



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DOCTORAL PROGRAMME IN NUTRITIONAL SCIENCE

Valutazione nutrizionale di diete e additivi
nell'alimentazione del cane.

Doctoral Dissertation of:
Nicoletta ROVERE

Matricola:
R12541

Tutor:
Prof. Luciano PINOTTI

The Chair of the Doctoral Program:
Prof. Coordinator Luciano PINOTTI

2021/2022 – 35° Cycle

Riassunto

Negli ultimi decenni si è assistito ad un aumento della considerazione

dell'uomo verso l'alimentazione degli animali da compagnia. Ormai a cani e gatti vengono riconosciute necessità ed esigenze alimentari simili a quelle dei proprietari. Infatti, sempre più spesso, si cercano diete bilanciate e appositamente formulate e, che garantiscano sicurezza, qualità e adeguatezza nutrizionale in tutti gli stati fisiologici dell'animale.

In questa tesi sono state valutate le caratteristiche nutrizionali e la digeribilità *in vitro* di diversi tipi di diete per cani presenti sul mercato: premium, super premium, con particolari fini nutrizionali, umide e BARF.

Inoltre, alla luce del crescente interesse delle aziende che producono *pet food* e dei proprietari di cani verso l'utilizzo di lieviti, sono stati indagati gli effetti che tali ingredienti avevano su cani adulti, cagne in gravidanza e allattamento e i rispettivi cuccioli. In particolare sono stati studiati gli esiti che due lieviti, *Saccharomyces cerevisiae* e *S.cerevisiae var boulardii*, hanno prodotto sulle performance di crescita (peso, body condition score e feed intake), sulle caratteristiche fecali (fecal score, sostanza secca, digeribilità apparente totale e presenza di patogeni), sulla risposta immunitaria locale (quantità di IgA), sulla composizione del microbiota intestinale e sull'odore fecale di animali adulti, di femmine in riproduzione e cuccioli.

Contenuti

Capitolo 1. Introduzione generale

- 1.1 Domesticazione del cane moderno
- 1.2 Antropomorfizzazione del cane moderno
- 1.3 Alimentazione industriale – Pet Food
- 1.4 Caratteristiche nutrizionali e digeribilità della dieta industriale
 - 1.4.1 Caratteristiche nutrizionali del Pet Food
 - 1.4.1.1 Proteine
 - 1.4.1.2 Carboidrati
 - 1.4.1.3 Fibre
 - 1.4.1.4 Grassi
 - 1.4.1.5 Vitamine
 - 1.4.1.6 Minerali
 - 1.4.1.7 Energia
 - 1.4.2 Digeribilità
 - 1.4.2.1 Fattori che influenzano la digeribilità della dieta
 - 1.4.2.1 Metodi per valutare la digeribilità della dieta
- 1.5 I lieviti come additivi in nutrizione del cane
 - 1.5.1 Lieviti presenti sul mercato
 - 1.5.1.1 Lieviti vivi
 - 1.5.1.2 Colture di lievito
 - 1.5.1.3 Prodotti a base di lievito, con fini nutrizionali
 - 1.5.1.4 Prodotti speciali a base di lievito
 - 1.5.1.5 Frazioni di lievito

Capitolo 2. Obiettivi

Capitolo 3. Digeribilità *in vitro* di diete industriali

- 3.1 Materiali e metodi
 - 3.1.1 Scelta dei prodotti e categorizzazione
 - 3.1.2 Analisi centesimale e stima dell'energia metabolizzabile (EM)
 - 3.1.3 Digeribilità *in vitro*
 - 3.1.4 Analisi statistica
- 3.2 Risultati e discussione
 - 3.2.1 Caratteristiche chimiche dei prodotti
 - 3.2.2 Digeribilità *in vitro* (IVD)
 - 3.2.2.1 IVD della Sostanza Secca (SS)
 - 3.2.2.2 IVD della Proteina Grezza (PG)
- 3.3 Conclusioni

Capitolo 4. Integrazione di lievito vivo *Saccharomyces cerevisiae var boulardii* nella dieta di cagne e relativi cuccioli: digeribilità e benessere intestinale

- 4.1 Materiali e metodi
 - 4.1.1 Animali
 - 4.1.2 Dieta, trattamento e campionamento

- 4.1.2.1 Analisi dei mangimi
- 4.1.3 Parametri investigati
- 4.1.4 Fecal score
- 4.1.5 Sostanza Secca (SS) delle feci
- 4.1.6 Digeribilità Apparente Totale (ATTD)
- 4.1.7 Real time PCR per isolare *Giardia* spp. e *Coronavirus canino* (CCV)
- 4.1.8 Microbiota intestinale
- 4.1.9 Determinazione dell'impronta olfattiva delle feci (E-nose)
- 4.1.10 Analisi statistica
- 4.2 Risultati e discussione
 - 4.2.1 Analisi centesimale dell'alimento
 - 4.2.1.1 Esigenze nutrizionali delle cagne in allattamento
 - 4.2.1.2 Esigenze nutrizionali dei cuccioli in accrescimento
 - 4.2.2 Parametri investigati
 - 4.2.3 Fecal score
 - 4.2.4 Sostanza Secca (SS) delle feci
 - 4.2.5 Digeribilità Apparente Totale (ATTD) della SS
 - 4.2.6 *Giardia* e *Coronavirus canino* (CCV)
 - 4.2.7 Microbiota intestinale
 - 4.2.8 Naso elettronico (E-nose)
- 4.3 Conclusioni

Capitolo 5. Integrazione di lievito idrolizzato *Saccaromyces cerevisiae* nella dieta del cane adulto: digeribilità e benessere intestinale

- 5.1 Materiali e metodi
 - 5.1.1 Animali
 - 5.1.2 Dieta e trattamento
 - 5.1.3 Valutazione dello stato nutrizionale
 - 5.1.4 Valutazione dello stato sanitario
 - 4.1.10 Analisi statistica
- 5.2 Risultati e discussione
 - 5.2.1 Feed intake
 - 5.2.2 Peso e Body Condition Score (BCS)
 - 5.2.3 Fecal score
 - 5.2.4 Sostanza Secca (SS) delle feci
 - 5.2.5 Digeribilità Apparente Totale (ATTD) della SS
 - 5.2.6 Parassiti
 - 5.2.7 IgA fecali
 - 5.2.8 Naso elettronico (E-nose)
- 5.3 Conclusioni

Capitolo 6. Conclusioni Generali

CAPITOLO 1

Introduzione Generale

1.1 DOMESTICAZIONE DEL CANE MODERNO

Il cane domestico (*Canis lupus familiaris*) appartiene alla famiglia dei Canidi, gruppo di carnivori che si è diversificato negli ultimi 10 milioni di anni e, attualmente, comprende 35 specie ancora viventi, fra cui lupi, sciacalli, volpi, coyote etc. (Wayne et al., 1997). Inoltre, studi genetici, morfologici e comportamentali hanno stabilito che i cani derivano dai lupi (*Canis lupus*), probabilmente in seguito a eventi indipendenti tra loro (Vilà et al., 1997; vonHoldt et al., 2010), anche se l'origine geografica e temporale del cane domestico rimane ancora controversa (Hand et al., 2010; Wayne and vonHoldt, 2012). Tuttavia, alcuni studi sostengono che i *protocani* siano apparsi per la prima volta intorno ai 15.000-33.000 di anni fa (tardo Pleistocene), quando gli esseri umani erano in gran parte ancora cacciatori e raccoglitori e vivevano nelle regioni dell'Eurasia, dell'Asia orientale e del Medio Oriente (Driscoll et al., 2009; vonHoldt et al., 2010; Wayne and vonHoldt, 2012; Thalmann et al., 2013).

In tale epoca, l'uomo, ancora nomade, si nutriva dei prodotti della caccia e, seguendo le migrazioni degli animali, entrava sicuramente in contatto con i lupi, cacciatori delle stesse prede (Morey, 1994). Le due specie si trovarono perciò in competizione, poiché si nutrivano degli stessi alimenti e utilizzavano gli stessi metodi di caccia.

Si presume perciò che, anziché rivaleggiare tra loro, abbiano preso vantaggi l'uno dall'altro: i cacciatori, seguendo i lupi, potevano trovare facilmente le prede e ucciderle, mentre i lupi a loro volta avevano la possibilità di nutrirsi con gli avanzi abbandonati dall'uomo. In tal modo, nel corso dei millenni, si è andata consolidando, tra lupi e uomini, una sorta di simbiosi e di convivenza utile a entrambi. Sembra pertanto possibile affermare che i nostri antenati abbiano cominciato ad offrire regolarmente cibo ai lupi/*protocani* costruendo quella "relazione" che in seguito fu definita "prima

ondata di domesticazione”. In questa prima fase, i *protocani* erano da considerarsi animali carnivori (Kaminski and Mashall-Pescini, 2014).

I cambiamenti climatici, che si verificarono circa 10.000 anni fa (passaggio da Pleistocene ad Olocene) con la fine del periodo glaciale e il brusco riscaldamento dell'atmosfera, portarono gli uomini a diventare sedentari e a dedicarsi alla coltivazione (Kaminski and Mashall-Pescini, 2014).

L'inizio dell'agricoltura segnò non solo un importante cambiamento nell'organizzazione della vita umana, ma determinò quella forte espansione demografica che favorì la domesticazione di diverse specie di piante e animali (Kaminski and Mashall-Pescini, 2014). Il passaggio dell'uomo a stanziale e coltivatore ha sicuramente modificato la nicchia ecologica del lupo. Il lupo diventa quindi un carnivoro adattato o onnivoro, adattato a convivere in modo stabile con l'uomo e a nutrirsi degli stessi alimenti (Morey, 2010; Ovodov et al., 2011). Tale fenomeno fu definito “seconda ondata di domesticazione” (Kaminski and Mashall-Pescini, 2014).

Nel corso delle generazioni, attraverso molteplici tentativi di domesticazione, alternati a incroci con i vicini selvatici, si è sviluppato il cane domestico (Bosch et al., 2015)

Esistono due possibili eventi a seguito dei quali ha avuto luogo la domesticazione: la selezione attiva e l'auto-domesticazione.

- La selezione attiva: secondo questa teoria, furono certamente gli uomini a selezionare i lupi meno paurosi che si avvicinavano alle abitazioni in cerca di cibo, soggetti socievoli che potevano essere impiegati come animali da guardia o come aiuto alla caccia (Driscoll et al., 2009). Da tale selezione, che avvenne principalmente nella seconda ondata di domesticazione, derivò un animale più piccolo e più docile, l'attuale *Canis lupus familiaris* (Wayne and vonHoldt, 2012);
- L'auto-domesticazione: in questo caso, si afferma, invece, che non ci sia stata una selezione intenzionale da parte dell'uomo, ma sia stato l'animale stesso che, vincendo la sua naturale aggressività o paura, si abituò a vivere vicino all'uomo e a condividere con lui il cibo e il riparo (Hare et al., 2012). Sembra che tale processo sia avvenuto nella prima ondata di domesticazione.

Quindi, si può affermare che l'addomesticamento del cane sia avvenuto per una co-evoluzione tra lupi selvatici e umani (Wayne and vonHoldt, 2012) a causa di molteplici fattori, tra cui l'analogia della struttura sociale e la comunicazione non verbale, simile

nei due soggetti. Infatti, nei branchi di lupi, come nella società umana, era presente una struttura gerarchica e la comunicazione avveniva mediante vocalizzazioni, mimica facciale e postura di dominanza o sottomissione. Tutto ciò ha reso il lupo capace di rispondere a molti segnali umani (Morey, 1994).

Dal confronto tra il cane e il suo antenato selvatico appaiono però evidenti i cambiamenti genetici che si sono verificati durante l'addomesticamento e che riguardano soprattutto il sistema nervoso e l'apparato gastrointestinale (Axelsson et al., 2013). Durante tali cambiamenti, divenuti in seguito permanenti e ereditari, sono stati coinvolti i geni inerenti i comportamenti di aggressività e competitività, importanti per inserirsi nelle comunità umane (Cagan et al., 2016), e quelli aventi un ruolo rilevante nella digestione e nel metabolismo dell'amido (Arendt et al., 2016).

A questo proposito, Axelsson et al. (2013) afferma che l'adattamento del cane a una dieta ricca in amidi ha costituito uno step cruciale, nel passaggio da lupo a cane, sostenendo che la domesticazione sia stata accompagnata da un cambio di dieta.

Prove recenti dimostrano che tre geni, in particolare AMY2B, MGAM e SGLT1, furono coinvolti nella selezione avvenuta durante la domesticazione. Questi sono i geni coinvolti nella digestione dell'amido e nell'assorbimento del glucosio (Bosch et al., 2015):

- AMY2B è il gene che codifica per le alfa-amilasi 2B pancreatiche, enzimi che rompono gli amidi in maltosio a livello di piccolo intestino;
- MGAM è il gene che codifica per la conversione del maltosio in glucosio;
- SGLT1 codifica per il trasporto del glucosio attraverso la parete intestinale.

Inoltre, Axelsson et al. (2013) afferma che il cane ha una maggiore espressione genica di AMY2B, MGAM e SGLT1 e di conseguenza una maggiore attività delle amilasi salivari e di MGAM (Figura 1).

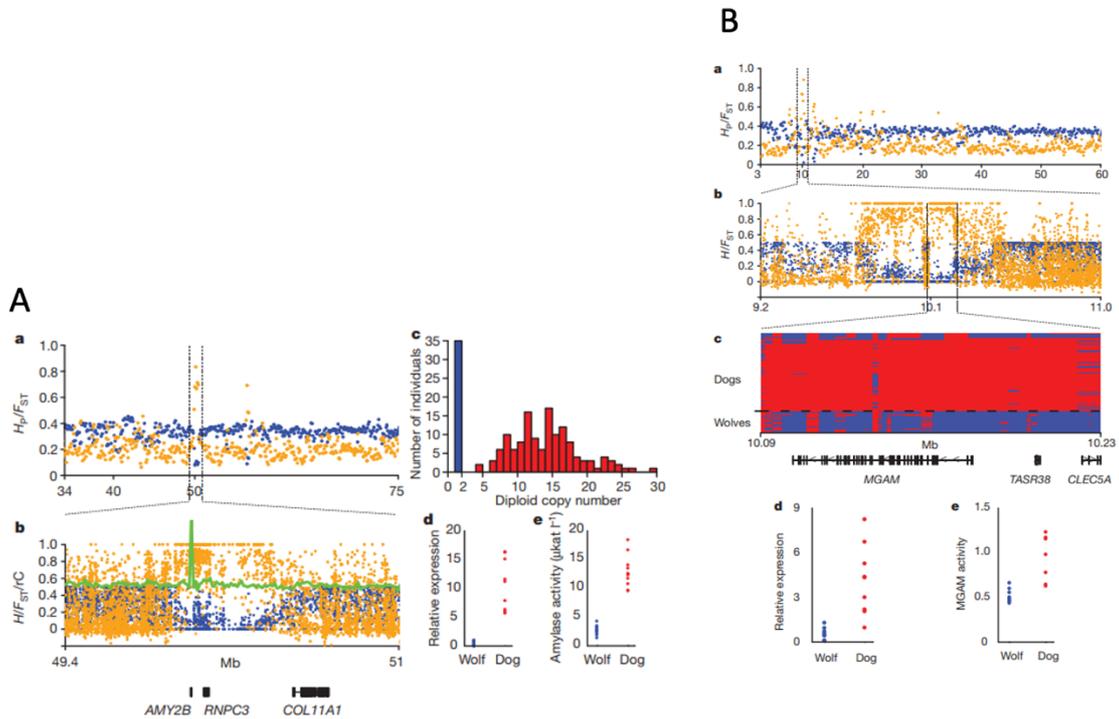


Figura 1. Nei cani il gene AMY2B, che codifica l'alfa-2B-amilasi, risiede sul cromosoma 6 (B - a), con una sequenza di 8 kb aumentata rispetto al lupo (B - b), suggestivo di un cambiamento del numero di copie. Il confronto regionale e locale del pool in quel locus (B - c), in particolare i livelli di espressione dell'RNA messaggero dell'amilasi pancreatica (B - d) e attività dell'amilasi nel siero (B - e) suggeriscono anche un sostanziale aumento del numero di copie nel cane del gene AMY2B rispetto al lupo (adattato da Axelsson et al., 2013).

I risultati indicano che tali adattamenti hanno permesso ai primi cani di evolversi anche con una dieta ricca di amido, tanto da essere ora considerati animali onnivori o carnivori adattati, nonostante appartengano all'ordine dei Carnivora (Axelsson et al., 2013; Bosh et al., 2015).

Anche le caratteristiche anatomiche e funzionali del cane moderno (Figura 2), permettono di inserirlo in questa categoria nutrizionale.

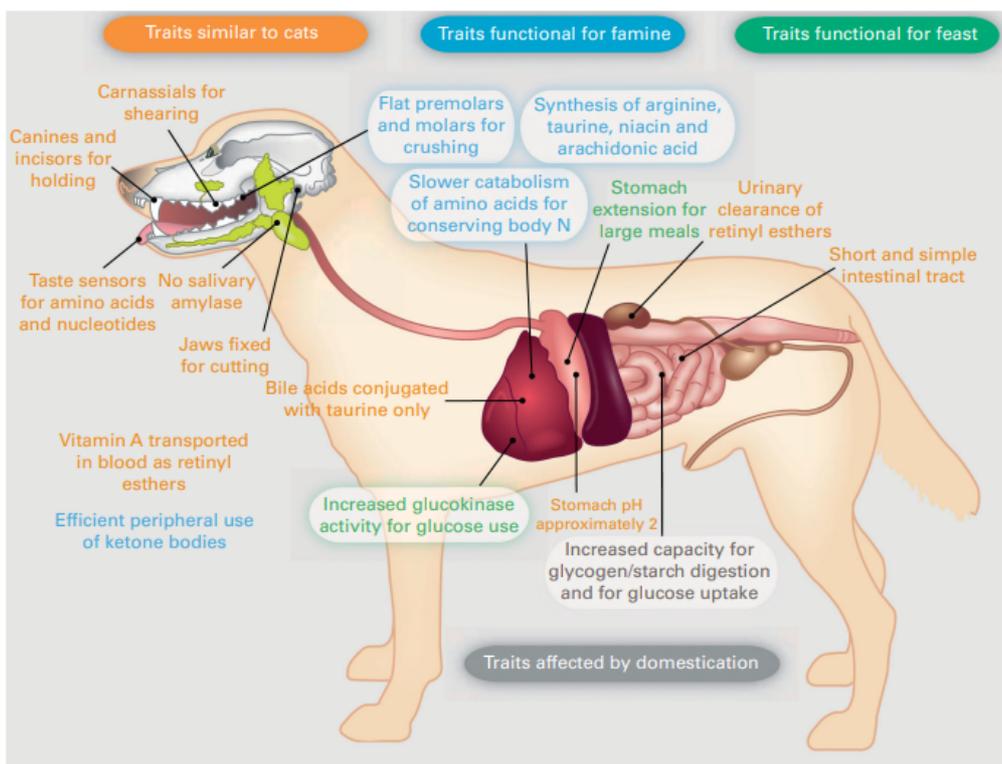


Figura 2. I cani sono classificati come onnivori in base ai tratti (evidenziati nelle caselle bianche) che sono diversi da quelli dei gatti carnivori (evidenziati in arancione) e potrebbero riflettere il tipico stile di vita dell'antenato del cane, il lupo. Tale animale ha caratteristiche anatomiche e funzionali che gli permettono sia di sopportare i periodi di carestia, sia di adattarsi a periodi di abbondanza di cibo. Tali caratteristiche si riscontrano ancora nel cane moderno e sono rappresentate nella figura rispettivamente in azzurro e in verde. Le capacità acquisite durante la domesticazione sono invece, mostrate nelle caselle grigie (Bosh et al., 2015).

Rispetto al gatto, animale per definizione carnivoro stretto, il cane condivide numerose caratteristiche tipiche dei carnivori: denti canini e carnassiali (detti anche denti ferini) taglienti adatti a strappare e lacerare, assenza di amilasi salivari, pH gastrico acido, intestino corto e semplice, ridotta attività delle amilasi pancreatiche e intestinali, mancanza di amilasi salivari; mancata sintesi di colecalciferolo (Hendriks, 2014). Tuttavia, essi differiscono dal carnivoro stretto per la capacità di sintetizzare quantità sufficienti di nutrienti essenziali (niacina, taurina e arginina), per un catabolismo più lento degli aminoacidi, per i denti molari molto sviluppati adatti alla frantumazione e funzionali all'utilizzazione di materiale vegetale, stomaco dilatabile adatto a pasti voluminosi, maggiore attività delle glucochinasi e aumentata capacità di digestione degli amidi e del glicogeno. Queste caratteristiche hanno facilitato la sopravvivenza del cane ancestrale, durante i periodi di ridotta disponibilità di nutrienti alimentari (Bosh et al., 2015).

1.2 ANTROPOMORFIZZAZIONE DEL CANE MODERNO

La lunga storia di coesistenza che l'uomo e il cane domestico hanno condiviso nel tempo, si è a tal punto radicata che attualmente il cane è ritenuto il "migliore amico dell'uomo". Infatti, esso, che oggi vive in molte delle nostre case, viene sempre più considerato un animale da compagnia, il *pet*, e un "membro della famiglia" (Cohen, 2002). L'allevamento di diverse specie, al fine di poterne godere la compagnia, ha una lunga storia (Biagi et al., 2021) e sono ben documentate sia la passione degli Egizi per i gatti che quella dei Greci e Romani per i cani (Kisling, 2000).

Secondo l'Articolo 1 del Dpcm del 28/02/2003 è definito animale da compagnia *“ogni animale tenuto, o destinato ad essere tenuto, dall'uomo, per compagnia o affezione senza fini produttivi o alimentari, compresi quelli che svolgono attività utili all'uomo, come il cane per disabili, gli animali da pet-therapy, da riabilitazione, e impiegati nella pubblicità. In questa categoria rientrano i cani, i gatti, i furetti, i pesci ornamentali, alcuni uccelli, i conigli e i roditori, anfibi e rettili”* (Dpcm, 2003).

La trasformazione sopra descritta è da ricercare nella crescente antropomorfizzazione dei *pets*: si è passati dal considerare cani e gatti animali deputati alla caccia, alla protezione delle case e al lavoro, al ritenerli animali da compagnia e a considerarli parte integrante della famiglia, con cui condividere abitudini, spazi di vita e cibo (Hand et al., 2010; Buff et al., 2014). Il cane, in particolare, viene considerato un componente significativo della famiglia e in molti casi, soprattutto nelle grandi metropoli, esso instaura una relazione indispensabile con l'uomo (Wong et al., 2019). In molti casi, il cane viene chiamato con un nome umano, viene festeggiato in occasione del compleanno, vestito e fotografato, al pari di un umano. Secondo molti proprietari, allevare un cane rende la famiglia più felice e più unita e la sua presenza riduce persino i litigi famigliari visto che sembra poter comprendere e condividere le emozioni umane (Sussman, 1985; Turner, 2006).

I cani rappresentano l'unica specie domestica con cui le persone possono andare a passeggiare, correre, giocare, avere una relazione, il che, è scientificamente dimostrato, apporta benefici fisici, psicologici e sociali agli umani conviventi (Friedmann et al., 1983; Sussman, 1985; Anderson et al., 1992; Edenburg and Bouw, 1994; Hart and Yamamoto, 1995; Headey, 1999; Banks and Banks, 2002; Shiloh et al., 2003; Headey and Grabka, 2007; Fine, 2010; Antonacopoulous and Pychyl, 2010; Xie et al., 2017; Friedmann and Krause-Parello, 2018; Wong et al., 2019). A riprova della sensazione di benessere generata dall'interazione interspecifica, è stato riscontrato un

aumento delle concentrazioni sieriche di beta-endorfine, ossitocina, prolattina e dopamina che si evidenzia dopo un'interazione positiva con i propri animali domestici (Odendaal and Meintjes, 2003). Nel libro "*The domestic dog*", i cani vengono definiti esseri eccezionali perché sono in grado di dimostrare amore e affezione verso il proprietario mediante particolari messaggi non verbali: saltando, scodinzolando, correndo intorno e abbaiando; in questo modo, i cani tengono compagnia al loro proprietario soprattutto quando è solo o triste (Hart, and Yamamoto, 2016).

Il proprietario, invece, manifesta una maggiore vicinanza verso l'animale trattenendosi per molto tempo e interagendo con lui: lo coccola, lo porta fuori e gli dà attenzioni particolari (Katcher and Beck, 1983). Questo favorisce un elevato attaccamento alla specie canina da parte dell'uomo, tanto che Archer (1997) nel suo studio, giunge a sostenere che gli umani provano maggiore soddisfazione nel relazionarsi in modo incondizionato con il cane, rispetto che agli esseri umani.

Sicuramente poi, questo attaccamento aumenta, quando si tratta di proprietari che vivono soli, oppure di anziani o di coppie che non hanno figli (Katcher and Beck, 1983). Il cane per queste persone, non è più soltanto un amico, ma risulta essere quasi un figlio e per molti questo profondo legame diventa motivo di premure e fonte costante di sicurezza (Hart and Yamamoto, 1995; Chan and Wong, 2022); soprattutto oggi che le aree rurali si spopolano, i grandi centri urbani sono abitati da persone che non si conoscono tra loro, i nuclei familiari si riducono di numero e aumenta la sensazione di solitudine e di isolamento, non solo per le persone più anziane, ma anche per i giovani (Matthews et al., 2019).

Il rapporto ASSALCO-ZOOMARK (2022) contiene una importante ricerca realizzata con il contributo di BVA-DOXA (azienda italiana che si occupa di ricerca di mercato) in cui si osserva e si descrive l'evoluzione avvenuta negli ultimi 15 anni proprio nel rapporto tra uomo e animale da compagnia. Secondo questa indagine, su un campione rappresentativo della popolazione italiana, appare evidente che oggi, rispetto al passato, gli animali d'affezione sono sempre più ritenuti veri e propri membri delle famiglie in cui vivono (lo afferma il 96% degli intervistati), vengono nutriti e curati in modo più attento (90%), sono più accettati nei luoghi pubblici (83%) e hanno più spazio sui mezzi d'informazione (80%). Inoltre, l'85% dei proprietari afferma che, rispetto ad alcuni anni fa, i *pets* partecipano a tutto quello che accade in famiglia, l'83% degli intervistati dedica agli animali più tempo e il 77% permette che essi abbiano libero accesso a tutti gli spazi della casa. In particolare, è emersa una sempre maggiore

presenza degli animali da compagnia nelle case italiane, di una maggior considerazione in ogni aspetto sociale e di un livello crescente di attenzione, sia in riferimento alla cura, sia alla loro alimentazione. Quest'ultima, viene considerata fondamentale, non solo per il benessere che procura agli animali, ma anche perché viene ritenuta un modo adeguato per coccolarli e ricambiare il loro affetto (ASSALCO, 2022).

Tutto ciò può costituire uno dei motivi per cui negli ultimi 40 anni, sempre più persone hanno accolto nelle loro case non solo cani e gatti, ma anche pesci, uccelli e specie non convenzionali (roditori e rettili). In particolare, ASSALCO ha stimato che gli italiani possiedono circa 64 milioni e 800 mila animali, fra cui circa 8 milioni di cani e 10 milioni di gatti (Tabella 1 e Figura 3 – ASSALCO, 2018; ASSALCO, 2022).

Tabella 1: animali domestici presenti in Italia, elaborazione su dati Euromonitor (ASSALCO, 2018; ASSALCO, 2022).

	2015	2021
Cani e gatti	14.5	18.8
Cani	6.70	8.70
Gatti	7.50	10.1
Altri pets	46.0	46.0
Pesci	29.9	29.9
Piccoli mammiferi e rettili	3.20	3.20
Uccelli	12.9	12.9
TOTALE	60.5	64.8



Figura 3. Percentuale di presenza degli animali da compagnia nelle famiglie italiane (ASSALCO, 2022).

Dall'anno 2020 ad oggi, l'aumento del numero di animali da compagnia, complice la pandemia da Covid-19, segna un trend positivo di crescita del numero di *pets*, non solo in Italia, ma anche in Europa dove la Federazione Europea del *Pet Food* (Fediaf, 2021), ha stimato che sono presenti circa 310 milioni di animali da compagnia, con quasi 92.000 cani e 113.500 gatti (Figura 4).

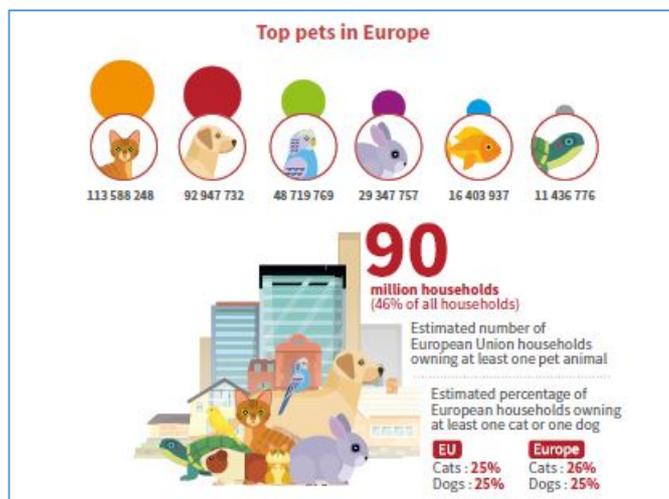


Figura 4. Numero di animali da compagnia presenti nelle famiglie europee (FEDIAF, 2021).

Il cambiamento nella considerazione degli animali domestici ha avuto un visibile riscontro anche a livello sociale: da quando la tutela degli animali fu inserita nella normativa europea del 2007 con il Trattato di Lisbona dove gli animali vennero riconosciuti come esseri senzienti (TFUE, 2012) fino ad oggi, quando la tutela degli animali viene aggiunta nella Costituzione Italiana (Cost. Ita., 2022 Art.9 e Art.41 - Figura 5).



Figura 5. Step di riconoscimento degli animali da compagnia nella normativa italiana (ASSALCO, 2022).

1.3 ALIMENTAZIONE INDUSTRIALE – *PET FOOD*

Il Regolamento UE 178/2002 definisce *pet food* “qualsiasi alimento, lavorato, parzialmente lavorato o non trasformato, prodotto da un’azienda di alimenti per animali domestici, destinato ad animali da compagnia dopo l’immissione sul mercato”.

Il *pet food* è un mangime composto, ossia una miscela costituita da almeno due materie prime per mangimi, contenenti o meno additivi, destinati all’alimentazione degli animali per via orale, in forma di mangime completo o complementare (D.L. 360/99).

- Mangime completo: miscela di materie prime per mangimi che, per la loro composizione, bastano ad assicurare una razione giornaliera.
- Mangime complementare: miscela di materie prime per mangimi che contengono tassi elevati di alcune sostanze e che per la loro composizione, assicurano la razione giornaliera soltanto se associati ad altri mangimi

Nella composizione dei mangimi possono essere utilizzate materie prime di origine animale e/o vegetale. Infatti, i principali ingredienti utilizzati nel *pet food* sono

- le carni (sotto-prodotti o prodotti della macellazione come muscoli, frattaglie, organi),
- il pesce (sottoprodotti della lavorazione delle principali specie di pesci, pesce azzurro, tonni, sgombri, merluzzi, trote, salmone)
- gli invertebrati (insetti). Gli insetti possono essere una buona alternativa ai sottoprodotti di origine animale. Essi hanno un basso impatto ambientale (ridotto utilizzo del suolo, acqua e substrati di crescita) (Bosh and Swanson, 2020; Penazzi et al., 2021); hanno buone caratteristiche nutrizionali (alto livello di proteine, amino acidi e acidi grassi); hanno caratteristiche tali da coprire i fabbisogni dei cani, buona digeribilità e buona palatabilità (Kierończyk et al., 2018; Penazzi et al., 2021; Kepinska-Pacelik and Biel, 2022).

Sarà necessario però considerare i problemi legati alle contaminazioni: batteriche, fungine, da metalli pesanti e micotossine (Kierończyk et al., 2018; Bosh and Swanson, 2020; Kepinska-Pacelik and Biel, 2022).

Questi componenti devono però essere idonei anche al consumo umano e possono essere ricevuti dall’azienda:

- *freschi*, ovvero mantenuti a temperatura tra 0-4°C;
- *congelati* a una temperatura tra -14/18°C;
- *essiccati* sotto forma di farina.

L'utilizzo di prodotti e sotto-prodotti di origine animale è regolamentata dal Reg. CE 1069/2009 che ha lo scopo di limitare i rischi potenzialmente connessi al loro utilizzo (UE, 2009).

A tali ingredienti si possono poi aggiungere cereali e vegetali quali frumento, mais, riso, soia, avena, orzo e girasole, in farina o in semi, minerali e vitamine (Russo, 2012).

L'industria del *pet food* ebbe inizio a partire dal XIX secolo, durante la rivoluzione industriale e la prima produzione di questi alimenti si deve all'elettricista americano James Spratt. Egli, che viveva a Londra, nel 1860, assistette allo sbarco di alcuni marinai e notò che i cani randagi mangiavano di buon grado gli avanzi dei biscotti che gli uomini sgranocchiavano. In questo episodio, egli intravide l'utilità di creare alimenti appositamente studiati per animali da compagnia: nacquero i *Meat Fibrine Dog Cake* a base di farina di grano, ortaggi, barbabietola e sangue bovino. Tali biscotti ebbero subito successo, specialmente in Inghilterra e, dopo la morte di Spratt, vennero fondate due società, una in Inghilterra e una negli Stati Uniti, destinate alla loro produzione. A partire dal 1907, il mercato venne monopolizzato dalla Bennett Biscuits & Co., società che cominciò a produrre diversi alimenti, tra cui un biscotto per cani chiamato *Milk-Bone* a base di carne, cereali, latte e minerali, olio di fegato, germe di grano e lievito. Si passò poi alla produzione di mangime a lunga conservazione. Il primo cibo in scatola per cani, a base di carne di cavallo, che era diventata conveniente e poco costosa, fu prodotto in Illinois nel 1922 e venne chiamato *Ken-L-Ration*.

La Seconda Guerra Mondiale però cambiò il corso dell'industria commerciale di alimenti per animali domestici: il governo americano fu costretto a razionare la carne e il metallo utilizzato per i cibi in scatola, per poter sostenere lo sforzo bellico a cui era chiamato e la loro produzione incontrò, di conseguenza, notevoli difficoltà (Parr and Remillard, 2014).

Il primo mangime estruso invece, fu il *Purina Dog Show*, ideato nel 1957 da Ralston Purina, il quale aveva compreso che il processo di estrusione aumentava la digeribilità e la conservabilità del prodotto (Case, 2010; Biagi et al., 2021). Quasi contemporaneamente, anche in Italia, comparvero i primi alimenti confezionati per cani, ad opera di Enrico Morando (Biagi et al., 2021).

Sarà a partire dagli Anni '70 che, grazie al continuo sviluppo delle scienze alimentari, della tecnologia per la sicurezza alimentare e della conoscenza del fabbisogno nutrizionale degli animali da compagnia, i produttori di *pet food* poterono introdurre vari

formati di vendita, allo scopo di soddisfare le esigenze di animali e proprietari: umidi, in lattina, vaschetta o busta, diete estruse, prodotti semi-umidi, diete per il trattamento di patologie specifiche e diete per i diversi stadi fisiologici o per le diverse età degli animali (ASSALCO, 2022).

È infatti, soltanto dagli ultimi decenni, che si è assistito ad un importante mutamento riguardo alle tendenze alimentari degli animali da compagnia. Sicuramente, il motivo di questa trasformazione è da ricercare nella crescente antropomorfizzazione dei *pets*, per i quali vengono riconosciuti bisogni ed esigenze simili a quelli dell'uomo. È stato dimostrato, infatti, che esiste un parallelismo tra l'alimentazione scelta dai proprietari per i propri *pets* e quella scelta per sé stessi (Schleicher et al., 2019). Per questo motivo, i *pet owners* diventano sempre più attenti alla salute e all'alimentazione dei propri animali da compagnia (ASSALCO, 2022). A questa aumentata attenzione verso gli animali domestici corrisponde, quasi contemporaneamente, un aumento di responsabilità sia in termini di salute, che di benessere e di qualità della vita. Negli animali domestici la qualità della vita viene misurata come riduzione dell'incidenza di malattie, ma anche come capacità di mantenere una vita attiva e come un allungamento della vita stessa (Bontempo, 2005). L'alimentazione, in particolare, è ritenuta fondamentale per il benessere canino e diventa un modo per coccolarli e ricambiare il loro affetto (ASSALCO, 2022).

Infatti, si cerca di garantire, anche a loro, un alimento che abbia un sempre miglior apporto nutrizionale e che curi l'uso delle migliori materie prime.

Diversi autori hanno confermato l'importante ruolo dell'alimentazione negli animali da compagnia, come già affermato da Ippocrate "*fa che il cibo sia la tua medicina*". La dieta infatti, assume un ruolo primario, perché se completa e bilanciata, può rispondere ai fabbisogni nutrizionali, può prevenire o risolvere quelle patologie che spesso compaiono in età avanzata, può favorire lo stato di benessere e promuovere la salute e la longevità dell'animale (Bontempo, 2005; Sanderson, 2016; Bosh and Swanson, 2020; Phillips-Donaldson, 2020; Wall, 2022; Ruple et al., 2022).

Proprio in questa "umanizzazione e antropomorfizzazione" degli animali da compagnia è insita la chiave su cui si fonda l'aumentata l'attenzione dei proprietari verso il *pet food* industriale (Vinassa et al., 2020) e la conseguente crescita di mercato (Schleicher et al., 2019; FEDIAF, 2021). Un'indagine SCIVAC del 2005 aveva già dimostrato che il *pet food* industriale permette all'animale di vivere meglio e più a lungo (Russo, 2012). Al contrario, è stato dimostrato che le diete casalinghe sono spesso sbilanciate: meno

di un terzo delle diete analizzate sono bilanciate o ancora la maggior parte sono squilibrate per il contenuto di minerali, proteine o vitamine (Oliveira et al., 2014). Ciò, è dovuto al fatto che tali diete non sono sempre verificate da veterinari nutrizionisti, oppure che i proprietari non aderiscono completamente alle indicazioni riportate (Ricci and Morelli, 2020).

Attualmente, circa il 77% degli animali da compagnia vengono nutriti con un alimento industriale. che, agli occhi del consumatore, garantisce (ASSALCO, 2022).

La domanda del consumatore si orienta quindi verso prodotti più sicuri, più salutare, con alto valore nutrizionale e tracciabili (Ansa, 2017; Sobol et al., 2022). Questi mangimi sono prodotti con ingredienti di qualità, ricchi di sostanze nutritive, altamente digeribili e specifici per le diverse fasi e gli stili di vita degli animali. Le aziende di *pet food* hanno risposto alle nuove e particolari esigenze commerciali ed etiche dei proprietari e, affidandosi a ricerche e a studi sempre più approfonditi, hanno incrementato e differenziato i propri prodotti: alimenti per le diverse fasi di vita, per le differenti patologie, specifici per razza e peso, diete monoporzione ottenute con ricette che soddisfano anche abitudini alimentari umane, quali varietà, freschezza e “buona cucina” (Russo, 2012; Minciotti, 2018; ASSALCO, 2022). Sicuramente, il primo obiettivo dell’industria è stato quello di fornire un alimento sicuro dal punto di vista igienico-sanitario, compresa la qualità microbiologica (presenza di Salmonella, Listeria e Escherichia o contaminazione con micotossine), adeguato dal punto di vista nutrizionale, caratterizzato da una lunga conservabilità, pratico da usare e capace di ridurre gli sprechi (Thompson, 2008; Russo, 2012; Motarjemi and Lelieveld, 2014; Chlebicz and Ślizewsk, 2018; Bosh and Swanson, 2020; FEDIAF, 2020; Kazimierska et al., 2021). È stato sottolineato che anche il mondo del *pet food* si sta adeguando alle richieste di maggiore sostenibilità, per ridurre l’impatto ambientale degli allevamenti intensivi e dell’industrializzazione agricola, con un aumentato uso di fonti proteiche alternative alla carne (insetti e diete vegane) (Gray, 2021).

Dal punto di vista economico, si rileva che, nel periodo 2007-2021, il mercato del *pet food* ha più che raddoppiato il fatturato passando da 1.163 milioni a 2.533 milioni di euro, con un tasso di crescita medio annuo delle vendite che si attesta intorno a un valore del +5,7%. In termini di volumi, il mercato ha raggiunto la quantità di 682.191 tonnellate contro le 442.000 tonnellate del 2007 con un tasso di crescita annuo del +3,1% (ASSALCO, 2022). La ripartizione delle vendite, distinta in prodotti umidi, secchi e snack, nel corso degli ultimi 15 anni, ha fatto rilevare un avvicinamento tra consumo

di umido e secco, ma gli snack hanno registrato la crescita maggiore. Il settore in cui si osserva una maggiore dinamicità è stato quello degli alimenti secchi per cani, la cui crescita è stata favorita, sia da un aumento progressivo del canale *specializzato*, sia da un'importante crescita del canale *grocery* dovuto a un grande incremento dell'assortimento (Figura 6 - ASSALCO, 2022).

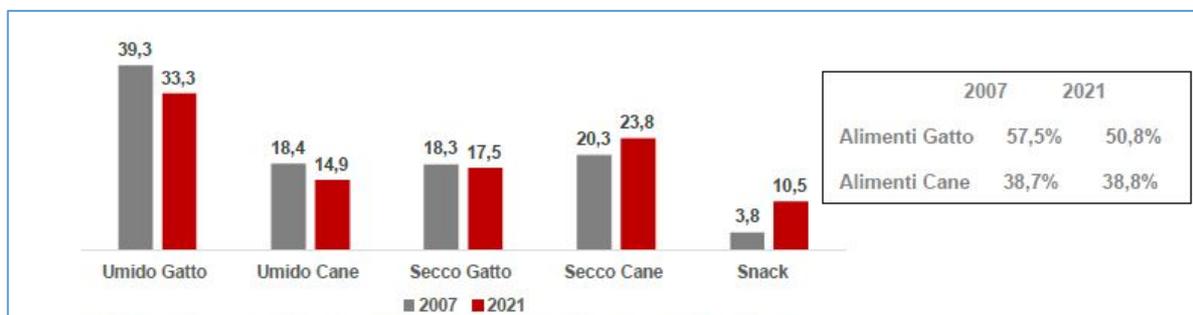


Figura 6. Quota valore dei diversi segmenti sul totale del mercato di *Pet food* italiano dall'anno 2007 al 2021 (ASSALCO, 2022).

I dati europei rilevano una produzione di prodotti alimentari per i *pets* pari a circa 27.7 bilioni di euro corrispondenti a 10,2 milioni di tonnellate di alimenti, venduti ogni anno (FEDIAF, *pet food trends*, 2021).

Inoltre, oggi il mercato mondiale e quello italiano in particolare segnano una maggiore richiesta di prodotti nuovi quali mono proteici, gluten o grain free, costituiti da ingredienti biologici, naturali, crudi od olistici (Buff et al., 2014; Schlicher et al., 2019; Bosh and Swanson, 2020; Phillips-Donaldson, 2020; FEDIAF, 2021), che si ritiene abbiano delle particolari qualità nutrizionali (Vinassa et al., 2020), anche se spesso non sono supportati da benefici scientifici dimostrati (Schleicher et al., 2019).

La ricerca di alimenti "naturali" e simili a quelli della dieta umana, ha portato negli ultimi anni, allo sviluppo di un settore specifico, sempre in crescita, di *pet food* definito "naturale" (Buff et al., 2014).

La non perfetta sovrapposizione della definizione di "naturale", data dalle due Agenzie di regolamentazione internazionale dei prodotti per animali, l'americana AAFCO e l'europea FEDIAF, ha spesso determinato un'erronea percezione di ciò che i proprietari considerano alimento naturale. Infatti, per questo motivo i proprietari tendono ad escludere da questa definizione, quei prodotti che subiscono processi di conservazione o estrusione perché, ai loro occhi, determinano una perdita di "naturalità" nei prodotti stessi (Buff et al., 2014).

Ancora più recente, è l'aumento d'interesse verso diete preparate in casa e spesso a base di cibo crudo, come suggerito nelle diete *raw meat-based diets* (RMBDs), tra cui

la più conosciuta la *Bone and Raw Food* (BARF) (Morelli et al., 2019; Davies et al., 2019). È stato rilevato, infatti, che più del 60% dei cani e gatti, che vivono in 55 Paesi di Europa, Asia, Africa e Oceania, consumano anche alimenti preparati in casa, come parte integrante della loro dieta, e il 12% di essi è alimentato esclusivamente con diete home-made (Vendramini et al., 2020).

Le motivazioni che spingono i proprietari di cani verso questo diverso tipo di diete sono molteplici: per alcuni, l'attenzione si focalizza sulla possibilità di controllare e selezionare gli ingredienti, di evitare conservanti artificiali, mantenere gli enzimi naturali e aggiungere fitonutrienti; per altri, lo scopo è quello di somministrare diete più sane e nutrienti, dare un alimento più appetibile, migliorare la salute dentale o poter fornire ai pets una dieta più vicina a quella del lupo o dei felidi selvatici (Ettinger and Feldman, 2016; Morelli et al., 2019). Non bisogna però dimenticare i numerosi rischi nutrizionali e sanitari dimostrati e associati all'impiego di queste diete (Freeman et al., 2013; Ricci and Morelli, 2020).

1.4 CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI E DIGERIBILITA' DELLA DIETA INDUSTRIALE

I proprietari che vogliono scegliere in modo oculato la dieta per il loro animale domestico, tengono in considerazione le caratteristiche del soggetto, i benefici che l'alimento potrebbe apportare, gli ingredienti in esso contenuti, la composizione nutrizionale, il prezzo e infine, le indicazioni di un professionista (Biagi et al., 2021).

La prima fonte a cui rivolgersi per acquisire informazioni relative al cibo da somministrare ai propri *pets* è il veterinario di fiducia, la seconda è data dai negozi specifici per la nutrizione animale e infine, vi è la rete/pubblicità (ASSALCO, 2022).

Purtroppo, i proprietari sono molto attenti alla scelta degli ingredienti e, ove è possibile, alla loro provenienza, ma per mancanza di conoscenze specifiche sono spesso portati ad antropomorfizzare le esigenze dei loro *pets*. Così, ci si dimentica che i fabbisogni nutrizionali sono specie-specifici e che spesso, i consigli utili all'uomo per mantenersi in buona salute, non sono altrettanto attendibili, quando riguardano il cane (Biagi et al., 2021).

1.4.1 CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI DEL *PET FOOD*

Il *pet food* industriale, quale alimento completo e bilanciato, contiene tutti i principi nutritivi di cui il cane ha bisogno. Questo animale ha sviluppato, nel tempo, un sistema digerente che gli consente di utilizzare un gran numero di alimenti così da soddisfare completamente il proprio fabbisogni di:

- energia;
- proteine e amminoacidi essenziali, minerali, vitamine, acidi grassi essenziali;
- fibra che garantisce una corretta funzionalità digestiva.

Occorre però sottolineare che, la quantità raccomandata dei principi nutritivi citati non è uguale per tutta la durata della vita dell'animale, ma essa deve essere adattata ai diversi stadi fisiologici: mantenimento, accrescimento, riproduzione, allattamento, vecchiaia (Biagi et al., 2021).

1.4.1.1 PROTEINE

Le proteine sono i principali componenti di muscoli, ossa, pelo e pelle. Esse formano molti ormoni e gli enzimi che sono indispensabili alla digestione e all'assorbimento dei nutrienti, sono i principali costituenti del sistema immunitario e sono una fonte secondaria di energia. Infatti, se le proteine introdotte con la dieta superano i fabbisogni, vengono usate a fini energetici o trasformate in grassi e carboidrati (Guidi and Colangeli, 2020).

Sono costituite da amminoacidi, alcuni dei quali essenziali (arginina, istidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptofano, treonina, valina), ovvero non sono sintetizzati dall'organismo, ma devono essere assunti con la dieta (Oberbauer and Larsen, 2019).

Le fonti principali di proteina nel *pet food* sono la carne e i sottoprodotti di origine animale, le uova e le proteine vegetali come la soia, il glutine di mais e il riso. Le proteine vegetali non sono disponibili/digeribili come quelle animali di alta qualità, ma sono migliori di quelle di origine animale di bassa qualità (ossa, testa, zampe...) (Guidi and Colangeli, 2020).

Viene definito fabbisogno proteico, il minimo apporto dietetico di proteine che permetta un rendimento ottimale (Burger and Rivers, 1989). Il fabbisogno proteico dei cani è difficile da determinare, poiché esso è influenzato da molti fattori quali la qualità, la composizione amminoacidica, la digeribilità degli alimenti, la densità energetica della

dieta, la situazione fisiologica (accrescimento, mantenimento, gravidanza e allattamento, senescenza), l'attività fisica svolta, e lo stato nutrizionale (Guidi and Colangeli, 2020).

Le linee guida nutrizionali della AAFCO (2014) e dell'NRC (2006) raccomandano, per la dieta di mantenimento, un contenuto minimo di proteina pari al 18% sulla SS in diete con una densità energetica di 4000 kcal/Kg di energia metabolizzabili (EM).

Le linee guida della FEDIAF distinguono il livello minimo raccomandato di proteine, sulla base dei differenti fabbisogni energetici dell'adulto. A un adulto che svolge poca attività fisica e con un fabbisogno energetico di 95 kcal/kg^{0,75}, è raccomandato un livello minimo di proteine del 21% su sostanza secca (SS), mentre a un adulto che svolge attività fisica moderata e con un fabbisogno di 110 kcal/kg^{0,75}, viene suggerito un minimo del 18% di proteine sulla SS (Figura 7 - FEDIAF, 2021). Tali livelli sono stati adattati in base alla digeribilità apparente delle proteine (80%), ad un minor fabbisogno energetico degli animali da compagnia e alle diverse necessità dei cani anziani.

Nutrient	UNIT	Minimum Recommended				Maximum
		Adult - based on MER of		Early Growth (< 14 weeks) & Reproduction	Late Growth (≥ 14 weeks)	(L) = EU legal limit
		95 kcal/kg ^{0,75}	110 kcal/kg ^{0,75}			(N) = nutritional
Protein*	g	21.00	18.00	25.00	20.00	-
Arginine*	g	0.60	0.52	0.82	0.74	-
Histidine	g	0.27	0.23	0.39	0.25	-
Isoleucine	g	0.53	0.46	0.65	0.50	-
Leucine	g	0.95	0.82	1.29	0.80	-
Lysine*	g	0.46	0.42	0.88	0.70	Growth: 2.80 (N)
Methionine*	g	0.46	0.40	0.35	0.26	-
Methionine + cystine*	g	0.88	0.76	0.70	0.53	-
Phenylalanine	g	0.63	0.54	0.65	0.50	-
Phenylalanine + tyrosine*	g	1.03	0.89	1.30	1.00	-
Threonine	g	0.60	0.52	0.81	0.64	-
Tryptophan	g	0.20	0.17	0.23	0.21	-
Valine	g	0.68	0.59	0.68	0.56	-

Figura 7. Livelli minimi raccomandati di proteine e amminoacidi nel cane. I valori sono espressi su 100g di sostanza secca. Fonte FEDIAF (2021).

1.4.1.2 CARBOIDRATI

I carboidrati si trovano, negli alimenti, sotto forma di carboidrati strutturali o fibre (pectine, gomme, emicellulosa, cellulosa e lignina) e non strutturali (monosaccaridi, disaccaride e polisaccaridi).

I carboidrati non strutturali forniscono la struttura carboniosa per la sintesi degli amminoacidi, del DNA e RNA, sono una fonte di energia, creano la struttura dei tessuti quando sono coniugati con proteine o lipidi (Guidi and Colangeli, 2020) e infine

mantengono una struttura adeguata alle crocchette. Gli amidi, infatti, tendono a "cementificare" e a impedire la frantumazione del prodotto (Biagi et al., 2021).

Nei mangimi commerciali, i carboidrati sono presenti sotto forma di amido che, una volta cotto, viene facilmente digerito. Occorre però ricordare che amidi poco cotti possono provocare intolleranze digestive e quindi diarrea (Hand et al., 2010; Alvarenga et al., 2021). Tali mangimi si avvalgono di diverse fonti per ottenere carboidrati: mais, avena, riso, frumento, orzo, sorgo e patate (Alvarenga et al., 2021). Questi alimenti hanno una quantità di nutrienti diversi e di conseguenza vengono scelti in rapporto al fabbisogno alimentare della dieta che l'azienda di *pet food* vuole produrre: il mais ha un buon apporto di fibre, grassi, proteine, carboidrati e acido linoleico; il riso è povero di grassi, magnesio e fosforo; l'orzo, invece, contiene una buona quantità di proteine e fosforo.

La loro digeribilità dipende anche dalla granulometria usata: le farine hanno una buona digeribilità a livello ileale e dell'intero tratto digestivo, invece, i grani interi, con un maggiore contenuto di fibra, hanno digeribilità ridotta.

Tuttavia, poiché i carboidrati non sono considerati principi nutritivi indispensabili per i cani, non esistono fabbisogni minimi definiti dalle linee guida FEDIAF (Case et al., 2010). Infatti, il cane può soddisfare il suo fabbisogno metabolico di glucosio anche attraverso le vie glucogeniche, purché nella dieta ci siano lipidi e soprattutto proteine in quantità sufficienti (Romsos et al., 1976). In particolare, in questa specie, alanina, glicina e serina sembrano essere gli amminoacidi glucogenici (Brady et al., 1977). È stato invece evidenziato come la loro presenza nella dieta sia indispensabile dal punto di vista fisiologico perché consente a questi animali di preservare altre risorse energetiche come proteine e lipidi visto che gli amidi sono una fonte di energia disponibile (Biagi et al., 2021).

Nel corso della sua domesticazione, che ha visto la modifica dei geni AMY2b, MGAM, SGLT1, deputati alla digestione dei carboidrati (Axelsson et al., 2013), il cane è divenuto capace di scindere gli amidi in glucosio grazie alle amilasi pancreatiche e si è abituato ad utilizzare i carboidrati contenuti nelle diete, attualmente compresi tra il 35% e il 55% di SS. Questo valore però, non può mai scendere sotto la soglia del 20% di SS, per motivi tecnologici e di produzione.

1.4.1.3 FIBRE

I carboidrati strutturali, definiti “fibra dietetica alimentare”, stimolano la masticazione, producono saliva e secernono succhi gastrici, favoriscono il riempimento dello stomaco determinando senso di sazietà ed evitano il picco glicemico postprandiale, mantenendo più a lungo la glicemia alta lontano dai pasti. Inoltre, sono indispensabili per mantenere sano l'intestino e per garantirne il buon funzionamento (Guidi and Colangeli, 2020).

In base alle loro caratteristiche chimico-fisiche (fermentescibili o non fermentescibili) e al loro rapporto con l'acqua (solubili o insolubili) contribuiscono alla peristalsi, aumentano o diminuiscono l'assorbimento dei nutrienti, aumentano le difese immunitarie locali (GALT) e la digestione (Guidi and Colangeli, 2020). Le fibre solubili, a contatto con l'acqua, creano una sostanza gelatinosa che, rallentando il transito, favoriscono l'assorbimento di alcuni nutrienti e modulano la risposta glicemica post prandiale (Guidi and Colangeli, 2020; Biagi et al., 2021). Le fibre insolubili invece assorbono acqua nel primo tratto dell'intestino, si gonfiano e favoriscono il senso di sazietà, stimolano la peristalsi e aumentano il transito intestinale. Nel grosso intestino tale fibra non viene fermentata e questo induce una riduzione della digeribilità della dieta e un aumento della massa fecale prodotta (Biagi et al., 2021).

Infine alcune componenti fibrose fermentescibili quali i frutto-oligosaccaridi FOS e i mannano-oligosaccaridi MOS agiscono come prebiotici, fanno da substrato per la crescita della flora batterica “buona” e la loro fermentazione nel grosso intestino porta alla formazione di acidi grassi volatili a corta catena (SCFA) (Hand et al., 2010). Gli SCFA riducono il pH intestinale, inibiscono la crescita di batteri patogeni quali *Bacteroides* e *Clostridium* spp e nutrono l'intestino. Il butirrato in particolare è usato dal colon per aumentare il numero di cellule della mucosa, per favorire l'assorbimento di acqua ed elettroliti e stimolare l'attività degli enzimi digestivi (Hand et al., 2010; Guidi and Colangeli, 2020).

Le principali fonti di fibre usate nei *pet food* sono: cellulosa, crusca di grano, buccette di soia, polpa di barbabietola, gusci di arachidi e orzo perlato.

Anche per le fibre, come per i carboidrati, non ci sono indicazioni precise riguardanti i fabbisogni minimi. La quantità di fibra presente nella dieta dipende dalla necessità di regolare la funzionalità intestinale e l'apporto calorico. Il contenuto massimo di fibra grezza presente nei mangimi varia tra il 3 e il 6% sulla SS. Maggiore è il fabbisogno di calorie, inferiore è la quantità di fibra. Al contrario, nelle diete per il controllo del peso

si aggiunge fibra dietetica per diminuire le calorie disponibili, ridurre l'assorbimento dei grassi, dei carboidrati e delle proteine e aumentare il senso di sazietà. In tal modo si limita il consumo di cibo (Hand et al., 2010).

1.4.1.4 GRASSI

I lipidi presenti nella dieta costituiscono la principale fonte di energia (2,25 volte maggiore, di quella che danno carboidrati o proteine): essi sono alla base degli acidi grassi essenziali, permettono l'assorbimento e il trasporto di vitamine liposolubili, garantiscono la sintesi del colesterolo, aumentano l'appetibilità della dieta (a questo scopo vengono inseriti all'interno o sulla superficie delle crocchette), danno la struttura alle membrane cellulari e ne mantengono la funzionalità, conservano la temperatura corporea, contribuiscono allo sviluppo del sistema nervoso e hanno una funzione essenziale nella risposta immunitaria e infiammatoria.

Essi hanno un elevato contenuto energetico (8,5 kcal/g di energia metabolizzabile) e un'alta digeribilità (80-95%). I carnivori, grazie alla cospicua secrezione biliare, possiedono un'elevata capacità di utilizzarli e quindi si possono essere inserire nella dieta, fino ad un massimo del 15-30% sulla razione giornaliera (Guidi and Colangeli, 2020). I cani possono mantenersi in buono stato di salute anche consumando diete con un contenuto di lipidi molto diverso, purché gli altri componenti della dieta siano corretti e quindi riescano a bilanciare le variazioni nella densità energetica (NRC, 2006). Tuttavia, animali per lo più sedentari, come sono divenuti i cani, non hanno bisogno di diete ad alto contenuto di grassi, i quali, infatti, nel lungo periodo potrebbero causare sovrappeso, obesità e mal digestione (Biagi et al., 2021).

I costituenti dei lipidi sono gli acidi grassi i quali si distinguono per la lunghezza della catena (4-24 atomi di carbonio) e per la presenza, il numero e la posizione di doppi legami (saturi, monoinsaturi e polinsaturi). Tra questi elementi, vi sono due famiglie di acidi grassi essenziali: gli omega-3 (alfa-linolenico, EPA e DHA) e gli omega-6 (tra cui l'acido linoleico, il gamma-linoleico e l'arachidonico). Generalmente il grasso animale è ricco di acidi grassi delle serie omega-6 mentre i pesci marini sono ricchi in acidi grassi omega-3.

Il fabbisogno lipidico di ogni animale dipende sia dalla richiesta di acidi grassi essenziali, sia dalla densità calorica della dieta che esso assume.

I cani soddisfano i loro fabbisogni di acidi grassi omega-6 grazie ad un adeguato apporto alimentare di acido linoleico a partire dal quale formano acido gamma-

linolenico e arachidonico. Di conseguenza, il fabbisogno di acidi grassi essenziali per il cane viene espresso come contenuto in acido linoleico. AAFCO (2014) e NRC (2006) raccomandano che la dieta contenga un minimo di acido linoleico di 1,1% e di grassi totali di 5,5% su SS in diete con densità energetica di 4000kcal/kg di EM. La FEDIAF invece, riporta valori minimi di grassi di 5,5% su SS e un minimo di acido linoleico di 1,53% su SS per cani a bassa attività fisica e 1,32% su SS per cani a moderata attività fisica (Figura 8 - FEDIAF, 2021).

Nutrient	UNIT	Minimum Recommended				Maximum	
		Adult - based on MER of		Early Growth (< 14 weeks) & Reproduction	Late Growth (≥ 14 weeks)	(L) = EU legal limit	
		95 kcal/kg ^{0.75}	110 kcal/kg ^{0.75}			(N) = nutritional	
Fat*	g	5.50	5.50	8.50	8.50	-	
Linoleic acid (ω-6)*	g	1.53	1.32	1.30	1.30	Early Growth:	6.50 (N)
Arachidonic acid (ω-6)*	mg	-	-	30.00	30.00	-	
Alpha-linolenic acid (ω-3)*	g	-	-	0.08	0.08	-	
EPA + DHA (ω-3)*	g	-	-	0.05	0.05	-	

Figura 8. Livelli minimi raccomandati di grassi e acidi grassi nel cane. I valori sono espressi su 100g di sostanza secca. Fonte FEDIAF (2021).

Fonti principali di acidi grassi sono: gli olii vegetali di mais, lino, colza, soia e girasole, il sego bovino, il grasso animale di pollo o maiale, il lardo e l'olio di fegato di merluzzo. Il cane adulto è in grado di sintetizzare gli acidi grassi della serie omega-6 a partire dall'acido linoleico, mentre il cucciolo che non ne è capace, necessita di un adeguato apporto alimentare di acido arachidonico (Guidi and Colangeli, 2020).

Carenza di queste sostanze essenziali determina alterazioni cutanee (pelo secco, opaco e desquamazione), alterazioni retiniche, della coagulazione e dell'attività riproduttiva, ritardi nella crescita e riduzione delle difese immunitarie (Hand et al., 2010).

1.4.1.5 VITAMINE

Le vitamine sono micronutrienti essenziali che svolgono numerose funzioni nell'organismo e non sono prodotte direttamente da esso ma devono essere assunte con la dieta.

Esse si dividono in liposolubili (A, D, E, K) e idrosolubili (vitamine del gruppo B, C).

La vitamina A garantisce le funzioni visive, riproduttive e l'integrità degli epitelii (FEDIAF, 2021). Si può trovare nel latte, nel tuorlo d'uovo e, in grandi quantità, nel fegato. Il cane può sintetizzarla a partire dal suo precursore il beta-carotene che si trova in vegetali quali le carote, le patate dolci o le verdure verdi scure (Guidi and

Colangeli, 2020). FEDIAF impone un livello di tossicità, per il cane, pari a 40.000 UI/100g di SS.

La vitamina D regola l'assorbimento di minerali, calcio e fosforo, favorisce la formazione dei tessuti ossei, aumenta l'assorbimento di Ca a livello intestinale e ne riduce l'escrezione renale. Tale vitamina può essere sintetizzata (in piccole quantità) quando il 7-deidrocoleciferolo presente sulla cute viene esposto al sole, o essere assunta con gli alimenti (tuorlo d'uovo o fegato) (Guidi and Colangeli, 2020).

La vitamina E è un'antiossidante e contribuisce, insieme al selenio, a prevenire l'ossidazione delle membrane fosfolipidiche cellulari e a difenderle dai radicali liberi. Le principali fonti alimentari di vitamina E sono gli olii di soia, di girasole e di mais (Guidi and Colangeli, 2020).

La vitamina K costituisce un fondamentale fattore della coagulazione ed è indispensabile per la sintesi della protrombina epatica.

Tutte le vitamine sono presenti negli alimenti, ma i fabbisogni giornalieri raccomandati dipendono da particolari situazioni: la specie, l'età, il momento fisiologico, la qualità degli alimenti e la presenza di antagonisti.

Occorre ancora sottolineare che le diete commerciali garantiscono sempre adeguati apporti di vitamine, in rispetto alle linee guida FEDIAF (FEDIAF, 2021).

1.4.1.6 MINERALI

I minerali sono principi nutritivi inorganici, rientrano nelle ceneri ottenute attraverso analisi centesimali e corrispondono allo 0,1% della SS della dieta. Possono essere divisi in macronutrienti e micronutrienti, a seconda della quantità presente nell'organismo. Si parla di macroelementi quando sono presenti in quantità superiori a 50mg/kg, dosabili con le comuni metodiche volumetriche. Si parla invece di microelementi quando sono presenti in quantità molto piccole, rilevabili solo con metodiche complesse. In ogni dieta, il fabbisogno di minerali deve essere considerato, sia come fabbisogno singolo, sia come fabbisogno multiplo, visto che i minerali interagiscono tra loro (Biagi et al., 2021): ognuno di essi influenza l'assorbimento, il metabolismo e l'attività dell'altro. È perciò importante non solo valutare le singole quantità, ma anche il loro rapporto.

I minerali che hanno maggiore rilevanza nella dieta del cane e del gatto sono il calcio (Ca) e il fosforo (P), visto che uno loro squilibrio può portare a gravi patologie osteoarticolari soprattutto in fase di accrescimento (Kiefer-Hecker et al., 2017).

- il Ca è il principale componente delle ossa e dei denti ed è un importante trasmettitore cellulare per il sistema nervoso, cardiaco e muscolare e per la coagulazione del sangue. L'organismo ne regola autonomamente la concentrazione sierica attraverso la risposta ormonale (PTH, calcitonina, vitamina D) (Guidi and Colangeli, 2020; Stockman et al., 2021).

La FEDIAF ne suggerisce i fabbisogni minimi che corrispondono a 1,25 g per Mcal, per adulti in mantenimento e 2-2,5 g per Mcal, per animali in gravidanza o accrescimento (FEDIAF, 2021) (Figura 8).

- il P svolge numerose funzioni ed è coinvolto in quasi tutti i processi metabolici, è inoltre un costituente del DNA, RNA, ATP etc (Stockman et al., 2021).

È indispensabile che sia mantenuto il rapporto di 1:1,1 con il Ca; di 2:1 per l'adulto e 1,6:1 per il cucciolo (FEDIAF, 2021).

Nutrient	UNIT	Minimum Recommended				Maximum	
		Adult - based on MER of		Early Growth (< 14 weeks) & Reproduction	Late Growth (≥ 14 weeks)	(L) = EU legal limit	
		95 kcal/kg ^{0.75}	110 kcal/kg ^{0.75}			(N) = nutritional	
Minerals							
Calcium*	g	0.58	0.50	1.00	0.80 ^a 1.00 ^b	Adult: 2.50 (N) Early growth: 1.60 (N) Late growth: 1.80 (N)	
Phosphorus	g	0.46	0.40	0.90	0.70	Adult: 1.60 (N)	
Ca / P ratio		1/1				Adult: 2/1 (N) Early growth & reprod.: 1.6/1 (N) Late growth: 1.8/1 ^a (N) or 1.6/1 ^b (N)	
Potassium	g	0.58	0.50	0.44	0.44	-	
Sodium*	g	0.12	0.10	0.22	0.22	≤	
Chloride	g	0.17	0.15	0.33	0.33	≤	
Magnesium	g	0.08	0.07	0.04	0.04	-	

Figura 9. Livelli minimi raccomandati di grassi e acidi grassi nel cane. I valori sono espressi su 100g di sostanza secca. Fonte FEDIAF (2021).

1.4.1.6 ENERGIA

L'energia è il motore dell'organismo che serve a mantenere la temperatura corporea costante, a far funzionare organi e tessuti, a favorire la crescita, la produzione di latte, l'efficienza riproduttiva e lo sforzo muscolare (Guidi and Colangeli, 2020). Essa viene ottenuta, in quantità variabili, a partire dai diversi nutrienti: grassi, proteine e carboidrati. I grassi apportano 9,4 Kcal/g, mentre proteine e carboidrati apportano rispettivamente 5,7 Kcal/g e 4,1 Kcal/g (FEDIAF, 2021).

La densità energetica di un alimento è un fattore importante da valutare, perché, insieme alla quantità di alimento assunto, permette al veterinario di fornire al proprietario, raccomandazioni più precise e puntuali, rivolte soprattutto a coloro che vogliono cambiare dieta al proprio animale oppure hanno necessità di somministrare

alimenti dietetici volti alla riduzione del peso. Inoltre, tale dato permette di confrontare alimenti diversi tra loro (Butterwick, 2021).

La ripartizione dell'energia nell'animale viene riportata in Figura 10.

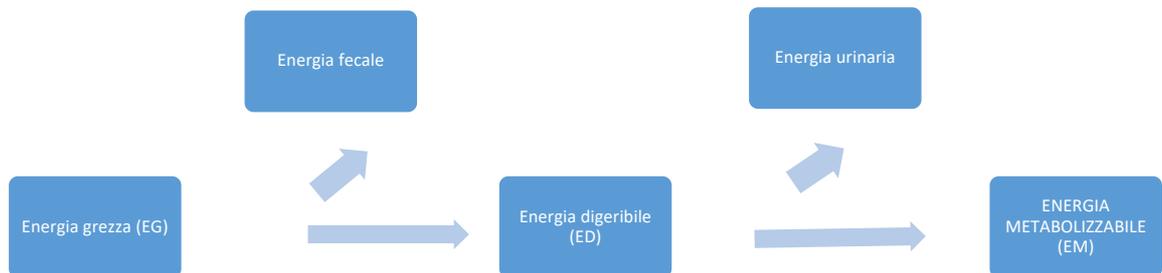


Figura 10. Rappresentazione schematica della ripartizione dell'energia nell'animale

L'*energia grezza (EG)* è l'energia totale presente nell'alimento, rilasciata in seguito alla sua completa ossidazione (Butterwick, 2021) e che viene calcolata con l'uso della bomba calorimetrica. Questa energia non è completamente disponibile, perché si verificano perdite durante la digestione e il metabolismo (Biagi et al., 2021).

L'*energia digeribile (ED)* è la quantità di energia che viene digerita e assorbita dall'animale. Equivale alla EG meno le perdite fecali. Anche questa energia non è completamente disponibile per l'animale, perché viene in parte metabolizzata dai tessuti e dalle cellule e in parte persa tramite l'urina (Butterwick, 2021).

L'*energia metabolizzabile (EM)* è l'energia dell'alimento che viene usata dai tessuti, ed è ottenuta dalla ED meno le perdite energetiche urinarie. Essa rappresenta l'energia realmente disponibile per l'organismo (Butterwick, 2021; Fediaf, 2021).

Il *gold standard* per il calcolo della EM è dato dagli studi di digeribilità durante i quali, ad un gruppo di animali viene somministrata una dieta e, per un tempo stabilito, raccolte feci e urine. Poi la determinazione della EG del cibo, delle feci e delle urine permette, per sottrazione, di ottenere la EM (Biagi et al., 2021).

Tuttavia, spesso i produttori di *pet food* non eseguono gli studi di digeribilità per motivi di costi e di tempo (FEDIAF, 2021). Perciò tali studi vengono sostituiti dalle equazioni predittive che forniscono una buona stima del contenuto di energia di una dieta (Butterwick, 2021; FEDIAF, 2021).

La EM può essere ottenuta mediante due metodi:

- il metodo di Atwater modificato, che si ottiene moltiplicando la quantità di grassi, proteine e carboidrati contenuti nell'alimento, rispettivamente per 3,5; 8,5; 3,5 (fattori di Atwater modificati);
- l'equazione proposta dall'NRC che prevede di calcolare il contenuto energetico secondo le seguenti formule (NRC, 2006):

1° step. Viene calcolato il contenuto in carboidrati (EI) dell'alimento, secondo la formula:

$$EI (g/100g) = 100 - (umidità + PG + EE + ceneri + FG)$$

2° step. Viene calcolato il contenuto di EG:

$$EG (Kcal/100g) = (5,7 * PG) + (9,4 * EE) + [4,1 * (EI + FG)]$$

3° step. Viene determinata la percentuale di digeribilità dell'EG:

$$EG (\%) = 91,2 - \frac{(1,43 * FG)}{100 - umidità} * 100;$$

4° step. Viene calcolato il contenuto di ED:

$$ED (Kcal/100g) = \frac{EG (Kcal/100g) * EG (\%)}{100},$$

5° step. Viene calcolato il contenuto di EM:

$$EM (Kcal/100g) = (ED - (1,04 * PG))$$

Il valore trovato viene convertito in Kcal/kg.

L'accuratezza dei due metodi è stata confrontata mediante uno studio che ha evidenziato come le equazioni proposte dall'NRC forniscano una stima più accurata per la misura della EM negli alimenti estrusi e come entrambi i metodi abbiano un'accuratezza moderata per il calcolo della EM nei *pet food* umidi (Calvez et al., 2012).

Tuttavia è importante determinare, oltre alla densità energetica dell'alimento, anche il fabbisogno energetico giornaliero dell'animale.

Il fabbisogno di mantenimento (*Resting Energy Requirement*, RER) è dato dall'energia fornita a un animale adulto che svolge un'attività fisica di base. Essa comprende l'energia necessaria per svolgere le funzioni fisiologiche essenziali e quella utile per attivare i processi digestivi, per svolgere attività fisica spontanea e per mantenere la

temperatura corporea (Meyer and Zentek, 2013; Biagi et al., 2021). La RER viene calcolata con la seguente equazione, proposta da FEDIAF:

$$\text{RER} = 110 \cdot \text{PC}^{0,75} \cdot k$$

Dove $\text{PC}^{0,75}$ rappresenta il peso metabolico (peso corporeo elevato allo 0,75); k i fattori di correzioni quali il comportamento (calmo, normale, attivo etc), la temperatura ambientale, l'attività fisica, l'età e la razza (FEDIAF, 2021).

1.4.2 DIGERIBILITÀ

I proprietari prendono sempre di più in considerazione la digeribilità della dieta, che costituisce un indice interno della qualità degli ingredienti utilizzati e più in generale dei prodotti impiegati (Biagi et al., 2016). Essi stessi possono misurare indirettamente tale caratteristica tramite la valutazione della qualità e della consistenza delle feci (Daumas et al., 2014).

Infatti, il valore di digeribilità, determinato tramite analisi di laboratorio, fornisce informazioni sulla quantità dei nutrienti della dieta che vengono effettivamente usati dall'animale (Hand et al., 2010; Biagi et al., 2016).

Per calcolare la digeribilità dei nutrienti, è importante misurare l'esatta quantità di alimento consumata e quella escreta con le feci. Quindi la digeribilità viene calcolata secondo la formula:

$$\frac{\text{nutrienti assunti } \left(\frac{\text{g}}{\text{d}}\right) - \text{emissione fecale } \left(\frac{\text{g}}{\text{d}}\right)}{\text{nutrienti assunti } \left(\frac{\text{g}}{\text{d}}\right)} \times 100$$

Tale digeribilità viene definita "apparente" perché nelle feci sono presenti anche una quantità di nutrienti non dietetici come gli enzimi, i succhi pancreatici, il muco, le cellule di sfaldamento dell'epitelio intestinale e i batteri (Phillipson, 1971).

1.4.2.1 FATTORI CHE INFLUENZANO LA DIGERIBILITÀ DELLA DIETA

Le caratteristiche dell'animale e quelle della dieta date dagli ingredienti scelti, dalla concentrazione totale dei nutrienti e dai processi tecnologici a cui è stato sottoposto l'alimento sono i fattori che principalmente influenzano la digeribilità della dieta.

Le caratteristiche dell'animale da considerare sono:

- la razza: Weber et al. valutano sulla digeribilità apparente di diete estruse gli effetti della taglia (piccola, media e grande) e dell'età (3 mesi, 5 mesi, 9 mesi e 15 mesi). Dimostrano che i cani di taglia grande hanno una digeribilità maggiore a tutte le età considerate (Weber et al., 2002);
- l'età: Weber et al e Swanson et al dimostrano che la digeribilità aumenta con l'età (Weber et al., 2002; Swanson et al., 2004)
- il livello di attività fisica: Ahlstrom et al indagano l'effetto di un esercizio basso o moderato sulla digeribilità dei nutrienti e dimostra che il valore di digeribilità è simile nei due casi (Ahlstrom et al., 2006);
- lo stato fisiologico: animali in gravidanza o in allattamento digeriscono meno i nutrienti perciò è necessario in tali situazioni utilizzare diete altamente digeribili (Hand et al., 2010)

Le caratteristiche della dieta da tenere in considerazione sono:

- gli ingredienti scelti che hanno digeribilità diverse: ad esempio, il pollo è più digeribile del manzo (Zentek et al., 2004);
- i processi termici, in particolare l'estrusione, a cui vengono sottoposti gli alimenti, che aumentano la digeribilità degli amidi (Murray et al., 2001; Perez-Navarrete et al., 2006);
- il grado di gelatinizzazione e il rapporto amilosio:amilopectina che influenza la digeribilità degli amidi che determinano la digeribilità degli amidi (Alvarenga et al., 2021);
- la forma fisica dell'alimento, intesa sia come granulometria che come struttura: la digeribilità è inversamente proporzionale alla dimensione dei granuli, più un alimento è tritato più risulterà digeribile (Hand et al., 2010);
- la quantità di fibra: maggiore è la sua quantità, minore è la digeribilità dei carboidrati (Hand et al., 2010);
- il tipo di fibra presente nell'alimento: se il contenuto di fibre lentamente fermentescibili è basso, la digeribilità è inferiore rispetto a quella di alimenti che non ne contengono o che contengono il tipo rapidamente fermentescibile (Hand et al., 2010).

1.4.2.2 METODI PER VALUTARE LA DIGERIBILITÀ DELLA DIETA

La digeribilità della dieta può essere valutata con metodi diversi sia *in vivo* che *in vitro*. Il più antico metodo per calcolare la digeribilità *in vivo*, è dato dalle gabbie metaboliche che permettono di raccogliere tutte le feci emesse dagli animali in osservazione (Biagi et al., 2016; Alvarenga et al., 2019; Duque-Saldarriaga et al., 2020). Allocare gli animali in gabbie però, può alterare i processi digestivi e quindi dare risultati diversi rispetto a quelli ottenuti osservando gli animali nel loro ambiente naturale (Sales and Janssens, 2003; Alvarenga et al., 2019). Esso è un metodo lungo, che può portare a problemi di benessere animale, visto che ne prevede il confinamento, che richiede un'organizzazione meticolosa della prova e può portare a errori nella rilevazione, poiché i soggetti potrebbero schiacciare le feci o mangiarle (Alvarenga et al., 2019).

Altro metodo per stimare la digeribilità è dato dai *marker* (Biagi et al., 2016; Alvarenga et al., 2019). Questi marker, spesso colorati, dovrebbero essere inerti, non tossici per gli animali e la loro microflora, non dovrebbero essere assorbiti o metabolizzati nel tratto gastroenterico, così da poter essere recuperati nelle feci al 100%, non dovrebbero influenzare la motilità, l'assorbimento e le secrezioni gastro-intestinali, dovrebbero essere fisicamente simili al materiale da marcare e dovrebbero avere caratteristiche chimico-fisico che ne permettono un'analisi quantitativa precisa (Verzichi and Marinucci, 2002; Sales, 2012; Duque-Saldarriaga et al., 2020). Nessun indicatore tuttavia, risponde a tutti questi criteri e soltanto in condizioni sperimentali specifiche, è possibile effettuare misurazioni affidabili mediante la scelta di marker appropriati.

I marker vengono classificati in esterni o interni. I marker esterni che, vengono mescolati con l'alimento, sono l'ossido di cromo, il cloruro di litio e le terre rare (Verzichi and Trabalza Marinucci, 2002; Alvarenga et al., 2019; Duque-Saldarriaga et al., 2020); quelli interni, direttamente presenti nelle feci, sono costituenti vegetali indigeriti come la silice, le sostanze cromogene vegetali, la lignina, l'azoto fecale e le ceneri acido insolubili (AIA) (Verzichi and Trabalza Marinucci, 2002; Alvarenga et al., 2019).

Questi metodi danno la possibilità di non dover raccogliere tutte le feci prodotte, perché il marker verrà rilevato direttamente nelle feci visto che è indigeribile e non interagisce con i processi digestivi (Sales and Janssens, 2003).

Le tecniche di determinazione della digeribilità, *in vitro*, godono di un sempre maggior interesse perché le metodiche *in vivo* sono spesso *time consuming* (prevedono circa 3 settimane di prova) e costose (costo degli animali, delle gabbie, della dieta e del personale), oltre ad avere un luogo idoneo dove svolgere la prova e mantenere gli

animali in sicurezza. Inoltre, in Europa, l'utilizzo di cani come animali da laboratorio è molto ridotto, nel rispetto delle leggi in vigore (UE, 2010; Biagi et al., 2016).

Tonglet et al. (2001) ha provato a correlare i risultati di una digeribilità di *pet food* commerciale *in vivo* con quelli ottenuti attraverso tre metodi enzimatici *in vitro* e ha ottenuto un indice di correlazione tra i due pari a 0,71. Mentre, lo studio di Hervera et al. (2007), hanno però già trovato una correlazione tra i due metodi, pari allo 0,92. Inoltre, è stata trovata una sovrapposizione tra i valori di digeribilità ottenuti con il metodo classico *in vivo* e quelli *in vitro*, anche in diete a base di insetto (Penazzi et al., 2021), confermando così la validità del metodo che prevede l'uso di marker.

1.5 I LIEVITI COME ADDITIVI IN NUTRIZIONE DEL CANE

I lieviti sono microrganismi eucarioti, di forma ovale o rotonda, della dimensione di circa 5-13 μm (Kath and Kulicke, 1999; Shurson, 2018). Hanno una parete esterna a strati costituita principalmente da carboidrati di circa 70 nm di spessore che rappresenta il 15-30% del peso secco della cellula (Bacon et al., 1969; Kath and Kulicke, 1999; Klis et al., 2006; Latgè, 2007; Beynen, 2019). La composizione chimica della parete è data dal 3% di ceneri, 13% di proteine, 8,5% di lipidi e da due principali polisaccaridi, i glucani e i mannani (Shurson, 2018). Questi ultimi sono, in parte, associati alle proteine presenti nella parete, e, in tale contesto, formano complessi di mannoproteine (Northcote and Horne, 1977) e, in parte, restano liberi nella forma α -D-mannano, a formare lo strato più superficiale della parete. Di conseguenza, la parete cellulare risultata costituita per il 60-65% da β -glucani, per il 35% da mannoproteine e per l'1-2% di chitina, che insieme ai glucani, serve a garantire rigidità e forma alla cellula (Faustino et al., 2021). La componente amorfa della matrice cellulare, invece, è costituita da α -D-mannani (Kogan and Korcher, 2007).

I lieviti sono funghi "anaerobi facoltativi", perché possono sopravvivere e crescere con o senza ossigeno. Crescono attraverso un processo aerobico, durante il quale l'ossigeno e lo zucchero vengono convertiti, mediante il metabolismo ossidativo, in anidride carbonica ed energia libera, utile a una crescita efficiente delle cellule (Shurson, 2018).

I lieviti sono ubiquitari nell'ambiente: sono stati isolati dalla frutta, dal miele, dal suolo, dall'acqua, dalle foglie, dai fiori e sono comunemente presenti negli ingredienti usati per i mangimi, come i cereali, gli insilati e il fieno (Shurson, 2018).

Esistono circa 60 generi di lievito, alcuni patogeni (*Candida*, *Cryptococcus* etc.) e altri con effetti benefici (*S.cerevisiae*, *Lactobacillus spp*). Comprendono circa 500 specie che si differenziano tra loro per morfologia, metabolismo dei substrati e processi riproduttivi (Stone, 2006). Di tutte queste specie, però, solo poche vengono usate commercialmente dalle aziende che producono alimenti fermentati come birra, formaggi, latte, o prodotti della panificazione e tuttavia, producono, a livello mondiale 42,26 bilioni di tonnellate di sottoprodotti, dei quali circa il 12,7% sono lieviti riutilizzabili nell'alimentazione animale (Faustino et al., 2021). Tra questi lieviti, il *Saccharomices cerevisiae* è la specie più utilizzata ed è stato descritto come un microrganismo sicuro, ad alto valore nutrizionale, con forti proprietà bioattive. Caratteristiche queste che sono state sfruttate per anni dalle aziende cosmetiche, farmaceutiche, dalle industrie alimentari o ancora per l'alimentazione animale. Visti i loro effetti benefici, essi vantano una lunga tradizione come integratori, soprattutto nelle specie zootecniche, proprio nell'alimentazione animale (Faustino et al., 2021).

1.5.1 LIEVITI PRESENTI SUL MERCATO

Numerose sono le forme di lievito o derivati di lievito che sono presenti sul mercato e possono essere classificati, sia per forma (vivi o inattivati) che per funzione (probiotici, prebiotici, postbiotici o con fini nutrizionali).

Essi comprendono i lieviti vivi, le colture di lievito, i prodotti con fini nutrizionali, i prodotti speciali e le frazioni di lievito (Figura 10).

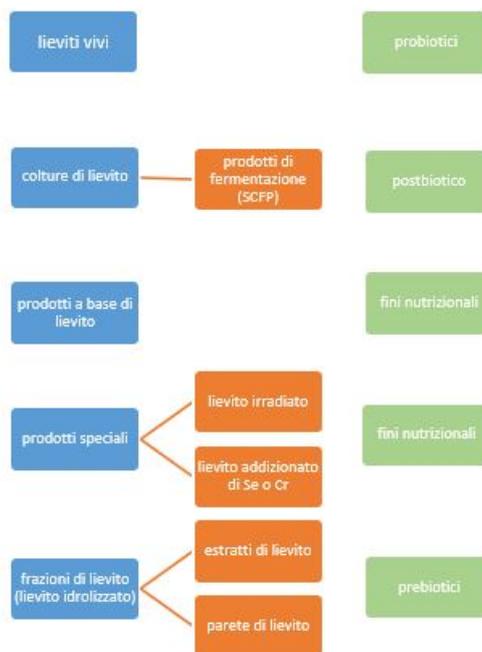


Figura 10. Rappresentazione delle categorie di prodotti reperibili in commercio (box in azzurro), esempi di prodotti appartenente a ciascuna categoria (box in arancione) e funzione per cui vengono impiegati (box in verde).

1.5.1.1 LIEVITI VIVI

I lieviti vivi sono microrganismi che vengono somministrati vivi e sono caratterizzati da spiccati effetti probiotici.

I probiotici sono organismi vivi che, se somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite (WHO, 2002; Seferoglu and Kirkan, 2022). Sarebbe però più appropriato descriverli come microrganismi vivi, che vengono somministrati con l'intento di migliorare la salute dell'ospite, modificando la composizione del suo microbiota, stimolando il sistema immunitario e favorendo il metabolismo dei nutrienti (Sivamaruthi et al., 2021; Saettone et al., 2020; Xu et al., 2020; Lee et al., 2022; Seferoglu and Kirkan, 2022). Essi includono specie batteriche e fungine, esogene e autoctone, che interagiscono con vari componenti cellulari all'interno dell'ospite (Schmitz and Suchodolski, 2016). Più in generale, si può asserire che l'impiego di ceppi probiotici può migliorare la composizione del microbiota intestinale di cani (Baillon et al., 2004; Biagi et al., 2007; Saettone et al., 2020; Sivamaruthi et al., 2021; Lee et al., 2022) e gatti adulti sani (Biagi et al., 2013) determinando un aumento delle concentrazioni di specie batteriche benefiche a discapito di quelle indesiderate (vetpedia, 2019; Saettone et al., 2020).

Comunemente quindi, vengono usati come probiotici il *Bifidobacterium*, il *Lattobacillus* e l'*Enterococcus faecium*, batteri vivi e non patogeni, che hanno dimostrato avere nel cane la capacità di modificare positivamente il microbiota intestinale (Xu et al., 2019) soprattutto quando esso è affetto da diarrea (Jensen and Bjørnvad, 2018; Nixon et al., 2018; Ziese et al, 2018; Mounika et al., 2019; Sivamaruthi et al., 2021).

Negli ultimi decenni però, viene rivolto sempre più interesse a organismi non batterici quali il lievito *Saccharomyces boulardii* (Franklin and Latson, 2006; Meineri et al., 2022).

La tassonomia del genere *Saccharomyces spp.* ha subito varie revisioni nel corso degli anni: attraverso uno studio comparativo di cariotipizzazione elettroforetica, *S. boulardii* è stato classificato come specie estranea a *S. cerevisiae* (Cardinali and Martini, 1994). Eppure una più recente tipizzazione del DNA, ottenuta mediante elettroforesi, ha dimostrato che *S. boulardii*, pur essendo distinto dal *S.cerevisiae*, mostra una certa somiglianza con lo stesso, ed è stata quindi proposta la denominazione *S. cerevisiae var. boulardii* (Mallie et al., 2001).

Negli anni successivi, il rapido sviluppo di tecniche molecolari ha permesso di includere *S.boulardii* all'interno della specie *S. cerevisiae* (Mitterdorfer et al., 2002), fino a quando Edwards-Ingram et al. (2007), mediante ibridazione genomica comparativa su microarray, hanno classificato *S. cerevisiae* e *S. boulardii*, come generi appartenenti alla stessa specie, anche se presentano differenze genetiche, di metabolismo e di fisiologia (Hennequin et al., 2001).

I ceppi probiotici, tra cui i lieviti, non sono nativi del tratto gastroenterico e, poiché colonizzano transitoriamente le superfici mucose, devono essere integrati continuamente. Sospendere l'integrazione porterebbe a una loro completa eliminazione dall'intestino crasso, nel giro di 3-5 giorni (More and Swidsinski, 2015). Al contrario, un'integrazione continua e costante si traduce in un loro rapido accumulo nell'intestino crasso il che consente una risposta precoce nei momenti di difficoltà (Franklin and Latson, 2006).

In Europa, il Regolamento EU 1831/2003 classifica i probiotici come additivi zootecnici che possono essere commercializzati solo dopo specifica autorizzazione (UE, 2003). All'interno del regolamento 1831/2003, nella categoria "additivi zootecnici", sono inclusi i seguenti gruppi funzionali:

- stimolatori della digeribilità: sostanze che, se somministrate agli animali, aumentano la digeribilità della dieta, attraverso l'azione su materie prime per mangimi
- stabilizzatori della flora intestinale: microrganismi o altre sostanze chimicamente definite che, se somministrate agli animali, hanno un effetto positivo sulla flora intestinale.

Ciò significa che il lievito vivo e i microrganismi vivi possono essere autorizzati in uno di questi due gruppi funzionali (Koeleman, 2019). Tuttavia, finora, nell'Unione Europea nessun lievito vivo è stato autorizzato per l'uso negli alimenti destinati agli animali domestici (Koeleman, 2019).

Vista l'esiguità di ceppi probiotici specificamente autorizzati per l'impiego nel cane e nel gatto (nel corso degli ultimi anni, in Europa, sono stati autorizzati per i cani soltanto un ceppo di *Enterococcus faecium*, uno di *Lactobacillus acidophilus* e uno di *Bacillus Subtilis*), il medico veterinario deve spesso ricorrere a prodotti destinati all'uomo, a base di batteri lattici e bifidobatteri, spore di *Bacillus* spp., o lieviti come, ad esempio il *S. cerevisiae var boulardii* (Vetpedia, 2019; Saettone et al, 2020).

Nell'ultimo decennio, ceppi specifici di lievito probiotico, *Saccharomyces cerevisiae var boulardii* (*S. boulardii*), hanno ricevuto notevole attenzione come supplementi efficaci per migliorare la funzione digestiva sia negli esseri umani che negli animali e come modulatori del microbiota intestinale (Franklin and Latson, 2006; Meineri et al., 2022).

Le cellule di lievito sono resistenti al pH basso, ai sali biliari e agli enzimi gastrointestinali e hanno una temperatura di crescita ottimale simile a quella del corpo. Caratteristiche queste che favoriscono la colonizzazione ottimale del colon (Ziese and Suchodolski, 2018). Infatti, per essere considerati probiotici, occorre resistere all'acidità gastrica, aderire alla mucosa intestinale, avere la capacità di colonizzare e di replicarsi nel colon, avere un'azione antibatterica contro i patogeni presenti, modulare il sistema immunitario e infine non deve essere né patogeno né tossico (Wynn, 2009; Saettone et al., 2020; Sivamaruthi et al., 2021). L'azione antibatterica del probiotico si esplica attraverso la produzione di muco il quale impedisce l'adesione dei patogeni oppure attraverso la produzione di metaboliti ad azione batterio-tossica, o ancora producendo proteasi o riducendo l'espressione genica e la produzione di tossine da parte dei batteri

patogeni (Castagliuolo et al., 1999; Saarela et al., 2000; Collado et al., 2007; Allaart et al., 2011; Bayoumi and Griffiths, 2012; Saettone et al., 2020).

In modo particolare, diversi studi hanno indagato i meccanismi d'azione di *S. cerevisiae boulardii*, evidenziando 3 aree principali di attività: azione a livello luminale, azione trofica e antinfiammatori e a livello mucosale:

- Azione luminale

Nel lume intestinale, i lieviti sono in grado di interferire con tossine patogene, di preservare la fisiologia cellulare, impedire l'adesione di patogeni, interagire con il microbiota dell'ospite e contribuire al ripristino dei livelli di acidi grassi a corta catena. Esercitano inoltre un'azione immunomodulatoria, sia a livello intestinale che a livello sistemico (Boirivant and Strober, 2007; Ng et al., 2009).

Il loro effetto antibatterico consiste nella capacità di bloccare i siti recettoriali delle tossine batteriche, funge da recettore bersaglio per la tossina o la eliminano (Pothoulakis et al., 1993; Brandao et al., 1998). Agiscono direttamente, ad esempio, bloccando la crescita di patogeni intestinali quali *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* e *Aeromonas hydrophila* (Altwegg et al., 1995; Zbinden et al., 1999)

- Azione trofica

La loro somministrazione favorisce l'incremento di butirrato e di altri AGV, grazie alle caratteristiche della parete cellulare, composta da glucani, mannoproteine e chitina, sostanze che fungono da substrato per la fermentazione microbica (Schneider et al., 2005). I lieviti, inoltre, hanno un effetto trofico sulle cellule dell'epitelio intestinale: sono capaci di sintetizzare e secernere poliamine giocando un ruolo importante nella proliferazione e differenziazione cellulare (McFarland, 2010).

- Azione antinfiammatoria

Studi sperimentali hanno dimostrato che i lieviti riducono i linfociti T CD4+ helper e diminuiscono l'espressione di citochine infiammatorie, tra cui l'IL-8, l'IL-6, l'IL-1 β , il TNF- α e l'interferone- γ . Così modulano il sistema immunitario ed influiscono sia sulla risposta immunitaria innata che su quella adattativa (Dalmaso et al., 2006).

Nel cane, l'uso di probiotici è stato poco studiato rispetto alle interazioni con le cellule dell'ospite, a differenza di quanto avvenuto per altre specie, come ruminanti, suini e polli (Chaucheyras-Durand e Durand, 2010; Vohra et al, 2016), ma è stato associato alla riduzione del rischio di diarrea antibiotici-dipendente (Jensent et al., 2018; Nixon et al., 2018; Xu et al., 2019; Saettone et al., 2020).

La diarrea associata agli antibiotici, sintomo comune negli esseri umani, nei cani, e nei cavalli, si verifica quando vengono somministrati antibiotici ad ampio spettro, per via orale o endovenosa, con conseguenti alterazioni del microbiota intestinale (McFarland, 2008). Gli antibiotici ad ampio spettro non sono specifici per i batteri responsabili dell'infezione, quindi, il loro più grande effetto collaterale è la distruzione non selezionata dei batteri, compresi quelli benefici per l'intestino. La perturbazione della popolazione microbica permette ai batteri opportunisti di prosperare e di causare diarrea. In medicina umana, è stato dimostrato che, durante il trattamento antibiotico, i lieviti inibiscono la crescita eccessiva di batteri patogeni, e la loro integrazione ha ridotto il rischio di diarrea fino al 20%, negli adulti (Franklin and Latson, 2006; Szajewska and Kolodziej, 2015).

In modo simile, si è osservato che, durante il trattamento antibiotico, una miscela simbiotica di *S.cerevisiae boulardii* o di altri ceppi probiotici hanno migliorato l'assunzione di cibo e hanno ridotto l'incidenza della diarrea associata nel cane (Whittemore et al., 2019). Nella stessa specie è stato osservato che il lievito aveva diminuito il rischio di diarrea associata all'uso di Lincomicina (Aktas et al., 2007). L'integrazione con lo stesso lievito, dopo la fine del trattamento, ha migliorato la microflora sana, senza alterare l'efficacia degli antibiotici comuni (More and Swidsinski, 2015; Selig et al., 2020; Franklin and Latson, 2006). Si può ancora aggiungere che il lievito idrolizzato *S.cerevisiae boulardii* ha migliorato lo stato di salute di soggetti affetti da enteropatia cronica, ha migliorato il fecal score delle feci e ridotto la frequenza di defecazione. Nel tempo si è visto anche migliorare la BCS dell'animale con l'inibizione della crescita di patogeni e neutralizzazione delle tossine batteriche (D'angelo et al., 2018).

Gli agenti patogeni enterici più comuni, per cani e gatti, sono *C. difficile*, *E. coli* e *Salmonella*. Questi prosperano quando la normale microflora e le cellule del tratto gastrointestinale sono danneggiate a causa di stress, malattie o cambiamenti nella dieta. Il mantenimento di una microflora sana e della salute gastrointestinale è, quindi, necessari per evitare che i batteri patogeni opportunisti creino danni sempre più gravi fino a determinare una malattia. Nello specifico:

- L'infezione da *C.difficile* è spesso associata alla diarrea, causata da antibiotici che è la più studiata riguardo all'integrazione con i lieviti. È stato dimostrato che essi impediscono a tali tossine di legarsi alle cellule del tratto gastroenterico, lisano i batteri ed evitano un'eccessiva risposta immunitaria (Czerucka et al., 2019; Pothoulakis et al., 1993);
- L' *E.coli* aderisce alle cellule epiteliali del tratto gastrointestinale e provoca la rottura delle *tight junctions*, causando danni ai tessuti con conseguente aumento della permeabilità e dell'attivazione di processi infiammatori. I lieviti non solo impediscono fisicamente il contatto di *E. coli* con il rivestimento intestinale, ma proteggono l'integrità delle giunzioni epiteliali e ne modulano la risposta infiammatoria (Stier and Bischoff, 2016; Czerucka e Rampal, 2019);
- La Salmonella è ubiquitaria nell'ambiente e diventa patogena quando l'animale si trova in uno stato di immunocompromissione dovuto a stress fisiologici, malattie, o altri stressors (cambiamenti nella dieta, ecc.) (Bradbery et al., 2015). I lieviti ne prevengono l'invasione, inibendo la specifica via molecolare, Rac (Martins et al., 2010), la immobilizzano e ne riducendo la capacità di invasione delle cellule epiteliali gastrointestinali.

Altri dati dimostrano che l'integrazione con lieviti vivo ottimizza, sia il sistema immunitario innato che quello adattativo (Buts et al., 1990). Ciò è utile per mantenere efficiente la funzione gastroenterica, efficace la risposta immunitaria e alta la protezione contro gli agenti patogeni. Il lievito vivo *S.cerevisiae* si è dimostrato capace di diminuire i *Coli* e gli enterococchi escreti con le feci in cani Beagle (Stella et al., 2005; Stercova et al., 2016).

Il sistema immunitario adattativo risponde più lentamente, ma con maggiore specificità, di quello innato, agli stimoli dei patogeni. Le sue cellule B sviluppano anticorpi-Ig specifici per vari agenti patogeni e danno una risposta immunitaria mirata. L'immunoglobulina A (IgA) è il primo anticorpo rilasciato, in risposta a un patogeno, nel tratto gastrointestinale (Stier and Bischoff, 2016). Buts et al. (1990) hanno rilevato un aumento della secrezione di IgA, pari al 56,9%, nel lume duodenale di ratti trattati con il lievito, rispetto a quelli del gruppo controllo.

L'infiammazione, associata alla risposta immunitaria innata e non patogeno-specifica, perciò si attiva rapidamente, come prima risposta del sistema immunitario a uno

stressor esterno. È stimolata da agenti patogeni o da danni tissutali, viene regolata da cellule infiammatorie o da intermedi, guidati dalle citochine. Dati ricavati da studi condotti sugli animali, hanno dimostrato che, il tessuto linfoide intestinale (GALT) è il bersaglio principale dell'effetto immunomodulatore dei probiotici associati agli enterociti, intermedi chiave con cui vengono trasmessi i segnali dal lume intestinale al GALT (Roberfroid et al., 2010). I lieviti modulano la risposta immunitaria innata, abbassando le citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF α , interleuchine e prostaglandine, e rallentando vari trasmettitori di segnali intracellulari (NF-kB, MAP chinasi) (Pothoulakis, 2009; Ibanez et al., 2019). L'inibizione delle citochine pro-infiammatorie è contemporaneamente accoppiata con *l'up-regulation* di fattori antinfiammatori (ad esempio IL-10), mucine e *tight junctions*, che sono i responsabili della protezione e della riparazione degli epiteli gastrointestinali danneggiati (Rodriguez-Nogales et al., 2018).

1.5.1.2 CULTURE DI LIEVITO

La coltura di lievito (YC) è un prodotto unico, composto da biomassa di lievito (comprese alcune cellule vitali residue, cellule morte e frammenti di pareti cellulari di lievito), da metaboliti di fermentazione e dal mezzo di crescita. Contiene una ricca varietà di sostanze biologicamente attive, tra cui proteine, piccoli peptidi, oligosaccaridi, vitamine, minerali, enzimi e numerosi "fattori di crescita sconosciuti", che possono tutti esercitare effetti benefici sulla nutrizione e, più in generale, sulla salute degli animali (Perricone et al., 2022).

Per ottenere colture di lievito, vengono inoculate cellule di lievito vivo in uno specifico terreno di coltura. Dopo una fermentazione in condizioni specifiche, il prodotto viene lasciato asciugare. Le cellule di lievito fermentano gli zuccheri presenti nel terreno di coltura e producono un'ampia varietà di metaboliti (peptidi, alcoli, esteri e acidi organici), la cui composizione dipende dal mezzo di fermentazione utilizzato e dalle condizioni di fermentazione (Shurson, 2018).

La coltura di lievito più comunemente impiegata è un prodotto ottenuto dalla fermentazione di *S. cerevisiae* (SCFP). Questi prodotti rientrano nella categoria dei postbiotici (Perricone et al, 2022). Il termine postbiotico è un concetto relativamente nuovo e indica quei fattori (prodotti o sottoprodotti metabolici) secreti da microrganismi vivi o rilasciati dopo la loro lisi, che apportano benefici fisiologici per l'ospite e per il suo

microbiota (Zolkiewicz et al., 2020). Secondo Tsilingiri et al. (2013), i postbiotici includono qualsiasi sostanza rilasciata o prodotta attraverso l'attività metabolica del microrganismo, che esercitano un effetto benefico sull'ospite, in modo diretto o indiretto, tuttavia, la sua definizione precisa rimane ancora in discussione.

Come riportato da Zolkiewicz et al. (2020), i meccanismi d'azione dei postbiotici proposti comprendono:

- Immunomodulazione: si esplica tramite produzione di citochine antinfiammatorie, stimolazione della risposta immunitaria T-helper-dipendente, induzione della maturazione e della sopravvivenza delle cellule dendritiche. Di conseguenza, vi è un aumento della secrezione di IL-10 e l'inibizione della secrezione di TNF. In questo modo viene limitata la risposta Th-1 mediata e aumentata la risposta Th-2 mediata;
- Prevenzione delle infezioni: si hanno effetti antimicrobici diretti che sigillano la barriera intestinale, si legano in modo competitivo ai recettori di alcuni batteri patogeni e modificano l'espressione dei geni ospiti o l'ambiente locale;
- Effetto antisclerosante: avviene con la regolazione del metabolismo dei lipidi e del colesterolo che può inibire la condensazione dei precursori del colesterolo, ridurre l'infiammazione, prevenire l'accumulo di colesterolo nei macrofagi e ridurre la concentrazione lipidica e di colesterolo LDL, mentre fa aumentare il livello di colesterolo HDL benefico;
- Azione antitumorale e azione antiossidante: queste sostanze hanno un potenziale anti tumorale perchè inibiscono l'infiammazione, inducono selettivamente l'apoptosi nelle cellule del cancro gastrico o regolano gli oncogeni e i geni soppressori attraverso modificazioni epigenetiche.

Prodotti di fermentazioni (SCFP) impiegati nel cane, ad esempio, non hanno mostrato variazioni della ATTD di SS, proteine, grassi, energia e ceneri, ma hanno modificato la composizione dei batteri intestinali (Lin et al., 2019).

Colture, invece, hanno modificato la composizione del microbiota, aumentando gli *Actinobacteria* e i *Firmicutes* e diminuendo i *Fusobacteria*; hanno agito sulla digeribilità delle fibre e ridotto quella delle proteine e dell'energia metabolizzabile; non hanno modificato la digeribilità della SS e delle ceneri (de Melo Santos et al., 2021).

1.5.1.3 PRODOTTI A BASE DI LIEVITO, CON FINI NUTRIZIONALI

I prodotti, a base di lievito con fini nutrizionali sono preparati costituiti da biomassa di cellule spente di lievito. Al fine di rendere disponibili questi nutrienti, la cellula di lievito viene lisata così che il suo contenuto possa essere digerito e assorbito (Peppler et al., 1978). Vengono spesso impiegati come integratori alimentari, visto l'alto contenuto di proteine (46,5%) con una digeribilità apparente del 75,5%, paragonabile a quella delle farine di sottoprodotto di pollame (78%) (Beynen, 2019), di amminoacidi quali lisina, metionina e treonina, di grassi e vitamine del gruppo B, tra cui la biotina, la niacina, l'acido pantotenico e la tiamina (Stone Charlie et al., 2006; Shurson, 2018) (Figura 9).

Component, %	Brewer's yeast	Dehulled soybean meal
Dry matter	93.30 ± 2.5	87.8 ± 0.6
Crude protein	46.5 ± 4.3	45.3 ± 1.0
Ether extract	3.9 ± 1.1	1.9 ± 0.4
Starch	1.0	0.0
Neutral detergent fiber	6.2 ± 8.7	12.2 ± 1.7
Acid detergent fiber	1.8 ± 2.4	7.3 ± 1.9
Ash	7.1 ± 1.1	6.4 ± 0.5
Arginine	2.06 (78)	3.36 (94)
Cysteine	0.29 (49)	0.67 (86)
Histidine	0.98 (77)	1.20 (91)
Isoleucine	1.99 (72)	2.09 (90)
Leucine	2.76 (73)	3.34 (89)
Lysine	2.85 (74)	2.78 (90)
Methionine	0.70 (69)	0.64 (92)
Phenylalanine	1.61 (66)	2.28 (91)
Threonine	2.01 (66)	1.77 (87)
Tryptophan	0.49 (55)	0.59 (89)
Valine	2.20 (66)	2.18 (88)
Calcium	0.32 ± 0.28	0.34 ± 0.09
Phosphorus	1.16 ± 0.16	0.62 ± 0.05
Metabolizable energy (kcal/kg) for swine	3466	3203

Figura 11. Confronto tra la composizione nutrizionale di prodotti, a base di lievito, con fini nutrizionali e prodotti a base di soia (Shurson, 2018).

1.5.1.4 PRODOTTI SPECIALI, A BASE DI LIEVITO

I prodotti speciali sono prodotti inattivati, utilizzati con particolari fini nutrizionali e a questo gruppo appartengono i lieviti irradiati e quelli addizionati di selenio o cromo.

Il lievito irradiato contiene l'ergosterolo, che può essere convertito in vitamina D2 (ergocalciferolo) quando viene irradiato con luce ultravioletta (Hohman et al., 2011). Un tempo, il lievito irradiato era un'importante fonte di vitamina D ma, attualmente, la vitamina D3, sintetica e meno costosa (colecalfiferolo) lo ha sostituito.

Il lievito addizionato di selenio è commercializzato come una forma altamente biodisponibile di Se (selenometionina), ne può contenere fino a 2000 mg/kg. Ha effetti unici sul metabolismo perché migliora lo stato di salute degli animali, rispetto ad una

alimentazione con forme inorganiche, e aumenta il contenuto di Se nella carne e nelle uova (Lyons and Jacques, 1999).

Il lievito addizionato con il cromo contiene cromo trivalente complessato con peptidi, amminoacidi e niacina biologicamente attivi. Sembra agire come un "fattore di tolleranza al glucosio" che potenzia l'attività fisiologica dell'insulina per migliorare il metabolismo dei carboidrati (Lukaski, 1999).

Tutte queste formulazioni, specie quelle dei lieviti arricchiti, si sono dimostrate vantaggiose nel miglioramento delle performance di crescita di animali in produzione zootecnica come ben riportato in letteratura (Dębski et al., 2004).

1.5.1.5 FRAZIONI DI LIEVITO

Si tratta di forme inattivate e di derivati del lievito che vengono somministrate per i loro effetti prebiotici (Shurson et al., 2018) e rientrano nelle "materie prime o ingredienti" dei mangimi (UE, 2009).

Sono stati definiti prebiotici quegli ingredienti fermentescibili da parte di specifici microrganismi, che sono capaci di indurre modifiche nella composizione e nell'attività del microbiota intestinale così da apportare benefici alla salute e al benessere dell'ospite (Robertfroid, 2007; Wernimont et al., 2020).

La maggior parte dei prebiotici è costituita da oligosaccaridi non digeribili, formati da catene di unità monosaccaridiche, con un basso grado di polimerizzazione ($DP < 19$).

Per essere definiti prebiotici, tali sostanze devono avere tre caratteristiche (Gibson and Robertfroid, 2008; Robertfroid, 2007):

- essere resistenti all'acidità gastrica, all'attività enzimatica e all'assorbimento intestinale. Il prebiotico deve rendersi disponibile, nel grosso intestino, in quantità sufficiente tanto da poter diventare un substrato per le fermentazioni batteriche;
- essere fermentabile, da parte della flora batterica residente;
- essere in grado di stimolare la crescita dei ceppi batterici benefici per l'ospite.

Secondo Robertfroid (2007), gli oligosaccaridi non digeribili che soddisfano queste caratteristiche sono quattro: l'inulina, i frutto-oligosaccaridi (FOS), i galatto-oligosaccaridi e il lattulosio.

In seguito, il concetto di prebiotico è stato ampliato grazie alle ricerche realizzate sul microbioma e ciò ha portato ad una loro nuova definizione. Attualmente viene definito prebiotico "il substrato utilizzato selettivamente dai microrganismi ospiti che conferisce

benefici alla salute dell'ospite" (Gibson et al., 2017). Quindi, in accordo con questa nuova definizione anche i MOS, i GOS e gli XOS vengono inseriti in questa categoria (Flickinger and Fahey, 2002; Gibson et al., 2004; Charalampopoulos and Rastall, 2012; Gibson et al., 2017; Al-Khalaifa et al., 2019).

I prebiotici, non digeriti, arrivano nel grosso intestino dove, fermentati dai batteri intestinali, producono grandi quantità di SCFA quali acetato, propionato, lattato e butirato (Flickinger et al., 2003; Propst et al., 2003; Beloshapka et al., 2013). Quest'ultimo ha un potente effetto trofico e anticancerogenico sulle cellule epiteliali di ileo e crasso (Chapman et al., 1995; Velazquez et al., 1996). È stato anche osservato che i prebiotici, se assunti in quantità elevate, possono avere effetto lassativo. Tuttavia, i cani ne tollerano bene concentrazioni fino al 2% della SS, senza che nella consistenza fecale compaia alcuna alterazione (Pinna and Biagi, 2014).

Nelle frazioni di lievito sono compresi gli estratti di lievito e la parete cellulare, ottenuti a partire da lieviti idrolizzati.

I *lieviti idrolizzati* sono prodotti, a partire da lieviti attivi, tramite autolisi, ossia per autodigestione a partire dall'attivazione di enzimi presenti all'interno della cellula, oppure attraverso idrolisi enzimatica con l'aggiunta di enzimi che permettono di rompere la cellula. Sono costituiti quindi, da tutto il contenuto della cellula di lievito: aminoacidi, nucleotidi, MOS, β -glucani e vitamina B (Perricone et al., 2022).

Dalla centrifugazione dei lieviti idrolizzati derivano le due frazioni del lievito: l'estratto e la parete cellulare.

Gli *estratti di lievito* sono la frazione solubile del lievito inattivo e consistono esclusivamente nel contenuto intracellulare rimasto dopo la lisi della cellula privata della parete cellulare. Essi sono ricchi di aminoacidi (60%), vitamine e minerali in tracce e funzionano come stimolanti della crescita dei microrganismi (Stone, 2006) e come appetizzanti (Bill Kaelle et al., 2022).

La *parete cellulare* o "scudo di glucano" invece, circonda la cellula del lievito ed è costituita da carboidrati (beta-glucani), da mannoproteine (catene di α -D-mannano legati a proteine che si localizzano sia in superficie che nella componente amorfa della matrice), e da chitina (Stone, 2006; Faustino, 2021). I β -glucani e la chitina sono i responsabili della rigidità della cellula di lievito e ne determinano la forma e la morfologia, mentre le mannoproteine e la loro porzione di carboidrati (α -D-mannano) sono i responsabili dell'interazione cellula-cellula o cellula-ambiente e garantiscono al

lievito la sua specificità immunologica. Entrambe le catene di carboidrati della parete sono state riconosciute capaci di modulare il sistema immunitario (Kogan and Kocher, 2007).

La parete cellulare del lievito, infine, ha la capacità di adsorbire o legarsi, nel tratto digestivo, a sostanze nocive come tossine, anti-vitamine, virus o batteri patogeni, con conseguente effetto protettivo sull'intestino (Chacher et al., 2017).

Le principali frazioni di lievito usate come prebiotici sono quelle che costituiscono la parete: MOS e β -glucani che hanno diversi effetti benefici.

I MOS o mannano-oligosaccaridi sono oligosaccaridi non digeribili, estratti attraverso una parziale idrolisi dei mannani (Faustino et al., 2021), che fanno parte di molecole complesse legate alle mannoproteine. Si possono trovare in due principali sedi della parete di lievito o attaccati alle proteine di parete come parte del gruppo glicosidico oppure come elementi delle catene laterali dell' α -D- mannosio (Spring et al., 2015).

Il loro potenziale meccanismo di azione è illustrato in Figura 10.

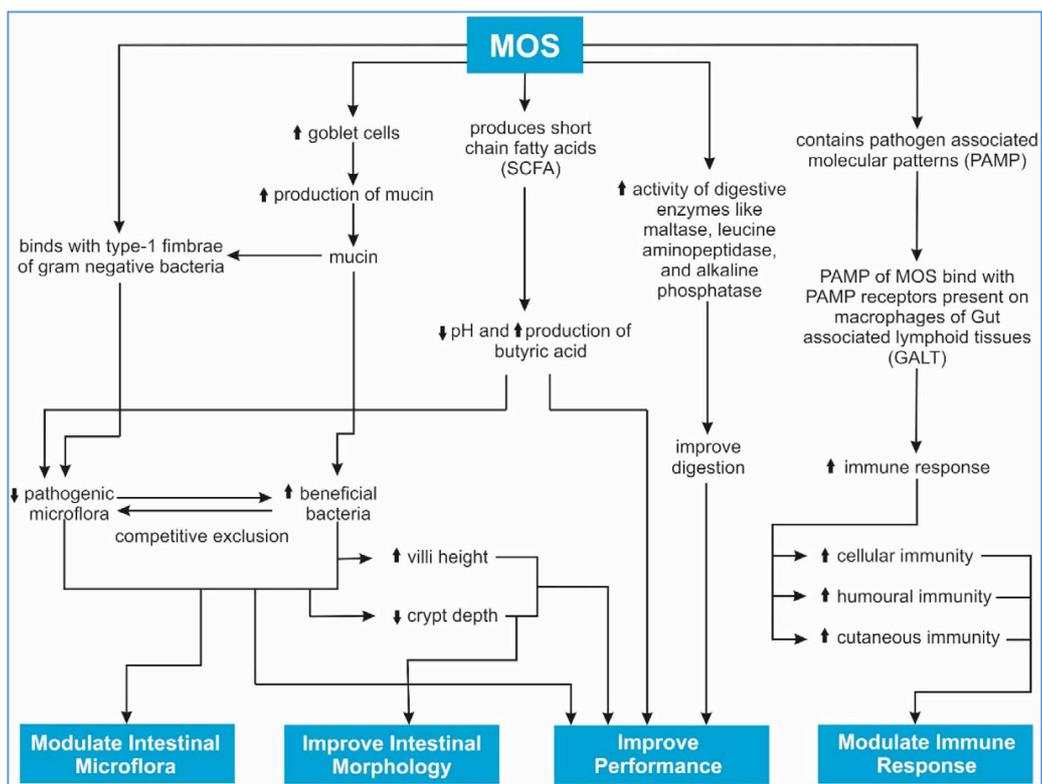


Figura 12. Rappresentazione schematica dei meccanismi d'azione dei MOS (Chacher et al., 2017)

La loro combinazione con le proteine crea una struttura a “pennello” che impedisce ai batteri di attaccarsi alla parete intestinale e di colonizzarla. Infatti, si legano ad alcuni

batteri patogeni come i *E.coli* e ad alcune tossine e ne riducono la patogenicità (Stone, 2006; Halas and Nochta, 2012; Gouveia et al., 2013).

Quando i MOS vengono addizionati alla dieta del cane influenzano la composizione e il metabolismo del microbiota intestinale perché non sono digeriti dall'animale, ma vengono consumati dai batteri intestinali. Favoriscono la rapida proliferazione di batteri benefici, quali *Lattobacilli* e *Bifidobacteria spp* (Strickling et al., 2000; Swanson et al., 2002 a,b; Grieshop et al., 2004; Middelboss et al., 2007; Beloshapka et al., 2012) e tendono a ridurre i *E.coli* e *C.perfringens* fecali.

Hanno spiccate proprietà immunomodulatrici (Spring et al., 2015; Elghandour et al., 2019), ben documentate per gli animali da reddito quali suinetti e polli (Halas and Nochta, 2012; Agazzi et al., 2020; Raza et al., 2017), ma anche nel cane. In questo animale è stato trovato un aumento nella produzione di linfociti e neutrofili sierici e una maggiore quantità di IgA (Swanson et al., 2002b; Middelbos et al., 2007).

I MOS migliorano anche la palatabilità dell'alimento. Essa è stata misurata con test di preferenza e con la quantità totale di alimento assunta e i risultati ottenuti dimostrano che queste sostanze, in generale, fanno aumentare l'assunzione di cibo (Swanson et al., 2002; Grieshop et al., 2004; Martins et al., 2014). In un solo caso non si è riscontrato alcun effetto positivo (Pawar et al., 2017).

Sono inoltre in grado di modificare le caratteristiche fecali quali il fecal score, la sostanza secca, il volume di feci emesse, la frequenza di defecazione, il pH fecale, la concentrazione di ammoniaca, gli acidi grassi a corta catena (SCFA) ossia acetato, propionato e butirato, con effetto trofico sulla mucosa intestinale e gli acidi grassi a catena ramificata (BCFA) come fenolo, indolo dando risultati spesso difformi (Howard et al., 2000; Swanson et al., 2002; Zentek et al., 2002; Grieshop et al., 2004; Beloshapka et al., 2012; Pawar et al., 2017; Musco et al., 2018; Thodoro et al., 2019; Lin et al., 2020; Van den Abbeem et al., 2020).

Agiscono sulla digeribilità dei nutrienti, ma in modo discordante a seconda degli studi e a seconda della specie: migliorano la digeribilità dei nutrienti in maiali, cavalli, polli e bovini (Schneider et al., 2005), ma non sempre sul cane (Zentek et al., 2002; Middelbos et al., 2007; Pawar et al., 2017; Theodoro et al., 2019). I lieviti aumentano gli enzimi dell'orletto a spazzola per la digestione di piccoli saccaridi e peptidi e up-regolano la sintesi delle poliammine, che migliorano l'espressione degli enzimi digestivi intestinali e dei trasportatori di nutrienti trans membrana (Franklin and Latson, 2006)

I β -glucani sono polisaccaridi presenti nella parete di diverse specie batteriche o fungine tra cui il *S.cerevisiae*. Essi hanno capacità immunostimolanti perché una volta assunti stimolano il sistema immunitario innato e quello adattativo, aumentando le concentrazioni di IgG e IgA nel sangue e nei liquidi corporei (Brown et al., 2003; Stuyven et al., 2010) e aumentano l'attività fagocitaria di monociti e neutrofilii (Vetvika et al., 2014). Abbassano i livelli di glucosio, colesterolo e trigliceridi ematici e hanno azione antinfiammatoria (Rai et al., 2018). In particolare si ritiene che i β -glucani, derivanti da *S.cerevisiae*, abbiano il migliore effetto immunostimolante (Beynen, 2019). Infatti, agiscono sull'attività mitogena dei macrofagi e inducono la produzione di ossido nitrico (Li et al., 2005; Rai et al., 2018). Sono stati perciò impiegati in campo veterinario per prevenire le patologie di origine batterica, virale o fungina (Szymanska-czerwinska, 2008) ma anche per ridurre lo stato infiammatorio di cani con IBD (Malewska et al., 2011).

CAPITOLO 2

OBIETTIVI

L'attività di ricerca si focalizzata sullo studio della dietologia del cane in termini sia di analisi chimiche e determinazione della digeribilità degli alimenti *in vitro*, sia sugli effetti che l'integrazione di un lievito può avere sulla salute intestinale della specie canina.

Nello specifico il progetto di ricerca si compone di uno studio *in vitro* e di due studi *in vivo*:

STUDIO 1_Digeribilità in vitro di alimenti industriali (estrusi e umidi) appartenenti a diverse categorie commerciali (premium, super premium, con particolari fini nutrizionali), nonché diete BARF (Bone And Raw Food o Biologically Appropriate Raw Food), disponibili in commercio;

STUDIO 2_Valutazione dei possibili effetti riscontrabili in madri e cuccioli nel periparto e post svezzamento ottenuti dalla somministrazione di lievito vivo *Saccharomyces cerevisiae var boulardii*;

STUDIO 3_Valutazione dei possibili effetti riscontrabili su cani adulti ottenuti dalla somministrazione di lievito vivo *Saccharomyces cerevisiae*.

In entrambi gli studi sono state valutati i principali parametri di accrescimento (peso, body condition score (BCS), e assunzione di alimento), digeribilità *in vitro* e *in vivo* (digeribilità totale apparente – ATTD) delle diete, studio del microbiota intestinale, caratteristiche fecali (fecal score, sostanza secca, presenza di patogeni quali, *Giardia spp.* e *Coronavirus canino*, e impronta olfattiva).

CAPITOLO 3

DIGERIBILITA' *IN VITRO* DI DIETE INDUSTRIALI

3.1 MATERIALI E METODI

3.1.1 SCELTA DEI PRODOTTI E CATEGORIZZAZIONE

Per realizzare questo progetto, sono stati acquistati in supermercati, *petshops* o in negozi online, 25 alimenti industriali, appositamente formulati per cani adulti di piccola taglia. Allo scopo di ottenere un pool il più vario possibile, i campioni sono stati selezionati in base alle loro caratteristiche, affinché rientrassero in specifiche categorie commerciali:

- Premium (n=5): prodotti di medio-bassa qualità, caratterizzati da una formula aperta e reperibili nei comuni supermercati o discount;
- Superpremium (n=5): prodotti di fascia superiore, caratterizzati da una formula chiusa e confezionati da marchi noti del mercato italiano e internazionale;
- Particolari fini nutrizionali/dietetici (n=6): prodotti rivolti al trattamento di diverse patologie, fra i quali rientrano anche idrolisati e monoproteici;
- Ingredienti alternativi (n=4) quali ad esempio gli insetti;
- Umidi (n=3): alimenti con un contenuto di umidità pari o superiore al 34%;
- BARF (n=2): alimenti crudi, venduti congelati, in negozi specializzati.

I campioni analizzati si caratterizzano in termini di ingredienti, come riportato in Tabella 5:

Tabella 5. Composizione in termini di ingredienti espressi in percentuale, indicati in ordine decrescente di quantità

Dieta	Categoria commerciale	Ingredienti
1	Premium	Proteina di pollo essiccata (26%), riso (25%), patate (24%), carne di pollo fresca (14%), grasso di pollo (4,3%), proteine animali cuore e fegato (1,5%), semi di lino (1,4%), lievito di birra 0,5%), olio di salmone (0,4), polpa di cicoria (0,2%), olio di girasole (0,1%), yucca schidigera essiccata (0,1%), origano (0,008%), maggiorana (0,008%), prezzemolo (0,008%), salvia (0,008%), timo (0,008%)
2	Premium	Cereali (55%), carni e derivati (15%), olii e grassi, sottoprodotti di origine vegetale, estratti di proteine vegetali, sostanze minerali, ortaggi (0,6%)
3	Premium	Pollo (17%), frumento integrale (13%), proteine disidratate di pollame, mais integrale (8%), riso (8%), grasso di origine animale, proteina disidratata di maiale, piselli disidratati (6%), proteine animali idrolizzate, proteina di soia, farina di mais, polpa di barbabietola, proteina di mais, sostanze minerali, inulina (0,7%), carota disidratata (0,5%)
4	Premium	Proteine animali (22%), riso 15%, granoturco, frumento, grasso animale, farina di pesce, glutine di mais, polpa di barbabietola essiccata, polpa di cicoria essiccata 1%, FOS 1%, olio di mais 1%, lievito essiccato, fosfato bicalcico, cloruro di potassio, cloruro di sodio, yucca schidigera
5	Premium	Proteine di pollame disidratate, frumento (22%), frattaglie di manzo (14%), mais, grasso di manzo, riso (4%), farina di soia, interiora, grassi, sostanze minerali, grasso di pollame, farina di proteina di mais, semola di mais, olio di pesce
6	Super premium	Agnello (40%), riso, concentrato proteico di patata, granoturco, polpa di barbabietola, lievito di birra, proteine animali idrolizzate, grasso animale, cartilagine idrolizzata, crostacei idrolizzati, metil sulfonil metano, XOS, MOS, yucca schidigera, spirulina, radice di echinacea, origano, aglio essiccato in polvere
7	Super premium	Proteina disidratata di pollo, mais, farina di mais, grassi animali, glutine di mais, proteine vegetali, frumento, proteine animali idrolizzate, riso, polpa di barbabietola, minerali, olio di pesce, olio di soia, lieviti, FOS

8	Super premium	Cinghiale (24%), proteina di cinghiale disidratata (22%, amido di piselli, grasso di pollo, zucca disidratata (5%), uova essiccate, olio di pesce, fibra di piselli, carote essiccate, farina di erba medica, inulina, FOS, estratto di lievito, mela essiccata (0,5%), spinaci essiccati, bucce e semi di psillio (0,3%), melograno essiccato, arancia dolce essiccata, mirtillo essiccata, cloruro di sodio, lievito di birra essiccato, curcuma (0,2%), estratto di aloe vera, glucosamina, solfato di condroitina
9	Super premium	Farina di pesce (23,5%), riso macinato (23%), pisello intero, glutine di granoturco, olii e grassi, amido di pisello, cruschetto di riso, polpa di barbabietola, sostanze minerali, MOS, FOS, glucosamina vegetale 0,04%, grifola frondosa (0,027%), yucca schidigera, prodotti e sottoprodotti della trasformazione di frutta e verdura fresca, prodotti ottenuti dalla trasformazione di vegetali, prodotti ottenuti dalla trasformazione di erbe, alghe
10	Super premium	Maiale disidratato (16,8%), maiale fresco (14%), riso (14), farina di riso integrale, mais, orzo, grasso di maiale disidratato (8,3%), grasso di pollo (4,8%), proteine di maiale disidratate, lievito (1%), minerali, MOS (0,1%), inulina di cicoria
11	Insetto	Fiocchi di patate (43%), proteine di insetto (larve di <i>Hermetia illucens</i> essiccate) (23%), fecola di patate, proteina di patate (7,7%), olio di salmone (1,7%), proteine vegetali idrolizzate, olio di semi di girasole, semi di lino, fosfato monocalcico, carbonato di calcio, lignocellulosa, cloruro di sodio, scorze di lievito (0,3%), inulina di cicoria (0,1%), cloruro di potassio, farina di alghe
12	Insetto	Piselli (62%), proteine di insetto disidratato (23%), olio di girasole, fosfato monocalcico, carbonato di calcio, semi di lino (1%), cloruro di sodio, aloe vera (0,03%), rosmarino
13	Insetto	Patata, farina di insetti, grasso di pollame, vitamine e minerali, lievito idrolizzato, carbonato di calcio, olio di pesce, semi di lino
14	Insetto	Riso (52,8%), insetti (15%), lievito parzialmente idrolizzato, olio di girasole, polpa di barbabietola, proteina di patate, sostanze minerali, tegumenti di psillio, cicoria disidratata
15	Particolari fini nutrizionali	Proteine di pollame disidratate, mais, farina di mais, grassi animali, glutine di mais, proteine vegetali isolate, frumento, idrolizzato di proteine

		animali, riso, polpa di barbabietola, Sali minerali, olio di pesce, olio di soia, lieviti e prodotti simili, FOS
16	Particolari fini nutrizionali	Patate (41%), proteina di pisello, olio di mais (10,5%), piselli (9%), sostanze minerali, semi di lino, proteina di patata, spinaci disidratati, fagioli (2,5%), idrolizzato proteico di origine vegetale, FOS (0,3%), lignocellulosa, estratto di gambo di ananas (0,25%), estratto di bacche di Goji (0,05%)
17	Particolari fini nutrizionali	Proteina disidratata di maiale (21%), granoturco integrale (20,5%), fioretto di granoturco, piselli, farinaccio di riso, riso, maiale (4%), riso integrale (4%), grasso di origine animale, semi di lino, olio di granoturco, aroma senza proteina animale, sostanze minerali, estratto secco di radice di cicoria (0,7%), lignocellulosa, estratto di gambo di ananas (0,1%), estratto secco di yucca schidigera (0,025%), alga spirulina (0,02%),
18	Particolari fini nutrizionali	Amido di mais, proteina di soia idrolizzata, sostanze minerali, olio di cocco, zucchero, olio di semi di colza, cellulosa, glicerina, olio di soia, olio di pesce
19	Particolari fini nutrizionali	Frattaglie di manzo (18%), manioca disidratata (17,5%), proteina di pollo disidratata (17,5%), amido di piselli, lardo, piselli disidratati, proteina di tacchino disidratata, polpa di barbabietola disidratata (3%), interiora aromatizzate, proteina di piselli, sostanze minerali, radice di barbabietola rossa disidratata (0,5%),
20	Particolari fini nutrizionali	Carne fresca di pollo (12%), carne di pollo disidratata (12%), carne di tacchino disidratata (12%), lenticchie rosse, piselli verdi interi, fave, grasso di pollo (5%), interiora di pollo fresche(fegato, cuore, reni) (4%), aringa disidratata (4%), uova intere fresche (4%), passera di mare intera fresca (4%), olio di aringa (2%), erba medica essiccata (2%), lenticchie verdi (2%), piselli gialli interi, fibra di piselli, cartilagine di pollo fresca (1%), alga bruna, zucca intera fresca, zucchina intera fresca, pastinaca intera fresca, cavolo fresco, spinaci freschi, foglia di senape indiana fresca, foglie di rapa fresche, carote intere fresche, mele rosse delizioso fresche, pere williams fresche, fegato di pollo liofilizzato, fegato di tacchino liofilizzato, mirtilli rossi interi freschi, mirtilli interi freschi, radice di

		cicoria, curcuma, cardo mariano, bardana, lavanda, altea, bacche di rosa rugosa
21	BARF	Polpa di manzo (50%), pusi di coniglio (30%), organi di bovino (10%), trippa grezza di bovino (10%)
22	BARF	Polpa di manzo (50%), ali e schiena di pollo (30%), organi di bovino (10%), trippa grezza di bovino (10%)
23	Umido	Cerni e derivati (55%), cereali, sostanze minerali, sottoprodotti di origine vegetale, estratti di proteine vegetali
24	Umido	Manzo (13%), maiale, fegato di maiale, pollo, patate, riso, carote, sostanza minerale, olio di girasole, proteina di riso, farina di riso fermentato, estratto secco di yucca schidigera (0,02%), estratto secco di agrumi, estratto secco di mela (0,01%)
25	Umido	Carne e sottoprodotti animali, cereali, olii e grassi, minerali, derivati di origine vegetale

3.1.2 ANALISI CENTESIMALE E STIMA DELL'ENERGIA METABOLIZZABILE (EM)

Le analisi centesimali sui mangimi (sostanza secca, proteina grezza, estratto etereo, fibra grezza e ceneri) sono state condotte, secondo le metodiche standard (AOAC, 2005 e Regolamento CE 152/2009), nel laboratorio di analisi degli alimenti del Dipartimento di Medicina Veterinari e Scienze Animali (DIVAS), dell'Università degli Studi di Milano.

100g di alimento, prelevati da ogni pet food, sono stati macinati con un mulino a coltelli Retsch, per 20 secondi a 4000 giri e si è ottenuta una polvere fine e omogenea.

In seguito:

- per la determinazione della proteina grezza (PG) è stato utilizzato il metodo 2001.11 (AOAC, 2005). La PG è stata determinata dal contenuto in azoto, trovato con il metodo Kjeldahl e usando il fattore di conversione 6,25. Il campione è stato poi mineralizzato in acido solforico in presenza di un catalizzatore. La soluzione acida ricavata è stata alcalinizzata

mediante l'aggiunta di NaOH. L' NH_3 è stata isolata per distillazione e raccolta in una quantità nota di acido solforico (il suo eccesso viene titolato con soluzione standard di NaOH);

- per la determinazione dell'estratto etereo (EE) è stato seguito il regolamento della commissione europea n. 152/2009. Il campione, trattato con HCl a caldo e raffreddato, è stato lavato ed essiccato. Il residuo è stato estratto tramite etere di petrolio, secondo il metodo Soxhlet;
- per la determinazione della fibra grezza (FG) è stato seguito il regolamento della commissione n. 152/2009 secondo il metodo Weende. Il campione è stato sgrassato e trattato con soluzioni bollenti di acido solforico e idrossido di potassio. Il residuo è stato lavato, essiccato, pesato e incenerito a 500°C ;
- per la determinazione delle ceneri grezze, è stato impiegato il metodo 942.05 (AOAC, 2005). Il materiale è stato incenerito in muffola a 550°C e, successivamente, raffreddamento in essiccatore, a temperatura ambiente;
- per la determinazione dell'umidità, è stato seguito il regolamento della commissione n. 152/2009. Il campione è stato essiccato in stufa a 104°C , per 24h, e la sostanza secca (SS) è stata determinata come differenza dall'umidità;
- per la determinazione dell'energia metabolizzabile (EM), è stato impiegato il metodo dell'European Standard EN 16967, proposto dall'NRC, 2006, riportato precedentemente al capitolo 1.4.1.6.

3.1.3 DIGERIBILITÀ *IN VITRO*

Le tecniche di digeribilità, *in vitro*, ricorrono a tempi di incubazione ed a enzimi, che mimano, *in vivo*, la digestione degli animali. Tali metodiche hanno il fine di misurare, nel tratto gastroenterico, la digeribilità apparente, sia dell'energia che delle diverse componenti alimentari, ma hanno anche il vantaggio di essere più semplici e di ridurre tempi e costi dell'esperimento (Boisen and Fernandez, 1995).

È stato impiegato il procedimento descritto da Boisen e Fernandez nel 1995 e nel 1997 (IVD, In Vitro Digestibility), mediante il quale si è potuta calcolare la digeribilità, a livello ileale, delle proteine e della sostanza secca presenti in campioni di mangime per cani (Boisen and Fernandez, 1995; Boisen and Fernandez, 1997).

La metodica utilizzata per preparare i campioni da esaminare è descritta di seguito. È stata prevista l'esecuzione di due step successivi e l'uso di una duplice copia di ogni campione come mostrato in Figura 11.

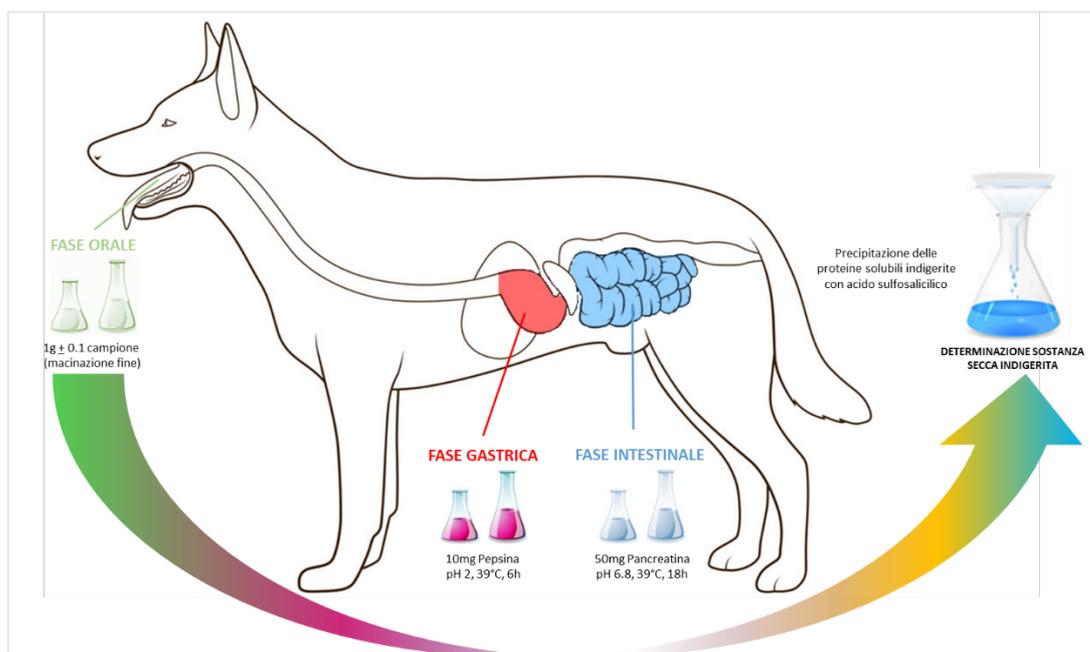


Figura 11. rappresentazione grafica della determinazione della IVD secondo il metodo di Boisen and Fernandez (1995).

Step 1:

- ciascuno dei 25 campioni in esame, sminuzzati in modo da ottenere particelle con un diametro <1mm, sono stati pesati ($1 \text{ g} \pm 0,1 \text{ mg}$) e inseriti in bottiglie da 100 mL, numerate e siglate. Per ogni serie, è stato aggiunto "bianco";
- in ogni bottiglia contenente il campione è stato inserito un piccolo magnete;

- sono stati aggiunti 25 mL di Buffer Fosfato 0,1M a pH 6 ed è stato messo in agitazione il magnete, per poter mantenere la soluzione in continuo movimento e ottenere una buona miscelazione;
- sono stati addizionati 10 mL di HCl 0,2M;
- è stato aggiustato il pH e portato a 2, con HCl 1M o NaOH 1M;
- è stato aggiunto 1 ml di soluzione di pepsina, appena preparata con l'uso di 10 mg di pepsina (Porcine, 2000 FIP-U g, Merck);
- sono stati inseriti 0,5 mL di cloramfenicolo (0,5 g/100 mL di etanolo), antibiotico batteriostatico per inibire la crescita batterica;
- le bottiglie sono state chiuse e lasciate per 6 ore a incubare in agitazione, in un bagnetto alla temperatura controllata di 39°C.

Step 2:

- ai campioni, tolti dall'incubatore, sono stati aggiunti 10 ml di Buffer Fosfato 0,2M a pH 6,8;
- sono stati aggiunti 5 ml di NaOH 0,6M;
- è stato aggiustato il pH e portato a 6,8 con HCl o NaOH 1M;
- è stato inserito 1 mL di soluzione di pancreatina appena preparata con 50 mg di pancreatina (Porcine, grade IV, Sigma);
- le bottiglie sono state chiuse e lasciate a incubare in agitazione a 39°C per 18 ore;
- i magneti sono stati tolti dalle bottiglie;
- sono stati aggiunti 5 mL di acido sulfosalicilico 20%, a tutti i campioni;
- i campioni sono stati lasciati a incubare a temperatura ambiente, per 30 minuti, allo scopo di far precipitare sul fondo delle bottiglie le proteine non digerite, ma solubilizzate dal procedimento;
- i campioni sono stati filtrati attraverso crogioli di vetro, precedentemente pesati, contenenti 0,5 g di celite (dimensione dei pori 40-90 μm di diametro);
- tutto il materiale residuo è stato trasferito nei filtri, mediante l'uso di acido sulfosalicilico 1% (p/v);

- sono stati effettuati due lavaggi dei crogioli usando per ciascuno 10 mL di acetone e 10 mL di etanolo;
- si sono fatti essiccare i residui non digeriti in stufa a 80°C, per una notte;
- è stata calcolata la IVD della sostanza secca come differenza tra la DM1 del campione e il residuo indigerito, dopo aver corretto per la DM dei bianchi

$$IVD (\%SS) = \frac{(SS \text{ campione} - UF \text{ } SS \text{ campione})}{SS \text{ campione}} * 100;$$

- Il residuo indigerito, comprensivo della celite, è stato trasferito in provettoni Kjeldahl per la determinazione dell'azoto (N) non digerito secondo il metodo ufficiale (Commissione Europea, 2009).
- È stata calcolata la IVD della proteina grezza secondo la seguente equazione:

$$IVD (\%PG) = \frac{(PGi \text{ campione} - PGf \text{ campione})}{PG \text{ iniziale campione}} * 100$$

dove PGi indica la proteina grezza del campione, e PGf la proteina grezza ottenuta tramite il metodo Kjeldahl.

3.1.4 ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti sono stati analizzati usando il software statistico IBM SPSS Statistics v. 21 (SPSS). I valori di IVD dei campioni di mangime sono stati analizzati usando ANOVA per poterne comparare le medie.

Le analisi sono state eseguite utilizzando il seguente modello:

$$y_{ij} = \mu_j + \epsilon_{ij}$$

dove y_{ij} è il valore osservato; μ_j è la media delle osservazioni per il j-ennesimo gruppo (campione); e ϵ_{ij} rappresenta la variabilità nello stesso campione.

Differenze con un p-values < 0.05 sono state considerate significative.

Per comparare la composizione nutrizionale e la distribuzione dei campioni sono stati fatti box plot. Queste analisi hanno dato la possibilità di calcolare la media, i quartili, il minimo e il massimo di ogni campione.

3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.2.1 CARATTERISTICHE CHIMICHE DEI PRODOTTI

In questo studio, sono stati analizzati mangimi *completi* estrusi o umidi di categoria “Adult mini”.

Secondo il Regolamento UE n. 767/2009, un alimento per animali da compagnia è denominato *completo* se la sua composizione è sufficiente a soddisfare i loro fabbisogni giornalieri (Regolamento UE n. 767/2009). Quindi deve essere un alimento che, per tutta la durata della somministrazione, copra i bisogni nutrizionali degli animali, secondo la specie e lo stato fisiologico per cui è destinato (FEDIAF, 2021).

Ogni alimento è stato analizzato per i singoli componenti SS, PG, EE, FG e i risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 6.

Tabella 6. Composizione chimica degli alimenti (% su SS).

Dieta	Categoria commerciale	PG	EE	FG	ceneri	Rapporto proteine: ceneri	SS	EM
1	Premium	27.8	15	4.8	7.5	3.7	93.3	3079
2	Premium	26.2	12.5	3.6	8.3	3.1	95.4	2966
3	Premium	28.5	17.9	2.6	7.3	3.9	94.6	3206
4	Premium	28.7	18.1	2.1	7.3	3.9	93.8	3178
5	Premium	29.2	18.3	1,6	8.6	3.3	92.4	3175
	Media premium	28	16.3	2.9	7.8		93.9	3121
6	Super premium	28.2	14.6	2.6	6.7	4.2	95.7	4020

7	Super premium	29.3	17.3	1.4	6.1	4.8	92.1	3960
8	Super premium	31.3	18.8	3	6.9	4.5	95.6	4005
9	Super premium	29.2	14.6	2.5	8.3	3.5	95.8	3027
10	Super premium	27.5	15.9	2.8	8.6	3.1	94.3	3980
	Media super premium	29.1	16.2	2.4	7.2		94.7	3798
11	Insetto	22.8	12.4	3.6	8.1	2.8	96.1	3004
12	Insetto	23.5	13.8	4.9	6.6	3.5	97.7	3103
13	Insetto	22	16.7	5.2	6.7	3.2	95.4	3240
14	Insetto	21.3	10.6	3.6	6.9	3	93.8	2975
	Media insetto	22.4	13.3	4.3	7		95.7	3080
15	Particolari fini nutr	29	17.2	1.4	6.1	4.7	92.9	3893
16	Particolari fini nutr	26.2	15.2	2.3	7	3.7	95.1	3123
17	Particolari fini nutr	26.5	15.9	2.6	7.4	3.5	94.3	3136
18	Particolari fini nutr	22.1	10.5	2.1	6.3	3.5	94.7	2982
19	Particolari fini nutr	27.5	16.4	3.1	8.4	3.2	94.3	3116
20	Particolari fini nutr	34.1	18.7	5.5	7.7	4.4	90.8	3510
	Media particolari fini nutr	27.5	15,6	2.8	7.1		93.6	3293
	Media estrusi	27	15.3	3.1	7.2		94.4	3323
21	BARF	39	49.7	0	5.7	6.8	36.6	3320
22	BARF	22.9	66.8	0	2.1	10.9	52.1	3260
	Media BARF	30.9	58.2	0	3.9		44.3	3290
23	Umido	52	26	2.6	11.9	4.3	19.2	673
24	Umido	38.7	22.5	4.3	9.6	4	18.6	633
25	Umido	22.9	13.7	2	5.9	3.8	21.8	769
	Media umido	37.8	20.7	2.9	9.1		19.8	691

Dalla Tabella 6 si evidenziano i seguenti risultati:

- La sostanza secca (SS), calcolata nelle diete a base di crocchette, ha valori simili in tutti i campioni analizzati. Tali valori vanno da un minimo del 90,8% nella dieta 20, che ha particolari fini nutrizionali, a un massimo del

97,7% nella dieta 12, che è a base di insetto. La media calcolata tra tutti i campioni di crocchette utilizzati è del 94,4%: valore atteso e in linea con la norma vigente (FEDIAF, 2021) e la letteratura (Hervera et al., 2007; Daumas, 2014; Biagi et al., 2016; Kazimierska et al., 2021).

La stessa considerazione vale per gli alimenti umidi, che hanno valori abbastanza simili tra loro, e sempre compresi nel range di definizione di quell'alimento: umidità superiore al 60% e in generale compresa tra il 60 e l'87% (FEDIAF, 2021; Hand et al., 2010).

I valori di SS delle diete BARF, riscontrati in studi precedenti (Kerr et al., 2012; Kerr et al., 2014; Algya et al., 2018), si attestano in media attorno al 30%, mentre nelle diete prese in esame, si trovano valori più elevati rispettivamente del 20% e del 67%. Sono stati presi in esame soltanto due campioni di BARF e, vista l'esiguità di tali diete, non si possono trarre conclusioni generali. Tuttavia questo dato può essere spiegato soltanto tenendo presente la diversità degli ingredienti e/o dei tagli che compongono le razioni. Infatti, a seconda dei tagli di carne o della fonte proteica impiegati si osserva un diverso apporto di proteine e di grassi e quindi della relativa SS. Ad esempio, Dillitzer et al., 2011, hanno constatato che le cosce di pollo apportano una PG compresa fra il 17 e il 19%, il manzo con l'osso dà il 19%, mentre con l'uso di manzo fresco si raggiunge il 23%. Sempre lo stesso studio ha trovato che la carne di bovino contiene una quantità di EE variabile a seconda del taglio: tra il 14% nei tagli magri e il 24% in quelli con osso; che la carne di maiale varia tra l'8% nei tagli magri e il 21% in quelli con osso; che nel pollo la percentuale di EE varia a seconda della parte anatomica utilizzata, con valori compresi tra il 7 e il 12 (Dillitzer et al., 2011).

Inoltre, in letteratura viene spesso utilizzato almeno di un carboidrato, oltre a carne di diversa specie (Kerr et al., 2012; Kerr et al., 2014; Algya et al., 2018). I carboidrati però sono del tutto assenti nelle diete in analisi, a base di sola carne e frattaglie.

Infine, mettendo a confronto i dati ottenuti per le BARF in questa tesi con i valori dell'alimento industriale umido, si osserva che, i primi hanno

valori di SS sempre superiori a quelli trovati nell'alimento commerciale. Ciò è probabilmente dovuto all'alto contenuto in grassi delle BARF, pari al doppio circa di quello contenuto nelle diete commerciali.

- La proteina grezza (PG) costituisce il nutriente più importante delle diete per animali, soprattutto di quelle destinate al cane, per il quale il fabbisogno minimo è del 18%, come prescritto dalle linee guida della FEDIAF (FEDIAF, 2021). Negli alimenti analizzati si evidenzia che il contenuto di proteina grezza è sempre superiore al 20%. In particolare i dati mostrano che le diete premium hanno un valore medio di PG pari al 28%, le super premium del 29,1%, quelle a base di insetto del 22,4%, le diete con particolari fini nutrizionali del 27,5%, le BARF del 31% e l'umido del 37,8%. Questo studio ha anche rilevato che nell'alimento estruso c'è una percentuale media di PG pari al 27%, paragonabile al valore medio trovato in letteratura, che va da un minimo di 15,8% a un massimo di 40,3% (Hervera et al., 2007; Daumas et al., 2014; Biagi et al., 2016; Kazimierska et al., 2021). Riguardo agli alimenti commerciali, si può ritenere che un range così ampio di contenuto in proteina sia correlabile al fatto che, per le aziende produttrici, non esistono obblighi di legge relativi alla formulazione della dieta, né ci sono indicazioni riguardanti i valori precisi di PG: ci sono soltanto indicazioni sui valori minimi (FEDIAF, 2021). Tutto ciò trova riscontro in letteratura dove si afferma che il pet food industriale può essere prodotto con una quantità di proteine variabili tra il 15 e il 60% della SS (Hand et al., 2010). Tuttavia, il range raccomandato per questo nutriente da somministrare ai cani adulti è del 15-30% e comunque non inferiore ai 26g (Case et al., 2010; Hand et al., 2010). E' poi da ricordare che un recente studio afferma che i cani alimentati per lungo tempo con diete ad alto contenuto proteico, possono incorrere in effetti negativi sul microbiota e sul profilo metabolico (Gebreselassie and Jewell, 2019).

Un buon contenuto di PG caratterizza tutte le diete analizzate, visto che sono sempre prevalentemente a base di carne e sottoprodotti (alimenti che apportano un notevole contributo di proteina) (Hand et al., 2010).

Uniche eccezioni da segnalare sono: la dieta 18, che contiene solo proteine di origine vegetale e che ha una percentuale di PG pari al 22,1% e le diete a base di insetto, che hanno valori ricompresi tra il 21,3% e il 23,5%.

Le diete vegetariane, in letteratura, hanno valori di proteina molto variabili e compresi in un range tra il 19,3% e il 40,3% (Kanakobo et al., 2015), range in cui sono comprese anche le diete prese in esame. Tali diete coprono i fabbisogni minimi di PG definiti dalle linee guida FEDIAF. Per poter dare un giudizio più approfondito sull'adeguatezza nutrizionale di tali formulazioni, andrebbero però analizzati i singoli nutrienti, che invece in questa tesi non sono stati presi in esame. Infatti, spesso queste diete sono risultate carenti in nutrienti essenziali quali gli aminoacidi o le vitamine (taurina, vitamina A, cobalamina o acido arachidonico) (Michel, 2006).

Le diete a base di insetto contengono una quantità di PG, min 18 e max 56%, simile a quelle a base di pollo o di pesce che ne contengono rispettivamente il 69 e il 71% (Bosh et al., 2014; Beynen, 2018; Penazzi et al., 2021). I dati sopra citati trovano conferma nei valori da noi individuati in questa tesi, anche se è opportuno considerare che gli studi condotti prendono in esame insetti o larve molto diversi fra loro, che quindi potrebbero avere un contenuto di proteina assai dissimile (Bosh et al., 2014; Beynen, 2018; Penazzi et al., 2021). I grilli ad esempio, hanno un contenuto più alto di proteina (70% su SS) rispetto alle tarme della farina (65%) o alle pupe di mosca soldato (52%) (Bosh et al., 2014). Come riportato per le diete vegetariane, anche in questo caso, i valori di PG trovati rispettano le raccomandazioni minime, per cui sarebbero necessarie ulteriori analisi relative ai singoli nutrienti sarebbero necessarie come riportato in letteratura da Bosh and Swanson, 2020 o Beynen, 2018. Le medie che si possono osservare nella Tabella 6 mostrano una grande variabilità. Specialmente le diete che hanno particolari fini nutrizionali evidenziando un range di valori compreso tra il 22,1 e il 34,1%.

Nelle BARF, invece, si rilevano valori del 22,9% nella dieta 22 e del 39% nella dieta 21, mentre negli umidi detti valori variano da un minimo di 22,9 a un massimo del 52%. Tali differenze sono spiegabili sia con lo scopo dietetico per cui sono state prodotte (prodotti con specifici fini dietetici), sia, le BARF o gli umidi, con la varietà degli ingredienti utilizzati (carne di pollo, di manzo o di coniglio, organi e frattaglie), sia per i diversi tagli che apportano una diversa quantità di proteine (Montegiove et al., 2022). Tutto ciò è confermato dai dati trovati in letteratura, nei quali si riscontra che le cosce di pollo apportano una PG compresa fra il 17% e il 19%, il manzo con l'osso ne apporta il 19%, mentre il manzo fresco raggiunge il 23% (Dillitzer et al., 2011).

- Il contenuto medio di grassi grezzi (EE) rilevato nelle diete prese in esame è superiore al 10%, con una media che è rispettivamente del 16,3%, 16,2%, 13,3%, 15,6%, 58,2% e 20,7% per le diete premium, super premium, a base di insetto, con particolari fini nutrizionali, BARF e umido. I valori di lipidi rilevati nelle crocchette e riportati in letteratura, vanno da un minimo del 6,3% a un massimo del 30,3% (Biagi et al., 2016; Kazimierska et al., 2021). Essi sono sovrapponibili a quelli indicati per le diete estruse analizzate in questo lavoro, che sono pari al 15,3%.

Il contenuto di grassi delle diete a base di insetto, risulta ridotto rispetto agli altri estrusi considerati e ciò dipende dal fatto che, a seconda dell'insetto impiegato nella formula (da un minimo del 13% per le larve di mosca soldato a un massimo del 34% delle tarme della farina) (Bosh et al., 2014), il contenuto di EE può variare molto, dal 12,8 al 39,6% della SS, come dimostrato in letteratura (Bosh et al., 2014; Bosh et al., 2016).

Rimane infine da commentare il contenuto di EE delle BARF. Queste diete sono caratterizzate da valori molto diversi tra loro e di gran lunga superiori, 49,7 e 66,8%, a quelli degli altri alimenti considerati. Infatti, in letteratura, si riscontrano valori lipidici, riferiti a diete crude, che vanno dai 20,5% (Kerr et al., 2012) e i 37,8 % (Kerr et al., 2014), molto inferiori a quello medio, (58,2%) che viene rilevato nelle diete prese in esame. Ciò trova ancora una volta giustificazione nei componenti che diversificano le diete: le

BARF sono composte da sola carne, alimento che è molto più ricco di grassi rispetto alla frutta, alla verdura e ai cereali, ingredienti di cui sono costituite, in buona parte, le diete descritte in letteratura (www.barfaustralia.com; Handl, 2014). Si conferma perciò che il contenuto in grassi è molto diverso, a seconda degli ingredienti o dei tagli di carni scelti per la composizione delle diete (Dillitzer et al., 2011). I tagli magri di bovino hanno un contenuto di EE pari al 14% e dell'8% nel maiale. I tagli con osso hanno un percentuale di grasso del 24% nella carne bovina e del 21% in quella di maiale (Dillitzer et al., 2011). Nel lungo periodo, questa caratteristica può dare sovrappeso e obesità, come già confermato da Freeman et al., 2013 il quale denuncia i rischi associati alle diete BARF (Freeman et al., 2013).

- Le ceneri sono costituite dalle sostanze inorganiche presenti in un alimento e costituiscono il residuo, che di esso resta, dopo l'incenerimento (Hand et al., 2010). Il valore delle ceneri grezze, quindi, rappresenta la quantità di minerali rimasti dopo la combustione, perché non digeriti dall'animale (Hand et al., 2010). Il contenuto medio di ceneri è quasi sempre inferiore al 10% (unica eccezione la dieta umida 23, che ha un valore di ceneri di quasi il 12%), dato confermato anche da altri studi presi in esame (Biagi et al., 2016; Kazimierska et al., 2021). Ciò può dovuto all'utilizzo di alimenti abbondanti in ossa che, nella produzione del pet food estruso, ne aumentano a il contenuto. I dati relativi alla presenza di sostanze inorganiche residue, nelle diete BARF, e riportati in letteratura (Dillitzer et al., 2011), indicano valori compresi tra il 3% e 5% negli avicoli e confermati dalla dieta 22 che è a base di pollo e di manzo. Se invece la dieta contiene manzo con osso si riscontra una quantità di ceneri che si attesta tra il 5% e il 10% visto il maggior contenuto in osso della razione (Dillitzer et al., 2011). Quest'ultimo dato trova conferma nella dieta 21 anch'essa contenente manzo.

Occorre però precisare che, il valore delle ceneri, considerato a sé stante, non è molto indicativo poiché è più importante considerare il rapporto proteine-ceneri (Hand et al., 2010). Se questo rapporto dà un risultato di

4/5, si può affermare che la proteina è di buona qualità e contiene meno ingredienti scadenti quali piume e ossa. Inoltre tale rapporto è un indice di digeribilità della proteina stessa (Hand et al., 2010). Al contrario, un valore inferiore a 4, indica scarsa qualità dell'alimento e potrebbe portare a un'eccessiva assunzione di fosforo o magnesio (Hand et al., 2010). Se ci si avvale di tale rapporto, si può osservare che tutte le diete premium hanno valori inferiori a 4. Esse infatti sono prodotti di qualità medio-bassa e di basso costo, che quindi potrebbero utilizzare fonti di proteine di una qualità inferiore a quelle usate per i prodotti commerciali appartenenti alla categoria super-premium.

Tuttavia, anche le diete n. 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, che appartengono a categorie super premium, a base di insetto o dietetiche hanno valori compresi tra 3 e 4, anche se tali prodotti vengono indicati come diete di alta qualità e dovrebbero contenere materie prime selezionate e scelte tra le migliori.

- La fibra grezza (FG) serve per dare texture alle crocchette e per il processo stesso dell'estrusione (Hand et al., 2010), ma una quantità esagerata della stessa può ridurre la digeribilità, poiché i cani non sono in grado di digerire questa frazione alimentare (Kazimierska et al., 2021). In questo caso, però, la FG si può considerare trascurabile, visto che tale contenuto è assente nelle diete (BARF) o sempre inferiore al 5,5% sulla SS nelle altre diete.
- L'energia metabolizzabile (EM) costituisce uno dei modi più accurati per esprimere la densità energetica dell'alimento (FEDIAF, 2021). La EM di un alimento secco può variare da 2800 a 4800 Kcal/kg, mentre quello delle diete umide va da 700 a 1000 Kcal/kg (Butterwick, 2021). Le medie dei valori riportati nella Tabella 6 sono sempre comprese in questo range quando si tratta di alimenti estrusi dove EM è compresa tra un minimo di 3080 Kcal/kg per le diete a base di insetto e un massimo di 3798 Kcal/kg per le diete super premium. Al contrario, le diete umide, che hanno notoriamente un ridotto contenuto energetico causato dalla diluizione con

acqua (Kallfelz, 1989; Hand et al., 2010), fanno registrare un valore medio di 691 Kcal/kg.

La media delle diete premium e delle super premium mostrano valori paragonabili a quelle presenti in letteratura, dove le prime si attestano su 3300 Kcal/kg e le seconde su 3900-4000 Kcal/kg (Daumas et al., 2014). La media calcolata per le diete super premium e quelle con particolari fini nutrizionali nasconde una forte variabilità dovuta al diverso contenuto di grassi e alla diversa composizione, in termini di ingredienti utilizzati. Le super premium vanno da un minimo di 3027 Kcal/kg nella dieta 9 a base di pesce, a 4020 Kcal/kg nella dieta 6 a base di agnello; le diete con particolari fini nutrizionali, in particolare quelle che hanno subito lo stesso trattamento tecnologico, l'estrusione, vanno dalle 2982 Kcal/kg per la dieta 18, idrolizzato vegetale, a 3893 Kcal/kg per la dieta 15, idrolizzato al pollo. Invece, le diete a base di insetto hanno fatto registrare un valore medio inferiore a quanto reperito in letteratura, dove tali alimenti hanno un contenuto energetico pari a 3926 Kcal/kg (Penazzi et al., 2021). Quanto riportato potrebbe essere dovuto al diverso tipo di insetti impiegati o al diverso livello di inclusione, dovuto al diverso contenuto di grasso degli insetti utilizzati (Bosh et al., 2014). Infine, i valori riferiti alle BARF analizzate da questo studio, sono comparabili con quelli delle diete industriali estruse, ma sono molto diversi da quanto riscontrato in letteratura, dove la EM si attesta tra 2150 e 4100 Kcal/kg (Kerr et al., 2011; Algya et al., 2018), per il diverso contenuto in grasso degli ingredienti e dei tagli usati. L'alto risultato riportato in Tabella 6 non sorprende poiché è noto l'elevato valore energetico di dette diete che possono favorire l'insorgenza di sovrappeso e obesità in soggetti che generalmente vivono in casa e che fanno ridotta attività fisica (Feeman et al., 2013).

3.2.2 DIGERIBILITÀ *IN VITRO* (IVD)

3.2.2.1 IVD DELLA SOSTANZA SECCA (SS)

L'analisi dei campioni ricavati da diete industriali, ha permesso di misurare, con il metodo *in vitro*, il valore della digeribilità corrispondente alla dieta testata.

I risultati ottenuti sono riportati in Figura 12.

Figura 12. Digeribilità *in vitro* (IVD) della sostanza secca dei campioni.

Come si può osservare nella Figura 12, i dati di digeribilità della sostanza secca, esemplificati nell'ambito delle diete esaminate, indicano buoni valori di digeribilità. Essi sono sempre superiore all'80%, ad eccezione della dieta premium numero 1, che si attesta al 76%. Detti valori però non sono distribuiti in modo omogeneo, intorno alla media, tranne che nelle diete umide, nelle diete BARF o in quelle a base di insetto. Ciò dimostra che le diete prese in considerazione, pur appartenendo alla stessa categoria commerciale, hanno l'IVD della sostanza secca molto diversa l'una dall'altra. Probabilmente tali differenze sono spiegabili per la diversa composizione delle diete sia in termini di ingredienti scelti sia in base alla qualità delle materie prime utilizzate (Kallfelz, 1989; Daumas et al., 2014). Ad esempio, il pollo è risultato essere più digeribile del manzo (Zentek et al., 2004), o ancora materie prime di migliore qualità sono

più digeribili di ossa e sottoprodotti (Kallfelz, 1989). Ciò è graficamente evidenziato nei box plot, dove la media e la mediana di tutti i campioni di crocchette non coincidono e la distribuzione dei dati non è simmetrica.

I valori di digeribilità più bassi si riscontrano nelle crocchette premium, anche se, in questo caso, valori medi (85,5%) non si discostano molto da quelli delle super premium (86,2%) e si hanno dati molto simili alla media di digeribilità trovata nei gruppi insetto (85,7%) o umido (83,5%).

Le diete industriali prese in esame mostrano una digeribilità (85,5% e 86,2% crocchette premium e super premium) in linea con i dati riportati in letteratura. I dati ottenuti con prove in vitro e in vivo sono ricompresi in un ampio range con valori che stanno tra il 70,5% (Biagi et al., 2016) e il 75,2-85,1% di altri autori (Dust et al., 2005; Yamka et al., 2006; Vhile et al., 2007; Hervera et al., 2007; Guevara et al., 2008; Barry et al., 2009; Dobenecker et al., 2010; Brambillasca et al., 2010; Hendriks et al., 2013; Daumas et al., 2014; Menniti et al., 2014; Algya et al., 2018).

I valori di digeribilità trovati negli alimenti a base di insetto però, non si discostano dai valori trovati in letteratura dove Bosh et al., 2014 e Beynen, 2018 indicano una IVD della SS compresa tra il 77 e il 91,5% (Bosh et al., 2014; Beynen, 2018). Tale ampio range viene spiegato dalla variabilità degli insetti inseriti nell'alimento (IVD della mosca domestica 83% vs tarme della farina 91%) e poi dalla fase evolutiva in cui si trova l'insetto stesso (larva di mosca soldato 84% vs pupa 68%) (Bosh et al., 2014; Bosh et al., 2016). Inoltre studi *in vivo* trovano un valore di digeribilità pari all'82-83% (Penazzi et al., 2021), comparabile con quello qui rilevato. Dal confronto tra i dati ottenuti in vivo e in vitro infine, sembra che il processo di estrusione aumenti la digeribilità anche del prodotto a base di insetto (Ottoboni et al., 2017).

A seguito di quanto fin qui osservato, non stupisce trovare nelle diete che si pongono particolari fini nutrizionali un valore medio di IVD che si attesta attorno al 89,5% e raggiunge un massimo del 92 e 97% nelle diete 15 e 18, diete ipoallergeniche, e nelle diete BARF. Nel primo caso, l'alta digeribilità è data proprio dal particolare processo di idrolisi a cui le diete sono state sottoposte,

processo che determina una maggiore digeribilità dei nutrienti e quindi anche della SS (Murray et al., 2004; Perez-Navarete et al., 2007).

Nel secondo caso, invece, l'alta digeribilità è legata alla mancata cottura degli alimenti, la quale permette sia di mantenere attivi tutti gli enzimi presenti nell'alimento, sia di non andare incontro a denaturazione delle proteine, la proteolisi, la perdita della struttura proteica secondaria e terziaria, reazioni proteine-polifenoli, reazioni ossidative o di Maillard che possono alterare la biodisponibilità di alcuni elementi (Friedman, 1996). Sembra perciò che le diete BARF abbiano una digeribilità maggiore, rispetto agli alimenti industriali (Algya et al., 2018). I dati relativi alle diete crude sono sovrapponibili ai valori rilevati in un altro studio, dove, la digeribilità media indicata è pari all'85,9% (dati non pubblicati, Rovere et al., 2022) e ad altri dati della letteratura dove, *in vivo*, la IVD della SS era pari all'83,6-84,1% (Algya et al., 2018).

3.2.2.1 IVD DELLA PROTEINA GREZZA (PG)

I campioni delle diete industriali e delle BARF presi in esame, sono stati anche analizzati riguardo alla digeribilità della proteina grezza. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 13.

Figura 13. Digeribilità in vitro (IVD) della sostanza secca dei campioni

Come si può osservare, i dati ottenuti analizzando le diete estruse industriali mostrano una digeribilità della proteina superiore al 70% con valori medi del 78,3% per le diete premium, 76,7% per le super premium, 75,3% per l'insetto, 80% per le diete con particolari fini nutrizionali e valori compresi tra il 74,4% della dieta n.3 (premium) e l'85,9% della dieta n. 18 (particolari fini nutrizionali).

La digeribilità di PG per l'alimento estruso, trovata in questo studio, rientra nei range reperibili in letteratura: valori in vitro pari a 84,6% (Biagi et al., 2016) o compresi tra 75,7 e 95,4 a seconda del metodo usato (Hervera et al., 2007) e valori in vivo sono compresi tra il 75,2 e il 94,6% (Dust et al., 2005; Yamka et al., 2006; Vhile et al., 2007; Hervera et al., 2007; Guevara et al., 2008; Barry et al., 2009; Dobenecker et al., 2010; Brambillasca et al., 2010; Hendriks et al., 2013; Daumas et al., 2014; Menniti et al., 2014; Algya et al., 2018).

I dati sopra indicati non risultano però distribuiti, in modo omogeneo, intorno alla media. Infatti, come mostrato dai box plot, la media e la mediana in tutti i campioni di crocchette, non coincidono e la distribuzione dei dati non è simmetrica. Anche

in questo caso, ciò sta a dimostrare che anche prodotti appartenenti alla stessa categoria commerciale hanno una forte variabilità tra loro.

Infatti, mentre nelle diete premium si riscontra una media di IVD di 78,3%, poi si va dal valore minimo del 74,4% della dieta 3, al massimo diell'82% della dieta 1: con un valore minimo del 72,3%, superiore a quanto è stato possibile trovare, in vivo, per la stessa tipologia di dieta, (Daumas et al., 2014).

Una situazione analoga si ripresenta anche per la tipologia super premium, dove la media nasconde un forte range di variabilità, min 69% dieta 6 e massimo 80,3% dieta 9. Ciò può portare ad affermare che, alcuni alimenti, pur appartenendo a categorie commerciali di fascia alta, contengono proteine poco digeribili, come ossa o piume e sottoprodotti della macellazione scadenti (Daumas et al., 2014). Ne consegue che i valori trovati in vivo, per la stessa categoria, risultano avere una digeribilità maggiore 79,6-80,8 (Daumas et al., 2014).

La stessa situazione è stata riscontrata in diete preparate con particolari fini nutrizionali: le diete 15 e 18, ad esempio, hanno valori di digeribilità simili tra loro, rispettivamente 85,7 e 85,9%, ma molto superiori a quelli di altre diete della stessa categoria commerciale come ad esempio 74,4% della dieta 20. Quanto appena riportato, trova una giustificazione nel fatto che in questa categoria sono compresi alimenti idrolizzati (vedi il caso delle due diete sopra citate) che, quindi, risultano avere, proprio per le loro caratteristiche produttive, una digeribilità di PG molto elevata poiché devono dare una risposta alle situazioni cliniche per cui sono stati ideati (Cave, 2006) . Al contrario, prodotti monoproteici, utili per il trattamento delle intolleranze e che hanno subito solamente un processo di estrusione, non hanno valori di IVD così elevati.

Situazione ancora diversa è quella delle diete a base d'insetto, dove la differenza di digeribilità è molto conclamata, min 68,4% e max 93,8%. Questa enorme differenza osservata si può solo spiegare con le diverse fonti proteiche a cui si è attinto visto il loro diverso contenuto in chitina, che modifica la digeribilità (Penazzi et al., 2021). Penazzi et al., 2021 affermano che il diverso contenuto di chitina delle varie specie di insetto, che viene conteggiata tra le fibre, influenza in modo negativo la digeribilità della dieta.

Infatti, come dimostrato in letteratura, i valori di digeribilità risultano molto diversi, min 73,4% e max 93,3, a seconda dell'età dell'insetto (90% larva di mosca soldato vs 78% pupa), della specie (91% nelle larve della farina vs 84% della mosca domestica) oppure in rapporto con la percentuale di inclusione (Bosh et al., 2014; 2016; Beynen et al., 2018; Bosh and Swanson, 2020; Penazzi et al., 2021).

Forti differenze tra i campioni analizzati, con valori che si discostano dalla media dell'86,3%, si riscontrano anche per l'umido industriale. La dieta 23, infatti, mostra un valore di IVD pari al 78,6% del tutto simile a quanto trovato per gli estrusi, al contrario di ciò che si rileva in letteratura dove il processo di estrusione tende a far aumentare la digeribilità delle proteine (Algya et al., 2018). La dieta 25 invece ha una digeribilità del 94%, dato perfettamente sovrapponibile a quanto trovato per le BARF. Sembra però opportuno sottolineare che queste considerazioni hanno un valore impatto vista la scarsità del campione considerato.

In queste ultime, la digeribilità è pari al 94%, valore simile a quello riscontrato in un recente studio, nel quale la digeribilità media calcolata, si attesta al 93,4% (dati non pubblicati, Rovere et al., 2022) ed è leggermente inferiore a quanto trovato *in vivo*, pari a 88,3-92% (Algya et al., 2018).

3.3 CONCLUSIONI

Il confronto fra i valori di SS, PG, EE, FG e ceneri rilevati in questo studio e le linee guida FEDIAF, dimostra chiaramente che, tutte le formulazioni prese in esame sono in linea con le raccomandazioni proposte. Tali raccomandazioni richiedono, infatti, che ci sia in ogni dieta un contenuto minimo di proteina grezza pari al 18% di SS per 1000 kcal di energia metabolizzabile (EM) e un minimo di lipidi grezzi pari al 5,5% (FEDIAF, 2021). In questa tesi è stato accertato che quasi tutti i pet food industriali hanno valori di PG e EE superiori al minimo richiesto (Kallfelz, 1989).

Organi internazionali, come FEDIAF o AAFCO, pubblicano ogni anno le *Nutritional Guidelines*, in cui vengono esplicitati i fabbisogni minimi e massimi di ogni nutriente in relazione all'età e agli stadi fisiologici di ogni animale. In particolare, le linee guida nutrizionali FEDIAF, che sono state utilizzate come riferimento, forniscono raccomandazioni essenziali, sia per quanto riguarda i livelli minimi sia per i livelli massimi dei nutrienti, che devono essere presenti in ogni alimento destinato ai *pet*. Occorre precisare che i livelli minimi includono un margine di sicurezza per prevenire le carenze dovute alle variazioni individuali di ogni animale o alle eventuali interazioni tra i diversi nutrienti mentre i livelli massimi sono basati sui limiti legali definiti dall'UE o sui livelli considerati nutrizionalmente sicuri, ottenuti dai dati di ricerca (FEDIAF, 2021). È ancora da ricordare che, dalle suddette linee guida però, sono esclusi i *pet food* che hanno scopi nutrizionali particolari o alimenti dietetici, i quali possono avere livelli di nutrienti diversi da quelli normalmente suggeriti. Ciò consente di garantire a cani e gatti l'assunzione di mangimi sicuri e adeguati alle loro necessità (Alvarenga et al., 2018; Meineri et al., 2019; Kazimierska et al., 2021).

L'obiettivo delle aziende di *pet food* diventa pertanto quello di fornire con la dieta i nutrienti corrispondenti alle esigenze specifiche dell'animale, in rapporto al suo stadio fisiologico (Hand et al., 2010), o alle diverse fasi di vita (Fahey et al., 2008). L'approccio *in vitro*, metodo scelto per il calcolo della digeribilità, nonostante qualche limite evidenziato, ha il vantaggio di escludere tutte le possibili interferenze: specie, razza, categoria, età, individuo e livello di ingestione, proprie di ogni animale letteratura. Quindi, poiché si tratta di un protocollo standardizzato, si evince che la variabilità riscontrata può soltanto essere determinata dalle caratteristiche dell'alimento analizzato, a partire da: composizione chimica, trattamenti fisico-chimici degli alimenti, tempo di contatto con gli enzimi, quantità e qualità di fibre e di proteine, aggiunta di microelementi o effetti associativi (Antongiovanni, 1998).

Inoltre, con questo studio, si è voluto valutare un protocollo di digeribilità *in vitro*, da utilizzare per la stima della digeribilità, in diete industriali, sia estruse che umide, e in diete BARF destinate all'alimentazione del cane adulto in mantenimento.

Dai risultati ottenuti, si evince che le diete considerate nella presente indagine hanno tutte una buona digeribilità, con valori relativi alla SS superiori all'80% e alla PG superiori al 75%.

Il protocollo *in vitro* utilizzato è risultato avere, nello studio di Hervera et al., 2007 sulla digeribilità di crocchette, un buon indice di correlazione (r^2), pari a 0,92, tra la digeribilità di PG calcolata *in vitro* e *in vivo*.

Per questo il metodo scelto, che prevede la digestione dei campioni in due step, e che mima *in vitro* la digestione gastrica del cane, risulta essere una buona scelta per la determinazione della digeribilità *in vitro* della PG. Si tratta, infatti, di un metodo per la determinazione del valore di digeribilità della proteina grezza per il suino, ideato nel 1995 da Boisen e Fernandez, il quale, in questo caso, è stata adattato al cane, sfruttando le analogie del tratto gastro-intestinale di questi due monogastrici e le analogie con le caratteristiche delle diete da loro impiegate. Infatti, gli autori sopra citati hanno adattato la metodica a diete ad alto contenuto proteico contenenti carne, farina di ossa e latte, mentre altri autori l'hanno adattata alle analisi effettuate *in vitro*, su crocchette per cani (Hervera et al., 2007; Bosh et al., 2016).

Un'ultima riflessione poi, va fatta rispetto alla necessità di condurre ulteriori approfondimenti con prove di digeribilità *in vitro*, poiché, soltanto con un adeguato data set sarà possibile, in futuro, stabilire quanto il protocollo preso in esame sia in grado di mimare, *in vivo*, la digeribilità apparente nel cane. Inoltre, per validare questo metodo sarebbe necessario condurre in concomitanza due prova di digeribilità, *in vivo* e *in vitro*, così da poter verificare il coefficiente di correlazione, anche nel caso di diete molto diverse tra loro. Ci si aspetterebbero dei valori leggermente superiori *in vitro* visto che tale metodica tende a sovrastimare i valori calcolati (Hervera et al., 2007). Ciò è dovuto al fatto che tutte le componenti solubili del campione si assumono essere potenzialmente digeribili e assorbibili *in vivo* (Hervera et al., 2007).

Infine sarebbe utile valutare eventuali differenze ottenute riducendo i tempi di esposizione all'azione enzimatica, come è stato fatto da altri autori (Hervera et al., 2007; Bosh et al., 2016) per adattarsi meglio alla fisiologia digestiva del cane (Wyse et al., 2003).

La scarsa numerosità di alcune categorie di campione (BARF e umido industriale) che non ha permesso di trarre conclusioni generali sull'argomento ha costituito limite principale di questo studio

CAPITOLO 4

Integrazione di lievito vivo *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* nella dieta di cagne e relativi cuccioli: digeribilità e benessere intestinale

4.1 MATERIALI E METODI

4.1.1 ANIMALI

Nel presente studio sono stati considerati 36 cagne, di taglia medio-grande, appartenenti a diverse razze (n=8 Golden Retriever, n=6 Labrador Retriever, n=8 Australian Sheperd, n=1 Dalmata, n=1 Boxer, n=3 Pastore Svizzero, n=1 Pastore Tedesco, n=2 Montagne des Pirenee, n=6 Bovaro del Bernese), di età compresa tra 1 e 6 anni con un peso corporeo medio di $30 \pm 5,2$ kg ciascuna. Le cagne sono state osservate singolarmente, per circa 60 ± 5 giorni prima del parto (60 ± 5 giorni post ovulazione) e poi osservate per 56 giorni dopo il parto, insieme ai loro cuccioli. Dalle 36 madri considerate, sono nati 285 cuccioli, con una media di 7.9 cuccioli per madre. Tuttavia, ai fini sperimentali si sono considerati 221 cuccioli per la determinazione di feed intake, peso, fecal score, e contenuto in sostanza secca delle feci. Il dettaglio su numero madri e cuccioli è riportato in Tabella 7.

Tabella 7. Dettaglio su madri e cuccioli considerati nello studio.

Animali					
	Cagne	Cuccioli			
		Nati (T0)	Vivi un giorno dopo il parto (T1)	Vivi 21 giorni dopo il parto (T21)	Vivi 56 giorni dopo il parto (T56)
Numero totale	36	285	254	229	221

Il presente studio è stato condotto in un allevamento privato di cani, sito nel Nord della Francia, in collaborazione con *l'Ecole Nationale Veterinarie de Toulouse*.

4.1.2 DIETA, TRATTAMENTI E CAMPIONAMENTI

Le cagne sono state alimentate, dal 28° giorno post ovulazione e per tutto l'allattamento e lo svezzamento, con una dieta commerciale estrusa, specifica per madri in allattamento e cuccioli.

I cuccioli sono stati svezzati con il medesimo alimento materno e hanno mantenuto tale alimentazione, fino al termine della prova.

Il mangime somministrato era composto da: proteina di pollo disidratata (30%), mais, grano, riso (15%), grasso di pollo, idrolizzato proteico, polpa di barbabietola, glutine di mais, minerali, olio di pesce.

La quantità di alimento che ciascun cane ha ricevuto giornalmente è stata calcolata individualmente sulla base dei fabbisogni energetici dell'animale, secondo le seguenti equazioni (NRC, 2006):

- Cagne fino a 4 cuccioli

$$EM \text{ (kcal/die)} = 145 \text{ kcal/kg PV}^{0,75} + 24n \times \text{kg PV} \times L$$

oppure

- Cagne fino a 8 cuccioli

$$EM \text{ (kcal/die)} = 145 \text{ kcal/kg PV}^{0,75} + (96+12n) \times \text{kg PV} \times L$$

dove PV corrisponde al peso vivo dell'animale, n è il numero di cuccioli e L rappresenta la costante di lattazione pari a 0,75/ 0,95/ 1,1/ 1,2 nelle diverse settimane di lattazione.

Per tutta la durata della prova (60 giorni preparto + 56 giorni *post-partum*/svezzamento), le cagne sono state tenute stabulate singolarmente in gabbie parto (per 60 giorni prima del parto e per 30 giorni *post-partum*) e poi, in gabbie svezzamento (dai 30 ai 56 giorni *post-partum*).

Per lo studio, tutte le cagne, dal 28° giorno post ovulazione fino alla fine della lattazione (56 giorni *post-partum*), sono state suddivise in due gruppi:

- Gruppo Trattato (Yeast-supplemented, Y): tutti gli appartenenti al gruppo trattato hanno ricevuto la dieta di mantenimento che era stata integrata con capsule gastrointestinali contenenti *S. cerevisiae var boulardi cncm i-1079* vivo in quantità pari a 0,1 g e maltodestrine.
- Gruppo Controllo (C): tutti gli appartenenti al gruppo controllo hanno ricevuto la dieta di mantenimento, con l'aggiunta di capsule gastroresistenti, contenenti solo maltodestrine.

I cuccioli sono stati tenuti stabulati per i 56 giorni post partum nello stesso box materno e sono stati assegnati al medesimo gruppo della madre (Y o C).

I dati utilizzati in questa tesi riguardano soltanto il periodo *post-partum*, ossia il periodo che va dal giorno T1 al T56, e cioè dal primo giorno post parto (T1) al termine della lattazione (T56), giorno in cui i cuccioli venivano messi in vendita. Infatti, l'obiettivo dello studio era quello di determinare gli effetti del lievito proprio in tale periodo (Figura 14).

Durante i 56 giorni *post-partum*/svezzamento, sono stati eseguiti rilevamenti e prelievi da destinare a successive analisi. Sono stati misurati il peso, il feed intake e il fecal score, sono stati prelevati campioni di mangime e campioni di feci per la determinazione della sostanza secca fecale, della digeribilità apparente totale e dell'odore fecale. Sono stati anche eseguiti tamponi rettali destinati alla ricerca di patogeni e alla caratterizzazione del microbiota intestinale (Figura 14) sia sulle madri che sui cuccioli nel rispetto del benessere animale (secondo quanto approvato dall'Organismo Preposto al Benessere Animale dell'Università di Tolosa). Tuttavia, ulteriori campionamenti eseguiti (tamponi cutanei, vaginali e ambientali, prelievi ematici, urinari e del colostro/latte etc) (Figura 14) non sono stati presi in esame per questa tesi.

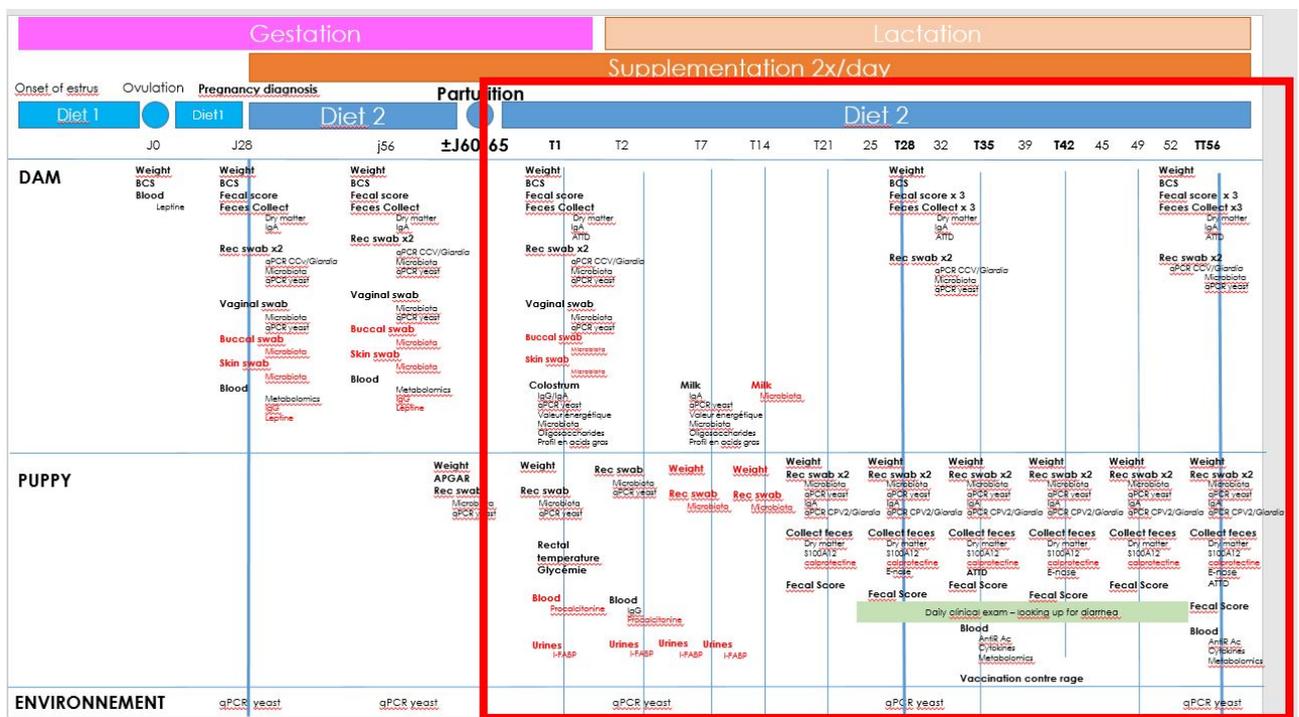


Figura 14. Descrizione di tutti i campionamenti eseguiti durante la prova.

Per le madri sono stati misurati il peso (T1, T28 e T56), il feed intake (nelle settimane da 1 a 9) e il fecal score (T1, T28 e T56), mentre per i loro cuccioli sono state eseguite le stesse misurazioni in tempi diversi: peso (T1, T7, T14, T21, T28, T35, T42, T49 e T56), feed intake (nelle settimane da 4 a 9) e fecal score (T28, T42 e T56).

Il campionamento delle feci per la determinazione di ATTD è stato eseguito su tutte le 36 cagne in 3 tempi (T1, T28 e T56); per i cuccioli invece sono stati fatti pool di gabbia, che comprendevano tutti i nati della stessa cucciolata e che sono stati eseguiti in 2 time point (T35 e T56).

La misurazione della sostanza secca è stata effettuata su tutte le feci delle madri e dei cuccioli, rispettivamente in 3 tempi per le madri (T1, T28 e T56) e 2 tempi per i cuccioli (T28 e T56).

Le analisi con l'E-nose sono state eseguite in 3 tempi (T28, T42 e T56), sulle feci di 108 cuccioli, scelti in modo randomizzato (3 per ogni cucciolata, di cui 54 assegnati al gruppo trattato e 54 al gruppo controllo).

Infine, sono stati eseguiti tamponi rettali, per la ricerca di patogeni, su tutte le 36 femmine, al T28 e T56 e, per motivi di costi, soltanto su 55 cuccioli (di cui 27 appartenenti al gruppo trattato e 28 appartenente al gruppo controllo), scelti in modo randomizzato, al T35 e T56.

La determinazione del microbiota è stata effettuata su tutte le madri a 3 time point (T1, T28 e T56).

4.1.2.1 ANALISI DEI MANGIMI

Un campione del mangime è stato conservato a +5°C, fino al momento delle analisi.

Sul campione di alimento è stata effettuata un'opportuna miscelazione e una adeguata omogeneizzazione allo scopo di renderlo idoneo alle analisi. In seguito,

sono state condotte analisi chimiche al fine di valutarne la composizione in sostanza secca (SS), proteina grezza (PG), fibra grezza (FG), estratto etereo (EE) e ceneri, come stabilito dall' *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e dal Regolamento della Commissione Europea del 2009.

4.1.3 PARAMETRI INVESTIGATI

Le cagne sono state pesate al giorno 1 (T1), al giorno 28 (T28), al giorno 56 (T56), con una bilancia veterinaria mobile (GIMA, 27259), posizionata fuori dai box. I cuccioli invece sono stati pesati settimanalmente con una bilancia pesa neonati.

La quantità di alimento assunto o feed intake, rappresenta la quota di alimento consumato dall'animale in un determinato periodo di tempo ed è stata calcolata secondo l'equazione:

$$FI \text{ (g/die)} = \text{g di alimento somministrato} - \text{g di alimento residuo nella ciotola}$$

Dai valori trovati giornalmente è poi stata ricavata la media settimanale.

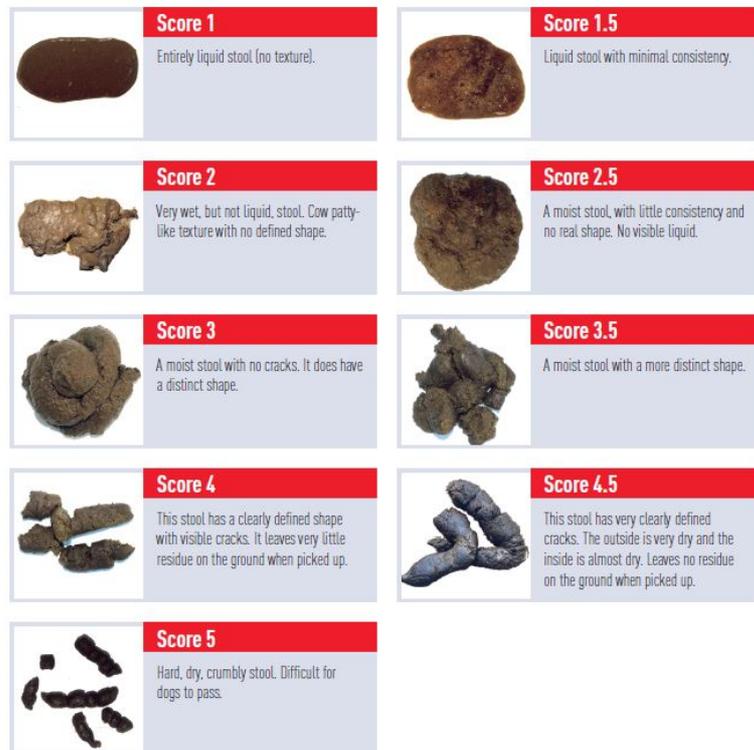
4.1.4 FECAL SCORE

Il fecal score è stato determinato singolarmente, osservando le feci all'interno del box, in tre tempi per madri (T1, T28 e T56) e tre tempi per i cuccioli (T28, T42 e T56).

Per motivi logistici, non è stato possibile far determinare il fecal score sempre dallo stesso operatore. Di conseguenza, poiché ogni operatore può percepire in modo differente la consistenza fecale (dato soggetto al giudizio dell'operatore), tale dato può aver subito un *bias* di rilevamento.

Il fecal score è stato analizzato secondo la scala proposta da Royal Canin. La scala proposta per le mamme ha uno score che va da 1 a 5, dove 1 si riferisce a feci non formate e molto liquide, mentre 5 a feci formate, molto secche/disidratate, per entrambe le categorie, mentre la scala proposta per i

cuccioli ha uno score che va da 1 a 13, dove 1 sono feci molto liquide e quindi, non formate e 13 invece feci formate e molto dure e disidratate (Figura 15 A e B).



A

Figura 15A. Fecal scoring system proposto da Royal Canin per cani adulti, dove 1 rappresenta feci liquide, mentre 5 feci secche.

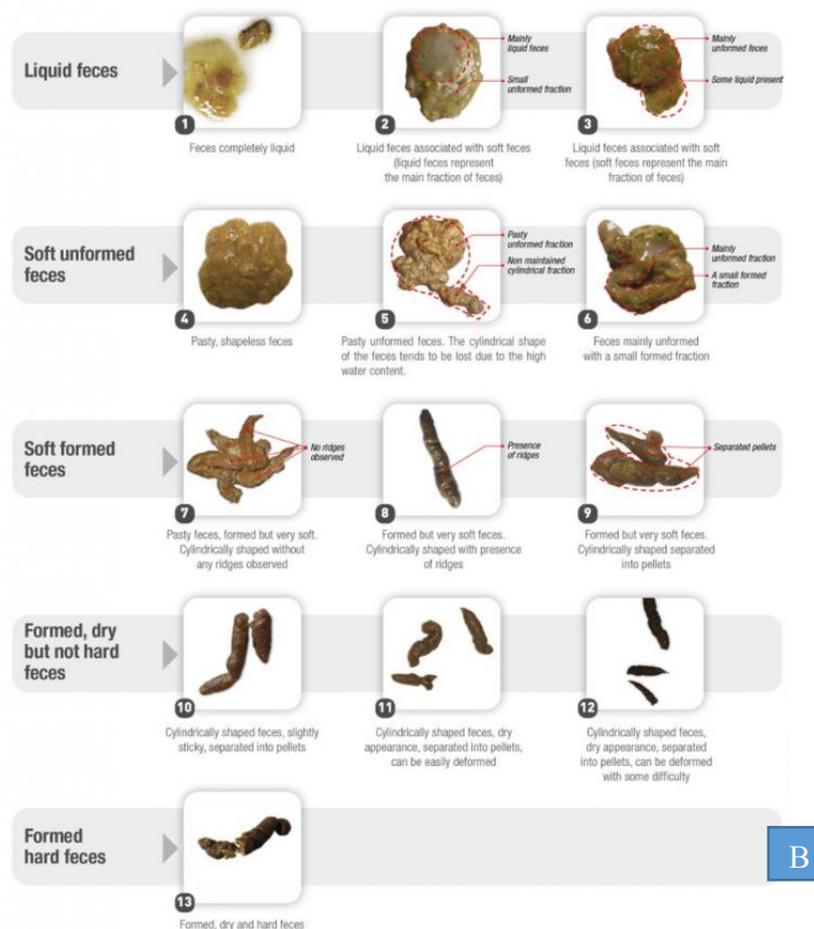


Figura 15B. Fecal scoring system proposto da Royal Canin per i cuccioli, dove 1 rappresenta feci liquide, mentre 13 feci secche.

4.1.5 SOSTANZA SECCA (SS) DELLE FECI

I campioni fecali di tutti i soggetti, 36 madri e 221 cuccioli, sono stati raccolti in tre tempi, rispettivamente T1, T28 e T56 per le madri e T28, T42 e T56 per i cuccioli, in appositi contenitori non sterili, e mantenuti congelati a temperatura di -20°C o -80°C , fino al momento delle analisi.

La determinazione della sostanza secca nelle feci è stata condotta secondo il Regolamento n. 152/2009 (UE, 2009), misurando la differenza tra il peso del campione, prima e dopo l'essiccazione in stufa. Infatti, il campione, pesato (30g),

identificato e posto in apposito crogiolo, viene essiccato in stufa a 65°C per 96 ore e poi ripesato.

In questo modo, viene determinato il valore della sostanza secca, calcolato come differenza percentuale tra il peso del campione, prima dell'essiccazione, e il peso dello stesso campione, dopo l'essiccazione. La formula utilizzata nel caso è la seguente:

$$SS\% = 100 - \frac{\text{peso del crogiolo con il prodotto dopo essicamento} - \text{peso del crogiolo vuoto}}{\text{peso del crogiolo con il prodotto prima dell'essicamento} - \text{peso del crogiolo vuoto}} \times 100$$

4.1.6 DIGERIBILITÀ APPARENTE TOTALE (ATTD)

La digeribilità apparente totale (ATTD) è stata determinata con il metodo delle ceneri acido insolubili (AIA) in 36 madri a 3 time point (T1, T28 e T56) e in 36 cucciolate (pool di gabbia) a 2 time point (T35 e T56), poiché risulta essere uno dei marker interni più comunemente utilizzati negli studi di digeribilità. Si tratta di un metodo impiegato per diverse specie zootecniche che ha fornito risultati alquanto soddisfacenti in qualità di indicatori da impiegare negli studi sulla digeribilità degli alimenti. In letteratura sono reperibili numerose valutazioni attinenti all'affidabilità di tale tecnica, effettuate mediante confronto con il metodo convenzionale della raccolta totale delle feci (Block et al., 1981; Thonney et al., 1979; van Keulen and Young, 1977). Le AIA sono state utilizzate con buoni risultati per il cane in diversi studi (Lôbo et al., 2001; Alvarenga et al., 2019). La ATTD è stata determinata per le madri e per i cuccioli a 56gg (in presenza alimentazione solida). I dettagli della metodica impiegata sono di riseguito riportati.

Il metodo analitico originale di Shrivastava and Talapatra (1962), adattato in seguito da Vogtmann et al nel 1975, prevede di quantificare la componente minerale indigerita, principalmente la silice, mediante l'uso di HCl concentrato e seguito da incenerimento a 650°C (Shrivastava and Talapatra, 1962; Sales and Janssens, 2003). Questo metodo ha reso possibile la stima dei coefficienti di digeribilità apparente totale (apparent total tract digestibility – ATTD) della

sostanza secca, sia sui campioni fecali che sui campioni di alimento precedentemente raccolti, con le seguenti modalità:

1. le feci, congelate a -20°C , sono state pesate (5g di campione) ed essiccate per una notte a 550°C , fino all'incenerimento; le feci dei cuccioli sono state messe in pool per le analisi e non è stata considerata singolarmente;
2. le ceneri ottenute (Figura 16a) sono state trasferite in un becker con 100 ml di HCl, fatte bollire per 5 minuti (Figura 16b), filtrate con filtri di carta (Whatman n. 41) e lavate con acqua distillata bollente (Figura 16c);
3. i filtri contenenti il materiale residuo sono stati inseriti in crogioli e fatti essiccare per una notte a 550°C (Figura 16d);
4. i crogioli contenenti i filtri sono stati pesati e la percentuale di AIA è stata calcolata con la seguente equazione:

$$[(W_f - W_e)/W_s] \times 100$$

dove W_f è il peso del crogiolo con le ceneri, W_e è il peso del crogiolo vuoto e W_s è il peso della sostanza secca del campione.

5. la digeribilità apparente totale (ATTD) è stata calcolata come di seguito indicato:

$$[A - (B/C \times 100)]/A \times 100$$

dove A è la percentuale di AIA delle feci, B sono le AIA del mangime, C è la SS del mangime.



Figura 16a. Crogiolo con feci incenerite in muffola.



Figura 16b. Composto di ceneri e HCl in ebollizione.



Figura 16c. Filtraggio delle ceneri acido insolubili.



Figura 16d. Crogioli con filtro e contenuto di ceneri.

4.1.7 REAL-TIME PCR SULLE FECI, PER ISOLARE *GIARDIA SPP.* E CORONAVIRUS CANINO (CCV)

La vita degli animali in allevamento è spesso collegata alla presenza di patogeni gastro-intestinali, principalmente *Giardia spp.*, Coronavirus Canino (CCV) e Parvovirus canino di tipo 2 (CPV2) (Grellet et al., 2014a). Ad esempio, *Giardia spp.* ha una prevalenza doppia fra gli animali che vivono in regime di allevamento, rispetto a quelli che vivono in casa ed è 3,5 volte più diffusa, negli allevamenti di grande dimensione (quindi quelli con più di 30 cuccioli/anno) rispetto a quelli più piccoli (Grellet et al., 2018).

Questi patogeni alterano le caratteristiche delle feci, possono ridurre il peso e la crescita del soggetto e ne peggiorano la qualità di vita.

Per questo, risulta opportuno eseguire test di controllo tenendo presente che il limite di rilevamento di un test, detto anche LOD (*limit of detection*), è la quantità più bassa di una sequenza target che può essere rilevata per le analisi, ed è generalmente descritto in copie della sequenza bersaglio del genoma del patogeno che si sta ricercando.

Per determinare la presenza di *Giardia spp.* e CCV, sono stati eseguiti tamponi rettali su tutte le madri in 2 time point (T28 e T56 giorni post-parto) e sui 55 cuccioli selezionati al T35 e al T56. I tamponi, conservati fino alle analisi a -20°C, sono stati analizzati da un laboratorio di analisi esterno che ha eseguito una *real-time* PCR, metodica che permette di rilevare anche una ridotta quantità di patogeni nelle feci tramite un'estrazione enzimatica e un'amplificazione di una porzione del genoma degli stessi.

In conformità con le raccomandazioni della Farmacopea Europea, la soglia di rilevamento di *Giardia spp.* e CCV nella *real-time* PCR, ossia il minor numero di copie genomiche rilevate nel 95% delle esecuzioni, sono state rispettivamente 6 e 111 copie di RNA genomico, mentre il limite di quantificazione è stato di 200 copie di RNA per entrambi.

4.1.8 MICROBIOTA INTESTINALE

Le analisi sul microbiota intestinale delle madri sono stati eseguiti, nei laboratori interni dell'azienda che ha fornito il lievito utilizzato in questa prova, a partire dai tamponi rettali effettuati.

Dai tamponi rettali eseguiti su tutte le madri (36) e raccolti a 3 time point (T1, T28 e T56 giorni post-parto), è stato estratto il DNA mediante Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research, USA), secondo le istruzioni del produttore. La PCR è stata eseguita nella regione V3-V4 dei geni 16S rRNA utilizzando i primer universali 341F (Muyzer et al., 1993) e 806R (Caporaso et al., 2011). Il sequenziamento ad alto rendimento è stato eseguito su una piattaforma Illumina HiSeq 2 × 250 paired e su una piattaforma di sequenziamento INRAE GeT-PlaGe (Tolosa, Francia).

Seguendo la metodica descritta in Callahan et al. (2016), i file grezzi fastq sono stati importati utilizzando la piattaforma QIIME2 (versione 2020.2) e filtrati utilizzando DADA2 (Bolyen et al., 2019). L'allineamento e la filogenesi de novo sono stati eseguiti con MAFFT e FastTree2 (Kato et al., 2002 e Price et al., 2010). Gli indici di *alfa diversity* (Chao1, Shannon e Simpson) e di *beta diversity* (Bray-Curtis, Jaccard, Unifrac e weighted Unifrac) sono stati calcolati considerando il minor numero di sequenze (11756) usando Phyloseq R.

La tassonomia è stata assegnata tramite database SILVA (v138) (Bokulich et al. 2018).

4.1.9 DETERMINAZIONE IMPRONTA OLFATTIVA DELLE FECI (E-NOSE)

Il Naso Elettronico PEN3, è un piccolo e rapido sistema di riconoscimento degli odori e di identificazione per gas e miscele di gas. PEN3 trova il suo impiego per il Controllo Qualità in una vasta gamma di settori: alimentare, chimico, farmaceutico. PEN3 è dotato di 10 sensori MOS termoregolati singolarmente in grado di simulare un naso umano e tutto il processo mentale di classificazione e riconoscimento umano di una emissione odorosa. L'identificazione è possibile a seguito di una fase di addestramento, utilizzando il modello generato dai sensori.

Utilizzando algoritmi di calcolo multivariato, lo strumento è in grado di riconoscere odori diversi, di eseguire un monitoraggio della molestia olfattiva e odorigena e può fornire sia risposte qualitative (come "buono-cattivo", "sì-no") che quantitative, a seconda delle esigenze dell'utente.

Grazie alla sua particolare strategia di campionamento, PEN3 può essere utilizzato in laboratorio, in applicazioni ambientali mobili e online per il controllo del processo produttivo.

Pertanto, nell'ambito del presente studio, il naso elettronico PEN3 *Airsense* Analytics GmbH (Schwerin, Germania) è stato impiegato per la valutazione dell'impronta olfattiva delle feci raccolte in 3 tempi (T28, T42 e T56) dai 108 cuccioli selezionati. Di ogni campione fecale poi è stato fatto un replicato tecnologico. Infatti, il PEN3 *Airsense* sfrutta l'aria ambientale filtrata, durante la fase di pulizia, e il gas diluito durante il campionamento con una portata massima di 600 ml/min. Esso è composto da un array di 10 sensori termoregolati, posizionati in una camera di acciaio sensibili a diverse classi di composti chimici (Tabella 8). I sensori sono costituiti da un substrato di ceramica riscaldato da una resistenza e rivestito con un film di ossido di metallo semiconduttore (MOS).

Tabella 8. Schematizzazione dei sensori del PEN3 *Airsense* con descrizione di ogni singolo sensore e relativi limiti di rilevamento

Numero del sensore	Nome del sensore	Descrizione del sensore e sensibilità	Limiti di rilevamento
1	W1C	Aromatic organic compounds	Toluene, 10 mg/kg
2	W5S	Very sensitive, broad range sensitivity, reacts to nitrogen oxides, very sensitive with negative signal	NO ₂ , 10 mg/kg
3	W3C	Ammonia, also used as sensor for aromatic compounds	Benzene, 10 mg/kg
4	W6S	Detects mainly hydrogen gas	H ₂ , 100 mg/kg
5	W5C	Alkanes, aromatic compounds, and non-polar organic compounds	Propane, 1 mg/kg

6	W1S	Sensitive to methane. Broad range of organic compounds detected	CH ₄ , 100 mg/kg
7	W1W	Detects inorganic sulfur compounds, e.g. H ₂ S. Also sensitive to many terpenes and sulfur containing organic compounds	H ₂ S, 0.1 mg/kg
8	W2S	Detects alcohol, partially sensitive to aromatic compounds, broad range	CO, 100 mg/kg
9	W2W	Aromatic compounds, inorganic sulfur and organic compounds	H ₂ S, 1 mg/kg
10	W3S	Reacts to high concentrations ([100 mg/kg) of methane and aliphatic organic compounds	CH ₄ , 10 mg/kg

Durante le analisi, quando i VOC reagiscono con la pellicola di rilevamento della superficie del sensore, si verifica uno scambio di ossigeno che crea una diminuzione della conducibilità elettrica, rilevabile da un elemento trasduttore (elettrodo) collegato a ciascun sensore. Il software rileva quindi il rapporto:

$$G/G_0$$

dove G e G₀ rappresentano, rispettivamente, la resistenza di un sensore durante il rilevamento di un gas e durante l'inalazione/clean air.

Il software permette poi di impostare le condizioni sperimentali da adottare durante le analisi e fornisce, in tempo reale, una visualizzazione grafica dei valori relativi ai sensori ed anche una tabella numerica degli stessi dati. Le condizioni operative utilizzate durante lo studio sperimentale effettuato, sono riportate in Tabella 9.

Tabella 9. Condizioni operative di funzionamento del PEN3 *Airsense*. Il tempo di caricamento del campione corrisponde a 10s, il tempo di misurazione a 120s, il tempo di lavaggio a 1000s, il tempo prima dell'inizio di una nuova annusata sono 10s, il flusso che viene mantenuto durante la lettura e il flusso inserito a ogni lettura sono 400ml/min.

Presempling time	10 s
Measurement time	120 s
Flush time	1000 s
Zero point count	10 s
Chamber flow	400 ml/min
Injection flow	400 ml/min
Diluition	0

Il tempo di campionamento e il tempo di lavaggio (fase di pulizia programmata dopo ogni analisi) sono stati definiti dopo prove eseguite in precedenza e volte a creare le migliori condizioni sperimentali.

Sono stati raccolti due campioni replicati per verificare la stabilità del segnale e per ottenere un numero sufficiente di dati che tenesse conto di tutte le variazioni del campione. I campioni sono stati tutti processati dopo il riscaldamento a temperatura ambiente.

Descrizione della metodica usata (Altomare et al., 2016; Ottoboni et al., 2018):

- A. 0,5g di campione è stato stoccato in vials di vetro, da 20 ml ciascuna, e chiuse ermeticamente, così da non permettere lo svilupparsi di ulteriori odori, che avrebbero potuto alterare l'affidabilità dei risultati, e stoccate a -20°C, fino al momento delle analisi;
- B. Il campione è stato scongelato a temperatura ambiente per 2-3h (Figura 17a);
- C. La pipa del naso elettronico è stata collegata alle vials con l'uso di un ago e il gas sprigionato è stato analizzato tramite un modello portatile di naso elettronico PEN3 *Airsense Analytics GmbH (Schwerin, Germania)* (Figura 17b);
- D. I dati sono stati visualizzati e analizzati attraverso un software di riconoscimento associato (Win Muster v. 1.6.2);

- E. Tutte le misurazioni del segnale, 1 ogni secondo, sono state raccolte in un file Excel e utilizzate per l'assemblaggio del data set;
- F. I dati ottenuti sono stati comparati con i dati di SS delle feci, del fecal score, della positività a *Giardia spp.* e della composizione del microbiota.



Figura 17a. Campione in vials di vetro durante lo scongelamento a T ambiente

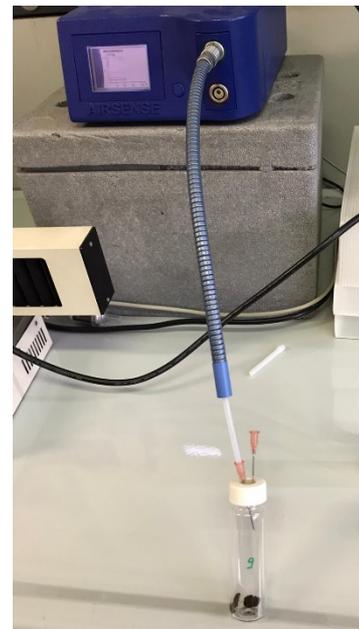


Figura 17b. Lettura del campione tramite E-nose.

4.1.10 ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti sono stati analizzati da ANOVA (procedura GLM attraverso il software SAS 9.3). Le misurazioni per i gruppi di controllo (C) e il gruppo trattato (Y), sono state esaminate mediante l'analisi della varianza a una via (ANOVA unidirezionale), al fine di confrontare i dati dei due gruppi (procedura GLM del software statistico SAS 9.3).

L'analisi è stata eseguita utilizzando il seguente modello:

$$y_{ij} = \mu_j + \epsilon_{ij}$$

dove y_{ij} indica le osservazioni (misurazioni), μ_j rappresenta la media delle osservazioni per il primo gruppo mentre ε_{ij} designa la variabilità casuale all'interno del gruppo.

Le differenze con valori di $P < 0.05$ sono state considerate significative.

I dati raccolti e indagati per la loro distribuzione Proc DISTR, sono stati presentati ed espressi come media, deviazione standard, valore minimo e valore massimo (Procedura PROCMEANS di SAS 9.3).

Inoltre, per mostrare la diversità delle variabili più discriminanti è stato utilizzato un test grafico (box-plot).

Al fine di valutare l'associazione tra i valori di sostanza secca, fecal score e risultati del naso elettronico, è stato condotto uno studio di correlazione con il metodo di Spearman in quanto i dati presi in esame non sono risultati distribuiti normalmente. La correlazione di Spearman ρ_s (ρ), è stata utilizzata al fine di valutare il grado di relazione non lineare. I valori di $P < 0.05$ sono stati considerati significativi.

4.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.2.1 ANALISI CENTESIMALI SULL'ALIMENTO

Il mangime completo estruso, per femmine in allattamento e cuccioli, usato in questo studio, è stato analizzato per i singoli componenti sostanza secca (SS), proteina grezza (PG), fibra grezza (FG), estratto etereo (EE) e ceneri e i risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 10.

Tabella 10. Composizione chimica dell'alimento (sostanza secca (SS), proteine grezze (PG), fibra grezza (FG), estratto etereo (EE) e ceneri) espressa come % su SS

Parametro	%
SS	93.3
PG	30.6
FG	1.80
EE	17.8
ceneri	10.0

Le femmine in lattazione e i cuccioli necessitano di specifici nutrienti che devono essere garantiti con la dieta, per favorire la produzione di latte nelle madri e la crescita nei cuccioli. Perciò l'alimento fornito è stato confrontato con i valori riportati dalle Linee Guida FEDIAF, per femmine in riproduzione e cuccioli di età inferiore alle 14 settimane. In queste linee guida la proteina grezza deve avere un valore minimo del 25%, mentre lipidi grezzi devono avere un valore minimo dell'8,5% sul totale (FEDIAF, 2021).

La dieta presa in esame è stata formulata in linea con tali raccomandazioni. Infatti, per le aziende produttrici di *pet food* diventa importante far corrispondere i nutrienti forniti con la dieta alle esigenze specifiche dell'animale, a seconda del suo stadio fisiologico (Hand et al., 2010), e modulare la nutrizione secondo le varie fasi di vita (Fahey et al., 2008). Numerose pubblicazioni rilevano, anche per le specie domestiche, l'innegabile connessione esistente tra riproduzione e nutrizione (Fontaine, 2012; Ivanova and Georgiev, 2018; Puttock, 2020; Calabrò et al., 2021) e la necessità di prestare particolare attenzione alle fasi di gravidanza e allattamento per le madri, e alle prime fasi di crescita dei neonati. Infatti, questi periodi sono caratterizzati da un alto consumo energetico che deve

essere garantito da un'adeguata alimentazione. Essa, da una parte deve assicurare alle madri la crescita embrionale/fetale o la produzione di latte, mentre dall'altra deve salvaguardare la crescita esponenziale dei neonati (Fontaine, 2012; Ivanova and Georgiev, 2018; Puttock, 2020).

Per questo, l'alimentazione, offerta da diete commerciali bilanciate, risulta essere l'opzione più frequentemente utilizzata: si tratta di diete che non richiedono alcun tipo di integrazione (Malandain, 2006).

4.2.1.1 ESIGENZE NUTRIZIONALI DELLE CAGNE IN ALLATTAMENTO

Con riferimento alle cagne in allattamento le esigenze energetiche per supportare la produzione di latte, sono molto elevate: nella prima settimana, tale produzione corrisponde a circa il 2,7% del peso corporeo dell'animale, ma poi aumenta gradualmente fino al raggiungimento del picco dove corrisponde all'8% del peso (Biagi et al., 2021).

Il latte della cagna ha un contenuto proteico e lipidico molto elevato, pari rispettivamente al 7,5% e il 9,6%, adatto a supportare la rapida crescita dei cuccioli.

I fabbisogni energetici della femmina in allattamento aumentano gradualmente fino alla terza/quarta settimana di lattazione e per nutrirla nel modo migliore sarebbe necessario somministrarle, *ad libitum*, un alimento altamente energetico e facilmente digeribile (Hand et al., 2010).

Fabbisogni di principi nutritivi:

- Proteine

Il fabbisogno di proteine a fine gestazione tende ad aumentare dal 40 al 70% oltre il mantenimento (15-30% di SS) (Leibetseder, 1989; Meyer et al., 1985) e segue l'incremento del fabbisogno energetico.

Quindi, le cagne in tarda gestazione dovrebbero avere pasti con livelli di proteine e di lipidi, per soddisfare il fabbisogno di nutrienti anche nel periodo in cui l'assunzione di alimento è limitato dall'inappetenza.

Invece, in lattazione il fabbisogno proteico aumenta maggiormente rispetto a quello energetico con un rapporto tra i due di 4,6/6,8g di proteine digeribili/100kcal di EM (Biagi et al., 2021).

Diventano particolarmente importanti alcuni aminoacidi, tra cui la taurina e l'arginina, che agiscono sullo sviluppo del sistema immunitario dei cuccioli (Hand et al., 2010), e la fenilalanina e la tirosina che stimolano la crescita, la sintesi degli ormoni tiroidei e delle catecolamine (NRC, 2006; Biourge and Serheraert, 2002).

- Lipidi

In tarda gravidanza è frequente tra le gestanti la comparsa dell'inappetenza dovuta all'aumentato ingombro uterino, per cui diventa fondamentale l'inclusione lipidica che aumenta la densità energetica della dieta, a fronte di un volume ridotto, poiché essi migliorano l'appetibilità dell'alimento (de Godoy et al., 2016). Secondo FEDIAF, la concentrazione minima di grassi per cagne in lattazione, dovrebbe essere di 8,5-9% sulla SS (FEDIAF, 2021).

Infatti, l'adeguatezza della lattazione dipende dalla quantità di lipidi della dieta: aumentando il contenuto di grassi dal 12 al 20% sulla SS, si incrementa il grasso del latte del 30% (Hand et al., 2010). Ciò è fondamentale poiché i cuccioli di cane nascono con scarse risorse energetiche e l'energia deve essere fornita loro, con il latte.

In particolare, occorre sottolineare l'importanza di alcuni acidi grassi quali acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA) che assumono un ruolo importante ed essenziale per il corretto sviluppo del sistema nervoso centrale e delle capacità visive dei cuccioli (Bauer et al., 2006; Kelley and Lepine, 2012).

- Carboidrati

In gravidanza l'apporto di carboidrati è fondamentale: i feti usano solo glucosio come fonte di energia per il loro sviluppo e di conseguenza il 20% dell'energia dovrebbe proprio provenire dai carboidrati contenuti nella razione (Biagi et al.,

2021). Invece, è ancora dibattuto l'inserimento di questo nutriente nella razione durante la lattazione (Biagi et al., 2021).

- Minerali

In lattazione è fondamentale il contenuto di calcio (Ca) della dieta, a causa della produzione di latte il suo fabbisogno aumenta fino a 2-3 volte quello necessario per il mantenimento (Biagi et al., 2021).

Il range di Ca raccomandato durante la gestazione e l'allattamento va da 1,0 a 1,7% (DM). Mentre, il range raccomandato per il fosforo (P) va da 0,7 a 1,3% (DM). Il rapporto calcio-fosforo dovrebbe essere quindi sempre mantenuto a 1,1:1, che corrisponde a inclusioni giornaliere comprese tra 250 e 500 mg per il calcio e tra 175 e 335 mg per il fosforo/kg di peso corporeo (Biagi et al., 2021).

Altro minerale importante durante la lattazione è il ferro (Fe). Il colostro, primo alimento del cucciolo, è molto ricco di ferro anche se i suoi livelli diminuiscono entro 48 ore e la sua concentrazione si abbassa nel latte maturo. Per questo motivo, la richiesta di ferro aumenta soltanto leggermente durante l'allattamento, rispetto ai requisiti di mantenimento degli adulti (70 mg/kg su SS) (Biagi et al., 2021).

4.2.1.2 ESIGENZE NUTRIZIONALI DEI CUCCIOLI IN ACCRESCIMENTO

Nelle prime 2-3 settimane di vita, i cuccioli hanno una dieta esclusivamente latte, divisa in 6-8 pasti al giorno nella prima settimana, fino ad arrivare a 4 pasti/die alla quarta settimana di vita. Poi dalla quarta/quinta settimana circa, in corrispondenza della progressiva diminuzione della produzione di latte materno, i cuccioli cominciano ad assumere quantità, sempre crescenti di alimento solido. Inizialmente, viene consigliato di somministrare un alimento semi solido, composto da crocchette bagnate con acqua tiepida (Biagi et al., 2021), il quale dovrebbe coprire i fabbisogni previsti da FEDIAF pari 25g/100g di proteina e 8,5 g/100g di grassi (FEDIAF, 2021).

Fabbisogni di principi nutritivi:

Il primo alimento dei cuccioli, alla nascita è, ovviamente, il latte materno; in particolare il colostro che si trasforma in latte nel corso della prima settimana (Hand et al., 2010).

- Energia

Il cucciolo neonato non è in grado di mantenere lo stato di omeostasi: scarse riserve epatiche di glicogeno, insensibilità all'insulina, ridotte masse muscolari e di tessuto adiposo, rendono essenziale l'assunzione energetica, data dall'ingestione di alimenti, ad intervalli brevi e regolari (Hand et al., 2010).

Durante la crescita i fabbisogni energetici aumentano, fino ad uniformarsi al raggiungimento dei 2/3 del peso atteso da adulto. I fabbisogni energetici diminuiscono con l'età, mentre aumenta la quantità totale di energia (calorie) da assumere (Hemmings, 2016; Hemmings,2018). È molto importante in queste fasi, indurre un accrescimento graduale e lineare, così da minimizzare il rischio delle patologie ortopediche e dello sviluppo (Hemmings, 2016; Hemmings,2018).

- Proteine

Rispetto ai cani adulti, i cuccioli risultano avere una minore digeribilità delle proteine, a causa della minore secrezione di pepsina, nello stomaco. Pertanto, richiedono proteine di alta qualità e altamente digeribili.

Durante l'allattamento, essi ricevono dal latte dal 21,5% al 30% di proteina su SS. Dalle 4 alle 14 settimane, poi, passano da un apporto minimo di 180 g/kg su SS, a un apporto raccomandato di 225 g/kg su SS (Hand et al., 2010).

Quando hanno raggiunto le 14 settimane di età, il loro fabbisogno proteico scende a un minimo di 140 g/kg e continua a diminuire fino a 85 g/kg dopo lo svezzamento (Hand et al., 2010).

Tra gli aminoacidi essenziali, deve essere evidenziate l'arginina di cui FEDIAF consiglia un apporto nei cuccioli di 0.82 -0.74% (Bauer et al., 2006).

- Lipidi

I neonati, nella prima settimana di vita, utilizzano principalmente i lipidi come fonte energetica: il colostro, infatti, risulta contenere un tenore lipidico molto alto, che va scemando nel corso della transizione a latte. Il latte, comunque, mantiene una densità energetica piuttosto elevata di 6,43 kcal/g su SS (Hand et al., 2010; Hemmings, 2018).

Il cucciolo ricava dal latte materno gli acidi grassi essenziali, tra cui l'acido linoleico in quantità del 3,0% su SS, che risulta superiore alla quantità minima raccomandata che è del 1,3% per gli alimenti adatti a cuccioli post svezzamento (NRC, 2006).

Dopo lo svezzamento, il livello raccomandato di acido docosaesaenoico (DHA) e acido eicosapentaenoico (EPA) è dello 0,05% (SS) per i cuccioli (NRC, 2006; Beynen, 2017).

- Carboidrati

Il lattosio, i cui livelli nella specie canina variano tra il 3,0 e il 3,5%, è il carboidrato principale del latte e risulta fondamentale per il neonato, che a causa dell'immaturità epatica nella funzione gluconeogenetica, non è in grado di provvedere all'omeostasi glicemica, che otterrà poi durante la crescita.

Gli enzimi digestivi, di fatti, variano nel tempo la loro efficienza digestiva: i cuccioli neonati mantengono alte concentrazioni di lattasi durante l'allattamento, mentre, con l'accrescimento quando passa da un'alimentazione latte a un alimento solido, queste diminuiscono parallelamente all'inserimento di zuccheri vari.

Diversamente, l'attività della sucralasi rimane costante, mentre altri enzimi come le amilasi, si sviluppano per ultimi.

Queste differenze implicano la necessità che ogni transizione alimentare venga fatta in modo graduale (Hand et al., 2010).

- Minerali e vitamine

È importante somministrare a cuccioli in crescita il corretto apporto di minerali e vitamine. Tra i minerali sono ritenuti importanti nella nutrizione del cucciolo il calcio (Ca) e il fosforo (P). Essi devono avere tra loro un rapporto di 1:1

(Hemmings, 2016) ed è quindi importante evitare eccessi di Ca o di Vit D, perché potrebbero predisporre a gravi deformazioni ossee (Hemmings, 2016). Quando il contenuto di Ca nella dieta, aumenta troppo, infatti, l'assorbimento attivo diminuisce, ma il cucciolo continua ad assorbire passivamente almeno il 30-40% del calcio ingerito (Hand et al., 2010). Inoltre, una condizione di ipercalcemia o iperfosfatemia può predisporre a un deposito di Ca nel rene che conduce a insufficienza renale cronica e ad effetti sul tratto gastroenterico, sulla funzione cardiaca e sul sistema nervoso (Hemmings, 2016). Tra le vitamine, invece, risultano fondamentali la A ed E per attivare il sistema immunitario (Hemmings, 2016).

4.2.2 PARAMETRI INVESTIGATI

Allo scopo di valutare gli effetti del lievito *S. cerevisiae var boulardi*, sulle performance di crescita, sono stati misurati sia per le madri che per i cuccioli, il consumo di alimento giornaliero e l'andamento del peso settimanale (incremento ponderale).

Le medie del peso corporeo per gruppo (di madri e cuccioli) e di incremento ponderale (solo per le madri) sono state calcolate, a partire dalla nascita degli animali e fino alla nona settimana di prova in tre time point (T1, T28 e T56), mentre il feed intake e l'incremento di peso (solo per i cuccioli) sono state calcolate settimanalmente, dopo ciascun trattamento alimentare (Y e C), dalla settimana 1 alla settimana 9.

È opportuno ricordare che la valutazione degli effetti della somministrazione di lievito vivo *Saccharomyces cerevisiae var boulardii* in cagne e cuccioli nel periparto e post-svezzamento rappresenta un elemento innovativo nell'ambito della valutazione nutrizionale di diete e additivi nell'alimentazione del cane. Infatti ad oggi risultano ancora scarsi i dati scientifici presenti con riferimento particolare alla specie canina.

Cagne

Con riferimento ai parametri investigati per le cagne i risultati ottenuti nell'ambito del presente studio sono riportati in Tabella 11.

Tabella 11. Parametri investigati per le cagne.

	Gruppo C media	Gruppo Y media	P value			ES
			Gruppo	Tempo	Gruppo*Tempo	
Peso (kg)						
T1	31.3	28.1	0.084	<0.001	0.529	0.88
T28	30.0	26.8				
T56	35.45	31.67				
Feed intake						
Settimana 1	518	517	0.721	<0.001	0.928	45.2
Settimana 2	863	815				
Settimana 3	945	949				
Settimana 4	849	794				
Settimana 5	769	730				
Settimana 6	935	856				
Settimana 7	1060	1049				
Settimana 8	1250	1196				
Settimana 9	1334	1324				
FS						
T1	4.00	3.50	0.083	0.215	0.415	0.08
T28	3.00	3.00				
T56	3.50	3.50				
SS feci (%)						
T1	31.2	28.8	0.973	0.596	0.037	0.35
T28	26.4	27.5				
T56	29.1	30.2				
ATTD (%)						
T1	86.3	82.9	0.040	0.168	0.498	0.65
T28	82.5	78.5				
T56	82.6	81.6				

Durante l'allattamento, l'andamento ponderale (Figura 18) e il consumo di alimento (Figura 19) hanno avuto andamenti riconducibili a situazioni fisiologiche.

Le madri, che erano state assegnate casualmente ai due gruppi, al momento del parto, presentavano un peso corporeo medio di 31,3 kg per il gruppo controllo (C) e di 28,1 kg per il gruppo trattato (Y) (Figura 18).

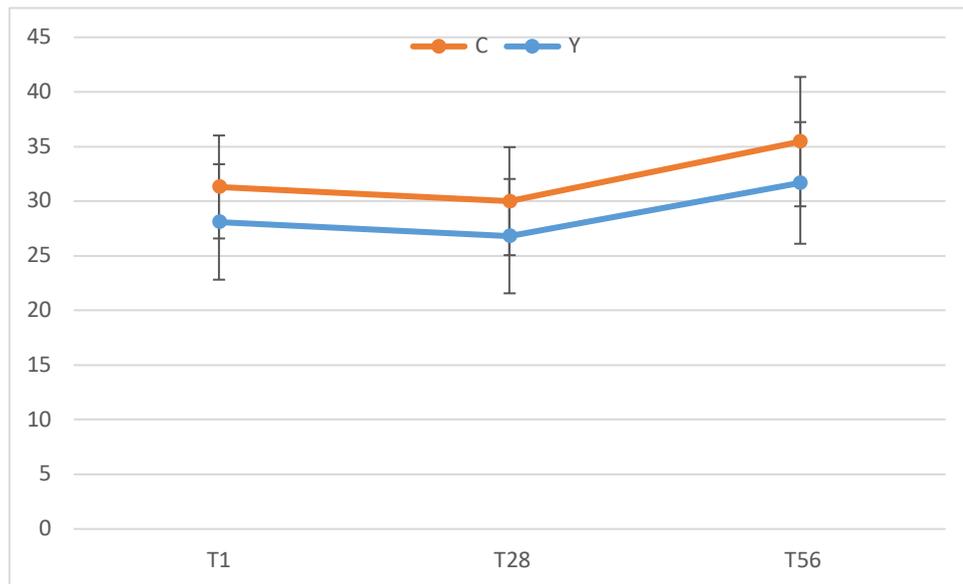


Figura 18. Andamento del peso medio delle madri espresso in kg \pm DS in 3 time point (T1, T28 e T56).

Nello specifico il peso medio, in entrambi i gruppi è calato fino a un massimo di 30kg per il gruppo C e 26,8 kg per il gruppo Y. Tuttavia, tale perdita non è mai stata superiore al 5% e può essere spiegata con un bilancio energetico negativo. Tale situazione si verifica in genere durante il picco di lattazione che generalmente nella cagna si verifica tra la 3° e la 5° settimana *post-partum* (Hand et al., 2010). Questa situazione si riscontra non solo nel cane, ma anche in altre specie e se non si risolve può indurre a patologie, anche gravi, nel *post-partum* (Biagi et al., 2021).

A partire dal giorno 28 (T28), il peso, nei due gruppi, ha iniziato ad aumentare in modo costante, in concomitanza con la maggiore assunzione di cibo, tanto da tornare ai valori precedenti alla gravidanza.

Lo studio ha evidenziato delle differenze tendenzialmente significative ($P=0,08$) in riferimento ai pesi nei due gruppi, seppur un effetto *carry over* del peso iniziale, non può essere escluso. Non si può dimenticare che tali oscillazioni di

peso sono normali nel *post-partum*, quando l'animale tende a perdere il peso acquisito nell'ultima fase della gravidanza e a tornare in breve tempo al peso precedente. Si osserva addirittura che gli animali a 56 giorni dal parto (T56), arrivano a pesare circa 3kg in più rispetto al T1, il che potrebbe rappresentare un problema per gli animali da riproduzione, dove sovrappeso e obesità costituiscono un rischio per fertilità e insorgenza delle patologie tipiche della gravidanza e del parto.

Ciò che è stato osservato in questo studio, si discosta da quanto osservato in altri studi condotti in altre specie in cui animali trattati con coltura di lievito nei periodi vicino al parto hanno evidenziato una ridotta perdita di peso nel *post-partum* (Dann et al., 2000).

Con riferimento all'andamento del peso corporeo delle cagne, tale parametro risulta in parte sovrapponibile all'assunzione di alimento. Infatti, anche nel caso del feed intake (Figura 19) seppur non siano state osservate differenze significative tra i due gruppi (C e Y), un incremento del consumo di alimento è stato osservato per entrambi i gruppi in funzione del tempo (settimane).

La figura evidenzia come l'assunzione di alimento ha avuto un andamento fluttuante, ma in un range fisiologico, sia nel gruppo C che nel gruppo Y. Il feed intake è migliorato gradualmente dopo il parto e dopo il picco di lattazione in entrambi i gruppi, per poi diminuire in corrispondenza delle settimane del picco di lattazione (Figura 19).

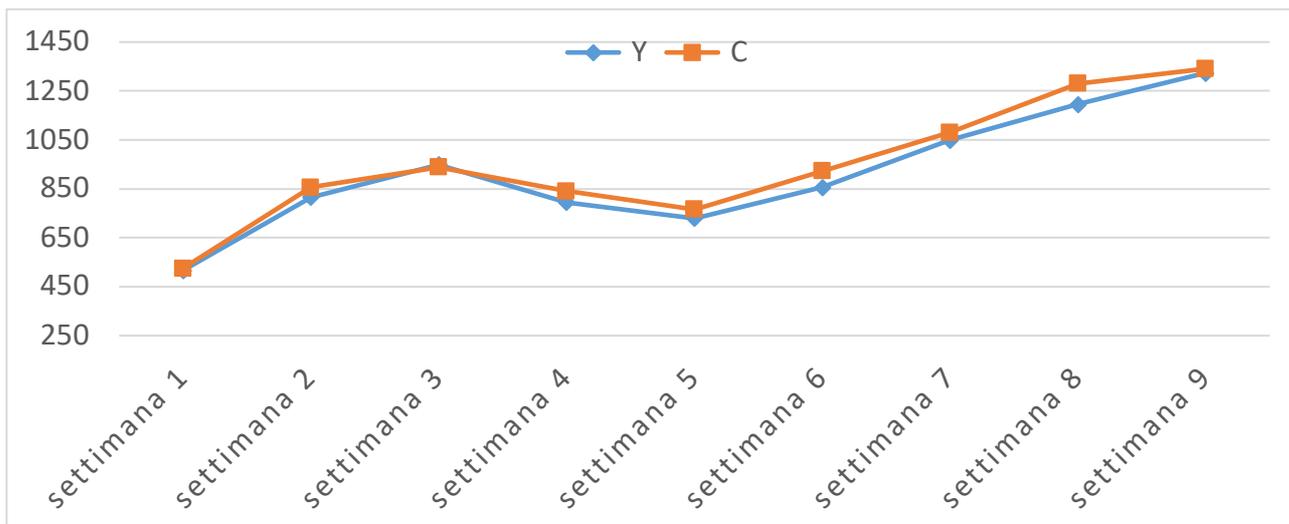


Figura 19. Andamento del feed intake medio delle madri espresso in g/settimane.

L'assunzione di alimento rappresentata in Figura 19 mostra un andamento oscillante, in linea con ciò che viene descritto in letteratura (Schroeder and Smith, 1995; Johnson, 2008; Smith Frances, 2011). Nello specifico, Schroeder and Smith (1995) riportano che il feed intake diminuisce durante l'ultima settimana di gestazione, quando è frequente la comparsa di una inappetenza da stress che ha l'apice in corrispondenza del momento del parto (Johnson, 2008; Smith Frances, 2011).

Durante le prime settimane di lattazione, gli animali hanno maggiori fabbisogni e l'energia assunta dalla madre con la dieta in questa fase serve a soddisfare sia i propri fabbisogni che quelli dei cuccioli (Fabbisogno Energetico Giornaliero, Daily Energy Requirement (DER): 3-4 volte il normale mantenimento, + 25% per ogni cucciolo) e perciò la quantità di alimento che dovrebbero assumere è maggiore, come mostrato in Figura 20, riportata da Hand et al. (2010).

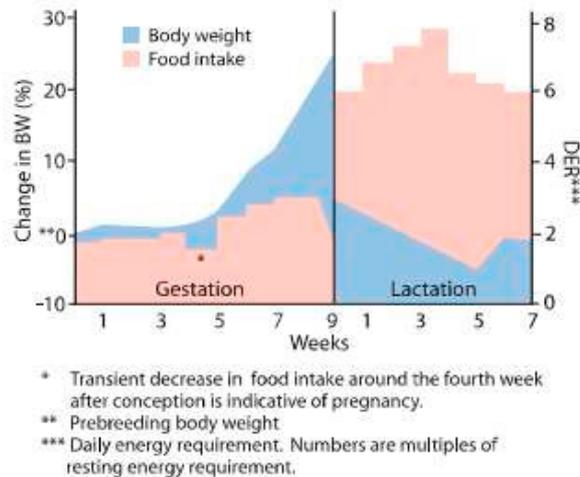


Figura 20. Variazioni del peso corporeo e dell'ingestione di cibo (rispetto al Daily Energy Requirement (DER) kcal/die) in funzione delle settimane di gestazione e lattazione (Hand et al., 2010).

Tuttavia, l'assunzione volontaria, osservabile nel nostro studio (Figura 19), è aumentata più lentamente (dalla settimana 1 alla settimana 3), rispetto agli aumentati fabbisogni. Questo, in genere determina una mobilitazione di energia e proteine dalle riserve corporee, con un decremento di peso, fenomeno comune in altre specie (Berglund et al., 1987), che però non è stato osservato nel presente studio. Dopo il picco di lattazione, si è potuto osservare un graduale aumento nell'assunzione di alimento e un conseguente aumento di peso, omogeneo nei due gruppi. I dati relativi alla variazione di feed intake nel tempo, mostrano differenze significative tra le diverse settimane considerate ($p < 0,05$). Tuttavia, se si confrontano i due gruppi, non appaiono differenze statistiche, né tra i gruppi, né per il tempo*gruppo.

Confrontando i dati ottenuti nel presente studio con quelli della letteratura si vedono discordanze: alcuni studi propongono, infatti, le colture di lieviti (Williams et al., 1991; Wholt et al., 1991; Dann et al., 2000) o il lievito vivo (Wholt et al., 1998) come sostanze capaci di stimolare l'assunzione di alimento nei soggetti subito dopo il parto. Inoltre, hanno visto aumentare, in diverse specie (cani, polli, maiali e bovini) l'ingestione di alimento e il peso corporeo, sia in soggetti sani (Grieshop et al., 2004; Bontempo et al., 2006; Collier et al., 2011; Rajput et al., 2013; Stercova et al., 2016; Labussier et al., 2022) sia in soggetti con patologie gastrointestinali in atto (Boyle et al., 2013; D'angelo et al., 2018).

Tali scenari tuttavia, non sono confermati nel presente studio.

Cuccioli

Con riferimento ai parametri investigati nei i cuccioli, i risultati ottenuti nell'ambito del presente studio sono riportati in Tabella 12

Tabella 12. Parametri investigati nei cuccioli.

	Gruppo C	Gruppo Y	P value			ES
	media	media	Gruppo	Tempo	Gruppo*Tempo	
Peso (kg)						
Settimana 1	405	412	0.82	0.21	0.81	0.14
Settimana 2	625	602				
Settimana 3	938	865				
Settimana 4	1253	1145				
Settimana 5	1622	1463				
Settimana 6	2012	1894				
Settimana 7	2537	2488				
Settimana 8	3180	3174				
Settimana 9	3842	3860				
Feed intake						
Settimana 4	331	316	0.944	<0.001	0.603	46.03
Settimana 5	503	488				
Settimana 6	609	596				
Settimana 7	700	722				
Settimana 8	911	882				

Settimana						
9		891	1010			
FS						
	T28	5.00	6.00	0.246	0.993	0.026
	T42	5.50	5.50			
	T56	5.50	5.00			
SS feci (%)						
	T28	28.87	28.68	0.83	0.030	0.334
	T56	26.28	26.65			
ATTD (%)						
	T35	65.28	67.00	0.423	<0.001	0.401
	T56	77.32	72.79			

In generale, il peso di un cucciolo alla nascita varia da 70 a 700g. Nel primo giorno di vita si ha poi, una perdita di peso fisiologica, che non dovrebbe superare il 10%. Successivamente, nel corso delle prime settimane, il peso del cucciolo deve crescere molto rapidamente, dal 5 al 10% al giorno (Hand et al., 2010; Hemmings, 2016; Grant, 2022), come riportato in letteratura da Hand et al. (2010) (Figura 21).

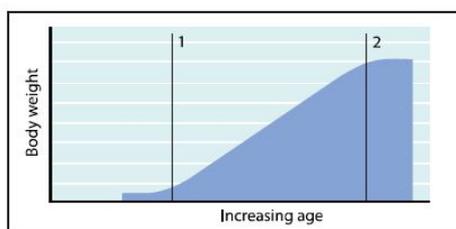


Figura 21. Incremento del peso del cucciolo in funzione delle settimane di vita (Hand et al., 2010).

In questo studio, i cuccioli dei due gruppi C e Y alla nascita avevano un peso medio, rispettivamente di 405g e 412g, senza differenze statistiche tra i gruppi (Figura 22).

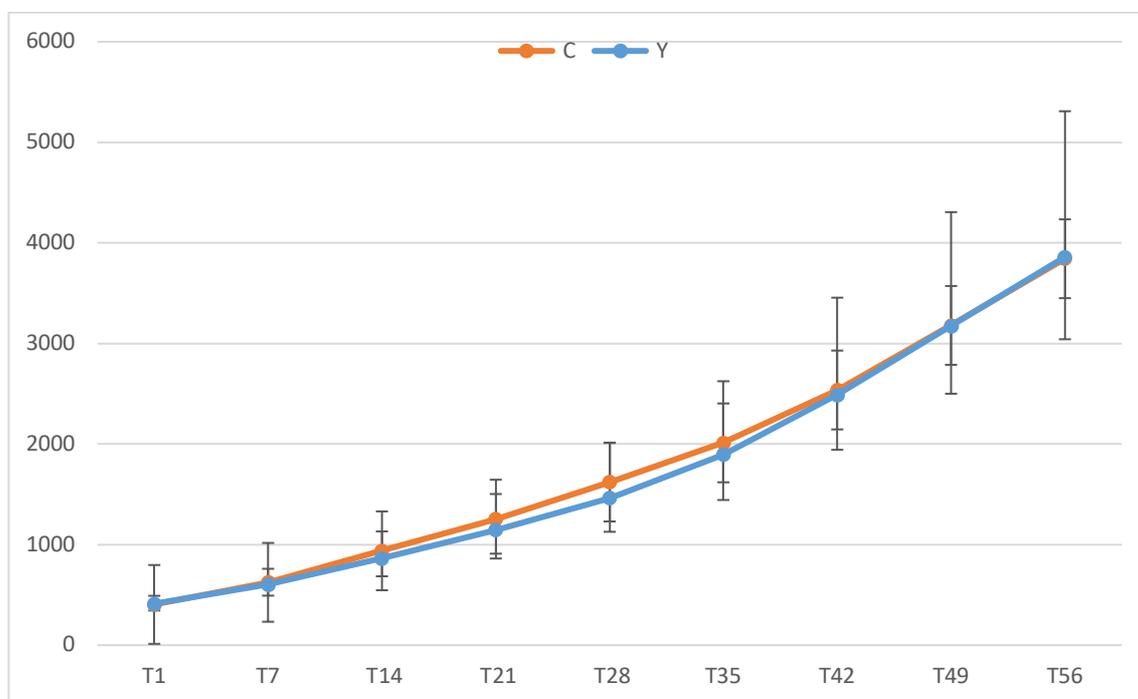


Figura 22. Andamento del peso dei cuccioli espresso in g \pm DS, in diversi time point (T1, T7, T14, T21, T28, T35, T42, T49 e T56).

Questa valutazione trova conferma nei dati della letteratura in altre specie, dove l'assunzione di coltura di lievito da parte delle madri, non ha avuto alcun effetto sul peso dei neonati alla nascita (Veum and Bowmann, 1973; Veum et al., 1995; Hasan et al., 2018). Come già sottolineato in precedenza, tali dati non concordano con altri studi presenti in letteratura, dove invece è documentato che l'assunzione giornaliera di coltura di lieviti migliora il peso alla nascita (Kim et al., 2008; Shen et al., 2011) in specie diverse dal cane.

I valori relativi all'incremento ponderale settimanale sono riportati in Figura 23. In questo studio, l'incremento ponderale settimanale è solo leggermente inferiore a quanto riportato in letteratura (Hand et al., 2010).

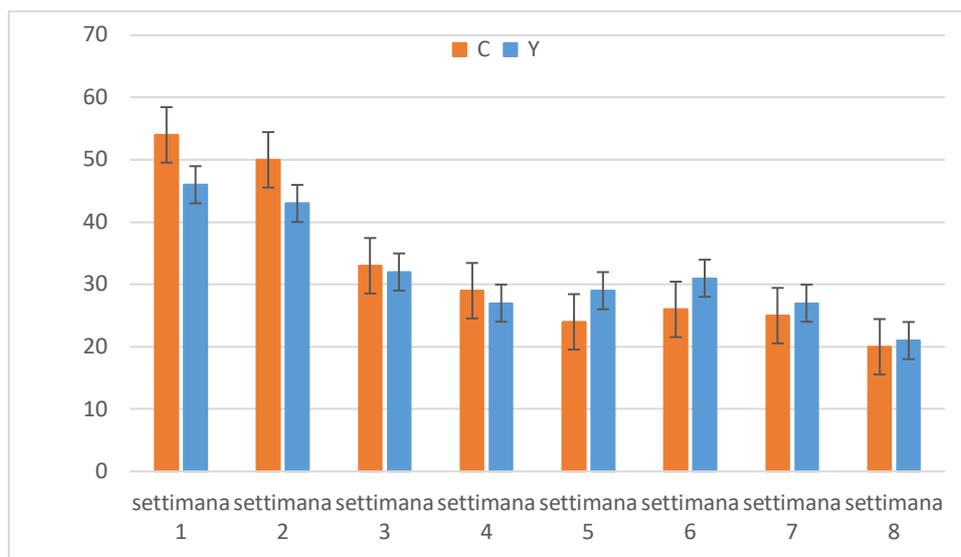


Figura 23. Incremento ponderale medio settimanale espresso in percentuale dei cuccioli.

Dalla Figura 23, si osserva che fino alla settimana 4, la crescita dei cuccioli del gruppo controllo (C) era maggiore rispetto a quella del gruppo trattato (Y). Alle settimane 3 e 4 l'incremento ponderale si portava quasi in pari e dalla settimana 5 in poi la situazione si invertiva: il gruppo trattato (Y) aumentava più del gruppo controllo (C). Quindi, il lievito potrebbe non aver modificato la produzione di latte materno, nè aver migliorato le sue caratteristiche nutrizionali, così come dimostrato da Shen et al. (2011). Questo dato dovrà ulteriormente essere verificato mediante i risultati delle analisi, condotte sul colostro e sul latte, riguardo al valore energetico, agli oligosaccaridi e al profilo degli acidi grassi. Tali risultati, ad oggi, non sono ancora disponibili (Figura 14).

È stato poi studiato l'aumento del peso dei singoli cuccioli (gruppo controllo Figura 24 e gruppo trattato Figura 25). Tutti i cuccioli hanno mostrato un incremento medio di peso quasi comparabile, per ogni settimana presa in considerazione.

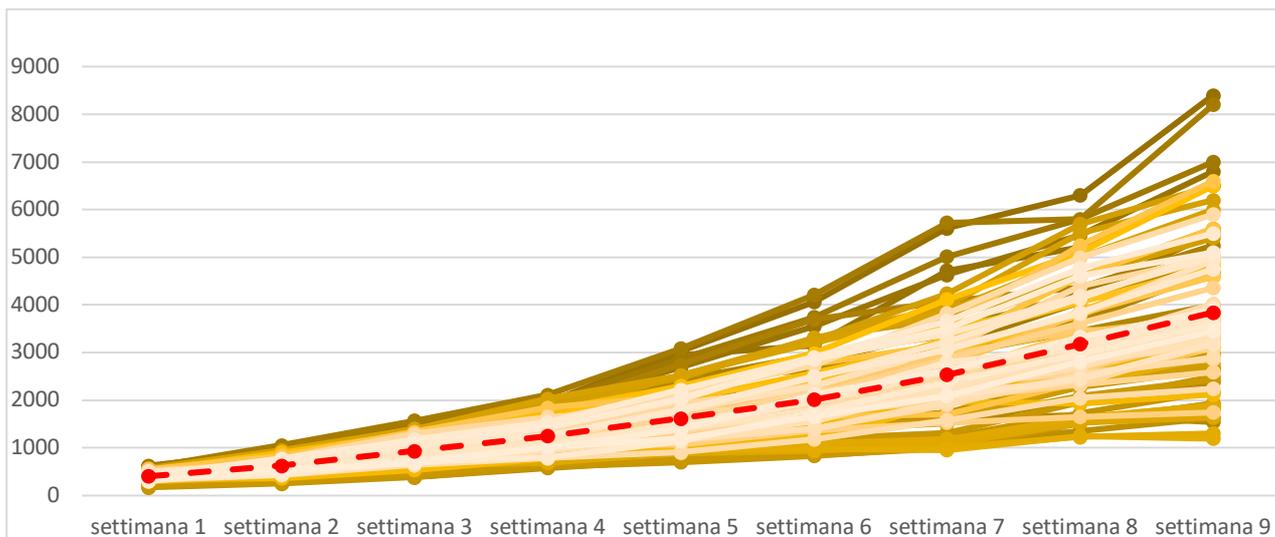


Figura 24. Incremento medio ponderale dei cuccioli del gruppo C, espresso in g/settimana, in rosso la media del gruppo.

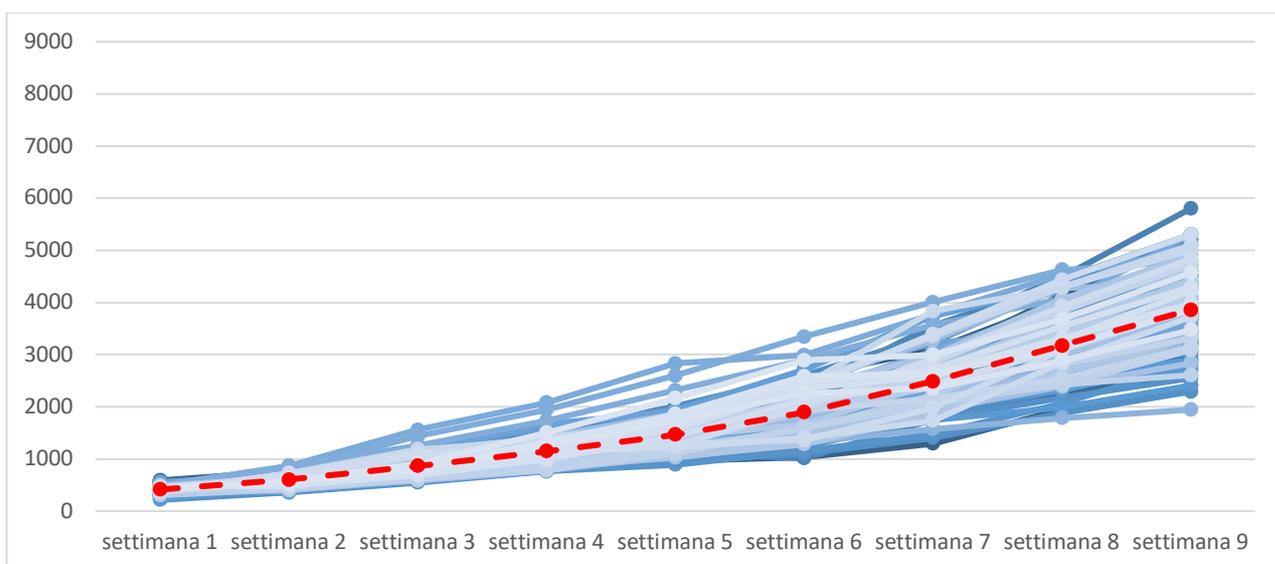


Figura 25. Incremento dei cuccioli del gruppo Y, espresso in g/settimana, in rosso la media del gruppo.

L'aumento del peso, ottenuto dai singoli cuccioli dalla settimana 1 tende a crescere in modo più disomogeneo nel gruppo C, rispetto al T (Figura 24 e 25). Per questo motivo, è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV) dei singoli cuccioli a partire dal giorno 7: esso raggiunge la massima variazione alla settimana 9 dove è pari a 0,37 nel gruppo C vs il 0,21 del gruppo Y (Figura 24 e 25). Un ridotto valore del CV nel gruppo trattato dimostra una maggiore omogeneità nella distribuzione della crescita dei cuccioli trattati rispetto a quelli

del gruppo controllo. Quindi, anche se non si osservano dei miglioramenti statistici dovuti alla somministrazione del lievito, si può affermare che i cuccioli del gruppo Y hanno growth performance più omogenee. Infatti, una crescita costante, in cuccioli di taglia medio grande, è raccomandabile, per evitare l'insorgenza di patologie muscolo-scheletriche che potrebbero compromettere il loro benessere e la loro salute da adulti.

Dati presenti in letteratura rilevano che il lievito vivo (Li et al., 2006; Peng et al., 2020) o come coltura (Shen et al., 2009, Shen et al., 2011), può migliorare il peso e l'incremento ponderale dei cuccioli; ma anche non modificarli, come riportato in altri studi nei suinetti (Kornegay et al., 1995; Yang et al., 2016) o nei vitelli (Cole et al., 1993). Questo è in linea con quello che è stato ottenuto nel presente studio.

L'assunzione di alimento solido o feed intake da parte del cucciolo inizia dalle 4-5 settimane, quando la produzione di latte si va via via riducendo (Biagi et al., 2021). Generalmente, durante la quarta settimana di vita dei cuccioli, si procede all'inserimento di alimenti solidi nella razione; questo è stato fatto anche nel presente studio. In queste prime settimane di svezzamento, lo scopo è quello di far conoscere il nuovo alimento e di stimolare la produzione di diversi enzimi digestivi come le amilasi (Biagi et al., 2021).

L'assunzione di alimento estruso, inizialmente bagnato con acqua tiepida e successivamente somministrato tal quale, sono riportati in Figura 26.

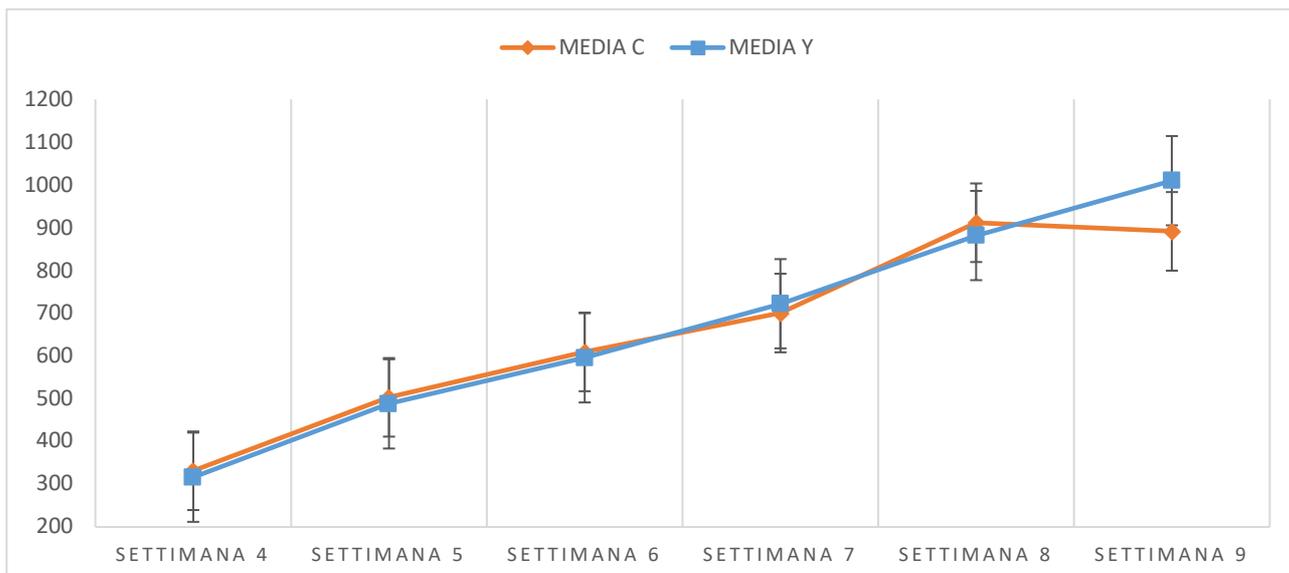


Figura 26. Andamento del feed intake dei cuccioli, espresso in g/sett ± DS.

Il consumo di alimento è migliorato gradualmente con il passare delle settimane, a partire dallo svezzamento e fino alla nona settimana. Come si può osservare dalla Figura 26, i cuccioli appartenenti al gruppo Y hanno avuto un'assunzione più costante durante tutte le settimane considerate, ma non statisticamente migliore; questo è stato riportato anche nello studio di Whittemore et al. (2019). In conclusione si può dire che l'integrazione con lievito *S. cerevisiae var boulardi* non ha avuto effetto sul feed intake dei cuccioli, ma li ha aiutati a mantenere un trend positivo di assunzione dell'alimento.

4.2.3 FECAL SCORE

L'insorgenza di diarree associate a patologie gastrointestinali o le feci malformate sono un dato particolarmente frequente negli animali da compagnia (Freeman et al., 2006). Uno studio basato su questionari ha rilevato che più del 15% dei proprietari aveva sperimentato una diarrea nel proprio cane (Hubbard et al., 2007) e un altro studio (Jones et al., 2014) ha rilevato che il 7% dei proprietari, portano il proprio cane ad una visita veterinaria a causa di una diarrea. Le cause che possono determinare feci poco formate sono diverse: lo stress (considerato un evento multifattoriale), i cambi di alimentazione, i

patogeni, le infezioni opportunistiche concomitanti e la densità nell'allevamento (Sokolow et al., 2005).

Nel presente studio, gli effetti dell'integrazione di lievito *S. cerevisiae var boulardii* sul fecal score, sono stati valutati singolarmente sia nelle madri che nei cuccioli, in base alle feci presenti nei box.

Le medie per gruppo sono state calcolate in tre time point T1, T28 e T56 per le madri e T28, T42 e T56 per i cuccioli.

Madri

In questo studio, durante l'allattamento, il fecal score ha subito diverse modifiche, come è mostrato in Figura 27.

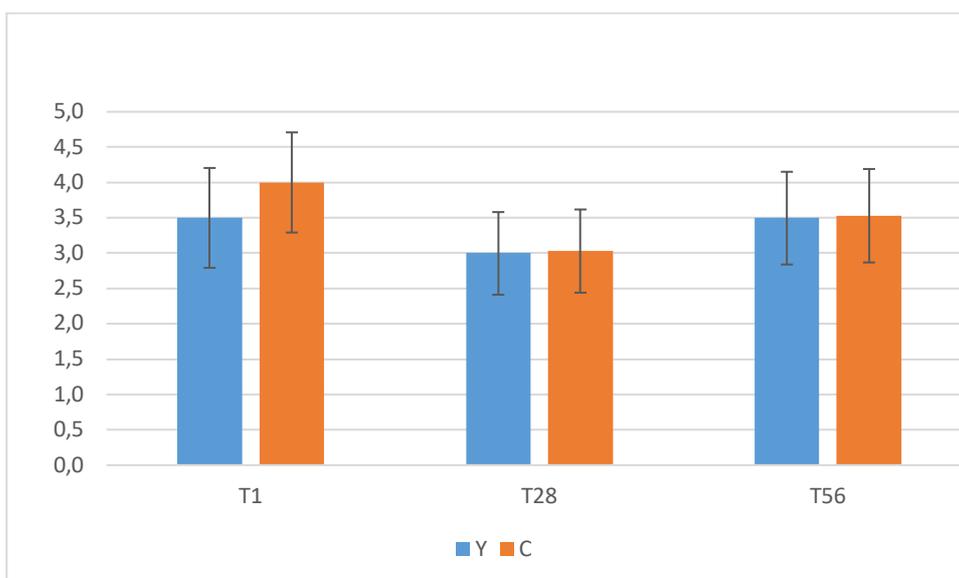


Figura 27. Fecal score medio delle madri calcolate in tre time point (T1, T28 e T56), i valori vanno da 1 a 5, dove 1 rappresentano le feci liquide e 5 le feci secche.

Al momento del parto, gli animali del gruppo trattato (Y) presentavano uno score medio di 3,5, che diventava 4 per quelli del gruppo controllo, ma questa differenza tra i gruppi è solo tendente al significativo ($P = 0,08$). Tali valori corrispondevano rispettivamente a feci morbide, ma formate, oppure a feci ben formate.

A T28, in corrispondenza del picco di lattazione, lo score, per entrambi i gruppi si riduceva a 3 (feci morbide e poco formate) e infine a T56 lo score risaliva a 3,5 (Figura 27).

I risultati ottenuti mostrano che non esiste una correlazione statisticamente significativa ($p > 0.05$), tra l'assunzione di lievito *S. cerevisiae var boulardi* e il fecal score.

Studi condotti precedentemente su cani adulti in mantenimento, mostrano dati discordanti relativi alla capacità dei lieviti *S. cerevisiae var boulardi* o *S. cerevisiae* di migliorare la consistenza fecale. Infatti, alcuni di questi studi trovano degli effetti migliorativi (Zentek et al., 2002; Grieshop et al., 2004; D'angelo et al., 2018) con la somministrazione di estratti di lievito o lievito vivo; altri studi non rilevano cambiamenti (Beloshapka et al., 2013; Pawar et al., 2017; Lin et al., 2019; Theodoro et al., 2019), mentre, altri ancora trovano una riduzione dello score (Martins et al., 2014).

D'Angelo et al. (2018), invece, riscontra che non solo un *S.boulardii* migliora il fecal score, ma anche diminuisce la frequenza di defecazione in soggetti affetti da enteropatia cronica.

Esiste una forte correlazione tra fecal score e presenza di parassiti e virus che possono modificare notevolmente la consistenza delle feci. Infatti, nel presente studio, come verrà riportato successivamente nei risultati relativi alla ricerca di parassiti, i cani hanno prevalenze molto alte di infestazione da parassiti. Questo potrebbe essere associato al ridotto score delle feci.

In più, è da tenere in considerazione che valori variabili di fecal score potrebbero essere anche dovuti ai diversi operatori che hanno registrato lo score stesso durante la prova. Infatti, la consistenza fecale è una valutazione soggettiva che dipende dall'operatore e per avere una migliore valutazione dovrebbe essere sempre eseguita dal medesimo soggetto; purtroppo per motivi organizzati questo non è stato possibile nel presente studio.

Cuccioli

Lo svezzamento è un periodo particolarmente stressante per i cuccioli, a causa del cambiamento di dieta, di ambiente e alle modifiche sociali a cui sono costretti. Tali stress rendono i cuccioli particolarmente suscettibili all'infezione da parte di patogeni e tra questi a quelli intestinali che fanno ridurre l'incremento ponderale e la qualità delle feci, causando spesso diarrea (Grellet et al., 2012).

Nel presente studio, i cuccioli a circa 40 giorni di vita sono stati spostati, insieme alle madri, nelle gabbie svezzamento, in un ambiente più grande, non riscaldato e a contatto visivo/uditivo con altri soggetti.

Il fecal score dei cuccioli è stato preso in considerazione a partire dal giorno 28 (T28), ossia da quando si è cominciato ad inserire l'alimento solido, quale parziale sostituto del latte.

Al giorno 28 (T28), i cuccioli appartenenti ai gruppi C e Y avevano un fecal score rispettivamente di 5 e 6 (Figura 28), senza differenze statistiche.

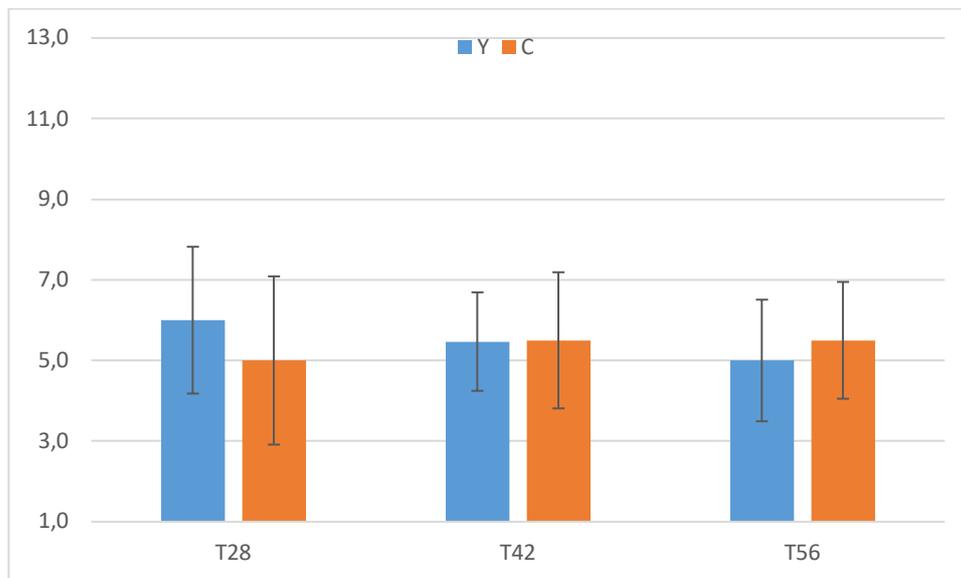


Figura 28. Fecal score medio dei cuccioli in 3 diversi time point (T28, T42 e T56), i valori vanno da 1 a 13, dove 1 rappresentano le feci liquide e 13 le feci secche.

Successivamente al primo mese (T28) ovvero, a 42 giorni, la media del fecal score per i due gruppi si pareggia e diventa 5,5, in entrambi i gruppi, per poi diminuire a 5 nel gruppo trattato (Y) e rimanere costante nel gruppo controllo (C). Quindi, da queste analisi si osservano differenze statistiche nel tempo* gruppo ($p < 0,05$): dal grafico sembra che il lievito somministrato alle madri non abbia avuto effetto sul benessere intestinale dei cuccioli, ma anzi abbia peggiorato progressivamente il fecal score. Tuttavia, è bene interpretare questo dato anche alla luce della progressiva insorgenza di patologie gastroenteriche le quali, modificando il microbiota, modificano anche la consistenza delle feci e allo stress che potrebbe essere stato causato dal cambio di ambiente.

4.2.4 SOSTANZA SECCA (SS) DELLE FECI

Gli effetti del lievito *S. cerevisiae var boulardi* sulla percentuale di sostanza secca delle feci sono stati valutati singolarmente, sia nelle madri che nei cuccioli. Le medie per gruppi, sono state valutate in tre time point (T1, T28 e T56).

Madri

Con riferimento alla SS delle feci materne, non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi C e Y, per l'intera durata della prova.

L'andamento del contenuto di SS nelle feci delle madri è riportato in Figura 29. Nello specifico, la SS delle feci materne, al momento del parto e poi durante tutto l'allattamento/svezzamento dei cuccioli, subisce modifiche che però non sono risultate significative.

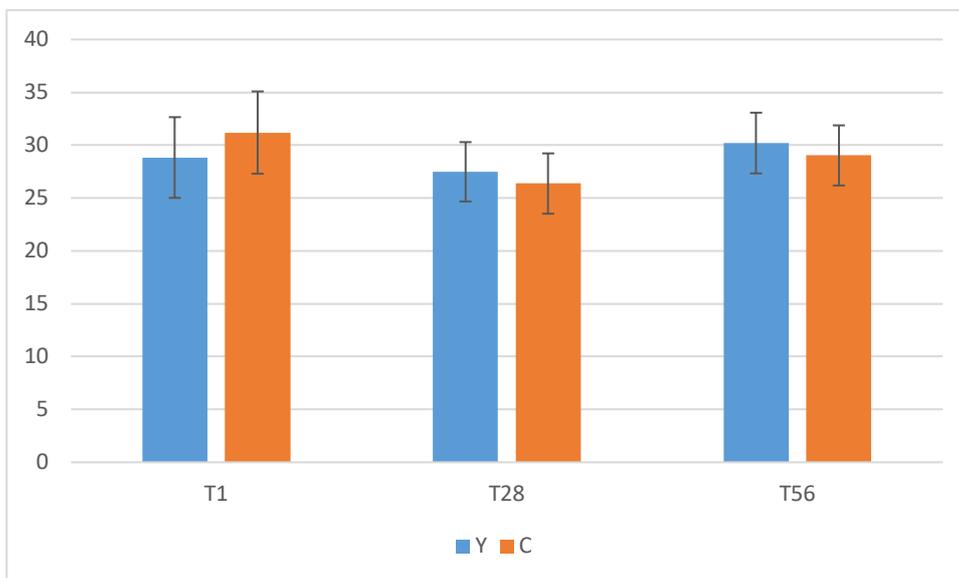


Figura 29. Sostanza secca media delle feci delle madri, espressa in percentuale, calcolata in tre time point (T1, T28 e T56).

Pertanto, alla luce dei risultati osservati, sembra che l'integrazione alimentare con lievito vivo *S. cerevisiae var boulardii* non influenzi il contenuto in sostanza

secca delle feci materne nel periodo del parto investigato. Risultati simili sono stati ottenuti in studi condotti su cani in mantenimento, a cui sono stati somministrati derivati di parete cellulare dei lieviti (Zentek et al., 2002; Grieshop et al., 2004; Martins et al., 2014; Pawar et al., 2017; Theodoro et al., 2019) e rilevato su scrofe in lattazione con diete addizionate con lieviti (Tan et al., 2015). L'umidità delle feci, infatti, può dipendere da molti fattori, e considerarla soltanto in funzione del trattamento probiotico può essere una visione troppo limitata. Essa può essere influenzata sia dalle condizioni del soggetto, quali: digeribilità dell'alimento, stress dovuto al cambio gabbie, interazioni con il personale dell'allevamento e parassiti o virus intestinali.

Cuccioli

Con riferimento al contenuto in sostanza secca nelle feci dei cuccioli, non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi (C e Y) per entrambi i time point indagati T28 e T56 (Figura 30).

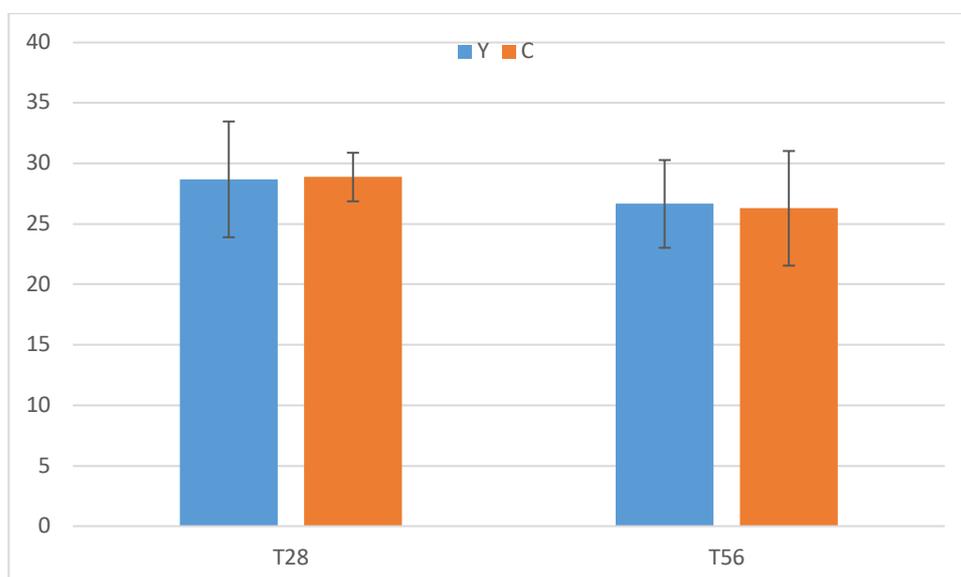


Figura 30. Sostanza secca media delle feci dei cuccioli, espressa in percentuale, calcolata in due time point (T28 e T56).

Tuttavia è stato osservato una leggera riduzione ($P < 0.05$) del contenuto in SS in funzione del tempo T28 > T56).

Come si evince dalla Figura 30, la SS delle feci è peggiorata con il tempo, ma tale dato deve essere letto alla luce anche dei dati del microbiota e dell'esame

parassitologico. I parassiti o virus, soprattutto in soggetti giovani, nei quali il sistema immunitario non è ancora completamente sviluppato, possono causare importanti danni alla mucosa intestinale, esitando in feci molli o diarree.

4.2.5 DIGERIBILITÀ APPARENTE TOTALE (ATTD) DELLA SS

Madri

La Figura 31, rappresenta la media e la deviazione standard della digeribilità apparente totale (ATTD) delle madri, calcolata nei gruppi C e Y, in tre diversi time point T1, T28 e T56.

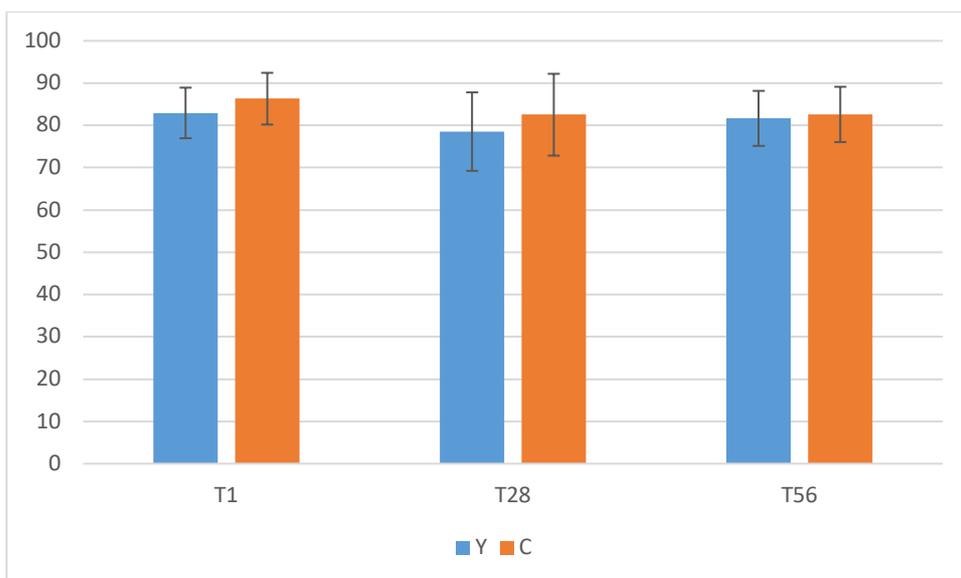


Figura 31. Digeribilità apparente totale (ATTD), espressa in percentuale e calcolata, tramite media e deviazione standard, per le madri, nei gruppi controllo (C) e trattato (Y), al tempo T1, T28 e T56.

I valori di ATTD riscontrati nel presente studio, sono compresi tra il 78,5 e l'86%, in linea con quanto riportato in letteratura, per cani in mantenimento (Pawar et al., 2017; Theodoro et al., 2019). Infatti, Pawar et al. (2017) e Theodoro et al. (2019) hanno rilevato una digeribilità apparente totale della SS, in diete addizionate con estratto di parete cellulare di lievito, compresa tra il 79,7 e l'83,6%. Tali valori risultano in linea, quando calcolati, nello stesso periodo di

lattazione, in altre specie, quali la scrofa (Veum et al., 1995; Shen et al., 2011) e cavallo (Glade, 1991) dove all'alimento era stata aggiunta una coltura di lievito. Nell'ambito della valutazione degli effetti della somministrazione di lievito vivo *Saccaromyces cerevisiae var boulardii* in cagne nel periodo del parto, sono state evidenziate alcune differenze tra i due gruppi sperimentali testati nell'ambito del presente studio in termini di ATTD. Nello specifico in termini di overall mean i valori di ATTD sono risultati più alti nel gruppo C rispetto al gruppo T (Tabella 11).

Studi riguardanti *S.cerevisiae* mostrano, come rilevato dal nostro studio, che sia nel cane (Martins et al., 2014; Stercova et al., 2016; Pawar et al., 2017; Theodoro et al., 2019; Lin et al., 2019; De Melo Santos et al., 2021) che scrofe in lattazione (Veum et al., 1995; Shen et al., 2011), nel coniglio (Rotolo et al., 2014) e nei pesci (Ozorio et al., 2010), l'integrazione con MOS, colture di lievito o lievito vivo non sembrano interferire sulla digeribilità apparente della sostanza secca.

In letteratura, però, si ritrovano dati discordanti. Infatti sono numerosi gli autori che hanno rilevato un miglioramento nella digeribilità apparente della sostanza secca (Glade et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Middelbos et al., 2007; Paryad and Mahmoudi, 2008; Agazzi et al., 2011; Giang et al., 2012; Zhang et al., 2019; Nari and Ghasemi, 2020; Park et al., 2020; Sampath et al., 2021).

Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che i lieviti sono in grado di aumentare l'espressione genica degli enzimi digestivi e di migliorarne l'effetto e di favorire la digestione di nutrienti come gli amidi, le fibre, gli zuccheri e le proteine etc (Morè and Vandenplas, 2018; Lazo-Valez et al., 2018; Ansari et al., 2021). Tuttavia, è bene ricordare che i lieviti vengono aggiunti, nelle diete destinate ai cani, principalmente per modificare l'ambiente intestinale del crasso, ma che la digestione, per questo animale, è già terminata a livello del colon. Ciò rende difficile l'osservazione dei cambiamenti riguardo la ATTD dei nutrienti (Pawar et al., 2017).

Dalla Figura 31, è possibile osservare una differenza numerica, non staticamente significativa, tra i tempi T1 e T28 ($P < 0.05$) indipendentemente dal gruppo. In particolare si nota che gli animali, a T1 digeriscono meglio che a T28, quando si verifica il picco di lattazione. La differenza a T1 coincide con il digiuno del post

travaglio. Da ciò si può dedurre che si tratti della riduzione stessa del feed intake, osservata in precedenza (Figura 20), ad aumentare la digeribilità dell'alimento. È noto, infatti, che digeribilità e assunzione di alimento sono inversamente proporzionali: una ridotta quantità di alimento nello stomaco migliora la digeribilità e viceversa (Antongiovanni, 1998).

Cuccioli

L'ATTD è stata calcolata, con le stesse modalità descritte in precedenza, anche per i 221 cuccioli nati da madri trattate con lievito o da madri controllo, per cui è stato fatto un pool di gabbia, in due tempi diversi: T35 e T56 giorni, dopo la nascita (Figura 32). È risultato opportuno cominciare a calcolare l'ATTD, dal giorno 35 post-parto, ossia dal giorno in cui i cuccioli avevano iniziato ad assumere quasi esclusivamente alimento secco.

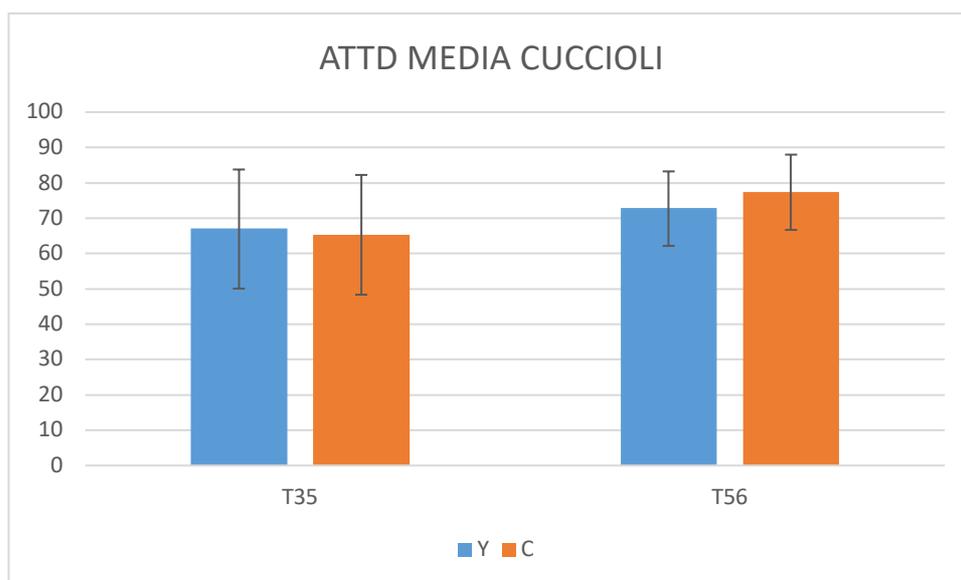


Figura 32. Digeribilità apparente totale (ATTD), espressa in percentuale, rilevata, tramite media e deviazione standard, per i cuccioli nati da madri del gruppo controllo (C) e del gruppo trattato (Y).

Nei cuccioli, i valori di ATTD sono compresi tra il 65% al T35 e il 77% al T56. I dati rilevati sono inferiori a quanto riportato nello studio di Swanson et al. (2004) che è pari all'81% nei cuccioli di cane di 8 settimane di età. Mentre, in altri studi condotti su suinetti di 25-28 giorni la ATTD ottenuta, dopo l'aggiunta di lievito vivo o in coltura, è pari all'82,5, 79,6% o 74,8% (Kornegay et al., 1995; Li et al., 2006; Shen et al., 2009).

I valori di ATTD osservati nell'ambito per presente studio si scostano leggermente dai valori riportati in altri lavori: 77,3% in Felix, et al. (2013); 80% in Domingues et al. (2019); 83% in Zanatta et al. (2011), ma occorre tener presente che gli animali considerati in questi ultimi, avevano un'età compresa tra i 5 e i 6 mesi.

Come si può osservare dalla Figura 32, non si evidenzia alcuna differenza significativa ($p > 0.05$) tra i due gruppi controllo e trattato (Y e C), e questo ci permette di affermare che la supplementazione di lieviti nelle diete delle madri non porta effetti positivi sul tratto gastroenterico del neonato e sulla sua conseguente capacità digestiva, come osservato nel suinetto (Veum and Bowman 1973; Kornegay et al., 1995; Li et al., 2006), dati discordanti con lo studio di Shen et al., (2009).

Invece, è possibile osservare una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra i tempi T35 rispetto al T56 per entrambi i gruppi. La differenza osservata nei tempi, è probabilmente da riferire allo sviluppo funzionale progressivo del tratto gastroenterico dei cuccioli perché la loro crescita è associata a molti cambiamenti sia nella morfologia che nella funzionalità del tratto gastrointestinale. Ciò, può avere importanti conseguenze sull'utilizzo dei nutrienti (Meyer et al., 1993; Buddington and Paulsen, 1998), che influenza molti fattori, come per esempio il microbiota intestinale, gli ormoni digestivi, la morfologia e l'immunità intestinale (Fahey et al., 2008). La digeribilità aumenta con lo sviluppo dell'animale, probabilmente in parallelo alla quantità di cibo ingerita dai cuccioli, ai cambiamenti nella lunghezza dell'apparato gastroenterico, alle modifiche della superficie di scambio, al tempo di transito del cibo e all'attività degli enzimi digestivi (Weber et al., 2003). Ad esempio, i neonati mantengono alte concentrazioni di lattasi durante tutto il periodo dell'allattamento, poi, passando a un'alimentazione solida, questi enzimi tendono a diminuire, in favore delle amilasi e a causa della sostituzione del lattosio con zuccheri diversi (Hand et al., 2010). In letteratura, indagini condotte su soggetti di età compresa tra i 3 mesi e un anno di vita hanno evidenziato che l'efficienza enzimatica si evolve in parallelo alla loro crescita (Gilham et al., 1993; Weber et al, 2003; Fahey et al. 2008). In soggetti maggiori di 5 mesi Weber et al. (2003) riscontra una maggiore digeribilità dei lipidi, mentre Gilham et al. (1993) accertano una maggiore digeribilità delle

proteine e anche Fahey et al. (2008) trova che gli adulti possiedono una maggior secrezione gastrica di pepsina e una maggiore digeribilità delle proteine. In effetti, i tre studi (Gilham et al., 1993; Weber et al, 2003; Fahey et al. 2008), confermano quanto emerso dal nostro studio e cioè che la digeribilità dei nutrienti migliora con l'età dell'animale, a seguito della maturazione del suo tratto gastroenterico.

4.2.6 GIARDIA SPP. E CORONAVIRUS CANINO (CCV)

Giardia spp. e Coronavirus canino (CCV) sono i patogeni intestinale tra i più diffusi nei cani, soprattutto tra quelli in regime di allevamento, dove purtroppo possono interferire con la salute e le performance degli animali (Grellet et al., 2018).

La prevalenza di patologie gastroenteriche è molto maggiore negli allevamenti, nei canili o nei rifugi ed è stata constatata da più autori (Sokolow et al., 2005; Stavinsky et al., 2011; Grellet et al., 2014a).

Per questo l'allevamento deve essere considerato l'ambito in cui interagiscono gli ospiti, ovvero i cani con le loro caratteristiche (soggetto, età, genetica e immunità) e i patogeni (parassiti/batteri/virus, virulenza): fattori influenzati a loro volta dal management e dall'ambiente (densità degli animali, stress, igiene, temperatura, umidità, protocolli profilattici) (Grellet et al., 2018).

Giardia spp. e Coronavirus canino (CCV), sono stati isolati in madri e cuccioli attraverso una PCR a partire da campioni fecali, la cui raccolta è stata eseguita su tre giorni consecutivi.

I risultati sono riportati in Tabella 10 per le madri e in Tabella 11 per i cuccioli.

Madri

Tabella 13. Dati relativi alla prevalenza di *Giardia spp.* e Coronavirus canino (CCV) nelle madri a T28 e T56.

Madri	Gruppo	<i>Giardia spp.</i> T28	<i>Giardia spp.</i> T56	Coronavirus T28	Coronavirus T56
YA	Y	Negative	Negative	Positive	Positive
YB	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
CB	C	Positive	Positive	Positive	Positive
YC	Y	Positive	Negative	Positive	Positive
CC	C	Negative	Positive	Positive	Positive
YD	Y	Positive	Negative	Positive	Positive
CD	C	Positive	Positive	Positive	Positive
YE	Y	Negative	Positive	Positive	Positive
CE	C	Negative	Positive	Positive	Positive
YF	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
CF	C	Negative	Positive	Positive	Positive
YG	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
CG	C	Negative	Positive	Positive	Positive
YH	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YK	Y	Negative	Positive	Positive	Positive
CK	C	Negative	Negative	Negative	Positive
YJ	Y	Positive	Negative	Positive	Positive
CJ	C	Positive	Negative	Positive	Positive
CL	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CI	C	Negative	Negative	Positive	Positive
YL	Y	Negative	Positive	Positive	Positive
CM	C	Positive	Negative	Positive	Positive
CN	C	Positive	Positive	Positive	Positive
YO	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
CO	C	Positive	Positive	Positive	Positive
YP	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
CP	C	Positive	Negative	Positive	Positive
YQ	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
CQ	C	Positive	Negative	Positive	Positive
YR	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
CR	C	Positive	Positive	Positive	Positive
YS	Y	Positive	Negative	Positive	Positive
CS	C	Positive	Positive	Positive	Positive
YU	Y	Positive	Negative	Positive	Negative

Al T1 la prevalenza di *Giardia spp.* è del 41%, di cui 13/23 sono del gruppo Y e i restanti 10/23 sono del gruppo C, senza differenze statisticamente significative tra i 2 gruppi ($p > 0,05$).

Al T56 le madri positive a *Giardia spp.* sono il 39% e di questi gli 11/21 appartengono al gruppo Y e i 10/21 al gruppo C, senza differenze statistiche tra i due gruppi.

Osservando i soggetti positivi nei due tempi, si nota che una parte di loro risultano positivi in entrambi i tempi portando così ad affermare che il lievito non ha avuto effetto sul miglioramento dell'intestino e quindi non è stato in grado di diminuire la prevalenza di *Giardia spp.*, come invece è stato riportato in uno studio condotto sui gerbilli (Ribeiro et al., 2018; Ribeiro et al., 2021).

Altri soggetti risultati negativi al T28 sono poi risultati positivi al T56 o viceversa. Questi cambiamenti possono essere spiegati nel primo caso (negativi a T28 e positivi a T56) considerando il tempo di incubazione di questo protozoo (12-19 giorni), nel secondo caso (positivi a T28 e negativi a T56) considerando le caratteristiche di *Giardia spp.*, ovvero la sua capacità di emettere oocisti in maniera fluttuante (www.esccap.it). Le differenze riscontrate nella prevalenza potrebbero sottostimare la reale diffusione del parassita, perché l'effetto diluizione potrebbe aver reso la sua presenza troppo bassa per essere rilevata. La prevalenza di *Giardia spp.* rilevata in questo studio riscontra valori dissimili da quelli trovati in letteratura (Mochizuki et al., 2001; Itho et al., 2005; Claerebout et al., 2009; Scaramozzino et al., 2009; Epe et al., 2010; Bouzid et al., 2015). Le differenze sono dovute alla diversa età degli animali considerati, alle caratteristiche dell'allevamento, ai metodi di rilevamento e all'area geografica presa in esame. Ad esempio, è stata trovata una prevalenza pari al 15,2% (Bouzid et al., 2015) o 20,5% in allevamenti italiani (Scaramozzino et al., 2009), al 21% (Epe et al., 2010), dal 37,4% al 48,2% in allevamenti giapponesi (Mochizuki et al., 2001; Itho et al., 2005) o al 43,9% in allevamenti del Belgio (Claerebout et al., 2009). Queste percentuali poi tendono ad aumentare nei soggetti con diarrea o feci molli (Claerebout et al., 2009; Epe et al., 2010; Bouzid et al., 2015), e occorre considerare che molto spesso *Giardia spp.* può dare gastro-enteriti acute autolimitanti con diarree o forme subcliniche difficili da

diagnosticare (Villeneuve et al., 2000; Ballweber et al., 2010; Bouzid et al., 2015). Nel nostro studio, infatti, la positività a *Giardia spp.* non sembra associata a variazioni o ad un peggioramento nella consistenza delle feci, per cui gli animali risultavano per lo più asintomatici, rischio significativo per la biosicurezza.

Dai dati riportati in Tabella 13 si evince che il lievito somministrato non ha avuto effetto su *Giardia spp.*, al contrario di quanto osservato in altri studi (Benyacoub et al., 2005; Besirbellioglu et al., 2006; Travers et al., 2011; Ribeiro et al., 2018; Ribeiro et al., 2021) che hanno utilizzato lo stesso ceppo *S.cerevisiae var boulardii* o altri come *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus johnsonii* o *Lactobacillus casei*. *S.cerevisiae var boulardii*, hanno dimostrato la capacità di diminuire la carica parassitaria di *Giardia spp.* in gerbilli trattati e di ridurre i danni causati dal patogeno (atrofia dei villi, apoptosi degli enterociti e ridotto assorbimento dei nutrienti). *S.cerevisiae var boulardii* stato anche in grado di aumentare il muco prodotto, riducendo l'adesione del protozoo, di aumentare l'altezza dei villi e la profondità delle cripte intestinali contrastando gli effetti negativi di *Giardia spp.* (Ribeiro et al., 2018; Ribeiro et al., 2021). Nell'uomo si è dimostrato che il lievito associato a Metronidazolo riduce il suo tempo di escrezione e il numero di cisti escrete con le feci (Besirbellioglu et al., 2006) e in più che *S.cerevisiae var boulardii* non previene direttamente l'infezione, ma aiuta la ripresa dalla sindrome del colon irritabile comparsa post infezione (Travers et al., 2011).

In un altro studio Benyacoub et al. (2005) che ha utilizzato *E.faecium* nei topi, è stato rilevato che questo probiotico ha migliorato l'immunità locale (IgA) contro *Giardia spp.* Mentre, in Travers et al. (2011) l'uso di *Lactobacillus casei* ha ridotto l'infiltrazione del protozoo nel piccolo intestino e l'atrofia dei villi da esso colpiti. In più, sempre in Travers et al. (2011), *Lactobacillus johnsonii*, *in vitro*, si è dimostrato capace di inibire la crescita di *Giardia spp.* e, *in vivo*, ha ridotto il numero di cisti fecali e il periodo di prepatenza, migliorando la salute generale dei gerbilli trattati.

Per quanto riguarda invece il Coronavirus canino (CCV), la prevalenza è pari al 97% nei due tempi considerati.

La trasmissione di questo virus è oro-fecale e le caratteristiche stesse dell'allevamento (ambienti sovraffollati, inserimenti frequenti di nuovi soggetti, non adeguata separazione tra le diverse zone quali maternità, nursery, gabbie per adulti, quarantena e infermeria), lo stress, la concomitante presenza di altri patogeni (passiti, batteri e virus) ne possono permettere la forte diffusione (Bandai et al., 1999).

Nel presente studio, tutti i soggetti usati per la prova, risultano essere asintomatici, in quanto non manifestano una riduzione del fecal score (Figura 30), ma sono reservoiri della patologia e la tramettono ad altri soggetti e anche ai loro cuccioli, come anche riportato da Stavinsky et al. (2010). Dalla Tabella 10 non si osserva un effetto legato alla somministrazione di lievito.

Lopez-Santamarina et al. (2021) riporta che altri probiotici quali il *Lactobacillus casei* e l'*Enterococcus faecium*, nell'uomo, hanno causato una riduzione dei batteri lattici con effetto protettivo verso una forma di gastroenterite da *Coronavirus* e sempre i Lactobacilli si sono dimostrati efficaci nel contrastare la crescita, in vitro, dei Coronavirus gastroenterici.

Cuccioli

Dei 251 cuccioli totali presenti nell'allevamento, ne sono stati selezionati 55 da sottoporre alle analisi di rilevamento di *Giardia spp.* e Coronavirus (CCV) che sono state effettuate al T35 e al T56. È stato scelto il giorno 35 perché, è a partire dalla 5 settimana di vita che si sviluppano le diarree associate a *Giardia spp.* e CCV, concomitanti con l'inizio delle vaccinazioni che possono debilitare il sistema immunitario (Dupont et al., 2013; Grellet et al., 2014a).

I risultati ottenuti sono stati riportati nella Tabella 14.

Tabella 14. Dati relativi alla prevalenza di *Giardia spp.* e Coronavirus canino (CCV) nelle madri a T28 e T56.

Cuccioli	Gruppo	<i>Giardia spp.</i> T28	<i>Giardia spp.</i> T56	Coronavirus T28	Coronavirus T56
YA1	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YA3	Y	Negative	Negative	Positive	Positive
YA4	Y	Negative	Negative	Positive	Positive
CB1	C	Positive	Positive	Positive	Positive
CB2	C	Positive	Positive	Positive	Positive
CB3	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CB5	C	Positive	Positive	Positive	Positive
CC1	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CC2	C	Positive	Positive	Positive	Positive
CC3	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CC4	C	Positive	Positive	Positive	Positive
CD1	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CD2	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CD3	C	Positive	Positive	Positive	Positive
CD4	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CD5	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CD6	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CD7	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CD8	C	Positive	Positive	Positive	Positive
CD9	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CD10	C	Negative	Negative	Positive	Positive
YD1	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YD2	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YD5	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YF1	Y	Negative	Negative	Positive	Positive
YF2	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YF3	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YF4	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YF6	Y	Negative	Negative	Positive	Positive
YF7	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YF8	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YF9	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
CG1	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CG2	C	Positive	Positive	Positive	Positive
CG3	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CG5	C	Negative	Negative	Negative	Positive
CG6	C	Positive	Positive	Positive	Positive
CG7	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CG8	C	Negative	Negative	Positive	Positive
YJ1	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YJ2	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YJ3	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YJ5	Y	Positive	Positive	Positive	Positive

YJ6	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YJ7	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YL1	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YL3	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
CK1	C	Negative	Negative	Positive	Positive
CK2	C	Positive	Positive	Positive	Positive
CK3	C	Positive	Positive	Positive	Positive
CK4	C	Positive	Positive	Positive	Positive
YP1	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YP2	Y	Negative	Negative	Positive	Positive
YP4	Y	Positive	Positive	Positive	Positive
YP7	Y	Negative	Negative	Positive	Positive

La prevalenza di *Giardia spp.* nei cuccioli è pari al 37% sia a T35 che a T56, valore intermedio rispetto a quanto indicato da studi presenti in letteratura (Itho et al., 2001, Itho et al., 2005; Grellet et al., 2014a; Grellet et al., 2014b), dove vengono considerati cuccioli di età compresa tra le 4 settimane e i 9 mesi di età, viene riportato un minimo di prevalenza di *Giardia spp.* del 13.4% e un massimo di *Giardia spp.* del 50%. Le percentuali sono più alte (x3,5 volte) in allevamenti di grandi dimensioni e doppie rispetto a quanto si riscontra in soggetti mantenuti in casa (Grellet et al., 2018) e i cuccioli con età inferiore ai 6 mesi sono a maggiore rischio infezione (Grellet et al., 2014a). Essa risulta particolarmente diffusa in soggetti giovani, come quelli qui esaminati, che non hanno ancora un sistema immunitario completamente sviluppato e in allevamenti di grandi dimensioni dove è più difficile mantenere alto lo standard igienico (Dupont et al., 2013).

Dei 55 cuccioli considerati, 32 sono risultati positivi, come illustrato in Tabella 14, 20 cuccioli appartengono al gruppo Y e solo 12 al gruppo C: non è una differenza statisticamente significativa ($p > 0,05$) per cui il lievito somministrato alle madri, non sembra non avere avuto effetti benefici sulla mucosa intestinale dei cuccioli e non avere la capacità di prevenire l'infestazione da parte del protozoo a differenza di quanto dimostrato in letteratura (Czerucka et al., 2019; Ribeiro et al., 2018, Ribeiro et al., 2021; Ansari et al., 2021).

Nel cucciolo la *Giardia spp.* è stata associata a problematiche digestive, vomito e diarrea, nel nostro studio però la positività non è associata ad un numero più rilevante di feci molli. Molto spesso, infatti, tali sintomatologie non sono riferibili alla presenza di un solo patogeno visto che ne coesistono due o più. È perciò

importante fare una valutazione generale dello stato di salute del cucciolo (Gates et al., 2009; Tupler et al., 2012; Grellet et al., 2018).

La prevalenza di Coronavirus canino (CCV) nei cuccioli è del 98% al T35 e del 100% al T56 similmente a quanto trovato nelle madri. Anche in letteratura (Tennant et al., 1993; Yesilbag et al., 2004; Dupont et al., 2013; Grellet et al., 2014a), sono state trovate prevalenza dal 20,3% fino al 100%, maggiore in cuccioli di allevamento, piuttosto che in soggetti che vivono in casa (Tennant et al., 1993; Bandai et al., 1999; Naylor et al., 2001).

I soggetti più sensibili a questo virus sono i cuccioli, sotto l'anno di età, in particolare sotto le 12 settimane di vita (<https://www.izsvepets.it/coronavirus-canino-ccov/>) a conferma dell'altissima prevalenza riscontrata nello studio.

Il CCV causa una blanda infezione autolimitante della mucosa. Vengono colpiti i villi che subiscono atrofia e fusione e si sviluppa una sintomatologia gastroenterica che comprende diarrea mucoide, anoressia, vomito e disidratazione (Yesilbag et al., 2004). La diarrea causata da questo virus ha suscitato sempre più interesse (Yesilbag et al., 2007; Grellet et al., 2014a) visto la sua alta prevalenza: alcuni autori non evidenziano la comparsa di diarrea in soggetti positivi (Sokolow et al., 2005; Tupler et al., 2012), mentre altri segnalano casi gravi associati ad altre forme virali (Evermann et al., 2005; Decaro et al., 2006). In questo studio la positività a Coronavirus non è associata a modifiche nel fecal score e non si osservano effetti dovuti alla somministrazione di lievito, come osservato per le madri.

4.2.7 MICROBIOTA INTESTINALE

Il concetto di microbiota è stato suggerito, per la prima volta, da Lederberg and McCray (2001), per indicare *“la comunità ecologica di microrganismi commensali, simbiotici e patogeni che condividono lo spazio del nostro organismo”*. Più precisamente, con il termine “microbiota” si fa riferimento a un insieme di comunità batteriche presenti sulle superfici mucose, come nell'intestino, nella vagina, nella bocca o in altri distretti come per esempio, la cute.

Il microbiota intestinale svolge un ruolo cruciale nella regolazione della salute dell'ospite: stimola il sistema immunitario e lo sviluppo di un epitelio intestinale sano, difende contro gli agenti patogeni invasori, favorisce la digestione e la raccolta di energia dalla dieta poiché produce acidi grassi a catena corta e vitamina B12 e permette il metabolismo e la fermentazione di polisaccaridi e aminoacidi (Laparra and Sanz, 2010; Handl et al., 2011; Blake and Suchodolski, 2016).

Studi molecolari hanno rivelato che il tratto gastrointestinale dei mammiferi ospita un microbiota altamente complesso che include batteri (98% delle sequenze evidenziate dal sequenziamento), archea, funghi, protozoi e virus (Swanson et al., 2011). Si stima che il carico microbico totale nell'intestino sia compreso tra 10^{12} e 10^{14} organismi, circa 10 volte il numero di cellule che compongono l'organismo animale (Suchodolski, 2011; Schmitz and Suchodolski, 2016).

Tali studi, che hanno sostituito i tradizionali metodi di coltura batterica (Tannock, 2005), hanno permesso il sequenziamento del RNA batterico, tramite il gene 16S, per identificare le specie batteriche presenti. Questo gene contiene sequenze altamente conservate di basi nucleotidiche uniche, ovvero una regione che porta informazioni filogenetiche a livello di gruppo e di specie (Tannock, 2005). I campioni più comunemente utilizzati sono le feci, anche se possono essere utilizzati campioni di mucosa o di contenuto dei diversi segmenti del tratto gastroenterico, ottenuti tramite biopsia (Suchodolski et al., 2009; Suchodolski et al., 2010; Swanson et al. 2011; GarciaMazcorro et al., 2011; Handl et al., 2011; Suchodolski et al., 2012a; Suchodolski et al. 2012b; Handl et al., 2013; Honneffer et al. 2014; Minamoto et al. 2014; Schmitz and Suchodolski, 2016).

Da questi studi si è rilevato che *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, e *Proteobacteria* sono i *phyla* più abbondanti, mentre *Clostridiales* è l'ordine batterico a maggior prevalenza (Suchodolski et al., 2009; Suchodolski et al., 2010; Swanson et al. 2011; GarciaMazcorro et al., 2011; Handl et al., 2011; Suchodolski et al., 2012a; Suchodolski et al. 2012b; Handl et al., 2013; Honneffer et al. 2014; Minamoto et al. 2014; Schmitz and Suchodolski, 2016).

Il numero e la diversità batterica aumentano gradualmente lungo tutto il tratto gastrointestinale (Suchodolski et al., 2005): nello stomaco, la carica batterica

totale è relativamente bassa e il *phylum* prevalente appartiene ai Proteobatteri (99,6% - *Helicobacter* e *Lactobacillus spp*) con pochi *Firmicutes* (0,3%) (Garcia-Mazcorro et al. 2012). Nel duodeno, la popolazione di microorganismi consiste di sei *phyla* primarie: *Firmicutes* (46,4% - *Clostridiales* (40%), Proteobatteri (26,6%), *Bacteroidetes* (11,2%), *Spirochaetes* (10,3%) *Fusobacteria* (3,6%) e *Actinobacteria* (1%) (Xenoulis et al. 2008). Nel digiuno, i Proteobatteri sono i più abbondanti (46%), seguiti da *Firmicutes* (15% - *Clostridiales* 39%), *Actinobacteria* (11,2%), *Spirochaetes* (14,2%), *Bacteroidetes* (6,2%) e *Fusobacteria* (5,4%) (Suchodolski et al., 2009). Nell'ileo sono risultati predominanti gli ordini di *Fusobacteriales* (30%), e *Clostridiales* (22%). Nel colon, infine, sono presenti i *phyla* di Fusobatteri, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (circa il 30% ciascuno), *Clostridiales* (18%), *Lactobacillales* (10%) e Proteobatteri in basse proporzioni (1,4%) (Suchodolski et al., 2008; Schmitz and Suchodolski, 2016).

Come riportato da Simpson et al. (2002), nelle feci di cane, la popolazione batterica più numerosa (4×10^{10} ufc/g feci) è rappresentata da *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* e, in minore quantità 10^7 batteri/g feci, enterococchi, costridi, bifidobatteri e eubatteri. Inoltre, indagini successive hanno trovato che la popolazione batterica più rappresentata era costituita da *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria*, in percentuali diverse, a seconda dello studio preso in esame (Middelbos et al., 2010; Swanson et al., 2011).

Tuttavia, le proporzioni dei *phyla* variano a seconda dell'animale (dieta, razza, stato di salute ed età), all'ambiente di vita o al tipo di analisi utilizzate (metodi di raccolta e manipolazione dei campioni, metodi di estrazione di DNA e RNA, primer e metodi di sequenziamento) (Deng and Swanson, 2015).

Il microbiota intestinale, che si evolve nel tempo, si stabilizza quasi completamente in età adulta (Buddington et al., 2003). Fino ad alcuni anni fa, si pensava che il tratto gastroenterico fosse sterile alla nascita, ma poi tale teoria è stata rivalutata. Si ritiene infatti, che come avviene nel bambino e nel topo, ci sia un microbiota che colonizza l'intestino, prima della nascita (Rautava et al., 2012). Poi, con il passare delle ore, le specie batteriche passano dalla madre al cucciolo

attraverso il canale del parto, l'ambiente, la mammella e il latte (Buddington et al., 2003).

L'alimentazione è fondamentale per modulare la struttura e la funzione del microbiota intestinale: i nutrienti (macronutrienti e micronutrienti) interagiscono direttamente con i microrganismi per promuoverne o inibirne la crescita (Middelbos et al., 2010; Zmora et al., 2019). Centrali, in questo meccanismo, sono i carboidrati indigeribili (glicani), che derivano principalmente da fonti vegetali, animali, fungine o algali, che fanno parte della dieta (Middelbos et al., 2010; Pinna and Biagi, 2014). Inoltre, la capacità microbica di ottenere energia dalla dieta conferisce ai microrganismi quel vantaggio che li rende capaci di proliferare a spese dei competitors. Questo aspetto dimostra che la dieta influenza non solo la numerosità dei batteri, ma anche la loro cinetica di crescita (Zmora et al., 2019).

Studi condotti su erbivori e carnivori hanno analizzato diete diverse che hanno rivelato configurazioni microbiche tipiche in relazione alle preferenze alimentari dell'animale (Zmora et al., 2019). Le popolazioni batteriche del microbiota vengono classificate in saccarolitiche o proteolitiche e la proporzione tra le due varietà mantiene in equilibrio il microbiota dell'ospite (Case et al., 2010). Nel cane devono prevalere i saccarolitici.

Quando si verifica un'alterazione nella composizione delle popolazioni batteriche e di conseguenza uno squilibrio tra di esse, si ha una disbiosi, spesso associata ad uno stato di malattia. Questo squilibrio potrebbe essere dovuto all'aumento o alla perdita di determinati ceppi di microrganismi, ossia cambiamenti nella proporzione tra le diverse popolazioni (Said et al., 2018). Studi condotti sia sulla specie umana che su quelle di interesse veterinario hanno evidenziato una relazione tra disbiosi intestinale e disordini gastrointestinali, IBD, colite granulomatosa e sindrome del colon irritabile (Handl et al., 2011; Suchodolski et al., 2012a; Suchodolski et al., 2012b; Honneffer et al., 2014; Minamoto et al., 2014). Ad oggi però, non è ancora stato chiarito se la disbiosi sia la causa o la conseguenza di patologie gastrointestinali: probabilmente si tratta di una condizione concomitante. In alcuni studi (Mizoguchi and Mizoguchi, 2010; Mondot et al., 2011; Well et al., 2011), si afferma che l'infiammazione intestinale

cronica causa disbiosi, ma, che nello stesso tempo, sia un fattore di rischio per patologie a carattere infiammatorio.

Le variazioni nei rapporti percentuali delle popolazioni microbiche sono solitamente associate a funzioni metaboliche alterate del microbiota, come ad esempio, la diminuzione delle concentrazioni di acido grassi a corta catena, l'inibizione del metabolismo degli aminoacidi e degli acidi biliari, il cambiamento dell'equilibrio nelle reazioni di ossidoriduzione che incentivano lo stato infiammatorio dell'ospite (Blake and Suchodolski, 2016; Schmitz and Suchodolski, 2016).

Altri studi hanno cercato di caratterizzare la composizione microbica fecale, in cani con diarrea acuta o cronica. Nella condizione acuta, è stato osservato un aumento di *Clostridium spp.*, *E. coli*, *Lactobacillus* ed *Enterococcus spp.* con concomitante riduzione dei normali ceppi batterici (*Faecalibacterium*, *Ruminococcaceae* e *Blautia spp.*) (Bell et al., 2008; Minamoto et al., 2014b; Guard et al., 2015). Nella condizione cronica, invece, sono stati trovati numerosi ceppi di *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* ed *E. coli* e una diminuzione di Fusobatteri, *Ruminococcaceae*, *Blautia spp.* e *Faecalibacterium spp.* (Jia et al., 2010; Minamoto et al. 2014b).

Le osservazioni condotte su altri cani con IBD hanno rilevato un cambiamento del microbiota simile a quanto osservato nell'uomo affetto dalla stessa patologia. In campioni cellulari dell'orletto a spazzola, sono state osservate sia una significativa riduzione della varietà dei microrganismi, sia una maggiore quantità di *Enterobacteriaceae* rispetto ai cani sani (Xenoulis et al., 2008). Inoltre, in biopsie della mucosa duodenale si è visto un maggior numero di Proteobatteri e una minore quantità di Clostridi (Suchodolski et al., 2010; Minamoto et al., 2014a, b). Per riportare in equilibrio la flora intestinale si è sempre più fatto ricorso all'impiego gli alimenti supplementari, prebiotici e probiotici (Gibson and Kolida, 2008).

In questo studio, è stato esaminato il microbiota delle madri con lo scopo di ricercare eventuali modifiche apportate da *S.cerevisiae var boulardi*.

Madri

Il microbiota delle madri è stato analizzato attraverso estrazione del DNA e sequenziamento.

Nei campioni analizzati, sono stati trovati un totale di 505 taxa, composti da 7 ranghi tassonomici. Il numero minimo e massimo di sequenze è stato rispettivamente di 11617 e di 22514, per un numero totale di 1791332 sequenze. L'analisi degli indici ASV, Chao1 e Shannon mostrano che l'alfa diversità, calcolata al T1, ha valori inferiori ($p < 0,05$) in rapporto ai tempi T28 e T56, ma non sono state osservate differenze tra i due gruppi di animali (Figura 33).

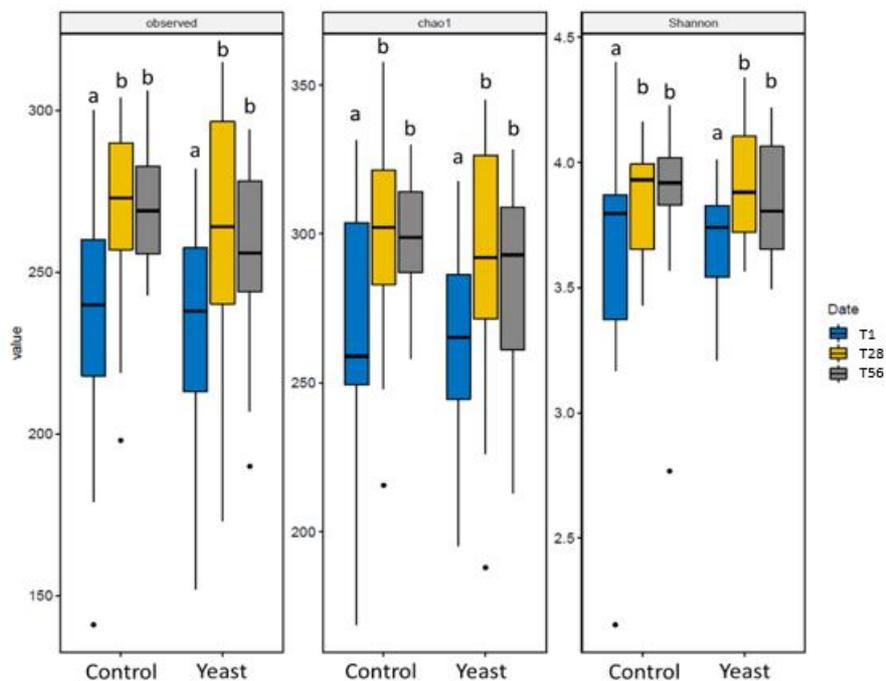


Figura 33. Indici di alfa diversità (AVS, Chao1 e Shannon) nelle madri di controllo e additivate con lievito, dopo 1 (T1), 28 (T28) e 56 (T56) giorni dal parto (lettere diverse indicano un $p < 0,05$).

Una riduzione degli indici di alfa diversità al T1, quindi al primo giorno post parto, indicano una riduzione nell'abbondanza e nella diversità della composizione. Si tratta di indici correlati alla stabilità del sistema microbico, quindi una loro riduzione può indicare una disbiosi (Wernet et al., 2014). Ciò dimostrerebbe che l'organismo è meno capace di rispondere alle perturbazioni del tratto gastroenterico, è più a rischio di essere colonizzato dai patogeni normalmente presenti nell'intestino (McCan, 2000; Dillon et al., 2005) ed è meno resistente

(Stecher et al., 2010). In più, una riduzione della biodiversità, quindi dell'indice Chao1, è stata associata a una maggiore espressione delle citochine infiammatorie (Mulder et al., 2009).

Non si osservano differenze tra i gruppi e di conseguenza si può affermare che nelle madri, il lievito non agisce sulla alfa diversità del microbiota fecale. Ciò è stato dimostrato anche per cani in mantenimento, dove colture di *S.cerevisiae* non ha modificato l'alfa diversità in cani adulti a cui è stata fornita la supplementazione di lievito (Lin et al, 2019; De Melo Santos et al, 2021), mentre uno studio, condotto su scrofe in gestazione, ha dimostrato che lo stesso lievito, idrolizzato, aumenta tale diversità (Hasan et al., 2018). *S.cerevisiae var bouhardi*, secondo Floch et al. (2022), permette di diminuire la richness dopo 28 giorni in scrofe in lattazione.

Le differenze, osservate in entrambi i gruppi al T1 sono perciò da correlare al parto.

Il periodo del periparto è un momento critico per l'animale che subisce cambiamenti importanti negli ormoni (aumento del progesterone), nel metabolismo (minore sensibilità all'insulina e aumento della resistenza insulinica) e nell'immunità (inibizione della secrezione di NF- κ B complesso proteico fondamentale per la risposta immunitaria alle infezioni) (Newbern and Freemark, 2011). Tali cambiamenti influenzano sul microbiota intestinale, per cui risulta importante tenere in considerazione che la gestione di questo particolare momento è molto critica e deve essere tesa ad evitare la comparsa di infezioni.

In letteratura, è stata osservata la stessa diminuzione della richness e del numero totale di OTU nella scrofa, tra i 5 giorni prima del parto e le 6 ore *post-partum* (Huang et al., 2019). Invece, i dati presenti in letteratura umana, dimostrano che quando durante la gravidanza ci sono forti cambiamenti nel microbiota intestinale della madre (Jiang et al., 2021), al periparto gli indici di *alfa diversità* non si modificano, ma indicano una situazione più stabile che perdura per 1 mese circa dopo il parto (Jost et al., 2014).

Nel nostro studio si è osservato che a 28 giorni di lattazione, la *alfa diversity* migliora e tende a restare stabile per i giorni seguenti. Anche Ji et al. (2019) hanno riscontrato, nelle scrofe a 21 giorni di lattazione, un aumento dell'indice

Shannon e delle specie osservate. Inoltre, hanno trovato che ad un aumento della *alfa diversità*, corrisponde una certa stabilità del microbiota e un miglioramento delle performance che favorisce la crescita dei cuccioli (Ji et al., 2019).

In questo studio, a livello di famiglie, la composizione tra i due gruppi era simile in ciascuno dei tre tempi. Tuttavia, indipendentemente dal trattamento, sono state osservate alcune differenze a livello di famiglia tra i tempi T1, T28 e T56 (Figura 34 e 35). In particolare, l'abbondanza di *Streptococcaceae* è maggiore nei gruppi al T28 e T56, rispetto a T1, indipendentemente dal trattamento. Al contrario, l'abbondanza della famiglia delle *Corynebacteriaceae* è maggiore in T1, rispetto al T28 e al T56.

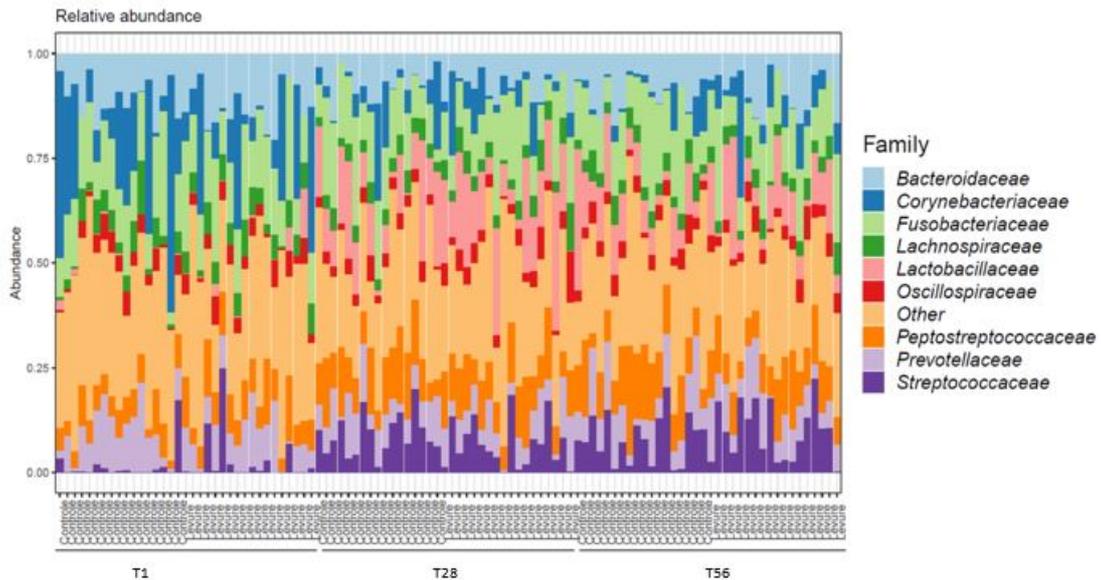


Figura 34. Abbondanza relativa a livello di famiglia nei gruppi di controllo e con supplemento di lievito al giorno 0 (T1), al giorno 28 (T28) ed al giorno 56 (T56) dopo la somministrazione del lievito.

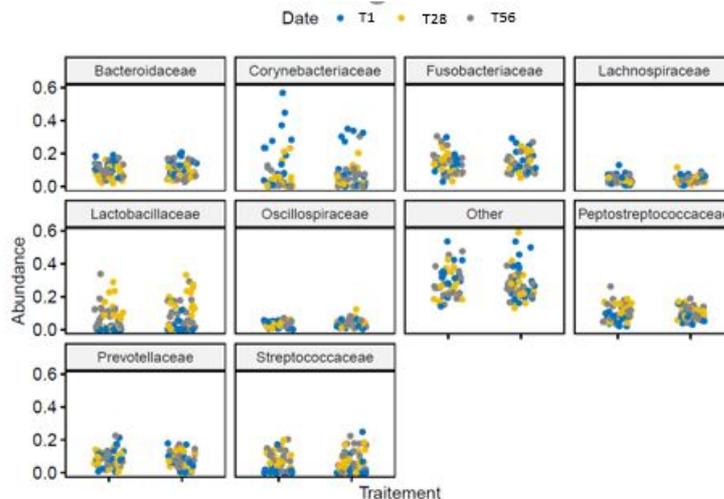


Figura 35. Una diversa rappresentazione della composizione dei taxa, a livello di famiglie, nei gruppi di controllo (a sinistra) o addizionati con lievito (a destra) dopo 1 (T1, blu), 28 (T28, giallo) e 56 (T56, grigio) giorni.

La distribuzione delle principali famiglie corrisponde a quanto riportato in letteratura per il cane (Suchodolski et al., 2008; Middelbos et al., 2010; Swanson et al., 2011; Schmitz and Jan Suchodolski, 2016), per il quale i più presenti nel colon e nelle feci risultano essere i *phyla* dei *Firmicutes*, (famiglie *Oscillospiraceae* e *Lachnospiraceae* (genere *Clostridium*), *Streptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Lactobacillaceae* (genere *Lactobacillus*), *Bacteroidetes* (famiglie *Bacteroidaceae* e *Prevotellaceae*), *Fusobacteria* (famiglia *Fusobacteriaceae*), *Actinobacteria* (famiglia *Corynebacteriaceae*).

L'aumento delle *Streptococcaceae*, famiglia appartenente ai lattobacilli, al T28 e T56, è un riscontro positivo visto che questo *genus* è associato al miglioramento della permeabilità intestinale, al miglioramento della barriera intestinale e della risposta immunitaria che contrasta l'infiammazione (Harmsen et al., 1999). In studi condotti sulle scrofe e sull'uomo, risulta che la famiglia dei *lactobacillaceae* comincia ad aumentare subito dopo il parto (Jost et al., 2014; Huang et al., 2019) e resta numerosa fino allo svezzamento (Ji et al., 2019). Secondo Huang et al. (2019), l'aumento del *phylum Firmicutes*, a cui appartengono le *Streptococcaceae*, è stato associato ad un incremento del metabolismo di carboidrati e lipidi, il quale stimola la produzione del latte di scrofa.

L'incremento del *Corynebacteriaceae* al tempo T1 in letteratura trova conferma nei dati relativi all'uomo (Jost et al., 2014).

Dai risultati riportati nel presente studio non appaiono effetti dovuti all'aggiunta di lievito perché non si osservano diversità tra i gruppi, a differenza di quanto osservato in letteratura dopo l'aggiunta di MOS, lieviti idrolizzati, colture o lieviti vivi (Swanson et al., 2002; Grieshop et al., 2004; Hasan et al., 2018; Lin et al., 2019; De Melo Santos et al., 2021; Dunier et al., 2021). Sempre in letteratura gli *Actinobacteria* risultano aumentati al momento del parto e nel post parto dopo dall'aggiunta di lievito di *S.cerevisiae* vivo (Duniere et al., 2021). I lattobacilli, a cui appartengono le Streptococcaceae, sono aumentati nel cane dopo la supplementazione di *S.cerevisiae* in forma di MOS (Lin et al., 2020; Swanson et al., 2002b), prodotti di fermentazione (Lin et al., 2019) o idrolizzati (Strompfova et al., 2021).

Dall'analisi UniFrac per la beta diversità non ponderata (unweighted) o ponderata (weighted), considerando i tre tempi insieme, non è possibile osservare un chiaro raggruppamento della comunità microbica tra il gruppo controllo ed il trattato (Figura 36 A, B). Tuttavia nel gruppo controllo, la distanza UniFrac non ponderata era diversa tra il T1 e T56 (PERMANOVA, $p=0,01$) e quella ponderata differiva tra T1 e T28 (PERMANOVA, $p=0,04$) (Figura 43C, D). Nessuna differenza è stata osservata nei diversi tempi tra due gruppi (Figura 36 E,F).

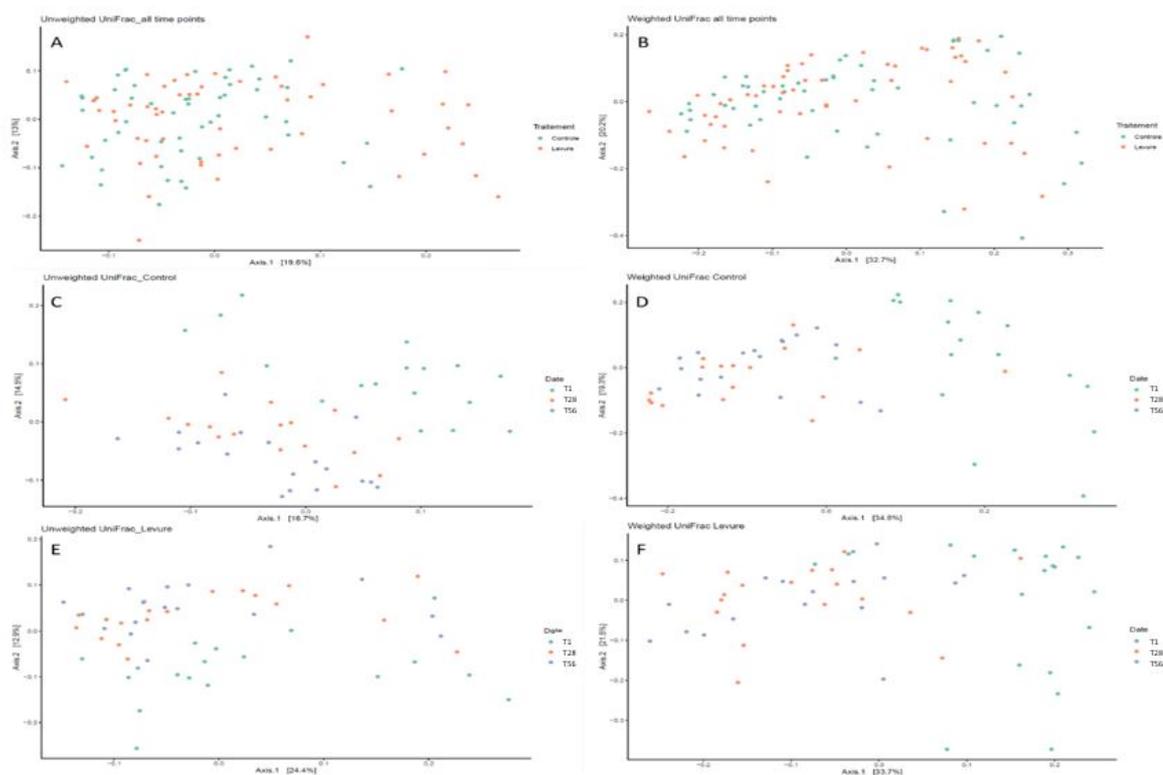


Figura 36. Diversità beta UniFrac non ponderata o ponderata tra A, B) gruppo controllo e gruppo alimentato con lievito, C, D) all'interno del gruppo di controllo in tre diversi punti temporali ed E, F) all'interno del gruppo alimentato con lievito in tre diversi punti temporali.

Appare evidente che i lieviti non abbiano avuto effetto sulla *beta diversity* vista la non clusterizzazione tra i campioni, similmente a quanto rinvenuto da Lin et al. (2019) o da De Melo Santos et al. (2021), dopo somministrazione di colture di lievito di *S.cerevisiae*.

Il confronto del microbiota fecale tra le madri alimentate con la dieta controllo e quella supplementata con lievito non ha mostrato differenze di beta diversità neanche considerando i singoli intervalli di tempo di campionamento (T1, T28, T56). La clusterizzazione per il tempo indica uno shift della comunità microbica dovuta ad un cambiamento fisiologico e ad un lento ritorno alla normalità (Ji et al., 2019). Uno studio condotto sulle scrofe, al periparto, mostra che tale diversità, calcolata con Unifrac ponderata, aumenta, subito dopo il parto (Huang et al., 2019).

Il confronto in 3 tempi della popolazione microbica fecale del gruppo controllo e del gruppo trattato, è riportato nella Figura 37 e non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi.

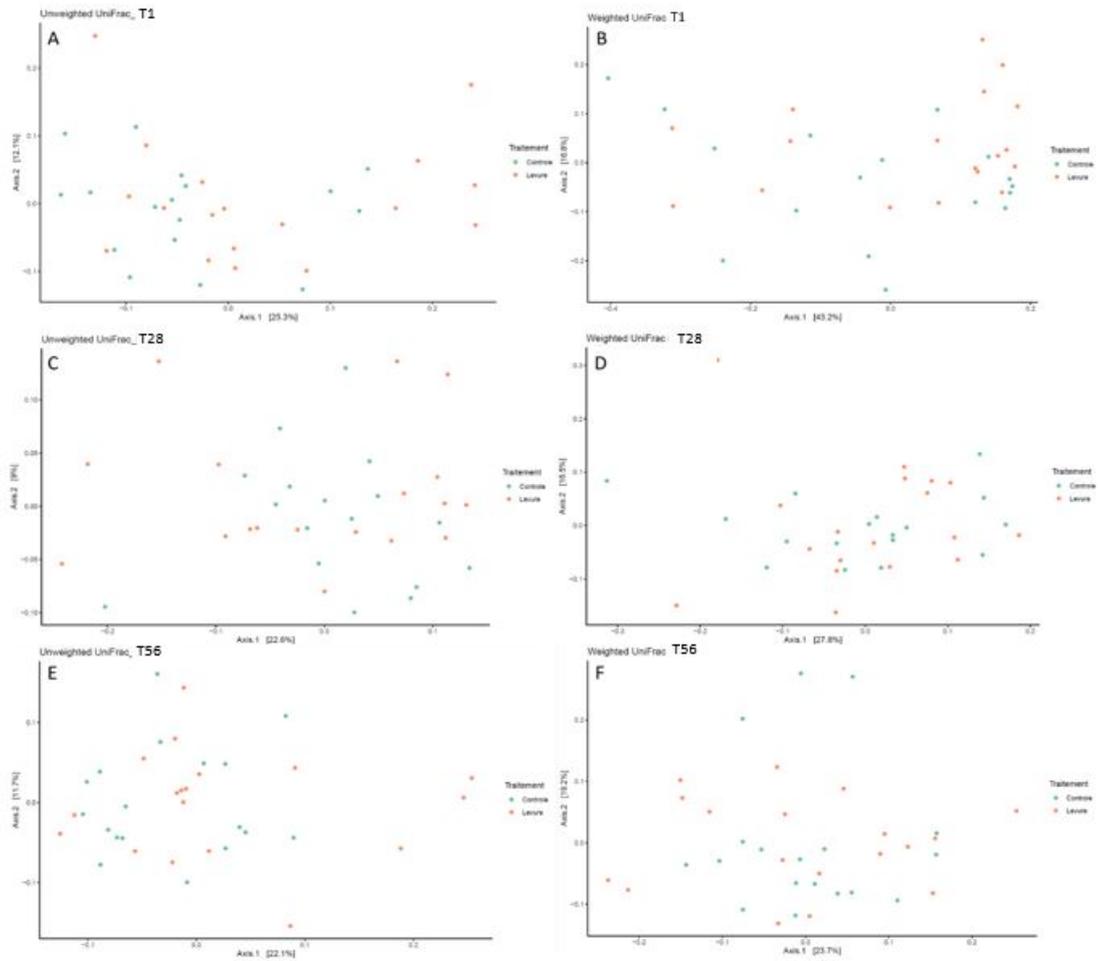


Figura 37. Diversità beta UniFrac non ponderata o ponderata, tra i gruppi di controllo o alimentati con lievito, al giorno A, B) giorno 1 C, D) giorno 28 ed E, F) giorno 56 dopo il parto.

È stata infine svolta un'analisi volta all'identificazione di taxa che possano fare da marker negli specifici gruppi al T28 e T56. I risultati delle analisi LefSe, riportati in Figura 38, mostrano la significatività e la filogenesi dei taxa discriminanti, tra i due gruppi.

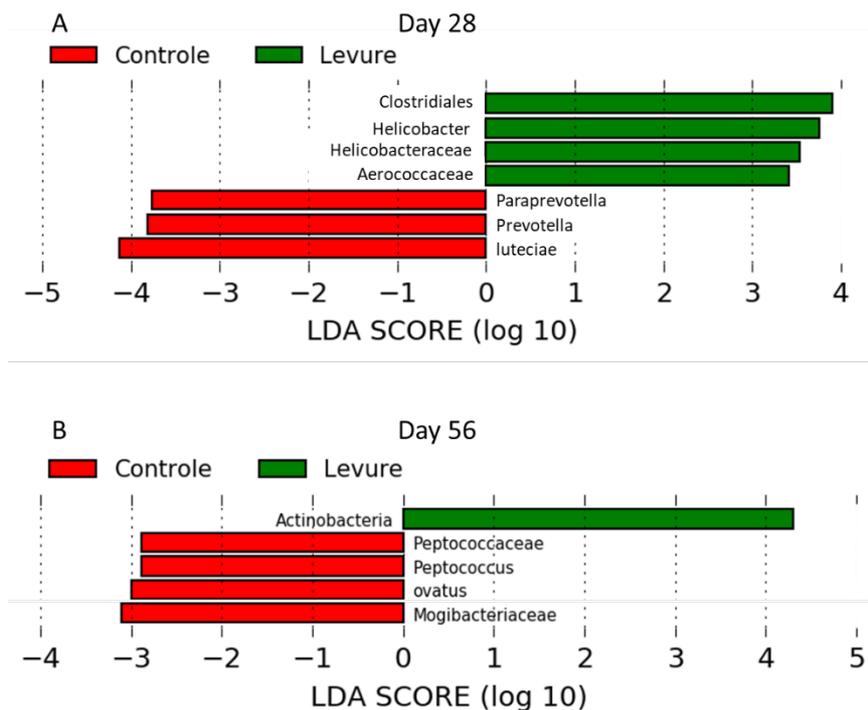


Figura 38. Analisi discriminante lineare della dimensione dell'effetto (LefSE) tra il gruppo di controllo (in rosso) e il gruppo trattato (in verde) al giorno 28 e 56 dopo il parto.

In particolare, si nota che a T28 l'integrazione con lievito ha aumentato l'abbondanza dell'ordine Clostridiales, insieme ai componenti delle famiglie *Helicobacteraceae* e *Aerococcaceae* (Figura 38A). Allo stesso tempo, la supplementazione ha ridotto l'abbondanza dei generi *Prevotella* e *Paraprevotella*, entrambi appartenenti alla famiglia delle Paraprevotellaceae. Anche la famiglia *luteciae*, appartenente allo *Streptococcus phylum*, è diminuita nel gruppo integrato rispetto al controllo al T28 (Figura 38A). Un aumento dei *clostridiales* e *helicobacter* e una diminuzione di *Prevotella* e *Paraprevotella* sono da ritenersi un fenomeno negativo, visto che i primi predispongono alle infezioni mentre le seconde stimolano il sistema immunitario e una loro riduzione è da associare a disbiosi da infiammazione (Hasan et al., 2018). In letteratura, *S.cerevisiae* idrolizzato o vivo è stato associato a una inversione della prevalenza di questi batteri (Tan et al., 2015; Hasan et al., 2018).

A T56, la supplementazione di lievito ha aumentato il *phylum* degli *Actinobacteria* e ha ridotto le famiglie delle *Peptococcaceae* e delle *Mogibacteriaceae*, entrambe appartenenti all'ordine dei Clostridiales (Figura 38B). Quindi, si può ritenere che il lievito, a T56, apporti degli effetti benefici nei soggetti trattati. Il gruppo non

integrato ha anche mostrato un'abbondanza significativamente maggiore della specie *ovatus*, membro del genere *Bacteroides* (Figura 38B).

Agli *Acrinobacteria*, appartengono i *Bifidobacteria*, batteri benefici che riducendo il pH luminale, riducono la presenza di batteri patogeni e di composti putrefattivi e migliorano la risposta immunitaria come dimostrato in letteratura dalla somministrazione sia di MOS che di prodotti fermentati o colture (Grieshop et al, 2004; Lin et al, 2019; De Melo Santos et al, 2021).

È stata infine condotta un'analisi multivariata mediante modelli lineari la quale mostra una correlazione positiva tra specifici taxa, digeribilità apparente totale (ATTD) e feed intake.

La specie *mastiditis*, appartenente al phylum *Corynebacterium*, è correlata positivamente ($p < 0,001$) con l'ATTD (figura 39A), mentre un membro non classificato della famiglia delle *Ruminococcaceae* ($p < 0,001$) con l'assunzione di mangime (Figura 39B). Infine, il microbiota delle madri 1 giorno dopo il parto (T1), è risultato associato a valori più bassi di feed intake (Figura 39C).

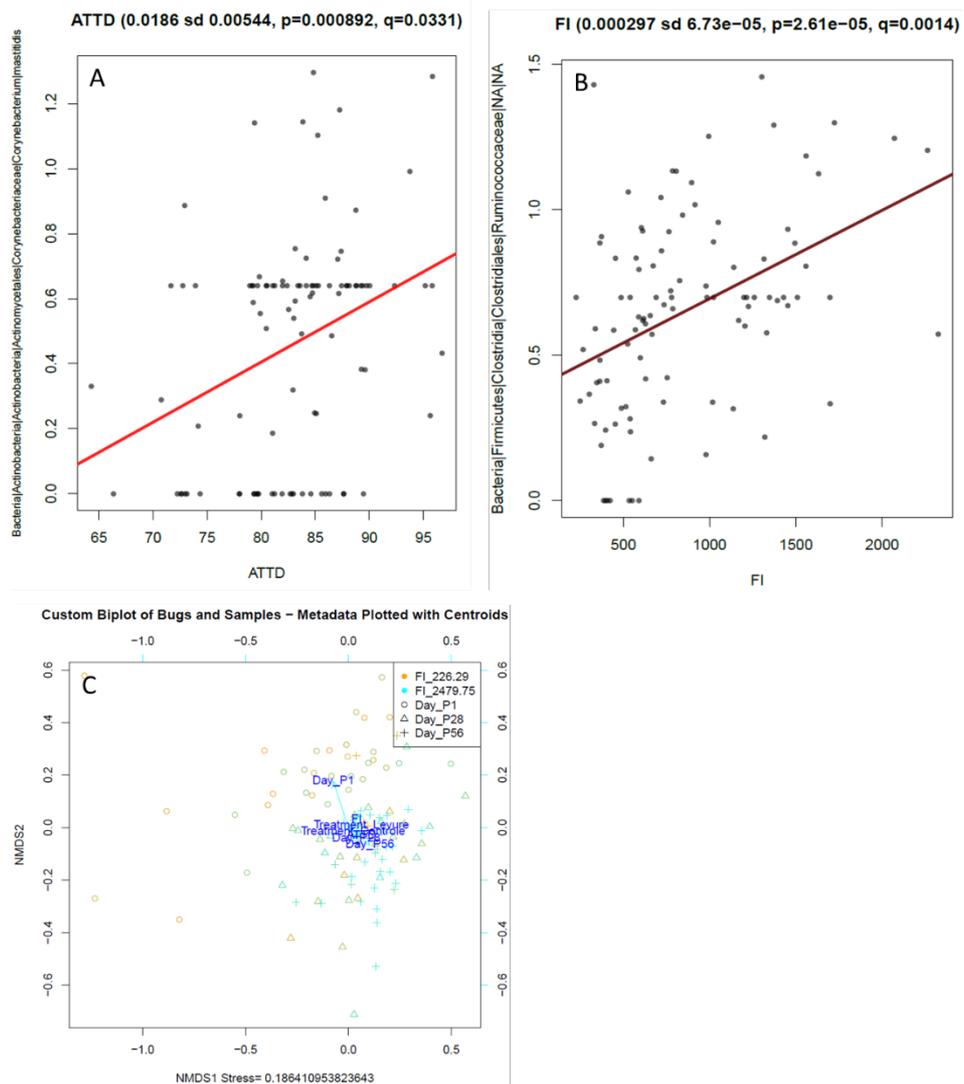


Figura 39. Analisi multivariata mediante modelli lineari che mostrano una correlazione positiva tra uno specifico taxa e A) la digeribilità apparente totale (ATTD) e B) il feed intake; C) bi-plot rappresenta la composizione del microbiota intestinale è colorato considerando diversi livelli di feed intake (arancione e azzurro). Simboli diversi rappresentano diversi punti temporali.

4.2.8 NASO ELETTRONICO (E-NOSE)

Il naso elettronico (E-Nose) è stato definito da Gardner and Bartlett (1994) uno strumento che, contenendo una serie di sensori chimici elettronici, con specificità parziale e un appropriato sistema di riconoscimento di schemi, è in grado di distinguere odori semplici o complessi (Gardner and Bartlett, 1994). Quindi, è capace di detectare e classificare le diverse sostanze chimiche, presenti nel campione, e determinare le differenze dell'impronta olfattiva di diverse matrici (Rock et al., 2008; Wilson and Baietto, 2009; Deshmukh et al., 2015). È un'apparecchiatura costituita da sensori elettrochimici di materiale sensibile, specifico per ogni sostanza chimica, che va a interagire con le molecole dei gas, e da un'elettronica idonea a quantificare e a elaborare i segnali elettrici (Wilson and Baietto, 2009). In questo modo, riesce a fornire l'impronta olfattiva di sostanze diverse e a mappare le risposte elettriche corrispondenti a uno specifico odore. Gli elementi fondamentali sono quindi i sensori chimici che, lavorando come trasduttori miniaturizzati, simili ai neuroni del nostro cervello, rispondono in maniera, selettiva e reversibile, alle sostanze chimiche volatili, generando, in tempo reale, segnali elettrici in funzione della concentrazione (Figura 40 e 41) (Rock et al., 2008; Wilson and Baietto, 2009; Deshmukh et al., 2015; Karakaya et al., 2020). È quindi in grado di classificare e categorizzare i gas che percepisce.

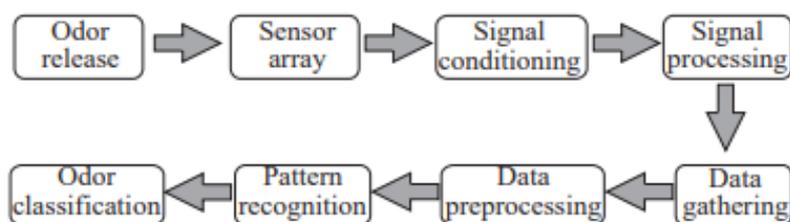


Figura 40. Schema di funzionamento del E-nose (Karakaya et al., 2020).

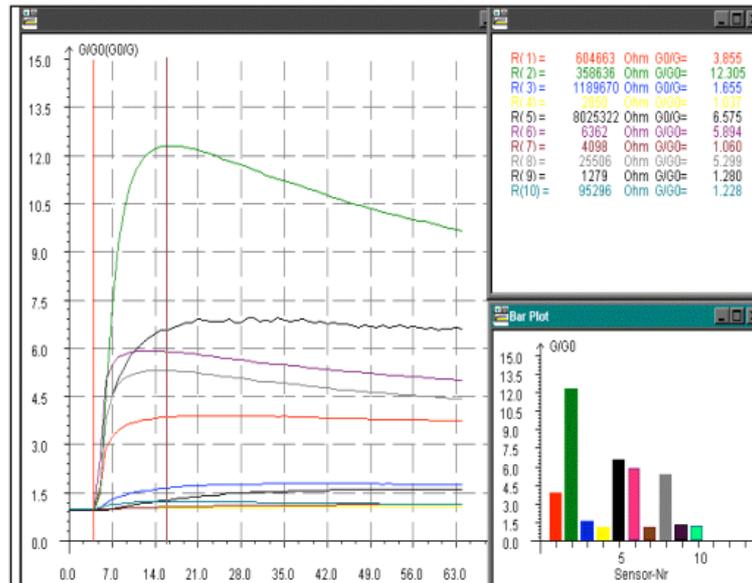


Figura 41. Esempio di output del sistema dove ogni curva colorata rappresentano la saturazione dei diversi sensori.

Il naso elettronico è un'apparecchiatura già ampiamente sfruttata nell'industria alimentare e biomedica, in agricoltura e in medicina per valutare la qualità e la sicurezza delle bevande e dei prodotti alimentari di origine animale/vegetale (Rock et al., 2008; Ghasemi-Varnamkhasti et al., 2009; Cheli et al., 2016; Cheli et al., 2018; Karakaya et al., 2020), per rilevare contaminazioni delle colture (Rock et al., 2008; Ottoboni et al., 2018; Karakaya et al., 2020), per eseguire monitoraggi ambientali (emissione di gas) (Rock et al., 2008; Deshmukh et al., 2015), per riconoscere patologie a carico dell'apparato respiratorio o gastroenterico a partire da campioni fecali, urine, respiro etc (Rock et al., 2008; Wilson, 2020; Karakaya et al., 2020).

Il naso elettronico ha dimostrato sperimentalmente la sua efficacia in campo medico umano per diagnosticare patologie del tratto gastroenterico come i tumori del colon, l'IBD, l'enterite necrotizzante e il morbo di Crohn, in modo rapido, precoce, poco costoso e non invasivo a differenza di altri metodi come la gascromatografia (Arasaradnam et al., 2013; de Meij et al., 2015; Altomare et al., 2016). Esso sfrutta le potenzialità dei composti organici volatili (VOC). I VOC sono gas che vengono prodotti dai batteri, sia in situazioni fisiologiche come le fermentazioni degli alimenti indigeriti, sia in situazione patologiche come le patologie gastrointestinali (Arasaradnam et al., 2010). Si ritiene, infatti, che i VOC

quali ad esempio idrocarburi, alcoli alifatici e chetoni, derivino da prodotti o sottoprodotti del metabolismo come dalla biosintesi degli acidi grassi (Zulkifli et al., 2017). Essi sono considerati dei marker non invasivi che possono essere utilizzati nei programmi di screening o monitoraggio, poiché sono marker precoci di patologia, ancor prima della comparsa dei sintomi clinici. Ciò porta a diagnosi precoci, non invasive e all'intervento con terapia immediata (Bosch et al., 2019). È noto che le patologie intestinali, modificando la composizione del microbiota, cambiano i gas intestinali e quindi si ha la produzione di odori fecali diversi. La proporzione dei gas prodotti varia in rapporto alle patologie: i pazienti affetti da IBD, ad esempio, producono aldeidi, alcoli secondari, chetoni, esteri di SCFA e BCFA, indolo e fenoli (Walton et al., 2013; Ahmed et al., 2016).

Cuccioli

Nello specifico, le analisi condotte (SS, ATTD, *Giardia spp.* e Coronavirus Canino, microbiota) e i dati raccolti (fecal score) sulle feci dei cuccioli sono stati messi in relazione all'output analitico del naso elettronico, ottenuto dall'impronta olfattiva dei campioni.

Si è potuto dedurre che le modifiche dei VOC danno la possibilità di diagnosticare patologie specifiche dell'allevamento quali *Giardia spp.* e Coronavirus Canino. Inoltre, si è voluto verificare se, a un diverso odore fecale, corrispondesse una positività a tali patogeni e una conseguente modificazione del microbiota intestinale.

Il naso elettronico utilizzato in questo studio, PEN 3 Airsense Analytics GmbH (Schwerin, Germania), è stato impiegato al fine di valutarne le potenzialità in termini di classificazione dell'impronta olfattiva delle feci in funzione di: trattamento alimentare (C Vs Y), età dei cuccioli (28 giorni – T28, 42 giorni – T42, e 56 giorni – T56), fecal score, e presenza/assenza di patogeni quali *Giardia spp.* Con riferimento a trattamento alimentare ed età dei cuccioli, l'utilizzo del naso elettronico associato all'analisi dei dati grezzi raccolti mediante analisi delle componenti principali non è stato in grado di classificare i campioni in funzione

delle variabili considerate (Figura 42).

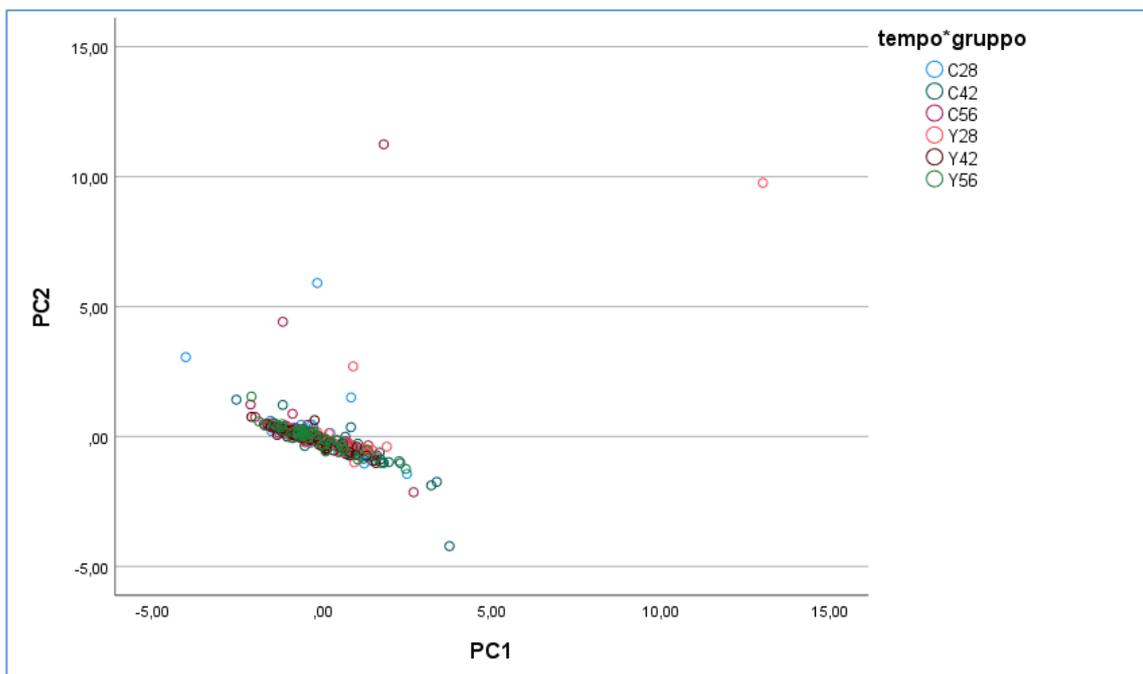


Figura 42. Rappresentazione grafica relativa all'analisi delle componenti principali (PCA) relativa alla classificazione dei cuccioli per trattamento alimentare ed età ○ = gruppo controllo al giorno 28 – C28; ○ = gruppo controllo al giorno 42 – C42; ○ = gruppo controllo al giorno 56 – C56; ○ = gruppo trattato al giorno 28 – Y28 ○ = gruppo trattato al giorno 42 – Y42; ○ = gruppo trattato al giorno 56 – Y56.

I batteri grazie al metabolismo dei substrati dietetici producono anche sostanze dannose per l'ospite, tra cui alcuni cataboliti del metabolismo proteico quali l'ammoniaca, le amine biogene (agmatina, istamina, cadaverina, putrescina...), solfuro di idrogeno (H_2S), idrogeno (H_2), metano (CH_4), fenolo, indolo e BCFA (Phillips et al., 1991), responsabili dell'odore fecale.

Le amine biogene vengono prodotte principalmente da clostridi, Bifidobacterium, Bacterides, Prevotella etc; l' H_2S viene generato da batteri appartenenti al genere Desulfovibrio e Desulfomonas; i composti fenolici, indolici e lo scatolo derivano dal metabolismo della tirosina o della fenilalanina (Smith and Macfarlane, 1996a; Smith and Macfarlane, 1996b; Smith and Macfarlane, 1997a; Smith and Macfarlane, 1997b).

Dalla Figura 42 non si vedono correlazioni e i punti, che rappresentano i diversi soggetti nel tempo risultano distribuiti in modo disomogeneo. Quindi, non sembra esserci correlazione tra la somministrazione di lievito e l'odore fecale. Si può affermare che, nel grosso intestino, il lievito non influenza il metabolismo degli

amminoacidi, principali responsabili della produzione dei VOC e rilevabili mediante l'E-nose.

Una coltura disidratata o i MOS non hanno modificato fenoli, indoli, altri VOC (Swanson et al., 2002a; De Melo Santos et al., 2021) e neppure l'ammoniaca (Pawar et al., 2017). La non modificazione dei VOC è considerata generalmente un fattore positivo, se correlato ad un minor odore delle feci, perchè potrebbe rappresentare una stabilità nel microbiota dei soggetti trattati (De Melo Santos et al., 2021).

Tuttavia, studi condotti sull'uomo e sul cane hanno evidenziato che alcuni oligosaccaridi (FOS) o MOS di derivazione fungina, aumentando il pH intestinale, hanno variano la composizione del microbiota e facendo proliferare i *Bifidobacteria* e *Lattobacilli* (Swanson et al., 2002; Grieshop et al., 2004; Middelbos et al., 2007), hanno ridotto i batteri considerati nocivi quali *Coli*, i *Fusobacteria*, i *Clostridi* e gli Enterococchi (Grieshop et al., 2004; Middelbos et al., 2007). Di conseguenza, riducono i prodotti putrefattivi delle feci (ammoniaca, fenoli, indoli e scatolo) (Hidaka et al., 1986; Terata et al., 1992), responsabili dell'odore. La somministrazione poi di batteri vivi, appartenenti al genere *Bacillus* o *S.cerevisiae*, favorirebbe la crescita di batteri non patogeni e ridurrebbe la formazione di gas nell'intestino e l'odore delle feci (Paap et al., 2016; Stercova et al., 2016; Lin et al., 2019; Bastos et al., 2021).

La riduzione dei Clostridi, principali responsabili delle fermentazioni proteiche che producono gli odori fecali, potrebbe essere rilevata con l'uso del naso elettronico. Attraverso le reazioni di deamminazione, decarbossilazione e deaminazione-decarbossilazione, questi batteri producono composti putrefattivi quali ammoniaca, amine biogene, BCFA, indolo, fenoli e composti sulfurei (Tabor and Tabor, 1985) che il naso capta e segnala.

Sarà poi interessante, non appena giungeranno dai laboratori dell'azienda Dunstar i dati relativi al microbiota, osservare se ci sono stati cambiamenti nelle popolazioni microbiche che il naso non è stato capace di evidenziare.

Con riferimento alla fecal score dei cuccioli, anche in questo caso l'utilizzo del naso elettronico associato all'analisi dei dati grezzi raccolti mediante analisi delle

componenti principali non è stato in grado di classificare i campioni in funzione delle variabili considerate (Figura 43).

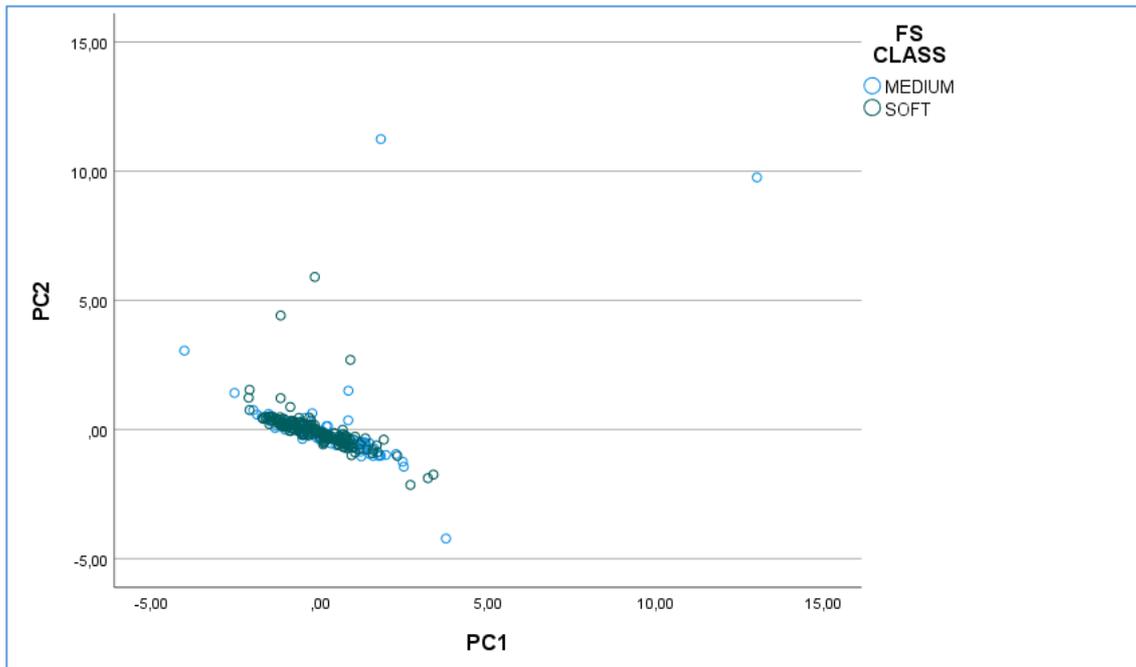


Figura 43. Rappresentazione grafica relativa all'analisi delle componenti principali (PCA) relativa alla classificazione dei cuccioli per fecal score (FS) dove MEDIUM indica una consistenza di feci da 6 a 9 della scala Royal Canin e SOFT indica una consistenza da 1 a 5 della scala ○ = Medium; ○ = Soft.

Tuttavia, considerando i singoli sensori (MOS) è stata osservata una correlazione i sensori W1C, W5S, W1S, W2S, W2W e il FS dei campioni. La correlazione tra il FS e quei sensori che detectano i composti aromatici, l'NO₂, il metano, l'H₂S e gli alcoli, possono indicare una modifica dell'odore fecale tra i diversi score, senza però essere in grado di distingue tra categorie di score alto, medio o basso. Un ridotto fecal score può dipendere dalle patologie gastrointestinali che sono associate a modifiche nell'odore fecale (Garner et al., 2007).

Con riferimento alla variabile presenza/assenza di patogeni quali giardia dei cuccioli, anche in questo caso l'utilizzo del naso elettronico associato all'analisi dei dati grezzi raccolti mediante analisi delle componenti principali non è stato in grado di classificare i campioni in funzione delle variabili considerate (Figura 44). Infatti, osservando il grafico relativo alla PCA risulta evidente una forte

sovrapposizione tra soggetti malati e sani ossia con presenza o assenza di *Giardia spp.* a livello fecale diagnosticata con metodo molecolare (PCR).

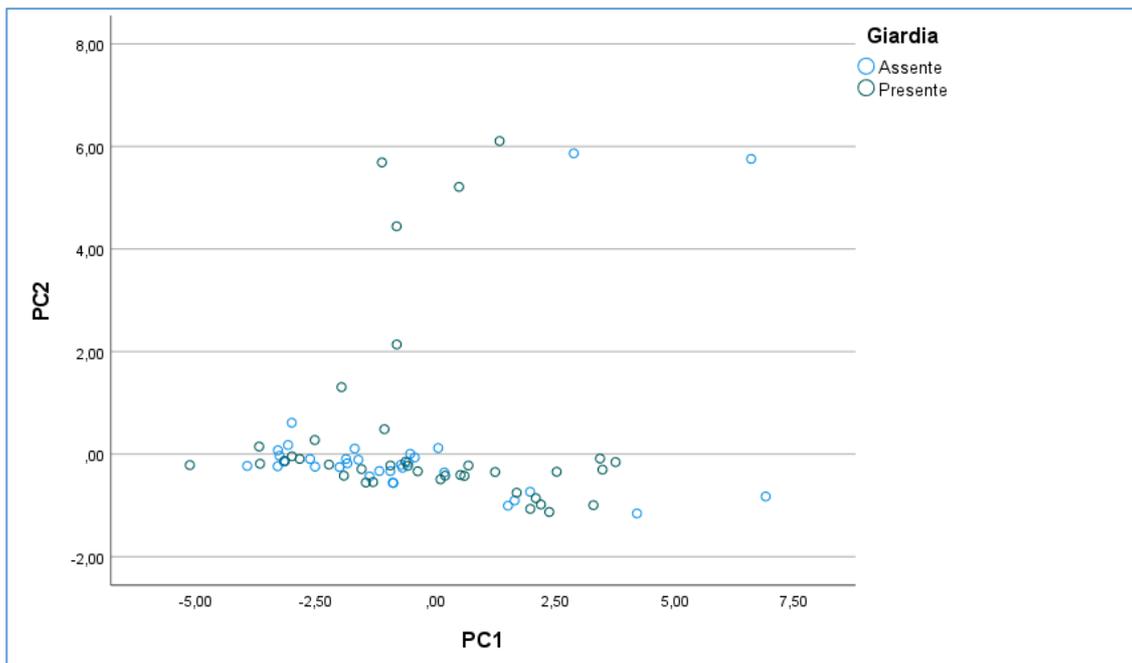


Figura 44. Rappresentazione grafica relativa all'analisi delle componenti principali (PCA) relativa alla classificazione dei cuccioli per presenza/assenza di patogeni quali giardia ○ = Assente; ○ = Presente.

Tuttavia, come rilevato in letteratura, *Giardia spp.* porta a modifiche nel microbiota le quali causano disbiosi, segnalata sia nell'uomo che negli animali (Fekete et al, 2021). Nel cane, *Giardia spp.* si trova associata ad un aumento di *Catenibacterium*, *Pseudomonas*, *Howardella*, *Clostridium* e *Lactobacillus* e a una riduzione di *Bacteroides*, *Megamonas* e *Pseudobutyvibrio* (Slapeta et al, 2015; Berry et al, 2020). Le feci di soggetti positivi risultano più odorose e a questo odore meglio percepito potrebbero essere associate le modifiche nei batteri del microbiota (Tangtrongsup e Scorza, 2010). Tali modifiche potrebbero essere legate a cambiamenti nei VOC fecali. Infatti, è stato dimostrato che in alcune infezioni (coliti ulcerative, infezioni da *Clostridium difficile jejuni*) si evidenziano specifici cambiamenti nei VOC e quindi nell'odore fecale (Garner et al, 2007).

4.3 CONCLUSIONI

Questo studio si era prefisso l'obiettivo di analizzare le feci emesse da cagne in allattamento e dai rispettivi cuccioli per valutare le modifiche che l'assunzione di un lievito vivo, *Saccaromyces cerevisiae var boulardii*, può produrre sull'assunzione di alimento, sul peso degli animali, sul fecal score, sulla sostanza secca (SS) delle feci, sulla digeribilità apparente totale (ATTD), sulla presenza di patogeni intestinali (*Giardia spp.* e Coronavirus canino), sul microbiota e sull'odore fecale.

Dai dati ottenuti è possibile affermare che, la dieta addizionata con lievito *Saccaromyces cerevisiae var boulardii* consente agli animali di mantenere costanti le performance di crescita (peso corporeo, incremento ponderale e assunzione media di alimento), e il fecal score nei due gruppi (C e Y), sia nelle madri che nei cuccioli.

Il peso e il feed intake delle madri ha avuto un andamento oscillante che rientra nei range fisiologici, mentre nei cuccioli tali parametri hanno avuto l'incremento esponenziale atteso.

Per il fecal score è stata rilevata una media rispettivamente di 3,5 (feci morbide ma formate) e di 5,5 (feci morbide e non formate).

I valori di ATTD, nelle femmine e nei cuccioli, sono rispettivamente compresi tra il 78,5 e l'86% e il 65% al T1 e il 77% al T56, senza differenze statistiche tra i due gruppi.

La prevalenza di *Giardia spp.* nelle madri, a T28 era del 41%, di cui 13/23 erano Y e i restanti 10/23 erano C, senza differenze statisticamente significative tra i 2 gruppi ($p > 0,05$). Al T56 i positivi a *Giardia spp.* erano il 39% e di questi 11/21 appartenevano al gruppo Y e 10/21 al gruppo C, senza differenze statistiche. Invece, la prevalenza di *Giardia spp.* nei cuccioli era pari al 37% sia al T35 che al T56, mentre quella del Coronavirus canino intestinale del 100% sia al T28 che al T56 in madri e cuccioli.

I dati riportati dimostrano che i patogeni intestinale sono molto diffusi nei cani, soprattutto tra quelli in regime di allevamento, dove possono interferire con la salute e le performance dei soggetti.

Dagli studi sul microbiota condotti sulle madri non sono emerse differenze tra gruppi per quanto riguarda *alfa e beta diversity*, ma sono state osservate modificazioni rispetto al tempo. Ad esempio, al T1 *l'alfa diversity* si riduce, indicando una necessità di attenzione al post partum, momento più soggetto allo sviluppo di infezioni o infiammazioni. Analizzando poi i taxa discriminanti al giorno 28, si è notato che l'integrazione con lievito ha aumentato l'abbondanza dell'ordine *Clostridiales*, e dei membri delle famiglie *Helicobacteraceae* e *Aerococcaceae*, ma contemporaneamente ha ridotto l'abbondanza dei generi *Prevotella* e *Paraprevotella*, entrambi appartenenti alla famiglia delle *Paraprevotellaceae*. Anche la famiglia *Lutaciae*, appartenente allo *Streptococcus* phylum, è diminuita, nel gruppo integrato rispetto al controllo, a T28. A T56 (giorni dal parto), invece, questa situazione si è invertita in modo favorevole per l'animale con un aumento degli *Actinobacteria* e una riduzione delle famiglie *Peptococcaceae* e *Mogibacteriaceae*, entrambe appartenenti all'ordine dei *Clostridiales*.

Infine, dalle analisi effettuate con il naso elettronico (e-Nose) non sono emerse correlazioni tra tempo e gruppo e tra positività a *Giardia spp.* e gruppo. Ciò dimostrerebbe una non correlazione tra la somministrazione di lievito e l'odore fecale. Sembra quindi, di poter affermare che, nel grosso intestino, il lievito non influenza il metabolismo degli amminoacidi, principali responsabili della produzione di VOC, rilevabili mediante l'E-nose.

Sembra ancora che il lievito *Saccharomyces cerevisiae var boulardii*, somministrato alle madri, non abbia avuto effetto diretto sul loro benessere intestinale né effetti indiretti su quello dei cuccioli, ma si è potuto riscontrare una minore variabilità nei risultati per i gruppi trattati rispetto ai gruppi controllo.

CAPITOLO 5

Integrazione di lievito idrolizzato *Saccaromyces cerevisiae* nella dieta del cane adulto: digeribilità e benessere intestinale

5.1 MATERIALI E METODI

Il presente studio è stato autorizzato dal comitato etico dell'Università degli studi di Milano, protocollo n. OPBA_22_2022 firmato in data 3/2022.

5.1.1 ANIMALI

Nello studio sono stati considerati 24 cani adulti, di cui 9 di razza Maltese e 11 di razza Yorkshire terrier, 12 femmine e 12 maschi, con un'età è compresa tra 1 e 9 anni (età media 3,75 anni \pm 0,55). Il peso dei soggetti era compreso fra 2 e 4 kg.

Alloggiati in strutture di metrature adeguate, nelle stesse condizioni di esercizio fisico giornaliero, libero accesso all'aperto e accuditi da personale specializzato, i cani, prima di essere ammessi alla prova, sono stati sottoposti a controllo veterinario per la valutazione dello stato di salute. In tale occasione, i cani, tutti regolarmente vaccinati, sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario attivo nei confronti di endo ed ectoparassiti. Lo studio è stato condotto nel periodo compreso tra marzo e aprile 2022 in un allevamento privato di cani, situato in provincia di Brescia.

5.1.2 DIETA E TRATTAMENTI

Tutti i cani hanno ricevuto un alimento industriale estruso completo e bilanciato, destinato al mantenimento di soggetti adulti, la cui composizione è riportata in Tabella 15. Tale alimento era già in uso in allevamento.

Tabella 15. Analisi chimica dell'alimento: costituenti analitici espressi sul tal quale

Nutrienti	%
Umidità	9.5
Proteine grezze	27
Lipidi grezzi	16
Fibra grezza	1.5
Ceneri	4.9
Acidi grassi omega 3	0.67
Acidi grassi omega 6	3.54
Taurina	0.21
Acidi grassi EPA/DHA (mg)	0.25
Arginina	1.41
Lisina	1.15
Energia (kcal/100g)	385.7

Composizione: Mais, riso, proteine di pollame disidratate, grassi animali, farina di mais, glutine di mais, proteine vegetali isolate*, idrolizzato di proteine animali, polpa di barbabietola, olio di soia, sali minerali, olio di pesce, lieviti e prodotti simili, frutto-oligosaccaridi, olio di borraggine, estratto di fiore di tagete (fonte di luteina).

Nel corso di questo studio, ciascun esemplare ha ricevuto una quantità di alimento, ripartita in due pasti giornalieri, stabilita in relazione al fabbisogno energetico di cani adulti, come riportato nelle linee guida FEDIAF (2021):

$$EM = 110 \times \text{Peso}^{0.75} \text{ Kg}$$

dove EM rappresenta l'energia metabolizzabile e P il peso corporeo ideale dei cani.

Inoltre i cani hanno sempre avuto a disposizione da bere acqua fresca.

La quantità somministrata è stata poi standardizzata a 90g a soggetto/die.

Per lo studio i soggetti sono stati suddivisi in due gruppi, ciascuno comprendente 12 soggetti, omogenei per età, sesso e peso. In particolare, i cani sono stati alloggiati in 12 box (2 animali per box) dove ogni singolo box è stato considerato come unità statistica:

- Gruppo trattato (Yeast-supplemented, Y), ricevente la dieta di mantenimento integrata con lievito (1,2 g di lievito diluiti in 4 ml di acqua somministrati tramite siringa);
- Gruppo controllo (C), ricevente la dieta di mantenimento senza integrazione (solo 4 ml di acqua tramite siringa).

A entrambi i gruppi è stato dato l'alimento prima del trattamento, registrando sia la quantità offerta a ciascun soggetto sia, dopo circa un'ora, la quantità avanzata. Per ogni soggetto ogni giorno è stato perciò calcolato il feed intake secondo l'equazione:

$FI \text{ (g/die)} = \text{g di alimento somministrato} - \text{g di alimento residuo nella ciotola}$

Dai valori ricavati giornalmente è poi stata calcolata la media settimanale.

Campioni di tale alimento e di alimento integrato con lievito sono stati sottoposti ad analisi per le principali componenti nutrizionali (proteine grezze, grassi grezzi, ceneri) all'inizio e alla fine dello studio tramite il metodo indicato nel Regolamento (CE) 152/200981.

Il lievito selezionato è stato *Saccharomyces cerevisiae*, le cui caratteristiche sono riportate nella figura 45. Tale lievito, autorizzato e normalmente incluso come ingrediente in quantità variabile nei comuni alimenti industriali per cani, è stato somministrato, diluito in acqua in una percentuale pari al 2% dell'assunzione totale di cibo.

YELA ProSecure

YELA ProSecure is an hydrolyzed yeast obtained from the fermentation of a specific *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain.

This feed material is obtained through a hydrolysis process at high temperature and controlled pH that stimulates the cell's rupture by endogenous and exogenous enzymes releasing high value nutrients.

YELA ProSecure contributes to well-balanced level of highly digestible amino acids and a broad spectrum of group B-vitamins that help support animal growth and immunity.

CHARACTERISTICS AND APPLICATION

- Appearance: fine light brown powder.
 - Characteristic yeast taste and odour.
- YELA ProSecure is produced to ensure optimal flow within industrial processes and a homogenous distribution in premixtures and compound feeds.
- YELA ProSecure is compatible with most feed ingredients and is stable in all animal feed types: mash, pellets or liquids.

ANALYTICAL CONSTITUENTS AND SPECIFICATIONS

Analytical constituents

- Crude protein > 40 %
- Moisture < 7 %
- Protein digestibility > 90 %

Amino acids (Typ. profile, g/100g)

	Total AA	Digestible AA
• Alanine.....	2.97	2.68
• Arginine.....	1.66	1.50
• Aspartic acid.....	4.29	3.87
• Cysteine and cystine.....	0.42	0.37
• Glutamic acid.....	5.45	4.91
• Glycine.....	1.73	1.56
• Histidine.....	0.78	0.70
• Isoleucine.....	1.83	1.65
• Leucine.....	2.69	2.42
• Lysine.....	3.26	2.95
• Methionine.....	0.59	0.53
• Phenylalanine.....	1.49	1.34
• Proline.....	1.38	1.24
• Serine.....	2.10	1.89
• Threonine.....	2.01	1.81
• Tryptophan.....	0.59	0.53
• Tyrosine.....	1.24	1.12
• Valine.....	2.19	1.97

Vitamins (Typ. profile)

- Vit B1 (Thiamine)..... 27.0 mg/kg
- Vit B2 (Riboflavin)..... 29.4 mg/kg
- Vit B3 (Niacine)..... 36.9 mg/kg
- Vit B5 (Pantothenic acid)..... 23.5 mg/kg
- Vit B6 (Pyridoxine)..... 14.6 mg/kg
- Vit B7 (Biotin)..... 86.5 µg/100g
- Vit B9 (Folic acid)..... 4 813 µg/100g
- Vit B12 (Cyanocobalamin)..... <1.0 µg/100g

Microbiological specifications

- *Salmonella* sp..... Negative/25g
- *E.coli*..... Negative/g
- Coliforms..... < 10 CFU/g

* Colony Forming Units

Not all products are available in all markets nor associated claims allowed in all regions.

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com

DIRECTIONS FOR USE

PIGLETS.....	5 to 30 kg/t
SOWS.....	5 to 10 kg/t
BROILERS STARTER.....	5 kg/t
BROILERS GROWER AND FINISHER.....	2.5 to 5 kg/t
CALVES.....	10 to 20 kg/t
PET FOOD.....	5 to 40 kg/t
FISH.....	5 to 20 kg/t

REGULATORY AND QUALITY INFORMATION

Classification as per EU Catalogue of feed materials (Regulation (EU) 608/2013): 12.1.12 Yeasts products.

This product does not contain animal substances nor product or ingredient that might pose a TSE/BSE risk.

Moreover, it does not contain genetically modified material or organism.

This product can be used in organic production under regulations (EC) No 834/2007 and No 889/2008 (as amended).

SAFETY INFORMATION

It is recommended to use protective gloves and mask during handling.

STORAGE AND SHELF LIFE

Store in a cool and dry place, in its original unopened packaging. Shelf life and composition of the product are guaranteed for 24 months from date of production under these conditions.

PACKAGING

25 kg bag with polyethylene liner.
800 kg big bags.

YELA ProSecure 05/14/15



Figura 45. Caratteristiche analitiche e descrizione del prodotto utilizzato

5.1.3 VALUTAZIONE DELLO STATO NUTRIZIONALE

Nel corso dello studio è stato valutato lo stato nutrizionale di ogni cane da parte dello stesso operatore (MV). Tale valutazione ha consistito, come dettato nelle linee guida nutrizionali pubblicate da Baldwin et al. (2010), nella rilevazione di:

- Peso corporeo;
- Body Condition Score (BCS);
- Muscle Condition Score (MCS).

I dati sono stati raccolti in schede e tabelle personali all'inizio (T0) e alla fine dello studio (T21).

Peso corporeo

Il Peso corporeo di ciascun cane è stato rilevato mediante l'impiego di una bilancia elettronica (Bilancia veterinaria, GIMA 27261). Le pesate sono state effettuate all'inizio dello studio e in corrispondenza del 21 giorno sempre alla stessa ora. Il peso corporeo espresso in chilogrammi (kg) è stato registrato in apposite schede personali. All'inizio dello studio tale dato è stato valutato in associazione BCS al fine di determinare il peso ideale del soggetto, necessario per formulare i bisogni nutrizionali specifici di ogni cane.

Body Condition Score (BCS)

Il Body Condition Scoring system è un sistema sviluppato per valutare la distribuzione del tessuto adiposo degli animali. Il giudizio che emerge dalla rilevazione compiuta da un operatore mediante esame visivo dell'animale (condotto di lato e dall'alto) e palpazione dello stesso a livello di cassa toracica facendo scorrere le mani lungo il costato per stimare lo strato di tessuto adiposo che ricopre le coste; a livello di addome, ponendo particolare attenzione all'accumulo di grasso intraddominale e alle prominenze ossee (a livello di tuberosità ischiatiche e iliache). In questo studio è stata utilizzata la scala di valutazione basata su 9 punti, con un BCS ideale compreso tra 4 e 5 (Figura 46).



Figura 46. Body Condition scoring system proposto dalla WSAVA (www.wsava.org)

Muscle Condition Score (MCS)

Il Muscle Condition Score (MCS) è un indice utilizzato per la valutazione della massa magra presente in un soggetto. Tale parametro viene rilevato da un operatore mediante esame visivo e palpazione in corrispondenza delle ossa temporali, scapole, vertebre lombari e ossa del bacino. Lo sviluppo della massa muscolare è stato classificato come normale, medio, moderato, marcata atrofia muscolare (Figura 47).

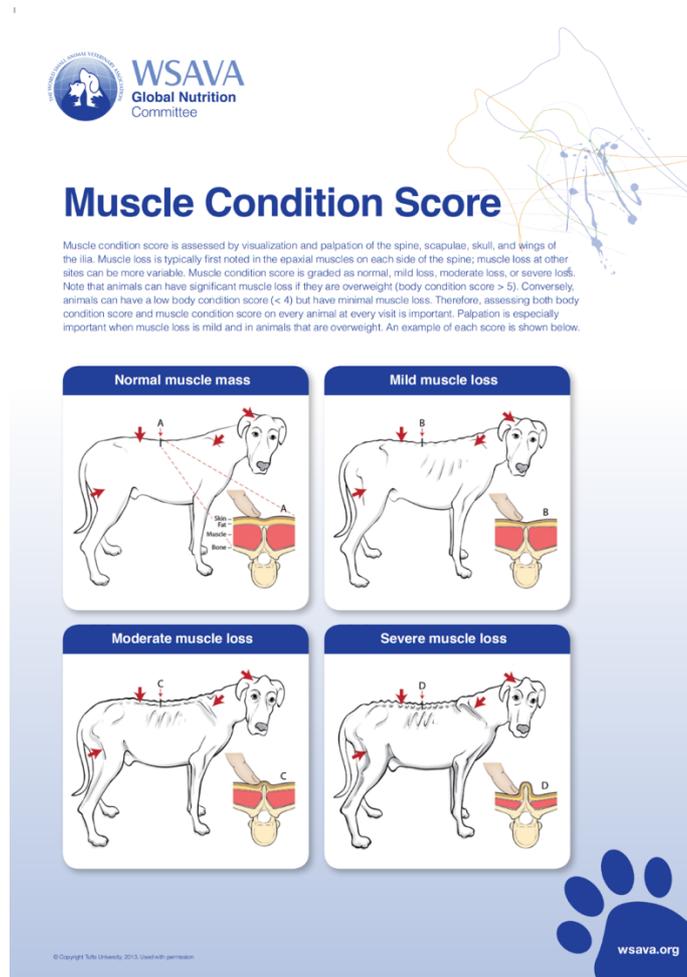


Figura 47. Scheda di scoring della MCS proposta dalle linee guida ufficiali WSAVA (www.wsava.org).

5.1.4 VALUTAZIONE DELLO STATO SANITARIO

Durante questo studio, sono stati raccolti campioni di feci all'inizio e in corrispondenza del termine della prova (21 giorno). In particolare, i campioni di feci raccolti sono stati ottenuti dalla prima defecazione spontanea della giornata di ciascun cane. Dopo averne fatto un pool, il materiale fecale è stato omogeneizzato e diviso in 3 parti. I sub-campioni così costituiti, posti in idonei barattoli, sono stati trasportati in contenitore refrigerato (4° C) fino ai laboratori di riferimento, dove sono stati poi conservati a -20°C e -80°C prima di essere sottoposti ad ulteriori analisi.

Fecal Score (FS) e sostanza secca fecale (SS)

Durante il corso dello studio è stata valutata la qualità delle feci prodotte dai singoli cani. Le feci prodotte sono state osservate e classificate, dal medesimo operatore, mediante la scala di Fecal Scoring System sviluppata da Royal canin, utilizzando un punteggio da 1 a 5 (Fig. 51).



Figura 51. Fecal scoring system proposto da Royal Canin per i cani adulti, dove 1 rappresenta feci liquide mentre 5 feci secche.

La sostanza secca delle feci è stata calcolata, secondo il metodo già descritto al paragrafo 4.1.5

Digeribilità apparente totale (ATTD)

La Digeribilità apparente totale (ATTD) delle feci è stata calcolata secondo il metodo già descritto al paragrafo 4.1.6

Analisi parassitologiche

Le analisi parassitologiche sono state condotte presso il laboratorio di parassitologia del dipartimento DIVAS dell'Università degli Studi di Milano per la ricerca di parassiti e la determinazione delle IgA.

In particolare l'isolamento dai campioni fecali parassiti presenti nelle feci sono stati isolati tramite la tecnica FLOTAC® dual. Brevemente, il campione è stato pesato (10g) ed è stato addizionato con 90ml di acqua (diluizione 1:10). La sospensione è stata omogeneizzata e filtrata con una rete metallica (porosità di

250 µm). Due aliquote (6ml ciascuna) della sospensione filtrata sono state trasferite in tubi conici. I tubi sono stati centrifugati per 3 minuti a 1500 rpm. Il surnatante è stato eliminato e il sedimento ottenuto, sotto forma di pellet, è stato mantenuto all'interno dei tubi. I tubi sono stati riempiti poi con 2 diverse soluzioni flottanti NaNO₃ (densità specifica 1200) e ZnSO₄ (densità specifica 1350). La sospensione è stata omogeneizzata di nuovo e le camere di flottazione sono state riempite con le due sospensioni. Il materiale è stato centrifugato nuovamente, per 5 min a 1000 rpm. Infine il materiale superficiale è stato letto con il microscopio per individuare i parassiti presenti (FLOTAC-group, 2022).

IgA

L'analisi dello stato immunitario, nello specifico la quantificazione delle immunoglobuline A (IgA), è stata eseguita sui campioni fecali, raccolti all'inizio e alla fine dello studio. Il contenuto di IgA è stato misurato tramite test ELISA quantitativo (Bethyl Laboratories, US). I campioni di feci destinati all'estrazione delle immunoglobuline sono stati conservati ad una temperatura di - 80°C in attesa di essere analizzati.

In particolare, il processo di estrazione è stato eseguito secondo quanto descritto da Peters e collaboratori (2004). Approssimativamente 1 g di feci è stato prelevato da ogni campione fecale mantenuto in ghiaccio, posto in un tubo da 15 ml e mantenuto refrigerato durante l'intero svolgimento della procedura. Il peso del campione analizzato è compreso tra 0.98 e 1.34 grammi di feci (mediana 1.18). In ogni tubo sono stati aggiunti 10 ml di tampone di estrazione così composto:

- M phosphate-buffered saline (PBS) a pH 7.4
- 0.5 % Tween (Sigma-Aldrich)
- 0.5% Inibitore delle protesi (Sigma Fast)

I campioni sono stati in seguito omogeneizzati attraverso una combinazione di agitazione manuale e meccanica delle provette, attraverso un mixer vortex. L'omogeneizzazione è stata ripetuta attraverso entrambe le modalità 4 volte a distanza di 15 minuti tra loro.

Le sospensioni di materiale fecale sono state, quindi, centrifugate refrigerata a 4°C a 2000 giri per 20 minuti. 1.5 ml di surnatante è stato prelevato da ogni provetta e trasferito in tubi da 2 ml sterili.

Questi sono stati nuovamente centrifugati a 11000 giri per 10 minuti a 4°C.

E' stato prelevato 1 ml di surnatante e trasferito in nuovi tubi sterili, al fine essere conservato a - 80°C, in attesa dell'esecuzione dei test ELISA.

La concentrazione di IgA è stata determinata con un kit commerciale ELISA specifico per la determinazione di IgA canine (Quantitation Set, Bethyl Laboratories). L'assorbanza è stata letta a 450 nm con un lettore a micropiastre e i risultati sono stati analizzati da Microplate Manager software. Tutti i campioni sono stati testati, in duplicato, ed è stata calcolata la densità ottica media (OD). Concentrazioni proteiche totali dei campioni fecali e duodenali sono stati determinati con il metodo Lowry. La concentrazione di IgA è stata normalizzata per milligrammo di proteine totali (Maeda et al., 2013).

Determinazione impronta olfattiva delle feci (E-nose)

Una parte del campione è stata portata, refrigerata, presso il laboratorio di analisi degli alimenti del dipartimento DIVAS dell'Università degli Studi di Milano per la determinazione dell'impronta olfattiva con E-nose.

La determinazione dell'impronta olfattiva delle feci è stata determinata con naso elettronico PEN3 - AIRSENSE Analytics GmbH.

Il naso elettronico ha dimostrato sperimentalmente la sua efficacia in campo medico umano per diagnosticare patologie del tratto gastroenterico come i tumori del colon, l'IBD, l'enterite necrotizzante e il morbo di Crohn, in modo rapido, precoce, poco costoso e non invasivo (Arasaradnam et al., 2013; de Meij et al., 2014; de Meij et al., 2015; Altomare et al., 2016; Wilson, 2018). Esso sfrutta le potenzialità dei composti organici volatili (VOC). I VOC sono gas che vengono prodotti dai batteri, sia in situazioni fisiologiche come le fermentazioni degli alimenti indigeriti, sia in situazione patologiche come le patologie gastrointestinali (Arasaradnam et al., 2011). Essi sono considerati dei marker non invasivi che possono essere utilizzati nei programmi di screening o monitoraggio, poiché sono

marker precoci di patologie, ancor prima della comparsa dei sintomi clinici (Bosch et al., 2019).

È inoltre noto che le patologie intestinali, modificando la composizione del microbiota, cambiano i gas intestinali e si ha la produzione di odori fecali diversi. Si è potuto inoltre dedurre che le modifiche dei VOC danno la possibilità di diagnosticare patologie specifiche dell'allevamento, quali *Giardia* e Coronavirus. Ulteriormente, è stato valutato se, a un diverso odore fecale, corrispondesse una positività a tali patogeni e una conseguente modificazione del microbiota intestinale.

Nello specifico, le analisi condotte (SS, ATTD, parassiti) e i dati raccolti (fecal score) sulle feci sono stati messi in relazione all'output analitico del naso elettronico, ottenuto dall'impronta olfattiva dei campioni.

I dettagli relativi alla metodica utilizzata sono descritti nel paragrafo 4.1.9

5.1.5 ANALISI STATISTICA

Al fine di valutare l'effetto del trattamento alimentare somministrato, i dati ottenuti sono stati analizzati mediante ANOVA con l'utilizzo del software SPSS 26 (IBM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp). Le misurazioni per i gruppi di controllo (C) e il gruppo trattato (Y), sono state esaminate mediante l'analisi della varianza a una via (one-way ANOVA), al fine di confrontare i dati dei due gruppi.

L'analisi è stata eseguita utilizzando il seguente modello:

$$y_{ij} = \mu_j + \varepsilon_{ij}$$

dove y_{ij} indica le osservazioni (misurazioni), μ_j rappresenta la media delle osservazioni per il primo gruppo mentre ε_{ij} designa la variabilità casuale all'interno del gruppo.

Le differenze con valori di $P < 0.05$ sono state considerate significative.

Inoltre sono stati eseguiti confronti per la determinazione della correlazione R_o di Spearman o di Pearson. Valori di $P < 0.05$ sono state considerate significativi.

5.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

I dati raccolti nell'ambito della prova sperimentale sono ripostati in Tabella 16.

Tabella 16. Parametri investigati per i cani adulti.

	Gruppo C media	Gruppo Y media	P value			ES
			Gruppo	Tempo	Gruppo*Tempo	
Peso (kg)						
T0	2.77	2.77	0.82	0.21	0.81	0.14
T21	2.75	2.89				
Feed intake						
Settimana 1	70.40	79.8	0.243	0.494	0.988	3.17
Settimana 2	77.60	82.6				
Settimana 3	75.00	84.6				
BCS						
T0	5.20	5.20	0.78	0.347	0.347	0.18
T21	5.20	5.40				
FS						
Settimana 1	2.80	3.20	0.524	0.347	0.347	0.15
Settimana 2	3.00	3.20				
Settimana 3	3.20	3.20				
SS feci (%)						
T0	36.5	34.4	0.178	0.156	0.767	0.53
T21	38.7	37.7				
ATTD (%)						
T0	91.1	89.6	0.082	<0.001	0.146	0.21
T21	94.1	93.9				
IgA (µg/mg)						
T0	225	237	0.996	0.261	0.476	10.5
T21	218	206				

5.2.1 FEED INTAKE

Come riportato precedentemente agli animali di entrambi i gruppi (C e Y) sono stati somministrati giornalmente 90g di alimento al giorno. Sulla base del residuo di alimento è poi stato valutato il feed intake (figura 48).

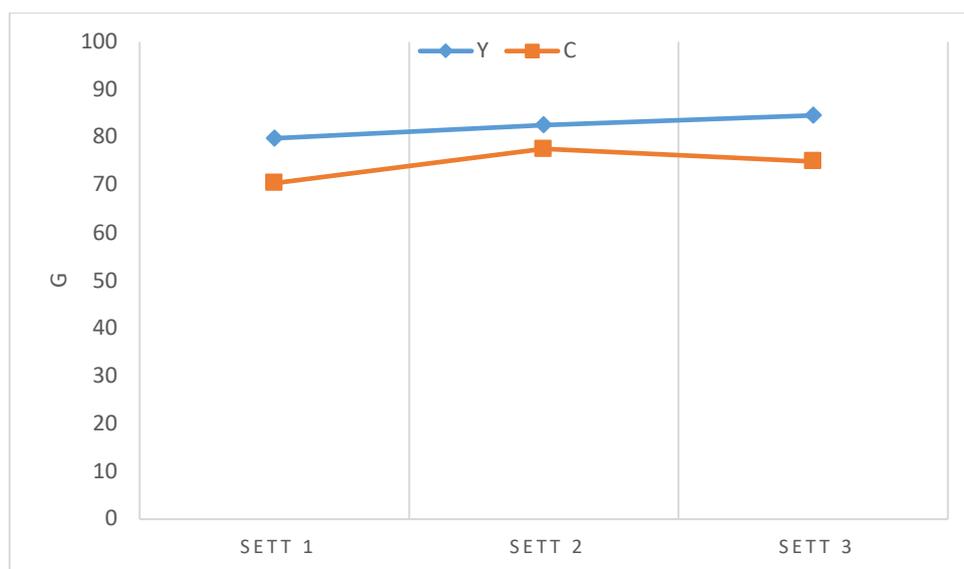


Figura 48. Andamento del feed intake espresso in g/settimana

In particolare, nella prima settimana, i cani del gruppo trattato (Y) assumevano in media 80g/die contro i 70g/die del gruppo controllo (C) (Figura 48). La differenza rivelata, tuttavia, non è risultata significativa.

Durante la seconda settimana, i livelli di assunzione di entrambi i gruppi sono aumentati avvicinandosi a valori simili, 82,5g e 77,5g al giorno, rispettivamente. Infine, nel corso della terza settimana, il feed intake è risultato leggermente in crescita nel gruppo Y raggiungendo il valore di 84,5g, mentre nel gruppo C l'assunzione si è ridotta a 75g.

Le differenze numeriche che si sono potute osservare sia per i gruppi sia per i tempi (Tabella 16), non sono da considerare statisticamente significative ($P > 0,05$). Il trend dell'assunzione di alimento in leggero aumento per i cani ricevuti l'integrazione con lievito però potrebbe essere dovuto al fatto che il lievito è notoriamente ritenuto un buon appetizzante, visto l'alto contenuto di proteine (> del 40% SS) e glutammato, che conferisce sapidità all'alimento ed è

percepito dalle papille gustative dell'animale come sapore umami. Il risultato poco rilevante può essere dovuto alla ridotta percentuale di lievito incluso (solo il 2%), che potrebbe non avere modificato in modo consistente il sapore dell'alimento e di conseguenza non averne favorito l'assunzione.

Questo dato è in linea con altri studi, condotti sul pollo (Perricone et al., 2022), sul maiale (Zhang et al., 2019) e sulla vacca da latte (Nocek et al., 2011) dove la somministrazione di lievito idrolizzato non ha modificato il feed intake.

A oggi in letteratura non ci sono studi che valutano tale parametro nel cane dopo integrazione con lieviti idrolizzati, ma le osservazioni rilevate concordano con altre indagini sull'uso della parete dei lieviti (Pawar et al., 2017). Detti studi, però, sono discordanti con altri che lo valutano sia dopo somministrazione di MOS di parete (Grieshop et al., 2004; Swanson et al., 2002a) sia dopo aggiunta di prodotti di fermentazione del lievito (Lin et al., 2019).

Inoltre è da considerare nell'interpretazione dei risultati il fattore razza. Essendo cani di piccola taglia, già tendenti ad un'assunzione di alimento scarsa e capricciosa, e sensibili agli stress, le manipolazioni giornaliere potrebbero aver agito in tal senso.

5.2.2 PESO E BCS

L'andamento del peso e della condizione corporea rilevati nel corso della prova (inizi e dopo 21 giorni) sono riportati nella figura 49 A e B.

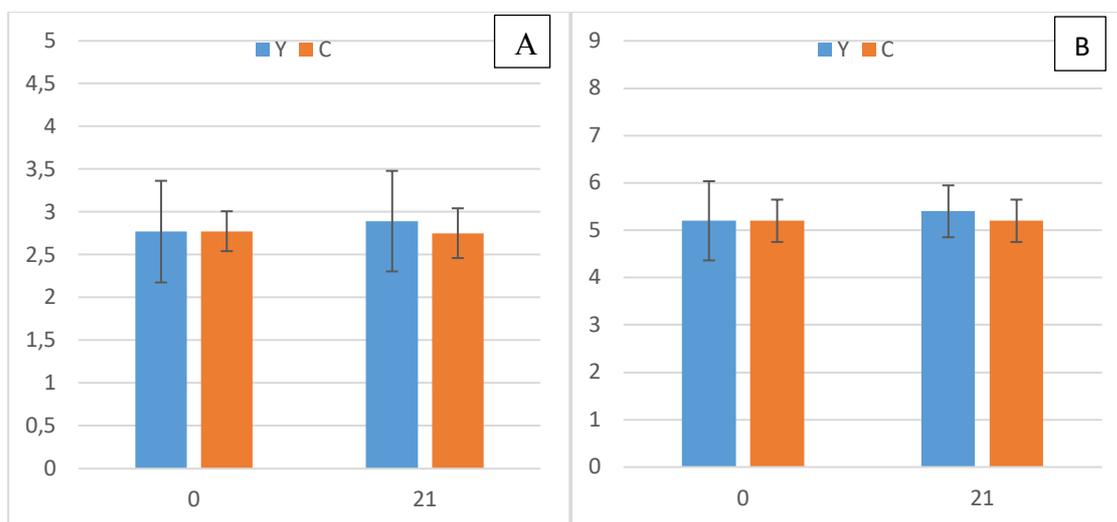


Figura 49 A. Peso medio espresso in kg \pm la deviazione standard calcolato in 2 time point (T0 e T21); 49 B BCS espresso in punti/9 \pm la deviazione standard in 2 time point

In particolare, si può osservare che, a inizio prova, il peso medio per i gruppi Y e C presi in esame, era pari a 2,7Kg e il BCS a 5/9, a dimostrazione che, dal punto di vista nutrizionale, gli animali esaminati erano in perfetta forma fisica.

Dopo 21 giorni, il peso medio delle Y era aumentato di 200g, mentre il peso dei soggetti C era rimasto costante. La stessa cosa si poteva osservare per il BCS.

Tali differenze numeriche non sono statisticamente significativa né se si considerano i gruppi o i tempi (Tabella 16). Ciò dimostra che il lievito aumenta, anche se non in modo importante, il peso dei cani, in analogia con gli studi condotti da Pawar e collaboratori (2017).

Nel confrontare i risultati ottenuti con la letteratura scientifica, è stato possibile evincere delle discordanze. Gli studi, infatti, che utilizzano lo stesso tipo di lievito in specie quali polli (Perricone et al., 2022) e suini (Zhang et al., 2019; Berto et al., 2020; Ding et al., 2020) rilevano un sostanziale miglioramento del peso e della crescita dopo il trattamento. Nelle stesse specie, *S. cerevisiae* vivo o sotto forma di parete ha dato il medesimo risultato (Bontempo et al., 2006; Rajput et al., 2013; Hu et al., 2014). Nel cane Stercova e coautori (2016) hanno affermato

che *S.cerevisie*, somministrato vivo, è in grado di aumentare il peso dei soggetti trattati mentre D'angelo e collaboratori nel 2017 hanno evidenziato che *S. cerevisie var boulardii* migliorava il BCS dei cani affetti da enteropatia cronica. Tuttavia, studi condotti su bovini (Stefenoni et al., 2020) o su suini (Yang et al., 2016) trattati rispettivamente con lievito idrolizzato o con estratti di parete non hanno rilevato un aumento significativo di peso nel gruppo Y.

La possibile causa dei limitati effetti ottenuti con la somministrazione di lievito è da ricercare nel ridotto tempo di osservazione degli animali. Si deve, però, tenere in considerazione che si tratta di uno studio pilota, volto a evidenziare qualsiasi possibile differenza osservabile nel gruppo trattato rispetto al gruppo controllo. Inoltre vanno considerate l'età degli animali, la razza, la dieta assunta e la percentuale di inclusione del lievito. Si tratta di animali adulti, che solitamente mantengono costante il peso senza oscillazioni importanti, riscontrabili tramite la valutazione nutrizionale. I cani appartenevano a razze di piccola taglia, notoriamente animali inappetenti/disappetenti per i quali non ci si può aspettare grandi modifiche del feed intake e del peso. Sono stati alimentati con la dieta standard senza cambiamenti che avrebbero potuto causare una modifica delle calorie ingerite e quindi del peso; il lievito è stato incluso in una percentuale ridotta pari al 2% che ha modificato solo di poco il feed intake e di conseguenza il loro peso.

5.2.3 FECAL SCORE

Il fecal score delle feci nelle singole gabbie è stato valutato giornalmente e se ne è poi ottenuta una media settimanale (Figura 49).

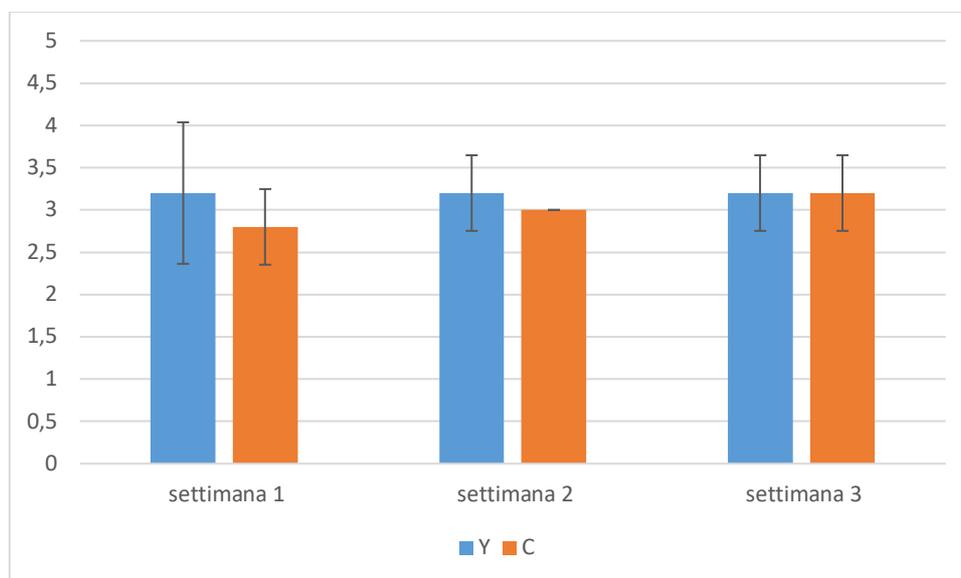


Figura 49. Fecal score medio calcolate in tre time point (settimana 1, 2 e 3), i valori vanno da 1 a 5, dove 1 rappresentano le feci liquide e 5 le feci secche

Come mostrato in Figura 49, il fecal score del gruppo Y si è mantenuto costante per tutte le settimane della prova, con una media di 3,2, corrispondente a feci morbide ma formate. Per il gruppo C, invece, si sono evidenziate alla settimana 1 feci morbide poco formate, che corrispondevano a un fecal score medio di 2,8, che poi è migliorato nell'arco delle successive settimane di prova arrivando a score di 3 alla settimana 2 e di 3,2 nell'ultima settimana. Tali dati tuttavia non hanno mostrato differenze statisticamente significative né per i tempi né per i gruppi (Tabella 16).

La qualità delle feci dipende da più fattori. In particolare può essere correlata dalle caratteristiche proprie del soggetto (dimensione e età), dalla presenza di patogeni (batteri, virus e parassiti), dalla dieta (cambiamenti senza periodo di transizione, tipo e qualità, digeribilità), dallo stress e dallo stile di vita (Weber et al., 2002; Weber et al., 2003; Sokolow et al., 2005; Stavisky et al., 2011).

Da quanto è stato possibile osservare durante questo studio, si evince che il lievito non ha indotto effetti migliorativi sulla consistenza delle feci, ma le ha mantenute costanti durante tutta la prova.

Ciò significa che il lievito può aver aiutato l'animale a superare la condizione di stress a cui era soggetto o i cambiamenti climatici osservati durante la prova. Infatti l'indagine è stata svolta nel mese di marzo durante il quale sono state segnalate oscillazioni importanti della temperatura, più freddo a inizio prova, con una temperatura rilevata pari a 14 °C e 24 °C a fine prova. Queste escursioni termiche sono state di certo percepite dagli animali poiché essi avevano la possibilità di uscire nei paddock esterni. Oltre alle condizioni climatiche, devono essere tenute in considerazione le condizioni di allevamento, dove l'elevato ricambio e la vicinanza dei soggetti avrebbe potuto favorire le parassitosi intestinali, prima causa di peggioramento della consistenza fecale. Non sembra però essere questo il caso visto che lo score migliorava con il passare del tempo nei soggetti controllo e resta invariato nei trattati.

Un altro fattore da tenere in considerazione è l'abitudine allo stress. Nonostante i cani abbiano avuto una settimana per l'adattamento alle nuove condizioni, le feci potrebbero aver risentito di questo fattore che, nel tempo, è andato via via migliorando nel gruppo C o è rimasto stabile in Y, grazie all'integrazione. Questo parametro è stato, infine, correlato positivamente con la digeribilità e si è osservato che a fine prova, i cani avevano migliorato la ATTD di 4 punti percentuali. Ciò sottolinea che al miglioramento della digeribilità dell'alimento corrispondono feci più formate.

Anche in altri studi condotti sul cane si è rilevato che l'aggiunta di *S.cerevisiae* sotto forma di idrolizzato, estratto di parete o coltura non ha modificato le caratteristiche fecali, tra cui il fecal score (Beloshapka et al., 2013; Pawar et al., 2017; Lin et al., 2019; Theodoro et al., 2019; Strompfova et al., 2021).

Anche in questo caso, i riferimenti bibliografici sono discordanti, alcuni studi hanno messo in luce un miglioramento della consistenza fecale dopo trattamento con estratti di lievito o con lievito vivo (Zentek et al., 2002; Grieshop et al., 2004; D'Angelo et al., 2017).

5.2.4 SOSTANZA SECCA (SS) DELLE FECI

Dall'analisi della sostanza secca dei campioni fecali è emerso che tale parametro è aumentato nel corso dello studio in entrambi i gruppi di cani (Figura 50).

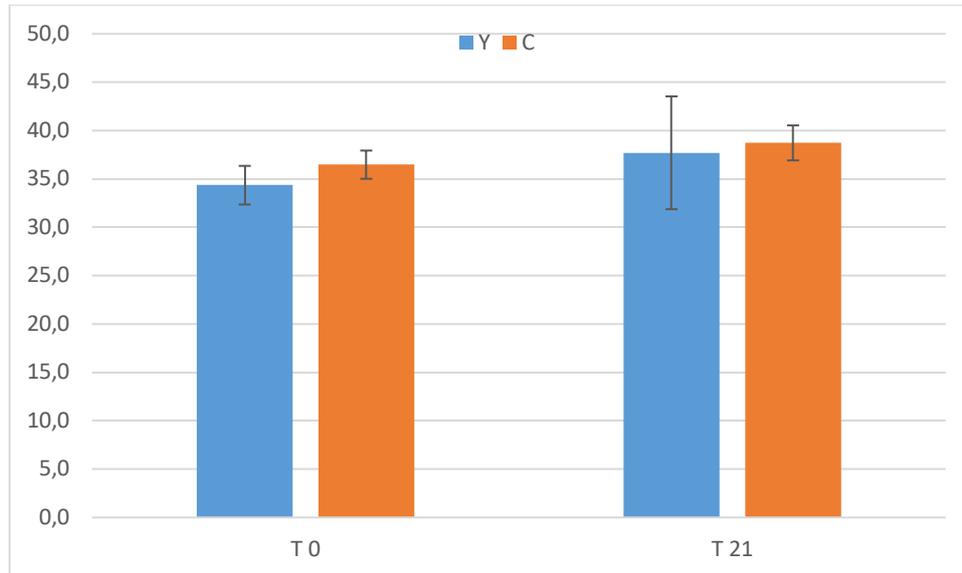


Figura 50. SS media delle feci, espressa in percentuale, calcolata in due time point (T0 e T21)

In particolare, al T0 il gruppo Y ha mostrato una SS pari a 34,4%, mentre al T21 è risultata essere 37,7%. Per il gruppo C, invece, a inizio e fine prova si rilevata una sostanza secca rispettivamente del 36,5% e del 38,7%. Tale differenze, tuttavia, non sono significative (Tabella 16).

Anche da questa analisi si può supporre che il lievito non abbia modificato in modo significativo la sostanza secca fecale in conformità con la letteratura (Pawar et al., 2017; Lin et al., 2020; Strompfova et al., 2021).

Si tratta, tuttavia, di un incremento numerico interessante, visto che la sostanza secca è direttamente correlata con il fecal score. Le differenze osservate tra questi due fattori potrebbero essere differenze numeriche difficilmente riscontrabili, a occhio nudo, dall'operatore che assegna i punteggi. Il dato relativo all'umidità delle feci e quello sulla consistenza possono essere importanti soprattutto per i proprietari di cani, per i quali le feci molli o poco raccogliibili rappresentano un disagio notevole. Un lievito che possa migliorare l'umidità e quindi la raccogliibilità è un punto sicuramente positivo, ma va valutato anche alla

luce di quanto affermato per il fecal score: possibile abitudine degli animali allo stress e presenza di eventuali parassiti.

Infine la SS delle feci è stata correlata con la digeribilità. Tra questi due parametri è stata rilevata una correlazione positiva medio bassa con un valore $P= 0,44$ (Tabella 16). All'aumento della digeribilità è corrisposto un aumento della sostanza secca delle feci. Questo dato può significare che un buon valore di digeribilità, sempre superiore all'80%, determina un miglioramento della qualità fecale.

5.2.5 DIGERIBILITA' APPARENTE TOTALE (ATTD)

La digeribilità apparente totale della sostanza secca, calcolata attraverso il metodo delle AIA, è stata valutata, al T0 e al T21, come media dei soggetti del gruppo Y e C (Figura 51).

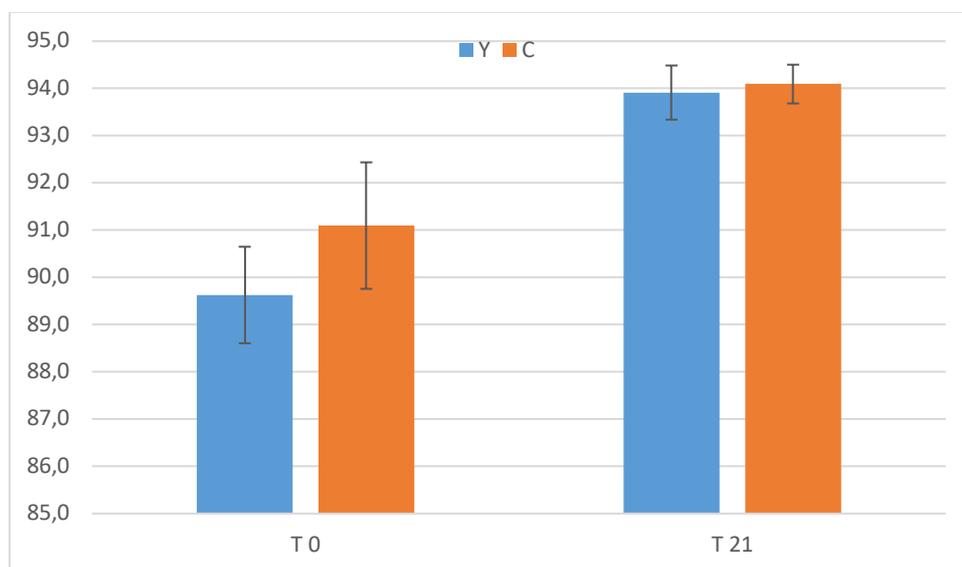


Figura 51. Digeribilità apparente totale (ATTD), espressa in percentuale e calcolata, tramite media e deviazione standard, per le madri, nei gruppi controllo e trattato, al tempo T0 e T21

La ATTD media misurata per il gruppo trattato al T0 è risultata pari a 89,6%, valore inferiore rispetto ai 91,1% del gruppo controllo. Al tempo 21 la digeribilità era aumentata in entrambi i gruppi, raggiungendo valori medi rispettivamente pari a 93,9 e 94,1%, stime più alte rispetto all'67% riscontrato da Stercova e coautori

(2016), all'82% di Martins et al. (2013) e Pawar et al., (2017), all'85% di De Melo Santos et al., (2021), ma simili rispetto ad altri autori (Meyer et al., 1993; Lin et al., 2019). Percentuali così diverse potrebbero trovare spiegazione nel diverso metodo di determinazione utilizzato, al diverso lievito impiegato (vivo, estratti di parete, colture), ma non nella diversa taglia dei cani inseriti nelle prove (James and Mccay, 1950; Meyer et al., 1993). In particolare, la diversa ATTD riscontrata potrebbe essere causata dal metodo di campionamento. È stato, infatti, osservato che la digeribilità della sostanza secca e di altri nutrienti, calcolata a livello fecale, è risultata più alta (fino al 17%) di quella calcolata a livello ileale (Muir et al., 1996; Murray et al., 1998). Il tratto ideale da scegliere per il campionamento dovrebbe essere il colon, cioè la parte di intestino deputata all'assorbimento dei nutrienti. Nel cane, però, l'assorbimento in questa posizione è molto limitato, mentre il metabolismo e la sintesi de novo di nutrienti potrebbero essere solo fattori confondenti (Hendriks and Sritharan, 2002). In questa specie spesso non è praticata la raccolta ileale, che richiederebbe l'anestesia, né l'incanulazione dei soggetti che è una pratica invasiva.

Dall'osservazione della Figura 51 e dalla Tabella 16, non si sono osservate differenze statisticamente significative ($P > 0,05$) tra i gruppi, sia al T0 che al T21, dato che trova conferma in diversi studi condotti sul cane sia dopo somministrazione di lievito vivo (Stercova et al., 2016), sia dopo l'aggiunta di estratti di parete (Martins et al., 2013; Pawar et al., 2017) o dopo colture (Lin et al., 2019; De Melo Santos et al., 2021). Questo dato potrebbe essere spiegato dal fatto che i lieviti vengono aggiunti alla dieta per modulare l'ambiente microbico dell'ultimo tratto dell'intestino, poiché sono una buona fonte di nutrienti per la crescita dei batteri benefici del colon. Si deve anche tenere in considerazione che, nel cane, la digestione è già praticamente terminata a livello di colon e risulterebbe perciò difficile osservare potenziali cambiamenti della digeribilità (Pawar et al., 2017).

È stato possibile rilevare soltanto uno studio riguardo questa specie che ha evidenziato un miglioramento della digeribilità ileale della sostanza secca dopo la somministrazione di derivati della parete cellulare del lievito *S.cerevisiae* (Middelbos et al., 2007). Ricerche, condotte su altri animali, polli e suini, hanno

messo in evidenza similmente che un lievito idrolizzato può migliorare tale digeribilità ileale, quando integrato alla dieta (Zhang et al., 2019; Ding et al., 2020; Sampath et al., 2021). Ciò può essere spiegato dall'alto contenuto di MOS e β -glucani, ottimi substrati per la crescita dei microrganismi intestinali benefici e buone fonti di enzimi digestivi e dall'azione trofica, che queste sostanze hanno sulla mucosa (Perricone et al., 2022).

Quando invece si vanno ad osservare solo i tempi T0 e T21, si può notare una tendenza alla significatività (P pari a 0,08) per il tempo 0 (Tabella16). Ad inizio prova si osservava una differenza di quasi 2 punti percentuali tra i due gruppi, differenza che si andava appianando nei 21 giorni. Sicuramente poi l'aggiunta del lievito ha aiutato il gruppo Y a recuperare la differenza iniziale, visto che in questo gruppo si è osservato un aumento della ATTD di quasi il 4% in sole 3 settimane.

5.2.6 PARASSITI

Le feci dei cani sono state analizzate per evidenziare la presenza di *Giardia* e di elminti, parassiti di particolare interesse per gli animali di allevamento, vista l'alta densità, il frequente turnover e l'inserimento continuo di nuovi individui.

I prebiotici e i probiotici sono capaci di prevenire la colonizzazione della parete cellulare intestinale da parte di batteri patogeni, virus e parassiti. La somministrazione di *S.cerevisiae var boulardii* e *S.cerevisiae* hanno dimostrato di avere effetti benefici contro *E.Coli*, *Salmonella*, *C.difficile*, *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *Helicobacter pylori* (Czerucka et al., 2007; Middelbos et al., 2007; Profir et al., 2015) grazie a due principali meccanismi d'azione: la produzione di fattori, che neutralizzano le tossine batteriche e la modulazione del segnale pro-infiammatorio della cellula ospite durante i processi infettivi (Czerucka et al., 2007). Il loro effetto è stato anche osservato su virus, quali *Coronavirus* e *Rotavirus* e su parassiti come *Isospora*, *Cryptosporium*, *Toxocaris canis* e *Giardia lamblia* (Chaucheyras-Durand and Durand, 2010; Profir et al., 2015). Lo spunto per osservare l'effetto di *S.cerevisiae var boulardii* in soggetti di allevamenti che si supponeva potessero avere parassitosi asintomatico è stato dato da uno studio

condotto sui topi, che ha valutato una riduzione del numero di larve di *T.canis* dopo trattamento con *S.cerevisiae* (Costa de Avila et al., 2012) e da altre ricerche che hanno valutato *Giardia* sui gerbilli (Ribeiro et al., 2021) e sull'uomo (Besirbellioglu et al., 2006) e hanno rilevato una riduzione del numero di parassiti.

La tecnica Flotac dual ha evidenziato i seguenti risultati (Tabella 17): *Giardia* è presente in 4 box su 10 (40%) al T0, ma in nessuno al T21, dato che potrebbe essere dovuto all'effetto del lievito come dimostrato in letteratura per i gerbilli (Ribeiro et al, 2021), oppure potrebbe essere causato dal ciclo stesso del parassita.

Tabella 17. Esame Flotac dual per la determinazione della presenza di *Giardia*, dove per positivo si intende l'evidenziazione di cisti della dimensione di 8-15 x 7-10 µm.

Box	Gruppo	<i>Giardia duodenalis</i> 0	<i>Giardia duodenalis</i> 21
1	Y	negativo	negativo
2	Y	negativo	negativo
3	Y	negativo	negativo
4	Y	positivo	negativo
5	Y	negativo	negativo
6	C	positivo	negativo
7	C	negativo	negativo
8	C	negativo	negativo
9	C	positivo	negativo
10	C	positivo	negativo

Giardia ha un ciclo di vita diretto: in seguito all'ingestione delle cisti, da parte dell'ospite, si ha la produzione asessuata di trofozoiti nel piccolo intestino (fase mobile attiva) a cui segue la produzione intermittente di cisti resistenti che vengono eliminate inizialmente in gran numero con le feci. L'infezione si verifica mediante la assunzione orale delle cisti e i trofozoiti dopo l'infezione si attaccano alle cellule epiteliali e hanno un periodo di prepatenza pari a 4-16 giorni. La patenza dura di solito diverse settimane o mesi e le cisti possono sopravvivere nell'ambiente anche in condizioni avverse (freddo e umidità) (www.esccap.it).

Visto il rilascio intermittente delle cisti, per ottimizzare la diagnosi, dovrebbero essere fatti campionamenti seriali per 3-4 giorni consecutivi e analisi ripetute.

Durante questo studio non è però stato possibile effettuare campionamenti di questo tipo.

I dati in letteratura mostrano una prevalenza doppia di *Giardia* negli allevamenti rispetto a quanto si può riscontrare negli animali di proprietà. Ciò si spiega con le caratteristiche proprie del parassita (il suo ciclo vitale, la sua contagiosità, la sua stabilità in ambiente, sopravvive diversi mesi anche in ambiente freddo e umido), la densità degli animali e i protocolli igienici utilizzati (Grellet et al., 2018). I dati raccolti riportano una prevalenza a livello mondiale che varia tra il 5% degli animali mantenuti in casa e fino al 100% dei soggetti allevati (Scaramozzino et al., 2009).

In allevamenti giapponesi ad esempio, è stata rilevata una prevalenza pari al 37,4% (Itho et al., 2005), simile a quella del nostro studio, del 14,6% (Sugano et al., 1989) o ancora del 48,2% (Mochizuki et al., 2001), mentre in canili americani tale prevalenza si attesta intorno al 22% (Tupler et al., 2012). Infine, uno studio che valuta la prevalenza di *Giardia* in cani allevati in Italia, ha messo in evidenza un valore del 20%, ma questa percentuale risultava maggiore negli allevamenti di grande dimensione rispetto a quelli più piccoli (Scaramozzino et al., 2009). La variazione percentuale può essere ricondotta all'età dei soggetti considerati (> nei soggetti giovani), alle condizioni igienico-sanitarie dell'allevamento, alla densità degli animali, al loro stato immunitario e alla metodica di analisi utilizzata. La flottazione eseguita con metodo Flotac dual ha evidenziato oltre a *Giardia*, anche la presenza di *Toxocaris leonina*. Tale parassita è un ascaride di grossa dimensione fino a 7-10cm, ubiquitaria nelle popolazioni di cani di tutto il mondo, ma più diffusa fra gli animali allevati dove la densità e lo stretto contatto tra soggetti ne facilita la trasmissione. Gli adulti si localizzano nell'intestino tenue dove depongono le uova che vengono escrete con le feci (Figura 52). Le uova hanno un periodo di prepatenza di 8-10 settimane circa e possono sopravvivere per mesi in ambiente, specialmente al freddo, visto che le uova non vengono distrutte neanche da un congelamento a -20°C né sono inattivate dai comuni disinfettanti (www.esccap.it). Tuttavia, la presenza di questo patogeno può essere difficile da diagnosticare perché spesso è asintomatica.

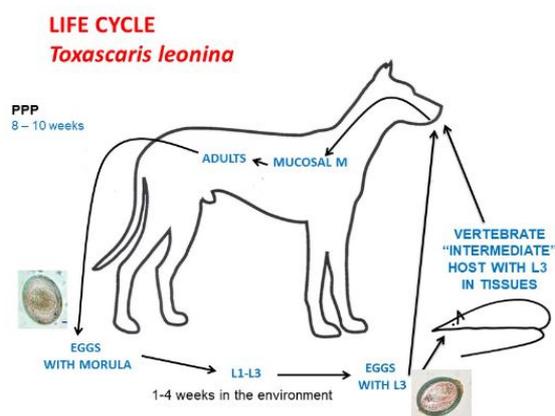


Figura 52. Rappresentazione schematica del ciclo di *T.leonina* (<https://wcvm.usask.ca/learnaboutparasites/parasites/toxascaris-leonina.php>)

La prevalenza di *T.leonina* rilevata in allevamento è riportata in Tabella 18.

Tabella 14. Esame Flotac dual per la determinazione della presenza di *T.leonina*, dove per positivo si intende l'evidenziazione di cisti della dimensione di 8-15 x 7-10 µm.

Box	Gruppo	<i>Toxascaris leonina</i> 0	<i>Toxascaris leonina</i> 21
1	Y	negativo	negativo
2	Y	negativo	negativo
3	Y	positivo	negativo
4	Y	negativo	negativo
5	Y	negativo	negativo
6	C	negativo	negativo
7	C	negativo	negativo
8	C	negativo	negativo
9	C	negativo	negativo
10	C	negativo	negativo

Come si evince dalla Tabella 14 nello studio è stata emersa una prevalenza molto bassa (solo 1/10) al T0 simile a quella della letteratura. *T.leonina* ha una prevalenza molto varia nella popolazione canina a livello mondiale: in America, ad esempio, varia tra lo 0 e l'87% (Fisher et al., 1994), in allevamenti olandesi la percentuale è risultata dello 0% (Overgaauw et al., 1998), del 2,5% in Belgio (Claerebout et al., 2009) e del 0,9% in Giappone (Itho et al., 2005), ma sempre si è confermata una maggiore prevalenza negli allevamenti, rispetto ai soggetti tenuti in casa (Claerebout et al., 2009).

Al T21, non sono stati rilevati parassiti il che può essere dovuto all'effetto dei lieviti, come dimostrato anche da altre indagini condotte mediante l'impiego di un lievito vivo *S.cerevisiae var boulardii* (Costa de Avuila et al., 2012), al lungo periodo di prepatenza (> dei 21 giorni di durata dello studio) oppure ancora all'effetto diluizione dovuto alla raccolta delle feci da box doppi. La numerosità ridotta del campione (soltanto 10 box doppi) può limitare le conclusioni da trarre sul reale effetto del lievito.

Vista la prevalenza dei parassiti a inizio prova e la condizione di allevamento dei soggetti, sembrerebbe quindi necessario un controllo sanitario particolarmente accurato, tramite esami copromicroscopici di routine, e una speciale attenzione agli animali riproduttori mediante migliorando dell'igiene e della pulizia delle gabbie che evita la permanenza a lungo delle feci nei box e la diffusione dei patogeni. Dovrebbe anche diventare obbligatoria l'igiene del personale addetto agli animali per scongiurare la diffusione delle uova o cisti e l'allontanamento degli animali diarroici che possono fungere da portatori. In più, i soggetti di nuova introduzione dovrebbero essere sottoposti a quarantena in modo da prevenire l'introduzione di animali parassitati. La sabbia delle aree gioco esterne, presenti nell'allevamento, dovrebbe essere sostituita regolarmente una o due volte l'anno e l'erba nei casi di infestazioni massicce dovrebbe essere rimossa e sostituita con asfalto (www.esccap.it).

5.2.7 IgA FECALI

Le immunoglobuline A fecali vengono prodotte dal tessuto linfoide mucosale intestinale (GALT), in particolare dalle plasmacellule delle placche di Peyer del tratto gastroenterico, come risposta immunitaria umorale locale a patogeni o tossine (Macpherson et al., 2008). Esse impediscono l'attacco e la penetrazione nel lume, di batteri e tossine, aumentano la secrezione di muco, prevengono l'infiammazione, aumentano il tempo di funzionamento degli enzimi digestivi in modo da prevenire l'assorbimento di alimenti e di proteine indigerite (Swanson et al., 2002a).

Per questo sono considerate la prima linea della difesa immunitaria non infiammatoria, della superficie mucosale (Cerutti and Rescigno, 2008). Una loro carenza è stata associata nel topo a una maggiore suscettibilità a tossine e patogeni intestinali o anche ad alterazioni del microbiota intestinale (Suzuki et al., 2004; Yang et al., 2020), mentre nel cane a IBD (Littler et al., 2006; Maeda et al., 2013).

Le IgA rientrano tra i biomarker di patologia non invasivi visto che sono il sottotipo di anticorpi più presenti nelle secrezioni (Grellet et al., 2014c). Per questo nell'uomo sono state associate a patologie gastroenteriche croniche come IBD, morbo di Chron e giardiasi (Cunningham-Rundles, 2001) e nel cane sono state utilizzate per valutare l'immunità intestinale (Tress et al., 2006; Peters et al., 2004).

In questo studio è sembrato importante valutare e quantificare le IgA (Figura 53) presenti nelle feci, poiché è noto che i parassiti presenti in allevamento possono indurre lesioni a livello intestinale e causare immunosoppressione.

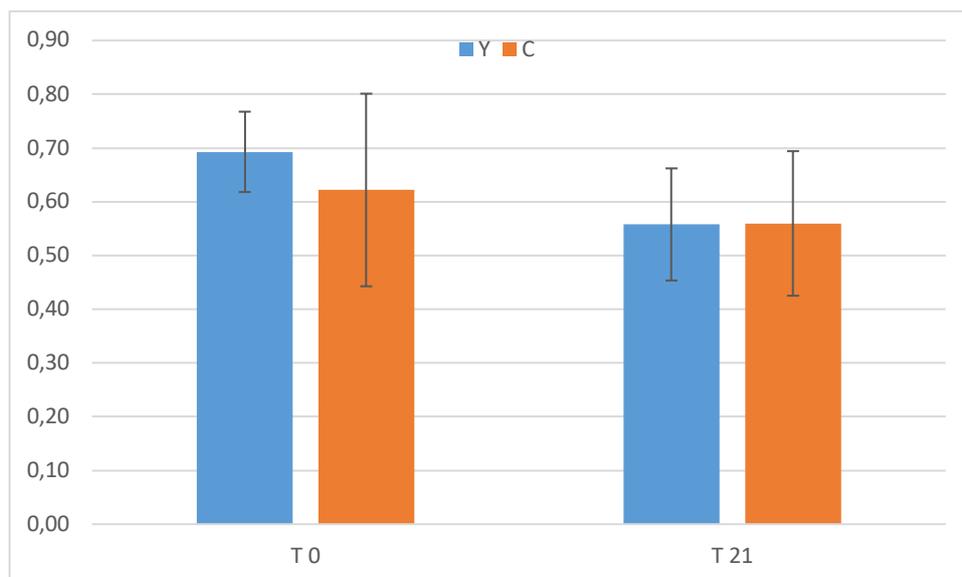


Figura 53. IgA espresse come mg/g di SS fecale, calcolate in due time poin (T0 e T21)

Dalla Figura 53 si evince che nel corso dello studio non sono state osservate differenze significative tra i gruppi nei due diversi tempi considerati, come dimostrato da Kroll e coautori (2020), secondo i quali i derivati della parete di lievito non modificano il contenuto di IgA fecali dopo il trattamento (Kroll et al., 2020). Il gruppo trattato, al T0, ha mostrato una media di IgA pari a 0,69 mg/g di SS fecale contro i 0,62 mg/g di SS fecale del gruppo controllo. Al tempo 21, poi, entrambi i gruppi hanno mostrato un calo numerico, ma non statisticamente significativo della concentrazione di IgA che raggiunge lo 0,56 mg/g di SS in entrambi i gruppi. Da tali risultati si può supporre che non ci sia correlazione tra la somministrazione di lievito e le IgA rilevate. Quest'ultimo dato non trova conferma con quanto riportato in letteratura, dove dopo somministrazione di MOS derivati da lieviti *S.cerevisiae*, le IgA fecali risultano aumentate (Theodoro et al., 2019).

Anche in altri studi dove venivano considerate però le IgA ileali è stato rilevato un loro significativo incremento dopo l'inizio del trattamento con MOS (Middelbos et al., 2007; Swanson et al., 2002a; Swanson et al., 2002b). In essi si afferma che le IgA fecali corrispondono solo al 15% delle IgA ileali, perché possono essere degradate dalla microflora del colon, in particolare dai clostridi (Swanson et al., 2002a; Swanson et al., 2002b). Da ciò si può dedurre che la valutazione delle IgA a livello fecale non è il metodo più rappresentativo per la misurazione degli

anticorpi secreti a livello mucosale (Ferguson et al., 1995), anche se è un metodo poco invasivo rispetto all'incanalazione dell'ileo.

In più la quantità di IgA presenti nelle feci è stata confrontata con la positività ai parassiti e non si è constatata nessuna correlazione: al T0, i box positivi ai test flotac, erano 5/10 mentre al T21 erano 0/10, anche se le IgA risultavano ridotte a fine prova.

In seguito, sarà interessante valutare gli effetti dei dati finora raccolti rispetto al microbiota intestinale dei soggetti, dato ancora mancante e che perciò non è presente in questa tesi.

5.2.8 NASO ELETTRONICO

L'odore delle feci è causato dai gas che si producono nell'intestino, soprattutto nel crasso, in seguito alla fermentazione dei carboidrati, alla putrefazione delle proteine e alla trasformazione degli acidi grassi a catena lunga, in acidi grassi a catena corta (Probert et al., 2014). Su tali processi è determinante l'azione della flora batterica che favorisce lo sviluppo di composti organici volatili (VOC). Essi sono il risultato delle fermentazioni microbiche, delle interazioni con i colonciti, della flora fecale, dell'integrità della mucosa e dei patogeni (Arasaradnam et al., 2013) e comprendono gas (H_2 , CO_2 , CH_4 , NH_3 , H_2S), idrocarburi, alcoli, aldeidi, chetoni, esteri, acidi organici, amine biogene (putrescina, cadaverina, spermidina), SCFA, BCFA, sostanze aromatiche (fenolo, indolo, scatolo), componenti che caratterizzano l'odore delle feci (Garner et al., 2007; Probert et al., 2014).

Tipo, entità e composizione della flora, così come tipo, intensità e prevalenza dei processi fermentativi e putrefattivi, determinano l'odore delle feci e la sua variabilità. È noto, infatti, da studi condotti sull'uomo che le feci acquisiscono odori diversi, ad esempio, durante forme patologiche che generalmente sono associate ad alterazioni nel microbiota (Arasaradnam et al., 2013; De Meiji et al., 2015; Chan et al., 2016; Hosfield et al., 2020).

Tra i batteri che compongono il microbiota intestinale, quelli proteolitici, presenti nel crasso, sono i responsabili delle fermentazioni putrefattive che portano all'accumulo di quasi tutti i cataboliti, responsabili dell'odore fecale. Ad esempio gli amminoacidi aromatici (fenilalanina, tirosina, triptofano) vengono degradati da batteri quali clostridi, *Bacteroides*, bifidobatteri, lattobacilli e enterobacilli che producono amine biogene (Drasar and Hill, 1974); gli AA solforati (cisteina, cistina, metionina e taurina) vengono ridotti a H₂S da batteri del genere *Desulfovibrio* e *Desulfomonas* (Awano et al., 2005); i BCFA sono prodotti dalla fermentazione di valina, leucina e isoleucina (Macfarlane and Cummings, 1991); gli SCFA sono prodotti in piccole quantità dal metabolismo degli AA glicina, treonina, alanina, glutammato, lisina (Barker, 1981; Elsdon and Hilton, 1978); i fenoli e gli indoli sono prodotti dalla fermentazione di tirosina e triptofano (Smith and Macfarlane, 1996a; Windey et al., 2012); l'ammoniaca dai Clostridia (Garner et al., 2007); le amine biogene dalla degradazione degli amminoacidi da parte di *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Clostridium* etc (Allison and Macfarlane, 1989; Smith and Macfarlane, 1996b; Matsumoto and Brenno, 2007; Hanfrey et al., 2011).

I VOC sono stati quindi proposti come biomarker fecali e sono stati impiegati, in umana, per il rilevamento di patologie quali i tumori, le patologie infiammatorie (IBD), le enteriti da *Campylobacter*, le coliti da *Clostridium difficile* e le enteriti necrotizzanti (Hosfield et al., 2020), mentre il naso elettronico è stato proposto come metodo utile a rilevare questi VOC. Esso rileva i cambiamenti nell'attività microbica che non vengono rilevati dalle comuni analisi condotte sul microbiota (Arasaradnam et al., 2013; De Meiji et al., 2015). In più il naso elettronico è stato indicato come metodo precoce nel riconoscimento della enterite necrotizzante (NEC) dei bambini, visto che è in grado di rilevare i cambiamenti che avvengono tra i VOC, prima che compaiano i sintomi (De Meiji et al., 2015).

Visti gli ottimi risultati osservati in umana per la diagnosi di malattie, anche infettive, è parso opportuno analizzare con l'E-nose le feci dei soggetti allevati così da valutare la correlazione tra l'odore fecale e la presenza di *Giardia* (Figura 54) o parassiti (*T.leonina*) (Figura 55).

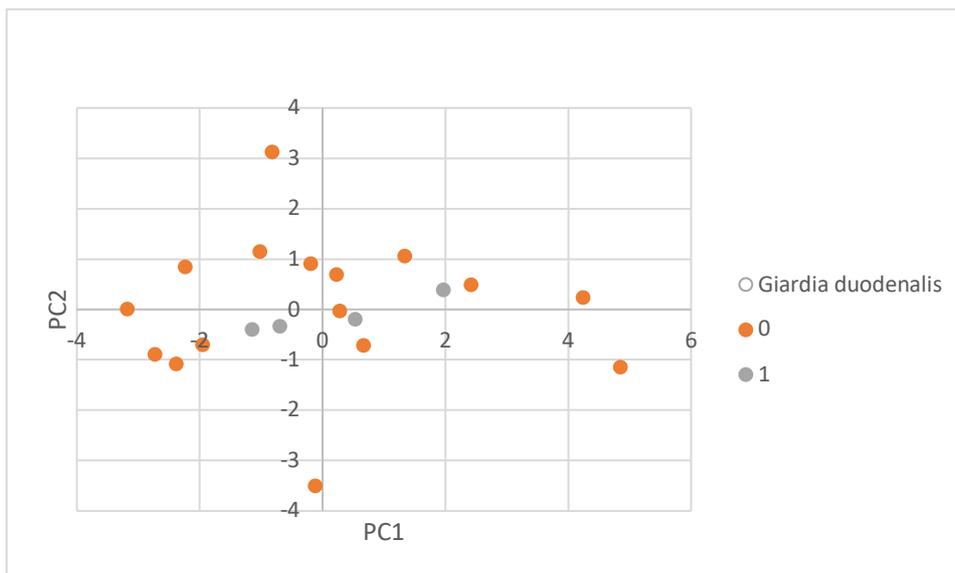


Figura 54. Rappresentazione della correlazione tra i sensori del naso e i parassiti, dove PC1 e PC2 indicano le componenti principali del modello statico utilizzato, mentre 0 e 1 rappresentano, rispettivamente, la negatività e la positività a *Giardia*.

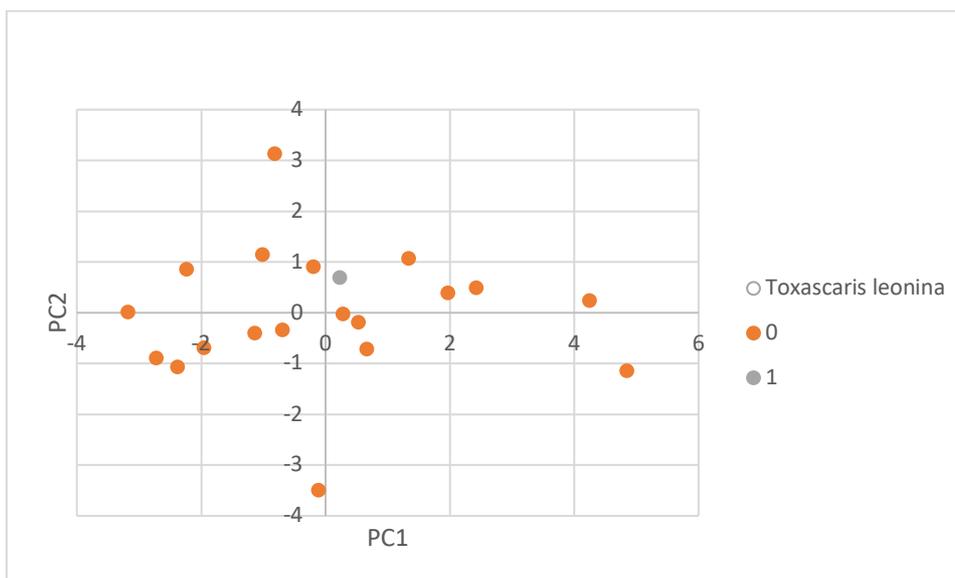


Figura 65. Rappresentazione della correlazione tra i sensori del naso e i parassiti, dove PC1 e PC2 indicano le componenti principali del modello statico utilizzato, mentre 0 e 1 rappresentano, rispettivamente, la negatività e la positività a *T.leonina*.

Le Figure 54 e 55 mostrano come non sia stato possibile evidenziare una correlazione tra i patogeni e i sensori del naso visto che i punti sono distribuiti in modo sparso, e da quanto si evince non appaiono differenze nei VOC rilevabili con il naso elettronico. Ciò può significare che i parassiti intestinali non

modificano in modo così significativo il microbiota intestinale da poter essere rilevato come cambiamento nei gas dal naso.

Tuttavia, come rilevato in letteratura, *Giardia* e altri protozoi causano nel microbiota delle modifiche che portano a una disbiosi segnalata sia nell'uomo che negli animali (Fekete et al., 2021). Nel cane, *Giardia* è stata associata ad un aumento di *Catenibacterium*, *Pseudomonas*, *Howardella*, *Clostridium* e *Lactobacillus* e, al contrario, a una riduzione di *Bacteroides*, *Megamonas* e *Pseudobutyvibrio* (Slapeta et al., 2015; Berry et al., 2020). Le feci di soggetti positivi sono descritte come più odorose e a questo odore meglio percepito potrebbero essere associate alcune modifiche avvenute nei batteri del microbiota (Tangtrongsup et al., 2010) e di conseguenza essere legate alle modifiche verificatesi nei VOC fecali.

Anche gli elminti sono stati associati a modificazioni del microbiota. Ad esempio, *T.cati* è stata associata nel gatto ad un aumento dei *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (Duarte et al., 2016).

La correlazione tra i sensori del naso e i gruppi, trattato e controllo, è stata poi valutata anche nel tempo*gruppo, come mostrato in Figura 56.

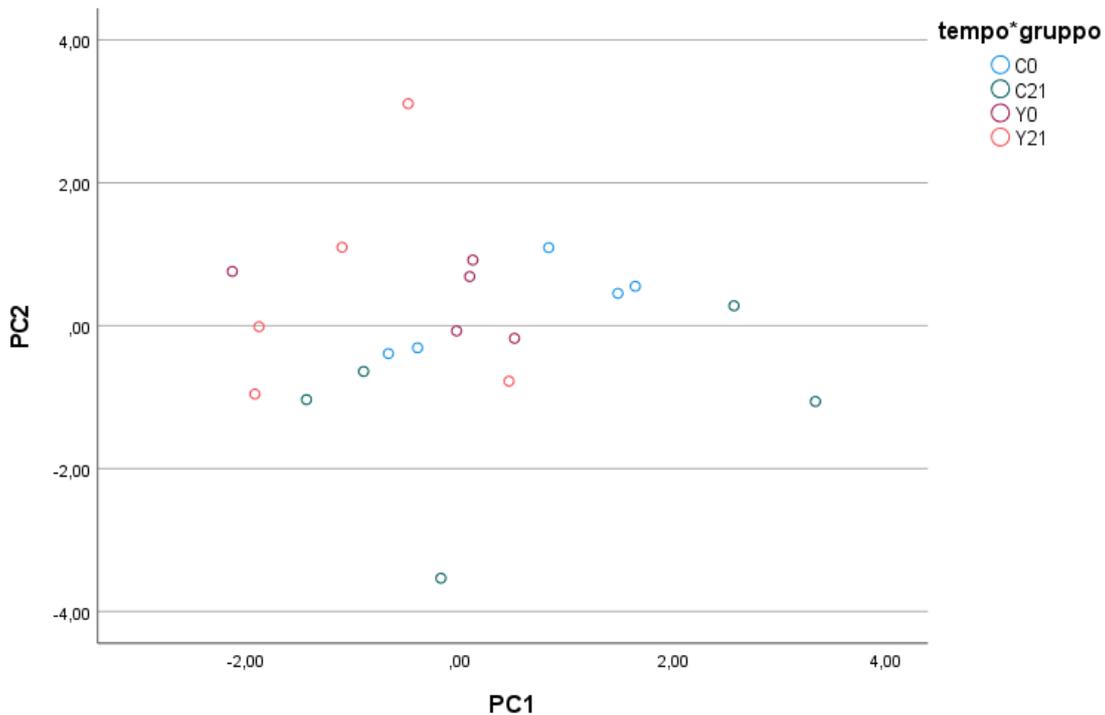


Figura 56. Rappresentazione della correlazione tra i sensori del naso e il tempo*gruppo, dove C0/Y0 e C21/Y21 rappresentano rispettivamente il gruppo controllo e trattato al tempo 0 e al tempo 21.

Anche in questo caso non ci sono correlazioni: i punti che rappresentano i diversi soggetti nel tempo risultano distribuiti in modo disomogeneo e ciò dimostrerebbe che non ci sia correlazione tra il lievito e l'odore fecale, indicando che, nel grosso intestino, il lievito non influenza il metabolismo degli amminoacidi.

In letteratura, è stato studiato l'effetto di *S.cerevisiae*: i risultati evidenziano una variazione nel microbiota e talvolta anche il loro effetto sulle amine biogene e su altre molecole, responsabili dell'odore fecale. L'idrolizzato di lievito (Strompfova et al., 2021) o i derivati di parete (Swanson et al., 2002a; Grieshop et al., 2004; Middelbos et al., 2007) aumentano il numero di *Bifidobacteria* e di *Lattobacilli*, mentre, sempre gli stessi derivati (Grieshop et al., 2004; Middelbos et al., 2007), le colture (Lin et al., 2019) o i lieviti vivi (Stercova et al., 2016) diminuiscono i *Coli*, i *Fusobacteria*, i *Clostridi*, gli *Enterococchi*. Le medesime diminuzioni sono state osservate anche per il pollo dopo somministrazione di lievito idrolizzato (Park et

al., 2020; Sampath et al., 2021). In particolare, la riduzione di specie come i *Clostridi*, responsabili di fermentazioni proteiche, deaminazione, decarbossilazione e deaminazione-decarbossilazione, che portano alla produzione di composti putrefattivi (ammoniaca, amine biogene, BCFA, indolo, fenoli e composti sulfurei) (Tabor and Tabor, 1985), dovrebbe ridurre gli odori fecali.

La parete di lievito ha ridotto la putrescina fecale (Theodoro et al., 2019), i composti volatili e l'ammoniaca (Zentek et al., 2002), mentre una coltura disidratata e i MOS non ha modificato la quantità di fenoli, di indoli (Swanson et al., 2002a; De Melo Santos et al., 2021) e di ammoniaca (Pawar et al., 2017), come anche rilevato nel nostro studio.

Un'ulteriore indagine sarà da svolgere quando perverranno i risultati del microbiota, così da valutare se eventuali suoi cambiamenti possono correlarsi con una maggiore sensibilità di specifici sensori.

5.3 CONCLUSIONI

In questo studio è stati valutati gli effetti della somministrazione di un lievito idrolizzato *S.cerevisiae*, (1,2g/die/cane) a cani adulti di razza maltese e yorkshire terrier su stato nutrizionale, digeribilità e benessere intestinale.

Non sono state osservate differenze statisticamente significative per l'assunzione di alimento (anche se si notano delle differenze numeriche sia tra i gruppi sia nei tempi), per il peso dei cani e per il fecal score con una media di circa 3 (feci morbide e formate). Da quanto si evince, il lievito non ha mostrato effetti migliorativi sulla consistenza delle feci, ma le ha mantenute costanti durante tutta la prova. *S.cerevisiae* non ha determinato effetti migliorativi neanche sull'ATTD e sulle IgA fecali.

Le analisi parassitologiche hanno rilevato *Giardia*, in 4 box su 10 al T0 e in nessun box, al T21. Quest'ultimo dato potrebbe essere dovuto all'effetto del lievito, come dimostrato in letteratura, oppure potrebbe essere dovuto al ciclo stesso del parassita che ha un rilascio intermittente delle cisti. *T.leonina*, invece, è stata

rilevata in un solo caso su 10, al T0, e in nessun campione, al T21. Ciò può essere dovuto all'effetto dei lieviti, al periodo di prepatenza oppure all'effetto diluizione derivato dalla raccolta delle feci da box doppi.

I sensori del naso elettronico sono, infine, stati correlati ai gruppi e alla presenza di parassiti, i quali modificano il microbiota secondo i dati presenti in letteratura. Dalle analisi eseguite, non sono state però individuate differenze. Quest'ultima rilevazione dimostrerebbe che né il lievito né la presenza di parassiti modifica in modo significativo i VOC prodotti nel colon e l'odore fecale.

Il limite di questo studio è quindi da imputare al ridotto numero dei soggetti considerati e dal tempo di osservazione limitato. Si tratta però di uno studio preliminare, volto a evidenziare qualsiasi possibile differenza osservabile nel gruppo trattato, rispetto al gruppo controllo.

Sarebbe opportuno quindi, per migliorare la significatività dei dati valutare i cani singolarmente e, nel caso di analisi parassitologiche, eseguire campionamenti seriali in 3-4 giorni consecutivi e ripetute analisi.

CAPITOLO 6

Conclusioni generali

Negli ultimi decenni si è assistito ad un aumento della considerazione dell'uomo verso l'alimentazione degli animali da compagnia e sempre più spesso, si tende a ricercare diete bilanciate e appositamente formulate che garantiscano sicurezza, qualità e adeguatezza nutrizionale in tutti gli stati fisiologici dell'animale.

In questa tesi sono state prese in esame alcuni tipi di diete per cani, presenti sul mercato: premium, super premium, con particolari fini nutrizionali, umide e BARF al fine di valutarne le caratteristiche nutrizionali e la digeribilità *in vitro*.

Il confronto effettuato tra le linee guida FEDIAF e i valori di SS, PG, EE, FG e ceneri, rilevati in questo studio, dimostra chiaramente che, tutte le formulazioni prese in esame corrispondono alle raccomandazioni proposte: un contenuto minimo di proteina grezza pari al 18%, per animali con maintenance energy requirement (MER) di 110 kcal/kg^{0,75} e un contenuto minimo di lipidi grezzi dell'5,5% (FEDIAF, 2021). Ciò consente di garantire ai cani l'assunzione di mangimi sicuri e adeguati alle loro necessità.

Il calcolo della digeribilità eseguito *in vitro* ha avuto il vantaggio di escludere tutte le possibili interferenze proprie di ogni animale e concludere che la variabilità riscontrata può soltanto essere determinata dalle caratteristiche dell'alimento analizzato.

Dai risultati ottenuti si evince perciò che le diete considerate nella presente indagine hanno tutte una buona digeribilità, con valori relativi alla SS superiori all'80% e alla PG superiori al 75% e simili ai valori ottenuti con l'uso di metodi,

come rilevato in letteratura (Hendricks et al., 2013; Biagi et al., 2016; Algya et al., 2018; Penazzi et al., 2021). Questo conferma che il metodo scelto, che prevede la digestione dei campioni in due step, e che mima *in vitro* la digestione gastrica del cane, può essere considerato adatto allo scopo. Tuttavia, sembra opportuno condurre ulteriori approfondimenti, sempre con prove di digeribilità *in vitro*, poiché, soltanto con un adeguato data set sarà possibile, in futuro, stabilire quanto il protocollo preso in esame sia in grado di mimare, *in vivo*, la digeribilità apparente nel cane.

Inoltre, alla luce del crescente interesse sia delle aziende che producono *pet food* che dei proprietari di cani verso l'utilizzo di additivi specifici come i lieviti, sono stati indagati gli effetti che tali sostanze avevano avuto su cani adulti, cagne in gravidanza/allattamento e i rispettivi cuccioli. In particolare sono stati studiati gli esiti che due lieviti, il *Saccharomyces cerevisiae* e il *S.cerevisiae var boulardii*, avevano prodotto sulle performance di crescita (peso, body condition score e feed intake), sulle caratteristiche fecali (fecal score, sostanza secca, digeribilità apparente totale e presenza di patogeni), sulla risposta immunitaria locale (quantità di IgA), sulla composizione del microbiota intestinale e sull'odore fecale. La lettura dei dati ottenuti rende possibile affermare che, la dieta addizionata con lievito *Saccaromyces cerevisiae var boulardii*, somministrata a femmine e cuccioli, consente a entrambe le categorie di mantenere costanti il fecal score e le performance di crescita (peso corporeo, incremento ponderale e assunzione media di alimento). Non sembra invece che il lievito aggiunto abbia influenzato la ATTD, la prevalenza di *Giardia spp* e Coronavirus canino, l'impronta olfattiva delle feci e *alfa e beta diversity* del microbiota. Le analisi condotte sul microbiota, durante l'analisi dei taxa discriminanti al T28, hanno mostrato che l'integrazione con lievito ha aumentato l'abbondanza dell'ordine *Clostridiales*, e dei membri delle famiglie Helicobacteraceae e Aerococcaceae, ma contemporaneamente ha ridotto la quantità dei generi *Prevotella* e *Paraprevotella*, entrambi appartenenti alla famiglia delle *Paraprevotellaceae*. Al T56, invece, questa situazione si è invertita in modo favorevole per l'animale e si è verificato un aumento degli *Actinobacteria* e una riduzione delle famiglie *Peptococcaceae* e *Mogibacteriaceae*, entrambe appartenenti all'ordine dei *Clostridiales*.

Lo studio condotto su cani adulti, alla cui dieta era stato aggiunto il lievito idrolizzato *S.cerevisiae*, ha evidenziato che tale lievito non ha avuto effetto sull'assunzione di alimento (anche se si notano alcune differenze numeriche, sia tra i gruppi sia nei tempi), sul peso dei cani, sul fecal score, sulla ATTD, sulle IgA e sull'odore fecale, ma ha mantenuto costanti tali parametri durante tutta la prova. Sono da evidenziare i risultati ottenuti dalle analisi parassitologiche che hanno rilevato la presenza di *Giardia spp*, in 4 box su 10 al T0 e in nessun box, al T21 per il gruppo trattato. Quest'ultimo dato potrebbe essere dovuto all'effetto del lievito, come dimostrato in letteratura, oppure potrebbe essere dovuto al ciclo stesso del parassita che ha un rilascio intermittente delle cisti. La presenza di *T.leonina*, invece, è stata rilevata in un solo caso su 10, al T0, e in nessun campione, al T21. Ciò può essere dovuto all'effetto dei lieviti, al periodo di prepatenza oppure all'effetto diluizione derivato dalla raccolta delle feci da box doppi.

Il limite di quest'ultimo studio condotto su cani adulti sembra da imputare al ridotto numero dei soggetti considerati (20) e al limitato tempo di osservazione (21 giorni). Sarebbe opportuno quindi, per migliorare la significatività dei dati valutare i cani singolarmente e, nel caso di analisi parassitologiche, eseguire campionamenti seriali in 3-4 giorni consecutivi e ripetere le analisi.

BIBLIOGRAFIA

AAFCO- The Association of American Feed Control Officials Dog and Cat Food Nutrient Profiles. (2014).

Ahlstrøm, Ø., Skrede, A., While, S. G., Hove, K. (2006). Effect of exercise on nutrient digestibility in trained hunting dogs fed a fixed amount of food. *The Journal of nutrition*, 136(7), 2066S-2068S.

Aktas, M. S., Borku, M. K., Ozkanlar, Y. (2007). Efficacy of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in dogs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51, 365-369.

Algya, K. M., Cross, T. W. L., Leuck, K. N., Kastner, M. E., Baba, T., Lye, L., de Godoy M. R. C., Swanson, K. S. (2018). Apparent total-tract macronutrient digestibility, serum chemistry, urinalysis, and fecal characteristics, metabolites and microbiota of adult dogs fed extruded, mildly cooked, and raw diets. *Journal of animal science*, 96(9), 3670-3683.

Al-Khalaifa, H., Al-Nasser, A., Al-Surayee, T., Al-Kandari, S., Al-Enzi, N., Al-Sharrah, T., Ragheb, G., Al-Qalaf, S., Mohammed, A. (2019). Effect of dietary probiotics and prebiotics on the performance of broiler chickens. *Poultry science*, 98(10), 4465-4479.

Allaart, J., G., van Asten, A., J., A., M., Vernooij, J., C., M., Grone, A., 2011. Effect of *Lactobacillus fermentum* on beta2 toxin production by *Clostridium perfringens*. *Applied and Environment Microbiology*, 77, 4406–4411.

Allison, C., Macfarlane, G.T., 1989. Influence of pH, nutrient availability, and growth rate on amine production by *Bacteroides fragilis* and *Clostridium perfringens*. *Applied and environmental microbiology*, 55, 2894–2898.

Altomare, D. F., Porcelli, F., Picciariello, A., Pinto, M., Di Lena, M., Caputi Iambrenghi, O., Ugenti I., Guglielmi A., Vincenti L., De Gennaro, G. (2016). The use of the PEN3 e-nose in the screening of colorectal cancer and polyps. *Techniques in coloproctology*, 20(6), 405-409.

Altwegg, M., Schnack, J., Zbinden, R. (1995). Influence of *Saccharomyces boulardii* on *Aeromonas hemolysin*. *Medical Microbiology Letters*, 4, 417-425.

Alugongo, G. M., Xiao, J. X., Chung, Y. H., Dong, S. Z., Li, S. L., Yoon, I., Hu Z.H., Cao, Z. J. (2017). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Performance and health. *Journal of dairy science*, 100(2), 1189-1199.

Alvarenga, I. C., Aldrich, C. G., Ou, Z. (2019). Comparison of four digestibility markers to estimate fecal output of dogs. *Journal of animal science*, 97(3), 1036-1041.

Alvarenga, I. C., Aldrich, C. G., Shi, Y. C. (2021). Factors affecting digestibility of starches and their implications on adult dog health. *Animal Feed Science and Technology*, 282, 115134.

Ahmed, I., Greenwood, R., Costello, B., Ratcliffe, N., Probert, C. S. (2016). Investigation of faecal volatile organic metabolites as novel diagnostic biomarkers in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 43(5), 596-611.

Agazzi, A., Ferroni, M., Fanelli, A., Marocco, S., Invernizzi, G., Dell'Orto, V., Savoini, G. (2011). Evaluation of the effects of live yeast supplementation on apparent digestibility of high-fiber diet in mature horses using the acid insoluble ash marker modified method. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(1), 13-18.

Agazzi, A., Perricone, V., Omodei Zorini, F., Sandrini, S., Mariani, E., Jiang, X. R., Ferrari A., Crestani M., Nguyen T.X., Bontempo V., Domeneghini C., Savoini, G. (2020). Dietary mannan oligosaccharides modulate gut inflammatory response and improve duodenal villi height in post-weaning piglets improving feed efficiency. *Animals*, 10(8), 1283.

Ansa. (2017). Animali domestici, sono 60 milioni le famiglie italiane, si punta al riconoscimento in società. *Ansa*. http://www.ansa.it/lifestyle/notizie/passioni/animali/2017/05/09/animali-domestici-dal-ruolo-in-famiglia-al-riconoscimento-in-societa_817d1c63-b05f-485b-922f-f9018d7e159a (accesso al sito in data 8/09/2022);

Arasaradnam, R. P., Quraishi, N., Kyrou, I., Nwokolo, C. U., Joseph, M., Kumar, S., Bardhan K.D., Covington, J. A. (2011). Insights into 'fermentonomics': evaluation of volatile organic compounds (VOCs) in human disease using an electronic 'e-nose'. *Journal of medical engineering & technology*, 35(2), 87-91.

Arasaradnam, R. P., Ouaret, N., Thomas, M. G., Quraishi, N., Heatherington, E., Nwokolo, C. U., Bardhan K.D., Covington, J. A. (2013). A novel tool for noninvasive diagnosis and tracking of patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 19(5), 999-1003.

Archer, J. (1997). Why do people love their pets? *Evolution and Human Behavior*, 18(4), 237-259.

Arendt, D., Musser, J., Baker, C., Bergman A., Cepko C., Erwin D. H., Pavlicev M., Schlosser G., Widder S., Laubichler M.D., Wagner G. P. (2016). The origin and evolution of cell types. *Nature Reviews Genetics*, 17 (12), 744- 757

Anderson W.P., Reid C.M., Jennings G.L. (1992). Pet ownership and risk factors for cardiovascular disease. *Medical journal of Australia*, 157, 298-301

Ansari, F., Alian Samakkhah, S., Bahadori, A., Jafari, S. M., Ziaee, M., Khodayari, M. T., Pourjafar, H. (2021). Health-promoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-29.

Antonacopoulos, N. M. D., Pychyl, T. A. (2010). An examination of the potential role of pet ownership, human social support and pet attachment in the psychological health of individuals living alone. *Anthrozoös*, 23(1), 37-54.

Antongiovanni, M., Franci, O., Acciaioli, A., Bruni, R., Pugliese, C., Ponzetta, M.P., Martini, A. (1998). Supplementation of cereal straws with different protein feeds: in vivo studies. *Options Méditerranéennes. Serie B: Etudes et Recherches*, 16, 53-64

ASSALCO. (2022). XV edizione Rapporto ASSALCO-ZOOMARK 2022. Alimentazione e cura degli animali da compagnia. Pet in Italia:15 anni di cambiamenti in famiglia e in società.

AOAC. (2005). Official methods of analysis of AOAC international. 18th ed.

Arasaradnam, R. P., Quraishi, N., Kyrou, I., Nwokolo, C. U., Joseph, M., Kumar, S., Bardhan K.D., Covington, J. A. (2011). Insights into 'fermentonomics': evaluation of volatile organic compounds (VOCs) in human disease using an electronic 'e-nose'. *Journal of medical engineering & technology*, 35(2), 87-91.

Arasaradnam, R. P., Ouaret, N., Thomas, M. G., Quraishi, N., Heatherington, E., Nwokolo, C. U., Bardhan K.D., Covington, J. A. (2013). A novel tool for noninvasive diagnosis and tracking of patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 19(5), 999-1003.

Awano, N., Wada, M., Mori, H., Nakamori, S., Takagi, H. (2005). Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases. *Applied and environmental microbiology*, 71, 4149–4152

Axelsson, E., Ratnakumar, A., Arendt, M. L., Maqbool, K., Webster, M. T., Perloski, M., Liberg O., Arnemo KJ.M., Hedhammar A., Lindblad-Toh, K. (2013). The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature*, 495(7441), 360-364.

Bacon, J. S. D., Farmer, V. C., Jones, D., Taylor, I. F. (1969). The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure. *Biochemical Journal*, 114(3), 557–567.

Bagheri, M., Ghorbani, G. R., Rahmani, H. R., Khorvash, M., Nili, N., Sudekum, K. H. (2009). Effect of live yeast and mannan-oligosaccharides on performance of early-lactation Holstein dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(6), 812-818.

Baillon ML, Marshall-Jones ZV, Butterwick RF. (2004). Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs. *American journal of veterinary research*, 65(3), 338-343.

Baldwin, K., Bartges, J., Buffington, T., Freeman, L. M., Grabow, M., Legred, J., Ostwald Jr, D. (2010). AAHA nutritional assessment guidelines for dogs and cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46(4), 285-296.

Ballweber, L. R., Xiao, L., Bowman, D. D., Kahn, G., Cama, V. A. (2010). Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends in parasitology*, 26(4), 180-189.

Bandai, C., Ishiguro, S., Masuya, N., Hohdatsu, T., Mochizuki, M. (1999). Canine coronavirus infections in Japan: virological and epidemiological aspects. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(7), 731-736.

Banks M.R., Banks W.A. (2002). The effect of animal-assisted therapy on loneliness in an elderly population in long-term care facilities. *The journals of gerontology series A biological sciences and medical sciences*, 57, M428-M432

Barker, H.A. (1981). Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Annual review of biochemistry*, 50, 23–40

Barry, K. A., Hernot, D. C., Middelbos, I. S., Francis, C., Dunsford, B., Swanson, K. S., Fahey Jr, G. C. (2009). Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. *Journal of animal science*, 87(10), 3244-3252.

Bastos, T. S., de Lima, D. C., Souza, C. M. M., Maiorka, A., de Oliveira, S. G., Bittencourt, L. C., Félix, A. P. (2020). *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* reduce faecal protein catabolites concentration and odour in dogs. *BMC veterinary research*, 16(1), 1-8.

Bauer JE, Heinemann KM, Lees GE, Waldron M.K. (2006). Docosahexaenoic acid accumulates in plasma of canine puppies raised on alpha-linolenic acid-rich milk during suckling but not when fed alpha-linolenic acid-rich diets after weaning. *Journal of Nutrition*, 136 (7), 2087S-2089S

Bayoumi, M. A., Griffiths, M. W. (2012). In vitro inhibition of expression of virulence genes responsible for colonization and systemic spread of enteric pathogens using *Bifidobacterium bifidum* secreted molecules. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 255–263.

Bell, J. A., Kopper, J. J., Turnbull, J. A., Barbu, N. I., Murphy, A. J., Mansfield, L. S., 2008. Ecological characterization of the colonic microbiota of normal and diarrheic dogs. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 149–694

Beloshapka, A. N., Duclos, L. M., Boler, B. M. V., Swanson, K. S. (2012). Effects of inulin or yeast cell-wall extract on nutrient digestibility, fecal fermentative end-product concentrations, and blood metabolite concentrations in adult dogs fed raw meat-based diets. *American journal of veterinary research*, 73(7), 1016-1023.

Beloshapka, A. N., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Steiner, J. M., Duclos, L., Swanson, K. S. (2013).

Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 84, 532-541

Benyacoub, J., Perez, P. F., Rochat, F., Saudan, K. Y., Reuteler, G., Antille, N., HUmen M., De Antoni G.L., Cavadini C., Blum S., Schiffrin, E. J. (2005). Enterococcus faecium SF68 enhances the immune response to Giardia intestinalis in mice. *The Journal of nutrition*, 135(5), 1171-1176.

Berglund, B., Danell, B. (1987). Live weight changes, feed consumption, milk yield and energy balance in dairy cattle during the first period of lactation. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 37(4), 495-509.

Berry, A. S., Johnson, K., Martins, R., Sullivan, M. C., Farias Amorim, C., Putre, A., Scott A., Wang S., Lindsay B., Baldassano R.N., Nolan T.J., Beiting, D. P. (2020). Natural infection with Giardia is associated with altered community structure of the human and canine gut microbiome. *Mosphere*, 5(4), e00670-20.

Berto, P. N., Tse, M. L., Ramos, D. R., Saleh, M. A., Miassi, G. M., Yamatogi, R. S., Berto D.A., Messias, A. (2020). Dietary supplementation with hydrolyzed yeast and its effect on the performance, intestinal microbiota, and immune response of weaned piglets. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92.

Besirbellioglu, B. A., Ulcay, A., Can, M., Erdem, H., Tanyuksel, M., Avci, I. Y., Araz E., Pahsa, A. (2006). Saccharomyces boulardii and infection due to Giardia lamblia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 38(6-7), 479-481.

Beynen, A. C. (2017). Brain food for puppies. *Creature Companion*, 10(1), 36-38.

Beynen A.C. (2018). Insect-based petfood. *Creature companion*, 9, 40-41.

Beynen A.C. (2019). Yeast in petfood. *Creature companion*. https://www.researchgate.net/publication/331429026_Beynen_AC_2019_Yeast_in_petfood

Biagi G, Cipollini I, Pompei A, Zaghini G, Matteuzzi D. (2007). Effect of a Lactobacillus animalis strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs. *Veterinary Microbiology*, 124, 160-165.

- Biagi E, Candela M, Turrone S, Garagnani P, Franceschi C, Brigidi P. (2013). Ageing and gut microbes: perspectives for health maintenance and longevity. *Pharmacological research*, 69(1),11-20.
- Biagi, G., Cipollini, I., Grandi, M., Pinna, C., Vecchiato, C. G., Zaghini, G. (2016). A new in vitro method to evaluate digestibility of commercial diets for dogs. *Italian Journal of Animal Science*, 15(4), 617-625.
- Biagi, G., Chiofalo, B., Cutrignelli, M.I. De Angelis, A., Fusi, E., Meineri, G., Prola, L., Ricci, R., Sandri M. (2021). Nutrizione e alimentazione del cane e del gatto, 1th ed., Edagricole, pp. 1-333
- Bill Kaelle, G. C., Menezes Souza, C. M., Bastos, T. S., Vasconcellos, R. S., Oliveira, S. G. D., Félix, A. P. (2022). Diet digestibility and palatability and intestinal fermentative products in dogs fed yeast extract. *Italian Journal of Animal Science*, 21(1), 802-810.
- Biourge V, Sergheraert R. (2002). Hair pigmentation can be affected by diet in dogs. *Proceedings of the Comparative Nutrition Society*, 4, 103-104
- Blake, A., Suchodolski, J. S. (2016). Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. *Animal Frontiers*, 6, 37–42.
- Block, E., Kilmer, L. H., & Muller, L. D. (1981). Acid insoluble ash as a marker of digestibility for sheep fed corn plants or hay and for lactating dairy cattle fed hay ad libitum. *Journal of Animal Science*, 52(5), 1164-1169.
- Bordenstein, S. R., Theis, K. R. (2015). Host biology inLight of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS biology*, 13 (8), e1002226.
- Boirivant, M., Strober, W. (2007). The mechanism of action of probiotics. *Current opinion in gastroenterology*, 23, 679-692
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.
- Boisen S., Fernández J.A. (1997), prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses. *Animal feed science and technology*, 68(3-4), 277-286
- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley G.A., Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 1-17.
- Bontempo V. (2005), Nutrition and Health of dogs and cats: evolution of petfood. *Veterinary research communications*, 29 (2), 45-50

Bontempo, V., Di Giancamillo, A., Savoini, G., Dell'Orto, V., Domeneghini, C. (2006). Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 129(3-4), 224-236.

Bosch, G., Zhang, S., Oonincx, D. G., Hendriks, W. H. (2014). Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods. *Journal of nutritional science*, 3.

Bosch G, Hagen-Plantinga EA, Hendriks WH. (2015). Dietary nutrient profiles of wild wolves: insights for optimal dog nutrition? *British Journal of Nutrition*, 113 (S1), S40-54.

Bosch G., Vervoort JJM., Hendriks WH. (2016). In vitro digestibility and fermentability of selected insects for dog foods. *Animal Feed Science and Technology*, 221, 174-184.

Bosch, S., Lemmen, J. P., Menezes, R., van der Hulst, R., Kuijvenhoven, J., Stokkers, P. C., de Meij T.G., de Boer, N. K. (2019). The influence of lifestyle factors on fecal volatile organic compound composition as measured by an electronic nose. *Journal of Breath Research*, 13(4), 046001.

Bosch, G., Swanson, K. S. (2021). Effect of using insects as feed on animals: pet dogs and cats. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(5), 795-805.

Bouزيد, M., Halai, K., Jeffreys, D., Hunter, P. R. (2015). The prevalence of Giardia infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Veterinary parasitology*, 207(3-4), 181-202.

Boyle, A. G., Magdesian, K. G., Gallop, R., Sigdel, S., Durando, M. M. (2013). *Saccharomyces boulardii* viability and efficacy in horses with antimicrobial-induced diarrhoea. *Veterinary Record*, 172(5), 128-128.

Bradbery AN, Coverdale JA, Lucia LM, Acuff GR, Hartz CJ. (2015). Detection of Salmonella in equine facility environmental samples by 2 methods. *Journal of Equine Veterinary Science*, 5(35), 418-436.

Brady L.J., Amstrong M.K., Muriuri K.L., Romsos D.R., Bergen G., Leveille G.A. (1977). Influence of prolonged fasting in the dog glucose turnover and blood metabolite. *The Journal of nutrition*, 197, 1053-1061

Brandao, R. L., Castro, I. M., Bambirra, E. A., Amaral, S. C., Fietto, L. G., Tropia, M. J., Neves, M. J., Dos Santos, R. G., Gomes, N. C., Nicoli, J. R. (1998). Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 564-568.

Brambillasca S, Purtscher F, Britos A, Repetto JL, Cajarville C. (2010). Digestibility, fecal characteristics, and plasma glucose and urea in dogs fed a commercial dog food once or three times daily. *he Canadian Veterinary Journal*, 51(2), 190.

Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S., Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *Journal of Experimental Medicine*, 197, 1119–1124.

Buddington RK, Paulsen DB. (1998). Development of the canine and feline gastrointestinal tract. *Recent advances in canine and feline nutrition*, 2, 195-215.

Buddington, R. K. (2003). Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 64, 646–651

Buff PR., Carter RA., Bauer JE., Kersey JH. (2014), Natural pet food: A review of natural diets and their impact on canine and feline physiology. *Journal of animal science*, 92(9), 3781-3791.

Buts, J. P., Bernasconi, P., Vaerman, J. P., Dive, C. (1990). Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Digestive Disease and Sciences*, 35, 251-256.

Butterwick R. (2021). Calcolo del contenuto energetico delle diete per animali da compagnia. *Vetfocus*, 24.3. <https://vetfocus.royalcanin.com/it/scientifico/calcolo-del-contenuto-energetico-delle-diete-per-animali-da-compagnia#:~:text=Il%20contenuto%20energetico%20delle%20diete,kcal%2F100%20g%20di%20alimento>.

Calabrò, S., Vastolo, A., Musco, N., Lombardi, P., Troisi, A., Polisca, A., Vallesi, E., Orlandi, R., Cutrignelli, M. I. (2021). Effects of two commercial diets on several reproductive parameters in bitches: Note two—lactation and puppies' performance. *Animals*, 11(1), 173.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583.

Calvez, J., Biourge, V., Weber, M., Ecochard, C. (2012). Metabolizable energy in dry dog food is best predicted by NRC 2006 equation. 12. AAVN Clinical Nutrition and Research Symposium, May 2012, New Orleans, USA

Cagan A, Blass T. (2016). Identification of genomic variants putatively targeted by selection during dog domestication. *BMC evolutionary biology*, 16(1), 1-13.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D., Lozupone C.A., Turnbaugh P.J., Fierer N., Knight R. (2011). Global patterns of 16S rRNA

diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108, 4516–4522.

Cardinali, G., Martini, A. (1994). Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 791–797.

Case L.P., Daristotle L., Hayek M.G., Foess Raasch M. (2010). *Canine and Feline Nutrition: A Resource for Companion Animal Professionals*, 3ed, Elsevier Mosby, pp. 1-565.

Castagliuolo, I., Riegler, M., F., Valenick, L., LaMont, J., T., Pothoulakis, C. (1999). *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infection and Immunity*, 67, 302–307.

Cave, N. J. (2006). Hydrolyzed protein diets for dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 36(6), 1251-1268.

Cerutti, A., Rescigno, M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*, 28(6), 740-750.

Chacher, M. F. A., Kamran, Z., Ahsan, U., Ahmad, S., Koutoulis, K. C., Din, H. Q. U., Cengiz, Ö. (2017). Use of mannan oligosaccharide in broiler diets: an overview of underlying mechanisms. *World's Poultry Science Journal*, 73(4), 831-844.

Chan, D. K., Leggett, C. L., Wang, K. K. (2016). Diagnosing gastrointestinal illnesses using fecal headspace volatile organic compounds. *World journal of gastroenterology*, 22(4), 1639.

Chan, H. W., Wong, D. F. K. (2022). Effects of Companion Dogs on Adult Attachment, Emotion Regulation, and Mental Wellbeing in Hong Kong. *Society & Animals*, 1(aop), 1-21.

Chapman, M.A., Grahn, M.F., Hutton, M., Williams, N.S. (1995). Butyrate metabolism in the terminal ileal mucosa of patients with ulcerative colitis. *British Journal of Surgery*, 82:36-38

Charalampopoulos, D., Rastall, R. A. (2012). Prebiotics in foods. *Current opinion in Biotechnology*, 23(2), 187-191.

Chaucheyras-Durand, F., Durand, H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial microbes*, 1(1), 3-9.

Cheli, F., Pinotti, L., Ottoboni, M., Tretola, M., Dell'orto, V. (2016). Cereal industry: e-nose for real time and online quality and safety control and management. *Sensors & Transducers*, 201(6), 52.

Cheli, F., Bontempo, V., Pinotti, L., Ottoboni, M., Tretola, M., Baldi, A., Dell'Orto, V. (2018). Feed analysis and animal nutrition: Electronic nose as a diagnostic tool. *Chemical Engineering Transactions*, 68, 223-228

Claerebout, E., Casaert, S., Dalemans, A. C., De Wilde, N., Levecke, B., Vercruyssen, J., Geurden, T. (2009). Giardia and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. *Veterinary parasitology*, 161(1-2), 41-46.

Cohen, S. P. (2002). Can pets function as family members?. *Western Journal of Nursing Research*, 24(6), 621-638.

Cole, N. A., Purdy, C. W., Hutcheson, D. P. (1992). Influence of yeast culture on feeder calves and lambs. *Journal of Animal Science*, 70(6), 1682-1690.

Collado, M. C., Grzeskowiak, Ł., Salminen, S. (2007). Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Current Microbiology*, 55, 260–265

Collier, C. T., Carroll, J. A., Ballou, M. A., Starkey, J. D., Sparks, J. C. (2011). Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae* boulardii reduces mortality associated with immune and cortisol responses to *Escherichia coli* endotoxin in pigs. *Journal of Animal Science*, 89(1), 52-58.

Costa de Avila, L. F. D. C., Conceição, F. R., de Lima Telmo, P., Dutra, G. F., de los Santos, D. G., Martins, L. H. R., Aires Berne M.E., Almeida da Silva P.E., Scaini, C. J. (2012). *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis. *Veterinary Parasitology*, 187(1-2), 337-340.

Cunningham-Rundles, C. (2001). Physiology of IgA and IgA deficiency. *Journal of clinical immunology*, 21(5), 303-309.

Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics—*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26 (6), 767-78.

Czerucka, D., Rampal, P. (2019). Diversity of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 mechanisms of action against intestinal infections. *World Journal of Gastroenterology*, 25(18), 2188.

D'Angelo, S., Fracassi, F., Bresciani, F., Galuppi, R., Diana, A., Linta, N., Bettini, G., Morini, M., Pietra, M. (2018). Effect of *Saccharomyces boulardii* in dogs with chronic enteropathies: double-blinded, placebo-controlled study. *Veterinary Record*, 182(9), 258-258.

Dalmasso, G., Cottrez, F., Imbert, V., Lagadec, P., Peyron, J. F., Rampal, P., Czerucka, D., Groux, H., Foussat, A., Brun, V. (2006). *Saccharomyces boulardii*

inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymphnodes. *Gastroenterology*, 131, 1812– 1825.

Dann, H. M., Drackley, J. K., McCoy, G. C., Hutjens, M. F., Garrett, J. E. (2000). Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 83(1), 123-127.

Daumas, C., Paragon, B. M., Thorin, C., Martin, L., Dumon, H., Ninet, S., Nguyen, P. (2014). Evaluation of eight commercial dog diets. *Journal of nutritional science*, 3, E63.

De Avila, L. F. D. C., Conceição, F. R., de Lima Telmo, P., Dutra, G. F., de los Santos, D. G., Martins, L. H. R., Berne M.E.A., da Silva P.E.A., Scaini, C. J. (2012). *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis. *Veterinary Parasitology*, 187(1-2), 337-340.

Decaro, N., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Elia, G., Cirone, F., Zappulli V.E., Tempesta M., Castagnaro M., Buonavoglia, C. (2006). Il coronavirus del cane: un “vecchio” virus per una “nuova” malattia. *Veterinaria*, 20(4), 31.

Dębski, B., Zalewski, W., Gralak, M. A., Kosla, T. (2004). Chromium-yeast supplementation of chicken broilers in an industrial farming system. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(1), 47-51.

De Godoy MR, Hervera M, Swanson KS, Fahey GC Jr. (2016). Innovations in Canine and Feline Nutrition: Technologies for Food and Nutrition Assessment. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 311-333

De Meij, T. G., Larbi, I. B., van der Schee, M. P., Lentferink, Y. E., Paff, T., Terhaar sive Droste, J. S., Mulder C.J., van Bodegraven A.A., de Boer, N. K. (2014). Electronic nose can discriminate colorectal carcinoma and advanced adenomas by fecal volatile biomarker analysis: proof of principle study. *International journal of cancer*, 134(5), 1132-1138.

De Meij, T. G., van der Schee, M. P., Berkhout, D. J., van de Velde, M. E., Jansen, A. E., Kramer, B. W., van Weissenbruch M.M., van Kaam A.H., Andriessen P., van Goudoever J.B., Niemarkt H.J., de Boer, N. K. (2015). Early detection of necrotizing enterocolitis by fecal volatile organic compounds analysis. *The Journal of pediatrics*, 167(3), 562-567.

De Melo Santos, K., Risolia, L. W., Rentas, M. F., Amaral, A. R., Rodrigues, R. B. A., Urrego, M. I. G., Vendramini T.H.A., Vieira Ventura R., de Carvalho Balieiro J.C., de Oliveira MMassoco C., Fernandes Santos J.P., Fonseca Ferreira Pontieri C., Brunetto, M. A. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* Dehydrated Culture Modulates Fecal Microbiota and Improves Innate Immunity of Adult Dogs. *Fermentation*, 8(1), 2.

- Deng, P., Swanson, K. S. (2015). Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *British Journal of Nutrition*, 113, 6–17.
- Deshmukh, S., Bandyopadhyay, R., Bhattacharyya, N., Pandey, R. A., Jana, A. (2015). Application of electronic nose for industrial odors and gaseous emissions measurement and monitoring—an overview. *Talanta*, 144, 329-340.
- Dillitzer N., Becker N., Kienzle E. (2011), Intake of minerals, trace elements and vitamins in bone and raw food rations in adult dogs. *British Journal of Nutrition*, 106, S53-S56.
- Dillon, R. J., Vennard, C. T., Buckling, A., Charnley, A. K. (2005). Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters*, 8(12), 1291-1298.
- Ding, Z., Kim, I. H. (2020). Effect of brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on growth performance, nutrient digestibility, and fecal score of growing pigs. *Korean Journal of Agricultural Science*, 47(3), 395-402.
- Dobenecker B, Frank V, Kienzle E. (2010). High calcium intake differentially inhibits nutrient and energy digestibility in two different breeds of growing dogs. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 94:109–114.
- Domingues, L., Murakami, F., Zattoni, D., Kaelle, G., de Oliveira, S., & Félix, A. (2019). Effect of potato on kibble characteristics and diet digestibility and palatability to adult dogs and puppies. *Italian Journal of Animal Science*.
- Drasar, B. S., Hill, M. J. (1974). Human intestinal flora, 1th ed., Academic Press, pp. 1-263.
- Driscoll, C. A., Macdonald, D.W., O'Brien, S.J. (2009). From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 9971-9978.
- Duarte, A. M., Jenkins, T. P., Latrofa, M. S., Giannelli, A., Papadopoulos, E., de Carvalho, L. M., Nolan M.J., Otranto D., Cantacessi, C. (2016). Helminth infections and gut microbiota—a feline perspective. *Parasites & vectors*, 9(1), 1-9.
- Dupont, S., Butaye, P., Claerebout, E., Theuns, S., Duchateau, L., Van de Maele, I., Daminet, S. (2013). Enteropathogens in pups from pet shops and breeding facilities. *Journal of Small Animal Practice*, 54(9), 475-480.
- Duque-Saldarriaga, J. C., Posada-Ochoa, S. L., Agudelo-Trujillo, J. H., Gómez-Osorio, L. M. (2020). A comparison of two methods to assess apparent total tract digestibility of nutrients in dogs. *Archives of animal nutrition*, 74(2), 138-149.

Dust, J. M., Grieshop, C. M., Parsons, C. M., Karr-Lilienthal, L. K., Schasteen, C. S., Quigley III, J. D., Merchen N.R., Fahey Jr, G. C. (2005). Chemical composition, protein quality, palatability, and digestibility of alternative protein sources for dogs. *Journal of animal science*, 83(10), 2414-2422.

Edwards-Ingram, L., Gitsham, P., Burton, N., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, D., Oliver, S. G., Stateva, L. (2007). Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*, 73, 2458-2467.

Elghandour, M. M. Y., Tan, Z. L., Abu Hafsa, S. H., Adegbeye, M. J., Greiner, R., Ugbogu, E. A., Monroy J.C., Salem, A. Z. M. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: a review. *Journal of applied microbiology*, 128(3), 658-674.

Elsden, S.R., Hilton, M.G. (1978). Volatile acid production from threonine, valine, leucine and isoleucine by clostridia. *Archives of microbiology*, 117(2), 165–172.

Endenburg, N., Bouw, J. (1994). Motives for acquiring companion animals. *Journal of Economic Psychology*, 15(1), 191–206.

Epe, C., Rehker, G., Schnieder, T., Lorentzen, L., Kreienbrock, L. (2010). *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe—results of a European study. *Veterinary Parasitology*, 173(1-2), 32-38.

Erasmus, L. J., Botha, P. M., Kistner, A. (1992). Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 75(11), 3056-3065.

Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (2016). *Trattato di clinica medica veterinaria malattie del cane e del gatto*, 7th ed, Antonio Delfino editore, pp.1-2300.

Evermann, J. F., Abbott, J. R., Han, S. (2005). Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 17(6), 610-614.

Fahey, GC Jr, Barry KA, Swanson, KS. (2008). Age-related changes in nutrient utilization by companion animals. *Annual Review of Nutrition*. 28, 425-445

Fekete, E., Allain, T., Siddiq, A., Sosnowski, O., Buret, A. G. (2021). *Giardia* spp. and the gut microbiota: dangerous liaisons. *Frontiers in microbiology*, 11, 1-18.

Faustino, M., Durão, J., Pereira, C. F., Pintado, M. E., Carvalho, A. P. (2021). Mannans and mannan oligosaccharides (MOS) from *Saccharomyces cerevisiae*—A sustainable source of functional ingredients. *Carbohydrate Polymers*, 272, 1-15.

FEDIAF. (2020). <https://europeanpetfood.org/self-regulation/legislation/>

FEDIAF. (2021). <https://europeanpetfood.org/>

Félix, A. P., Zanatta, C. P., Brito, C. B. M., Sá Fortes, C. M. L., Oliveira, S. G., Maiorka, A. (2013). Digestibility and metabolizable energy of raw soybeans manufactured with different processing treatments and fed to adult dogs and puppies. *Journal of Animal Science*, 91(6), 2794-2801.

Ferguson, A., Humphreys, K. A., Croft, N. M. (1995). Technical report: results of immunological tests on faecal extracts are likely to be extremely misleading. *Clinical & Experimental Immunology*, 99(1), 70-75.

Fiedmann E., Katcher A.H., Thomas S.A., Lynch J.J., Messent P.R. (1983). Social interaction and blood pressure: influence of animal companions. *The journal of nervous and mental disease*, 171, 461-465

Fine, A.H. (2010). Handbook on Animal-Assisted Therapy. Theoretical Foundations and Guidelines for Practice, 3th edition, Academic press, pp. 1-588.

Fisher, M. A., Jacobs, D. E., Hutchinson, M. J., Dick, I. G. C. (1994). Studies on the control of *Toxocara canis* in breeding kennels. *Veterinary Parasitology*, 55(1-2), 87-92.

Flickinger, E. A., Fahey, G. C. Jr. (2002). Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. *British Journal of Nutrition*. 87, 297S–300S

Flickinger, E. A., Schreijen, E. M. W. C., Patil, A. R., Hussein H. S., Grieshop, C. M., Merchen, N. R., Fahey, G. C. Jr. (2003). Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *Journal of Animal Sciences*. 81, 2008–2018.

Floc'h, L., Achard, C. S., Eugenio, F. A., Apper, E., Combes, S., Quesnel, H. (2022). Effect of live yeast supplementation in sow diet during gestation and lactation on sow and piglet fecal microbiota, health and performance. *Journal of Animal Science*, 100(8), 1-14.

Fontaine, E. (2012). Food intake and nutrition during pregnancy, lactation and weaning in the dam and offspring. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), 326-30.

Fouhse, J. M., Dawson, K., Graugnard, D., Dyck, M., Willing, B. P. (2019). Dietary supplementation of weaned piglets with a yeast-derived mannan-rich fraction modulates cecal microbial profiles, jejunal morphology and gene expression. *Animal*, 13(8), 1591-1598.

Franklin, R.P., Latson, K.M. (2016). Saccharomyces boulardii probiotic for pets. *Full bucket health*. <https://www.fullbuckethealth.com/pages/saccharomyces-boulardii-probiotic-whitepaper-pets>, ultimo accesso al sito 3/09/2022)

Freeman, L. M., Abood, S. K., Fascetti, A. J., Fleeman, L. M., Michel, K. E., Laflamme, D. P., Bauer C., Kemp B.L.E., Van Doren J.R., Willoughby, K. N. (2006). Disease prevalence among dogs and cats in the United States and Australia and proportions of dogs and cats that receive therapeutic diets or dietary supplements. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(4), 531-534.

Freeman, L. M., Chandler, M. L., Hamper, B. A., Weeth, L. P. (2013). Current knowledge about the risks and benefits of raw meat-based diets for dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(11), 1549-1558.

Friedman, E., Krause-Parello, C. A. (2018). Companion animals and human health: benefits, challenges, and the road ahead for human-animal interaction. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 37(1), 71-82.

Garcia-Mazcorro, J. F., Lanerie, D. J., Dowd, S. E., Paddock, C. G., Grutzner, N., Steiner, J. M., Ivanek, R., Suchodolski, J. S. (2011). Effect of a multi-species symbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 78, 542–554.

Garcia-Mazcorro, J. F., Dowd, S. E., Poulsen, J., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. (2012). Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. *Microbiology Open*, 1, 340–347.

Gardner, J.W. and Bartlett, P.N. (1994) A Brief History of Electronic Noses. *Sensors & Actuators B Chemical*, 18-19, 210-211.

Garner, C. E., Smith, S., de Lacy Costello, B., White, P., Spencer, R., Probert, C. S., Ratcliffem, N. M. (2007). Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *The FASEB Journal*, 21(8), 1675-1688.

Gates, M. C., Nolan, T. J. (2009). Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. *Veterinary parasitology*, 166(1-2), 153-158.

Gebreselassie E.E.E., Jewell D.E. (2019). Long-term consumption of high protein disrupts dog gut microbiome and metabolites. *The FASEB journal*, 33 (S1), lb248-lb248.

Ghasemi-Varnamkhasti, M., Mohtasebi, S. S., Siadat, M., Balasubramanian, S. (2009). Meat quality assessment by electronic nose (machine olfaction technology). *Sensors*, 9(8), 6058-6083.

Giang, H. H., Viet, T. Q., Ogle, B., Lindberg, J. E. (2012). Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with a complex of lactic acid bacteria alone or in combination with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces boulardii*. *Livestock Science*, 143(2-3), 132-141.

Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J. A. E., Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17, 257–25.

Gibson, G.R., Roberfroid, M. (2008). Handbook of prebiotics, 1th ed., CRC Press, pp. 1-504.

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton C., Swanson K.S., Cani P.D., Verbeke K., Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491-502.

Gilham, M. S., Booles, D., Johnson, J. V., Legrand-Defretin, V. (1993). Digestibility in labrador retrievers during growth. *Proceedings of the Nutrition Society*, 52, 294.

Glade, M. J. (1991). Dietary yeast culture supplementation of mares during late gestation and early lactation Effects on dietary nutrient digestibilities and fecal nitrogen partitioning. *Journal of Equine Veterinary Science*, 11(1), 10-16.

Gouveia, E. M. M. F., Silva, I. S., Nakazato, G., Onselem, V. J. V., Corrêa, R. A. C., Araujo, F. R., Chang, M. R. (2013). Action of phosphorylated mannanoligosaccharides on immune and hematological responses and fecal consistency of dogs experimentally infected with enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 499-504.

Grant C. (2022). Puppy growth charts. *Vetfocus*, 32(1). <https://vetfocus.royalcanin.com/en/scientific/puppy-growth-charts>

Gray, A. (2021). Sustainable eating: the future for pet food?. *Vet record*, 188(12), 454-455

Grellet, A., Feugier, A., Chastant-Maillard, S., Carrez, B., Boucraut-Baralon, C., Casseleux, G., Grandjean, D. (2012). Validation of a fecal scoring scale in puppies during the weaning period. *Preventive veterinary medicine*, 106(3-4), 315-323.

Grellet, A., Chastant-Maillard, S., Robin, C., Feugier, A., Boogaerts, C., Boucraut-Baralon, C., Grandjean D., Polack, B. (2014a). Risk factors of weaning diarrhea in puppies housed in breeding kennels. *Preventive Veterinary Medicine*, 117(1), 260-265.

Grellet A., Mila H., Debouchaud M.A., Feugier A., Chastant-Maillard S. (2014b). Risk factors of Giardia infection and pathogenicity in weaning puppies. 24th ECVIM congress, September 2014, Mainz, Germany

Grellet, A., Mila, H., Heilmann, R. M., Feugier, A., Gruetzner, N., Suchodolski, J. S., Steiner J.M., Chastant-Maillard, S. (2014c). Effect of age, gestation and lactation on faecal IgA and calprotectin concentrations in dogs. *Journal of nutritional science*, 3.

Grellet A., Mila H., Chastant-Maillard S. (2018). Influence of endoparasites in dog breeding kennels. 21th EVSSAR Congress, June 2018, Venice, Italy

Grieshop, C., Flickinger, E., Bruce, K., Patil, A. R., Czarnecki-Maulden, G. L., Fahey Jr, G. C. (2004). Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides. *Archives of animal nutrition*, 58(6), 483-494.

Gross K.L. (1993). Effect of diet on composition of milk from dogs. Waltham Symposium on the nutrition of companion animals, September 1993, Adelaide, Australia.

Guard, B. C., Barr, J. W., Reddivari, L., Klemashevich, C., Jayaraman, A., Steiner, J. M., Vanamala, J., Suchodolski, J. S. (2015). Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PLoS ONE*, 10, e0127259.

Guevara MA, Bauer LL, Abbas CA, Beery KE, Holzgraefe DP, Cecava MJ, Fahey JGC. (2008). Chemical composition, in vitro fermentation characteristics, and in vivo digestibility responses by dogs to select corn fibres. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(5), 1619–1626.

Guidi D., Colangeli R. (2020). *Nutrizione e dietetica del cane e del gatto*. 1th ed., Edra. P.1-176.

Halas, V., & Nocht, I. (2012). Mannan oligosaccharides in nursery pig nutrition and their potential mode of action. *Animals*, 2(2), 261-274.

Hand, M.S., Thatcher, C.D., Remillard, R.L., Roudebush, P., Novotny, B.J. (2010). *Small animal clinical nutrition*, 5th, Mark Morris Institute ed. Topeka, Kansas, pp. 1-1314.

Handl, S., Dowd, S. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. (2011). Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiology Ecology*, 76, 301–310

Handl S., German A. J., Holden S. L., Dowd S. E., Steiner J. M., Heilmann R. M., Grant, R. W., Swanson, K. S., Suchodolski, J. S. (2013). Faecal microbiota in lean and obese dogs. *FEMS Microbiology Ecology*, 84, 332–343.

Hanfrey, C.C., Pearson, B.M., Hazeldine, S., Lee, J., Gaskin, D.J., Woster, P.M., Phillips, M.A., Michael, A.J. (2011). Alternative spermidine biosynthetic route is critical for growth of *Campylobacter jejuni* and is the dominant polyamine pathway in human gut microbiota. *Journal of Biological Chemistry*, 286(50), 43301–43312.

Hare, B., Wobber, V., Wrangham, R. (2012). The self-domestication hypothesis: evolution of bonobo psychology is due to selection against aggression. *Animal Behaviour*, 83(3), 573-585.

Harmsen, H. J., Elfferich, P., Schut, F., & Welling, G. W. (1999). A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent in situ hybridization. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11(1), 3-12.

Hasan, S., Junnikkala, S., Peltoniemi, O., Paulin, L., Lyyski, A., Vuorenmaa, J., Oliviero, C. (2018). Dietary supplementation with yeast hydrolysate in pregnancy influences colostrum yield and gut microbiota of sows and piglets after birth. *PLoS ONE*, 13(5), e0197586.

Headey B. (1999). Health benefits and health cost saving due to pets: preliminary estimates from an Australian national survey. *Social Indicator Research*, 47, 233-243.

Headey B., Grabka, M.M. (2007). Pets and human health in Germany and Australia: national longitudinal results. *Social Indicator Research*, 80, 297-311.

Hemmings, C. (2016). The importance of good nutrition in growing puppies and kittens. *The Veterinary Nurse*, 7(8), 450–456.

Hemmings, Clare (2018). Nutrition for puppies. *The Veterinary Nurse*, 9(9), 458–464.

Hendriks W.H., Sritharan K. (2002). Apparent Ileal and Fecal Digestibility of Dietary Protein Is Different in Dogs, *The Journal of Nutrition*. 132(6), 1692S–1694S

Hendriks, W. H., Thomas, D. G., Bosch, G., Fahey Jr, G. C. (2013). Comparison of ileal and total tract nutrient digestibility of dry dog foods. *Journal of Animal Science*, 91(8), 3807-3814.

Hendriks, W. H. (2014). The omnivorous dog dogma and carnivorous cat connection. ESVCN - European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, September, 2014, Utrecht, Netherlands.

Hennequin, C., Thierry A., Richard G. F., Lecointre G., Nguyen H. V., Gaillardin C., Dujon B. (2001). Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 551–559

Hervera, M., Baucells, M. D., Blanch, F., Castrillo, C. (2007). Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 91(5-6), 205-209.

Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., Tashiro, Y. (1986). Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria and microflora*, 5(1), 37-50.

Hohman, E.E., Martin, B.R., Lachcik, P.J., Gordon, D.T., Fleet, J.C., Weaver, C.M. (2011). Bioavailability and efficacy of vitamin D2 from UV-irradiated yeast in growing, vitamin D-deficient rats. *ournal of agricultural and food chemistry*, 59(6), 2341–2346.

Honneffer, J. B., Minamoto, Y., Suchodolski, J. S. (2014). Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 16489–16497.

Hosfield B.D., Pecoraro A.R., Baxter N.T., Hawkins T.B, Markel T.A. (2020). The assessment of fecal volatile organic compounds in healthy infants: electronic nose device predicts patient demographics and microbial enterotype. *Journal of Surgical Research*, 254, 340-347.

Howard, M. D., Kerley, M. S., Sunvold, G. D., Reinhart, G. A. (2000). Source of dietary fiber fed to dogs affects nitrogen and energy metabolism and intestinal microflora populations. *Nutrition Research*, 20(10), 1473-1484.

<https://wcvn.usask.ca/learnaboutparasites/parasites/toxascaris-leonina.php>

<https://www.izsvepets.it/coronavirus-canino-ccov/>

<https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/01/Body-Condition-Score-Dog.pdf>

https://www.parassitologia.unina.it/flotac-group/flotac/manuali_36.xhtml

Hu, L., Che, L., Su, G., Xuan, Y., Luo, G., Han, F., Wu Y., Tian G., Wu C., Fang Z., Lin Y., Xu S., Wu, D. (2014). Inclusion of yeast-derived protein in weanling diet improves growth performance, intestinal health, and anti-oxidative capability of piglets. *Czech Journal of Animal Science*, 59, 327-336.

Huang, X., Gao, J., Zhao, Y., He, M., Ke, S., Wu, J., Zhou Y., Fu H., Chen C., Huang, L. (2019). Dramatic remodeling of the gut microbiome around parturition and its relationship with host serum metabolic changes in sows. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2123.

Hubbard, K., Skelly, B. J., McKelvie, J., Wood, J. L. N. (2007). Risk of vomiting and diarrhoea in dogs. *Veterinary record*, 161(22), 755.

Ibáñez L, Pontier-Bres R, Larbret F, Rekima A, Verhasselt V, Blin-Wakkach C, Czerucka. D. (2019). *Saccharomyces boulardii* Strain CNCM I-745 Modifies the Mononuclear Phagocytes Response in the Small Intestine of Mice Following *Salmonella Typhimurium* Infection. *Frontiers in Immunology*, 10, 1-11.

Itoh, N., Muraoka, N., Aoki, M., Itagaki, T. (2001). Prevalence of *Giardia lamblia* infection in household dogs. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 75, 671-677.

Itoh, N., Muraoka, N., Saeki, H., Aoki, M., Itagaki, T. (2005). Prevalence of *Giardia intestinalis* infection in dogs of breeding kennels in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(7), 717-718.

Ivanova, C., Georgiev, P. (2018). Pregnancy in the bitch—a physiological condition requiring specific care—review. *Tradition and Modernity in Veterinary Medicine*, 3, 77-82.

James, W. T., McCay, C. M. (1950). A study of food intake, activity, and digestive efficiency in different type dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 11, 412-413.

Jensen, A. P., Bjørnvad, C. R. (2019). Clinical effect of probiotics in prevention or treatment of gastrointestinal disease in dogs: a systematic review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(5), 1849-1864.

Ji, Y. J., Li, H., Xie, P. F., Li, Z. H., Li, H. W., Yin, Y. L., Blachier F., Kong, X. F. (2019). Stages of pregnancy and weaning influence the gut microbiota diversity and function in sows. *Journal of Applied Microbiology*, 127(3), 867-879.

Jia J., Frantz N., Khoo C., Gibson G.R., Rastall R.A. McCartney A.L. (2010) Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhoea. *FEMS Microbiology Ecology*, 71, 304–312

Jiang, G., Zhou, Z., Li, X., Qian, Y., Wang, K. (2021). The Gut Microbiome During Pregnancy. *Maternal-Fetal Medicine*, 3, E021-E021.

Jones, P. H., Dawson, S., Gaskell, R. M., Coyne, K. P., Tierney, A., Setzkorn, C., Radford A.D., Noble, P. J. (2014). Surveillance of diarrhoea in small animal practice through the Small Animal Veterinary Surveillance Network (SAVSNET). *The Veterinary Journal*, 201(3), 412-418.

Johnson, CA. (2008). Glucose homeostasis during canine pregnancy: Insulin resistance, ketosis, and hypoglycemia. *Theriogenology*, 70(9):1418-23

Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., Chassard, C. (2014). Stability of the maternal gut microbiota during late pregnancy and early lactation. *Current microbiology*, 68(4), 419-427.

Kallfelz, F. A. (1989). Evaluation and use of pet foods: General considerations in using pet foods for adult maintenance. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 19(3), 387-402.

Kaminski, J., Marshall-Pescini, S. (2014). The social dog: hystory and evolution in In the social dog, behaviour and cognition, 1th ed., Elsevier, pp. 1-418

Kanakubo, K., Fascetti, A. J., Larsen, J. A. (2015). Assessment of protein and amino acid concentrations and labeling adequacy of commercial vegetarian diets formulated for dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 247(4), 385-392.

Karakaya, D., Ulucan, O., Turkan, M. (2020). Electronic nose and its applications: A survey. *International Journal of Automation and Computing*, 17(2), 179-209.

Katcher, A.H., Beck, A. (1983). *New Perspectives on our Life with Companion Animals*, 1th ed., University of Pennsylvania Press, pp. 1-640.

Kath, F., Kulicke, W. (1999). Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 268(1), 59–68

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059-3066.

Kazimierska, K., Biel, W., Witkowicz, R., Karakulska, J., Stachurska, X. (2021). Evaluation of nutritional value and microbiological safety in commercial dog food. *Veterinary Research Communications*, 45(2), 111-128.

Kelley, R.L., Lepine, A.J. (2012). Post-weaning supplementation with docosahexaenoic acid (DHA) improves cognitive performance in growing puppies. 32th ECVIM - European congress of veterinary internal medicine, September 2012, Maastricht, Nedherland

Kendall, P. T., Blaza, S. E., Smith, P. M. (1983). Influence of level of intake and dog size on apparent digestibility of dog foods. *The British Veterinary Journal*, 139(4), 361-362.

Kępińska-Pacelik, J., Biel, W. (2022). Insects in Pet Food Industry—Hope or Threat?. *Animals*, 12(12), 1515.

- Kerr, K. R., Vester Boler, B. M., Morris, C. L., Liu, K. J., Swanson, K. S. (2012). Apparent total tract energy and macronutrient digestibility and fecal fermentative end-product concentrations of domestic cats fed extruded, raw beef-based, and cooked beef-based diets. *Journal of Animal Science*, 90(2), 515-522.
- Kerr, K. R., Morris, C. L., Burke, S. L., Swanson, K. S. (2014). Apparent total tract energy and macronutrient digestibility of one-to three-day-old, adult ground, extruded, and canned chicken-based diets in domestic cats (*Felis silvestris catus*). *Journal of Animal Science*, 92(8), 3441-3448.
- Kiefer-Hecker, B., Kienzle, E., Dobenecker, B. (2018). Effects of low phosphorus supply on the availability of calcium and phosphorus, and musculoskeletal development of growing dogs of two different breeds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(3), 789-798.
- Kierończyk, B., Rawski, M., Pawełczyk, P., Różyńska, J., Golusik, J., Mikołajczak, Z., Józefiak, D. (2018). Do insects smell attractive to dogs? A comparison of dog reactions to insects and commercial feed aromas-a preliminary study. *Annals of Animal Science*, 18(3), 795.
- Kim, S. W., Brandherm, M., Freeland, M., Newton, B., Cook, D., Yoon, I. (2008). Effects of yeast culture supplementation to gestation and lactation diets on growth of nursing piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(7), 1011-1014.
- Kisling, V.N. (2000). Zoo and Aquarium history: ancient animal collection to zoological gardens. 1th ed., CRC press, pp.1-440.
- Koeleman, E. (2019). Yeast products for healthy pets. *All about feed*. <https://www.allaboutfeed.net/animal-feed/feed-processing/yeast-products-for-healthy-pets>, ultimo accesso 28/09/2021
- Kogan, G., Kocher, A. (2007). Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science*, 109(1-3), 161-165.
- Kornegay, E. T., Rhein-Welker, D., Lindemann, M. D., Wood, C. M. (1995). Performance and nutrient digestibility in weanling pigs as influenced by yeast culture additions to starter diets containing dried whey or one of two fiber sources. *Journal of Animal Science*, 73(5), 1381-1389.
- Kroll, F. S. A., Putarov, T. C., Zaine, L., Venturini, K. S., Aoki, C. G., Santos, J. P. F., Pedrinelli, V., Vendramini T.H.A., Brunetto, M.A., Carciofi, A. C. (2020). Active fractions of mannoproteins derived from yeast cell wall stimulate innate and acquired immunity of adult and elderly dogs. *Animal Feed Science and Technology*, 261, 114392.

Labussière, E., Achard, C., Dubois, S., Combes, S., Castex, M., Renaudeau, D. (2022). Saccharomyces cerevisiae boulardii CNCM I-1079 supplementation in finishing male pigs helps to cope with heat stress through feeding behaviour and gut microbiota modulation. *British Journal of Nutrition*, 127(3), 353-368.

Laparra, J. M., Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Nutraceuticals and Functional Foods*, 61, 219–225

Latgé, J.-P. (2007). The cell wall: A carbohydrate Armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, 66(2), 279–290.

Lazo-Vélez, M. A., Serna-Saldívar, S. O., Rosales-Medina, M. F., Tinoco-Alvear, M., Briones-García, M. (2018). Application of Saccharomyces cerevisiae var. boulardii in food processing: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 125(4), 943-951.

Lederberg, J., McCray, A. T. (2001). ‘Ome Sweet ‘Omics- -A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, 15, 8.

Lee, D., Goh, T. W., Kang, M. G., Choi, H. J., Yeo, S. Y., Yang, J., Huh C. S., Kim Y.T., Kim, Y. (2022). Perspectives and advances in probiotics and the gut microbiome in companion animals. *Journal of Animal Science and Technology*, 64(2), 197.

Leibetseder J. (1989). Ernährung der zuchthündin und der Junghunde. *Der Praktischer Tierarzt*, 70, 12-20

Li, J., Xing, J., Li, D., Wang, X., Zahao, L., Lv, S., Huang, D. (2005). Effects of β -glucan extracted from Saccharomyces cerevisiae on humoral and cellular immunity in weaned pig. *Archives of Animal Nutrition*, 59, 303-312

Li, J., Li, D., Gong, L., Ma, Y., He, Y., & Zhai, H. (2006). Effects of live yeast on the performance, nutrient digestibility, gastrointestinal microbiota and concentration of volatile fatty acids in weanling pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 60(4), 277-288.

Lin, C. Y., Alexander, C., Steelman, A. J., Warzecha, C. M., De Godoy, M. R., Swanson, K. S. (2019). 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. *Journal of Animal Science*, 97(4), 1586-1599.

Lin, C. Y., Carroll, M. Q., Miller, M. J., Rabot, R., Swanson, K. S. (2020). Supplementation of yeast Cell Wall fraction tends to improve intestinal health in adult dogs undergoing an abrupt diet transition. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 597939.

Littler, R. M., Batt, R. M., Lloyd, D. H. (2006). Total and relative deficiency of gut mucosal IgA in German shepherd dogs demonstrated by faecal analysis. *Veterinary Record*, 158(10), 334-341.

Lôbo Jr, M. F., Rezende, A. S. C., Saliba, E. O. S., Sampaio, I. B. M. (2001). Determination of apparent digestibility coefficients either by markers or total fecal collection techniques in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 53, 691-694.

Lopez-Santamarina, A., Lamas, A., del Carmen Mondragón, A., Cardelle-Cobas, A., Regal, P., Rodriguez-Avila, J. A., Miranda J.M., Franco C.M., Cepeda, A. (2021). Probiotic effects against virus infections: New weapons for an old war. *Foods*, 10(1), 130.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Lukaski, H.C. (1999). Chromium as a supplement. *Annual Review of Nutrition*, 19, 279–302.

Lyons, T.P., Jacques, K.A. (1999). *Biotechnology in the Feed Industry*, 1th ed., Nottingham University Press, Nottingham, pp. 1-515.

Macfarlane, G.T., Cummings, J.H. (1991). The colonic flora, fermentation, and large bowel digestive function, *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. Raven Press, New York.

Macpherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F. E., Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology*, 1(1), 11-22.

Maeda, S., Ohno, K., Uchida, K., Nakashima, K., Fukushima, K., Tsukamoto, A., Nakajima M., Fujino Y., Tsujimoto, H. (2013). Decreased immunoglobulin A concentrations in feces, duodenum, and peripheral blood mononuclear cells of dogs with inflammatory bowel disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(1), 47-55.

Malandain, E. (2006). Nutrition and reproduction in bitches and queens. 5th Biannual Congress European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), April 2006, Budapest, Hungary.

Malewska, K., Rychlik, A., Nieradka, R., Kander, M. (2011). Treatment of inflammatory bowel disease (IBD) in dogs and cats. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14, 165-170.

Mallie, M., Van, P. N., Bertout, S., Vaillant, C., Bastide, J. M. (2001). Genotypic study of *Saccharomyces boulardii* compared to the *Saccharomyces sensu stricto* complex species. *Journal de Mycologie Medicale*, 1, 19–25.

Martins, F.S., Dalmasso, G., Arantes, R.M., Doye, A., Lemichez, E., Lagadec, P., Imbert, V., Peyron, J.F., Rampal, P., Nicoli, J.R., Czerucka, D. (2010). Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS ONE*, 5: e8925.

Martins, M. S., Sakomura, N. K., Souza, D. F., Filho, F. O. R., Gomes, M. O. S., Vasconcellos, R. S., Carciofi, A. C. (2014). Brewer's yeast and sugarcane yeast as protein sources for dogs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98(5), 948-957.

Matsumoto, M., Benno, Y. (2007). The Relationship between Microbiota and Polyamine Concentration in the Human Intestine: A Pilot Study. *Microbiology Immunology*, 51, 25–35.

Mattews T., Danese A., Caspi A., Fisher H., Golman-Mellor S., Kepa A., Mott T.E., Odger C.I., Arseneault L. (2019). Lonely young adult in modern Britain: findings from an epidemiological cohort study. *Psychological medicine*, 49, 268-277.

McCann, K. S. (2000). The diversity–stability debate. *Nature*, 405(6783), 228-233.

McFarland, L. V. (2008). Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment. *Future Medicine*, 3(5), 563-578

McFarland, L. V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 2202-2222.

Meineri, G., Martello, E., Atuahene, D., Miretti, S., Stefanon, B., Sandri, M., Biasato, I., Corvaglia M. R., Ferrocina I., Cocolin, L. S. (2022). Effects of *Saccharomyces boulardii* Supplementation on Nutritional Status, Fecal Parameters, Microbiota, and Mycobiota in Breeding Adult Dogs. *Veterinary Sciences*, 9(8), 1-12.

Menniti MF, Davenport GM, Shoveller AK, Cant JP, Osborne VR. (2014). Effect of graded inclusion of dietary soybean meal on nutrient digestibility, health, and metabolic indices of adult dogs. *Journal of Animal Science*, 92, 2094–2104

Meyer, H., Dammers C., Kienzle E. (1985). Körperzusammensetzung neugeborener welpen und nährstoffbedarf trigender hündinnen. *Forstschritte in der. Advances in Animal Physiology and Animal Nutrition*, 16, 7-25

Meyer H., Kienzle E., Zentek J. (1993). Body size and relative weights of gastrointestinal tract and liver in dogs. *Journal of Veterinary Nutrition*, 2, 31-35

Meyer, H., Zentek, J. (2013). Ernährung des Hundes, 7th ed., Enke, pp. 1-336

Michel, K.E. (2006). Unconventional Diets for Dogs and Cats. 36(6), 0–1281. doi:10.1016/j.cvsm.2006.08.003

Middelbos, I. S., Godoy, M. R., Fastinger, N. D., Fahey Jr, G. C. (2007). A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. *Journal of Animal Science*, 85(11), 3022-3032.

Middelbos, I. S., Vester Boler, B. M., Qu, A., White, B. A., Swanson, K. S., Fahey Jr., G. C. (2010). Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. *PLoS ONE*, 5:e9768

Minamoto, Y., Otoni, C. C., Steelman, S. M., Büyükleblebici, O., Steiner, J. M., Jergens, A. E., Suchodolski, J. S. (2015). Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, 6(1), 33-47.

Minamoto, Y., Dhanani, N., Markel, M. E., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. (2014). Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 174, 463–473

Minciotti, G. (2018), animali domestici, la pet economy supera i due miliardi, *ilsole24ore*, <http://www.ilsole24ore.com/art/impresa-e-territori/2018-05-17/animali-domestici-la-pet-economy-supera-i-due-miliardi/AE9G1epE> (accesso al sito in data: 20/09/2018).

Mitterdorfer, G., Mayer, H. K., Kneifel, W., Viernstein, H. (2002). Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 521-530

Mizoguchi, A., Mizoguchi, E. (2010). Animal models of IBD: linkage to human disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 10, 578-587.

Mochizuki, M., Hashimoto, M., Ishida, T. (2001). Recent epidemiological status of canine viral enteric infections and *Giardia* infection in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63(5), 573-575.

Mondot, S., Kang, S., Furet, J. P., Aguirre de Carcer, D., McSweeney, C., Morrison, M., Marteau, P., Dore, J., Leclerc, M. (2011). Highlighting new

phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflammatory Bowel Disease*, 17, 185-192.

Montegiove, N., Calzoni, E., Cesaretti, A., Pellegrino, R. M., Emiliani, C., Pellegrino, A., Leonardi, L. (2022). The Hard Choice about Dry Pet Food: Comparison of Protein and Lipid Nutritional Qualities and Digestibility of Three Different Chicken-Based Formulations. *Animals*, 12(12), 1538.

Moré, M. I., Swidsinski, A. (2015). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis—a review. *Clinical and experimental gastroenterology*, 8, 237.

Moré, M. I., Vandenplas, Y. (2018). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 improves intestinal enzyme function: a trophic effects review. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, 11, 1-14.

Morelli, G., Bastianello, S., Catellani, P., Ricci, R. (2019). Raw meat-based diets for dogs: survey of owners' motivations, attitudes and practices. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1-10.

Morelli, G., Stefanutti, D., Ricci, R. (2021). A survey among dog and cat owners on pet food storage and preservation in the households. *Animals*, 11(2), 273.

Morey D.F. (1994). The early evolution of the domestic dog. Animal domestication, commonly considered a human innovation, can also be described as an evolutionary process. *American Scientist*, 82, 336-347

Morey, D. (2010). *Dogs: Domestication and the development of a social bond*, 1th ed., Cambridge University Press, pp. 1-365

Motarjemi, Y., Lelieveld, H. (2014). *Food safety management. A practical guide for the food industry*, 1th ed., Academic Press, pp. 1- 1057

Mounika, B., Kumar, B. A., Reddy, A. G., Kumar, D. A., Madhuri, G. (2019). Effect of probiotic formulation containing *Bacillus* spp. on diarrhoea in dogs. *The Pharma Innovation Journal*, 8(6), 81-85

Muir, H. E., Murray, S. M., Fahey, G. C., Jr, Merchen, N. R. Reinhart, G. A. (1996) Nutrient digestion by ileal cannulated dogs as affected by dietary fibers with various fermentation characteristics. *Journal of Animal Science*, 74, 1641–1648

Mulder, I. E., Schmidt, B., Stokes, C. R., Lewis, M., Bailey, M., Aminov, R. I., Prosser, J.I., Gill, B.P., Pluske J.R., Mayer, C-D., Musk C.C., Kelly, D. (2009). Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC biology*, 7(1), 1-20.

- Murray, S. M., Patil, A. R., Fahey, G. C., Jr, Merchen, N. R. Hughes, D. M. (1998) Raw and rendered animal by-products as ingredients in dog diets. *Journal of Nutrition*, 128, 2812S–2815S.
- Murray, S. M., Flickinger, E. A., Patil, A. R., Merchen, N. R., Brent Jr, J. L., Fahey Jr, G. C. (2001). In vitro fermentation characteristics of native and processed cereal grains and potato starch using ileal chyme from dogs. *Journal of Animal Science*, 79(2), 435-444.
- Musco, N., Calabrò, S., Roberti, F., Grazioli, R., Tudisco, R., Lombardi, P., Cutrignelli, M. I. (2018). In vitro evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall fermentability using a dog model. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102, 24-30.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., Uitterlinden, A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695-700.
- Nari, N., Ghasemi, H. A. (2020). Growth performance, nutrient digestibility, bone mineralization, and hormone profile in broilers fed with phosphorus-deficient diets supplemented with butyric acid and *Saccharomyces boulardii*. *Poultry Science*, 99(2), 926-935.
- Naylor, M. J., Monckton, R. P., Lehrbach, P. R., Deane, E. M. (2001). Canine coronavirus in Australian dogs. *Australian Veterinary Journal*, 79(2), 116-119.
- Newbern, D., Freemark, M. (2011). Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 18, 409–416.
- Ng, S., C., Hart, A., L., Kamm, M., A., Stagg, A., J., Knight, S., C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15, 300-310.
- Nixon, S. L., Rose, L., Muller, A. T. (2019). Efficacy of an orally administered anti-diarrheal probiotic paste (Pro-Kolin Advanced) in dogs with acute diarrhea: A randomized, placebo-controlled, double-blinded clinical study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(3), 1286-1294.
- Nocek, J. E., Holt, M. G., Oppy, J. (2011). Effects of supplementation with yeast culture and enzymatically hydrolyzed yeast on performance of early lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 4046-4056.
- Northcote, D. H., Horne, R. W. (1977). The chemical composition and structure of the yeast cell wall. *Biochemical Journal*, 51(2), 232.

NRC - National Research Council. (2006). Nutrient requirement of dogs and cats. National Academy Press, Washington DC, pp. 1-424.

Odendaal, J. S., Meintjes, R. A. (2003). Neurophysiological correlates of affiliative behaviour between humans and dogs. *The Veterinary Journal*, 165(3), 296-301.

Ottoboni, M., Spranghers, T., Pinotti, L., Baldi, A., De Jaeghere, W., Eeckhout, M. (2018). Inclusion of *Hermetia Illucens* larvae or prepupae in an experimental extruded feed: process optimisation and impact on in vitro digestibility. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 418-427.

Ottoboni, M., Pinotti, L., Tretola, M., Giromini, C., Fusi, E., Rebucci, R., Grillo M., Tassoni L., Foresta S., Gastardello S., Furlan V., Maran C., dell'Orto V., Cheli, F. (2018). Combining E-nose and lateral flow immunoassays (LFIA) for rapid occurrence/co-occurrence aflatoxin and fumonisin detection in maize. *Toxins*, 10(10), 416.

Overgaauw, P. A. M., Boersema, J. H. (1998). Nematode infections in dog breeding kennels in the Netherlands, with special reference to *Toxocara*. *Veterinary Quarterly*, 20(1), 12-15.

Ovodov, N. D., Crockford, S. J., Kuzmin, Y. V., Higham, T. F., Hodgins, G. W., van der Plicht, J. (2011). A 33,000-year-old incipient dog from the Altai Mountains of Siberia: evidence of the earliest domestication disrupted by the Last Glacial Maximum. *PLoS ONE*, 6(7), e22821.

Ozório, R. O. A., Turini, B. G. S., Mõro, G. V., Oliveira, L. S. T., Portz, L., Cyrino, J. E. P. (2010). Growth, nitrogen gain and indispensable amino acid retention of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) fed different brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) levels. *Aquaculture Nutrition*, 16(3), 276-283.

Paap PM, Laak VDL, Smit JI, Nakamura N, Beynen AC. (2016). Administration of *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin®) may improve faeces consistency in dogs with chronic diarrhea. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, 6, 256–60.

Paryad, A., Mahmoudi, M. (2008). Effect of different levels of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance, blood constituents and carcass characteristics of broiler chicks. *African Journal of Agricultural Research*, 3(12), 835-842.

Park, J. H., Sureshkumar, S., Kim, I. H. (2020). Egg production, egg quality, nutrient digestibility, and excreta microflora of laying hens fed with a diet containing brewer's yeast hydrolysate. *Journal of Applied Animal Research*, 48(1), 492-498.

Pawar, M. M., Pattanaik, A. K., Sinha, D. K., Goswami, T. K., Sharma, K. (2017). Effect of dietary mannanoligosaccharide supplementation on nutrient digestibility,

hindgut fermentation, immune response and antioxidant indices in dogs. *Journal of Animal Science and Technology*, 59(1), 1-7.

Penazzi, L., Schiavone, A., Russo, N., Nery, J., Valle, E., Madrid, J., Martinez S., Hernandez F., Pagani E., Ala U., Prola, L. (2021). In vivo and in vitro digestibility of an extruded complete dog food containing black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal as protein source. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 542.

Peng, X., Yan, C., Hu, L., Huang, Y., Fang, Z., Lin, Y., Xu S., Feng B., Li J., Zhuo Y., Wu D., Che, L. (2020). Live yeast supplementation during late gestation and lactation affects reproductive performance, colostrum and milk composition, blood biochemical and immunological parameters of sows. *Animal Nutrition*, 6(3), 288-292.

Peppler H.J. (1978). Yeast. *Annual Reports on Fermentation Processes*, 2, 191-202.

Pérez-Navarrete, Cecilia, Rolando Gonzalez, Luis Chel-Guerrero, David Betancur-Ancona. (2006). "Effect of extrusion on nutritional quality of maize and Lima bean flour blends." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2477-2484.

Perricone, V., Sandrini, S., Irshad, N., Savoini, G., Comi, M., Agazzi, A. (2022). Yeast-Derived Products: The Role of Hydrolyzed Yeast and Yeast Culture in Poultry Nutrition—A Review. *Animals*, 12(11), 1426.

Peters, I. R., Calvert, E. L., Hall, E. J., Day, M. J. (2004). Measurement of immunoglobulin concentrations in the feces of healthy dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, 11(5), 841-848.

Phillips, S.F., Pemberton, J.H., Shorter, R.G. (1991). *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*, 1th ed., Raven Press, pp. 51–92.

Phillipson A.T. (1971). Endogenous losses of nutrient. *Symposium Proceedings*, 30, 61-67

Pinna, C., Biagi, G. (2014). The utilisation of prebiotics and synbiotics in dogs. *Italian Journal of Animal Science*, 13(1), 3107.

Pompei, A., Rampal, P. (2005). Effects of *Saccharomyces boulardii* on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 6165–6169.

Pothoulakis, C., Kelly, C., P., Joshi, M., A., Gao, N., O'Keane, C., J., Castagliuolo, I., Lamont, J., T. (1993). *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology*, 104, 1108-1115.

Pothoulakis, C. (2009). Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 30(8), 826-33.

Prawirodigdo, S., Gannon, N. J., Leury, B. J., Dunshea, F. R. (2021). Acid-insoluble ash is a better indigestible marker than chromic oxide to measure apparent total tract digestibility in pigs. *Animal Nutrition*, 7(1), 64-71.

Price, M. N., Dehal, P. S., Arkin, A. P. (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, 5(3), e9490.

Probert, C. S., Reade, S., Ahmed, I. (2014). Fecal volatile organic compounds: a novel, cheaper method of diagnosing inflammatory bowel disease?. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(9), 1129-1131

Profir, A. G., Buruiana, C. T., Vizireanu, C. (2015). Effects of *S. cerevisiae* var. *boulardii* in gastrointestinal disorders. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 21(2), 148-155.

Propst, E., L., Flickinger, E., A., Bauer, L., L., Merchen, N., R., Fahey Jr, G., C. (2003). A doseresponse experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. *Journal of Animal Science*, 81, 3057-3066.

Puttock, C. (2020). Pregnancy and lactation nutrition in bitches and queens. *Veterinary Nursing Journal*, 35(9-12), 378-381.

Rai, A. K., Pandey, A., Sahoo, D. (2019). Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 129-137.

Rajput, I. R., Li, L. Y., Xin, X., Wu, B. B., Juan, Z. L., Cui, Z. W., Yu D.Y., Li, W. F. (2013). Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poultry Science*, 92(4), 956-965.

Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S., Isolauri, E. (2012). Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature Reviews: Gastroenterology and Hepatology*, 9, 565-576.

Raza M., Kumari A., Jaiswal S., Uniyal S., Mohan N., Uniyal A. (2017). Mannan oligosachharide as a modulator of gut health and immunity in poultry – a review. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 6, 1581-1586

Remillard, R. L. (2008). Homemade diets: attributes, pitfalls, and a call for action. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(3), 137-142.

Ribeiro, M. R. S., Oliveira, D. R., Oliveira, F. M. S., Caliari, M. V., Martins, F. S., Nicoli, J. R., Torres M.F., Andrade M.E.R., Cardoso V.N., Gomes, M. A. (2018).

Effect of probiotic *Saccharomyces boulardii* in experimental giardiasis. *Beneficial Microbes*, 9(5), 789-797.

Ribeiro, M. R. S., Oliveira, D. R., Caliari, M. V., Cara Machado, D. C., Andrade, M. E. R., Cardoso, V. N., dos Santos Martins F., Nicoli J.R., Gomes, M. A. (2021). *Saccharomyces boulardii* as therapeutic alternative in experimental giardiasis. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 460-469.

Ricci, R., Morelli, G. (2019). La dieta casalinga per cani e gatti. *Summa, Animali da Compagnia*, 36 (4), 19-24

Roberfroid, M. B. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137, 830S-837S.

Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(S2), S1-S63.

Röck, F., Barsan, N., & Weimar, U. (2008). Electronic nose: current status and future trends. *Chemical Reviews*, 108(2), 705-725.

Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Garrido-Mesa, J., Vezza, T., Utrilla, M. P., Chueca, N., García, F., Rodríguez- Cabezas, M.E., Gálvez, J. (2018). Intestinal anti-inflammatory effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in DSS-induced colitis in mice: Impact on microRNAs expression and gut microbiota composition. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 61, 129-139.

Romsos D.R., Belo P.S., Bennink M.R., Bergen W.G., Leveille G.A. (1976). Effect of dietary carbohydrate, fat and protein on growth, body composition and blood metabolite levels in dog. *The Journal of Nutrition*, 106,1452-1464.

Rotolo, L., Gai, F., Peiretti, P. G., Ortoffi, M., Zoccarato, I., Gasco, L. (2014). Live yeast (*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*) supplementation in fattening rabbit diet: Effect on productive performance and meat quality. *Livestock Science*, 162, 178-184.

Rumpold, B. A., Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(5), 802-823.

Ruple, A., MacLean, E., Snyder-Mackler, N., Creevy, K. E., Promislow, D. (2022). Dog models of aging. *Annual Review of Animal Biosciences*, 10, 419-439.

Russo, F. (2012). Pet food sicuro e di qualità: oltre la normativa. 5th convegno nazionale degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali sull'alimentazione animale qualità e sicurezza del pet food, ASSALCO, Torino, IT.

http://www.izsto.it/images/stories/allegati_eventi/russo.pdf (accesso al sito in data: 3/10/2021).

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84,197–215.

Saettone, V., Biasato, I., Radice, E., Schiavone, A., Bergero, D., Meineri, G. (2020). State-of-the-Art of the Nutritional Alternatives to the Use of Antibiotics in Humans and Monogastric Animals. *Animals*, 10(12), 2199.

Sales, J., Janssens, G. P. J. (2003). Acid-insoluble ash as a marker in digestibility studies: a review. *Journal of Animal Feed Science*, 12(3), 383-401.

Sales, J. (2012). A review on the use of indigestible dietary markers to determine total tract apparent digestibility of nutrients in horses. *Animal Feed Science and Technology*, 174(3-4), 119-130.

Said, H.M., Ghishan, F.K., Kaunitz, J.D., Merchant, J.L., Wood, J.D. (2018). Physiology of the gastrointestinal tract Volumes 1 and 2, 6th ed., Elsevier Academic Press, pp. 1-1812.

Sampath, V., Han, K., Kim, I. H. (2021). Influence of yeast hydrolysate supplement on growth performance, nutrient digestibility, microflora, gas emission, blood profile, and meat quality in broilers. *Journal of Animal Science and Technology*, 63(3), 563.

Sanderson, S.L. (2016). Overview of Nutrition: Small Animals. *Merck manual, Veterinary manual* <https://www.merckvetmanual.com/management-and-nutrition/nutrition-small-animals/overview-of-nutrition-small-animals>

Scaramozzino, P., Di Cave, D., Berrilli, F., D’Orazi, C., Spaziani, A., Mazzanti, S., Scholl F., De Liberato, C. (2009). A study of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting kennelled dogs. *The Veterinary Journal*, 182(2), 231-234.

Burger I.H., Rivers J.P.W. (1989). Nutrition of the dog and cat, Waltham Symposium Number 7, 1th ed., Cambridge University Press, pp. 1-428

Schleicher, M., Cash, S. B., Freeman, L. M. (2019). Determinants of pet food purchasing decisions. *The Canadian Veterinary Journal*, 60(6), 644.

Schroeder, G.E., Smith, G.A. (1995). Bodyweight and feed intake of German shepherd bitches during pregnancy and lactation. *Journal of Small Animal Practice*, 36, 7-11.

Seferoğlu, Y., Kirkan, Ş. (2022). Roles of Probiotics in Animal Health. *Animal Health Production and Hygiene*, 11(1), 40-46.

Selig, D. J., DeLuca, J. P., Li, Q., Lin, H., Nguyen, K., Scott, S. M., Sousa, J.C., Vuong, C.T., Xie, L.H., Livezey, J. R. (2020). Saccharomyces boulardii CNCM I-745 probiotic does not alter the pharmacokinetics of amoxicillin. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 35(1).

Shiloh S., Soreck G., Terkel J. (2003). Reduction of state-anxiety by petting animals in a controlled laboratory experiment. *Anxiety Stress Coping*, 16, 387-395.

Schmitz S, Suchodolski J. (2016) Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics - what is the evidence? *Veterinary medicine and science*, 2(2), 71-94.

Schneider, S. M., Girard-Pipau, F., Filippi, J., Hebuterne, X., Moyse, D., Calle Hinojosa, G., Strickling, J. A., Harmon, D. L., Dawson, K. A., Gross, K. L. (2000). Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. *Animal Feed Science and Technology*, 86(3-4), 205-219.

Schneider, S. M., Girard-Pipau, F., Filippi, J., Hebuterne, X., Moyse, D., Calle Hinojosa, G., Pompei, A., Rampal, P. (2005). Effects of Saccharomyces boulardii on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 6165–6169.

Serpell, J. (2017). *The Domestic Dog: Its Evolution, Behavior and Interactions with People*, 2nd ed., Cambridge University Press, pp. 1-284

Shen, Y. B., Piao, X. S., Kim, S. W., Wang, L., Liu, P., Yoon, I., Zhen, Y. G. (2009). Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *Journal of Animal Science*, 87(8), 2614-2624.

Shen, Y. B., Carroll, J. A., Yoon, I., Mateo, R. D., Kim, S. W. (2011). Effects of supplementing Saccharomyces cerevisiae fermentation product in sow diets on performance of sows and nursing piglets. *Journal of Animal Science*, 89(8), 2462-2471.

Shrivastava V.S., Talapatra S.K. (1962). Pasture studies in Uttar Pradesh. II. Use of some natural indicators to determine the plane of nutrition of a grazing animal. *Indian Journal of Dairy Science*, 15, 154-160.

Shurson, G. C. (2018). Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal Feed Science and Technology*, 235, 60-76.

Simpson, J. M., Martineau, B., Jones, W. E., Ballam, J. M., Mackie, R. I. (2002). Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microbial Ecology*, 44, 186–97

Sivamaruthi, B. S., Kesika, P., Chaiyasut, C. (2021). Influence of probiotic supplementation on health status of the dogs: A review. *Applied Sciences*, 11(23), 11384.

Šlapeta, J., Dowd, S. E., Alanazi, A. D., Westman, M. E., Brown, G. K. (2015). Differences in the faecal microbiome of non-diarrhoeic clinically healthy dogs and cats associated with *Giardia duodenalis* infection: impact of hookworms and coccidia. *International Journal for Parasitology*, 45(9-10), 585-594.

Smith, E.A., Macfarlane, G.T. (1996a). Studies on Amine Production in the Human Colon: Enumeration of Amine forming Bacteria and Physiological Effects of Carbohydrate and pH. *Anaerobe*, 2, 285–297.

Smith, E.A., Macfarlane, G.T. (1996b). Enumeration of human colonie bacteria producing phenolic and indolic compounds : Effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *Journal of Applied Microbiology*, 81, 288–302.

Smith, E.A., Macfarlane, G.T. (1997a). Dissimilatory amino Acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*, 3, 327–337.

Smith, E.A., Macfarlane, G.T. (1997b). Formation of Phenolic and Indolic Compounds by Anaerobic Bacteria in the Human Large Intestine. *Microbial Ecology*, 33, 180–188.

Smith, F. O. (2011). Prenatal care of the bitch and queen. *Small animal pediatrics*, 1.

Sobol, O. M., Kryvyi, V. V., Bokshan, H. I. (2022). Review of the modern approaches to healthy diets for dogs and cats. *Таврійський науковий вісник*, 124, 195-203.

Sokolow, S. H., Rand, C., Marks, S. L., Drazenovich, N. L., Kather, E. J., Foley, J. E. (2005). Epidemiologic evaluation of diarrhea in dogs in an animal shelter. *American Journal of Veterinary Research*, 66(6), 1018-1024.

Spring, P., Wenk, C., Connolly, A., Kiers, A. (2015). A review of 733 published trials on Bio Mos®, a mannan oligosaccharide, and Actigen®, a second generation mannose rich fraction, on farm and companion animals. *Journal of Applied Animal Nutrition*, 3, e8.

Stavisky, J., Pinchbeck, G. L., German, A. J., Dawson, S., Gaskell, R. M., Ryvar, R., Radford, A. D. (2010). Prevalence of canine enteric coronavirus in a cross-sectional survey of dogs presenting at veterinary practices. *Veterinary Microbiology*, 140(1-2), 18-24.

Stavisky, J., Radford, A. D., Gaskell, R., Dawson, S., German, A., Parsons, B., Clegg S., Newman J., Pinchbeck, G. (2011). A case–control study of pathogen and lifestyle risk factors for diarrhoea in dogs. *Preventive Veterinary Medicine*, 99(2-4), 185-192.

Stecher, B., Chaffron, S., Käppeli, R., Hapfelmeier, S., Friedrich, S., Weber, T. C., Kirundi J., Suar M., McCoy K.D., von Mering C., Macpherson A., Hardt, W. D. (2010). Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000711.

Stefenoni, H., Harrison, J. H., Adams-Progar, A., Block, E. (2020). Effect of enzymatically hydrolyzed yeast on health and performance of transition dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1541-1552.

Stella, A. V., Paratte, R., Valnegri, L., Cigalino, G., Soncini, G., Chevaux, E., Dell'Orto V., Savoini, G. (2007). Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Ruminant Research*, 67(1), 7-13.

Stercova, E., Kumprechtova, D., Auclair, E., Novakova, J. (2016). Effects of live yeast dietary supplementation on nutrient digestibility and fecal microflora in beagle dogs. *Journal of Animal Science*, 94(7), 2909-2918.

Stier, H., Bischoff, S.C. (2016). Influence of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on the gut-associated immune system. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 13(9), 269-279

Stockman, J., Villaverde, C., Corbee, R. J. (2021). Calcium, Phosphorus, and Vitamin D in Dogs and Cats: Beyond the Bones. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 51(3), 623-634.

Stone, C.W. (2006). Yeast products in the feed industry: a practical guide for feed professionals. Engormix, Animal feed. <https://en.engormix.com/feed-machinery/articles/yeast-products-infeed-industry-t33489.htm>.

Strompfová, V., Kubašová, I., Mudroňová, D., Štempelová, L., Takáčová, M., Gašowski, B., Cobanova, K., Mađari, A. (2021). Effect of Hydrolyzed Yeast Administration on Faecal Microbiota, Haematology, Serum Biochemistry and Cellular Immunity in Healthy Dogs. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(5), 1267-1276.

Suchodolski, J. S., Ruaux, C. G., Steiner, J. M., Fetz, K., Williams, D. A. (2005). Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 1556–1562.

Suchodolski, J.S., Camacho, J., Steiner, J.M. (2008). Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 66, 567–578.

Suchodolski, J. S., Dowd, S. E., Westermarck, E., Steiner, J. M., Wolcott, R. D., Spillmann, T., Harmoinen, J. A. (2009). The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiology*, 9, 1–16.

Suchodolski, J. S., Xenoulis, P. G., Paddock, C.G., Steiner, J.M., Jergens, A.E. (2010). Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Veterinary Microbiology*, 142, 394-400.

Suchodolski, J. S. (2011). Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 41, 261–272.

Suchodolski, J.S., Markel, M.E., Garcia-Mazcorro, J.F., Unterer, S., Heilmann, R.M., Dowd, S.E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E.M., Steiner, J.M., Cook, A.K., Toresson, L. (2012a). The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea an idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, 7, 51907.

Suchodolski, J. S., Dowd, S. E., Wilke, V., Steiner, J. M., Jergens, A. E. (2012b). 16S rRNA gene pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, 7, 39333

Sussman M.B. (1985). *Pets and the family*, 1th ed, The Haworth press, New York, pp. 1-248.

Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., Fagarasan, S. (2004). Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 1981-1986.

Szymańska-Czerwińska, M., Bednarek, D. (2008). Effect of prebiotics on immunological processes in animals. *Medycyna weterynaryjna*, 64, 262-264

Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Healy, H. P., Dawson, K. A., Merchen N.R., Fahey Jr, G. C. (2002a). Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *The Journal of Nutrition*, 132(5), 980-989.

Swanson, K., Grieshop, C., Flickinger, E., Healy, H. P., Dawson, K. A., Merchen, N. R., Merchen, N. R. Fahey Jr, G. C. (2002b). Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on immune function and

ileal and fecal microbial populations in adult dogs. *Archives of Animal Nutrition*, 56(4), 309-318.

Swanson, K. S., Kuzmuk, K. N., Schook, L. B., Fahey Jr, G. C. (2004). Diet affects nutrient digestibility, hematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs. *Journal of Animal Science*, 82(6), 1713-1724.

Swanson, K. S., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Middelbos, I. S., Vester, B. M., Barry, K. A., Nelson, K. E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, Cann, I. K., White, B. A., Fahey, G. C. Jr. (2011). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 5, 639–649.

Sugano, H. (1989). Giardiasis of puppies from breeder's kennel. *Journal of the Japan Medical Association*, 42, 68-71.

Szajewska, H., Kołodziej, M. (2015). Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 42(7), 793-801.

Tabor, C. W., Tabor, H. (1985). Polyamines in microorganisms. *Microbiological Reviews*, 49(1), 81-99.

Tan, C. Q., Wei, H. K., Sun, H. Q., Long, G., Ao, J. T., Jiang, S. W., Peng, J. (2015). Effects of supplementing sow diets during two gestations with konjac flour and *Saccharomyces boulardii* on constipation in periparturient period, lactation feed intake and piglet performance. *Animal Feed Science and Technology*, 210, 254-262.

Tangtrongsup, S., Scorza, V. (2010). Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp infections in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(3), 155-162.

Tannock, G. W. (2005). New perceptions of the gut microbiota: implications for future research. *Gastroenterology Clinics*, 34(3), 361-382.

Tennant, B. J., Gaskell, R. M., Jones, R. C., Gaskell, C. J. (1993). Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *The Veterinary Record*, 132(1), 7-11.

Terada, A., Hara, H., Oishi, T., Matsui, T., Mitsuoka, T., Nakajyo, S., Fujimori, I., Hara, K. (1992). Effect of dietary lactosucrose on faecal flora and faecal metabolites of dogs. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 5, 87-92.

Thalman, O., Shapiro, B., Cui, P., Schuenemann, V. J., Sawyer, S. K., Greenfield, D. L., Germonpré, M. B., Sablin M. V., López-Giráldez, F., Domingo-Roura X., Napierala, H., Uerpman, H-P., Loponte, D. M., Acosta A. A., Giemsch, L., R., Schmitz, W., Worthington, B., Buikstra, J. E., Druzhkova, A., Graphodatsky, A., Ovodov, N. D., Wahlberg, N., Freedman, A. H.; Schweizer, R.

M., Koepfli, K.-P., Leonard, J.A., Meyer, M., Krause J., Pääbo S., Green, R.E., Wayne, R. K. (2013). Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science*, 342(6160), 871-874.

Theodoro, S. D. S., Putarov, T. C., Tiemi, C., Volpe, L. M., de Oliveira, C. A. F., Glória, M. B. D. A., Carciofi, A. C. (2019). Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their potential prebiotic properties in dogs. *PLoS ONE*, 14(11), e0225659.

Thompson, A. (2008). Ingredients: where pet food starts. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(3), 127-132.

Tonglet, C., Jeusette, I., Istasse, L., Diez, M. (2001). Prediction of protein digestibility in dog food by a multi-enzymatic method: a useful technique to develop. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 85(7-8), 189-194.

Thonney, M. L., Duhaime, D. J., Moe, P. W., Reid, J. T. (1979). Acid insoluble ash and permanganate lignin as indicators to determine digestibility of cattle rations. *Journal of Animal Science*, 49(4), 1112-1116.

Travers, M. A., Florent, I., Kohl, L., Grellier, P. (2011). Probiotics for the control of parasites: an overview. *Journal of Parasitology Research*, 2011, 1-11.

Tress, U., Suchodolski, J. S., Williams, D. A., Steiner, J. M. (2006). Development of a fecal sample collection strategy for extraction and quantification of fecal immunoglobulin A in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 67(10), 1756-1759.

Tsilingiri, K.; Rescigno, M. (2013). Postbiotics: What else? *Benef. Microbes*, 4, 101–107.

Tupler, T., Levy, J. K., Sabshin, S. J., Tucker, S. J., Greiner, E. C., Leutenegger, C. M. (2012). Enteropathogens identified in dogs entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241(3), 338-343.

Turner, W. G. (2006). The role of companion animals throughout the family life cycle. *Journal of Family Social Work*, 9(4), 11-21.

Van den Abbeele, P., Duysburgh, C., Rakebrandt, M., Marzorati, M. (2020). Dried yeast cell walls high in beta-glucan and mannan-oligosaccharides positively affect microbial composition and activity in the canine gastrointestinal tract in vitro. *Journal of Animal Science*, 98(6), skaa173.

Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security. *FAO forestry paper*, pp. 1-187.

Van Keulen, J. Y. B. A., Young, B. A. (1977). Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science*, 44(2), 282-287.

Velazquez O.C., Lederer H.M., Rombeau J.L. (1996). Butyrate and the colonocyte: implications for neoplasia. *Digestive disease & Sciences*, 41 (4), 727-739

Vendramini, T. H. A., Pedrinelli, V., Macedo, H. T., Zafalon, R. V. A., Risolia, L. W., Rentas, M. F., Macegoza M. V., Gameiro A.H., Brunetto, M. A. (2020). Homemade versus extruded and wet commercial diets for dogs: Cost comparison. *Plos ONE*, 15(7), e0236672.

Verzichi, S., Trabalza Marinucci, M. (2002). L'impiego degli indicatori, con particolare riferimento agli n-alcani, per lo studio della dieta negli erbivori domestici e selvatici. *Webzine Sanità Pubblica Veterinaria*, 15. https://spvet.it/arretrati/numero_15/indicatori.html

Vetpedia. (2019). Prebiotici e probiotici: utilizzo nel cane e nel gatto. *Vetpedia*. <https://www.vetpedia.it/indice-schede/scheda-enciclopedia/prebiotici-e-probiotici-utilizzo-nel-cane-e-nel-gatto.html>

Vetvicka, V., Oliveira, C. (2014). [beta](1-3)(1-6)-D-glucans Modulate Immune Status and Blood Glucose Levels in Dogs. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4(8), 981.

Veum, T. L., Bowman, G. L. (1973). Saccharomyces cerevisiae yeast culture in diets for mechanically-fed neonatal piglets and early growing self-fed pigs. *Journal of Animal Science*, 37(1), 67-71.

Veum, T. L., Reyes, J., Eilersieck, M. (1995). Effect of supplemental yeast culture in sow gestation and lactation diets on apparent nutrient digestibilities and reproductive performance through one reproductive cycle. *Journal of Animal Science*, 73(6), 1741-1745.

While, S.G., Skrede, A., Ahlstrøm, Ø., Hove, K. (2007). Yttrium oxide (Y₂O₃) as an inert marker in digestibility studies with dogs, blue foxes and mink fed diets containing different protein sources. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 91:381–389.

Vilà, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., Amorim, I. R., Rice, J. E., Honeycutt, R. L., Crandall, K.A, Lundeberg, J., Wayne, R. K. (1997). Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, 276(5319), 1687-1689.

Villeneuve, V., Beugnet, F., Bourdoiseau, G. (2000). Efficacy of oxfendazole for the treatment of giardiasis in dogs. Experiments in dog breeding kennels. *Parasite*, 7(3), 221-226.

Vinassa, M., Vergnano, D., Valle, E., Giribaldi, M., Nery, J., Prola, L., Bergero D., Schiavone, A. (2020). Profiling Italian cat and dog owners' perceptions of pet food quality traits. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1-10.

Vohra, A., Syal, P., Madan, A. (2016). Probiotic yeasts in livestock sector. *Animal Feed Science and Technology*, 219, 31-47.

Vogtmann, H., Pfirter, H. P., Prabucki, A. L. (1975). A new method of determining metabolisability of energy and digestibility of fatty acids in broiler diets. *British Poultry Science*, 16(5), 531-534

Vonholdt, B. M., Pollinger, J. P., Lohmueller, K. E., Parker, H.A., Quignon, H.G., P., Degenhardt J. D, Boyko A.R., Earl D.A., Auton A., Reynolds A., Bryc K., Brisbin A., Knowles J.C., Mosher D.S., Spady T.C., Elkahlon A., Geffen E., Pilot M., Jedrzejewski W., Greco C., Randi E., Bannasch D., Wilton A., Shearman J., Musiani M., Cargill M., Jones P.G., Qian Z., Huang W., Ding Z., Zhang Y., Bustamante C.D., Ostrander E.A., Novembre J. , Wayne, R. K. (2010). Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*, 464(7290), 898-902.

Walton, C., Fowler, D. P., Turner, C., Jia, W., Whitehead, R. N., Griffiths, L., Dawson C., Waring R.H., Ramsden D.B., Cole J.A., Cauchi M., Bessant C., Hunter, J. O. (2013). Analysis of volatile organic compounds of bacterial origin in chronic gastrointestinal diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(10), 2069-2078.

Wayne, R. K.; Vonholdt, B. M. (2012). Evolutionary genomics of dog domestication. *Mammalian Genome*, 23(1), 3-18.

Weber, M. P., Stambouli, F., Martin, L. J., Dumon, H. J., Biourge, V. C., Nguyen, P. G. (2002). Influence of age and body size on gastrointestinal transit time of radiopaque markers in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 63(5), 677-682.

Weber M, Martin L, Biourge V, Nguyen P, Dumon H. (2003). Influence of age and body size on the digestibility of a dry expanded diet in dogs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 87(1-2), 21-31

Well, J. M., Rossi, O., Meijerink, M., van Barleen, P. (2011). Epithelial crosstalk at the microbiota mucosal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4607-4614.

Wernimont, S. M., Radosevich, J., Jackson, M. I., Ephraim, E., Badri, D. V., MacLeay, J. M., Jewell D. E., Suchodolski, J. S. (2020). The effects of nutrition on the gastrointestinal microbiome of cats and dogs: impact on health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1266.

WHO. (2002). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food and Nutrition Paper*. <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>

Wilson, A. D. (2018). Application of electronic-nose technologies and VOC-biomarkers for the noninvasive early diagnosis of gastrointestinal diseases. *Sensors*, 18(8), 2613.

Whittemore, J. C., Moyers, T. D., Price, J. M. (2019). Randomized, controlled, crossover trial of prevention of antibiotic-induced gastrointestinal signs using a synbiotic mixture in healthy research dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(4), 1619-1626.

Williams, P. E. V., Tait, C. A. G., Innes, G. M., Newbold, C. J. (1991). Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *Journal of Animal Science*, 69(7), 3016-3026.

Wilson, A. D., Baietto, M. (2009). Applications and advances in electronic-nose technologies. *Sensors*, 9(7), 5099-5148.

Wilson, A. D. (2020). Noninvasive early disease diagnosis by electronic-nose and related VOC-detection devices. *Biosensors*, 10(7), 73.

Windey, K., De Preter, V., Verbeke, K. (2012). Relevance of protein fermentation to gut health. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 184–196.

Wynn, S.G. (2009). Probiotics in veterinary medicine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234, 606-613.

Wyse, C.A., McLellan, J., Dickie, A.M., Sutton, D.G.M., Preston, T., Yam. (2003). A review of methods for assessment of the rate of gastric emptying in the dog and cat. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, 609-621.

Wohlt, J. E., Finkelstein, A. D., Chung, C. H. (1991). Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility, and performance by dairy cattle during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 74(4), 1395-1400.

Wohlt, J. E., Corcione, T. T., Zajac, P. K. (1998). Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1345-1352.

Wong P.W.C., Yu R.W.M., Ngai J.T.K. (2019). Companion animal ownership and human well-being in a metropolis- the case of Hong Kong. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 1729.

www.esccap.it – European Scientific Council Companion Animal Parasites

www.barfaustralia.com

Xenoulis, P. G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J. M., Van House, A. M., Suchodolski, J. S. (2008). Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiology Ecology*, 66, 579–589.

Xie, Z. Y., Zhao, D., Chen, B. R., Wang, Y. N., Ma, Y., Shi, H. J., , Yang Y., Wang Z-M., Wang, L. S. (2017). Association between pet ownership and coronary artery disease in a Chinese population. *Medicine*, 96(13).

Xu, H., Zhao, F., Hou, Q., Huang, W., Liu, Y., Zhang, H., Sun, Z. (2019). Metagenomic analysis revealed beneficial effects of probiotics in improving the composition and function of the gut microbiota in dogs with diarrhoea. *Food & Function*, 10(5), 2618-2629.

Yamka, R. M., Harmon, D. L., Schoenherr, W. D., Khoo, C., Gross, K. L., Davidson, S. J., Joshi, D. K. (2006). In vivo measurement of flatulence and nutrient digestibility in dogs fed poultry by-product meal, conventional soybean meal, and low-oligosaccharide low-phytate soybean meal. *American Journal of Veterinary Research*, 67(1), 88-94.

Yang, H. S., Wu, F., Long, L. N., Li, T. J., Xiong, X., Liao, P., Liu H-n, Yin, Y. L. (2016). Effects of yeast products on the intestinal morphology, barrier function, cytokine expression, and antioxidant system of weaned piglets. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 17(10), 752-762.

Yang, C., Mogno, I., Contijoch, E. J., Borgerding, J. N., Aggarwala, V., Li, Z., Siu, S., Grasset, E.K., Helmus, D.S., Dubinsky, M.C., Mehandru, S., Cerutti, A., Faith, J. J. (2020). Fecal IgA levels are determined by strain-level differences in *Bacteroides ovatus* and are modifiable by gut microbiota manipulation. *Cell Host & Microbe*, 27(3), 467-475.

Yeşilbağ, K., Yilmaz, Z. E. K. İ., Torun, S., Pratelli, A. (2004). Canine coronavirus infection in Turkish dog population. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 51(7), 353-355.

Yesilbag K., Yilmaz, K. Y. Z., Özkul, A., Pratelli, A. (2007). Aetiological role of viruses in puppies with diarrhoea. *The Veterinary Record*, 161, 169-170.

Zanatta, C. P., Félix, A. P., Brito, C. B. M., Murakami, F., Sabchuk, T. T., Oliveira, S. G., Maiorka, A. (2011). Digestibility of dry extruded food in adult dogs and puppies. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63, 784-787.

Zbinden, R., Bonczi, E., Altwegg, M. (1999). Inhibition of *Saccharomyces boulardii* on cell invasion of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11, 158-162.

Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T. (2002). Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. *The Journal of Nutrition*, 132(6), 1682S-1684S.

Zentek, J., Fricke, S., Hewicker-Trautwein, M., Ehinger, B., Amtsberg, G., Baums, C. (2004). Dietary protein source and manufacturing processes affect macronutrient digestibility, fecal consistency, and presence of fecal *Clostridium perfringens* in adult dogs. *The Journal of Nutrition*, 134(8), 2158S-2161S.

Zhang, J. Y., Park, J. W., Kim, I. H. (2019). Effect of supplementation with brewer's yeast hydrolysate on growth performance, nutrients digestibility, blood profiles and meat quality in growing to finishing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(10), 1565.

Ziese, A. L., Suchodolski, J. S., Hartmann, K., Busch, K., Anderson, A., Sarwar, F., Sindern N., Unterer, S. (2018). Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. *PLoS ONE*, 13(9), e0204691.

Ziese A-L., Suchodolski, J., (2018). Boulardii: A New Probiotic Approach in Veterinary Medicine. *Clinical Notes*, December 2018, 38-41.

Zmora, N., Suez, J., Elinav, E. (2019). You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nature reviews- Gastroenterology & Hepatology*, 16(1), 35-56.

Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., Feleszko, W. (2020). Postbiotics—a step beyond pre-and probiotics. *Nutrients*, 12(8), 2189.

Zulkifli, S. A., Mohamad, C. W. S. R., Abdullah, A. H. (2017). Classification of human pathogen bacteria for early screening using electronic nose. 2nd International Conference on Applied Science and Technology, April 2017, Kedah, Malaysia.