day of inoculation (day 36, Figure 2 and Table S2). Testing the prediction that microbiota would cluster after supplementation yielded a significant *p*-value; however, only 5.5% of the sample variability can be explained by this factor alone. This is in contrast to other studies that have found alterations in the composition of the gut microbiome due to the supplementation of feed with *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products (cows [5], calves [6,7], dogs [8], and cats [9]). The largely unchanged composition of the microbiota after SCFP feeding compared with the placebo group was reflected to some extent in the unchanged time-dependent kinetics of the number and composition of blood leukocytes, their subpopulations, and the fraction of reticulocytes. During feeding until inoculation on day 36, the parameters of both groups showed an approximately parallel course, and, with one exception on day 28, there was no significant difference between the groups (Figure 5). The fact that SCFP feeding had no effect on circulating cells in the blood was also discussed by Lucassen et al. [19]. At this point, however, it must be emphasized that only the microbiota in the feces was analyzed to illustrate the potential influence of the supplement on the gut microbiota of the horses. The intestinal compartments (stomach, colon, small intestine, rectum) harbor bacterial species in different variations and abundances [42,43]. Therefore, in the absence of a significant shift in fecal bacterial species diversity by SCFP feeding, we cannot exclude the possibility that putative prebiotic effects manifested in the small intestine, the proximal colon, or in between.

The individual animal had the greatest influence on the composition of the fecal microbiota (Table 2). The horses in our study formed a homogeneous group kept under identical conditions. This precludes that husbandry conditions, training intensity, environmental factors, age, breed, and weather conditions had an influence on the highly dynamic microbiome [12,44,45]. Whether individual horses responded differently to physical and psychological stressors, as described in Mach et al., was not considered in our study [46].

An isolated OTU of the genus *Fibrobacter*, which belongs to the family *Fibrobacteraceae* (phylum *Fibrobacteres*), differed significantly between PLA and OLI horses. This OTU repeatedly and independent of the SCFP supplementation (day −3, day 10, day 24, day 43, day 46, and day 52) showed increased abundance in the PLA group (Table S3). *Fibrobacter* ferment a narrow range of carbohydrates, including cellulose and cellobiose, with the major fermentation products succinic and acetic acids, sometimes with a small amount of formic acid [47]. *Fibrobacteres* are major degraders of plant biomass in the herbivore gut [48]. The highest relative abundances of *Fibrobacteres* sequences are observed in samples from strictly herbivorous hosts with large body weights [49]. In horses, *Fibrobacter* is most abundant in the small intestine, large intestine, and rectum [44]. Previously, a significant increase in the relative abundance of *Fibrobacter* has been associated with the increased feeding of hay in horses [37,50] or in grass-fed compared to concentrate-fed horses [10]. Live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation in combination with a high-starch diet resulted in a significant reduction in relative levels of *Fibrobacter succinogenes* in fecal samples of horses, which was chosen as one of two exemplary cellulolytic bacteria [51]. *Fibrobacter* require carbon dioxide, straight-chain and branched-chain saturated fatty acids, and one or more vitamins, while ammonia is essential as the nitrogen source [47]. The major fermentation products are succinic and acetic acids, sometimes with a small amount of formic acid [47]. Two studies have observed lower abundances of the genus *Fibrobacter* in association with equine disease. In contrast to horses with Equine metabolic syndrome (EMS), an overrepresentation of the genus *Fibrobacter* is found in healthy control horses [52]. In the study by Leclere et al., healthy horses and horses with asthma were relocated to

the same stables after a grazing period, while the change of feed to hay and of the stable environment resulted in a significant increase in the relative abundance of *Fibrobacter* only in healthy horses [37]. This indicates that the intestinal microbiota of asthmatic horses does not adapt in the same way to dietary and environmental changes as the microbiota of healthy horses. Underlying mechanisms that explain how airway obstruction and inflammation could influence the intestinal microbiota and how, in turn, this microbiota could modulate systemic inflammation in asthmatic horses deserves further investigation [37]. It should be emphasized that a significant horse effect was found for *Fibrobacteres* in the same study [37].

Interestingly, a parenteral vaccination against influenza resulted in a significant difference in alpha diversity between PLA and OLI horses (Figure 2). Alpha diversity increased in PLA horses, whereas it remained at the same level in OLI horses (Figure 2). Such a vaccine-induced change in the composition of the gut microbiome was described in cows [25] and in calves. A second vaccination with *E. coli* O157:H7 resulted in significantly different alpha diversity of the fecal microbiota [25]. Of the three measured diversity indices, only the Shannon index differed significantly between both groups. The Shannon index additionally takes the evenness of species in a community into account. While the total number of bacterial species has not changed (indicated by measured richness between PLA and OLI horses), there is a higher similar abundance between the present bacterial species within fecal microbiota of PLA horses compared to OLI horses one day after vaccination. We suspect that due to vaccination, no more bacterial species appear, but the abundance of the present species within microbiota was influenced differently between PLA and OLI horses.

The reasons for a challenge-induced change in the fecal microbiota are largely unknown but may be induced by circulating vaccine-induced cytokines and other mediators reaching the gut microbiome [53]. That SCFP feeding of racehorses may have altered the spectrum of released mediators after vaccination has been discussed previously [19]. In support of this, PLA and OLI horses showed a different trend in numbers of neutrophilic granulocytes, monocytes, CD4⁺ lymphocytes, CD8⁺ lymphocytes, and CD21⁻/MHCII⁺ lymphocytes between day 36 and day 66 (Figures 6 and S2). That SCFP feeding alters a vaccination-induced mediator spectrum has also been reported for cattle [54] and poultry [55]. Local gut epithelial cells sensing vaccination-induced mediators may, in turn, release a different spectrum of mediators affecting the local microbiota [56–58]. Thus, the difference in alpha diversity between OLI and PLA horses 24 h after parenteral vaccination may be the consequence of a temporarily altered host-microbiota interaction. That such effects on the fecal microbiota could be seen within 24 h after the application of the parenteral stimulus was rather surprising. However, rapid microbiota changes in the feces of racehorses have been described after exposure to a race stressor in a time window between 24 h before and 48 h after the race [45].

5. Conclusions

Since feeding with the SCFP Olimond BB did not cause a significant shift in fecal bacterial species, a prebiotic effect of Olimond BB seems very unlikely. Differences between SCFP- and placebo-fed racehorses regarding a vaccination-induced altered alpha diversity of fecal microbiota and the development of blood leukocyte subset numbers support the hypothesis that postbiotic ingredients of Olimond BB altered the host response after vaccination. In sum, the findings indicate an immunomodulatory effect of SCFP-feeding, which is independent of significant microbiota changes in the gastrointestinal tract. The lack of a vaccination-induced change in the alpha diversity of SCFP-fed horses points towards SCFP-mediated regulatory mechanisms of inflammatory responses, which should be analyzed in the future.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani12121496/s1>, Figure S1: Bar charts represent the relative abundances of the dominant phyla in fecal samples of horses; Figure S2: Time effect of leukocyte subpopulations between day 36 and 66 per group; Table S1: Placebo and Olimond BB feed supplement ingredients; Table S2: Assessment of the treatment on alpha diversity estimates; Table S3: Differentially abundant OTUs (padj < 0.05) in samples of horses that have received Placebo vs Olimond at different time points of the experiment; Table S4: Differentially abundant OTUs (padj < 0.05) between two time points of horses that have received Olimond; Table S5. Differentially abundant OTUs (padj < 0.05) between two time points of horses that have received Placebo.

Author Contributions: A.L.: Conceptualization, data curation, formal analysis, methodology, investigation, software, writing—original draft, writing—review and editing, visualization. J.H.: data curation, formal analysis, methodology, writing—original draft, writing—review and editing, visualization. C.V.: methodology, review and editing. L.O.: methodology, review and editing. T.S.: methodology, review and editing. H.-J.S.: conceptualization, data curation, formal analysis, methodology, investigation, writing—original draft, writing—review and editing, supervision, project administration. C.F.-S.: conceptualization, investigation, review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by BB horses GmbH&Co.KG. This Open Access publication was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—491094227 “Open Access Publication Costs” and the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) (81-02.04.2020.A177, 15 July 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data for this study have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession number PRJEB52027.

Acknowledgments: The skillful help and support of Udo Rabe and Lennart Golbeck is highly acknowledged.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kauter, A.; Epping, L.; Semmler, T.; Antao, E.-M.; Kannapin, D.; Stoeckle, S.D.; Gehlen, H.; Lübke-Becker, A.; Günther, S.; Wieler, L.H.; et al. The gut microbiome of horses: Current research on equine enteral microbiota and future perspectives. *Anim. Microbiome* **2019**, *1*, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. McDermott, A.J.; Huffnagle, G.B. The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology* **2014**, *142*, 24–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kim, L.; Morley, P.S.; Traub-Dargatz, J.L.; Salman, M.D.; Gentry-Weeks, C. Factors associated with Salmonella shedding among equine colic patients at a veterinary teaching hospital. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2001**, *218*, 740–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Belkaid, Y.; Harrison, O. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* **2017**, *46*, 562–576. [[CrossRef](#)]
5. Tun, H.M.; Li, S.; Yoon, I.; Meale, S.J.; Azevedo, P.A.; Khafipour, E.; Plaizier, J.C. Saccharomyces cerevisiae fermentation products (SCFP) stabilize the ruminal microbiota of lactating dairy cows during periods of a depressed rumen pH. *BMC Vet. Res.* **2020**, *16*, 237. [[CrossRef](#)]
6. Xiao, J.; Alugongo, G.; Chung, R.; Dong, S.; Li, S.; Yoon, I.; Wu, Z.; Cao, Z. Effects of Saccharomyces cerevisiae fermentation products on dairy calves: Ruminal fermentation, gastrointestinal morphology, and microbial community. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 5401–5412. [[CrossRef](#)]
7. Alugongo, G.; Xiao, J.; Chung, Y.; Dong, S.; Li, S.; Yoon, I.; Wu, Z.; Cao, Z. Effects of Saccharomyces cerevisiae fermentation products on dairy calves: Performance and health. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 1189–1199. [[CrossRef](#)]
8. Lin, C.-Y.; Alexander, C.; Steelman, A.J.; Warzecha, C.M.; de Godoy, M.R.C.; Swanson, K.S. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult Dogs. *Anim. Sci.* **2019**, *97*, 1586–1599. [[CrossRef](#)]
9. Matheus, L.F.D.O.; Risolia, L.W.; Ernandes, M.C.; de Souza, J.M.; Oba, P.M.; Vendramini, T.H.A.; Pedrinelli, V.; Henríquez, L.B.F.; Massoco, C.D.O.; Pontieri, C.F.F.; et al. Effects of Saccharomyces cerevisiae cell wall addition on feed digestibility, fecal fermentation and microbiota and immunological parameters in adult cats. *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 351. [[CrossRef](#)]
10. Daly, K.; Proudman, C.J.; Duncan, S.H.; Flint, H.J.; Dyer, J.; Shirazi-Beechey, S.P. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. *Br. J. Nutr.* **2011**, *107*, 989–995. [[CrossRef](#)]

11. Dougal, K.; De La Fuente, G.; Harris, P.A.; Girdwood, S.E.; Pinloche, E.; Geor, R.; Nielsen, B.D.; Ii, H.C.S.; Elzinga, S.; Newbold, C.J. Characterisation of the Faecal Bacterial Community in Adult and Elderly Horses Fed a High Fibre, High Oil or High Starch Diet Using 454 Pyrosequencing. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87424. [[CrossRef](#)]
12. Salem, S.E.; Maddox, T.W.; Berg, A.; Antczak, P.; Ketley, J.M.; Williams, N.J.; Archer, D.C. Variation in faecal microbiota in a group of horses managed at pasture over a 12-month period. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 8510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Schoster, A.; Guardabassi, L.; Staempfli, H.R.; Abrahams, M.; Jalali, M.; Weese, J.S. The longitudinal effect of a multi-strain probiotic on the intestinal bacterial microbiota of neonatal foals. *Equine Vet. J.* **2015**, *48*, 689–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Grimm, P.; Combes, S.; Pascal, G.; Cauquil, L.; Julliand, V. Dietary composition and yeast/microalgae combination supplementation modulate the microbial ecosystem in the caecum, colon and faeces of horses. *Br. J. Nutr.* **2020**, *123*, 372–382. [[CrossRef](#)]
15. Cooke, C.G.; Gibb, Z.; E Harnett, J. The Safety, Tolerability and Efficacy of Probiotic Bacteria for Equine Use. *J. Equine Vet. Sci.* **2021**, *99*, 103407. [[CrossRef](#)]
16. Gerstner, K.; Liesegang, A. Effect of a montmorillonite-bentonite-based product on faecal parameters of horses. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2018**, *102*, 43–46. [[CrossRef](#)]
17. Valigura, H.C.; Leatherwood, J.L.; Martinez, R.E.; Norton, S.A.; White-Springer, S.H. Dietary supplementation of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product attenuates exercise-induced stress markers in young horses. *J. Anim. Sci.* **2021**, *99*, skab199. [[CrossRef](#)]
18. Martinez, R.E.; Leatherwood, J.L.; Arnold, C.E.; Glass, K.G.; Walter, K.W.; Valigura, H.C.; Norton, S.A.; White-Springer, S.H. Responses to an intra-articular lipopolysaccharide challenge following dietary supplementation of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in young horses. *J. Anim. Sci.* **2021**, *99*, skab272. [[CrossRef](#)]
19. Lucassen, A.; Finkler-Schade, C.; Schuberth, H.-J. A *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation Product (Olimond BB) Alters the Early Response after Influenza Vaccination in Racehorses. *Animals* **2021**, *11*, 2726. [[CrossRef](#)]
20. Lynn, D.J.; Pulendran, B. The potential of the microbiota to influence vaccine responses. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *103*, 225–231. [[CrossRef](#)]
21. Jamieson, A.M. Influence of the microbiome on response to vaccination. *Hum. Vaccines Immunother.* **2015**, *11*, 2329–2331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lynn, D.J.; Benson, S.C.; Lynn, M.A.; Pulendran, B. Modulation of immune responses to vaccination by the microbiota: Implications and potential mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *22*, 33–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nguyen, Q.N.; Himes, J.E.; Martinez, D.R.; Permar, S.R. The Impact of the Gut Microbiota on Humoral Immunity to Pathogens and Vaccination in Early Infancy. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005997. [[CrossRef](#)]
24. Borey, M.; Blanc, F.; Lemonnier, G.; Leplat, J.-J.; Jardet, D.; Rossignol, M.-N.; Ravon, L.; Billon, Y.; Bernard, M.; Estellé, J.; et al. Links between fecal microbiota and the response to vaccination against influenza A virus in pigs. *NPJ Vaccines* **2021**, *6*, 92. [[CrossRef](#)]
25. Mir, R.A.; Schaut, R.G.; Allen, H.K.; Looft, T.; Loving, C.L.; Kudva, I.T.; Sharma, V.K. Cattle intestinal microbiota shifts following *Escherichia coli* O157:H7 vaccination and colonization. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0226099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Caporaso, J.G.; Lauber, C.L.; Walters, W.A.; Berg-Lyons, D.; Lozupone, C.A.; Turnbaugh, P.J.; Fierer, N.; Knight, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4516–4522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Edgar, R.C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 996–998. [[CrossRef](#)]
28. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596. [[CrossRef](#)]
29. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5261–5267. [[CrossRef](#)]
30. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [[CrossRef](#)]
31. Kassambara, A. Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests [R Package Rstatix Version 0.7.0]. Available online: <https://mran.microsoft.com/web/packages/rstatix/index.html> (accessed on 20 January 2022).
32. Fox, J. *John Fox and Sanford Weisberg*, 3rd ed.; SAGE: Thousand Oaks, CA, USA, 2019.
33. Oksanen, J.; Blanchet, F.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlenn, D.; Minchin, P.; O’Hara, R.; Simpson, G.; Solymos, P. Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.5-7. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (accessed on 18 January 2022).
34. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)]
35. Robinson, M.D.; McCarthy, D.J.; Smyth, G.K. EdgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 139–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **1995**, *57*, 289–300. [[CrossRef](#)]
37. LeClere, M.; Costa, M.C. Fecal microbiota in horses with asthma. *J. Vet. Intern. Med.* **2020**, *34*, 996–1006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Fernandes, K.A.; Rogers, C.W.; Gee, E.K.; Kittelmann, S.; Bolwell, C.F.; Bermingham, E.N.; Biggs, P.J.; Thomas, D.G. Resilience of Faecal Microbiota in Stabled Thoroughbred Horses Following Abrupt Dietary Transition between Freshly Cut Pasture and Three Forage-Based Diets. *Animals* **2021**, *11*, 2611. [[CrossRef](#)]
39. Sorensen, R.J.; Drouillard, J.S.; Douthit, T.L.; Ran, Q.; Marthaler, D.G.; Kang, Q.; Vahl, C.I.; Lattimer, J.M. Effect of hay type on cecal and fecal microbiome and fermentation parameters in horses. *J. Anim. Sci.* **2020**, *99*, skaa407. [[CrossRef](#)]
40. Uhr, G.T.; Dohnalová, L.; Thaïss, C.A. The Dimension of Time in Host-Microbiome Interactions. *mSystems* **2019**, *4*, e112846. [[CrossRef](#)]
41. Fernandes, K.A.; Kittelmann, S.; Rogers, C.; Gee, E.; Bolwell, C.F.; Bermingham, E.; Thomas, D.G. Faecal Microbiota of Forage-Fed Horses in New Zealand and the Population Dynamics of Microbial Communities following Dietary Change. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112846. [[CrossRef](#)]
42. Costa, M.C.; Stämpfli, H.R.; Arroyo, L.G.; Allen-Vercoe, E.; Gomes, R.G.; Weese, J.S. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. *BMC Vet. Res.* **2015**, *11*, 19. [[CrossRef](#)]
43. Steelman, S.M.; Chowdhary, B.P.; Dowd, S.; Suchodolski, J.; E Janečka, J. Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis. *BMC Vet. Res.* **2012**, *8*, 231. [[CrossRef](#)]
44. Costa, M.; Silva, G.; Ramos, R.; Staempfli, H.; Arroyo, L.; Kim, P.; Weese, J. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Vet. J.* **2015**, *205*, 74–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Górnjak, W.; Cholewińska, P.; Szeligowska, N.; Wołoszyńska, M.; Soroko, M.; Czyż, K. Effect of Intense Exercise on the Level of Bacteroidetes and Firmicutes Phyla in the Digestive System of Thoroughbred Racehorses. *Animals* **2021**, *11*, 290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Mach, N.; Ruet, A.; Clark, A.; Bars-Cortina, D.; Ramayo-Caldas, Y.; Crisci, E.; Pennarun, S.; Dhorne-Pollet, S.; Foury, A.; Moisan, M.-P.; et al. Priming for welfare: Gut microbiota is associated with equitation conditions and behavior in horse athletes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 8311. [[CrossRef](#)]
47. Montgomery, L.; Flesher, B.; Stahl, D. Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and Description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1988**, *38*, 430–435. [[CrossRef](#)]
48. Ransom-Jones, E.; Jones, D.L.; McCarthy, A.J.; McDonald, J.E. The Fibrobacteres: An Important Phylum of Cellulose-Degrading Bacteria. *Microb. Ecol.* **2012**, *63*, 267–281. [[CrossRef](#)]
49. Neumann, A.P.; McCormick, C.A.; Suen, G. *Fibrobacter* communities in the gastrointestinal tracts of diverse hindgut-fermenting herbivores are distinct from those of the rumen. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 3768–3783. [[CrossRef](#)]
50. Costa, M.C.; Stampfli, H.R.; Allenvercoe, E.; Weese, J.S. Development of the faecal microbiota in foals. *Equine Vet. J.* **2015**, *48*, 681–688. [[CrossRef](#)]
51. Murray, J.-A.M.D.; Brown, S.; O’Shaughnessy, P.; Monteiro, A.; Warren, H.; Hastie, P.M. Effect of Live Yeast Culture Supplementation on Fibrolytic and Saccharolytic Bacterial Populations in the Feces of Horses Fed a High-Fiber or High-Starch Diet. *J. Equine Vet. Sci.* **2017**, *51*, 41–45. [[CrossRef](#)]
52. Elzinga, S.; Weese, J.S.; Adams, A.A. Comparison of the Fecal Microbiota in Horses with Equine Metabolic Syndrome and Metabolically Normal Controls Fed a Similar All-Forage Diet. *J. Equine Vet. Sci.* **2016**, *44*, 9–16. [[CrossRef](#)]
53. Mohajeri, M.H.; La Fata, G.; E Steinert, R.; Weber, P. Relationship between the gut microbiome and brain function. *Nutr. Rev.* **2018**, *76*, 481–496. [[CrossRef](#)]
54. Deters, E.L.; Stokes, R.S.; Genter-Schroeder, O.N.; Hansen, S.L. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in receiving diets of newly weaned beef steers I: Growth performance and antioxidant defense. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 3897–3905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cortés-Coronado, R.F.; Gómez-Rosales, S.; Angeles, M.D.L.; Casaubon-Huguenin, M.T.; Sørensen-Dalgaard, T. Influence of a yeast fermented product on the serum levels of the mannan-binding lectin and the antibodies against the Newcastle disease virus in Ross broilers. *J. Appl. Poult. Res.* **2017**, *26*, 38–49. [[CrossRef](#)]
56. Vaishnava, S.; Yamamoto, M.; Severson, K.M.; Ruhn, K.A.; Yu, X.; Koren, O.; Ley, R.; Wakeland, E.K.; Hooper, L.V. The Antibacterial Lectin RegIII γ Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine. *Science* **2011**, *334*, 255–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Shi, N.; Li, N.; Duan, X.; Niu, H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil. Med. Res.* **2017**, *4*, 14. [[CrossRef](#)]
58. Okumura, R.; Takeda, K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp. Mol. Med.* **2017**, *49*, e338. [[CrossRef](#)]

4 Diskussion

4.1 Versuchsdesign

Im Versuch wurde sichergestellt, dass die verwendeten Pferde unter den vergleichbaren Haltungs- Trainings- und Umweltbedingungen eine weitestgehend homogene Gruppe bildeten. Das ist von großer Bedeutung, da die Mikrobiota ein sensibles und hochdynamisches System ist und deren Zusammensetzung wirtsspezifischen und äußeren Einflüssen unterliegt. Es wurden elf Probanden der gleichen Rasse (englische Vollblüter), aus einer Zuchtlinie verwendet. Die Gruppe bestand aus 10 Stuten und einem Hengst in der gleichen Altersklasse von 2 bis 3 Jahren mit einem mittleren Gewicht von 442 kg +/- 34 kg. Jedes Tier wurde in einer Einzelbox gehalten, mit Blick auf Artgenossen, durch ein offenes Fenster. Die Tiere waren Allgemeingesund und wurden durch regelmäßige tierärztliche Untersuchungen kontrolliert. Dadurch wurden potenzielle Einflussfaktoren, wie Erkrankungen weitestgehend minimiert. Beispielsweise können Koliken die relative Häufigkeit kommensaler Bakterien ändern (Reduktion von *Prevotella*, *Clostridia*, *Lachnospiraceae*; Anstieg von *Christenellaceae*, *Streptococcus* und *Sphaerochaeta*) [38]. An Kolitis erkrankte Pferde zeigten eine Hauptstammzusammensetzung von *Bacteroidetes* (40 %), *Firmicutes* (30 %) und *Proteobacteria* (18 %), während gesunde Pferde in der Zusammensetzung davon deutlich abwichen: *Firmicutes* (68 %), *Bacteroidetes* (14 %) und *Proteobacteria* (10 %). Zudem wiesen Pferde mit Kolitis signifikant mehr Fusobakterien und gesunde Pferde eine signifikant höhere relative Häufigkeit von Actinobakterien und Spirochaeten auf [39]. Auch die Mikrobiota von Pferden mit Asthma passen sich anders an Umgebungs- oder Futter-Umstellungen an als die gesunder Pferde [20]. Eine Studie zu Körpergewicht bei Ponys zeigte bei einer Langzeitstudie, dass die Zusammensetzung des Phylum *Firmicutes* sich veränderte, *Fibrobacter* abnimmt und *Actinobacteria* bei steigendem Körpergewicht zunimmt. Auch wurde gezeigt, dass das *Fibrobacter* häufiger bei Pferden vorkommt als bei Ponys [40].

Im Versuch wurde dreimal täglich Kraftfutter, Hafer und Mineralien (Veröffentlichung 2, 2.1. Animals) gefüttert. Heu und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Supplementation erfolgte zur täglichen Abendfütterung. Das tägliche Fütterungsregime während des Versuchs entsprach der Fütterung, wie sie auch vor Studienlage getätigt wurden ist. Damit wurde ein etwaiger Einfluss einer veränderten Fütterung ausgeschlossen, wie sie in einer Studie zu drei unterschiedlichen Diäten (ballaststoffreich, ballaststoffreich mit stärkereichen Zusatz, ballaststoffreich mit ölreichen Zusatz) gezeigt wurde. Diese Behandlungen führten in der fäkalen Mikrobiota auf der Ebene von OTUs zu signifikanten Unterschieden nach 42 Tagen der Fütterungsperiode [41].

Die Trainingseinheiten enthielten unterschiedliche Intensitätsstufen. Die tägliche Bewegung beinhaltete entweder Schritt in der Führanlage, Traben auf der Rennbahn, langsamer oder schneller Galopp auf der Rennbahn oder die Simulation eines Rennens. Die Trainingseinheiten wurden in einer wiederkehrenden Frequenz gewechselt, sodass die Pferde über die Zeit des Fütterungsversuchs, in der Summe ein vergleichbares Training (Häufigkeit, Intensität) erfahren haben. Gorniak et al. zeigten, dass bei Pferden 48 Stunden nach einer intensiven Belastung signifikant höhere Abundanzen der Phyla *Bacteroidetes* und *Firmicutes* in der fäkalen Mikrobiota vorliegen können, als 24 Stunden vor der Belastung analysiert wurde [42]. Ob es zu Schwankungen in den Phyla zwischen den Trainingseinheiten in der mikrobiellen Zusammensetzung kam, wurde in der Studie nicht fokussiert.

Die Rahmenbedingungen der Studie, was die Fütterungslänge und Probenentnahmeintervalle betrifft, waren ausreichend, um messbare Veränderungen in der Mikrobiota zu beobachten. Die Wahl der Probenentnahmen wurde so gewählt, dass kurz- und langfristige Veränderungen der dynamischen Mikrobiota erfasst werden können. Zum Beispiel hat eine Antibiose beim Menschen bereits nach 24 Stunden eine messbare Wirkung auf die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota und den größten Einfluss nach 4 Tagen. Die Ursprungszusammensetzung der bakteriellen Vielfalt wurde nach 4 bis 5 Wochen wieder erreicht [43]. Die Minimierung bekannter äußerer Einflussfaktoren und die Wahl einer weitestgehend homogenen Gruppe unterstützt das Ergebnis in der zweiten Studie, dass das individuelle Tier den größten

Einfluss auf die fäkale Mikrobiota hatte (Veröffentlichung 2, Tabelle 1). Diese Erfahrung machten auch Mach et al., die ebenfalls Dynamiken individueller Mikrobiota-Profile beim Pferd analysierten und eine höhere interindividuelle als intraindividuelle Divergenz auf OTU Ebene feststellten [44]. Um eine exakte Darstellung der bakteriellen Gemeinschaften in den Darmabschnitten zu erhalten, wäre ein Fistulieren oder eine Euthanasie der Tiere von Nöten. Eine Alternative bietet die Analyse der fäkalen Mikrobiota, die zumindest die Zusammensetzung und Diversität der Mikroben vom distalen Dickdarm bis zum Rektum repräsentiert [21, 41]. Damit lässt sich allerdings keine Aussage darüber treffen, ob die SCFP-Supplementation zu Mikrobiota-Veränderungen in anderen Darmabschnitten geführt hat. Ob einzelne Pferde unterschiedlich auf physische und psychische Stressoren reagieren, wie in Mach et al. [46] beschrieben, wurde in unserer Studie nicht berücksichtigt.

4.2 Die SCFP-Fütterung verändert nicht die Homöostase von leukozytären Blutzellen

Die Zusammensetzung und die Gesamtzahl von zirkulierenden Leukozyten, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, T-Lymphozyten (CD4⁺ oder CD8⁺) und B-Lymphozyten (CD21⁺ oder CD21⁻/MCH-II⁺), sowie die prozentualen Anteile von Retikulozyten wurden im Verlauf der Studie durchflusszytometrisch ermittelt. Die Fütterung bis zur Impfung betrug sechs Wochen. Die Zeitpunkte der Entnahme von Blutproben (Tag 0, Tag 14, Tag 28, Tag 40) wurden so gewählt, dass der Zeitraum ausreicht, um einen etwaigen Einfluss der Fütterung unabhängig von weiteren Einflussfaktoren, wie der Impfung zu betrachten. Zu keinem Zeitpunkt wurde ein signifikanter Einfluss der SCFP-Fütterung auf die Zahl zirkulierender, leukozytären Blutzellen oder auf den Anteil der Retikulozyten unter den Erythrozyten festgestellt (Veröffentlichung 2, Abbildung 5). Die gewählten Parameter zeigten in Abhängigkeit der Zeit in beiden Gruppen einen tendenziell gleichen Verlauf. Mit einer Ausnahme an Tag 28 (Gesamtzahl der Lymphozyten), gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Zahl zirkulierender Blut-Leukozyten und Retikulozyten zwar zeitlichen Einflüssen ausgesetzt ist, die SCFP-Fütterung jedoch in keiner signifikanten Weise die Neubildung von Zellen im

Knochenmark oder deren Zirkulationsverhalten (Immigration in das Gewebe, Emigration aus sekundären Immunorganen) direkt oder indirekt beeinflusst. Ähnliche Ergebnisse erzielte eine Fütterungsstudie mit Kälbern ($n = 12$), die 31 Tage mit SCFP (1 g/Tag) gefüttert wurden, in der keine Veränderung der prozentualen Anteile von leukozytären Zellsubpopulationen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden konnte [32]. Ebenso wurden bei Lämmern ($n = 5$), die eine 90 Tage lange Supplementation mit einem SCFP (7 g/Tag) erhielten, keine signifikanten Änderungen der Gesamtzahlen von Leukozyten und deren Subpopulationen beobachtet [45]. Die Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu Befunden bei Hunden ($n = 12$), die bereits nach einer 3-wöchigen SCFP-Fütterung (125, 250 oder 500 mg/Tag) eine Verringerung der Gesamtzahl von Leukozyten und eine höhere Zahl an MHC-Klasse-II⁺ B-Lymphozyten und Monozyten aufwiesen [25]. In einer anderen Studie, in der Rinder ($n = 10$) 21 Tage eine SCFP Supplementation (19 g/Tag) erhielten und in der zweiten Studiehälfte 7 Tage lang Hitzestress ausgesetzt wurden, erhöhte die Supplementation mit SCFP die Leukozytenzahl im Blut, insbesondere die der neutrophilen Granulozyten [46]. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei verschiedenen Spezies könnten in den individuellen Verdauungsphysiologien begründet sein. Zudem kann spekulativ die unterschiedliche Probandenanzahl und die Menge des gefütterten SCFP eine Rolle für die beobachteten Unterschiede spielen. Die ausbleibenden Effekte auf die Zahl zirkulierender equiner Immunzellen in der hier vorliegenden Studie decken sich mit einer nicht nachgewiesenen Wirkung auf die Phagozytoseleistung von neutrophilen Granulozyten (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Effekte spiegeln die Ergebnisse SCFP-supplementierter Kälber [32]. Durchflusszytometrische Analysen, die einen differenzierten Aufschluss über das Zirkulationsverhalten monozytärer Subpopulationen (klassische, intermediäre, nicht-klassische) gegeben hätten, konnten nicht durchgeführt werden [47]. Zwar gibt es erste Entwicklungen von monoklonalen Antikörpern gegen equines CD16 und equines CD14, die zur Charakterisierung monozytärer Subpopulationen verwendet werden können [48]. Diese Antikörper stehen jedoch nicht kommerziell zur Verfügung. Demnach lässt sich nicht abschließend beurteilen, ob eine SCFP-Fütterung beim Pferd zu einer Beeinflussung der equinen Blut-Leukozyten-Homöostase führt. Eine direkte

Wirkung postbiotischer SCFP-Faktoren, die nach Aufnahme aus dem Darm oder indirekt über die Wirkung auf Darmzellen (Epithel-, residente Immunzellen) die Zellbildung und Freisetzung aus dem Knochenmark steuern, kann jedoch mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden. Eher deckt sich die nicht beeinflusste Zell-Zusammensetzung im Blut in der SCFP-Fütterungsphase mit der unveränderten Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota (siehe 2.4). Lin et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass bei Hunden eine Veränderung der Zahl zirkulierender Immunzellen mit einer Fütterungs-induzierten, erhöhten relativen Häufigkeit von *Bifidobacterium* und einer geringeren von *Fusobacterium* einher ging [25]. Bis zu diesem Punkt zeigten sich bei den SCFP-supplementierten Pferden keine Effekte auf das (zugängliche) Immunsystem. Es blieb insbesondere unklar, ob diese nutritive Maßnahme eventuell das Reaktionsverhalten auf einen immunologischen Reiz beeinflusst. Auf eine in der Zufütterungsphase parallel durchgeführte weitergehende Analyse der Zellfunktionalität (bspw. der Proliferationsbereitschaft lymphozytärer Zellen oder der Zytokin-Sekretion aktivierter Monozyten und/oder Lymphozyten) wurde in der Studie aus Kapazitätsgründen verzichtet.

Um dennoch der Frage einer unter SCFP-Fütterung veränderten Reaktionsneigung nachzugehen, wurde die Reaktion der Pferde auf eine Booster-Impfung gegen equine Influenza geprüft.

4.3 Die SCFP-Fütterung veränderte die Reaktion auf einen immunologischen Reiz

Impfinduzierte Effekte wurden geprüft, indem unmittelbar vor der Impfung (Tag 40) und 24 Stunden später (Tag 41) Blutproben entnommen und Änderungen der Zahl zirkulierender Zellsubpopulationen bestimmt wurden. Dieses Zeitfenster von 24 Stunden erlaubte es die frühe Phase einer Impfreaktion abzugreifen die dominierend von Mechanismen des angeborenen Immunsystems getragen wird. Die Impfung führte 24 Stunden später zu einer signifikant erhöhten Anzahl der Gesamtleukozyten und der CD4⁺ T-Zellen in beiden Gruppen. In der Placebo-Gruppe stieg die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen fiel, während in der SCFP-Gruppe diese beiden Zellpopulationen unverändert blieben. In

keiner der beiden Gruppen veränderte die Impfung die Anzahl der Lymphozyten, Monozyten, CD21⁺ B-Zellen oder CD21⁻/MHCII⁺ B-Zellen (Veröffentlichung 1, Tabelle 3). Klassische, Impfung-induzierte frühe Reaktionen des Wirtes auf eine Impfung, wie Schwellungen an der Einstichstelle oder ein transientes Ansteigen der Körpertemperatur über 38,2 °C ließen sich bei den Pferden 24 Stunden nach der Impfung nicht feststellen (Veröffentlichung 1). Insofern konnten diese klinisch leicht zu erhebenden Parameter keinen Aufschluss darüber geben, ob die SCFP-Fütterung zu einem veränderten Reaktionsspektrum des Gewebes und der Zellen geführt hat. Bei einer Studie mit 34 Pferden wurden Einflüsse unterschiedlicher Influenza-Impfstoffe getestet, wobei 7 Pferde auf den rekombinanten Impfstoff des gleichen Herstellers mit fieberhaften Körpertemperaturen über 38,5°C reagierten [49]. Zwar war in der Studie der Influenza-Impfstoff mit einem Tetanus-Impfstoff kombiniert, was aber für die beobachteten Nebenwirkungen nicht relevant war, da das verwendete Antigen beider Impfstoffe das Gleiche war. Bei einem inaktivierten immunstimulierenden COMplex(ISCOM)-Impfstoff gegen Influenza entwickelte eines von vier Pferden eine fieberhafte Reaktion 9 Stunden nach der Impfung [50]. Dass keine veränderten Temperaturen weder in der Placebo- noch in der SCFP-Gruppe vorlagen, kann anderenfalls auch an der geringen Probandenzahl liegen. Schwellungen an der Impfstelle wurden bei keinem der Pferde festgestellt. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Ergebnissen anderer Studien, wo nur bei nach Impfung mit einem inaktivierten Impfstoff gegen Influenza beim Pferd Schwellungen an der Injektionsstelle festgestellt wurden [49]. Bei drei von fünf Pferden entwickelte sich eine leichte bis mittelschwere Schwellung nach Impfung mit einem inaktivierten immunstimulierenden COMplex (ISCOM)-Impfstoff und nach Impfung mit einem rekombinanten Vektorimpfstoff zeigte eines von fünf Pferden eine leichte Schwellung. Bei allen Pferden war die Schwellung 48 Stunden nach der Impfung abgeklungen. In der hier vorliegenden Studie wurde ein Carbomer-adjuvantierter modifizierter viraler Vektorimpfstoff verwendet (PROTEQFLU™) [51]. Ein wesentlicher Grundgedanke für die Wahl lag im Adjuvanz (Carbomer) begründet, welches robuste CD8⁺ T-Zell-Antworten induzieren soll [52] und damit indirekt die Adjuvanz-induzierte Polarisierung von Immunantworten in Richtung von Th1-Antworten anzeigt. Eine Modulation der Reaktionsbereitschaft von

Zellen durch die SCFP-Fütterung ließe sich dann indirekt an einem anderen Impfstoff-induzierten Mediatorspektrum ablesen, welches im Gefolge zu einer Veränderung der Zellzusammensetzung im peripheren Blut führt. Die Ergebnisse entsprachen nur bedingt den Erwartungen an eine modulierte Th1-Antwort. Neben den klinischen unauffälligen Parametern zu Nebenwirkungen zeigten sich nur schwache bis keine Veränderungen auf der Ebene der Akute-Phase-Reaktion anhand der SAA-Konzentrationen in beiden Gruppen. SAA wird beim Pferd als sensitiver Marker (Referenzwert $< 0,5$ und 20 mg/L) genutzt um frühe, unspezifische und systemische Reaktionen, die durch Gewebeerletzungen unterschiedlicher Art, Entzündungen, Infektionen oder Traumata induziert werden [53]. Entzündliche Prozesse, die mit der Bildung von Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor (TNF) einhergehen, führen zu einem bis zu 100-fachen SAA-Anstieg. Solche zu erwartenden Reaktionen wurden in einer Studie bei 10 Pferden mit zwei verschiedenen Impfstoffen, einem inaktivierten immunstimulierenden COMplex (ISCOM)-Impfstoff und einem rekombinanten Vektorimpfstoff gegen Influenza verglichen. Die SAA-Konzentration war 24 Stunden nach der Impfung mit beiden Impfstoffen signifikant angestiegen, wobei die Werte nach der Impfung mit dem ISCOM-Impfstoff höher waren als nach der Impfung mit dem Vektorimpfstoff. Zudem stieg nach der ISCOM-Impfstoff-Vakzinierung die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut an [50]. Insgesamt konnte in der hier gezeigten Studie nur ein Subset dieser impfinduzierten Effekte beobachtet werden: die Veränderung der Blutleukozyten-Zahlen und Retikulozyten bei fehlendem Anstieg der SAA-Konzentrationen. Das führt zu der Vermutung, dass die Beeinflussung der überprüften Blutzellen höchstwahrscheinlich nicht auf hohe Konzentrationen von Impfstoff-induzierten entzündlichen Zytokinen (z. B. IL-1, IL-6, TNF) zurückzuführen ist. So wurden bei den geimpften Pferden entweder geringere Mengen an den genannten Zytokinen induziert, oder die Impfung führte zur Sekretion eines anderen Spektrums an Mediatoren.

Dass die Impfung zur Bildung von systemisch wirkenden Mediatoren führte, ließ sich an den Zellzahlveränderungen im Blut feststellen. Interessanterweise wies die SCFP-Gruppe bei einzelnen Zellsubpopulationen hierbei Unterschiede zur Placebo-Gruppe auf (Veröffentlichung 1, Abbildung 2). Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass

SCFP-gefütterte Pferde nach der Impfung ein anderes Profil von systemisch wirkenden Mediatoren freisetzen. Interessant erschien zudem die Erhöhung des Anteils an Retikulozyten nach einer Impfung, die bisher so noch nicht beschrieben worden war. Ob die Impfung von Pferden zu einer hochregulierten Expression von Genen oder Proteinen führt, die im Zusammenhang mit der Erythropoese stehen, oder ob durch die Impfung Mediatoren induziert wurden, welche die Funktion von Makrophagen modulieren und den Erythrozyten-Umsatz verändern, ist unbekannt. In der vorliegenden Studie können die beobachteten unterschiedlichen Veränderungen in der Zusammensetzung der Leukozyten im peripheren Blut als Surrogat für initiale Immunprozesse dienen, die im Muskel am Ort der Impfung stattfinden. Derart veränderte Gewebereaktionen nach SCFP-Fütterung wurde bei Pferden beobachtet, denen LPS intraartikulär verabreicht wurde. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe wiesen sie danach einen niedrigeren Prostaglandin-E2-Spiegel auf. Außerdem erreichten die SCFP-gefütterten Pferde nach der LPS-Provokation schneller intraartikuläre Ausgangswerte [54]. Ob bestimmte Zellen des Körpers (Monozyten, dendritische Zellen, Makrophagen) durch die SCFP-Fütterung der Pferde in ihrer Reaktion auf einen Impfreiz beeinflusst wurden und welche initialen Prozesse nach Kontakt mit dem Impfstoff und seinem Adjuvanz anders ablaufen, wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Hier bieten sich für die Zukunft Studien an, in denen die frühen Prozesse über holistische Transkriptomanalysen zeitlich und räumlich präziser erfasst werden. Perspektivisch können sich diese Analysen auch lohnen, um Impferfolge im Sinne einer schützenden adaptiven Immunantwort besser steuern zu können. In der vorliegenden Studie handelte es sich um eine Wiederholungsimpfung mit dem Ziel vorhandene T- und B-Gedächtniszellen zu reaktivieren – mithin ein sehr Erregerspezifischer Ansatz mit Fokus auf dem Antigen. Dennoch zeigten Detail-Analysen der durch die Impfung induzierten Gedächtnisreaktion (anhand induzierter, Influenza-spezifischer Antikörper) (Veröffentlichung 1, Tabelle 4), dass die SCFP-Fütterung auf subtile Weise – sehr wahrscheinlich über das genuin induzierte Mediatorspektrum – hier regulierend eingreift. Somit hat die SCFP-Fütterung nicht nur einen (noch zu prüfenden) Einfluss auf die Induktion einer Antigen-spezifischen Antwort, sondern steuert ebenfalls Prozesse der adaptiven Immunantwort.

Ob dies über postbiotische Faktoren im Futterzusatzstoff direkt erfolgt, oder indirekt über die Beeinflussung des Darm-Mikrobioms, war zu diesem Zeitpunkt noch spekulativ. Daher wurde im Folgenden analysiert, ob die SCFP-Fütterung der Pferde zu einer Änderung des fäkalen Mikrobiota führt.

4.4 Die SCFP-Fütterung veränderte nicht die fäkale Mikrobiota

Die SCFP-Fütterung nahm bis zum Zeitpunkt der Impfung keinen signifikanten Einfluss auf die fäkale Mikrobiota (Veröffentlichung 2, ergänzende Abbildung 1). Ob Mikrobiota-modulierende Effekte im Dünndarm oder im proximalen Dickdarm auftraten, konnte mit der Beschränkung auf die fäkale Mikrobiota nicht beantwortet werden. Die Darmkompartimente (Magen, Dickdarm, Dünndarm, Rektum) beherbergen bakterielle Spezies in unterschiedlicher Variation und Häufigkeit [21, 55]. Nach [55, 56] weist zumindest der Dickdarm von Pferden die gleiche Artenvielfalt auf wie der Kot und kann als repräsentativ für die Vielfalt im Dickdarm angesehen werden. In der Studie von Valigura et al. wird die höchste Gleichheit der Artenvielfalt zwischen dem Zäkum und den Fäkalien angenommen [57]. Demgegenüber berichtete Dougal et al., dass die bakterielle Vielfalt in den Fäkalien deutlich höher ist als im Zäkum, was zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann [41]. Die Zusammensetzung der Stammebene der fäkalen Mikrobiota wurde von *Bacteroidetes* (durchschnittlich 41,7 %) und *Firmicutes* (durchschnittlich 33,3 %), gefolgt von *Verrucomicrobia* (durchschnittlich 12,6 %), *Spirochaetae* (durchschnittlich 6,20 %) und *Fibrobacteres* (durchschnittlich 4,11 %) dominiert. Je nach Studie variieren die Zusammensetzungen bei Pferden, wobei der Anteil von *Firmicutes* bei gesunden Pferden mit einem durchschnittlichen prozentualen Anteil zwischen 40 % und 90 % am höchsten ist [39, 43, 58-60]. Ein überwiegender *Bacteroidetes*-Anteil wurde bei Pferden beobachtet, die an Kolitis erkrankt waren [39] oder durch trainingsassoziierte Schwankungen verursacht, wie bei Gorniak et al. festgestellt (siehe 2.1) [42]. SCFP- und Placebo-supplementierte Pferde unterschieden sich ebenfalls nicht in der Alpha-Diversität der fäkalen Mikrobiota. Die Alpha-Diversität der fäkalen mikrobiellen Gemeinschaft, stellt den Artenreichtum und die Gleichmäßigkeit innerhalb einer Stichprobe dar. Zu ähnlichen Ergebnissen – eines nicht beeinflussten Artenreichtums - kommt auch eine Studie mit Hunden, die mit

SCFP supplementiert wurden [25]. Allerdings wurde bei den SCFP-supplementierten Hunden auf Ebene der Gattungen signifikant Erhöhungen in den relativen Häufigkeiten von *Bifidobacterium* und *Prevotella* festgestellt, wohingegen die relative Häufigkeit von *Fusobacterium* abnahm [25]. Bei Katzen führte die Zufütterung von SCFP zu einer Senkung von *Clostridium perfringens* [8]. Auch die Art der Probeentnahme spielt eine wichtige Rolle. So führte eine SCFP-Supplementierung bei Kühen zu einer Steigerung der relativen Häufigkeiten von *Prevotella brevis*, *R. flavefaciens*, Ciliatenprotozoen und *Bifidobacterium spp.* in der Digesta der Pansenflüssigkeit [23]. Abgesehen von methodischen Unterschieden in der Bestimmung des Mikrobioms und den SCFP-Dosierungen scheinen somit vorwiegend Spezies-spezifische Unterschiede in der Beeinflussung des Darm-Mikrobioms durch SCFP zu bestehen. Auf der Ebene von OTUs zeigte die Gattung *Fibrobacter*, die zur Familie der *Fibrobacteraceae* (Phylum *Fibrobacteres*) gehört, einen signifikanten Unterschied zwischen Placebo- und SCFP-Pferden auf (Veröffentlichung 2). Dieses OTU zeigte wiederholt an verschiedenen Tagen (zwischen Tag 3 und 52) eine erhöhte Abundanz in der Placebo-Gruppe. Dies könnte vorsichtig dahingehend interpretiert werden, dass die SCFP-Fütterung die Expansion dieses OTUs beschränkt hat und mithin als Beleg dafür gelten, dass die SCFP-Supplementation auf subtile Weise die mikrobielle Gemeinschaft im Darm des Pferdes beeinflussen kann.

Die Vermutung liegt nahe, dass die Verringerung der relativen Konzentration von *Fibrobacter* auf der stärkereichen Fütterung basiert. In dieser Studie haben alle Pferde im Mittel die gleiche Fütterung erhalten. Dennoch kam es zu einem Anstieg der relativen Häufigkeit von *Fibrobacter* in der Placebo-Gruppe. Hier kann nur spekuliert werden, dass das SCFP einen hemmenden Effekt auf die Gattung *Fibrobacter* ausübt. So wurden hemmende Effekte auf die Populationsgröße von *Fibrobacter* bei einem Fütterungsversuch mit Kraftfutter festgestellt, wohingegen die Gattung in der Kraftfutter Gruppe auf einen Anteil von ca. 0,5 % sank und die mit Gras gefütterte Gruppe einen Anteil von 6-7 % *Fibrobacter* aufwies [61]. Diese Studie ähnelt einem weiteren Fütterungsversuch, in dem stärkereiches Futter in Kombination mit einer Lebendhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) gefüttert wurde und es zu einer signifikanten Verringerung der relativen Konzentration von *Fibrobacter* in Kotproben von Pferden

kam [62]. Insgesamt waren SCFP-induzierte Effekte auf die fäkale Mikrobiota eher schwach und der Einfluss des Individuums dominierte mit hoher Signifikanz die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota (Veröffentlichung 2, Tabelle 1). Die prägnantesten Einflussgrößen für die Mikrobiota-Variabilität wurde, wie bereits im Versuchsdesign (s. 4.1) beschrieben, vergleichbar für alle Pferde gehalten, um den Einfluss von Haltung, Trainingsintensität, Umweltfaktoren, Alter, Rasse und Wetterbedingungen ausschließen zu können [19, 42].

4.5 Die SCFP-Fütterung nimmt Einfluss auf die impf-induzierte Änderung der Alpha-Diversität

Wenngleich die SCFP-Fütterung bis zur Impfung die fäkale Mikrobiota kaum beeinflusste, fiel auf, dass sich supplementierte Pferde von denen, die ein Placebo erhielten, nach der Impfung signifikant in der Alpha-Diversität unterschieden (Veröffentlichung 2, Abbildung 2). Die Alpha-Diversität nahm bei Placebo-Pferden zu, während sie bei SCFP-Pferden auf demselben Niveau blieb. Eine solche impfbedingte Veränderung der Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota wurde bei Kühen nach Impfung gegen *Escherichia coli* O157:H7 beobachtet, wobei der Shannon-Diversitätsindex und der Artenreichtum bei geimpften Kühen signifikant niedriger als bei nicht geimpften Kühen ausfiel – allerdings erst nach einer oralen Belastung mit lebenden *Escherichia Coli* O157:H7 [63]. Die Diversität zwischen geimpften und nicht geimpften Pferden der Studie unterschied sich nur im Shannon-Index, allerdings bereits nach 24 Stunden. Der Shannon-Index berücksichtigt die Vielfalt in der bakteriellen Gemeinschaft, wobei angenommen wird, dass alle Arten einer Population vertreten sind. Die Reichhaltigkeit, und somit die Gesamtzahl der Bakterienarten, hatte sich in beiden Gruppen nicht verändert. Allerdings erhöhte sich die Häufigkeit der vorhandenen Bakterienarten in der fäkalen Mikrobiota von Placebo-Pferden nach der Impfung. Die Gründe für eine durch die Impfung hervorgerufene Veränderung der fäkalen Mikrobiota sind weitgehend unbekannt, könnten aber durch zirkulierende, impfstoffinduzierte Zytokine und andere Mediatoren, die das Darm-Mikrobiom erreichen, ausgelöst werden [64]. Schweine, die mit einem abgetöteten Impfstoff gegen das *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV) geimpft

und im Anschluss mit dem Virus infiziert wurden, zeigten einen Einfluss auf den taxonomischen Reichtum in der fäkalen mikrobiellen Gemeinschaft. Die Impfung selbst führte zu einer Erhöhung der Alpha-Diversität (Shannon-Index), wobei eine Wechselwirkung zwischen Impfung und anschließender Infektion zu einer Abnahme der Alpha-Diversität und des Shannon-Index führte [65]. Neben der Diversität zeigten die Ergebnisse in der zweiten Veröffentlichung (Veröffentlichung 2, Abbildung 7, ergänzende Abbildung 2) einen unterschiedlichen Trend der Anzahl von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und CD21⁺/MHCII⁺ B-Zellen zwischen Tag 36 und Tag 66 innerhalb der jeweiligen Gruppe. Bei der Anzahl der neutrophilen Granulozyten zeigte sich ein gegenläufiger Verlauf, wobei die Zahl in der SCFP-Gruppe signifikant stieg, während sie in der Placebo Gruppe nach einem signifikanten Anstieg zwischen Tag 36 und Tag 37, von Tag 37 bis Tag 66 signifikant abnahm [66]. Dass die Fütterung von SCFP, das impf-induzierte Mediatorspektrum verändert, wurde auch bei Masthühnern gezeigt, die mit gesteigerten Mengen (0, 400, 800 und 1.600 ppm) eines hefefermentierten Supplementes gefüttert und mit einem Impfstoff gegen das *Newcastle-Disease-Virus* (NDV) geimpft wurden [37]. Die bei den Pferden durch die Impfung induzierten Mediatorspektren haben demnach nicht nur einen Effekt auf das Zirkulationsverhalten und die Dynamik von Immunzellen sondern können auch auf andere Kompartimente wie den Darm wirken und damit die Wechselbeziehung zwischen der Mikrobiota und dem Wirt – zumindest für eine begrenzte Zeit – steuern.

5 Zusammenfassung

Alexandra Lucassen Der Einfluss eines *Saccharomyces cerevisiae* Fermentationsproduktes auf die fäkale Mikrobiota und das Immunsystem bei Rennpferden

Saccharomyces cerevisiae Fermentationsprodukte (SCFP) werden in der Tierhaltung als prä- und postbiotische Futterzusätze eingesetzt, mit dem Ziel die Allgemeingesundheit zu fördern und vor Krankheiten zu schützen. Eine der möglichen Mechanismen von Futterzusätzen ist die Modulation des Immunsystems. Hypothetisch interagieren SCFP durch präbiotische Mechanismen mit der mikrobiellen Gemeinschaft des Darm-Mikrobioms und beeinflussen damit indirekt das Immunsystem oder sie wirken durch postbiotische Effekte direkt auf residente Darmepithel- und Immunzellen sowie nach Resorption auf Immunzellen in der Peripherie. Um solch einen Nachweis zu führen, wurde in der ersten Studie der Einfluss eines kommerziell erhältlichen SCFP auf die Zahl zirkulierender leukozytären Subpopulationen bei Rennpferden analysiert. Zudem wurde geprüft ob die SCFP-Fütterung die Reaktion der Tiere auf eine Impfung beeinflusst. Dabei lag der Fokus auf den frühen Ereignissen (angeborene Immunmechanismen) nach einer Impfung, die zur Antikörperproduktion und der Induktion von spezifischen T-Lymphozyten führen. In der zweiten Studie sollte durch die Analyse der fäkalen Mikrobiota geklärt werden, ob die SCFP-Fütterung zu einer Änderung des Darm-Mikrobioms führt. Für die Fragestellungen beider Veröffentlichungen wurde im Vorfeld eine Fütterungsstudie durchgeführt. Dabei erhielten sechs Pferde 43 Tage lang das SCFP und fünf Pferde ein Placebo. Blutproben wurden am Tag -3 vor der Supplementierung, Tag 10, Tag 24, Tag 36 (Tag der Impfung), Tag 37 (24 Stunden nach der Impfung), Tag 52 und Tag 66 (nach Ende der Supplementation) entnommen. Die Anzahl und Funktion der zirkulierenden Immunzell-Subpopulationen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Kotproben wurden zwischen Tag -3 und Tag 36 (vor Beginn Supplementierung, Supplementierung bis Tag der Impfung), Tag 37 (24 Stunden nach der Impfung), Tag 39 (3 Tage nach der Impfung) und zwischen Tag 43 und Tag 66 (nach der

Placebo-Gruppe nicht in der Zusammensetzung und Zahl der Leukozyten-Subpopulationen sowie des Anteils der Retikulozyten an den Erythrozyten. 24 Stunden nach der Impfung stiegen die Gesamtzahl der Leukozyten und die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen in beiden Gruppen signifikant an. In der Placebo-Gruppe nahm die Zahl der neutrophilen Granulozyten signifikant zu und die Zahl der CD8⁺ T-Zellen signifikant ab, während die Zahl dieser Zelltypen in der SCFP-Gruppe unverändert blieb. Der Anteil der Retikulozyten stieg nur in der SCFP-Gruppe signifikant an. Die Anzahl der Lymphozyten, Monozyten, CD21⁺ B-Zellen und der SAA-Spiegel blieben in beiden Gruppen nach der Impfung unverändert. Sechzehn Tage nach der Impfung unterschieden sich Placebo- und SCFP-Pferde signifikant in ihren erhöhten ELISA-IgG-Titern gegen die Influenzastämme Newmarket und Florida Clade 1. Die bakterielle Zusammensetzung und Vielfalt der fäkalen Mikrobiota wurde durch die SCFP-Fütterung nur geringfügig beeinflusst. Die Gattung *Fibrobacter* wies in der Placebo-Gruppe wiederholt an verschiedenen Tagen eine signifikant höhere Abundanz als in der SCFP-Gruppe auf. Insgesamt hatte das Einzeltier den größten Einfluss auf die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota. Direkt nach der Influenza-Impfung unterschieden sich SCFP- und Placebo-Pferde signifikant in der fäkalen bakteriellen Diversität im Shannon-Index. Die beobachteten Unterschiede nach der Impfung deuten darauf hin, dass eine SCFP-Fütterung zu modulierten frühen Immunreaktionen nach einer Influenzaimpfung führt, was auch die Gedächtnisreaktionen nach der Auffrischungsimpfung beeinflussen kann.

Die weitestgehend unbeeinflusste fäkale Mikrobiota spricht gegen eine starke präbiotische Wirkung von SCFP. Die Modulation von impf- und wirtsinduzierten Veränderungen der Mikrobiota deutet darauf hin, dass die Hauptwirkungen von SCFP auf die enthaltenen oder induzierten postbiotischen Komponenten zurückzuführen sind.

6 Summary

Alexandra Lucassen The influence of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on the fecal microbiota and immune system in racehorses

Saccharomyces cerevisiae fermentation products (SCFP) are used in animal husbandry as pre- and postbiotic feed additives, aiming at the promotion of general health and protecting against diseases. One possible mechanism of feed additives is the modulation of distinct immune mechanisms. Hypothetically, SCFP may interact through prebiotic mechanisms with the microbial community of the intestinal microbiome which indirectly modulates immune functions, or they act through postbiotic effects directly on resident intestinal epithelial and immune cells and, after resorption, on immune cells in the periphery. To address these issues, the first study analyzed the influence of a commercially available SCFP on the numbers of leukocyte subpopulations in racehorses. In addition, it was tested whether the SCFP feeding alters the response of the animals towards a vaccination. Here, the focus was on early events (innate immune mechanisms) after vaccination) that lead to antibody production and induction of specific T cells. The second study, based on the analysis of the fecal microbiome, aimed at the question whether SCFP feeding leads to a changed gut microbiome. For both studies, a feeding trial was conducted. Six horses received the SCFP for 43 days and five horses received a placebo. Blood samples were collected on day -3 before supplementation, day 10, day 24, day 36 (day of vaccination), day 37 (24 hours after vaccination), day 52, and day 66 (after the end of supplementation). The number and function of circulating immune cell subpopulations were analyzed by flow cytometry. Fecal samples were collected between days -3 and 36 (before the start of supplementation, supplementation until day of vaccination), day 37 (24 hours after vaccination), day 39 (3 days after vaccination), and between day 43 and day 66 (after supplementation). The fecal microbiome was determined by 16S rRNA gene sequencing. Vaccination on day 36 was a booster vaccination against equine influenza with a carbomer-adjuvanted modified viral vector vaccine. During feeding, SCFP and

placebo animals did not differ in the composition and number of leukocyte subpopulations and the reticulocyte fractions. Twenty-four hours after vaccination the total number of leukocytes and the number of CD4⁺ T cells significantly increased in both groups. In the placebo group, the number of neutrophilic granulocytes increased significantly and the number of CD8⁺ T cells decreased, whereas the number of these cell types remained unchanged in the SCFP group. Reticulocyte fractions raised significantly only in the SCFP group. Numbers of lymphocytes, monocytes, CD21⁺ B cells, and SAA levels remained unchanged in both groups after vaccination. Sixteen days after vaccination, the Placebo and SCFP horses differed significantly in their ELISA IgG titers against the Newmarket and Florida Clade 1 influenza strains. SCFP feeding had a negligible effect on the composition of fecal microbiota and their diversity. Repeatedly, on several days, the genus *Fibrobacter* showed a higher abundance in the placebo group. Overall, the individual animal had the greatest impact on fecal microbiota composition. Immediately after influenza vaccination, SCFP and placebo horses differed significantly in fecal bacterial diversity on the Shannon Index. The observed differences after vaccination suggest that SCFP feeding leads to modulated early immune responses after influenza vaccination, which may also influence memory responses after booster vaccination.

The largely unaffected fecal microbiome argues against a strong prebiotic SCFP effect. The modulation of vaccine- and host-induced changes in the microbiome suggests that the main effects of SCFP are due to included or induced postbiotic components.

7 Literaturverzeichnis

1. Brade, W., O. Distl, H. Sieme, A. Zeyner, *Pferdezucht, -haltung und -fütterung Empfehlungen für die Praxis*. Landbauforschung: Sonderheft, ed. J.H.v. Thünen-Institut. Vol. 353. 2011, Braunschweig.
2. Belkaid, Y., O.J. Harrison, *Homeostatic Immunity and the Microbiota*. *Immunity*, 2017. **46**(4): 562-576.
3. McDermott, A.J., G.B. Huffnagle, *The microbiome and regulation of mucosal immunity*. *Immunology*, 2014. **142**(1): 24-31.
4. Costa, M.C., J.S. Weese, *Understanding the Intestinal Microbiome in Health and Disease*. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2018. **34**(1): 1-12.
5. Ballou, M.A., E.M. Davis, B.A. Kasl, *Nutraceuticals: An Alternative Strategy for the Use of Antimicrobials*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2019. **35**(3): 507-534.
6. Aronson, J.K., *Defining 'nutraceuticals': neither nutritious nor pharmaceutical*. *Br J Clin Pharmacol*, 2017. **83**(1): 8-19.
7. Żółkiewicz, J., A. Marzec, M. Ruszczynski, W. Feleszko, *Postbiotics-A Step Beyond Pre- and Probiotics*. *Nutrients*, 2020. **12**(8): 2189.
8. de Oliveira Matheus, L.F., L.W. Risolia, M.C. Ernandes, J.M. de Souza, P.M. Oba, T.H.A. Vendramini, V. Pedrinelli, L.B.F. Henriquez, C. de Oliveira Massoco, C.F.F. Pontieri, M.A. Brunetto, *Effects of Saccharomyces cerevisiae cell wall addition on feed digestibility, fecal fermentation and microbiota and immunological parameters in adult cats*. *BMC Vet Res*, 2021. **17**(1): 351.
9. Xiao, J.X., G.M. Alugongo, R. Chung, S.Z. Dong, S.L. Li, I. Yoon, Z.H. Wu, Z.J. Cao, *Effects of Saccharomyces cerevisiae fermentation products on dairy calves: Ruminal fermentation, gastrointestinal morphology, and microbial community*. *J Dairy Sci*, 2016. **99**(7): 5401-5412.
10. Pujari, R., G. Banerjee, *Impact of prebiotics on immune response: from the bench to the clinic*. *Immunol Cell Biol*, 2021. **99**(3): 255-273.
11. De Marco, S., M. Sichetti, D. Muradyan, M. Piccioni, G. Traina, R. Pagiotti, D. Pietrella, *Probiotic Cell-Free Supernatants Exhibited Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity on Human Gut Epithelial Cells and Macrophages Stimulated with LPS*. *Evid Based Complementary Altern Med*, 2018. **2018**: 1756308.
12. Zolkiewicz, J., A. Marzec, M. Ruszczynski, W. Feleszko, *Postbiotics-A Step Beyond Pre- and Probiotics*. *Nutrients*, 2020. **12**(8).
13. Julliard, V., P. Grimm, *Horse species symposium: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge*. *J Anim Sci*, 2016. **94**(6): 2262-2274.
14. Kauter, A., L. Epping, T. Semmler, E.M. Antao, D. Kannapin, S.D. Stoeckle, H. Gehlen, A. Lubke-Becker, S. Gunther, L.H. Wieler, B. Walther, *The gut*

- microbiome of horses: current research on equine enteral microbiota and future perspectives*. Anim Microbiome, 2019. **1**(1): 14.
15. Dougal, K., G. de la Fuente, P.A. Harris, S.E. Girdwood, E. Pinloche, C.J. Newbold, *Identification of a core bacterial community within the large intestine of the horse*. PLoS One, 2013. **8**(10): e77660.
 16. Costa, M.C., J.S. Weese, *The equine intestinal microbiome*. Anim Health Res Rev, 2012. **13**(1): 121-8.
 17. Kim, Y.G., *Microbiota Influences Vaccine and Mucosal Adjuvant Efficacy*. Immune Netw, 2017. **17**(1): 20-24.
 18. Schoster, A., L.G. Arroyo, H.R. Staempfli, J.S. Weese, *Comparison of microbial populations in the small intestine, large intestine and feces of healthy horses using terminal restriction fragment length polymorphism*. BMC Res Notes, 2013. **6**: 91.
 19. Salem, S.E., T.W. Maddox, A. Berg, P. Antczak, J.M. Ketley, N.J. Williams, D.C. Archer, *Variation in faecal microbiota in a group of horses managed at pasture over a 12-month period*. Sci Rep, 2018. **8**(1): 8510.
 20. Leclere, M., M.C. Costa, *Fecal microbiota in horses with asthma*. J Vet Intern Med, 2020. **34**(2): 996-1006.
 21. Costa, M.C., G. Silva, R.V. Ramos, H.R. Staempfli, L.G. Arroyo, P. Kim, J.S. Weese, *Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses*. Vet J, 2015. **205**(1): 74-80.
 22. MM, O.D., H.M. Harris, I.B. Jeffery, M.J. Claesson, B. Younge, O.T. PW, R.P. Ross, *The core faecal bacterial microbiome of Irish Thoroughbred racehorses*. Lett Appl Microbiol, 2013. **57**(6): 492-501.
 23. Tun, H.M., S. Li, I. Yoon, S.J. Meale, P.A. Azevedo, E. Khafipour, J.C. Plaizier, *Saccharomyces cerevisiae fermentation products (SCFP) stabilize the ruminal microbiota of lactating dairy cows during periods of a depressed rumen pH*. BMC Vet Res, 2020. **16**(1): 237.
 24. Cao, Z., J. Xiao, G.M. Alugongo, S. Ji, Z. Wu, S. Dong, S. Li, I. Yoon, R. Chung, *Effects of Saccharomyces Cerevisiae Fermentation Products on the Microbial Community throughout the Gastrointestinal Tract of Calves*. Animals, 2018. **9**(1).
 25. Lin, C.Y., C. Alexander, A.J. Steelman, C.M. Warzecha, M.R.C. de Godoy, K.S. Swanson, *Effects of a Saccharomyces cerevisiae fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult dogs¹*. J Anim Sci, 2019. **97**(4): 1586-1599.
 26. Michael, C.F., C.M. Waters, K.S. LeMessurier, A.E. Samarasinghe, C.Y. Song, K.U. Malik, D.B. Lew, *Airway Epithelial Repair by a Prebiotic Mannan Derived from Saccharomyces cerevisiae*. J Immunol Res, 2017. **2017**: 8903982.

27. Ryman, V.E., S.C. Nickerson, F.M. Kautz, D.J. Hurley, L.O. Ely, Y.Q. Wang, N.E. Forsberg, *Effect of dietary supplementation on the antimicrobial activity of blood leukocytes isolated from Holstein heifers*. Res Vet Sci, 2013. **95**(3): 969-74.
28. Grieshop, C.M., E.A. Flickinger, K.J. Bruce, A.R. Patil, G.L. Czarnecki-Maulden, G.C. Fahey, Jr., *Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides*. Arch Anim Nutr, 2004. **58**(6): 483-93.
29. Shen, Y.B., J.A. Carroll, I. Yoon, R.D. Mateo, S.W. Kim, *Effects of supplementing Saccharomyces cerevisiae fermentation product in sow diets on performance of sows and nursing piglets*. J Anim Sci, 2011. **89**(8): 2462-71.
30. Moyad, M.A., L.E. Robinson, J.M. Kittelsrud, S.G. Reeves, S.E. Weaver, A.I. Guzman, M.E. Bubak, *Immunogenic yeast-based fermentation product reduces allergic rhinitis-induced nasal congestion: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Adv Ther, 2009. **26**(8): 795-804.
31. Moyad, M.A., L.E. Robinson, E.T. Zawada, J. Kittelsrud, D.G. Chen, S.G. Reeves, S. Weaver, *Immunogenic yeast-based fermentate for cold/flu-like symptoms in nonvaccinated individuals*. J Altern Complement Med, 2010. **16**(2): 213-8.
32. Mahmoud, A.H.A., J.R. Slate, S. Hong, I. Yoon, J.L. McGill, *Supplementing a Saccharomyces cerevisiae fermentation product modulates innate immune function and ameliorates bovine respiratory syncytial virus infection in neonatal calves*. J Anim Sci, 2020. **98**(8).
33. Burdick Sanchez, N.C., J.A. Carroll, P.R. Broadway, T.S. Edrington, I. Yoon, C.R. Belknap, *Some aspects of the acute phase immune response to a lipopolysaccharide (LPS) challenge are mitigated by supplementation with a Saccharomyces cerevisiae fermentation product in weaned beef calves*. Transl Anim Sci, 2020. **4**(3): txaa156.
34. Martinez, R., J. Leatherwood, H. Valigura, C. Arnold, K. Glass, M. Much, R. Owen, C. Warzecha, S. White, *Responses to an intra-articular lipopolysaccharide challenge following dietary supplementation of Saccharomyces cerevisiae fermentation product in young horses*. J Eq Vet Sci, 2019. **76**: 80.
35. Valigura, H., J. Leatherwood, R. Martinez, C. Warzecha, S. White, *Dietary supplementation of Saccharomyces cerevisiae fermentation product attenuates exercise-induced stress markers in young horses*. J Eq Vet Sci, 2019. **76**: 48.
36. Deters, E.L., R.S. Stokes, O.N. Genther-Schroeder, S.L. Hansen, *Effects of a Saccharomyces cerevisiae fermentation product in receiving diets of newly weaned beef steers. II. Digestibility and response to a vaccination challenge 1*. J Anim Sci, 2018. **96**(9): 3906-3915.
37. Cortés-Coronado, R.F., S. Gómez-Rosales, M.d.L. Angeles, M.T. Casaubon-Huguenin, T. Sørensen-Dalgaard, *Influence of a yeast fermented product on the serum levels of the mannan-binding lectin and the antibodies against the*

- Newcastle disease virus in Ross broilers*. Journal of Applied Poultry Research, 2017. **26**(1): 38-49.
38. Stewart, H.L., L.L. Southwood, N. Indugu, B. Vecchiarelli, J.B. Engiles, D. Pitta, *Differences in the equine faecal microbiota between horses presenting to a tertiary referral hospital for colic compared with an elective surgical procedure*. Eq Vet J, 2019. **51**(3): 336-342.
39. Costa, M.C., L.G. Arroyo, E. Allen-Vercoe, H.R. Stampfli, P.T. Kim, A. Sturgeon, J.S. Weese, *Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene*. PLoS One, 2012. **7**(7): e41484.
40. Langner, K., I. Vervuert, *[Impact of nutrition and probiotics on the equine microbiota: current scientific knowledge and legal regulations]*. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere, 2019. **47**(1): 35-48.
41. Dougal, K., G. de la Fuente, P.A. Harris, S.E. Girdwood, E. Pinloche, R.J. Geor, B.D. Nielsen, H.C. Schott, 2nd, S. Elzinga, C.J. Newbold, *Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing*. PLoS One, 2014. **9**(2): e87424.
42. Gorniak, W., P. Cholewinska, N. Szeligowska, M. Woloszynska, M. Soroko, K. Czyz, *Effect of Intense Exercise on the Level of Bacteroidetes and Firmicutes Phyla in the Digestive System of Thoroughbred Racehorses*. Animals, 2021. **11**(2).
43. Costa, M.C., H.R. Stampfli, L.G. Arroyo, E. Allen-Vercoe, R.G. Gomes, J.S. Weese, *Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs*. BMC Vet Res, 2015. **11**: 19.
44. Mach, N., A. Ruet, A. Clark, D. Bars-Cortina, Y. Ramayo-Caldas, E. Crisci, S. Pennarun, S. Dhorne-Pollet, A. Foury, M.P. Moisan, L. Lansade, *Priming for welfare: gut microbiota is associated with equitation conditions and behavior in horse athletes*. Sci Rep, 2020. **10**(1): 8311.
45. Mahmoud, M.M., I.M.I. Youssef, M.M. Abd El-Tawab, H.A. Bakr, N.A. Eissa, M.S. Hassan, N.D. Giadinis, S. Milewski, W. Baumgartner, P. Sobiech, *Influence of probiotic and yeast culture supplementation on selected biochemical and immunological parameters of growing lambs*. Pol J Vet Sci, 2020. **23**(1): 5-12.
46. Al-Qaisi, M., E.A. Horst, E.J. Mayorga, B.M. Goetz, M.A. Abeyta, I. Yoon, L.L. Timms, J.A. Appuhamy, L.H. Baumgard, *Effects of a Saccharomyces cerevisiae fermentation product on heat-stressed dairy cows*. J Dairy Sci, 2020. **103**(10): 9634-9645.
47. Hussen, J., A. Duvel, O. Sandra, D. Smith, I.M. Sheldon, P. Zieger, H.J. Schuberth, *Phenotypic and functional heterogeneity of bovine blood monocytes*. PLoS One, 2013. **8**(8): e71502.

48. Noronha, L.E., R.M. Harman, B. Wagner, D.F. Antczak, *Generation and characterization of monoclonal antibodies to equine CD16*. Vet Immunol Immunopathol, 2012. **146**(2): 135-42.
49. Entenfellner, J., J. Gahan, M. Garvey, C. Walsh, M. Venner, A. Cullinane, *Response of Sport Horses to Different Formulations of Equine Influenza Vaccine*. Vaccines, 2020. **8**(3).
50. Andersen, S.A., H.H. Petersen, A.K. Ersboll, J. Falk-Ronne, S. Jacobsen, *Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses*. Vet J, 2012. **191**(2): 199-202.
51. Lucassen, A., C. Finkler-Schade, H.J. Schuberth, *A Saccharomyces cerevisiae Fermentation Product (Olimond BB) Alters the Early Response after Influenza Vaccination in Racehorses*. Animals, 2021. **11**(9).
52. Lee, W., B. Kingstad-Bakke, B. Paulson, A. Larsen, K. Overmyer, C.B. Marinaik, K. Dulli, R. Toy, G. Vogel, K.P. Mueller, K. Tweed, A.J. Walsh, J. Russell, K. Saha, L. Reyes, M.C. Skala, J.D. Sauer, D.M. Shayakhmetov, J. Coon, K. Roy, M. Suresh, *Carbomer-based adjuvant elicits CD8 T-cell immunity by inducing a distinct metabolic state in cross-presenting dendritic cells*. PLoS Pathog, 2021. **17**(1): e1009168.
53. Witkowska-Pilaszewicz, O.D., M. Zmigrodzka, A. Winnicka, A. Miskiewicz, K. Strzelec, A. Cywinska, *Serum amyloid A in equine health and disease*. Eq Vet J, 2019. **51**(3): 293-298.
54. Martinez, R.E., J.L. Leatherwood, C.E. Arnold, K.G. Glass, K.W. Walter, H.C. Valigura, S.A. Norton, S.H. White-Springer, *Responses to an intra-articular lipopolysaccharide challenge following dietary supplementation of Saccharomyces cerevisiae fermentation product in young horses*. J Anim Sci, 2021. **99**(10).
55. Fernandes, K.A., S. Kittelmann, C.W. Rogers, E.K. Gee, C.F. Bolwell, E.N. Bermingham, D.G. Thomas, *Faecal microbiota of forage-fed horses in New Zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change*. PLoS One, 2014. **9**(11): e112846.
56. Grimm, P., S. Combes, G. Pascal, L. Cauquil, V. Julliand, *Dietary composition and yeast/microalgae combination supplementation modulate the microbial ecosystem in the caecum, colon and faeces of horses*. Br J Nutr, 2020. **123**(4): 372-382.
57. Valigura, H.C., J.L. Leatherwood, R.E. Martinez, S.A. Norton, S.H. White-Springer, *Dietary supplementation of a Saccharomyces cerevisiae fermentation product attenuates exercise-induced stress markers in young horses*. J Anim Sci, 2021. **99**(8): skab199.
58. Steelman, S.M., B.P. Chowdhary, S. Dowd, J. Suchodolski, J. Janečka, *Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis*. BMC Vet Res, 2012. **8**.

59. Langner, K., D. Blaue, C. Schedlbauer, J. Starzonek, V. Julliand, I. Vervuert, *Changes in the faecal microbiota of horses and ponies during a two-year body weight gain programme*. PLoS One, 2020. **15**(3): e0230015.
60. Sorensen, R.J., J.S. Drouillard, T.L. Douthit, Q. Ran, D.G. Marthaler, Q. Kang, C.I. Vahl, J.M. Lattimer, *Effect of hay type on cecal and fecal microbiome and fermentation parameters in horses*. J Anim Sci, 2021. **99**(1).
61. Daly, K., C.J. Proudman, S.H. Duncan, H.J. Flint, J. Dyer, S.P. Shirazi-Beechey, *Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease*. Br J Nutr, 2012. **107**(7): 989-95.
62. Murray, J.-A.M.D., S. Brown, P. O'Shaughnessy, A. Monteiro, H. Warren, P.M. Hastie, *Effect of Live Yeast Culture Supplementation on Fibrolytic and Saccharolytic Bacterial Populations in the Feces of Horses Fed a High-Fiber or High-Starch Diet*. J Eq Vet Sci, 2017. **51**: 41-45.
63. Mir, R.A., R.G. Schaut, H.K. Allen, T. Looft, C.L. Loving, I.T. Kudva, V.K. Sharma, *Cattle intestinal microbiota shifts following Escherichia coli O157:H7 vaccination and colonization*. PLoS One, 2019. **14**(12): e0226099.
64. Mohajeri, M.H., G. La Fata, R.E. Steinert, P. Weber, *Relationship between the gut microbiome and brain function*. Nutr Rev, 2018. **76**(7): 481-496.
65. Yuan, F., J. Sharma, S.G. Nanjappa, C.A. Gaulke, Y. Fang, *Effect of Killed PRRSV Vaccine on Gut Microbiota Diversity in Pigs*. Viruses, 2022. **14**(5).
66. Lucassen, A., J. Hankel, C. Finkler-Schade, L. Osbelt, T. Strowig, C. Visscher, H.-J. Schuberth, *Feeding a Saccharomyces cerevisiae Fermentation Product (Olimond BB) Does Not Alter the Fecal Microbiota of Thoroughbred Racehorses*. Animals, 2022. **12**(12).

8 Danksagung

Mein erster herzlicher Dank gebührt meinem Doktorvater *Herrn Prof. Dr. Schubert*. Sie förderten meine akademische Entwicklung, sowie mein persönliches Wachstum. Durch Ihre offene Tür haben Sie mir stets die Freiheit gegeben, genau das Maß an Betreuung zu ersuchen, das ich brauchte.

Einen weiteren Dank möchte ich *Frau Dr. Hankel* und *Herrn Prof. Dr. Visscher* für die gute Zusammenarbeit beim Konzeptualisieren, Ausarbeiten und Publizieren des zweiten Teilprojektes meiner Dissertation aussprechen.

Herrn Dr. Martin Beyerbach danke ich für die statistische Beratung in der Planung, Durchführung und Auswertung meiner Studie.

Außerordentlicher Dank gilt *Frau Bianca Flemm*, die das Forschungsvorhaben in ihrer Weitsicht einrichtete, das Projekt finanziell unterstützte und ideell beförderte. Ihnen habe ich überhaupt das Thema meiner Promotion zu verdanken.

Frau Dr. Christa Finkler-Schade danke ich für die Unterstützung in der Gestaltung und Organisation des Projekts und ihre fachliche Beratung.

Meinen weiteren Kolleg*innen aus dem Institut für Immunologie danke ich für den kollegialen und herzlichen Umgang. Ein besonderer Dank geht dabei an *Herrn Udo Rabe*, der mich bei der Durchführung meiner Versuche kontinuierlich unterstützte und das Gelingen meiner Arbeit wesentlich beeinflusste.

Außerdem danke ich meinen Mitdotorandinnen *Frau Dr. Lisa-Marie Schünenmann*, *Frau Dr. Eileen Schultz*, *Frau Dr. Alina Kauke* und *Frau Marina Vey*. Eure Fragen und Anregungen haben meine Arbeit mitgeformt. Ich danke, *Lisa-Marie* und *Eileen*, besonders dafür, dass sie ihre Erfahrungen und ihr Wissen mit mir teilten, das mir zu Beginn half, mich zu orientieren. *Eileen* danke ich für die Gespräche in einer turbulenten Zeit. *Alina* danke ich für die schöne Zeit im geteilten Büro, dem Gefühl „im gleichen Boot zu sitzen“ und die gegenseitige Unterstützung. Außerdem für ihre Hündin *Nala*, die eine willkommene Ablenkung war. *Marina* danke ich für Ihr Engagement sich mit meinen Fragestellungen auseinander zu setzen. Euch allen danke ich für eure Gesellschaft in den Mittagspausen und bei zahllosen Spaziergängen.

Ich danke dem Gestüt in Nordrhein-Westfalen, dass sie ihren Betrieb zur Verfügung gestellt haben. Den Mitarbeiter*innen danke ich für ihre freundliche Mitarbeit in der Studie und die schöne Zeit, die ich vor Ort erleben durfte.

Zuletzt danke ich nachdrücklich meiner Familie und meinen Freund*innen. Euer Vertrauen in meinen Lebensweg und eure liebevolle Teilnahme an meinen persönlichen Errungenschaften, machen mich sehr glücklich.