



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

TESI DI DOTTORATO

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento Di Medicina Animale, Produzioni e Salute

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE VETERINARIE

CICLO XXXI

TITOLO TESI

**Valutazione della qualità del pet food
e analisi del microbiota intestinale
in cani con differente condizione corporea**

Coordinatore: Ch.ma Prof.ssa Valentina Elena Giuditta Zappulli

Supervisore: Ch.ma Dott.ssa Antonia Ricci

Co-supervisore: Ch.ma Dott.ssa Rebecca Ricci

Dottorando: Dott.ssa Giada Morelli

Riassunto

Una dieta completa e bilanciata è essenziale per mantenere gli animali in buona salute. La maggior parte di cani e gatti in Europa, Stati Uniti e altri paesi sviluppati consuma pet food industriali il cui mercato è in costante crescita ogni anno. Gli alimenti commerciali per pets devono essere sicuri e nutrizionalmente bilanciati per soddisfare i loro fabbisogni; pertanto, ai produttori è richiesto di seguire le raccomandazioni fornite dalla Federazione europea dell'industria alimentare per animali domestici. La legge europea stabilisce inoltre regole per l'etichettatura allo scopo di fornire informazioni adeguate ai consumatori. Allo stesso tempo si sta assistendo ad una aumentata popolarità delle diete crude commerciali per pet, poiché molti proprietari decidono di alimentare i propri animali con una dieta più naturale o ancestrale. Poiché nelle etichette mancano informazioni precise e i controlli regolari scarseggiano, possono insorgere dei dubbi circa la qualità delle diete commerciali per pet, sia estruse che crude. L'obiettivo generale di questo progetto è stato quello di fornire maggiori dettagli circa il valore nutritivo del pet food e circa la qualità microbiologica dei prodotti a base di carne cruda.

Una introduzione generale riguardo alle caratteristiche e al mercato del pet food è fornita nel **Capitolo 1**.

Il **Capitolo 2** illustra la composizione amminoacidica di 80 pet food completi. La proteina dietetica dovrebbe fornire tutti gli aminoacidi essenziali che gli animali non possono sintetizzare, e un l'apporto sufficiente a garantire i loro fabbisogni dipende dalla sua qualità. Il pet food selezionato ha dimostrato una variabilità limitata fra categorie differenti, e alcuni prodotti hanno dimostrato alcune carenze di determinati amminoacidi essenziali.

Il **Capitolo 3** è incentrato sul profilo lipidico di 22 mangimi completi e 21 complementari. I grassi sono una componente importante del pet food in quanto fornisce acidi grassi essenziali e ne aumenta l'appetibilità. Inoltre, specifici integratori a base di omega-3&6

vengono formulati per migliorare la condizione di salute in animali affetti da certe patologie. I prodotti analizzati hanno mostrato un'ampia variabilità, dipesa soprattutto

dagli ingredienti inclusi, e discordanze inaccettabili sono state trovate fra valori riportati in etichetta e quelli analizzati.

L'obiettivo dello studio riportato nel **Capitolo 4** è stato quello di far luce sul problema della contaminazione in diete *novel protein* e idrolizzate testando la presenza di 19 specie animali. Le diete di eliminazione sono uno strumento valido per la diagnosi di reazioni avverse al cibo in cani e gatti, ma la presenza di ingredienti non dichiarati può impedire al veterinario di formulare una diagnosi appropriata. Dei 40 prodotti analizzati, solo dieci presentavano un'etichettatura coerente con il contenuto.

Nel **Capitolo 5** è riportata la valutazione della qualità microbiologica di alimenti a base di carne cruda per pet acquistati online. È ampiamente documentato il fatto che le diete crude aumentino l'esposizione sia di animali che di umani a batteri pericolosi, e i prodotti analizzati erano abbondantemente contaminati da microrganismi, più della metà risultando positiva per batteri potenzialmente zoonotici.

Infine, l'ultimo capitolo di questa tesi di Dottorato riguarda il microbiota intestinale. L'obiettivo dello studio descritto nel **Capitolo 6** è stato quello di indagare se delle alterazioni nel microbiota intestinale potessero essere associate all'obesità nel cane. Mediante il sequenziamento del gene 16S rRNA, è stata valutata la composizione del microbiota fecale in 15 cani normopeso e 14 sovrappeso. Il microbiota dei cani esaminati ha mostrato una considerevole variazione interindividuale, ma non delle differenze significative per quanto concerne la condizione corporea.

Summary

A complete and balanced diet is essential to maintain animals in good health. Most dogs and cats in Europe, the United States and other developed countries are fed commercially manufactured pet foods, whose market is still growing every year. Commercial pet diets should provide safe and nutritionally balanced foods to meet the animal's nutritional needs; therefore, pet food manufacturers are required to follow the recommended allowances presented by the European Pet Food Industry Federation. European feed law also establishes rules and requirements for labelling to provide adequate information for consumers. At the same time, we are seeing an increasing popularity of commercial raw pet food diets, as many owners choose to feed a more natural or ancestral diet to their pets due to anecdotal health benefits.

However, since pet food labels lack precise information and there is a scarcity of regular controls, concerns may arise about the quality of commercially available pet diets, both extruded and raw. The overall aim of this project was therefore to provide greater insight into the nutrient composition of commercial pet food and the microbiological quality of raw meat-based products.

First, a general introduction about pet foods' features and sales is provided in **Chapter 1**.

Chapter 2 explores the amino acid composition of 80 complete pet foods. Dietary proteins should provide all the essential amino acids that animals cannot synthesize, and whether the intake is sufficient to meet their requirement, depends on the protein quality included. The amino acid composition of the selected pet food showed limited variability among different categories, and some products displayed certain essential amino acids deficiency.

Chapter 3 is centered on the fatty acid profile of 22 complete and 21 complementary pet foods. Fat is an important component of pet food which provides essential fatty acids and improves the palatability. Moreover, specific omega-3&6 supplements are formulated to improve the pet's health in certain disease conditions. The lipid composition of the analyzed products showed great variability, mainly depending on the ingredients included, and unacceptable discordances were found among labeled and analyzed values.

The aim of the study reported in **Chapter 4** was to shed light upon the problem of contamination in novel protein diets and hydrolyzed protein diets testing for the presence of 19 animal species. Elimination diets are common tools for the diagnosis of adverse food reaction in dogs and cats, but the presence of undeclared ingredients may negatively interfere with the trial and prevent the veterinarian from making an appropriate diagnosis. Of the 40 analyzed products, only ten presented a content that correctly matched the label.

In **Chapter 5** the evaluation of the microbiological quality of raw-meat pet foods purchased online is reported. It has been well documented that feeding raw diets increases exposure to dangerous bacteria for both pets and humans, raising questions about the quality of raw meat-based products intended for dogs and cats. The collected products were largely contaminated by microbes and more than half of the samples resulted positive for potentially zoonotic bacteria.

Finally, the last chapter of this PhD thesis deals with the gut microbiota instead. Previous work has shown obesity to be associated with changes in intestinal microbiota; however, while obesity has become a health epidemic in pets, limited information is available about the role of the canine gut microbiota. The aim of the study described in **Chapter 6** was to investigate whether alterations in the intestinal microbiota may be associated with canine obesity. Using 16S rRNA gene sequencing, the composition of the fecal microbiota in 15 lean and 14 overweight pet dogs was evaluated. The gut microbiota of the recruited dogs showed considerable interindividual variation, but no significant differences based on body condition.

Parte I

Sommario

Riassunto (italiano)	3
Summary (inglese)	5
Capitolo 1	1
Background – L'alimentazione del cane e del gatto	1
1.1 Il pet food	2
1.1.1 Il mercato italiano degli alimenti per cani e gatti	4
1.1.2 Il pet food e la sua produzione	Errore. Il segnalibro non è definito.
1.2 Diete alternative	8
1.3 Riferimenti	10
1.4 Scopo della ricerca	11
Capitolo 2 Analisi del profilo amminoacidico di 80 mangimi commerciali secchi per cani e gatti e sua predizione mediante l'utilizzo della spettroscopia del vicino infrarosso (NIRs)	13
2.1 Abstract	13
2.2 Abbreviazioni	14
2.3 Introduzione	15
2.3.1 Le proteine: funzioni e struttura	15
2.3.2 Fabbisogni minimi proteici ed amminoacidici nel cane e nel gatto	17
2.3.3 Peculiarità nel gatto nel metabolismo proteico	18
2.3.4 La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR)	20
2.3.5. Obiettivo dello studio	24
2.4 Materiali e Metodi	25
2.4.1 Raccolta prodotti e suddivisione in categorie	25
2.4.2 Analisi centesimale e amminoacidica	25
2.4.3 Analisi con tecnica NIRs	29
2.4.4 Elaborazione dati e analisi statistica	31
2.5 Risultati	33
2.5.1 Rispetto dei limiti minimi definiti da FEDIAF	33
2.5.2 Profilo amminoacidico dei mangimi	35
2.6 Discussione e conclusione	52
2.7 Bibliografia	58
Capitolo 3 Profilo degli acidi grassi di 22 mangimi completi e 21 mangimi complementari per cani e gatti	62
3.1 Abstract	62
3.2 Abbreviazioni	65
3.3 Introduzione	66
3.3.1 I lipidi	66
3.3.2 Metabolismo e acidi grassi essenziali nel cane e nel gatto	68
3.3.3 Fabbisogni di grassi nel cane e nel gatto	74
3.3.4 I grassi nella dieta del cane e del gatto.....	78
3.3.5 Obiettivo dello studio	82
3.4 Materiali e Metodi	83

3.4.1 Raccolta prodotti e lettura etichette.....	83
3.4.2 Analisi di laboratorio	83
3.5 Risultati	86
3.5.1 Profilo degli acidi grassi nei mangimi completi e rispetto dei limiti FEDIAF.....	86
3.5.2 Profilo degli acidi grassi nei mangimi complementari.....	90
3.5.3 Confronto tra le informazioni dichiarate in etichetta ed i risultati di laboratorio	92
3.5.4 Quantità di EPA e DHA fornita dai mangimi complementari	95
3.6 Discussione e conclusione	100
3.7 Bibliografia	111
Capitolo 4 <i>Undeclared animal species in dry and wet novel and hydrolyzed protein diets for dogs and cats detected by microarray analysis</i>	122
4.1 Abstract	122
4.2 Abbreviations	123
4.3 Introduction.....	123
4.4 Materials and Methods.....	125
4.4.1 Sample recruitment.....	125
4.4.2 Animal species identification	125
4.4.3 DNA extraction	125
4.4.4 DNA amplification and microarray assay	126
4.4.5 Microarray analysis	126
4.5 Results.....	127
4.6 Discussion and conclusions	132
4.7 References.....	136
Capitolo 5 <i>Evaluation of microbial contamination and effects of storage in raw-meat pet foods purchased online</i>	137
5.1 Abstract	137
5.2 Abbreviations	138
5.3 Introduction.....	138
5.4 Materials e Methods.....	139
5.4.1 Quantitative microbiology.....	140
5.4.2 <i>Salmonella spp.</i> cultures.....	141
5.4.3 <i>Listeria monocytogenes</i> culture	141
5.4.4 <i>Yersinia enterocolitica</i> cultures	141
5.4.5 Statistical analyses.....	142
5.5 Results.....	143
5.6 Discussion and conclusions	145
5.7 References.....	150
Capitolo 1 <i>bis Caratteristiche del microbiota fecale in cani normopeso e sovrappeso appartenenti a razze differenti</i>.....	II
1.1 Abstract	II
1.2 Abbreviazioni.....	III
1.3 Introduzione	1

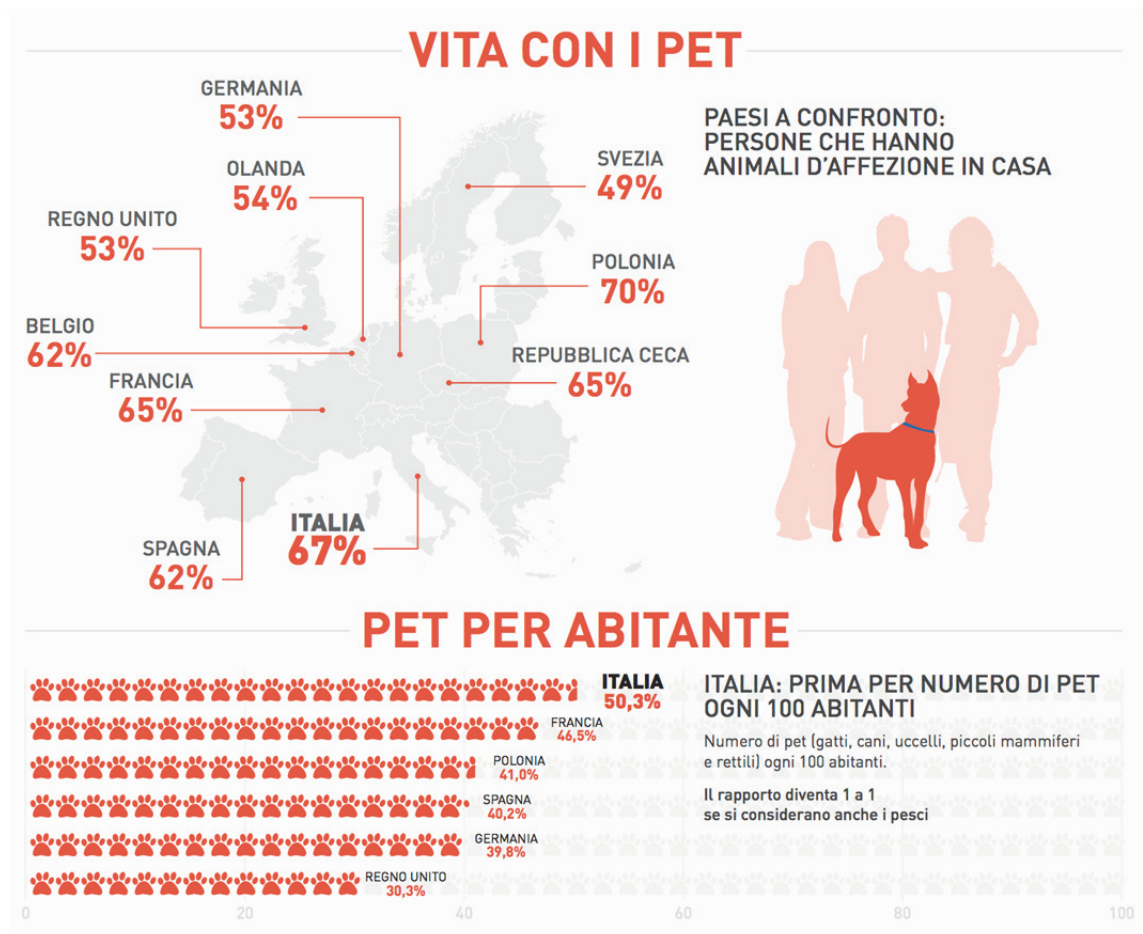
1.3.1 Il microbiota intestinale.....	1
1.3.2 Metodiche di caratterizzazione del microbiota intestinale	2
1.3.3 Composizione del microbiota intestinale canino	5
1.3.4 Ruolo e funzioni del microbiota intestinale canino	8
1.3.5 Il microbiota intestinale e l'obesità	10
1.3.6 Il microbiota intestinale di cani obesi: stato dell'arte	17
1.3.7 Scopo della ricerca.....	23
1.4 Materiali e metodi.....	25
1.4.1 Animali e metadati	25
1.4.2 Raccolta dei campioni fecali ed estrazione del DNA batterico	26
1.4.3 Analisi bioinformatica.....	27
1.5 Risultati.....	30
1.6 Discussione e conclusioni.....	39
1.7 Bibliografia.....	44

Capitolo 1

Introduzione generale – L'alimentazione del cane e del gatto

Gli animali d'affezione sono ormai membri di diritto di milioni di famiglie italiane ed europee, con effetti importanti a livello sociale ed economico. Una ricerca internazionale di GFK (2016a) ha evidenziato come l'Italia sia uno fra i Paesi più *pet friendly*: considerando i principali Paesi europei e gli USA, l'Italia occupa il terzo posto di questa graduatoria, dietro a Stati Uniti e Polonia. Sempre secondo questa rilevazione, il 67% degli intervistati ha dichiarato di vivere almeno con un pet, percentuale che colloca l'Italia davanti a Repubblica Ceca (65%), Francia (65%) e Spagna (62%)(Figura 1).

Figura 1. Dettaglio della popolazione pet in Europa (tratto da Assalco – Zoomark, 2018).



È ormai ampiamente riconosciuto che il benessere e la salute di cani e gatti passa dall'alimentazione, poiché una dieta sbilanciata può favorire l'insorgenza di alcune malattie, mentre una sana ed equilibrata può aiutare a prevenirle o a tenerle sotto controllo. Il contributo che i pet danno alla società va ormai ben oltre il ruolo della compagnia e i proprietari riconoscono sempre di più non solo la necessità di fornire loro cure adeguate, ma si è pure consolidata una spiccata attenzione alla gestione nutrizionale del pet. Attualmente, gli alimenti industriali rappresentano di gran lunga la prima modalità di alimentazione dei pet (77%)(Assalco – Zoomark, 2018).

1.1 Il pet food

I pet food in commercio possono essere distinti in tre grandi categorie: secco, semi-umido ed umido. Tale distinzione viene fatta in base al contenuto di acqua presente nei diversi alimenti (FEDIAF, 2011):

- Pet food secco: tasso di umidità non superiore al 14 %;
- Pet food semi-umido: tasso di umidità superiore al 14 % ed inferiore al 60 %;
- Pet food umido: tasso di umidità superiore o uguale al 60 %.

Inoltre, secondo quanto definito dal Regolamento CE 767/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio, i mangimi per cani e gatti vengono differenziati in mangimi completi e complementari. I mangimi completi sono definiti come dei “composti che, per la loro composizione, sono sufficienti per una razione giornaliera”, cioè sono in grado di apportare il giusto quantitativo di nutrienti e di elementi necessari alla determinata specie animale. I mangimi complementari, al contrario, sono “composti con contenuto elevato di talune sostanze, ma che, per la loro composizione, sono sufficienti per una razione giornaliera soltanto se utilizzati in associazione con altri mangimi”; di questa seconda categoria fanno parte gli snack fuoripasto e gli integratori.

In commercio esistono svariate tipologie di alimenti completi per cani e gatti, formulati per soddisfare le esigenze degli animali ma anche per seguire i trend dei proprietari. Si possono trovare così mangimi a base di vari prodotti di origine animale, mangimi vegetariani o vegani, mangimi monoproteici, mangimi *grain free* (i.e. senza cereali) e mangimi dietetici, ovvero destinati a particolari fini nutrizionali (Reg. CE 767/2009).

Le materie prime che possono essere utilizzate per la produzione del pet food sono stabilite dalla Direttiva Europea 82/475/CEE, la quale ha fissato le seguenti categorie:

carni e derivati, latte e derivati del latte, uova e prodotti a base di uova, oli e grassi, lieviti, pesci e sottoprodotti dei pesci, cereali, ortaggi, sottoprodotti di origine vegetale, estratti di proteine vegetali, sostanze minerali, zuccheri, frutta, noci, semi, alghe, molluschi e crostacei, insetti, prodotti del panificio.

La *Fédération Européenne De l'Industrie des Aliments pour Animaux Familiers* (FEDIAF) è un'associazione fondata nel 1970 che rappresenta le industrie del pet food e gli operatori di tale settore presso l'Unione Europea ed altre organizzazioni internazionali.

Allo scopo di garantire il benessere degli animali domestici fornendo loro alimenti equilibrati da un punto di vista nutrizionale, FEDIAF ha redatto le Linee guida nutrizionali per pet food completi e complementari per cani e gatti (2018) che si basano sulle più attuali conoscenze sulla nutrizione del cane e del gatto.

Con la stesura di queste linee guida, FEDIAF si pone tre importanti obiettivi:

- Far sì che vengano prodotti pet food nutrizionalmente equilibrati, nel rispetto della legislazione dell'Unione Europea in materia di nutrizione degli animali;
- Essere il riferimento circa l'alimentazione degli animali d'affezione in Europa;
- Rafforzare la cooperazione tra i produttori di alimenti per animali da compagnia ed i professionisti della cura degli animali, fornendo informazioni valide da un punto di vista scientifico sulla formulazione e la valutazione dei pet food.

Le linee guida nutrizionali FEDIAF forniscono raccomandazioni essenziali per quanto riguarda i livelli minimi (che includono un margine di sicurezza per prevenire le carenze dovute alle variazioni individuali di ogni animale e alle eventuali interazioni tra i diversi nutrienti) e massimi (basati sui limiti legali definiti dall'UE o sui livelli considerati nutrizionalmente sicuri basati sui dati di ricerca) di nutrienti che devono essere presenti all'interno di ogni alimento destinato ai pet. Ciò consente di garantire a cani e gatti l'assunzione di mangimi sicuri e adeguati alle loro necessità.

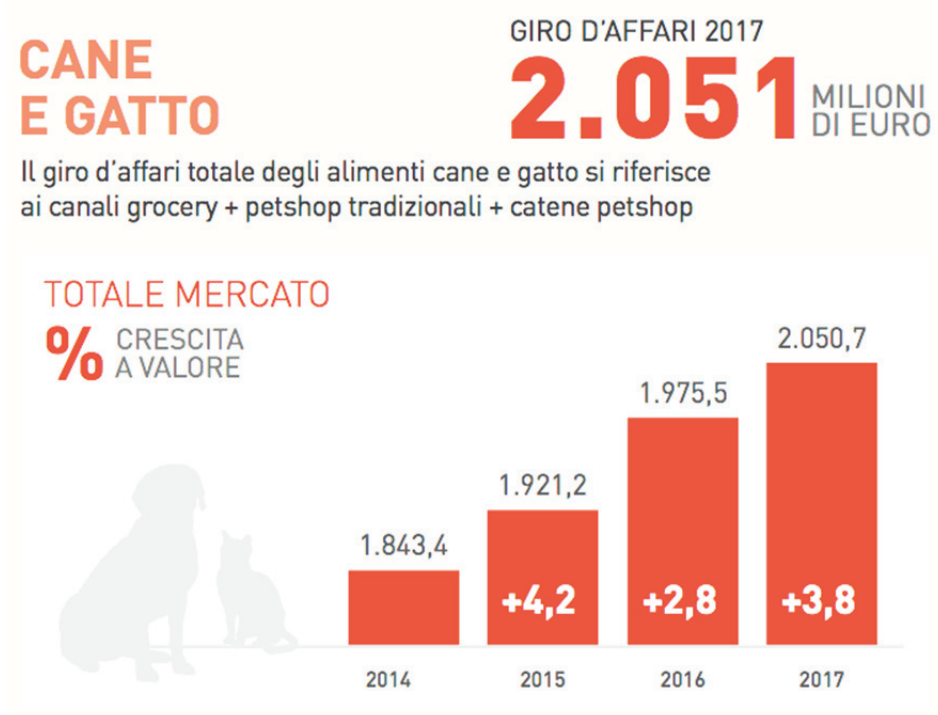
Sono esclusi da queste linee guida quei pet food con scopi nutrizionali particolari (e.g. alimenti dietetici) i quali possono presentare livelli di nutrienti diversi da quelli indicati.

In Italia il pet food è salubre e garantito, poiché la sicurezza alimentare è regolata da un complesso piano di controlli ufficiali che verifica l'impiego di materie prime salubri e tracciabili. Il Piano Nazionale di controllo ufficiale sull'Alimentazione Animale (PNAA) è un importante documento del Ministero della Salute che assicura un sistema di controllo dei mangimi e del pet food al fine di garantire la protezione della salute umana e animale (Assalco – Zoomark, 2018). Il contenuto del Piano viene periodicamente aggiornato sulla base dei criteri di rischio, delle allerte comunitarie, delle evoluzioni normative e di nuove esigenze di controllo ufficiale, nonché presenta programmi di controllo sulle sostanze indesiderabili. Nel triennio 2014-2016 soltanto 4 campioni su 801 controlli sono risultati non conformi (Assalco – Zoomark, 2018).

1.1.1 Il mercato italiano degli alimenti per cani e gatti

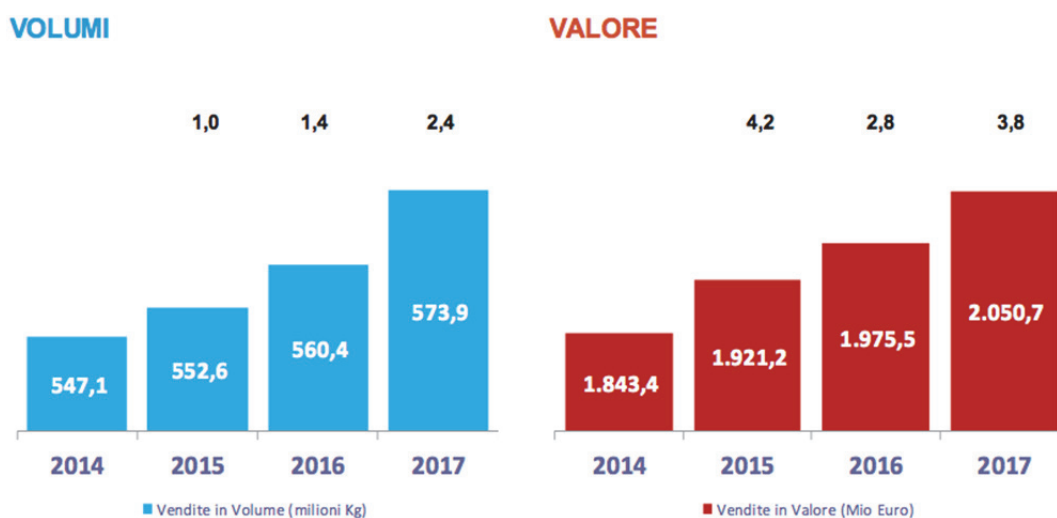
Il settore del pet food rappresenta una fetta di mercato in costante crescita a livello mondiale. Soltanto in Italia, il giro d'affari degli alimenti per cani e gatti ha recentemente raggiunto i 2 miliardi di euro annui per oltre 570'000 tonnellate commercializzate (Assalco – Zoomark, 2018)(Figura 2).

Figura 2. Dettaglio del mercato del pet food in Italia (tratto da Assalco – Zoomark, 2018).



Come riportato nel più recente Rapporto Assalco – Zoomark (2018), nel 2017 il mercato dei prodotti per l'alimentazione dei cani e gatti in Italia ha confermato un trend positivo, con un incremento del fatturato del +3.8% rispetto all'anno precedente e una crescita dei volumi di +2.4% (Figura 3).

Figura 3. Dettaglio delle vendite del pet food in volumi e in valore negli ultimi anni in Italia (tratto da Assalco – Zoomark, 2018).



Gli alimenti per cane e gatto vengono acquistati principalmente in tre diversi canali di vendita: i cosiddetti *grocery*, ovvero ipermercati, supermercati, discount, all'interno dei quali è possibile reperire i prodotti più economici; i petshop tradizionali, in cui è possibile acquistare prodotti di fasce un po' più alte come i mangimi premium e superpremium appartenenti generalmente ad aziende molto note sul mercato italiano ed internazionale; le catene petshop, da intendersi come una struttura organizzata di almeno sette punti vendita di proprietà equivalenti ai petshop tradizionali ovvero specializzati nella vendita di alimenti ed articoli per animali (Assalco – Zoomark, 2018).

Il *grocery* canalizza il 56% del fatturato complessivo del mercato del pet food (circa 1'150 milioni di Euro) e il 74% dei volumi (circa 430'000 tonnellate). La crescita del *grocery* è guidata dai supermercati (circa 9'000 punti vendita) che sviluppano il 30% del fatturato e il 34% dei volumi. Le catene petshop (8% dei volumi e 13% dei valori, per un totale di 47 tonnellate e 260 milioni di euro) sono quelle che mostrano la crescita maggiore con dinamiche del +18% a valore e +17% a volume rispetto all'anno precedente. I petshop tradizionali (circa 5'000 punti vendita), invece, coprono solo il 17% dei volumi (che corrispondono a 99'500 tonnellate circa), ma generano il 31% dei valori (642 milioni di euro di fatturato); ciò significa che il petshop, con poco più della metà dei punti vendita dei soli supermarket (5'000 vs 9'000) fattura mediamente il doppio per punto vendita (128'000 euro/anno contro i 68'500 euro/anno dei supermercati). Le catene petshop, avendo un assortimento più ampio, garantiscono un fatturato per punto vendita di circa 5 volte quello di un petshop tradizionale (Assalco – Zoomark, 2018).

Nel 2017, tutti i segmenti degli alimenti per cani e gatti hanno mostrato un aumento delle vendite (Figura 4).

Figura 4. Dettaglio delle vendite e della variazione del pet food in categorie nell'ultimo anno in Italia (tratto da Assalco – Zoomark, 2018).

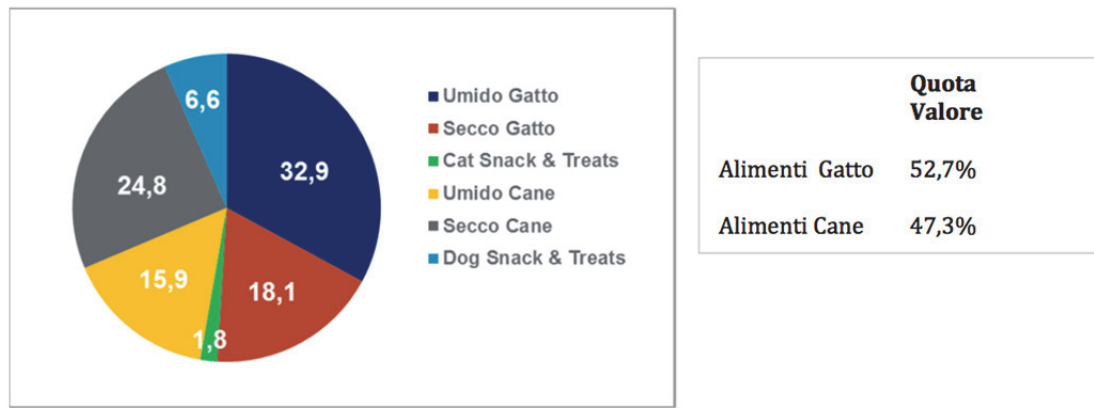
	Vend. Valore (mio Euro)	% Quota Valore	Var %
Umido Gatto	675,1	32,9	2,7
Secco Gatto	370,2	18,1	3,1
Umido Cane	325,8	15,9	3,0
Secco Cane	508,2	24,8	5,3
Snack&Treat (Cane+Gatto)	171,4	8,4	7,0
Tot. Alimenti Cane e Gatto	2.050,7	100,0	3,8
Cibo Altri Animali	15,2		-6,1
Accessori Animali	71,9		-2,0
Cat Litter Total	68,1		1,0

Il segmento degli alimenti umidi si è dimostrato il più cospicuo registrando un miliardo di euro che equivale al 50% di quota sul mercato totale. Nonostante ciò, gli alimenti umidi hanno registrato una crescita a valore inferiore a quella degli alimenti secchi (+2.8% e +4.3%, rispettivamente). Il segmento degli alimenti secchi vale 878 milioni di euro e detiene il 43% di quota, composta per il 25% dal secco cane e per il 18% dal secco gatto (Figura 5). L'alimento maggiormente acquistato per l'alimentazione del gatto è rappresentato dall'umido, che copre circa due terzi del mercato (62% a valore) ed è cresciuto quasi del 3% nel 2017. L'alimento secco per gatto realizza invece il 34% delle vendite ed è cresciuto del 3% (Assalco – Zoomark, 2018).

Sempre secondo il Rapporto Assalco-Zoomark (2018), i proprietari acquistano la maggior parte dei prodotti destinati all'alimentazione dei propri gatti nei Grocery, ed in particolare in supermercati ed ipermercati; ciò fa pensare che i proprietari di gatti tendono a dare meno peso alla qualità del pet food, guardando più all'economicità dei prodotti. Per quanto riguarda invece gli alimenti per cani, al primo posto figura il mangime secco, che realizza il 52% del fatturato, seguito dall'umido con il 34%. La canalizzazione delle vendite dei prodotti per cani è differente da quella dei prodotti per gatti: il 39% viene acquistato nei petshop tradizionali, a dimostrazione del fatto che l'attenzione nei confronti

dell'alimentazione per il cane è maggiore, ed i proprietari tendono a preferire prodotti di qualità superiore rispetto a quelli reperibili nei Grocery (Assalco – Zoomark, 2018).

Figura 5. Dettaglio della distribuzione delle vendite del pet food in categorie nell'ultimo anno in Italia (tratto da Assalco – Zoomark, 2018).



Fonte: IRI – 52 settimane al 31 Dicembre 2017– dati a valore

1.2 Diete alternative

Oltre ai più tradizionali mangimi commerciali secchi e umidi, nell'ultimo decennio il mondo del pet food ha visto lo sviluppo di molteplici filosofie alimentari fra cui la più popolare è rappresentata dalla dieta crudista. Le *raw meat-based diets* (RMBDs) sono diete a base di ingredienti crudi derivati da diverse specie sia di animali domestici (e.g. pollo, tacchino, manzo) che di selvaggina (e.g. cinghiale, anatra). Oltre alla componente muscolare, di questi animali vengono utilizzate anche le interiora e le ossa, o addirittura le carcasse intere. Le vendite di pet food crudo a livello globale sono cresciute drasticamente negli ultimi anni (in Figura 6 sono riportate quelle negli Stati Uniti) e addirittura è stato stimato che nei Paesi Bassi un proprietario su due somministra regolarmente al proprio cane alimenti crudi (Corbee et al., 2013).

La moda del crudismo si basa sul presupposto che cani e gatti siano animali carnivori e che in natura tenderebbero a cacciare, procurandosi del cibo che verrebbe quindi consumato direttamente crudo. Oltre a questo, c'è la percezione

da parte dei proprietari che la dieta crudista sia nettamente superiore in termini di disponibilità di nutrienti e di salubrità delle materie prime rispetto a un'alimentazione di tipo commerciale. Inoltre, il proprietario si sente più in sintonia con il proprio animale domestico in quanto si può occupare personalmente della sua dieta. Per molti proprietari scegliere una RMBD risulta dunque la scelta ottimale per avere al proprio fianco un cane sano, che sfrutta al massimo la capacità digestiva, che segue i propri istinti e che soddisfa al meglio le esigenze etologiche. Non è raro che, in seguito alla somministrazione di una RMBD, il proprietario noti degli effetti benefici evidenti sull'animale (e.g. il miglioramento della qualità del pelo, una maggiore pulizia dentale e un comportamento più equilibrato), nonostante l'evidenza scientifica incentrata su questo tipo di alimentazione, sui suoi effetti benefici nel lungo periodo e sulla sua effettiva validità sia attualmente molto scarsa. Al contrario, alcuni effetti indesiderati circa la somministrazione di RMBD a cani e gatti sono state ampiamente documentate. Primo fra tutti c'è il rischio da parte dell'animale di consumare regolarmente pasti giornalieri che non sono né completi né bilanciati, poiché la maggior parte delle indicazioni rintracciabili si basano su opinioni di professionisti a vario titolo (non medici veterinari nutrizionisti) e che non sono state revisionate da figure competenti (Freeman et al., 2013). Di conseguenza, la carenza o l'eccesso di determinati nutrienti potrebbero causare nel lungo termine conseguenze sulla salute dell'animale anche gravi, specialmente in soggetti giovani. In secondo luogo, come ampiamente dimostrato in letteratura, la carne cruda può facilmente essere contaminata durante le fasi di macellazione, lavorazione e trasporto. La diffusione di batteri patogeni a partire direttamente dalla manipolazione di carne cruda o attraverso le feci di animali che la consumano è stata inconfutabilmente dimostrata, pertanto rappresenta un rischio concreto sia per la salute animale che per quella umana (Freeman et al., 2013).

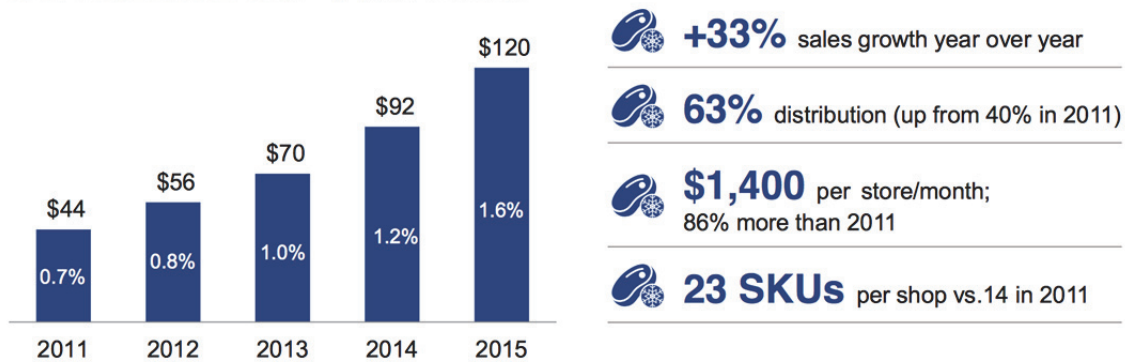
Figura 6. Dettaglio delle vendite e della variazione del pet food crudo negli ultimi anni negli Stati Uniti (tratto da Gfk, 2016b).

Raw frozen/refrigerated pet food trend in the US (excl. vet)



Category remains small despite strong distribution and velocity growth since 2011

RAW FROZEN/REFRIG. – \$ sales in million



© GfK January 20, 2016 | Pet food trends shaping the world

35

1.3 Riferimenti

GfK (2016a). Pet ownership global survey. Available at:

https://www.gfk.com/fileadmin/user_upload/country_one_pager/NL/documents/Global-GfK-survey_Pet-Ownership_2016.pdf (accessed on 25 September 2018)

GfK (2016b). Pet food trends shaping the world. Available at:

<https://pida.memberclicks.net/assets/PILC16presentations/pilc%20lange%20petfood%20trends%20shaping%20the%20world.pdf> (accessed on 25 September 2018)

ASSALCO (2018). Rapporto Assalco – Zoomark 2018: Alimentazione e cura degli animali da compagnia. Available at:

<http://www.assalco.it/index.php?action=shownews&id=1&nid=7461>

FEDIAF (2018). Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs. Available at: <http://www.fediaf.org/self-regulation/nutrition.html>

FEDIAF (2011). Code of good labelling practice for pet food. Available at:

<https://www.pfma.org.uk/assets/docs/Final%20Code%20of%20Good%20Labelling%20Practice%20Oct%202011.pdf> (accessed on 25 September 2018)

Corbee R. J., Breed R. D., Hazewinkel H. A. W. (2013). Feeding practice of dog owners active on internet forums Poster session presented at: 17th European Society of Veterinary and Comparative Nutrition Congress Sep 19-21. Ghent, Belgium, 2013.

1.4 Scopo della ricerca

I proprietari riconoscono oggi il ruolo fondamentale che l'alimentazione gioca nella salute e nel benessere dei propri animali, e una sempre maggiore attenzione viene riposta nella scelta di alimenti di qualità.

I fabbisogni nutrizionali del cane e del gatto sono stati stabiliti grazie agli studi condotti negli ultimi decenni (NRC, 2006), e FEDIAF revisiona ogni anno la letteratura più recente per redigere lo strumento di riferimento per l'industria del settore, ovvero le linee guida nutrizionali che riportano livelli minimi e massimi dei nutrienti essenziali che devono comporre un pet food completo e bilanciato, adatto ad essere consumato da cani e gatti per tutta la vita senza incorrere in carenze o eccessi di nutrienti che possono nuocere alla loro salute. Il rispetto di tali linee guida, tuttavia, rimane un atto volontario dal momento che la legge non impone verifiche circa la formulazione dei prodotti destinati all'alimentazione di animali da compagnia, né impone controlli sul prodotto finito. Analogamente, il regolamento in vigore che stabilisce la corretta etichettatura del pet food (EC 767/2009) non impone notevoli specificazioni, per cui le quantità di nutrienti essenziali che vengono inclusi nei vari prodotti rimangono spesso ignote e il rispetto dei valori indicati non è sottoposto a regolari verifiche.

La validità di un mangime, che sia completo o complementare, dipende in primis dalla qualità delle materie prime e dalla competenza di chi si occupa delle formulazioni, ma talvolta le informazioni riportate nelle etichette sono l'unico strumento che proprietari e Medici Veterinari possiedono per poter giudicare il singolo prodotto.

Nonostante il settore del pet food sia in ampia espansione da molti anni e sia fortemente coinvolto nel mantenimento della salute della maggior parte di cani e gatti a livello mondiale, poca attenzione viene attualmente rivolta alla qualità nutrizionale degli alimenti commerciali destinati agli animali da compagnia. La necessità di indagare la qualità del pet food nasce anche dal fatto che esiste un enorme vuoto normativo a riguardo, dal momento che la legge non impone livelli qualitativi minimi standard ai produttori e non prevede controlli di routine sul prodotto finito né tantomeno verifiche circa la veridicità dell'etichettatura. Da un punto di vista nutrizionale, accertarsi che i prodotti reperibili in commercio siano

effettivamente completi e bilanciati come richiesto da FEDIAF significa tutelare la salute di cani e gatti evitando problemi dovuti a carenze o eccessi di nutrienti. Similmente, da un punto di vista commerciale, accertarsi che i prodotti reperibili in commercio effettivamente contengano quanto dichiarato in etichetta significa tutelare i diritti dei consumatori che acquistano tali prodotti e facilitare il lavoro dei veterinari qualora venga interpellata la loro figura al fine di valutare l'adeguatezza dei mangimi che assumono i loro pazienti.

Pertanto, data l'importanza assunta dal pet food nel panorama del mercato globale, il ruolo quotidiano e fondamentale nella promozione e nel mantenimento della salute di cani e gatti, e la scarsa conoscenza della composizione dei prodotti presenti in commercio dovuta a una legislazione limitata e alla conseguente assenza di controlli, gli studi raccolti in questo lavoro si sono proposti di fare luce sulla qualità del pet food mediante la valutazione di parametri oggettivi. Questa tesi si è incentrata su delle analisi effettuate per valutare l'adeguatezza nutrizionale (i.e. amminoacidi, acidi grassi) di pet food completi secchi e complementari, le contaminazioni (i.e. allergeni) di pet food completi secchi e umidi, e il profilo microbiologico (i.e. carica microbiologica totale e specifici batteri patogeni) di pet food crudi.

Capitolo 2

Analisi del profilo amminoacidico di 80 mangimi commerciali secchi per cani e gatti e sua predizione mediante l'utilizzo della spettroscopia del vicino infrarosso (NIRs)

2.1 Abstract

La qualità della proteina è un aspetto importante da considerare quando si determina il valore nutrizionale di un mangime commerciale. Gli amminoacidi essenziali inclusi nei pet food completi devono essere presenti nelle quantità indicate nelle linee guida nutrizionali di FEDIAF (2018) per soddisfare i fabbisogni di cani e gatti. Dal momento che non esiste l'obbligo di riportare il profilo amminoacidico nell'etichetta del pet food, l'obiettivo del presente studio è stato quello di analizzare di 80 mangimi completi secchi per valutare il rispetto delle raccomandazioni FEDIAF e per identificare delle differenze indicative nella composizione di prodotti appartenenti a categorie differenti (i.e. 30 superpremium, S; 26 grocery, G; 11 grain free, GF; 6 vegetariani, V; 7 dietetici, D). Inoltre, è stata predisposta la lettura al vicino infrarosso (NIRs) per valutare l'affidabilità della predizione della composizione amminoacidica degli stessi prodotti. I mangimi selezionati sono stati sottoposti ad analisi centesimale (Reg. CE 152/2009) e NIRs presso il Laboratorio Chimico NIRs/XRF, ad analisi amminoacidica (European Pharmacopoeia 5.0-2.2.56 e CE 152/2009 per il triptofano) presso il Laboratorio LA.CHI. dell'Università degli Studi di Padova (sede di Legnaro), e ad analisi statistica descrittiva e ANOVA. Le analisi hanno rivelato che il 45% dei mangimi analizzati (n=36; 12 P, 9 G, 8 GF, 3 V and 4 D) non rispettava uno o due livelli minimi indicati da FEDIAF. Gli amminoacidi più carenti sono risultati triptofano (n=32; 9 S, 8 G, 8 GF, 4 D e 3 V) e taurina (n=2; 1 S, 2 G e 1 D), ma ulteriori indagini sono necessarie per confermare il primo esito. Nei prodotti per cani, una differenza significativa fra le varie categorie è stata osservata per fenilalanina (p=0.03; contenuto più elevato nei V), mentre una tendenza è stata registrata per arginina e leucina; nei prodotti per gatti l'arginina è stata rilevata in quantità considerevolmente superiori nei GF (p=0.02). La predizione del profilo

amminoacidico mediante tecnica NIRs ha dato risultati variabili a seconda del tipo di amminoacido, dello strumento utilizzato per la lettura e della struttura del mangime (intero vs macinato).

La composizione amminoacidica dei pet food analizzati ha dimostrato una variabilità limitata. Alcuni prodotti possono risultare carenti di amminoacidi essenziali per il cane e per il gatto, indipendentemente dalla tipologia di mangime. La tecnica NIRs non ha dato risultati totalmente soddisfacenti per la predizione del profilo amminoacidico a causa della complessa composizione della matrice pet food.

2.2 Abbreviazioni

CEN	Ceneri
EE	Estratto etereo
EM	Energia metabolizzabile
FG	Fibra grezza
NIR	Spettroscopia nel vicino infrarosso
PAPs	Proteine animali processate
PG	Proteina grezza
SS	Sostanza secca

2.3 Introduzione

2.3.1 Le proteine: funzioni e struttura

Le proteine sono componenti essenziali di tutte le cellule viventi, non solo per il loro ruolo strutturale nelle pareti, ma anche per le importanti funzioni che svolgono, tra cui la regolazione del metabolismo sotto forma di enzimi e di ormoni. Esse sono un elemento fondamentale per la crescita e la riparazione dei tessuti, ma all'occorrenza possono anche divenire una fonte di energia (Hand et al., 2010). Difatti, le proteine strutturali possono essere considerate un deposito di aminoacidi, specialmente quelle presenti nei muscoli, quelle nel fegato e le albumine sieriche. Le proteine dei muscoli sono considerate la più grande riserva di aminoacidi nel momento del bisogno.

Gli animali hanno bisogno delle proteine per ottenere gli aminoacidi specifici che i loro tessuti non sono in grado di sintetizzare, ovvero gli aminoacidi cosiddetti "essenziali". Gli aminoacidi essenziali non possono essere sintetizzati in quantità sufficienti, per cui devono essere forniti attraverso la dieta. Gli aminoacidi non essenziali sono componenti altrettanto importanti delle proteine corporee, ma che possono essere sintetizzate a partire da altri aminoacidi o da altre fonti di azoto dietetico. Nel cane e nel gatto sono stati identificati rispettivamente 10 ed 11 aminoacidi essenziali: Arginina, Istidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano, Valina e Taurina nel gatto. È fondamentale specificare che la carenza proteica può risultare da un insufficiente apporto attraverso la dieta, ma anche dalla carenza di singoli aminoacidi, poiché la carenza anche di un solo aminoacido essenziale risulta in anoressia e bilancio azotato negativo. I segni di una carenza proteica includono: scarso accrescimento, perdita di peso, perdita di massa muscolare, pelo fragile e opaco, aumentata suscettibilità alle malattie, edema, e nelle condizioni più estreme morte. L'eccesso di proteina dietetica rispetto ai fabbisogni, al contrario, non viene depositato come tessuto muscolare ma viene convertito in grasso e stoccato come tessuto adiposo.

Gli aminoacidi assimilati vengono riassemblati nel fegato e in altri tessuti per formare delle nuove proteine. In seguito al loro assorbimento, gli aminoacidi possono andare incontro a tre “destini”: sintesi di proteine tissutali, specialmente nei muscoli e nel fegato; sintesi di enzimi, albumine, ormoni ed altri componenti contenenti azoto (e.g. nucleotidi, creatinina, ossido nitrico e neurotrasmettitori); deaminazione ed uso dei rimanenti scheletri carboniosi per ottenere energia. Gli aminoacidi si suddividono infatti in glucogenici o chetogenici: quelli glucogenici possono essere convertiti in glucosio attraverso il piruvato, mentre quelli chetogenici possono essere convertiti ad acetil-CoA o a corpi chetonici. Una parte degli aminoacidi endogeni va costantemente incontro a catabolismo, e questo comporta una perdita giornaliera fisiologica di azoto (Hand et al., 2010).

Le proteine sono normalmente necessarie nella fase di mantenimento per ripristinare quelle perse durante il naturale *turnover* delle superfici epiteliali, dei peli e degli altri tessuti corporei, così come tramite le secrezioni. Le proteine sono maggiormente necessarie durante i periodi di crescita, gravidanza, lattazione e convalescenza, per riparare i tessuti danneggiati: durante questi stadi critici la qualità (i.e. la composizione amminoacidica) e la digeribilità sono di particolare importanza. Le proteine di origine animale generalmente possiedono un profilo amminoacidico più bilanciato, con più aminoacidi essenziali e una digeribilità migliore rispetto alle proteine vegetali.

Quando si parla di qualità delle proteine si fa riferimento all'efficienza attraverso cui gli aminoacidi provenienti dal cibo vengono convertiti in tessuti. Tale efficienza dipende dalla fonte proteica, dalla concentrazione di aminoacidi essenziali e dalla loro disponibilità. La sintesi proteica, infatti, può essere limitata quando uno o più aminoacidi non sono presenti o non sono presenti in quantità sufficienti (Hand et al., 2010). Le proteine che apportano una proporzione ottimale di tutti gli aminoacidi essenziali sono definite proteine “di alta qualità”, viceversa quando le proteine non apportano tutti gli aminoacidi essenziali vengono definite “di bassa qualità”. Anche la digeribilità contribuisce alla qualità delle proteine e può essere ridotta dall'elevato contenuto di ceneri, da un ingente tempo di lavorazione e dalle alte temperature; fattori secondari che possono influenzare la disponibilità delle

proteine sono il contenuto nell'alimento di fibra, tannini, pectine e oligosaccaridi. Le proteine di origine vegetale hanno generalmente una digeribilità inferiore rispetto a quelle di origine animale, a causa della bassa digeribilità delle fibre e dei carboidrati presenti nelle piante (Hand et al., 2010).

2.3.2 Fabbisogni minimi proteici ed aminoacidici nel cane e nel gatto

Le linee guida nutrizionali di FEDIAF definiscono i quantitativi minimi di proteine e di aminoacidi che devono essere contenuti in ogni mangime presente sul mercato. Tali valori, espressi in grammi per 100 g di sostanza secca (calcolati su un mangime di riferimento che apporta 400 kcal di energia metabolizzabile), sono riportati in [Figura 1](#) per il cane e in [Figura 2](#) per il gatto. I livelli proteici di FEDIAF, sia per cani che per gatti, sono basati sulle raccomandazioni NRC (2006), ma sono stati adeguati tenendo conto di una probabile minore digeribilità della proteina utilizzata (e.g. per la selezione della materia prima o per procedimenti industriali) e di eventuali assunzioni ridotte di energia (e.g. nel caso di cani anziani o sovrappeso).

Figura 1. Livelli minimi raccomandati di proteine e di aminoacidi essenziali nel cane. (Fonte: Nutritional guidelines FEDIAF, 2018). Unit per 100 g dry matter

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 2. Livelli minimi raccomandati di proteine e di aminoacidi essenziali nel gatto. (Fonte: Nutritional guidelines FEDIAF, 2017).

Nutrient	UNIT	Minimum Recommended			Maximum
		Adult based on MER of		Growth & Reproduction	(L) = EU legal limit
		75 kcal/kg ^{0.67}	100 kcal/kg ^{0.67}		(N) = nutritional
Protein*	g	33.30	25.00	28.00/30.00	-
Arginine*	g	1.30	1.00	1.07/1.11	Growth: 3.50 (N)
Histidine	g	0.35	0.26	0.33	-
Isoleucine	g	0.57	0.43	0.54	-
Leucine	g	1.36	1.02	1.28	-
Lysine*	g	0.45	0.34	0.85	-
Methionine*	g	0.23	0.17	0.44	Growth: 1.30 (N)
Methionine + cystine*	g	0.45	0.34	0.88	-
Phenylalanine	g	0.53	0.40	0.50	-
Phenylalanine + tyrosine*	g	2.04	1.53	1.91	-
Threonine	g	0.69	0.52	0.65	-
Tryptophan*	g	0.17	0.13	0.16	Growth: 1.70 (N)
Valine	g	0.68	0.51	0.64	-
Taurine (canned pet food)*	g	0.27	0.20	0.25	-
Taurine (dry pet food)*	g	0.13	0.10	0.10	-

2.3.3 Peculiarità nel gatto nel metabolismo proteico

La gluconeogenesi è un processo metabolico mediante il quale, nel caso di una carenza di glucosio ematico, un composto non glucidico viene convertito in glucosio seguendo fondamentalmente le tappe inverse della glicolisi. La gluconeogenesi permette dunque di produrre glucosio a partire da precursori non saccaridici quali piruvato, lattato, glicerolo, etanolo e amminoacidi. Questo processo metabolico è molto importante nel cane ma soprattutto nel gatto, poiché quest'ultimo è un carnivoro stretto ("obbligato") e ottiene la maggior parte dell'energia necessaria per la sua sopravvivenza attraverso l'assunzione di proteine di origine animale.

Il fabbisogno proteico di un gatto adulto rispetto a quello di un'altra specie animale non carnivora è di circa due o tre volte più elevata (Morris, 2002), e questa esigenza è dovuta ad un'elevata richiesta di azoto. Gli onnivori alimentati con diete a basso contenuto proteico sono in grado di conservare gli amminoacidi endogeni riducendo l'attività dell'enzima aminotransferasi coinvolto nel primo step del catabolismo; in un famoso studio di Rogers e colleghi condotto nel 1977, invece, in un gruppo di gatti alimentato con una dieta ipoproteica (proteina grezza: 170 g/kg) l'attività dell'aminotransferasi non si adattava al ridotto *intake* proteico, risultando pertanto simile a quella osservata nel gruppo controllo di gatti che assumeva una dieta con 700 g/kg di proteina grezza. Avendo dunque una scarsa capacità di regolare gli enzimi, il gatto così come gli altri carnivori stretti hanno l'immediata capacità di catabolizzare ed usare gli amminoacidi come fonte di energia.

Due amminoacidi in particolare giocano un ruolo chiave nella nutrizione e nella salute del gatto: l'arginina e la taurina. Per molti mammiferi l'arginina non è un nutriente essenziale poiché la sintesi endogena ne compensa la necessità, ma per cani e gatti di tutte le età è un amminoacido che deve essere fornito con la dieta. L'arginina è un intermedio chiave nel ciclo dell'urea, ovvero la via metabolica principale per detossificare i rifiuti azotati come l'ammoniaca. Per le specie differenti da cane e gatto, l'arginina viene prodotta attraverso l'azione combinata di intestino e reni: il glutammato e la glutammina vengono metabolizzati a livello della mucosa intestinale portando alla produzione di citrullina (gli intermedi di tale processo sono la pirrolina-5-decarbossilasi, sintetizzata nei mitocondri dal glutammato mediante l'enzima pirrolina-5-carbossilato-sintasi e poi convertita in ornitina grazie all'azione dell'enzima ornitina-aminotransferasi); la citrullina prodotta nell'intestino viene poi convertita ad arginina a livello renale mediante l'enzima arginasi. Nel gatto l'attività degli enzimi pirrolina-5-carbossilato-sintasi e ornitina-aminotransferasi è molto bassa e ciò comporta una produzione minima di citrullina a livello intestinale, rendendo il gatto totalmente dipendente dall'*intake* di arginina con il cibo. Molte proteine contengono una quantità naturalmente sufficiente di arginina per prevenire l'iperammoniemia nei gatti (Morris, 2002).

La taurina è un amminoacido che non va a costituire i polipeptidi, ma rimane presente come amminoacido libero nei tessuti animali e si concentra in cervello, retina, muscolo scheletrico e fegato. Cani e gatti usano necessariamente la taurina per coniugare gli acidi biliari che servono per l'assorbimento dei grassi, mentre molti altri animali possono utilizzare anche la glicina (Morris, 2002). I mammiferi sintetizzano la taurina a partire dall'ossidazione della cisteina, ma l'attività di due enzimi in questo processo, ovvero cisteina-diossigenasi e acido cisteinsulfonico-decarbossilasi, è limitata nei gatti. La ridotta attività enzimatica del processo di sintesi limita quindi la produzione endogena di taurina, e la combinazione con la bassa affinità dell'enzima che coniuga gli acidi biliari con la glicina porta alla deplezione del pool di taurina nell'organismo felino. Inoltre, secondo Morris e colleghi (1994), le diete che contengono un'elevata percentuale di proteine indigeribili aumentano la secrezione di colecistochinina e facilitano la crescita di una flora microbica che degrada la taurina. Quindi, il fabbisogno dietetico di taurina

dipende non dagli ingredienti della dieta, ma anche dal metodo attraverso il quale vengono processati, e questo è un fattore importante da considerare quando si formulano delle diete commerciali per gatti: il cibo in scatola ha bisogno di circa il doppio della concentrazione di taurina rispetto alle diete estruse per poter garantire il mantenimento di una concentrazione di taurina normale nel plasma. La taurina è abbondantemente presente nel tessuto animale, ma può diventare limitante nelle diete a cui sono state aggiunte quantità significative di componenti vegetali e nelle diete in cui la tecnica di produzione ha portato alla formazione di prodotti di Maillard (i.e. unione di zuccheri e amminoacidi che rende questi ultimi indisponibili all'assorbimento), nonché nelle diete la cui composizione favorisce la degradazione microbica di taurina nell'intestino. La carenza dietetica di taurina nel gatto può causare degenerazione retinica, compromissione della riproduzione, difetti nello sviluppo dei gattini e cardiomiopatia dilatativa (Morris, 2002).

2.3.4 La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR)

La spettroscopia nel vicino infrarosso (*near infrared spectroscopy*, NIR) è una tecnica analitica veloce, non distruttiva ed economica che permette di valutare determinate proprietà del campione in esame. Le tecniche NIRs hanno acquisito una notevole importanza nelle applicazioni di controllo della qualità dei prodotti nei vari processi delle industrie agroalimentari e zootecniche; esse possono riguardare ad esempio la stima del valore nutritivo di alimenti (sia materie prime che alimenti completi) e la qualità dei prodotti finali (prodotti freschi e anche trasformati). Il NIR è impiegato anche come tecnica analitica di discriminazione allo scopo di identificare l'origine di un prodotto o la tipologia di un processo produttivo (Berzaghi & Riovanto, 2009). La tecnica NIR si basa sulla misurazione della capacità della materia di assorbire, trasmettere o riflettere le radiazioni elettromagnetiche, correlando tali informazioni con parametri fisici, chimici, reologici e talvolta sensoriali. In particolare, essa considera la capacità di assorbimento selettivo della radiazione elettromagnetica da parte di alcuni legami tipici dei gruppi funzionali presenti nella materia organica (i.e. $-CH$, $-OH$, $-NH$). Altri tipi di vibrazione molecolare sono dovute ai legami $S-H$, $C=O$ e $C=C$.

La somma di queste proprietà assorbenti, combinate con quelle di dispersione della radiazione (*radiation - scattering*) del campione, determina la *diffusa riflettanza*. La diffusa riflettanza dell'infrarosso contiene informazioni relative alla composizione chimica della materia che possono essere estratte elaborando in maniera adeguata i dati di riflettanza (Bokobza, 1998). La combinazione delle bande spettrali sovrapposte si sviluppa per interazione di due o più vibrazioni aventi luogo simultaneamente e la frequenza risultante sarà pari alla somma dei multipli delle frequenze fondamentali interessate (Osborne, 2000). Si crea in questo modo uno spettro di assorbimento, ovvero una specie di "impronta digitale" caratteristica del campione in esame. Con metodi di analisi chemometrica è poi possibile confrontare gli spettri di un dataset di calibrazione con le analisi ottenute con metodi tradizionali, al fine di calibrare gli strumenti NIRs.

Il processo di calibrazione dello spettrometro NIR può essere suddiviso in quattro fasi successive:

- 1) Raccolta dati;
- 2) Preparazione dei set di dati di calibrazione e validazione;
- 3) Sviluppo di un modello di calibrazione;
- 4) Convalida del modello.

Prima di costruire le curve di taratura, bisogna dunque procedere alla scelta del set di calibrazione che deve essere rappresentativo della popolazione (e.g. alimenti, materie prime, mangimi) in esame, poiché si vuole ottenere una distribuzione omogenea dei campioni di calibrazione che giustifichi il più possibile la variabilità del prodotto presente in natura o in commercio. I costi di analisi sono generalmente un fattore che frena l'ampliamento del dataset di calibrazione, per cui anche la scelta del dataset diventa spesso il fattore limitante la robustezza della calibrazione. L'obiettivo di questa prima fase è pertanto quello di raccogliere e organizzare la composizione chimica e i dati ottici di tutti i campioni disponibili. I dati di composizione sono ottenuti da metodi chimici di riferimento, mentre i dati ottici (i.e. valori di *riflettanza* o *trasmittanza*) sono ottenuti attraverso la scansione dei campioni con lo spettrometro NIR, il quale richiede la calibrazione; i risultati di entrambe le analisi sono organizzati poi in una tabella. L'importanza della qualità delle analisi di riferimento non va sottovalutata, in quanto da esse dipende

l'accuratezza della calibrazione; pertanto è necessario assicurarsi che i dati di riferimento contengano l'errore più basso possibile (Kovalenko, 2005). Le fasi successive di preparazione, calibrazione e validazione delle calibrazioni sono generalmente gestite da personale specializzato e con l'impiego di software dedicati. Le principali tecniche di calibrazione sono:

- Partial Least Square (PLS);
- Modified Partial Least Square (MPLS);
- Principal Component Regression (PCR).

Alcune operazioni preliminari alla calibrazione prevedono l'applicazione di pretrattamenti agli spettri (Rinnan et al., 2009), quali:

- Calcolo della derivata (di vario ordine);
- Allisciamento (*smoothing*);
- Multiplicative Scatter Correction (MSC);
- Standard Normal Variate (SNV) and Detrending.

Tali pretrattamenti servono per ridurre i fenomeni di *light scattering* delle particelle che provocano variazioni incontrollabili su ciascuno spettro, anche quando si rimisura lo stesso campione. Il grado di dispersione della luce dipende dalla lunghezza d'onda (i.e. regioni dello spettro con lunghezze d'onda più lunga sono maggiormente soggette a questo fenomeno), perciò la dispersione non è un fenomeno uniforme sullo spettro. Per rimediare alla presenza di aberrazioni nei dati, esistono degli algoritmi utilizzabili prima di applicare il modello.

La regione del vicino infrarosso è generalmente definita tra 700 nm e 3'000 nm; comunque la maggior parte delle analisi quantitative sono ottenute nella regione compresa tra 1'200 nm e 2'500 nm. Attualmente si possono trovare tre tipi di strumenti in commercio:

- Monocromatori;
- Diode Array;
- Strumenti a filtri.

I monocromatori sono usati per misurare l'intero spettro VIS-NIR e sono impiegati in riflettanza e in trasmittanza. L'utilizzo di batterie di diodi (*diode array*) è tipicamente ristretto tra i 400-1700 nm; il vantaggio di questo tipo di strumento risiede nella velocità di esecuzione delle scansioni, infatti sono utilizzati nei casi di

campioni in movimento ad alta velocità. Gli strumenti a filtri sono i più semplici e permettono applicazioni specifiche ad alcuni campi.

Infine, i detector impiegati in queste applicazioni sono:

- Detector al silicone (400-1'100 nm);
- Indium Gallium Arsenide (800-1'700 nm);
- Lead sulphite (1'100-2'500 nm).

2.3.5. Obiettivo dello studio

Per l'alimentazione del cane e del gatto esistono in commercio numerosi mangimi di molteplici marche, tipologie e qualità formulati per rispondere alle più svariate richieste dei proprietari. Oltre ai mangimi tradizionali di mantenimento, infatti, negli ultimi 10 anni sono comparsi sul mercato crocchette senza cereali per soddisfare una maggiore richiesta di naturalità, così come prodotti vegetariani o vegani per i proprietari che hanno adottato questa tendenza alimentare. Inoltre, è una pratica comune l'acquisto di prodotti molto economici reperibili presso i *grocery*, le cui materie prime sono probabilmente di minore qualità rispetto a prodotti *superpremium* acquistabili presso negozi specializzati.

Il Regolamento CE 767/2009 prevede l'obbligo di riportare nell'etichetta dei mangimi per animali da compagnia la percentuale di proteina greggia, ma non fornisce indicazioni circa il profilo amminoacidico delle proteine utilizzate. È altresì risaputo che cani e gatti hanno fabbisogni minimi di aminoacidi essenziali, per cui tali nutrienti devono essere presenti in opportune quantità in tutti gli alimenti commerciali.

Sulla base di tali presupposti, questo studio si è posto tre obiettivi principali: il primo, indagare il profilo amminoacidico di 80 pet food di differenti tipologie e qualità, per valutare se rispettano le indicazioni minime definite da FEDIAF; il secondo, valutare se esistono delle differenze nel profilo amminoacidico tra diverse categorie di mangimi; il terzo, comprendere se la tecnica NIR è in grado di predire in maniera affidabile la composizione amminoacidica della crocchetta, sia in forma intera che macinata, utilizzando due strumenti presenti presso il Laboratorio Chimico NIRs-XRF del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute dell'Università degli studi di Padova (sede a Legnaro).

2.4 Materiali e Metodi

2.4.1 Raccolta prodotti e suddivisione in categorie

Per questo progetto sono stati acquistati 80 pet food secchi, di cui 28 destinati all'alimentazione del gatto e 52 destinati all'alimentazione del cane. Tali prodotti sono stati reperiti in differenti punti vendita, ovvero supermercati, petshop e negozi online.

Per ottenere un pool di campioni più vario possibile, sono stati selezionati mangimi con delle caratteristiche che li hanno fatti rientrare nelle seguenti cinque categorie:

- Superpremium (n=30): prodotti della fascia di qualità superiore appartenenti a marchi noti sul mercato italiano ed internazionale;
- Grocery (n=26): prodotti di medio-bassa qualità reperibili in supermercati, ipermercati e discount;
- Vegetariani (n=6): prodotti caratterizzati dall'assenza di materie prime di origine animale;
- Grain Free (n=11): prodotti non contenenti cereali;
- Dietetici (n=7): prodotti appartenenti ad aziende note sul mercato italiano ed internazionale, rivolti al sostegno di varie patologie; in quest'ultima categoria rientrano anche gli idrolisati e i monoproteici.

2.4.2 Analisi centesimale e amminoacidica

Per la preparazione dei campioni sono stati prelevati 100 g di prodotto da ognuno degli 80 pet food. Come definito dal Regolamento CE 152/2009, ogni campione è stato macinato utilizzando un mulino a coltelli Retsch GM200 (costruito in materiale non assorbente l'umidità) per 20 secondi a 4000 giri per ottenere una polvere omogenea e fine, facendo attenzione che il campione non si scaldasse.

Presso il Laboratorio Chimico NIRs-XRF del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute dell'Università degli studi di Padova (sede a Legnaro), i pet food macinati sono stati sottoposti all'analisi centesimale (sostanza secca, SS; proteina grezza, PG; estratto etereo, EE; fibra grezza, FG; ceneri, CEN).

Il contenuto di SS è stato determinato mediante essiccazione in forno per 24 ore a 105°C.

La PG (Regolamento CE 152/2009 – Allegato III, Metodo C) è stata determinata a partire dal contenuto di azoto, dosato secondo il metodo di Kjeldahl e calcolato usando un fattore di conversione dell'azoto pari a 6.25. Il campione è stato mineralizzato in acido solforico in presenza di un catalizzatore. La soluzione acida è stata alcalinizzata con una soluzione d'idrossido di sodio. L'ammoniaca è stata isolata per distillazione e raccolta in una quantità determinata di acido solforico, il cui eccesso è stato titolato con una soluzione standard d'idrossido di sodio.

L'EE è stato determinato sempre seguendo quanto definito dal Regolamento CE 152/2009 (Allegato III Metodo H, procedimento B): il campione è stato trattato a caldo con acido cloridrico, la miscela è stata raffreddata e filtrata e, dopo essere stato lavato ed essiccato, il residuo è stato estratto tramite l'estrazione di Soxhlet usando l'etere del petrolio. Il solvente è stato eliminato per distillazione e il residuo è stato essiccato e pesato.

La FG (Regolamento CE 152/2009 – Allegato III, Metodo I) è stata determinata utilizzando il metodo Weende, procedendo prima con la sgrassatura del campione, successivamente è stato fatto un trattamento con soluzioni bollenti di acido solforico e di idrossido di potassio a concentrazioni determinate. Il residuo è stato separato per filtrazione su vetro sinterizzato, lavato, essiccato, pesato e incenerito a 475-500° C. La perdita di peso conseguente all'incenerimento corrisponde alla cellulosa grezza della quantità di prodotto sottoposta all'analisi.

Il contenuto di CEN è stato misurato in modo gravimetrico dopo la combustione in forno a 550°C fino a che è stata ottenuta una cenere bianca, grigia chiara o rossiccia, e il successivo raffreddamento a temperatura ambiente (Regolamento CE 152/2009 - Allegato III, Metodo A).

L'analisi degli aminoacidi è stata effettuata presso il Laboratorio LA.CHI. del Dipartimento DAFNAE (Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente) dell'Università degli Studi di Padova (sede Legnaro).

L'analisi degli aminoacidi è stata svolta rispettando tre importanti fasi:

- Idrolisi dei campioni;

- Derivatizzazione pre-colonna degli aminoacidi;
- Cromatografia liquida.

Prima di essere sottoposti ad ogni procedura tutti gli 80 campioni macinati sono stati sgrassati in maniera tale da ridurre il contenuto lipidico ed evitare interferenze strumentali.

Per quanto riguarda la fase di idrolisi, in base alla eventuale degradazione dell'aminoacido da valutare, è stato necessario preparare il campione in maniera specifica:

- a) Idrolisi acida diretta per i seguenti aminoacidi: lisina, treonina, alanina, arginina, aspartato, glutammato, glicina, istidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina, valina, taurina;
- b) Idrolisi basica per il triptofano;
- c) Ossidazione seguita da idrolisi acida per cistina e metionina (attraverso l'ossidazione la cistina è stata convertita in acido cisteico, la metionina è stata convertita in metionin solfone).

a) Analisi di aminoacidi mediante idrolisi acida:

Da ogni campione sono stati prelevati 0.400 g, quantità stabilita in base al contenuto proteico della matrice, ed è stata eseguita un'idrolisi a caldo con acido cloridrico 6 N. I campioni così preparati sono stati incubati in una stufa ventilata a 110°C per 24 ore. Trascorse le 24 ore le provette sono state tolte dalla stufa e sono state fatte raffreddare a temperatura ambiente. Quindi si è proceduto con la filtrazione dei campioni utilizzando della carta da filtro. Successivamente ogni campione è stato diluito con acqua per ridurre la concentrazione dell'acido. Infine è stata fatta un'ulteriore filtrazione utilizzando dei filtri per siringa in cellulosa rigenerata da 0.20 µm (European Pharmacopoeia 5.0-2.2.56, Amino acid analysis - Protein hydrolysis - Method 1).

b) Analisi di aminoacidi mediante idrolisi basica:

Da ogni campione sono stati prelevati 0.500 g, quantità stabilita in base al contenuto proteico della matrice, ed è stata eseguita idrolisi basica a caldo con 8.4 g di idrossido di bario ottaidrato e 15 ml di acqua. L'idrolisi basica è stata eseguita in stufa a 110°C per 20 ore. Trascorse le 20 ore le provette sono state tolte dalla

stufa e sono state fatte raffreddare a temperatura ambiente. È stato corretto il pH di ogni campione utilizzando HCl in modo tale che si arrivasse, per ognuno, ad un pH di 4.5. Ogni idrolizzato è stato quindi portato a volume con acqua utilizzando un matraccio da 50 ml. Si è proceduto con la filtrazione dei campioni utilizzando della carta da filtro. Successivamente ogni campione è stato diluito con un tampone di diluizione (1:3) in maniera tale da ottenere una concentrazione ideale. Infine, è stata fatta un'ulteriore filtrazione utilizzando dei filtri per siringa in cellulosa rigenerata da 0.20 μm (Regolamento CE 152/2009, Allegato 3 - Punto G: determinazione del triptofano).

c) Analisi di cistina e metionina:

Prima di procedere con l'idrolisi acida è stato necessario ossidare cistina e metionina ad acido cisteico e metionina solfone. Da ogni campione sono stati prelevati 0.400 g, quantità stabilita in base al contenuto proteico della matrice, e si è proceduto con l'ossidazione. L'ossidazione è avvenuta aggiungendo 5 ml di miscela di ossidazione ad ogni campione (miscela di ossidazione: 0.5 ml di perossido di idrogeno al 30%, 4.5 ml di soluzione di acido formico fenolo; la miscela di ossidazione è stata incubata in stufa a 25°C per 1 ora per formare acido performico, quindi è stata fatta raffreddare in acqua gelata per 15 minuti), ed in seguito tutte i campioni sono stati posti all'interno di un refrigeratore a 0°C per 16 ore. Trascorse le 16 ore, per eliminare l'eccesso di reagente dai campioni, sono stati aggiunti 0.840 g di disolfito di sodio. Si è poi potuto procedere con l'idrolisi acida, aggiungendo 20 ml di HCl 6 N a tutti i campioni, i quali sono stati poi incubati in stufa a 103°C per 24 ore. Trascorse le 24 ore le provette sono state tolte dalla stufa e sono state fatte raffreddare a temperatura ambiente. Quindi si è proceduto con la filtrazione dei campioni utilizzando della carta da filtro. Successivamente ogni campione è stato diluito con acqua in maniera tale da diluire l'acido cloridrico ed ottenere una concentrazione ideale. Infine, è stata fatta un'ulteriore filtrazione utilizzando dei filtri per siringa in cellulosa rigenerata da 0.20 μm (European Pharmacopoeia 5.0-2.2.56, Amino acid analysis - Protein hydrolysis - Method 4).

Le fasi di derivatizzazione pre-colonna e di cromatografia liquida sono state svolte allo stesso modo per tutti gli aminoacidi analizzati. Sui campioni idrolizzati è stata eseguita una derivatizzazione pre-colonna utilizzando i reagenti OPA (o-ftalaldeide) e FMOC-Cl (9-fluorenilmetil cloroformato). Successivamente i campioni sono stati sottoposti a separazione cromatografica HPLC a fase inversa. Per la separazione cromatografica è stato utilizzato il sistema cromatografico Agilent 1260 con rivelatore DAD e fluorimetro. L'eluizione è avvenuta su colonna Agilent ZORBAX Eclipse AAA (150 x 4.6 mm, 3.5 µm), termostata a 40° C. È stata utilizzata una modalità separativa in gradiente con fase mobile costituita da una soluzione acquosa di NaH₂PO₄, 40 mM (A) ed una soluzione di acetonitrile : metanolo : acqua, in rapporto 45 : 45 : 10 (v : v : v) (B), con velocità di flusso 2 ml/min. Per l'identificazione degli aminoacidi derivatizzati con OPA è stata utilizzata una lunghezza d'onda di massimo assorbimento di 338 nm, mentre per gli aminoacidi derivatizzati con FMOC è stata utilizzata una lunghezza d'onda di massimo assorbimento di 262 nm. L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante curva di calibrazione costruita utilizzando soluzioni standard di aminoacidi con un range tra 10 e 1'000 pmol/µL. I dati sono stati elaborati mediante il software per cromatografia Agilent OpenLAB (European Pharmacopoeia 5.0-2.2.56, Amino acid analysis - Methodologies of amino acid analysis: general principles - Method 5 and Method 7).

2.4.3 Analisi con tecnica NIRs

Sempre presso il Laboratorio Chimico NIRs-XRF del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute dell'Università degli studi di Padova (sede a Legnaro), gli 80 campioni sono stati sottoposti ad analisi NIRs, utilizzando due modelli di strumenti:

- NIRS™ DS 2500 F (FOSS), strumento da laboratorio;
- PoliSPEC^{NIR} (ITPhotonics), strumento portatile.

Lo strumento NIRS™ DS 2500 F (FOSS) è un monocromatore con range spettrale che va da 800 a 2'500 nm, con un passo di 0.5 nm. Il PoliSPEC^{NIR} (ITPhotonics) è uno spettrofotometro *diode array* raffreddato con sfera integratrice che opera da

902 a 1'680 nm, con un passo di 2 nm. Le scansioni sono state effettuate sia sui mangimi tal quali (i.e. crocchette intere), sia sul prodotto macinato utilizzando entrambi gli strumenti.

Per quanto riguarda le scansioni effettuate con lo strumento portatile PoliSPEC^{NIR} (ITPhotonics), da ognuno degli 80 prodotti è stata prelevata una quantità tale di crocchette da poter riempire un contenitore con le seguenti dimensioni: 22 cm di lunghezza, 15 cm di larghezza, 5 cm di altezza. È stata quindi effettuata la scansione acquisendo gli spettri dall'intera superficie del campione con un tempo di integrazione di 9.8 msec, per un totale di 20 secondi; in questo modo è stata fatta un'analisi completa dell'alimento. Lo stesso procedimento è stato effettuato sui prodotti macinati, utilizzando in questo caso un contenitore di dimensione e volume inferiori, di diametro 9 cm ed altezza di 2 cm. È stata quindi effettuata la scansione acquisendo gli spettri dall'intera superficie del campione con un tempo di integrazione di 9.8 msec, per un totale di 10 secondi. Gli spettri ottenuti da ogni campione sono stati elaborati dal software PoliDATA che li ha salvati sia singolarmente che come media.

Le analisi svolte con lo strumento NIRSTM DS 2500 F (FOSS) sono state svolte prelevando da ognuno degli 80 prodotti una quantità tale di crocchette intere da poter riempire completamente la cella di lettura del macchinario, la quale presentava un diametro di 6.5 cm e un'altezza di 2.5 cm. La scansione completa di ogni prodotto è avvenuta in 30 secondi. Lo stesso procedimento è stato effettuato sul prodotto macinato, sempre utilizzando una quantità tale di prodotto da poter riempire completamente la cella di lettura del macchinario. Gli spettri ottenuti da ogni campione sono stati elaborati dal software WinISI 4 (FOSS Denmark) che li ha salvati sia singolarmente che come media.

Le elaborazioni chemometriche sono state eseguite con l'impiego di software dedicati:

- Per il NIRSTM DS 2500 F (FOSS) è stato usato WinISI 4, utilizzando una calibrazione Modified Partial Least Square sugli spettri pretrattati (derivata prima, gap 4, smooth 4, Standard Normal Variate e Detrending);
- Per il PoliSPEC^{NIR} (ITPhotonics) è stato impiegato SensoLogic Calibration Wizard (SensoLogic GmbH, Germany), utilizzando una calibrazione Partial

Least Square sugli spettri pretrattati (derivata prima, gap 4, smooth 4, Standard Normal Variate e Detrending).

Per valutare le prestazioni delle calibrazioni sono stati impiegati alcuni indicatori quali:

- Coefficiente di determinazione di calibrazione = R^2_{cal} ;
- Errore standard di calibrazione = SE_{cal} ;
- Coefficiente di determinazione di validazione incrociata = R^2_{cv} ;
- Errore standard di validazione incrociata = SE_{cv} .

2.4.4 Elaborazione dati e analisi statistica

Per ogni mangime è stata calcolata l'energia metabolizzabile (EM), utilizzando i dati reperiti in etichetta, secondo la formula Atwater modificato:

$EM = \text{proteina grezza \%tq} * 3,5 + \text{grassi grezzi \%tq} * 8,5 + \text{estrattivi inazotati \%tq} * 3,5.$

Per verificare se i valori ottenuti dall'analisi amminoacidica (espressi sul tal quale) rispettassero i limiti minimi definiti da FEDIAF (espressi in SS su 400 kcal EM/100 g SS) è stata applicata una conversione in SS, e gli stessi valori sono stati rapportati ad una EM di 400 kcal/100 g di SS.

I valori di EM, aminoacidi, PG, CEN e SS sono stati sottoposti ad analisi statistica. La loro distribuzione è stata testata mediante il test di normalità di Shapiro-Wilk: valori di $w \geq 0,90$ sono stati assunti come indicativi di normalità. Le variabili distribuite normalmente sono state sottoposte ad analisi della varianza (ANOVA) mediante procedura GLM di SAS (2006) per confrontare le differenze tra il contenuto amminoacidico dei prodotti suddivisi per specie (cane vs gatto) e per categoria (alta qualità vs grocery vs dietetici vs grain free vs vegetariani). In particolare, per il gatto sono state considerate solo tre categorie (i.e. alta qualità, grocery e grain free), in quanto non si disponeva di prodotti vegetariani per gatti e i prodotti dietetici per gatti erano rappresentati da un solo campione. Le variabili non normalmente distribuite (i.e. taurina, cistina e cistina + metionina) sono state sottoposte ad analisi statistica non parametrica (test di Mann-Whitney nel

confronto su due livelli – effetto specie; test di Kruskal-Wallis nel confronto multiplo – effetto categoria). I valori di $P < 0.05$ sono stati considerati significativi.

I dati relativi al profilo amminoacidico sono stati correlati con il contenuto di PG e CEN per mezzo del coefficiente di correlazione di Pearson (r), considerando come significativi i valori $r > 60\%$.

Infine, separatamente per mangimi canini e felini, è stata svolta un'analisi canonica discriminante (CDA), per individuare gli amminoacidi che maggiormente caratterizzano e discriminano le diverse categorie di prodotti. La procedura individua preliminarmente un pool di variabili significativamente predittive della classificazione rispetto all'effetto della categoria di alimenti, e successivamente un'analisi canonica delle componenti principali individua due fattori latenti prevalenti per le variabili selezionate (Can 1 e Can 2) che spiegano in percentuali diverse il sistema di correlazioni tra le variabili originarie.

2.5 Risultati

2.5.1 Rispetto dei limiti minimi definiti da FEDIAF

Dai risultati ottenuti dall'analisi degli amminoacidi è emerso che 36 prodotti su 80 analizzati (45%) non rispettano i livelli minimi raccomandati da FEDIAF per uno o più amminoacidi essenziali (Tabella 1). In particolare, è risultato che i valori minimi definiti da FEDIAF non sono stati rispettati per i seguenti amminoacidi essenziali:

- Arginina, 2 prodotti: 2 alta qualità per gatti;
- Cistina + Metionina, 2 prodotti: 1 grain free per cani e 1 alta qualità per cani;
- Fenilalanina + Tirosina, 3 prodotti: 1 grain free per gatti e 2 alta qualità per gatti;
- Lisina, 2 prodotti: 1 dietetico per cani e 1 grocery per cani;
- Triptofano, 32 prodotti: 8 alta qualità per cani e 1 alta qualità per gatti, 6 grocery per cani e 2 grocery per gatti, 7 grain free per cani e 1 grain free per gatti, 3 dietetici per cani e 1 dietetico per gatti, 3 vegetariani per cani;
- Valina, 1 prodotto: 1 dietetico per cani;
- (solo per il gatto) Taurina, 4 prodotti: 1 alta qualità per gatti, 2 grocery per gatti e 1 dietetico per gatti.

Tutti i prodotti hanno rispettato i contenuti minimi di Fenilalanina, Leucina, Isoleucina, Istidina, Metionina e Treonina definiti da FEDIAF.

Tabella 1. Numero di pet food, divisi per categorie e per specie, che non hanno rispettato i limiti minimi FEDIAF (AA= amminoacidi; S=superpremium; G=grocery; GF=grain free; V=vegetariani; D=dietetici).

AA	S	G	GF	V	D	Totale
Cane						
Valina	0	0	0	0	1	1
Lisina	0	1	0	0	1	2
Triptofano	8	6	7	3	3	32
Cis + met	1	0	1	0	0	2
Gatto						
Arginina	2	0	0	-	0	2
Triptofano	1	2	1	-	1	5
Taurina	1	2	0	-	1	4

Fen + tir	2	0	1	-	0	3
Totale	15	11	10	3	7	

2.5.2 Profilo amminoacidico dei mangimi

Di seguito sono riportate le statistiche generali descrittive dei risultati dell'analisi amminoacidica per i 52 prodotti per cani (Tabella 2, 4) e per i 28 prodotti per gatti (Tabella 3, 5).

Tabella 2. Proteina grezza (PG), ceneri grezze (CEN), sostanza secca (SS), energia metabolizzabile (EM, espressa in kcal/100g SS) e contenuto amminoacidico dei 52 campioni per cani (media, deviazione standard, valori minimi e valori massimi, quartile inferiore, mediana, quartile superiore). I valori amminoacidici, di PG e CEN sono espressi in g/100 g SS rapportate ad una dieta contenente 400 kcal EM/100g SS.

Variabile	Media	Dev st	Min	Max	Quartile inferiore	Mediana	Quartile superiore
PG	26.71	3.99	14.13	41.02	25.12	26.99	28.49
CEN	7.944	1.850	3.917	11.973	6.719	7.812	9.346
SS	92.95	1.080	91.04	95.43	92.24	92.80	93.80
EM	382.92	21.60	338.19	426.05	364.95	384.77	399.64
aspartato	2.204	0.517	1.219	3.695	1.873	2.150	2.483
glutammato	4.656	1.062	2.325	7.129	4.081	4.570	5.350
serina	1.619	0.429	0.996	3.510	1.363	1.540	1.766
istidina	0.531	0.136	0.268	0.793	0.431	0.551	0.615
glicina	1.879	0.746	0.446	3.888	1.395	1.818	2.320
treonina	1.141	0.270	0.801	2.208	0.962	1.088	1.218
arginina	1.556	0.419	0.794	3.080	1.280	1.547	1.860
alanina	1.730	0.365	1.043	2.759	1.481	1.719	1.944
tirosina	0.592	0.243	0.025	1.246	0.432	0.596	0.732
valina	1.077	0.242	0.550	1.856	0.928	1.064	1.222
fenilalanina	1.033	0.228	0.547	1.581	0.855	1.037	1.148
isoleucina	0.816	0.183	0.551	1.465	0.681	0.773	0.900
leucina	1.892	0.426	1.171	3.479	1.612	1.791	2.111
lisina	1.420	0.732	0.114	3.401	0.899	1.184	2.124
prolina	1.896	0.533	0.636	3.566	1.674	1.914	2.215
triptofano	0.170	0.057	0.059	0.281	0.118	0.166	0.215
cistina	0.362	0.103	0.168	0.630	0.295	0.358	0.410
metionina	0.696	0.163	0.423	1.117	0.586	0.665	0.743
taurina	0.083	0.041	0.017	0.221	0.051	0.079	0.106
cis + met	1.057	0.236	0.663	1.747	0.885	1.020	1.130
fen + tir	1.624	0.358	0.915	2.570	1.360	1.628	1.804

Tabella 3. Proteina grezza (PG), ceneri grezze (CEN), sostanza secca (SS), energia metabolizzabile (EM, espressa in kcal/100g SS) e contenuto amminoacidico dei 52 campioni per gatti (media, deviazione standard, valori minimi e valori massimi, quartile inferiore, mediana, quartile superiore). I valori amminoacidici, di PG e CEN sono espressi in g/100 g SS rapportate ad una dieta contenente 400 kcal EM/100g SS.

Variabile	Media	Dev st	Min	Max	Quartile inferiore	Mediana	Quartile superiore
PG	34.91	2.90	29.97	41.05	34.04	35.07	36.48
CEN	8.196	1.950	5.293	13.674	6.876	7.641	9.714
SS	93.57	1.11	91.51	96.10	92.67	93.55	94.22
EM	382.52	25.30	341.43	439.74	362.22	379.87	400.43
aspartato	2.701	0.530	1.320	4.181	2.435	2.718	3.000
glutammato	6.076	1.244	2.906	8.296	5.625	6.309	6.685
serina	2.139	0.534	1.481	3.784	1.761	1.922	2.415
istidina	0.636	0.159	0.341	0.958	0.533	0.633	0.766
glicina	2.424	0.794	0.929	4.243	1.886	2.338	2.843
treonina	1.607	0.358	1.048	2.171	1.300	1.627	1.902
arginina	2.013	0.528	0.821	2.900	1.678	2.022	2.406
alanina	2.366	0.396	1.479	3.145	2.075	2.405	2.599
tirosina	0.789	0.361	0.030	1.469	0.542	0.787	1.000
valina	1.359	0.297	0.755	2.008	1.203	1.284	1.504
fenilalanina	1.332	0.259	0.862	1.914	1.178	1.307	1.482
isoleucina	1.167	0.268	0.745	1.949	1.003	1.105	1.354
leucina	2.549	0.571	1.592	4.293	2.111	2.563	2.839
lisina	1.945	0.758	0.621	3.315	1.309	1.911	2.603
prolina	2.520	0.464	1.779	3.757	2.283	2.518	2.705
triptofano	0.200	0.067	0.078	0.305	0.151	0.201	0.259
cistina	0.514	0.311	0.267	1.716	0.328	0.433	0.597
metionina	0.835	0.150	0.644	1.167	0.726	0.804	0.928
taurina	0.177	0.101	0.065	0.550	0.106	0.154	0.221
cis + met	1.349	0.394	0.951	2.883	1.079	1.281	1.463
fen + tir	2.121	0.469	1.338	3.384	1.782	2.153	2.401

Tabella 4. Analisi della varianza (ANOVA) della sostanza secca (SS), della proteina grezza (PG), delle ceneri grezze (CEN) e degli aminoacidi misurati nei prodotti per cani, suddivisi nelle 5 categorie (LSMEANS \pm Errore Standard oppure Mediana (Min-Max); EAA = aminoacidi essenziali; NEAA = aminoacidi non essenziali). I valori aminoacidici, di PG e CEN sono espressi in g/100 g SS rapportate ad una dieta contenente 400 kcal EM/100g SS (S=superpremium; G=grocery; GF=grain free; V=vegetariani; D=dietetici).

Variabili	S (n=18)	D (n=6)	GF (n=9)	G (n=13)	V (n=6)	P
SS	93.15 \pm 0.23	92.48 \pm 0.41	93.51 \pm 0.33	92.27 \pm 0.28	93.50 \pm 0.41	0.02
PG	27.31 \pm 0.90	23.15 \pm 1.55	28.83 \pm 1.27	26.64 \pm 1.05	25.43 \pm 1.55	0.07
CEN	6.91 \pm 0.34 ^b	6.13 \pm 0.59 ^b	9.00 \pm 0.48 ^a	9.43 \pm 0.40 ^a	8.06 \pm 0.59 ^{ab}	< 0.0001
EAA						
Arginina	1.49 \pm 0.09	1.33 \pm 0.16	1.92 \pm 0.13	1.51 \pm 0.11	1.56 \pm 0.16	0.05*
Istidina	0.50 \pm 0.03	0.51 \pm 0.05	0.60 \pm 0.04	0.49 \pm 0.04	0.64 \pm 0.05	0.06
Isoleucina	0.84 \pm 0.04	0.86 \pm 0.07	0.81 \pm 0.06	0.73 \pm 0.05	0.89 \pm 0.07	0.35
Leucina	2.05 \pm 0.09	1.68 \pm 0.16	1.86 \pm 0.13	1.67 \pm 0.11	2.18 \pm 0.16	0.03*
Lisina	1.44 \pm 0.17	1.91 \pm 0.30	1.40 \pm 0.25	1.27 \pm 0.20	1.22 \pm 0.30	0.46
Metionina	0.69 \pm 0.04	0.77 \pm 0.07	0.63 \pm 0.05	0.67 \pm 0.04	0.80 \pm 0.07	0.24
Fenilalanina	1.06 \pm 0.05 ^{ab}	0.95 \pm 0.09 ^{ab}	1.06 \pm 0.07 ^{ab}	0.92 \pm 0.06 ^b	1.25 \pm 0.09 ^a	0.03
Triptofano	0.17 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02	0.94
Treonina	1.16 \pm 0.07	1.08 \pm 0.11	1.22 \pm 0.09	1.13 \pm 0.08	1.05 \pm 0.11	0.78
Valina	1.11 \pm 0.06	0.98 \pm 0.098	1.20 \pm 0.08	1.00 \pm 0.07	1.08 \pm 0.10	0.33
Cist+ met	1.033 (0.663-1.531)	0.962 (0.906-1.383)	0.870 (0.727-1.537)	1.012 (0.848-1.480)	1.188 (0.951-1.747)	0.20
Fen + tir	1.65 \pm 0.08	1.35 \pm 0.14	1.67 \pm 0.11	1.55 \pm 0.10	1.91 \pm 0.14	0.08
NEAA						
Alanina	1.83 \pm 0.08	1.54 \pm 0.14	1.86 \pm 0.12	1.72 \pm 0.10	1.47 \pm 0.14	0.14
Aspartato	2.11 \pm 0.10 ^{bc}	2.16 \pm 0.18 ^{abc}	2.70 \pm 0.15 ^a	1.86 \pm 0.122 ^c	2.52 \pm 0.18 ^{ab}	0.001
Cistina	0.378 (0.197-0.538)	0.270 (0.168-0.375)	0.311 (0.200-0.524)	0.378 (0.239-0.584)	0.375 (0.336-0.630)	0.06
Glicina	1.85 \pm 0.16 ^{ab}	1.46 \pm 0.27 ^{ab}	2.47 \pm 0.22 ^a	2.06 \pm 0.18 ^{ab}	1.12 \pm 0.27 ^b	0.003
Glutamato	4.58 \pm 0.23 ^{ab}	3.78 \pm 0.39 ^b	4.26 \pm 0.32 ^b	4.91 \pm 0.26 ^{ab}	5.80 \pm 0.39 ^a	0.007
Prolina	2.02 \pm 0.116 ^a	1.28 \pm 0.201 ^b	2.01 \pm 0.16 ^{ab}	2.02 \pm 0.14 ^a	1.71 \pm 0.20 ^{ab}	0.02
Serina	1.67 \pm 0.10	1.37 \pm 0.178	1.64 \pm 0.15	1.62 \pm 0.121	1.69 \pm 0.178	0.65
Taurina	0.096 (0.041-0.152)	0.115 (0.053-0.221)	0.060 (0.050-0.112)	0.048 (0.017-0.115)	0.051 (0.031-0.179)	0.01
Tirosina	0.59 \pm 0.06	0.41 \pm 0.10	0.61 \pm 0.08	0.63 \pm 0.07	0.66 \pm 0.10	0.37

^{a,b} Lettere diverse indicano differenze significative;

* per questi aminoacidi non è stato possibile stabilire con esattezza la significatività tra i vari livelli, pertanto il valore di P denota una tendenza alla significatività.

Tabella 5. Analisi della varianza (ANOVA) della sostanza secca (SS), della proteina grezza (PG), delle ceneri grezze (CEN) e degli aminoacidi misurati nei prodotti per gatti, suddivisi nelle 5 categorie (LSMEANS \pm Errore Standard oppure Mediana (Min-Max); EAA = aminoacidi essenziali; NEAA = aminoacidi non essenziali). I valori aminoacidici, di PG e CEN sono espressi in g/100 g SS rapportate ad una dieta contenente 400 kcal EM/100g SS (S=superpremium; G=grocery; GF=grain free).

Variabili	S (n=12)	GF (n=2)	G (n=13)	P
SS	94.25 \pm 0.28 ^a	92.39 \pm 0.69 ^{ab}	93.17 \pm 0.27 ^b	0.01
PG	34.12 \pm 0.79	37.57 \pm 1.95	35.56 \pm 0.76	0.20
CEN	6.88 \pm 0.45 ^b	9.05 \pm 1.10 ^{ab}	9.42 \pm 0.43 ^a	0.001
EAA				
Arginina	1.73 \pm 0.14 ^b	2.71 \pm 0.33 ^a	2.15 \pm 0.13 ^{ab}	0.02
Istidina	0.59 \pm 0.05	0.71 \pm 0.12	0.67 \pm 0.05	0.38
Isoleucina	1.23 \pm 0.08	1.06 \pm 0.19	1.16 \pm 0.07	0.65
Leucina	2.76 \pm 0.16	2.41 \pm 0.40	2.44 \pm 0.16	0.33
Lisina	2.03 \pm 0.22	1.35 \pm 0.54	2.03 \pm 0.21	0.49
Metionina	0.88 \pm 0.04	0.89 \pm 0.10	0.80 \pm 0.04	0.32
Fenilalanina	1.37 \pm 0.08	1.29 \pm 0.19	1.33 \pm 0.07	0.90
Triptofano	0.21 \pm 0.01	0.13 \pm 0.04	0.21 \pm 0.02	0.21
Treonina	1.57 \pm 0.10	1.43 \pm 0.25	1.71 \pm 0.10	0.45
Valina	1.34 \pm 0.08	1.74 \pm 0.21	1.33 \pm 0.08	0.20
Taurina	0.170 (0.065-0.550)	0.200 (0.119-0.281)	0.153 (0.084-0.270)	0.67
Cis + met	1.304 (1.001-2.883)	1.186 (1.049-1.323)	1.248 (0.967-1.985)	0.85
Fen + tir	2.06 \pm 0.13	1.65 \pm 0.32	2.29 \pm 0.12	0.14
NEAA				
Alanina	2.31 \pm 0.12	2.60 \pm 0.29	2.37 \pm 0.11	0.66
Aspartato	2.55 \pm 0.14 ^b	3.67 \pm 0.34 ^a	2.70 \pm 0.13 ^b	0.02
Cist(e)ina	0.437 (0.294-1.716)	0.300 (0.287-0.314)	0.456 (0.267-1.248)	0.19
Glicina	2.01 \pm 0.19	3.06 \pm 0.47	2.57 \pm 0.18	0.05
Glutammato	5.81 \pm 0.32	7.03 \pm 0.79	6.38 \pm 0.31	0.26
Prolina	2.44 \pm 0.13	2.05 \pm 0.32	2.65 \pm 0.13	0.19
Serina	2.09 \pm 0.16	2.06 \pm 0.39	2.24 \pm 0.15	0.77
Tirosina	0.69 \pm 0.10	0.35 \pm 0.23	0.96 \pm 0.09	0.03*

^{a,b} Lettere diverse indicano differenze significative;

* per questo aminoacido non è stato possibile stabilire con esattezza la significatività tra i vari livelli, pertanto il valore di P denota una tendenza alla significatività.

Dal confronto per categoria entro i prodotti cane, differenze statisticamente significative sono state evidenziate per la fenilalanina (aminoacido essenziale) e per aspartato, glicina, glutammato e prolina (aminoacidi non essenziali). Per quanto riguarda i prodotti gatto invece, differenze statisticamente significative sono state evidenziate per arginina (aminoacido essenziale) ed aspartato (aminoacido non essenziale).

La correlazione di Pearson (Tabella 6) ha permesso di evidenziare che, all'aumentare del contenuto proteico, si osserva un aumento di aspartato, glutammato, serina, treonina, arginina, alanina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina, prolina e fenilalanina + tirosina. Il contenuto di taurina nei prodotti è invece in tendenza inversamente proporzionale al contenuto di ceneri.

Tabella 6. Correlazione tra contenuto proteico e contenuto amminoacidico e correlazione tra contenuto di ceneri e contenuto amminoacidico negli 80 campioni. In grassetto i valori degli aminoacidi con $r > 60\%$ (r = coefficiente di correlazione di Pearson) (P = significatività).

AMMINOACIDI	PROTEINA GREZZA		CENERI GREZZE	
	r	p	r	p
Aspartato	0.671	0.000	0.241	0.032
Glutammato	0.620	0.000	0.175	0.120
Serina	0.604	0.000	0.111	0.329
Istidina	0.432	0.000	0.196	0.082
Glicina	0.558	0.000	0.383	0.000
Treonina	0.712	0.000	0.026	0.821
Arginina	0.660	0.000	0.345	0.002
Alanina	0.788	0.000	0.127	0.262
Tirosina	0.429	0.000	0.191	0.090
Valina	0.682	0.000	0.161	0.155
Fenilalanina	0.677	0.000	0.089	0.432
Isoleucina	0.672	0.000	-0.121	0.286
Leucina	0.680	0.000	-0.113	0.317
Lisina	0.256	0.022	-0.221	0.049
Prolina	0.713	0.000	0.237	0.034
Triptofano	0.218	0.052	-0.147	0.193
Cistina	0.288	0.010	-0.064	0.571
Metionina	0.316	0.004	-0.189	0.093
Taurina	0.409	0.000	-0.330	0.003
Cis + Met	0.350	0.001	-0.140	0.217
Fen + Tir	0.686	0.000	0.178	0.114

Mediante l'analisi canonica discriminante è stato possibile identificare quali fossero gli amminoacidi caratterizzanti ogni categoria di pet food. Per quanto riguarda i prodotti cane (Figura 3), la Can 1 e la Can 2 contano per il 91 % della variabilità dei dati misurati (Can 1 = 60 % e Can 2 = 31 %). Dei 21 amminoacidi analizzati, 3 sono stati identificati statisticamente significativi per la Can 1 e solo 1 è stato identificato statisticamente significativo per la Can 2. In particolare, è stato messo in evidenza come la categoria vegetariani sia caratterizzata dagli amminoacidi glutammato e tirosina, mentre la categoria grain free è caratterizzata dagli amminoacidi prolina ed aspartato. Per alta qualità e grocery non sono stati identificati degli amminoacidi chiaramente caratterizzanti le due categorie; tutti i campioni infatti si concentrano nella porzione centrale del grafico, in parte sovrapponendosi. Per quanto riguarda i prodotti gatto (Figura 4), la Can 1 e la Can 2 contano per il 100 % della variabilità dei dati misurati (Can 1 = 68% e Can 2 = 32%). Dei 21 amminoacidi analizzati, 2 sono stati identificati statisticamente significativi per la Can 1 e 2 sono stati identificati statisticamente significativi per la Can 2. In particolare, è emerso come la categoria grocery sia caratterizzata dall'amminoacido istidina, la categoria alta qualità è caratterizzata dall'amminoacido taurina, mentre l'amminoacido prolina caratterizza sia la categoria alta qualità che grocery. Per quanto riguarda la categoria grain free, l'amminoacido caratterizzante è la valina.

Figura 3. Scatter plot dei prodotti cane in base all'analisi canonica discriminante.

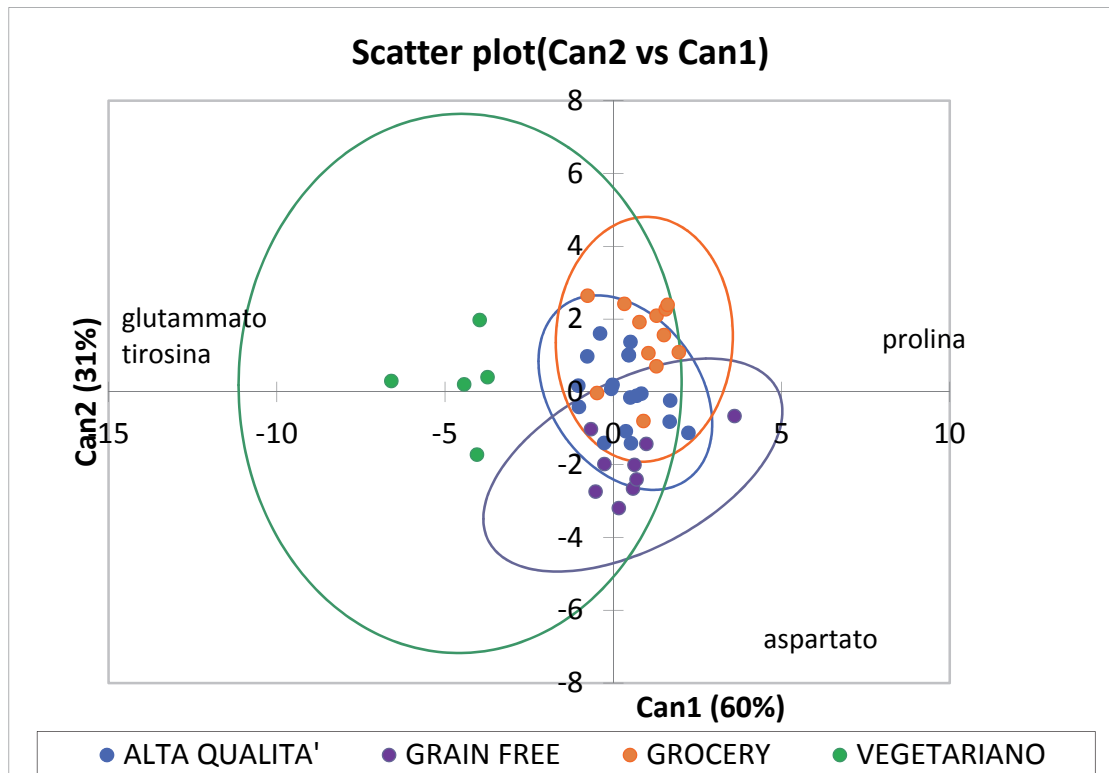
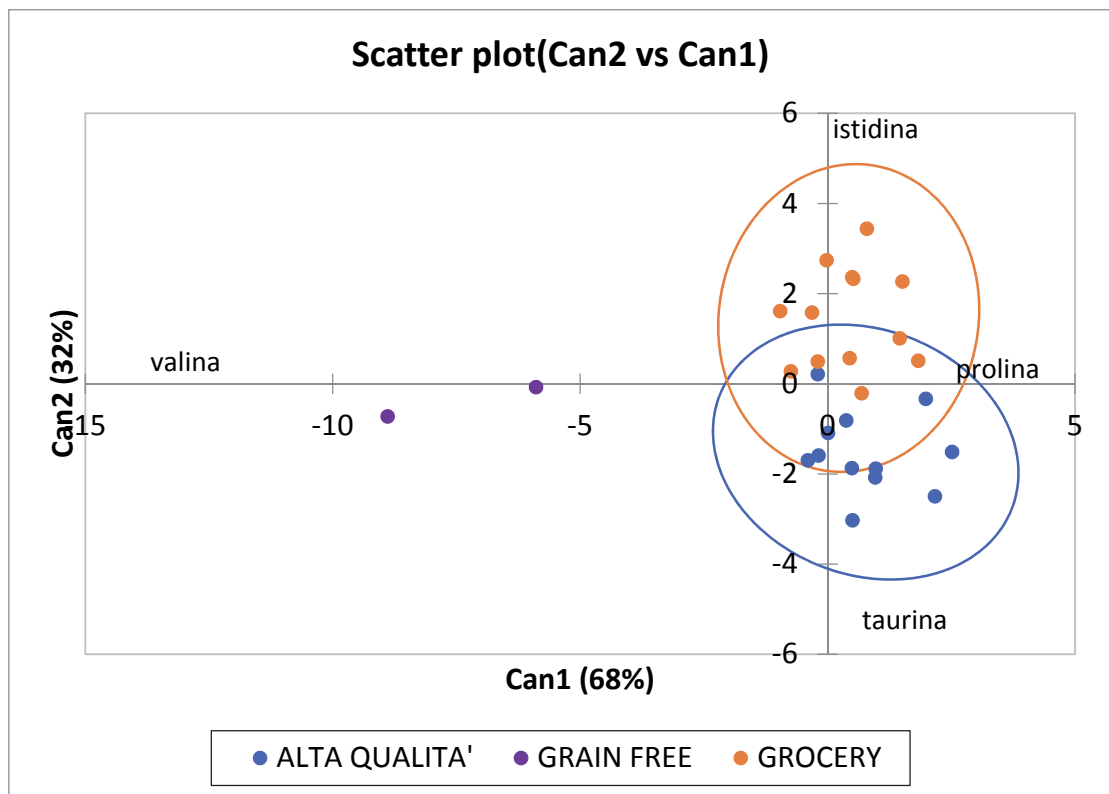


Figura 4. Scatter plot dei prodotti gatto in base all'analisi canonica discriminante.



2.5.3.1 Risultati dell'analisi NIRs con PoliSPECNIRS su prodotti interi

Da una prima analisi visiva degli spettri, nella coda compresa tra 1'660 e 1'690 sembra esserci una perdita di segnale (a sfavore del rapporto segnale/rumore), perciò è stato deciso di tagliare lo spettro a 1'660 nm (Figura 5).

I tre campioni indicati con la freccia nella Figura 5, risultano essere chiaramente fuori dalla nuvola degli altri spettri poiché il loro assorbimento è risultato maggiore rispetto a tutti gli altri prodotti: ciò che accomuna questi tre prodotti e che li differenzia dagli altri è il fatto che tutti e tre appartengono alla categoria grain free per cani e la loro proteina caratterizzante è il pesce. Anche il *plot* delle componenti principali 3 e 4 (Figura 6) mostra come tali campioni siano ai margini della nuvola. In questo *plot* si evidenzia anche la posizione anomala del campione indicato con la freccia, ovvero un altro prodotto grain free, in questo caso per gatti, anch'esso contenente pesce.

Figura 5. Spettri dei campioni interi analizzati con PoliSPEC^{NIR}.

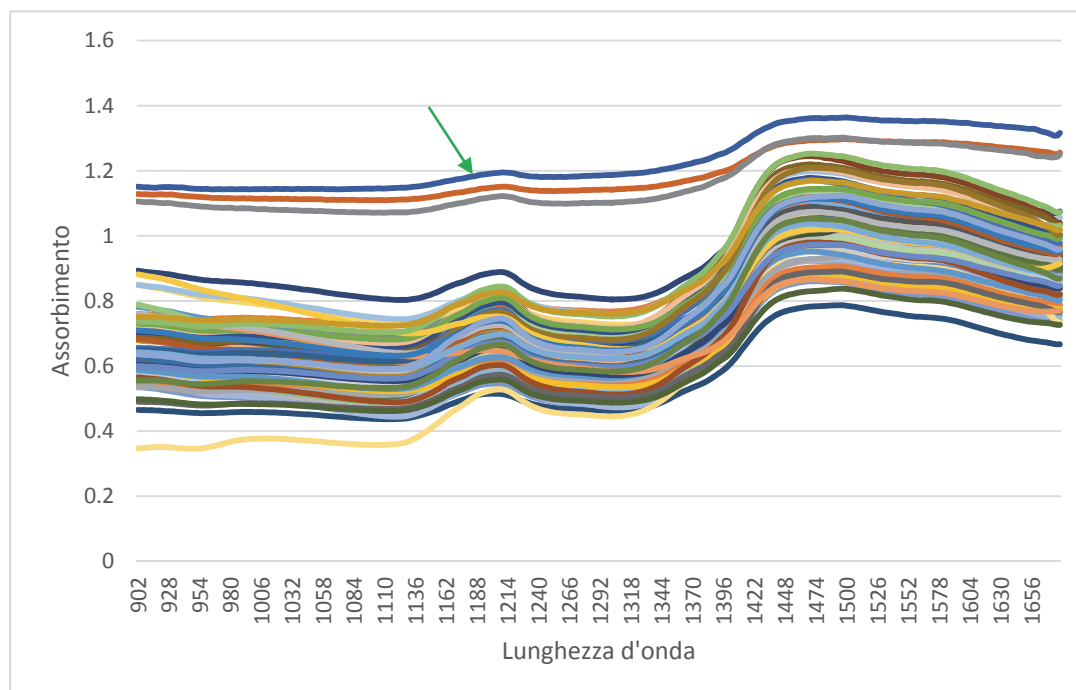
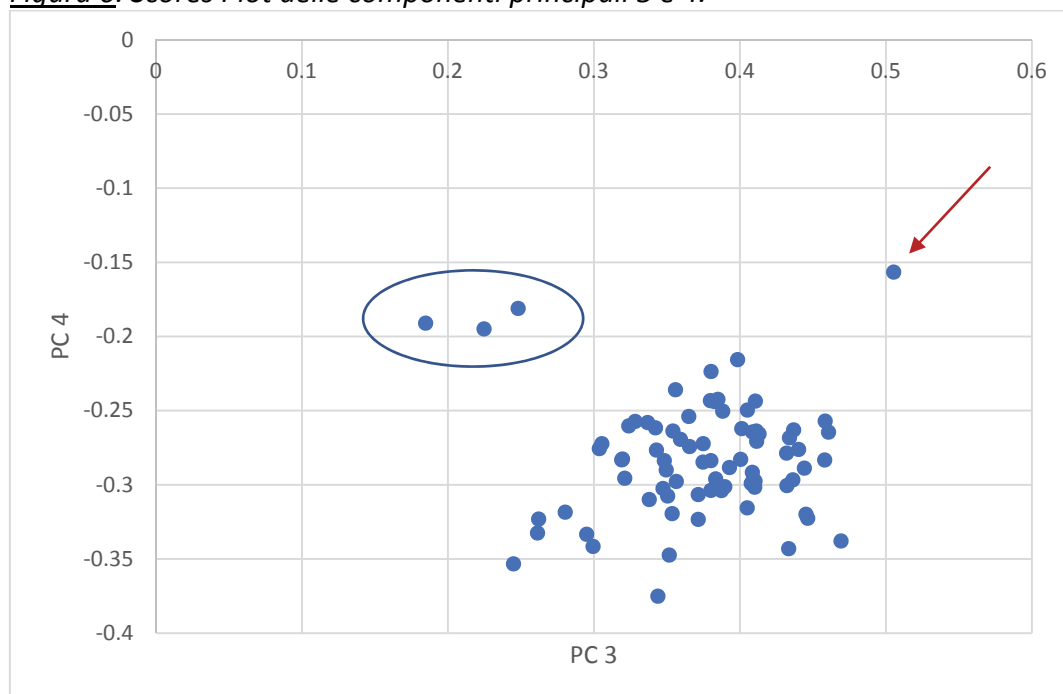


Figura 6. Scores Plot delle componenti principali 3 e 4.



La calibrazione ottenuta impiegando gli spettri dei campioni letti interi (Tabella 7) mostra come tra gli aminoacidi alcuni siano stati predetti molto bene con R^2_{cal} maggiore di 0.86 (i.e. glicina e leucina) e molti con R^2_{cal} compreso tra 0.60 e 0.85 (i.e. alanina, isoleucina, triptofano, cistina e metionina). A conferma di quanto già illustrato, il rapporto tra la deviazione standard e l'errore di calibrazione si dimostra particolarmente buono per la leucina ($RPD_{cal} > 3.0$). I risultati di validazione incrociata, tuttavia, mostrano risultati meno buoni per tutti gli aminoacidi; il motivo di questo decadimento dell'indicatore potrebbe essere cercato nell'esiguità dei campioni impiegati per la calibrazione e nella loro eterogeneità.

Per tutte le calibrazioni, il numero di componenti principali usate in calibrazione è inferiore a 10, ad eccezione della glicina e della leucina, dimostrando una generale discreta robustezza della calibrazione.

Tabella 7. Statistiche e risultati dei prodotti interi analizzati con PolISPEC^{NIR} (AA = amminoacidi; N_{cal} = numero di calibrazioni; Fat. = fattori; R²_{cal} = coefficiente di determinazione di calibrazione; SE_{cal} = errore standard di calibrazione; SE_{cv} = errore standard di validazione incrociata; R²_{cv} = coefficiente di determinazione di validazione incrociata; RPD_{cal} = rapporto tra deviazione standard ed errore di calibrazione; RPD_{cv} = rapporto tra deviazione standard ed errore di validazione incrociata; mean = media; SD = deviazione standard).

AA	N _{cal}	Fat	R ² _{cal}	SE _{cal}	SE _{cv}	R ² _{cv}	RPD _{cal}	RPD _{cv}	Mean	SD
aspartato	75	6	0.66	306.94	378.92	0.45	1.65	1.34	2111.38	505.93
glutammato	73	4	0.51	822.91	891.51	0.39	1.39	1.28	4592.30	1143.7
serina	70	4	0.50	297.40	319.78	0.39	1.38	1.28	1582.45	409.22
istidina	73	2	0.28	117.75	127.95	0.14	1.16	1.07	499.78	136.75
glicina	75	10	0.86	293.86	494.47	0.54	2.45	1.46	1884.52	721.11
treonina	71	4	0.53	231.42	251.36	0.42	1.42	1.31	1147.37	329.00
arginina	72	4	0.51	316.63	347.09	0.39	1.39	1.27	1528.48	441.39
alanina	72	7	0.75	220.59	294.73	0.52	1.91	1.43	1759.82	421.10
tirosina	74	6	0.44	207.78	247.59	0.18	1.28	1.07	600.11	266.04
valina	71	3	0.54	179.23	194.51	0.43	1.44	1.33	1026.70	258.33
fenilalanina	72	4	0.52	186.23	207.56	0.37	1.40	1.25	1021.28	260.19
isoleucina	70	4	0.63	139.68	155.40	0.52	1.61	1.44	813.15	224.33
leucina	73	15	0.97	96.47	310.06	0.66	5.23	1.63	1891.23	504.53
lisina	72	2	0.26	590.25	620.96	0.16	1.15	1.09	1397.04	677.57
prolina	73	2	0.55	353.54	385.32	0.45	1.48	1.35	1934.10	521.97
triptofano	74	9	0.73	31.44	49.01	0.34	1.80	1.16	162.25	56.72
cisteina	74	7	0.62	89.00	121.07	0.27	1.54	1.13	362.77	137.08
metionina	75	6	0.73	64.19	88.72	0.41	1.74	1.26	599.08	111.52
taurina	74	3	0.53	28.25	33.37	0.29	1.38	1.17	93.75	38.88

2.5.3.2 Risultati dell'analisi NIRs con PolISPECNIRS su prodotti macinati

Una prima analisi degli spettri, come nel caso dei campioni interi, ha mostrato una coda che da 1'660 a 1'690 nm sembra avere una risposta fotometrica calante, sfavorendo il rapporto segnale/rumore. Per questo motivo è stato deciso di usare l'intervallo spettrale 902-1'690 nm (Figura 7).

Anche in questo caso, come succedeva per i prodotti interi, i tre campioni indicati con la freccia nella Figura 7, sono chiaramente fuori dalla nuvola degli altri spettri dato che il loro assorbimento è risultato maggiore. Anche il *plot* delle componenti principali 2 e 3 (Figura 8) mostra come tali campioni siano ai margini della nuvola.

Figura 7. Spettri dei campioni macinati analizzati con PoliSPEC^{NIR}.

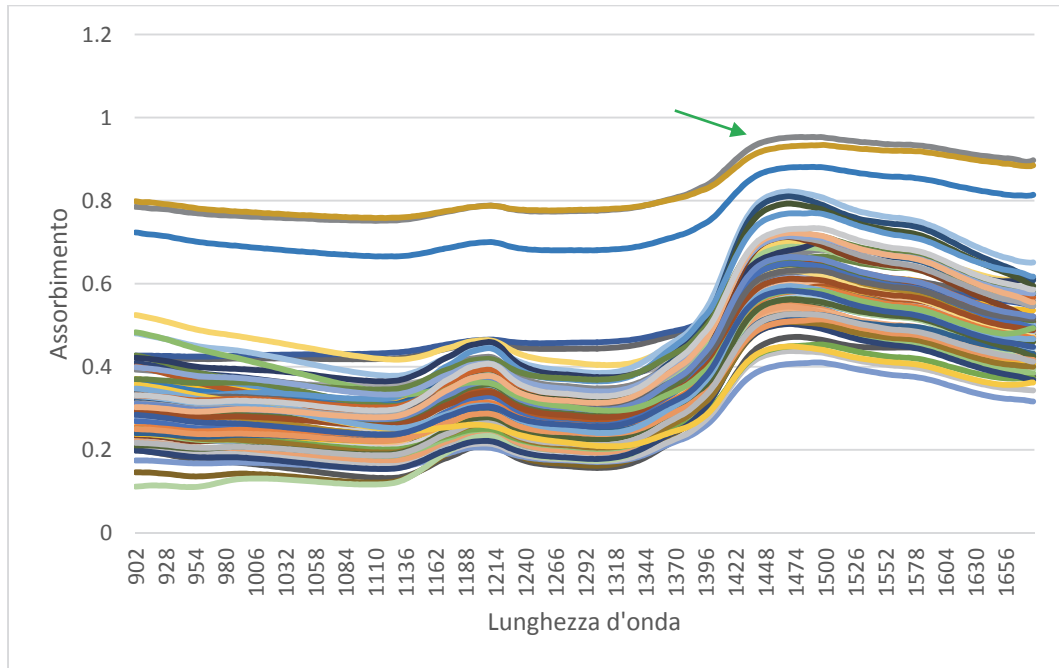
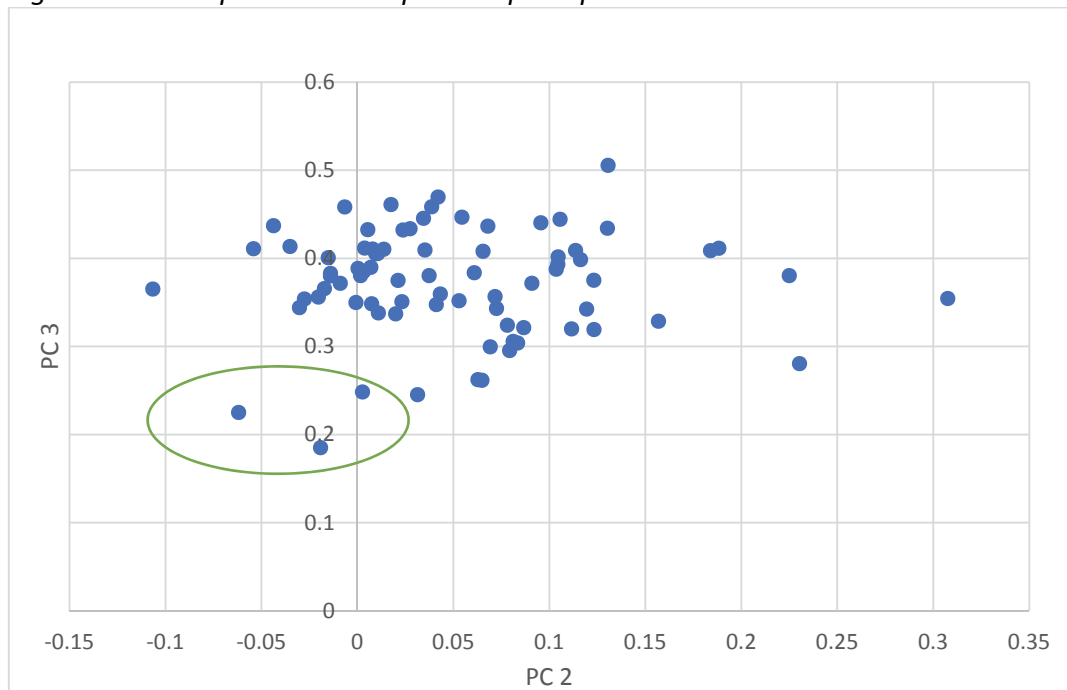


Figura 8. Scores plot delle componenti principali 2 e 3.



I risultati di calibrazione dei prodotti macinati sono riportati in Tabella 8. Come atteso, rispetto ai pet food interi, i risultati sono migliori: oltre a migliorare l'omogeneità del prodotto, la macinazione sfavorisce gli effetti di scattering della

luce che, sebbene mitigati dai pretrattamenti spettrali, possono dar luogo a cospicui peggioramenti delle prestazioni di calibrazione.

Sorprendentemente, gli aminoacidi glicina e leucina hanno valori di R^2_{cal} inferiori che nel campione intero (0.67 e 0.77, rispettivamente), mentre altri hanno R^2_{cal} compreso tra 0.60 e 0.86 (i.e. isoleucina, leucina, prolina e cistina).

Il rapporto tra la deviazione standard e l'errore di calibrazione si dimostra particolarmente buono per la leucina ($RPD_{cal} > 3.0$).

Tabella 8. Statistiche e risultati dei prodotti macinati analizzati con PoliSPEC^{NIR}. (AA = aminoacidi; N_{cal} = numero di calibrazioni; Fat = fattori; R^2_{cal} = coefficiente di determinazione di calibrazione; SE_{cal} = errore standard di calibrazione; SE_{cv} = errore standard di validazione incrociata; R^2_{cv} = coefficiente di determinazione di validazione incrociata; RPD_{cal} = rapporto tra deviazione standard ed errore di calibrazione; RPD_{cv} = rapporto tra deviazione standard ed errore di validazione incrociata; mean = media; SD = deviazione standard).

AA	N_{cal}	Fat	R^2_{cal}	SE_{cal}	SE_{cv}	R^2_{cv}	RPD_{cal}	RPD_{cv}	Mean	SD
aspartato	76	7	0.72	283.12	353.18	0.52	1.79	1.44	2100.97	507.88
glutammato	77	8	0.64	730.26	915.11	0.41	1.59	1.26	4551.82	1157.5
serina	72	4	0.54	285.39	300.42	0.46	1.44	1.36	1572.36	409.84
istidina	74	3	0.35	110.68	118.79	0.23	1.22	1.13	496.71	134.66
glicina	77	7	0.67	411.39	489.18	0.49	1.66	1.39	1813.85	681.66
treonina	74	4	0.51	234.04	250.04	0.41	1.39	1.30	1141.86	324.17
arginina	75	4	0.53	319.46	340.79	0.43	1.42	1.33	1501.85	453.08
alanina	76	4	0.59	283.06	304.02	0.49	1.51	1.41	1736.10	428.33
tirosina	73	3	0.31	227.91	250.09	0.15	1.17	1.07	593.55	267.76
valina	72	4	0.62	166.69	180.13	0.53	1.58	1.46	1026.20	263.11
fenilalanina	75	4	0.58	173.65	188.80	0.48	1.51	1.38	1014.19	261.33
isoleucina	74	5	0.70	143.66	158.64	0.60	1.75	1.59	830.03	251.85
leucina	78	7	0.77	264.04	337.80	0.59	1.99	1.56	1895.08	525.83
lisina	72	1	0.26	576.40	597.95	0.19	1.16	1.12	1394.74	667.05
prolina	73	10	0.86	213.80	352.78	0.59	2.50	1.51	1925.64	534.33
triptofano	77	8	0.61	37.14	47.83	0.31	1.51	1.17	162.43	55.94
cisteina	74	8	0.65	68.89	86.12	0.40	1.59	1.27	349.30	109.52
metionina	76	6	0.49	117.08	135.93	0.28	1.35	1.16	661.54	157.98
taurina	72	2	0.32	48.28	51.35	0.21	1.20	1.13	97.38	57.88

Considerando gli amminoacidi essenziali, gli R2cal risultano essere maggiori nei prodotti macinati per arginina, istidina, isoleucina, fenilalanina, valina e taurina. Per leucina, metionina, triptofano e taurina gli R2cal dei prodotti interi risultano invece essere maggiori. L'amminoacido lisina è stato predetto allo stesso modo sia nei prodotti macinati che in quelli interi (R2cal = 0.26).

Considerando gli amminoacidi non essenziali, gli R2cal risultano essere maggiori nei prodotti macinati per aspartato, glutammato, serina, prolina e cistina. Per glicina, alanina e tirosina gli R2cal dei prodotti interi risultano invece essere maggiori.

2.5.3.3 Risultati dell'analisi NIRs con NIRS™ DS 2500 F (FOSS)

La calibrazione ottenuta con lo strumento NIRS™ DS 2500 F (FOSS) con campioni interi evidenzia prestazioni migliori rispetto all'omologa ottenuta con il PoliSPEC^{NIR}, eccetto che per gli amminoacidi serina, glicina, tirosina, leucina, triptofano, cistina, metionina e taurina (Tabella 9). I migliori risultati sono stati ottenuti invece per aspartato, glutammato, glicina, alanina, leucina. Tuttavia, l'RPDcv è risultato sempre < 2.01.

Analogamente a quanto osservato per il PoliSPEC^{NIR}, gli R2cal della calibrazione ottenuta con campioni macinati sono risultati migliori per aspartato, serina, istidina, glicina, treonina, tirosina, lisina, prolina, cisteina, metionina e taurina. Gli R2cal degli amminoacidi arginina, valina e leucina risultano essere uguali per interi e macinati (Tabella 9 e 10). Per nessun aminoacido RPDcv è superiore a 2.0.

Per tutte le calibrazioni, il numero di componenti principali usate è inferiore a 10, dimostrando una generale discreta robustezza della calibrazione.

Tabella 9. Statistiche e risultati dei prodotti interi analizzati con NIRS™ DS 2500 F (FOSS) (AA = amminoacidi; Ncal = numero di calibrazioni; Fat = fattori; R²_{cal} = coefficiente di determinazione di calibrazione; SE_{cal} = errore standard di calibrazione; SE_{cv} = errore standard di validazione incrociata; R²_{cv} = coefficiente di determinazione di validazione incrociata; RPD_{cal} = rapporto tra deviazione standard ed errore di calibrazione; RPD_{cv} = rapporto tra deviazione standard ed errore di validazione incrociata; mean = media; SD = deviazione standard).

AA	N _{cal}	Fat	SE _{cal}	R ² _{cal}	SE _{cv}	R ² _{cv}	RPD _{cal}	RPD _{cv}	Mean	SD
aspartato	76	5	225.96	0.82	307.00	0.66	2.33	1.72	2135.10	526.99
glutamato	74	7	409.50	0.85	705.82	0.55	2.58	1.50	4642.99	1056.16
serina	74	2	271.41	0.47	293.66	0.38	1.38	1.28	1554.75	374.43
istidina	78	1	115.95	0.31	121.88	0.22	1.20	1.14	509.05	139.22
glicina	75	8	278.24	0.81	470.20	0.46	2.31	1.37	1813.03	642.13
treonina	76	2	209.18	0.62	238.69	0.50	1.62	1.42	1160.86	339.13
arginina	78	6	226.74	0.76	353.31	0.42	2.05	1.32	1547.89	465.12
alanina	74	8	125.56	0.91	201.47	0.76	3.32	2.07	1744.44	416.54
tirosina	76	1	214.55	0.29	226.15	0.20	1.19	1.13	576.80	254.74
valina	74	2	151.09	0.67	170.31	0.57	1.73	1.53	1038.26	261.15
fenilalanina	75	2	147.81	0.62	164.59	0.52	1.61	1.45	1011.41	238.31
isoleucina	75	3	130.49	0.69	144.85	0.61	1.79	1.61	820.47	233.58
leucina	74	6	174.03	0.88	246.69	0.75	2.84	2.01	1889.10	494.91
lisina	76	1	544.07	0.27	592.79	0.12	1.17	1.07	1355.08	635.90
prolina	77	2	336.16	0.58	373.28	0.47	1.54	1.39	1919.04	517.00
triptofano	78	8	30.15	0.71	51.67	0.14	1.86	1.08	160.28	56.00
cisteina	76	2	88.12	0.33	96.08	0.19	1.22	1.12	348.48	107.52
metionina	76	2	112.55	0.47	131.45	0.27	1.38	1.18	653.67	154.77
taurina	72	1	41.65	0.28	45.09	0.14	1.18	1.09	91.64	48.96

Tabella 10. Statistiche e risultati dei prodotti macinati analizzati con NIRS™ DS 2500 F (FOSS) (AA = amminoacidi; Ncal = numero di calibrazioni; Fat = fattori; R2cal = coefficiente di determinazione di calibrazione; SEcal = errore standard di calibrazione; SEcv = errore standard di validazione incrociata; R2cv = coefficiente di determinazione di validazione incrociata; RPDcal = rapporto tra deviazione standard ed errore di calibrazione; RPDcv = rapporto tra deviazione standard ed errore di validazione incrociata; mean = media; SD = deviazione standard).

AA	N _{cal}	Fat	SE _{cal}	R ² _{cal}	SE _{cv}	R ² _{cv}	RPD _{cal}	RPD _{cv}	Mean	SD
aspartato	74	6	193.86	0.85	263.66	0.71	2.54	1.87	2089.73	492.95
glutammato	76	5	633.38	0.67	823.81	0.44	1.74	1.34	4577.40	1104.29
serina	74	2	258.34	0.48	286.22	0.35	1.39	1.25	1545.72	358.71
istidina	78	1	113.09	0.34	119.25	0.26	1.23	1.17	509.05	139.22
glicina	74	8	226.62	0.88	355.64	0.71	2.91	1.86	1841.01	660.49
treonina	76	3	200.12	0.64	221.43	0.56	1.67	1.51	1152.44	334.91
arginina	76	6	226.11	0.76	321.03	0.52	2.06	1.45	1536.80	465.85
alanina	75	6	169.87	0.84	218.10	0.73	2.47	1.92	1743.93	419.09
tirosina	74	2	181.29	0.40	202.06	0.25	1.30	1.16	604.18	234.83
valina	73	2	139.86	0.67	154.86	0.59	1.74	1.57	1026.76	243.37
fenilalanina	78	3	159.58	0.60	183.33	0.47	1.58	1.38	1024.11	252.68
isoleucina	75	2	131.01	0.67	140.52	0.61	1.73	1.62	817.16	227.02
leucina	77	8	175.88	0.88	263.20	0.72	2.86	1.91	1889.95	502.18
lisina	77	1	556.07	0.32	589.37	0.23	1.22	1.15	1382.54	676.08
prolina	77	3	317.41	0.62	355.88	0.52	1.63	1.45	1919.04	517.00
triptofano	78	1	49.40	0.22	51.61	0.14	1.13	1.09	160.28	56.00
cisteina	75	5	73.00	0.54	93.01	0.25	1.48	1.16	349.17	108.08
metionina	76	4	102.46	0.57	119.97	0.41	1.53	1.31	658.83	157.09
taurina	72	4	35.61	0.47	42.12	0.25	1.37	1.16	91.64	48.96

Anche per le analisi effettuate con lo strumento NIRS™ DS 2500 F (FOSS), considerando gli amminoacidi essenziali, gli R2cal risultano maggiori nei prodotti macinati per istidina, leucina, lisina, metionina, treonina e taurina. Per isoleucina, fenilalanina e triptofano risultano invece maggiori gli R2cal nei prodotti interi. Gli R2cal di arginina, leucina e valina risultano essere uguali per interi e macinati. Considerando gli aminoacidi non essenziali, gli R2cal risultano maggiori nei prodotti macinati per aspartato, serina, glicina, tirosina, prolina e cistina. Per gli amminoacidi glutammato e alanina risultano invece maggiori gli R2cal dei prodotti interi.

Confrontando i risultati di R²_{cal} ottenuti dall'analisi dei prodotti interi con PolISPEC^{NIR}, dei macinati con PolISPEC^{NIR}, degli interi con NIRS™ DS 2500 F (FOSS) e dei macinati con NIRS™ DS 2500 F (FOSS) è stato possibile valutare quale strumentazione NIRs e quale formato di prodotto (intero o macinato) siano più adatti per predire il valore di ogni singolo aminoacido (Tabella 11).

Tabella 11. Confronto tra gli R²_{cal} di tutti gli aminoacidi analizzati su prodotti interi con PolISPEC^{NIR}, su prodotti macinati con PolISPEC^{NIR}, su prodotti interi con NIRS™ DS 2500 F (FOSS) e su prodotti macinati con NIRS™ DS 2500 F (FOSS) (R²_{cal} = coefficiente di determinazione di calibrazione). In grassetto sono stati evidenziati gli R²_{cal} maggiori per ogni aminoacido (EAA = aminoacidi essenziali; NEAA = aminoacidi non essenziali).

Amminoacidi	R ² _{cal} interi PolISPEC ^{NIRS}	R ² _{cal} macinati PolISPEC ^{NIRS}	R ² _{cal} interi NIRS™ DS 2500 F	R ² _{cal} macinati NIRS™ DS 2500 F
EAA				
Arginina	0,51	0,53	0,76	0,76
Istidina	0,28	0,35	0,31	0,34
Isoleucina	0,63	0,70	0,69	0,67
Leucina	0,97	0,77	0,88	0,88
Lisina	0,26	0,26	0,27	0,32
Metionina	0,73	0,49	0,47	0,57
Fenilalanina	0,52	0,58	0,62	0,60
Triptofano	0,73	0,61	0,71	0,22
Treonina	0,53	0,51	0,62	0,64
Valina	0,54	0,62	0,67	0,67
Taurina	0,53	0,32	0,28	0,47
NEAA				
Tirosina	0,44	0,31	0,29	0,40
Aspartato	0,66	0,72	0,82	0,85
Glutammato	0,51	0,64	0,85	0,67
Serina	0,50	0,54	0,47	0,48
Prolina	0,55	0,86	0,58	0,62
Alanina	0,75	0,59	0,91	0,84
Cist(e)ina	0,62	0,65	0,33	0,54
Glicina	0,86	0,67	0,81	0,88

Lo strumento fisso da laboratorio NIRS™ DS 2500 F (FOSS), avendo un range spettrale ed una sensibilità aumentati rispetto allo strumento portatile PoliSPEC^{NIR}, dovrebbe presentare valori di R2cal maggiori e quindi più precisi circa l'analisi amminoacidica, sia su mangimi interi che su quelli macinati (soprattutto i secondi). Al contrario delle aspettative, invece, possiamo notare che gli R2cal di molti aminoacidi (serina, istidina, tirosina, isoleucina, leucina, prolina, triptofano, cist(e)ina, metionina e taurina) sono risultati maggiori per l'analisi effettuata con PoliSPEC^{NIR}. In particolare, per serina, istidina, isoleucina, prolina e cistina i valori di R2cal maggiori sono risultati dall'analisi con PoliSPEC^{NIR} sul prodotto macinato; per leucina, triptofano, metionina e taurina, invece, gli R2cal maggiori sono risultati dall'analisi con PoliSPEC^{NIR} sui prodotti interi. Gli R2cal di aspartato, glicina, treonina e lisina sono maggiori per NIRS™ DS 2500 F (FOSS) su prodotto macinato, quelli di glutammato, alanina e fenilalanina sono maggiori per NIRS™ DS 2500 F (FOSS) su prodotto intero. Gli R2cal maggiori per arginina e valina hanno mostrato avere un identico valore sia in seguito ad analisi con NIRS™ DS 2500 F (FOSS) su prodotto intero che macinato.

2.6 Discussione e conclusione

È ormai ben consolidato il ruolo chiave che una corretta alimentazione svolge nel mantenimento della salute e del benessere degli animali da compagnia, e il consumo di un pet food completo garantisce a cani e gatti tutti i nutrienti essenziali di cui hanno bisogno. Tuttavia, la qualità delle materie prime impiegate per la produzione dei mangimi è molto variabile e difficilmente intuibile dalla lettura dell'etichetta. Il profilo amminoacidico, ad esempio, è un'informazione molto importante circa il valore nutrizionale delle proteine che compongono un mangime destinato al cane o al gatti, ma che non è quasi mai reperibile nel cartellino. Uno squilibrio nel profilo amminoacidico alimentare non è da sottovalutare, poiché può determinare delle carenze nutrizionali che compromettono lo sviluppo degli individui giovani e portano a problemi di salute nei soggetti adulti. Nonostante la sua rilevanza, l'analisi del profilo amminoacidico degli alimenti viene effettuata di rado, poiché richiede l'uso di strumentazioni molto costose associate ad procedure lunghe e indaginose. Per questo motivo, il profilo amminoacidico dei mangimi per cani e gatti presenti sul mercato resta spesso sconosciuto.

Questo è il primo studio che ha analizzato e valutato il profilo amminoacidico di un numero così elevato e vario di pet food secchi per cani e gatti. I prodotti selezionati appartengono infatti a 5 categorie con caratteristiche tra loro molto diverse: alimenti vegetariani, alimenti grain free, alimenti di alta qualità, alimenti acquistati presso i grocery ed alimenti dietetici.

Escludendo dalle valutazioni conclusive i mangimi dietetici, i quali non devono obbligatoriamente rispettare i limiti minimi amminoacidici definiti da FEDIAF (2018), e i prodotti che sono risultati carenti di triptofano, amminoacido la cui analisi è da considerarsi di dubbia validità, è stato possibile definire che 9 prodotti su 80 analizzati (11,25%) non rispettano le indicazioni di FEDIAF per uno o più aminoacidi essenziali.

In letteratura sono presenti soltanto un paio di altri studi svolti sulla valutazione del contenuto amminoacidico di alimenti per cani e gatti. In tali studi era stato misurato, mediante analisi di laboratorio, il contenuto amminoacidico di pet food vegetariani (Kanakubo et al., 2015) e vegani (Gray et al., 2004) allo scopo di

valutare l'adeguatezza del contenuto amminoacidico. Probabilmente la scelta di tali alimenti è stata dovuta alla filosofia dietro a questi prodotti che tendenzialmente va contro la natura onnivora del cane e carnivora del gatto. I valori amminoacidici ottenuti in questi due studi sono stati confrontati con i livelli minimi definiti da AAFCO (*Association of American Feed Control Officials*), ovvero il corrispettivo americano di FEDIAF. In particolare, nello studio di Kanakubo e colleghi del 2015 sono stati analizzati 24 alimenti per cani e gatti (di cui 13 secchi e 11 umidi) ed è risultato che 6 prodotti non rispettavano il contenuto minimo amminoacidico definito da AAFCO per i seguenti aminoacidi: leucina, metionina, metionina + cisteina, taurina, lisina e triptofano. Allo stesso modo Gray e colleghi nel 2004 hanno analizzato due alimenti vegani, uno secco e uno umido. In entrambi i mangimi sono state messe in evidenza delle carenze nutrizionali: sia nell'alimento secco che in quello umido gli aminoacidi metionina e taurina non rispettavano i livelli minimi definiti da AAFCO, e in aggiunta a ciò, nell'alimento umido, anche arginina e lisina non erano presenti in quantità sufficienti. In questo studio invece è stato possibile dimostrare che i livelli minimi amminoacidici definiti da FEDIAF non sono stati rispettati in alimenti contenenti prodotti di origine animale (appartenenti alle categorie alta qualità, grain free e grocery), ma non nei prodotti della categoria vegetariani, al contrario di quanto dimostrato negli studi di Gray (2004) e Kanakubo (2015).

Sono da segnalare in particolare un prodotto dietetico per cani carente in valina, un prodotto monoproteico per cani carente in lisina, e un prodotto per gatto carente in taurina. Tuttavia, se la carenza riscontrata nel prodotto dietetico potrebbe essere giustificata dal fatto che è un prodotto a basso contenuto proteico (34 g proteina/ 1000 kcal EM) formulato per cani con insufficienza renale cronica, gli altri prodotti sono degli alimenti monoproteici o alimenti ad alta digeribilità che in teoria potrebbero essere utilizzati nel lungo periodo. Tali carenze quindi potrebbero comportare delle conseguenze poiché nel lungo periodo la presenza di livelli amminoacidici non adeguati all'interno di alimenti completi per il mantenimento di cani e gatti può risultare in una alterazione dello stato di salute dell'animale. Una deficienza di taurina nel gatto può comportare degenerazione retinica, cardiomiopatia dilatativa, crescita scarsa, disfunzioni all'apparato

riproduttivo, nervoso ed immunitario (NRC, 2006). Sempre nel gatto carenze di arginina possono causare salivazione, disturbi neurologici, iperestesia, emesi, coma, tetania, fino ad arrivare alla morte nel giro di poche ore (Morris & Rogers, 1978). Carenze di fenilalanina + tirosina possono comportare nel gatto alterazioni neurologiche, mancanza di coordinazione e iperattività; nel cane si osservano perdita di peso e variazioni nel colore del pelo (NRC, 2006). Una deficienza di metionina comporta scarsa crescita e dermatiti (Gray et al., 2004). Le carenze nutrizionali di triptofano e lisina possono risultare in un rifiuto all'assunzione di cibo e perdita di peso (NRC, 2006).

Un discorso a parte merita il triptofano, il quale è risultato l'amminoacido più carente nei prodotti analizzati (32 su 80). L'analisi di questo amminoacido prevede una metodica parzialmente differente perché per esso si effettua un'idrolisi basica a differenza degli altri amminoacidi che vengono sottoposti ad idrolisi acida. Questo risultato fa sorgere dei dubbi sulla buona riuscita della metodica utilizzata, impedendo di trarre delle conclusioni definitive. Pertanto, l'analisi di quantificazione del triptofano in futuro sarà ripetuta su tutti gli 80 campioni per smentire o confermare i dati ottenuti.

Appare quindi possibile che alcuni pet food per il mantenimento per cani e gatti possano presentare delle carenze per alcuni amminoacidi, indipendentemente dalla loro qualità o luogo d'acquisto. Tali carenze possono essere dovute alla variabilità delle materie prime utilizzate per la produzione di un mangime nonché alla diversa qualità di tali materie prime. È doveroso sottolineare che i risultati da noi ottenuti sono rappresentativi dei soli lotti di produzione soggetti ad analisi, pertanto non è possibile generalizzare dichiarando che tale prodotto o tale categoria di prodotti sia sempre carente in quel/quegli amminoacido/i. Tra i limiti dello studio va anche riportato il fatto che l'energia metabolizzabile (espressa in g/100 g SS) di tutti gli 80 pet food è stata calcolata basandosi sull'analisi chimica dichiarata in etichetta. Inoltre, è stato reperito un numero troppo esiguo di prodotti per gatto (1 prodotto nella categoria dietetici e 0 prodotti vegetariani). Nel prossimo futuro l'obiettivo sarà quello di reperire un numero di prodotti gatto pari a quello di prodotti cane, per aumentare la numerosità dei campioni includendo almeno 5 prodotti vegetariani e vegani e altrettanti prodotti dietetici.

Per quanto riguarda l'analisi canonica discriminante, questo studio ha permesso di identificare degli amminoacidi che caratterizzano alcune delle 5 categorie, sia tra i prodotti per cani che tra i prodotti per gatti. Per i pet food per cani è stato messo in evidenza come la categoria vegetariani sia caratterizzata dagli amminoacidi glutammato e tirosina, mentre la categoria grain free è caratterizzata da prolina e aspartato. Per la categoria alta qualità e grocery non sono stati identificati degli amminoacidi chiaramente caratterizzanti le due categorie. Per quanto concerne invece i pet food per gatti, è stato messo in evidenza come la categoria grocery sia caratterizzata dall'amminoacido istidina, la categoria alta qualità sia caratterizzata dalla taurina, mentre la prolina caratterizzi sia la categoria alta qualità che grocery. Per quanto riguarda la categoria grain free, infine, è emerso che l'amminoacido caratterizzante è la valina. Nonostante questi risultati, non è comunque possibile esprimere con certezza il motivo di tale variabilità e, non essendo stati fatti in passato degli studi simili e su un numero altrettanto elevato ed eterogeneo di prodotti, non vi è al momento modo di comparare i risultati ottenuti. Gli unici studi che hanno valutato il profilo amminoacidico di mangimi commerciali, come detto in precedenza, hanno preso in esame solo prodotti vegani e vegetariani con il solo obiettivo di valutare il rispetto dei valori minimi AAFCO. Per poter rafforzare l'ipotesi che gli aminoacidi individuati siano realmente caratterizzanti e discriminanti per ogni categoria, sarebbe utile svolgere nuovamente le analisi su un numero più cospicuo di prodotti. Sarebbe inoltre stato interessante poter utilizzare i dati del profilo amminoacidico per effettuare un'analisi canonica discriminante la fonte proteica principale impiegata nella formulazione del prodotto, ma ciò non è stato possibile per vari motivi, tra cui la numerosità delle materie prime impiegate nel pet food, sia di origine animale che vegetale, nonché l'ambiguità e la poca chiarezza con le quali gli ingredienti sono riportati in etichetta.

Infine, la predizione del profilo amminoacidico dei pet food selezionati per questo studio utilizzando la metodica NIRs non ha dato risultati soddisfacenti come quelli ottenuti dagli studi condotti in passato. González Martìn et al. (2006) hanno analizzato il profilo amminoacidico di 50 campioni in forme differenti (i.e. crocchette, tavolette, granelle e farine) di alimenti destinati a diversi animali

mediante metodica NIRs utilizzando uno strumento FOSS NIRsystems 5000. In tale studio sono stati ottenuti dei valori molto alti di R^2_{cal} , tra 0.81 e 0.96 per tutti gli aminoacidi ad eccezione della lisina (0.69), indipendentemente dalla conformazione degli alimenti. De la Haba e colleghi, sempre nel 2006, hanno impiegato la metodica NIRs per predire la composizione amminoacidica di 92 proteine animali processate (PAPs) utilizzate nella composizione di alimenti per animali. In tale studio i campioni sono stati valutati sia in forma intera che macinati, e i valori maggiori di R^2_{cal} delle PAPs sono stati ottenuti per i prodotti interi ($R^2_{cal} \geq 0.85$ per tutti). In questo studio, invece, solo per gli aminoacidi non essenziali aspartato, glutammato, glicina, alanina e prolina e per l'amminoacido essenziale leucina i valori di R^2_{cal} sono risultati maggiori di 0.80 (dato che indica un'ottima precisione della predizione NIRs). In particolare, è stato evidenziato che per la predizione della leucina lo strumento più idoneo è PoliSPEC^{NIR} sul prodotto intero; per aspartato e glicina il NIRS™ DS 2500 F (FOSS) sul prodotto macinato, mentre con lo stesso strumento ma su prodotti interi si ottiene una predizione ottimale di glutammato e alanina. Questa diversità potrebbe essere dovuta alla natura complessa del pet food e per questo motivo in futuro sarebbe auspicabile utilizzare un numero maggiore di campioni per ottenere una curva di calibrazione più precisa e affidabile. La presenza di articoli in bibliografia in cui viene riportata la validità dell'analisi effettuata con metodiche NIRs fa supporre che la variabilità dei risultati ottenuti possa dipendere dal fatto che i prodotti macinati hanno subito un riscaldamento durante il processo di macinazione che ne ha in parte modificato la composizione chimica. Inoltre, il mangime estruso (i.e. crocchetta) è una matrice estremamente complessa in quanto è composta da numerose materie prime, sia di origine vegetale che animale, che potrebbero avere interferito nella lettura al NIRs. Probabilmente, per una matrice come il pet food è necessario aumentare il numero di campioni per ottenere una curva di calibrazione più precisa.

In conclusione, è possibile affermare che alcuni pet food per il mantenimento di cani e gatti possano presentare delle carenze per certi aminoacidi, indipendentemente dalla loro qualità o luogo d'acquisto. Sia tra i prodotti cane

che tra i prodotti gatto è stato possibile identificare degli aminoacidi che caratterizzano alcune categorie di mangime, ma si può esprimere con certezza il motivo di tale variabilità. La predizione del profilo amminoacidico dei pet food selezionato per questo studio e analizzato mediante tecnica NIRs non ha sempre dato risultati totalmente soddisfacenti a causa della complessa composizione di tale matrice.

2.7 Bibliografia

- Ahlstrøm, Ø., Baucells, M. D., Dobenecker, B., Hendriks, W., Hesta, M., Iben, C., Nguyen P., Mussa, P., Paragon B. & Zentek J. (2011). Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs. The European Pet Food Industry Federation, (July) :1–75.
- Alomar D., Gallo C., Castaneda M. & Fuchslocher R. (2003). Chemical and discriminant analysis of bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Meat Science*, Numero 63: 441-450.
- Assalco-Zoomark, 2017. Alimentazione E Cura Degli Animali Da Compagnia.
- Berzaghi P. & Riovanto R. (2009). Near infrared spectroscopy in animal science production: principles and applications, *Italian Journal of Animal Science*, 8: 39-62.
- Bokobza L. (1998). Near Infrared Spectroscopy *Journal of Near Infrared Spectroscopy* Vol 6, Issue 1: 3 – 17.
- Boschetti L., Ottaviani M., Facco P., Barolo M., Serva L., Balzan S. & Novelli E. (2013). A correlative study on data from pork carcass and processed meat (Bauernspeck) for automatic estimation of chemical parameters by means of near-infrared spectroscopy, *Meat Science* Volume 95, Issue 3, November 2013: 621-628.
- Byrne C. E., Downey G., Troy D. J. & Buckley D.J. (1998). Non-destructive prediction of selected attributes of beef by near-infrared reflectance spectroscopy between 750 and 1098 nm. *Meat Science*, Vol. 49, Number 4: 399-409.
- Council of Europe (2005). *European Pharmacopeia*, 5th edition - pp. 86-92. Ed. Strasbourg.
- Cozzolino D., Martins V. & Murray I. (2002). Visible and near infrared spectroscopy of beef longissimus dorsii muscle as a means of discriminating between pasture and corn silage feeding regimes. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, Number 10: 187-193.
- Czuba B. & Vessey D. A. (1981) Identification of a unique mammalian species of choyl-CoA: amino acid N-acyltrans-ferase. *Biochimica Biophysica Acta* 665: 612–614.
- Dalle Zotte A., Berzaghi P., Jansson L. M. & Andrighetto I. (2006). The use of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) in the prediction of chemical composition of freeze-dried egg yolk and discrimination between different n-3 PUFA feeding sources. *Animal Feed Science Technology*, Number 128: 108-121.
- De la Haba M. J., Garrido-Varo A., Guerrero-Ginel J. E. & Pea rez-Marian D. C. (2006). Near-Infrared Reflectance Spectroscopy for Predicting amino acid content in Intact Processed Animal Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7703-7709.
- De la Roza B., Martinez A., Madrono S. & Argamenteira A. (2002). Measurement of metabolic parameters in lactating dairy cows by near infrared reflectance

- spectroscopy analysis using cattle fecal sample. In *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference*, ed. Davies A.M.C. and Cho R.K. NIR Publication, Chichester, UK: 371-374.
- DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE (82/475/CEE) del 23 giugno 1982 che fissa le categorie di ingredienti che possono essere utilizzate per l'indicazione della composizione degli alimenti composti per gli animali familiari, (2), 27-28.
- FEDIAF, 2011. Code of good labelling practice for pet food.
- FEDIAF, 2017. Nutritional Guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.
- González-Martín I., Alvarez-García N. & González-Cabrera J. (2006). Near-infrared spectroscopy (NIRS) with a fibre-optic probe for the prediction of the amino acid composition in animal feeds. *Talanta*, 69: 706-710.
- Gray C. M., Sellon R. K. & Freeman L. M., (2004). Nutritional adequacy of two vegan diets for cats. *Vet Med Today, JAVMA*, vol 225, No. 11: 1670-1675.
- Haeusler A., Rode M. & Paul C. (2002). Compositional analysis near infrared diode array instrumentation on forage harvester. In *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference*, ed. Davies A.M.C. and Cho R.K. NIR Publication, Chichester, UK: 345-346.
- Hand M. S., Thatcher C. D., Remillard R. L., Roudebush P. & Novotny, B. J. (2010). *Small Animal Clinical Nutrition*. 5th Edition, Mark Morris Institute.
- Hildrum K. I., Isaksson T., Naes T., Nilsen B. N, Rodbotten M. & Lea P. (1995). Near infrared reflectance spectroscopy in the prediction of sensory properties of beef. *J. Near Infrared Spectroscopy*, Number 3: 81-87.
- Hoffman P. C., Brehm N. M., Combs D. K., Bauman L. M, Peters J. B. & Undersander D. J. (1999). Predicting the Effect of Proteolysis on Ruminal Crude Protein Degradation of Legume and Grass Silages Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, Number 82: 756-763.
- 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. *JAVMA.*, Vol. 247: 385–392.
- Knight A. & Leitsberger M. (2016). Vegetarian versus Meat-Based Diets for Companion Animals. *Animals*, 6(9), 57: 2-17.
- Kovalenko I. V. (2005). Determination of amino and fatty acid composition of soybeans using near-infrared spectroscopy, *Retrospective Theses and Dissertations*. Paper 1245: 1-104.
- Leroy B., Lambotte S., Dotreppe O., Lecocq H., Istasse L. & Clinquart A. (2003). Prediction of technological and organoleptic properties of beef *Longissimus thoracis* from near infrared reflectance and transmission spectra. *Meat Science*, Number 66: 45-54.
- Morris J. G. & Rogers Q. R. (1978a) Ammonia intoxication in the near-adult cat as a result of a dietary deficiency of arginine. *Science* 199: 431–432.

- Morris J. G. & Rogers Q. R. (1978b) Arginine: an essential amino acid for the cat. *Journal of Nutrition* 108: 1944–1953.
- Morris J. G., Rogers Q. R., Kim S. W. & Backus R. C. (1994) Dietary taurine requirement of cats is determined by microbial degradation of taurine in the gut. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 359: 59–70.
- Morris J. G. (2002). Idiosyncratic nutrient requirements of cats appear to be diet-induced evolutionary adaptations. *Nutrition Research Reviews*, 15(1): 153-168.
- Murray I. (1986). Near Infrared Reflectance Analysis of Forages, Recent Advanced in Animal Nutrition: 141-156.
- Nelson D. L. & Cox M. M. (2006). I Principi di Biochimica di Lehninger, 4° edizione - Capitolo 14, pp.555-561. Ed. Zanichelli.
- Norris K. H., Barnes R. F., Moore J. E. & Shenk J. S. (1976). Predicting forage quality by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal Science*. Vol. 43, Number 4: 889-897.
- NRC (2006). Nutrient requirements of Dogs and Cats.
- Osborne G. (2000). Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Ed. Robert A., Mayers C., John Wiley & Sons Ltd, Chichester: 1-13.
- Ottavian M., Fasolato L., Serva L., Facco P. & Barolo M. (2014). Data Fusion for Food Authentication: Fresh/Frozen–Thawed Discrimination in West African Goatfish (*Pseudupeneus prayensis*) Fillets *Food Bioprocess Technol* (2014) 7: 1025.
- Pearson T. C., Wicklow D. T., Maghirang E. B., Xie F. & Dowell F. E. (2001). Detecting Aflatoxin in single corn kernels by transmittance and reflectance spectroscopy. *Transactions of ASAE*, Vol. 44(5): 1247-1254.
- REGOLAMENTO (CE) N. 152/2009 DELLA COMMISSIONE del 27 gennaio 2009 che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali.
- REGOLAMENTO (CE) N. 1774/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 3 ottobre 2002 recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano, 1–95.
- REGOLAMENTO (CE) N. 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.
- REGOLAMENTO (CE) N. 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 22 settembre 2003 sugli Additivi Destinati all'Alimentazione Animale., 4, 29–43.
- REGOLAMENTO (CE) N. 767/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 13 luglio 2009 sull'immissione sul mercato e sull'uso dei mangimi, che

modifica il regolamento (CE) n. 1831/2003 e che abroga le direttive 79/373/CEE del Consiglio, 80/511/CEE della Commissione, 82/471/CEE del Consiglio, 83/228/CEE del Consiglio, 93/74/CEE del Consiglio, 93/113/CE del Consiglio e 96/25/ CE del Consiglio e la decisione 2004/217/CE della Commissione.

REGOLAMENTO (UE) N. 68/2013 DELLA COMMISSIONE del 16 gennaio 2013 concernente il catalogo delle materie prime per mangimi.

Rinnan A., Van den Berg F., Balling S. & Trendera E. (2009). Review of the most common pre-processing techniques for near – infrared spectra in Analytical Chemistry, Vol 285, No 10.

Ripoche A. & Guillard A. S. (2001). Determination of fatty acid composition of pork fat by Fourier transform infrared spectroscopy. Meat Science, Number 58: 299-304.

Rogers Q. R., Morris J. G. & Freedland R. A. (1977) Lack of hepatic enzymatic adaptation to low and high levels of dietary protein in the adult cat. Enzyme 22: 348–356.

Saccare S. (2016). Processo di estrusione applicazioni nutrizionali, (May): 51–54.

Salaun F., Blanchard G., Le Pailh L., Roberti F. & Niceron C. (2017). Impact of macronutrient composition and palatability in wet diets on food selection in cats. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 101(2): 320–328.

Sørensen L. K. (2004). Prediction of Fermentation Parameters in Grass and Corn Silage by Near Infrared Spectroscopy, Journal of Dairy Science, Number 87: 3826-3835.

Tsenkova R. & Toyoda K. (1999). Near-Infrared Spectroscopy for Dairy Management: Measurement of Unhomogenized Milk Composition, Journal of Dairy Science Vol. 82, Number 11: 2344-2351.

Yamka R. M., Mcleod K. R., Harmon D. L., Freetly H. C. & Schoenherr W. D. (2015). The impact of dietary protein source on observed and predicted metabolizable energy of dry extruded dog foods 1. JAVMA, Vol 226, No. 7, April 1: 204-212.

Yongliang L., Brenda G. L., Windham W. R., Realini C. E., Pringle T. D. D. & Duckett S. (2003). Prediction of color, texture, and sensory characteristics of beef steaks by visible and near infrared reflectance spectroscopy. A feasibility study. Meat Science, Number 65: 1107-1115.

Capitolo 3

Profilo degli acidi grassi di 22 mangimi completi e 21 mangimi complementari per cani e gatti

3.1 Abstract

I lipidi rappresentano una componente fondamentale nella dieta di cani e gatti, e all'interno dei mangimi completi devono essere inclusi gli acidi grassi essenziali nelle quantità indicate nelle linee guida nutrizionali di FEDIAF (2018) per soddisfare i loro fabbisogni. In commercio si possono inoltre reperire numerosi mangimi complementari per l'integrazione di acidi grassi omega-3 e omega-6 destinati a migliorare la condizione di salute dell'animale. Spesso però, le indicazioni riportate nell'etichetta del pet food sono generiche e lasciano molti dubbi circa fonti le lipidiche utilizzate e l'effettiva concentrazione di determinati nutrienti. Pertanto, l'obiettivo del presente studio è stato quello di analizzare il profilo lipidico di diverse categorie di pet food completi secchi (n=22; 5 superpremium, S; 5 grocery, G; 5 grain free, GF; 4 vegetariani, V; 3 dietetici, D) e complementari (n=21; 9 olio di salmone, OS; 4 olio di fegato di merluzzo, OM; 4 integratori a base di oli di pesce, IOP; 4 integratori a base di oli vegetali, IOV) per valutare il rispetto delle raccomandazioni FEDIAF, per verificare l'affidabilità dei valori riportati in etichetta e per stimare le dosi degli omega-3 EPA e DHA apportate dagli integratori.

I mangimi selezionati sono stati sottoposti ad analisi chimica presso il Laboratorio Chimico NIRs/XRF dell'Università degli Studi di Padova (sede di Legnaro) e ad analisi statistica descrittiva.

Per quanto riguarda i mangimi completi, le analisi hanno dimostrato che il profilo acidico dei mangimi completi selezionati è variabile, ma in tutti i casi i valori minimi FEDIAF sono stati rispettati (tranne l'acido arachidonico, assente in tutti i prodotti, ma ulteriori indagini sono necessarie per confermare tale esito). Gli acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA) maggiormente presenti nelle crocchette analizzate sono rispettivamente gli acidi palmitico e stearico, oleico e linoleico. In particolare, gli SFA sono risultati presenti in quantità

inferiori nelle crocchette della categoria V ($2.49 \pm 0.63\%SS$) e maggiori nella categoria S ($5.48 \pm 1.83\%SS$); al contrario, nei V si è registrato il maggior quantitativo di PUFA, specialmente di acido linoleico (LA, $4.67 \pm 1.70\%SS$). La vaghezza della composizione nelle etichette delle crocchette selezionate non ha permesso di prevedere con accuratezza il contenuto di omega-3 e omega-6, ed è stato dimostrato che la presenza di ingredienti a base di pesce non è garanzia di un contenuto elevato di EPA e DHA.

Anche il profilo acido dei mangimi complementari è risultato molto variabile, nonostante gli ingredienti riportati in etichetta fossero più specifici. L'acido grasso maggiormente riscontrato è l'acido palmitico (dal 6.18% negli OS all'11.67% negli IOP), mentre il MUFA maggiormente presente nei campioni analizzati è l'acido oleico (dal 6.99% negli IOP al 40.68% negli OS). I prodotti più ricchi di LA si sono rivelati gli IOV ($30.91 \pm 15.63\%SS$) e quelli di EPA+DHA gli IOP ($41.48 \pm 27.33\%SS$). L'estrema variabilità del contenuto di omega-3 potrebbe dipendere dal tipo di pesce utilizzato. È stato inoltre dimostrato che, nella maggior parte dei casi, le dosi di EPA e DHA consigliate dai produttori di oli di salmone non intendono raggiungere dosaggi terapeutici specifici, diversamente dagli integratori a base di olio di pesce in forma di gocce e perle. Per tali prodotti la posologia andrebbe stabilita non solo in base al peso dell'animale, ma anche tenendo conto della patologia che si intende trattare.

Infine, si è visto che la maggior parte dei valori indicati nelle etichette dei prodotti selezionati non è in accordo con i risultati delle analisi di laboratorio, superando una differenza tollerabile dovuta alla variabilità delle materie prime.

La composizione lipidica dei pet food analizzati ha dimostrato una notevole variabilità all'interno delle varie categorie. Nonostante ciò, nessun mangime completo è risultato carente di acidi grassi essenziali per il cane e per il gatto. La posologia nell'etichetta dei mangimi complementari è imprecisa e gli oli di salmone non forniscono dosi terapeutiche. Esiste un'enorme discordanza fra i valori dichiarati e quelli analizzati, pertanto la legge dovrebbe prevedere dei limiti di tolleranza e l'obbligo di dichiarare il contenuto di acidi grassi almeno per i mangimi complementari.

3.2 Abbreviazioni

AA	Acido arachidonico
DGLA	Acido diomo- γ -linolenico
DHA	Acido docosaesaenoico
DPA	Acido docosapentaenoico
EFA	Acidi grassi essenziali
EM	Energia metabolizzabile
EPA	Acido eicosapentaenoico
ETE	Acido eicosatrienoico
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
FEDIAF	European Pet Food Industry Federation
GLA	Acido γ -linolenico
LA	Acido linoleico
ALA	l'acido α -linolenico
MUFA	Acidi grassi monoinsaturi
PUFA	Acidi grassi polinsaturi
SFA	Acidi grassi saturi
SS	Sostanza secca

3.3 Introduzione

3.3.1 I lipidi

I lipidi sono un gruppo di sostanze ad elevato contenuto energetico e svolgono importanti funzioni sia strutturali che funzionali in tutti gli esseri viventi; in forma solida sono chiamati grassi, mentre in forma liquida sono chiamati oli. Gli acidi grassi rappresentano l'elemento costitutivo di quasi tutti i lipidi e apportano caratteristiche specifiche ai grassi introdotti con la dieta. Ad esempio, i trigliceridi sono i più importanti tra i lipidi per quanto riguarda lo stoccaggio di energia, mentre i fosfolipidi e gli steroli sono i principali costituenti della membrana cellulare. A causa della loro insolubilità in acqua, caratteristica essenziale per molte funzioni di membrana, i lipidi devono essere trasportati nel sangue da proteine specifiche che formano nel complesso le lipoproteine (Gurr et al., 2002; Lehninger et al., 2013).

Gli acidi grassi possono essere classificati in base al numero di atomi di carbonio da cui è composto il loro "scheletro" e il numero di doppi legami carbonio-carbonio ("grado di insaturazione").

A seconda della lunghezza, gli acidi grassi si possono classificare in:

- *a corta catena*: quando il numero di atomi di carbonio è inferiore a 6;
- *a media catena*: quando il numero di atomi di carbonio compreso tra 6 e 12;
- *a lunga catena*: quando il numero di atomi di carbonio è superiore a 12.

In relazione al grado di insaturazione, invece, si definiscono acidi grassi:

- *saturi (saturated fatty acids, SFA)*: quando non presentano doppi legami;
- *insaturi (unsaturated fatty acid, UFA)*: quando sono presenti uno (*monoinsaturi; monounsaturated fatty acids, MUFA*) o più doppi legami (*polinsaturi; polyunsaturated fatty acids, PUFA*) (Lenox, 2015).

3.3.1.1 Acidi grassi saturi

Gli acidi grassi saturi (*saturated fatty acids, SFA*) sono costituiti da una catena carboniosa formata unicamente da legami singoli C-C. Gli acidi grassi saturi sono

rappresentati principalmente nei grassi di origine animale, ma sono presenti anche in quelli di origine vegetale.

I principali acidi grassi saturi a corta catena sono l'*acido butirrico* (4:0), caratteristico del grasso del latte dei ruminanti, e l'*acido caprinico* (6:0) contenuto nel grasso del latte dei ruminanti e negli oli di cocco e di palma. Tra quelli a media-lunga catena invece troviamo l'*acido laurico* (12:0), contenuto nell'olio di cocco e palma, l'*acido miristico* (14:0), presente in tutti gli oli vegetali e animali in piccole quantità, e i più diffusi *acido palmitico* (16:0) e *acido stearico* (18:0), presenti in tutti i grassi animali e oli vegetali (principali componenti dello strutto e del sego) (Cabras & Martelli, 2004; Gurr et al., Harwood, & Frayn, 2002).

3.3.1.2 Acidi grassi insaturi

In base alla posizione del primo doppio legame contando a partire dal gruppo metilico (carbonio definito "omega"), gli acidi grassi insaturi si possono classificare in omega-3, omega-6, omega-7 e omega-9 i quali presentano il doppio legame rispettivamente tra il carbonio 3 e 4, 6 e 7, 7 e 8, 9 e 10 (Lenox, 2015). Inoltre, in base alla posizione degli atomi di idrogeno associati agli atomi di carbonio coinvolti nel doppio legame, gli acidi grassi insaturi si possono suddividere in cis e trans; nel primo caso gli atomi di idrogeno si trovano dalla stessa parte rispetto al doppio legame, mentre nel caso degli acidi grassi trans si trovano in posizione opposta. La stereo-isomeria del doppio legame è estremamente importante in quanto influisce sulle caratteristiche chimico-fisiche dei grassi. Negli acidi grassi insaturi di tipo cis, il doppio legame induce nella molecola un ripiegamento che diventa progressivamente più evidente man mano che aumenta il grado di insaturazione. Tale ripiegamento permette un aumento della fluidità delle membrane biologiche: maggiore è il numero di doppi legami presenti negli acidi grassi che costituiscono i fosfolipidi di membrana, maggiore sarà la fluidità della membrana stessa. La fluidità è poi strettamente correlata con la struttura e la funzione della membrana cellulare (Case et al., 2010; NRC, 2006). La maggior parte degli acidi grassi polinsaturi presenti in natura sono di tipo cis, mentre i doppi legami di tipo trans sono più rari. Questi ultimi sono presenti nel latte dei ruminanti dove la loro presenza è dovuta al metabolismo dei batteri ruminali, oppure si formano durante

processi di idrogenazione dei grassi alimentari (Cabras & Martelli, 2004; Gurr et al., 2002).

Gli acidi grassi monoinsaturi (*monounsaturated fatty acids*, MUFA) più comuni sono l'*acido palmitoleico* (16:1 n-7) e l'*acido oleico* (18:1 n-9), presenti in tutti i grassi animali e oli vegetali. Essi derivano rispettivamente dall'acido palmitico e dall'acido stearico per opera dell'enzima Δ -9-desaturasi; tale enzima, essendo specifico per la posizione 9 della catena, origina acidi grassi con un doppio legame in questa posizione. Un altro acido grasso monoinsaturo ampiamente rappresentato nel regno vegetale è l'*acido erucico* (22:1 n-9), caratteristico dell'olio di colza in cui può rappresentare fino al 50% degli acidi grassi (Cabras & Martelli, 2004).

Gli acidi grassi polinsaturi (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) più comuni della serie omega-3 sono: l'*acido α -linolenico* o ALA (18:3 n-3), l'*acido stearidonico* (18:4 n-3), l'*acido eicosatetraenoico* (20:4 n-3), l'*acido eicosapentaenoico* o EPA (20:5 n-3), l'*acido docosapentaenoico* o DPA (22:5 n-3), l'*acido docosaesaenoico* o DHA (22:6 n-3). Alcuni omega-3 sono tipici del regno acquatico, in particolare EPA e DHA che sono ampiamente rappresentati nelle alghe e nei pesci, mentre altre fonti come ad esempio le noci, i semi e gli oli vegetali contengono principalmente ALA. (Cabras & Martelli, 2004).

Gli acidi grassi polinsaturi più importanti della serie omega-6, invece, sono l'*acido linoleico* o LA (18:2), l'*acido γ -linolenico* o GLA (18:3), l'*acido diomo- γ -linolenico* o DGLA (20:3), e l'*acido arachidonico* o AA (20:4). Il capostipite della serie è LA di cui la miglior fonte sono gli oli vegetali come l'olio di mais, l'olio di soia e l'olio di cartamo; l'AA invece è presente soprattutto nei grassi animali, mentre il GLA si trova principalmente nell'olio di ribes nero, di borragine, di enotera e può essere allungato a DGLA, componente minore dei fosfolipidi animali (Cabras & Martelli, 2004).

3.3.2 Metabolismo e acidi grassi essenziali nel cane e nel gatto

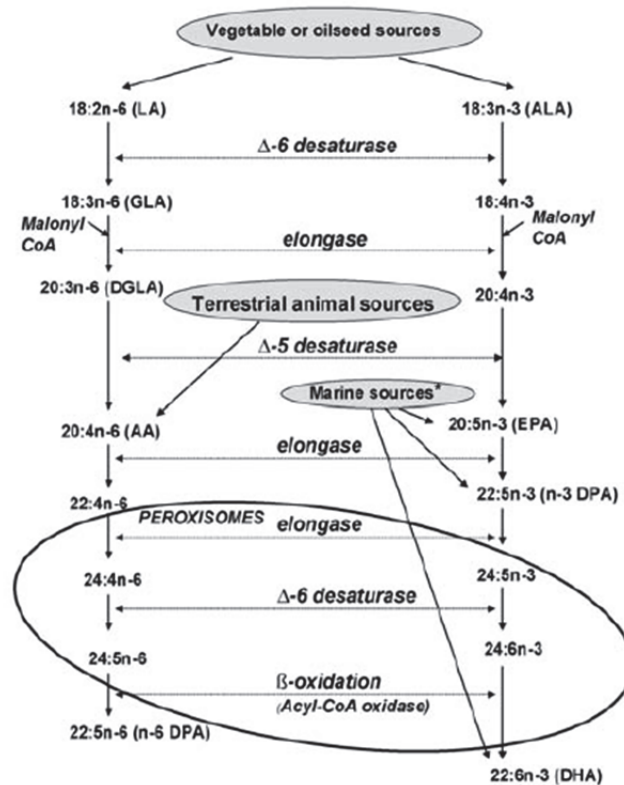
I mammiferi, ad eccezione di alcuni ruminanti, possono sintetizzare gli acidi grassi saturi a partire dal glucosio o dagli amminoacidi grazie ad un precursore comune, l'acetil-CoA. I prodotti di questa sintesi sono gli acidi grassi saturi palmitico e

stearico, i quali possono venire successivamente desaturati in monoinsaturi, rispettivamente palmitoleico e oleico, ad opera dell'enzima Δ -9-desaturasi (NRC, 2006). Gli enzimi coinvolti nelle reazioni di sintesi degli acidi grassi sono più o meno attivi a seconda delle caratteristiche della dieta somministrata, ovvero sono più attivi con diete a basso contenuto di grassi, mentre la loro attività è soppressa quando l'apporto lipidico è elevato. Infatti, gli animali alimentati con diete ricche di grassi non sintetizzano acidi grassi ad un tasso elevato, poiché utilizzano quelli apportati con la dieta (Case et al., 2010; NRC, 2006).

Diversamente dagli animali, le piante possiedono gli enzimi necessari alla sintesi degli acidi grassi omega-6 e omega-3, cioè gli enzimi Δ -12- e Δ -15-desaturasi. L'enzima Δ -12-desaturasi, presente nei cloroplasti di tutte le piante, a partire dall'acido oleico forma LA attraverso l'inserimento di un doppio legame aggiuntivo tra il già esistente doppio legame n-9 e l'estremità metilica. L'enzima Δ -15-desaturasi, invece, è presente nei cloroplasti soprattutto di piante marine, fitoplancton e solo di alcune piante terrestri, e catalizza la reazione attraverso la quale avviene l'interconversione di omega-6 in omega-3, cioè a partire da LA si forma ALA. Diverse piante marine possono inserire ulteriori doppi legami nell'ALA con conseguente allungamento della catena e formazione di acidi grassi come EPA e DHA, mentre nessuna pianta è in grado di convertire LA in AA. Per questo motivo i prodotti di origine marina sono ricchi dei derivati di ALA e nessuna pianta apporta AA, il quale è presente esclusivamente in prodotti di origine animale (Bauer, 2006b). Poiché gli animali mancano di entrambe le desaturasi Δ -12 e Δ -15, LA ed ALA sono considerati essenziali (*essential fatty acid*, EFA), cioè non possono essere sintetizzati in quantità sufficienti a soddisfarne la richiesta endogena e quindi devono essere apportati con la dieta. Inoltre, data la mancanza della Δ -15-desaturasi, omega-6 e omega-3 non possono essere interconvertiti negli animali (NRC, 2006). Alcuni acidi grassi, pur essendo normalmente sintetizzati dall'organismo, in determinati stadi di vita la loro sintesi non è sufficiente a prevenirne la carenza e dunque sono considerati "condizionatamente essenziali". Ciò avviene durante la gravidanza e l'allattamento in cui è necessario provvedere alla somministrazione di tali acidi grassi nella dieta (Bauer, 2008).

Negli animali a partire dagli omega-6 e omega-3 assunti si verificano ulteriori conversioni metaboliche, descritte schematicamente nella [Figura 1](#). Il primo step è la desaturazione regolata dall'enzima Δ -6-desaturasi che aggiunge un doppio legame al sesto carbonio partendo dal gruppo carbossilico. Questo enzima non presenta specificità per un particolare tipo di acido grasso e agisce quindi a partire da LA o da ALA. Per questo motivo entrambi gli acidi grassi competono per il legame con l'enzima e le due vie metaboliche di LA e ALA, pur comprendendo fondamentalmente gli stessi enzimi, sono distinte e non intercambiabili (Dunbar & Bauer, 2002). L'acido linoleico n-6 viene desaturato a GLA, il quale viene successivamente allungato da un enzima elongasi a DGLA che a sua volta viene desaturato dall'enzima Δ -5-desaturasi a formare l'AA. Allo stesso modo, l'ALA viene desaturato, allungato e nuovamente desaturato dagli stessi enzimi citati precedentemente, e da tali reazioni derivano EPA, DPA e DHA. Tuttavia, l'efficienza della sintesi dei derivati dell'ALA diminuisce lungo la cascata, quindi la conversione di ALA in EPA è limitata e in DHA è ancora minore, tanto che nel cane il processo è considerato inefficiente e nel gatto praticamente inesistente. Per questo motivo EPA e DHA devono essere forniti con la dieta (Lenox, 2015).

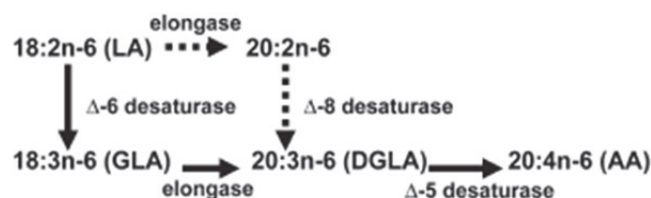
Figura 0. Descrizione schematica della via di desaturazione ed elongazione degli omega-3 e omega-6. Notare che le due vie utilizzano gli stessi enzimi (Fonte: Bauer, 2006b).



Dagli acidi grassi EPA e AA ricavati dal metabolismo rispettivamente di ALA e LA derivano gli *eicosanoidi*, un gruppo di sostanze prodotte e rilasciate dalle membrane cellulari in risposta a traumi fisici o chimici ed implicate nella risposta infiammatoria ed immunitaria. I quattro principali tipi di eicosanoidi sono prostaglandine (PG), prostacicline, trombossani e leucotrieni (LT). Da AA attraverso le vie enzimatiche della ciclossigenasi e lipossigenasi derivano rispettivamente le prostaglandine della serie 2 (PGE2) e i leucotrieni della serie 4 (LTB4) che hanno un ruolo proinfiammatorio. Anche l'EPA è un substrato degli stessi enzimi e può quindi inibire il metabolismo dell'AA attraverso competizione per la stessa via enzimatica (NRC, 2006). Dall'EPA derivano, però, le prostaglandine della serie 3 (PGE3) e i leucotrieni della serie 5 (LTB5) che presentano un'attività infiammatoria minore e la loro sintesi ha una scarsa o assente efficienza (Case et al., 2010). Questo meccanismo suggerisce che un aumento dell'apporto dietetico di omega-3 può spostare la produzione di eicosanoidi verso quelli meno infiammatori (James et al., 2000).

Le vie metaboliche descritte dimostrano quindi come LA sia l'unico omega-6 essenziale nel cane, in quanto se viene apportato con la dieta nelle giuste quantità, l'animale non necessiterà di integrazione di GLA o AA. Invece, il gatto non sintetizza adeguate quantità di AA durante tutti gli stadi della vita, anche se le giuste dosi di LA vengono fornite con la dieta. I primi studi condotti sul metabolismo degli EFA nei gatti hanno rivelato la loro incapacità di convertire LA in AA e hanno quindi suggerito una loro probabile mancanza dell'enzima Δ -6-desaturasi necessario per la reazione (River et al., 1975). Altri studiosi hanno poi confermato e ampliato queste osservazioni e hanno concluso che i gatti dispongono di desaturasi Δ -5 e Δ -8 che consentono un percorso alternativo di sintesi dell'AA, come illustrato nella [Figura 2](#) (Sinclair et al., 1981). Infatti, quando i gatti venivano nutriti con una dieta ricca di acido linoleico, le concentrazioni plasmatiche ed epatiche di AA erano simili a quelle di gatti alimentati con diete contenenti AA. Sulla base di questi dati, sembra che i gatti siano in grado di sintetizzare AA da LA, anche se non è stata fornita alcuna prova di una via alternativa di sintesi (Bauer, 2006b). La prova dell'attività limitata della Δ -6-desaturasi nei gatti, invece, è stata confermata mediante gascromatografia e la spettrometria di massa effettuate su fegato e cervello di gatti alimentati con diete completamente prive di AA (Pawlosky et al., 1994).

Figura 2. Possibile via alternativa di sintesi dell'AA da LA. Come si può notare la via utilizza l'enzima Δ -8-desaturasi che agisce in alternativa all'enzima mancante, a partire da un acido grasso (C 20:2 n-6) derivato da LA in seguito a suo allungamento (Fonte: Bauer, 2006b).



Dati gli studi svolti in merito, AA è considerato condizionatamente essenziale per il gatto, cioè è necessaria una sua integrazione durante alcune fasi critiche della vita dell'animale ovvero durante la gravidanza e lo sviluppo neonatale (Case et al., 2010). Infatti, diversi studi hanno dimostrato come le gatte necessitano di

integrazione dietetica di AA per poter portare a termine una gravidanza normale, mentre non è necessaria per il concepimento né per la riproduzione del maschio, il quale è in grado di sintetizzare AA nei testicoli (Bauer, 2006b). Esistono tuttavia raccomandazioni nutrizionali per l'AA nella dieta felina, in quanto resta comunemente considerato essenziale per i gatti in tutte le fasi di vita, ma le quantità dietetiche richieste sono tipicamente basse e facilmente soddisfatte (Bauer, 2016).

L'ALA è considerato essenziale sia per il cane che per il gatto, sebbene il loro fabbisogno non sia stato ben definito. I suoi derivati vengono scarsamente sintetizzati sia nel cane che nel gatto, quindi EPA e soprattutto DHA sono di conseguenza considerati "condizionatamente essenziali" durante la riproduzione e l'accrescimento (Case et al., 2010). Studi effettuati sui cani hanno dimostrato che la gravidanza determina uno status di EFA ridotto proporzionalmente al numero di feti. In particolare, è necessario incrementare l'apporto di EFA durante la gestazione e l'allattamento per consentire il passaggio di un'adeguata quantità di EFA ai feti ed ai neonati attraverso la placenta e il latte (Case et al., 2010). Gli EFA svolgono funzioni importanti nell'organismo, come quella del DHA nello sviluppo cerebrale e retinico in cuccioli e gattini. Il DHA raggiunge elevate concentrazioni nel tessuto cerebrale e in particolar modo nella retina del cane e del gatto durante i primi due mesi di vita, in cui avviene la massima crescita e maturazione del cervello, suggerendo il ruolo fondamentale del DHA in tali tessuti (Heinemann & Bauer, 2006). Inoltre, è stato dimostrato che cuccioli di 12 settimane di vita migliorano nettamente la loro funzionalità e sensibilità retinica quando alimentati con diete contenenti DHA nella vita prenatale e postnatale rispetto a cuccioli alimentati con diete contenenti ALA e non DHA (Heinemann et al., 2005). Per questi motivi l'apporto di DHA sia prenatale che postnatale è considerato essenziale in cuccioli e gattini e il modo migliore per fornirlo ai feti ed ai neonati è attraverso l'integrazione di tale acido grasso nella dieta della madre (Case et al., 2010). Infatti, le femmine hanno limitata capacità di arricchire il loro latte con DHA ed EPA a partire da ALA alimentare ed inoltre studi recenti hanno dimostrato che i cuccioli appena nati possono convertire l'ALA presente nel latte in DHA, ma l'efficienza di conversione è molto bassa e perdono totalmente questa capacità

dopo lo svezzamento (Bauer, 2006b; Heinemann & Bauer, 2006). Gli effetti del DHA sullo sviluppo neurologico sono stati studiati anche testando la capacità di apprendimento e memoria; entrambe le capacità sono significativamente aumentate in cuccioli alimentati con diete ricche in DHA durante la gestazione, l'allattamento e lo svezzamento, rispetto ad un'alimentazione a basso contenuto di DHA negli stessi periodi. Questo ha dimostrato come l'apporto precoce di DHA è essenziale per l'ottimale sviluppo neurologico (Kelley et al., 2005). Sebbene i cani e, presumibilmente, i gatti siano capaci di una certa conversione dell'ALA nei suoi derivati, essa come descritto, è inefficiente e quindi è consigliato includere il DHA nelle diete formulate per cani e gatti in accrescimento (Case et al., 2010).

3.3.3 Fabbisogni di grassi nel cane e nel gatto

FEDIAF (*Fédération Européenne De l'Industrie des Aliments pour Animaux Familiers*) è l'organismo europeo che stabilisce e rinnova annualmente le "Linee guida nutrizionali per pet food completi e complementari per cani e gatti" (2018), e in tale documento sono definiti anche i valori minimi di grassi totali ed EFA che devono essere contenuti all'interno dei pet food, nonché i valori massimi di LA per il cane (Figura 3 e 4)

Inoltre, poiché n-3 e n-6 competono per la stessa via metabolica, va considerato che la quantità di ALA nel mangime deve essere determinata in relazione ai livelli di LA. Se LA >1%, la quantità di ALA deve essere aumentata per mantenere il giusto equilibrio tra le due famiglie di acidi grassi. Per questo il testo di riferimento per la nutrizione del cane e del gatto, "Nutrient Requirements of Dogs and Cats" (NRC, 2006), non riporta quantitativi minimi raccomandati di ALA, ma consiglia di mantenere il rapporto LA:ALA tra 2.6 e 26. NRC ha inoltre stabilito che il limite massimo di EPA+DHA in cuccioli, cani adulti e cani in riproduzione è pari a 2.8 g/1000 kcal.

Figura 3. Valori minimi e massimi raccomandati da FEDIAF (2018) per il cane. I valori sono espressi in unità per 1000 kcal di energia metabolizzabile.

Nutrient	UNIT	Minimum Recommended				Maximum (L) = EU legal limit (given only on DM basis, see table III-3,) (N) = nutritional
		Adult based on MER of		Early Growth (< 14 weeks) & Reproduction	Late Growth (≥ 14 weeks)	
		95 kcal/kg ^{0.75}	110 kcal/kg ^{0.75}			
Fat*	g	13.75	13.75	21.25	21.25	-
Linoleic acid (ω -6) *	g	3.82	3.27	3.25	3.25	Early Growth: 16.25 (N)
Arachidonic acid (ω -6)	mg	-	-	75.00	75.00	-
Alpha-linolenic acid (ω -3) *	g	-	-	0.20	0.20	-
EPA + DHA (ω -3) *	g	-	-	0.13	0.13	-

Figura 4. Valori mini raccomandati da FEDIAF (2018) per il gatto. I valori evidenziati in blu sono espressi in unità per 1000 kcal di energia metabolizzabile.

Nutrient	UNIT	Minimum Recommended			Maximum (L) = EU legal limit (given only on DM basis, see table III-4,) (N) = nutritional
		Adult based on MER of		Growth & Reproduction	
		75 kcal/kg ^{0.67}	100 kcal/kg ^{0.67}		
Fat*	g	22.50	22.50	22.50	-
Linoleic acid (ω -6) *	g	1.67	1.25	1.38	-
Arachidonic acid (ω -6)	mg	20.00	15.00	50.00	-
Alpha-linolenic acid (ω -3) *	g	-	-	0.05	-
EPA + DHA (ω -3) *	g	-	-	0.03	-

Un insufficiente contenuto di grassi nella dieta può portare a deficienze sia energetiche che di EFA, anche come conseguenza di una diminuita assunzione di cibo dovuta ad una scarsa appetibilità e ad un peggioramento della texture del pet food (Case et al., 2010). Segni di carenza di EFA includono disordini dermatologici, riproduttivi (e.g. degenerazione tubuli testicolari, nelle gatte difficoltà a portare a termine la gravidanza) e scarso accrescimento. La cute è particolarmente vulnerabile alla deficienza di EFA, tanto che nei cani la mancanza di LA determina alterazione della barriera lipidica cutanea con conseguente scadente qualità e perdita di pelo, lesioni cutanee e inefficiente guarigione delle ferite. La cute diventa pruriginosa, unta, suscettibile alle infezioni e, in alcuni casi, sono riportati desquamazione, essudazione interdigitale e otiti esterne. La mancanza di LA nei gatti esita negli stessi segni dermatologici, e in più i gattini possono sviluppare degenerazione grassa del fegato, deposito di grassi nel rene e insufficiente accrescimento (Case et al., 2010).

Il deficit di omega-3 in genere non è accompagnato da sintomatologia clinica così evidente come per la carenza di omega-6, e generalmente provoca sintomi nervosi

(Lenox, 2015). In altre specie, la deficienza di omega-3 provoca anomalie del sistema nervoso e della retina, diminuita capacità visiva e riduzione della capacità di apprendimento e memoria. Sebbene questi segni non siano stati riportati in cane e gatto, l'alta concentrazione di DHA nel tessuto nervoso e retinico e il suo elevato fabbisogno durante l'accrescimento e la riproduzione, suggeriscono che una carenza di omega-3 nel cane e nel gatto possa provocare sintomi simili (Case et al., 2010).

Quando la dieta è povera di acidi grassi omega-3 e omega-6, i precursori disponibili fungono da metaboliti alternativi all'acido grasso carente per produrre degli acidi grassi particolari che si accumulano nei tessuti (Bauer, 2016). Per esempio, quando è presente una carenza di LA, l'acido oleico sintetizzato dall'organismo viene allungato e desaturato per formare l'acido eicosatrienoico ("mead acid") C20:3 n-9. In umana, il rapporto Mead acid/AA, cioè rapporto triene-tetraeno, è ampiamente utilizzato per identificare le carenze di acidi grassi (Bauer, 2016). Nei gatti, le diete carenti in AA ma che contengono LA determinano la sintesi di un altro acido triene, C20:3 n-6, probabilmente sintetizzato da LA. Similmente, sia nel cane che nel gatto, in assenza di quantità dietetiche sufficienti di DHA, l'acido grasso C22:5 n-6 si accumula nei tessuti del cervello dopo essere stato sintetizzato da AA. In conclusione, l'acido C 20:3 n-9 è usato come marker di carenza di omega-6, mentre l'acido 22:5 n-6 come marker di carenza di omega-3 (Bauer, 2016).

Oggigiorno la carenza di EFA non è comune in cani e gatti alimentati con diete commerciali e si verifica principalmente per assunzione di diete mal-formulate o per mal-conservazione dei mangimi. Infatti, l'esposizione del mangime a temperature ed umidità elevate per lunghi periodi provoca l'ossidazione dei grassi insaturi (rancidità) con conseguente perdita dell'attività degli EFA, ma anche delle vitamine D, E e della biotina. Inoltre, la deficienza di EFA può essere anche una complicazione di malattie quali pancreatite, patologie biliari, epatiche e malassorbimento (Case et al., 2010).

Al contrario, l'eccesso di grassi nella dieta si verifica spesso quando cani e gatti vengono alimentati con diete casalinghe sbilanciate, pet food non idonei al

soggetto, oppure quando vengono aggiunti alla razione giornaliera un'eccessiva quantità di snack commerciali o avanzi da tavola composti da un'elevata percentuale di grassi. Una quantità elevata di grassi nella dieta può provocare a lungo termine obesità e carenza di altri nutrienti essenziali, quale ad esempio la vitamina E. Infatti, la vitamina E è un potente antiossidante che protegge i PUFA dalla rancidità e nel processo protettivo di ossidazione degli acidi grassi essa viene distrutta. Quindi la richiesta endogena di vitamina E aumenta con l'aumentare dei PUFA dietetici (Case et al., 2010). Questo aspetto è estremamente importante quando si effettua un'integrazione di PUFA nella dieta, perché all'aumentare degli acidi grassi polinsaturi dietetici deve aumentare anche la vitamina E apportata con la dieta. Se ciò non avviene, nel gatto si instaura una carenza di vitamina E che provoca pansteatite o "yellow fat disease", nella quale si assiste ad ossidazione del tessuto adiposo (Case et al., 2010; Hand & Lewis, 2010).

I grassi nella dieta rappresentano una fonte concentrata di energia altamente digeribile. Infatti, a parità di peso, i grassi apportano più del doppio della quantità di energia metabolizzabile (EM) rispetto a proteine e carboidrati, ossia 9 kcal/g (NRC, 2006). Sia i cani che i gatti tollerano elevate quantità di grassi dietetici, ma è importante considerare che, poiché gli animali normalmente si alimentano per soddisfare i propri bisogni energetici, il consumo di una razione più energetica comporterà una diminuzione del volume totale di cibo assunto. Pertanto, se i principi nutritivi non sono regolati (aumentati) in relazione alla densità energetica, possono verificarsi carenze nutrizionali (Case et al., 2010). Diete con una densità energetica particolarmente elevata sono utili durante periodi come crescita, gravidanza, lattazione e periodi prolungati di attività fisica perché permettono all'animale di assumere un adeguato apporto calorico senza dover incrementare la quantità di sostanza secca (ss) dell'alimento ingerito. Inoltre, studi svolti su cani coinvolti in attività sportive di tipo endurance hanno dimostrato che la somministrazione di diete ad alto contenuto di grassi promuove la mobilitazione e l'uso di acidi grassi come fonte energetica per un periodo di tempo prolungato, contribuendo al miglioramento della performance sportiva (Case et al., 2010). Al contrario, diete ad alto contenuto energetico devono essere evitate negli animali con vita sedentaria, i quali tendono ad assumerne quantità eccessive data l'elevata

appetibilità, con conseguente rischio di obesità. È importante precisare che diete ricche di grassi andrebbero evitate nei soggetti in accrescimento di taglia grande-gigante poiché, se somministrate *ad libitum*, potrebbero promuovere un elevato tasso di crescita. Il rapido tasso di crescita è stato dimostrato incompatibile con un adeguato sviluppo scheletrico ed è un fattore di rischio per lo sviluppo di diverse patologie muscolo-scheletriche (Blum et al., 1992).

3.3.4 I grassi nella dieta del cane e del gatto

Secondo alcuni studiosi i grassi nella dieta del cane e del gatto andrebbero distinti in *facilitative fats* e *functional fats* (Bauer, 2006a). I grassi “facilitanti” sono grassi saturi (es. palmitico e stearico), monoinsaturi (es. oleico) e idrogenati che vengono rapidamente utilizzati dal cane e dal gatto attraverso il processo di β -ossidazione, grazie al quale viene generata energia sotto forma di ATP utilizzando l’ossigeno. Sono chiamati facilitanti perché aumentano l’appetibilità e la texture del pet food, assicurando quindi l’assunzione dell’energia necessaria e lo stoccaggio nel tessuto adiposo per essere poi utilizzati quando necessario. Essi forniscono energia per il lavoro, per la regolazione della temperatura corporea, per la crescita, per la riproduzione, per la sopravvivenza ed inoltre facilitano l’assorbimento delle vitamine liposolubili. I grassi facilitanti si trovano nella maggior parte delle diete per cani e gatti e non determinano alcun rischio per la salute dell’animale, ad eccezione dell’ obesità che potrebbe svilupparsi nel caso in cui la dieta ne fosse troppo ricca (Bauer, 2006a). I grassi “funzionali” sono invece acidi grassi polinsaturi, generalmente ma non sempre essenziali, quali LA, ALA, EPA, DHA e AA. I grassi funzionali intervengono in numerosi processi che permettono di mantenere la salute di vari apparati e intervengono nel controllo dell’infiammazione e nello sviluppo neurologico (Bauer, 2006a). A differenza dei grassi facilitanti, nella dieta sono richieste piccole quantità di grassi funzionali. La loro integrazione nella dieta diventa fondamentale in alcuni stadi della vita dell’animale, in particolare durante la crescita, lo sviluppo e la riproduzione (Bauer, 2006a).

Le fonti principali di lipidi nella dieta del cane e del gatto possono essere grassi animali, sia terrestri che marini, e oli di numerose piante e semi. La composizione

del grasso derivato da fonti animali generalmente riflette l'apporto dietetico dell'animale stesso; ad esempio, manzi ingrassati al pascolo tendono ad avere una più alta concentrazione tissutale di omega-3 e più bassa di omega-6, rispetto a manzi ingrassati in allevamento con dieta a base di cereali (Lenox, 2015). Questi ultimi, poiché solitamente alimentati con dieta a basso contenuto di grassi, sintetizzano la maggior parte degli acidi grassi a partire da carboidrati e quindi il loro grasso tissutale sarà per la maggior parte costituito da acidi grassi saturi e monoinsaturi (NRC, 2006).

I grassi derivati da fonti marine come pesci, fitoplancton e altre piante marine tipicamente contengono un più alto quantitativo di PUFA della serie omega-3 rispetto agli animali terrestri. La composizione del grasso anche in questo caso dipende dall'alimentazione del pesce; per esempio salmoni di allevamento nutriti con oli vegetali hanno una composizione tissutale di acidi grassi che differisce da salmoni selvatici di cattura. Inoltre, la composizione dei grassi è influenzata anche dalla specie di appartenenza del pesce, dalla stagione e dall'habitat (Lenox, 2015). Le piante terrestri contengono elevate quantità di ALA, ma il loro contenuto di grassi totale è basso e non costituiscono la fonte principale di grassi nella dieta di cani e gatti. Gli oli di semi variano notevolmente nella loro composizione acidica e un dato acido grasso è spesso prevalente come caratteristico della sua particolare origine vegetale. Quindi, gli oli di semi possono essere ricchi in ALA o LA e alcuni conterranno variabili quantità di entrambi (NRC, 2006).

Molte diete commerciali sono arricchite con acidi grassi omega-3 a scopo salutistico e terapeutico. In generale, i mangimi completi per cani e gatti possono presentare contenuti variabili di acidi grassi omega-3 e le concentrazioni superiori si trovano soprattutto nei mangimi dietetici veterinari (Bauer, 2011). La quantità di acidi grassi contenuta nei mangimi non è sempre reperibile in etichetta dal momento che il produttore non è obbligato a dichiarare tale informazione (Reg. EC 767/2009), a meno che non si tratti di mangimi destinati a particolari fini nutrizionali. Infatti, secondo la Direttiva 2008/38/CE tali mangimi, in base al fine nutrizionale dichiarato, devono riportare in etichetta precise indicazioni circa il contenuto o le fonti di specifici acidi grassi, come riportato nella Tabella 1.

Tabella 0. Informazioni che il produttore di mangimi destinati a particolari fini nutrizionali è obbligato a dichiarare in etichetta (Direttiva 2008/38/CE).

Fine nutrizionale del mangime	Informazione obbligatoria in etichetta
Supporto della funzione renale in caso di insufficienza renale cronica	Tenore di acidi grassi essenziali (se aggiunti)
Riduzione di intolleranze a ingredienti e sostanze nutritive	Tenore di acidi grassi essenziali (se aggiunti)
Controllo dell'apporto di glucosio (diabete mellito)	Fonte(i) di acidi grassi a catena di atomi di carbonio breve e media (se aggiunti)
Supporto della funzione epatica in caso di insufficienza epatica cronica	Tenore di acidi grassi essenziali
Regolazione del metabolismo dei lipidi in caso di iperlipidemia	Tenore di acidi grassi essenziali; Tenore di acidi grassi n-3 (se aggiunti)
Ripresa nutrizionale, convalescenza	Tenore di acidi grassi n-3 e n-6 (se aggiunti)
Supporto della funzione dermica in caso di dermatosi ed eccessiva perdita di peli	Tenore di acidi grassi essenziali

Oltre che nei mangimi completi e destinati a particolari fini nutrizionali, gli omega-3 si possono trovare in commercio sotto forma di mangimi complementari destinati all'integrazione di questi specifici nutrienti. Tali prodotti comprendono principalmente olio di pesce (generalmente salmone) in forma liquida o sotto forma di capsule, olio di fegato di merluzzo, olio di semi di lino. L'olio di salmone è il prodotto d'elezione per l'integrazione specifica di EPA e DHA; anche l'olio di fegato di merluzzo viene spesso somministrato come fonte di omega-3, ma rispetto all'olio di pesce presenta una più bassa concentrazione e un differente rapporto EPA:DHA. Inoltre, è essenziale considerare che l'olio di fegato di merluzzo apporta elevate quantità di vitamina A e di vitamina D che possono provocare tossicità quando l'olio viene somministrato alle dosi raccomandate per l'integrazione di EPA e DHA. infine, l'olio di semi di lino è fonte principalmente di ALA e non è quindi raccomandato per l'integrazione di EPA e DHA (Bauer, 2011).

3.3.5 Obiettivo dello studio

Gli acidi grassi presenti nella dieta del cane e del gatto hanno la capacità di migliorare o di compromettere la salute dell'animale e, per questo motivo, si attribuisce sempre maggiore importanza sia alla loro quantità che alla loro qualità. Molte diete di mantenimento sono arricchite di omega-3 provenienti da ingredienti a base di pesce (olio, farine, carni) per fornire EPA e DHA, dato che i loro effetti benefici sono ampiamente riconosciuti. Ciò è spesso enfatizzato in etichetta allo scopo di attirare l'attenzione dei consumatori, i quali sono sempre più attenti alla salute dei loro pet e quindi alla qualità della dieta che essi assumono. In commercio sono inoltre presenti numerosi integratori destinati al supporto nutrizionale di omega-3 e omega-6, tra cui oli di salmone e perle contenenti olio di pesce e oli vegetali.

Per meglio comprendere, da un punto di vista del contenuto lipidico, la qualità di mangimi completi e complementari commercializzati per cane gatto, gli obiettivi principali di questo studio sono stati tre.

Il primo è stato quello di analizzare il profilo degli acidi grassi di mangimi completi per cani e gatti e di verificare che la quantità di grassi totale e la quantità di acidi grassi essenziali fossero in linea coi limiti FEDIAF.

Il secondo obiettivo è stato quello di analizzare il profilo degli acidi grassi di mangimi complementari (oli e perle) destinati all'integrazione di acidi grassi omega-3 e omega-6 nel cane e nel gatto e di verificare la quantità di EPA+DHA che gli oli di salmone e gli integratori a base di olio di pesce apportano se somministrati seguendo le dosi raccomandate dai produttori.

Data la genericità delle informazioni presenti in etichetta e data la variabilità nella composizione acidica delle fonti lipidiche utilizzate nel pet food, un ulteriore obiettivo è stato quello di verificare se la quantità di acidi grassi dichiarata nelle etichette dei mangimi selezionati corrispondesse a quella riscontrata con le analisi di laboratorio.

3.4 Materiali e Metodi

3.4.1 Raccolta prodotti e lettura etichette

Al fine di soddisfare gli obiettivi descritti, sono stati selezionati 22 mangimi completi secchi (crocchette) e 21 mangimi complementari (oli, gocce e perle) destinati all'integrazione di omega-3 e omega-6 nella dieta di cani e gatti.

I mangimi completi sono stati acquistati presso supermercati, pet shop e siti internet; successivamente sono stati assegnati a 5 gruppi (i.e. 5 "grocery", 5 "grain free", 4 "vegetariano", 5 "superpremium", 3 "dietetico") definiti dagli autori in modo da categorizzare differenti tipologie e qualità di prodotti presenti sul mercato.

I mangimi complementari sono stati scelti tra quelli maggiormente venduti secondo i siti di e-commerce più noti in ambito pet food e comprendevano: 9 oli di salmone, 4 oli di fegato di merluzzo, 4 integratori a base di olio di pesce in forma di gocce e perle, e 4 integratori a base di oli vegetali in forma di gocce e perle.

Per ogni prodotto è stata eseguita un'attenta lettura dell'etichetta ed è stato creato un database (Excel, Microsoft) in cui sono stati raccolti i dati riguardanti: specie di destinazione, ingredienti, componenti analitici, dosi consigliate, indicazioni, prezzo.

3.4.2 Analisi di laboratorio

Tutti i prodotti reclutati sono stati sottoposti ad analisi presso il laboratorio NIRs/XRF dell'Università di Padova (dipartimento di Medicina Animale Produzioni e Salute, Legnaro, PD). I mangimi sono stati analizzati secondo la procedura riportata di seguito.

- I. Estrazione lipidica su mangimi completi: sui campioni di crocchette è stata eseguita l'estrazione lipidica preliminare ASE (*Accelerated Solvent Extraction*, estrazione accelerata con solvente) attraverso l'utilizzo di due solventi quali esano e isopropanolo in rapporto 3:2. Il contenuto totale di lipidi è stato determinato con analisi gravimetrica dopo la rimozione del solvente per evaporazione mediante evaporatore Genevac EZ2 a 50 °C.

- II. Preparazione degli esteri metilici: Dopo l'estrazione della sostanza grassa, i campioni sono stati transesterificati utilizzando una soluzione di metanolo e acido solforico (H₂SO₄) al 4% che funge da catalizzatore nella reazione di formazione degli esteri metilici degli acidi grassi (*Fatty Acid Methyl Ester*, FAME). La separazione bifasica è stata ottenuta aggiungendo 0.5 ml di acqua distillata e 1.5 ml di N-eptano ad ogni campione.
- III. Analisi gascromatografica: Gli esteri metilici sono stati quantificati mediante gascromatografo Shimadzu GC 2010 plus, dotato di colonna Omegawax 250 (30m×0.25 μm×0.25 μm; Sigma-Aldrich Co. LLC., Saint Louis, USA) e rivelatore a ionizzazione di fiamma. Il gas utilizzato come *carrier* è stato l'elio ad un flusso costante di 0.8 ml/min e le temperature utilizzate a livello di iniettore e rivelatore erano di 260 °C. I picchi sono stati identificati in base a miscele FAME commercialmente disponibili (37-Component FAME Mix; Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) e i dati ottenuti sono stati espressi come % del totale di FAME rilevati.

3.4.3 Elaborazione dati

I dati ottenuti dalle analisi di laboratorio, espressi in % sul totale degli acidi grassi rilevati, sono stati inseriti in un foglio di calcolo ed elaborati con Excel (Microsoft). Gli acidi grassi identificati nei 22 mangimi completi sono stati poi trasformati in % sulla sostanza secca (SS), considerando la % di SS dei mangimi ottenuta dall'analisi centesimale effettuata per un altro studio svolto sugli stessi prodotti. Solo per 4 mangimi complementari i risultati di laboratorio sono stati trasformati in % SS utilizzando il contenuto di grassi grezzi riportato in etichetta; tali prodotti erano gli unici a dichiarare tra i componenti analitici una quantità ≤80% di grassi grezzi. I dati ottenuti invece dagli altri 17 mangimi complementari non sono stati modificati poiché la quantità di grassi grezzi riportata in etichetta era ≥99%. I risultati riguardanti SFA, MUFA e PUFA contenuti sia nei mangimi completi che complementari sono stati poi confrontati al fine di osservare quanto i dati potessero variare tra i prodotti della stessa categoria e tra categorie diverse. Inoltre, per i mangimi completi è stata calcolata l'energia metabolizzabile (EM), utilizzando i dati reperiti in etichetta, secondo la formula Atwater modificato:

$$EM = \text{proteina grezza \%tq} * 3,5 + \text{grassi grezzi \%tq} * 8,5 + \text{estrattivi inazotati \%tq} * 3,5$$

A partire dall'EM stimata (kcal/100g) è stato possibile calcolare le quantità di EFA assunta dall'animale espressa come g/Mcal allo scopo di verificare se nei mangimi completi selezionati fossero rispettati i limiti minimi e massimi di EFA indicati da FEDIAF.

Al fine di effettuare un confronto tra i risultati di laboratorio e il profilo acido riportato nelle etichette dei mangimi selezionati, i valori degli acidi grassi polinsaturi omega-3 e omega-6 risultati dalle analisi di laboratorio sono stati trasformati in % sul tal quale (tq) e sommati come riportato di seguito:

- Totale n-3: ALA + EPA + DHA + ETE (acido eicosatrienoico, 20:3 n-3);
- Totale n-6: LA + GLA + DGLA + AA.

Dopodiché, è stata calcolata la differenza (Δ , %) tra il dato riportato in etichetta e quello ottenuto dalle analisi di laboratorio svolte nei mangimi completi e nei mangimi complementari. Il calcolo è stato eseguito come riportato di seguito:

$$\left[\frac{\text{ac. grasso ottenuto dalle analisi \% tq} * 100}{\text{ac. grasso riportato in etichetta \% tq}} - 100 \right]$$

Infine, per i mangimi complementari, a partire dai risultati di laboratorio è stata calcolata la quantità di EPA+DHA (mg/d) assunta dall'animale in base alle raccomandazioni del produttore, allo scopo di verificare se le quantità soddisfano le dosi consigliate dalla letteratura disponibile in merito all'integrazione dietetica di tali acidi grassi in specifiche patologie. Come riferimenti sono stati presi in considerazione cani di 5, 15 e 30 kg e per effettuare il calcolo, riportato di seguito, è stato ritenuto che il peso di un ml di olio fosse pari a 0.9 g:

$$(\text{EPA+DHA mg/g} * 0.9 \text{ g} * \text{olio ml/d}).$$

3.5 Risultati

3.5.1 Profilo degli acidi grassi nei mangimi completi e rispetto dei limiti FEDIAF

Le Tabelle 2-4 riportano il contenuto (%SS) di SFA, MUFA e PUFA ottenuti dalle analisi di laboratorio eseguite sui 22 mangimi completi, suddivisi nelle cinque categorie “grocery”, “grain free”, “vegetariano”, “superpremium” e “dietetico”. I risultati ottenuti hanno dimostrato che gli SFA, MUFA e PUFA maggiormente presenti nelle crocchette analizzate sono rispettivamente gli acidi palmitico e stearico (16:0 e 18:0), oleico (18:1 n-9) e linoleico (18:2 n-6). In particolare, gli acidi grassi saturi palmitico e stearico sono presenti in quantità inferiori nelle crocchette della categoria vegetariano; al contrario sono presenti in maggiori quantità nella categoria superpremium (Tabella 2). Altri acidi grassi saturi sono stati rilevati in quantità inferiori, mentre quelli a 4, 6, 8, 10, 12, 15, 22, 23 e 24 atomi di carbonio non sono stati identificati nei mangimi analizzati.

Tabella 2. Grassi totali, acidi grassi saturi totali (SFA) e principali SFA (%SS, media \pm DS) nei mangimi completi analizzati (S=superpremium; G=grocery; GF=grain free; V=vegetariani; D=dietetici).

	S	G	GF	V	D
Grassi tot.	16.03 \pm 2.04	12.45 \pm 3.72	15.07 \pm 3.18	11.85 \pm 3.14	13.45 \pm 2.28
SFA tot.	5.48 \pm 1.83	4.28 \pm 1.14	4.16 \pm 1.27	2.49 \pm 0.63	4.28 \pm 0.95
Palmitico (16:0)	3.62 \pm 0.99	2.82 \pm 0.79	2.78 \pm 0.73	1.90 \pm 0.49	2.98 \pm 0.78
Stearico (18:0)	1.53 \pm 0.75	1.20 \pm 0.35	1.11 \pm 0.56	0.53 \pm 0.15	0.85 \pm 0.48

Per quanto riguarda i MUFA, l'acido oleico risulta presente in alimenti sia di origine animale che vegetale e il suo contenuto medio è molto simile tra i mangimi delle diverse categorie (range medio 3.90-5.83%SS), con valori inferiori registrati sempre nei prodotti vegetariani e quelli maggiori nei prodotti superpremium e grain free (Tabella 3). Altri MUFA sono stati rilevati in quantità inferiori, mentre quelli a 15, 20 e 22 atomi di carbonio non sono stati rilevati con le analisi di laboratorio.

Tabella 3. Grassi totali, acidi grassi monoinsaturi totali (MUFA) e principali MUFA (%SS, media \pm DS) nei mangimi completi analizzati (S=superpremium; G=grocery; GF=grain free; V=vegetariani; D=dietetici).

	S	G	GF	V	D
Grassi tot.	16.03 \pm 2.04	12.45 \pm 3.72	15.07 \pm 3.18	11.85 \pm 3.14	13.45 \pm 2.28
MUFA tot.	6.63 \pm 1.29	5.29 \pm 1.67	6.57 \pm 2.49	4.17 \pm 0.90	5.73 \pm 1.78
Oleico (18:1 n-9)	5.83 \pm 0.96	4.67 \pm 1.45	5.81 \pm 2.20	3.90 \pm 0.84	5.10 \pm 1.34

In merito ai PUFA, il maggior contenuto di LA si è riscontrato nei mangimi vegetariani (Tabella 4). In quantità nettamente inferiori rispetto a LA, altri PUFA rilevati dalle analisi dei 22 mangimi completi analizzati sono ALA, DHA e EPA (Tabella 4). Altri acidi grassi polinsaturi come GLA, DGLA, AA e l'acido 20:3 n-3 risultano assenti o presenti in tracce (<0.1%).

Tabella 0. Grassi totali, acidi grassi polinsaturi (PUFA) omega-6 (n-6) e omega-3 (n-3) e principali PUFA (%SS, media \pm DS) nei mangimi completi analizzati (S=superpremium; G=grocery; GF=grain free; V=vegetariani; D=dietetici).

	S	G	GF	V	D
Grassi tot.	16.03 \pm 2.04	12.45 \pm 3.72	15.07 \pm 3.18	11.85 \pm 3.14	13.45 \pm 2.28
PUFA n-6 tot.	3.24 \pm 1.45	2.50 \pm 0.75	3.25 \pm 1.20	4.67 \pm 1.71	2.58 \pm 0.61
LA	3.22 \pm 1.46	2.48 \pm 0.71	3.23 \pm 1.20	4.67 \pm 1.70	2.52 \pm 0.55
PUFA n-3 tot.	0.35 \pm 0.15	0.21 \pm 0.12	0.54 \pm 0.50	0.31 \pm 0.23	0.28 \pm 0.13
ALA	0.26 \pm 0.13	0.21 \pm 0.12	0.51 \pm 0.47	0.30 \pm 0.31	0.28 \pm 0.13
EPA+DHA	0.09 \pm 0.08	0.00 \pm 0.00	0.02 \pm 0.03	0.01 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00

La lettura della lista degli ingredienti nell'etichetta dei 22 mangimi completi analizzati è stata effettuata per rintracciare le fonti di grassi, con particolare attenzione a quelle di PUFA. Le fonti di LA rintracciate sono:

- "olio di mais" o "olio di granoturco": 3 vegetariani, 1 grain free, 1 superpremium;
- "olio di semi di girasole": 1 grain free;
- "olio di soia": 1 superpremium, 1 dietetico.

Per quanto riguarda ALA, dalla lettura delle etichette dei mangimi completi analizzati sono state rintracciate le seguenti fonti:

- “semi di lino”: 3 grain free), 2 vegetariano, 1 superpremium;
- “olio di canola”: 1 grain free.

Dai risultati ottenuti, ALA ha dimostrato una notevole variabilità all'interno delle categorie, tanto che sia il valore massimo (1.27%) che quello minimo (0.15%) sono stati registrati in due mangimi appartenenti alla stessa categoria ovvero i grain free. Tra i mangimi analizzati, quelli che contengono semi di lino presentano quantitativi di ALA generalmente superiori ai prodotti che non dichiarano di contenere semi di lino all'interno della stessa categoria. Il prodotto che ha presentato il quantitativo maggiore di ALA è l'unico a contenere olio di canola.

In merito ad EPA e DHA, i prodotti che secondo l'etichetta contengono ingredienti a base di pesce (sotto forma di carni fresche, farine o oli) e dai quali era possibile aspettarsi un contenuto di tali acidi grassi sono 10. In 6 di questi prodotti, inaspettatamente, né EPA né DHA sono stati identificati; inoltre, EPA è risultato presente solo in tre prodotti superpremium, mentre DHA è risultato totalmente assente nei prodotti grocery e dietetici, ed è stato identificato in sei prodotti tra cui due mangimi grain free, tre prodotti superpremium e un mangime vegetariano. Dalla lettura dell'etichetta dei mangimi completi analizzati, solo in un prodotto è stata rintracciata una fonte di GLA, cioè l'olio di borragine, ma dalle analisi di laboratorio non sono state riscontrate quantità nemmeno minime di tale acido grasso.

Infine, dal confronto tra i risultati ottenuti dall'analisi degli acidi grassi e i livelli minimi raccomandati da FEDIAF (espressi come g/1000 kcal di EM) è emerso che i limiti sono rispettati in tutti i mangimi destinati sia al cane che al gatto, tranne per quanto riguarda il contenuto di AA, il quale dalle analisi di laboratorio risulta assente in tutte le crocchette.

3.5.2 Profilo degli acidi grassi nei mangimi complementari

Le Tabelle 5-7 riportano il contenuto (%SS) di SFA, MUFA e PUFA ottenuti dalle analisi di laboratorio eseguite sui 21 mangimi complementari, suddivisi nelle quattro categorie “olio di salmone”, “olio di fegato di merluzzo”, “integratori a base di olio di pesce in forma di gocce e perle” e “integratori a base di oli vegetali in forma di gocce e perle”.

Per quanto riguarda il contenuto di SFA (Tabella 5), l'acido grasso maggiormente riscontrato dalle analisi di laboratorio è l'acido palmitico, contenuto in quantità medie variabili tra categorie diverse (dal 6.18% negli oli di salmone all'11.67% negli integratori a base di olio di pesce), ma anche all'interno della stessa categoria. Ad esempio, tra gli oli di salmone l'acido palmitico varia dal 2.36% al 14.57%, tra gli oli di fegato di merluzzo varia dal 6.81% al 10.88%, tra gli integratori a base di olio di pesce in forma di gocce e perle varia dallo 0.57% al 16.96%. Infine, tra gli integratori a base di oli vegetali in forma di gocce e perle varia dal 4.01% a 19.13%. Oltre all'acido palmitico, altri SFA sono stati rilevati dalle analisi di laboratorio in quantità minori, mentre quelli a 4, 6, 12, 15 e 23 atomi di carbonio sono risultati assenti nei mangimi analizzati.

Tabella 5. Acidi grassi saturi totali (SFA) e principali SFA (%SS, media \pm DS) nei mangimi complementari analizzati (OS=olio di salmone; OM=olio di fegato di merluzzo; IOP=integratori a base di oli di pesce; IOV=integratori a base di oli vegetali).

	OS	OM	IOP	IOV
SFA tot.	18.32 \pm 0.82	35.48 \pm 4.41	23.68 \pm 13.78	16.67 \pm 13.43
Palmitico (16:0)	6.18 \pm 0.23	9.04 \pm 2.18	11.67 \pm 7.74	9.76 \pm 6.70

Invece, in merito al contenuto di MUFA, l'acido grasso maggiormente presente nei campioni analizzati è l'acido oleico, in quantità medie che vanno dal 6.99% negli integratori a base di olio di pesce in forma di gocce e perle al 40.68% negli oli di salmone. Anche in questo caso è stata riscontrata un'ampia variabilità all'interno delle categorie: ad esempio, tra gli oli di salmone un prodotto ne contiene quantità nettamente inferiori (14.57%), rispetto agli altri prodotti della stessa categoria.

Altri MUFA sono stati rilevati dalle analisi in quantità inferiori, mentre i MUFA a 14, 15 e 17 atomi di carbonio sono risultati assenti nei mangimi complementari analizzati.

Tabella 6. Acidi grassi monoinsaturi totali (MUFA) e principali MUFA (%SS, media \pm DS) nei mangimi complementari analizzati (OS=olio di salmone; OM=olio di fegato di merluzzo; IOP=integratori a base di oli di pesce; IOV=integratori a base di oli vegetali).

	OS	OM	IOP	IOV
MUFA tot.	46.21 \pm 9.21	24.05 \pm 12.81	15.62 \pm 10.24	12.74 \pm 4.24
Oleico (18:1 n-9)	40.98 \pm 10.16	23.05 \pm 4.09	6.99 \pm 4.60	9.58 \pm 6.52

Dai risultati di laboratorio è stato evidenziato un contenuto di PUFA variabile tra le categorie e all'interno di ciascuna categoria. Il PUFA maggiormente presente negli oli di salmone è LA, con un quantitativo medio del 13.16%. Un prodotto in particolare, che come già riportato dichiara la natura selvatica del salmone utilizzato, si discosta particolarmente dagli altri per il contenuto di LA inferiore (2.09%).

Negli oli di salmone il quantitativo di EPA+DHA si distingue sempre nell'olio di cui sopra che ne presenta concentrazioni nettamente superiori (20.64%). Dalla lettura dell'etichetta di alcuni oli di salmone è possibile evidenziare il paese di provenienza del salmone (e.g. Norvegia in 3 prodotti e Alaska in 1), e l'indicazione circa la natura selvatica del salmone utilizzato (in 2 prodotti).

Dei 4 oli di fegato di merluzzo analizzati, 2 riportano nella lista ingredienti dell'etichetta solo "olio di fegato di merluzzo", mentre un prodotto riporta "olio di pesce" e uno "olio di fegato di merluzzo e olio di cardo"; quest'ultimo prodotto è quello che contiene le maggiori quantità di LA (27.67%).

Negli integratori a base di olio pesce in forma di gocce e perle, gli ingredienti dichiarati nelle etichette sono "olio di pesce" in 6 prodotti, oppure associato ad "olio di krill" in altri 2. Dalla Tabella 7 è possibile evidenziare che nei 4 integratori a base di olio di pesce in forma di gocce e perle troviamo le più alte quantità di EPA+DHA.

Nei 4 integratori a base di oli vegetali in forma di gocce e perle gli ingredienti riportati nelle etichette sono: “olio di semi di ribes nero” (n=2), “olio di semi di lino” (n=1), “olio di soia” (n=1), “olio di borragine” (n=3), “olio di semi di enotera” (n=1), “olio vegetale” (n=1), “olio di pesce” (n=2). I risultati di laboratorio dimostrano che in questa categoria si trovano le più elevate quantità di LA e di GLA.

Altri acidi grassi polinsaturi come ETE e DGLA dalle analisi di laboratorio sono risultati presenti in tracce (<0.1%) o assenti.

Tabella 7. Acidi grassi polinsaturi (PUFA) omega-6 (n-6) e omega-3 (n-3) e principali PUFA (%SS, media \pm DS) nei mangimi complementari analizzati (OS=olio di salmone; OM=olio di fegato di merluzzo; IOP=integratori a base di oli di pesce; IOV=integratori a base di oli vegetali).

	OS	OM	IOP	IOV
PUFA n-6 tot.	15.81 \pm 5.34	11.56 \pm 11.13	2.75 \pm 1.81	38.55 \pm 19.72
LA	13.16 \pm 4.26	10.40 \pm 11.62	1.07 \pm 0.44	30.91 \pm 15.63
GLA	1.63 \pm 2.87	0.74 \pm 0.94	0.16 \pm 0.19	7.64 \pm 4.70
PUFA n-3 tot.	10.92 \pm 5.31	15.82 \pm 2.38	42.18 \pm 27.12	7.90 \pm 6.65
ALA	4.30 \pm 2.45	2.23 \pm 0.43	0.70 \pm 0.25	7.09 \pm 7.19
EPA+DHA	6.63 \pm 5.31	13.59 \pm 2.02	41.48 \pm 27.33	0.81 \pm 1.34

3.5.3 Confronto tra le informazioni dichiarate in etichetta ed i risultati di laboratorio
Alcuni dei mangimi selezionati, sia completi (n=10) che complementari (n=7), non dichiarano alcuna informazione riguardo al profilo acidico. Dalla lettura dell’etichetta dei mangimi selezionati è emerso che, quando il contenuto di acidi grassi viene dichiarato, esso può essere espresso come totale degli omega-3 e/o omega-6, oppure come singolo acido grasso, ad esempio EPA o DHA o EPA+DHA. L’unità di misura è generalmente diversificata in base al tipo di prodotto: % tq, mg/g, mg/ml, mg/capsula.

Le Tablelle 8 e 9 riportano il confronto tra i risultati di laboratorio e le informazioni riportate nelle etichette dei 12 mangimi completi e 14 complementari che dichiarano in etichetta il contenuto di almeno un acido grasso o famiglia di acidi

grassi. Osservando la Tabella 8, tutti i 12 prodotti considerati dichiarano in etichetta almeno un valore di acidi grassi superiore a quanto rilevato mediante analisi di laboratorio ($\Delta\%$ negativo). Inoltre, nell'etichetta di tre prodotti viene dichiarato un contenuto rispettivamente di EPA, DHA e EPA+DHA che dalle analisi di laboratorio risulta invece pari allo 0%. Di questi tre mangimi, il n. 21 non dichiara in etichetta ingredienti a base di pesce, ma riporta indicazioni generiche come "oli e grassi" e "grassi animali"; risulta pertanto improbabile trovare EPA e DHA in questo campione. Invece, i prodotti n. 10 e 21 dichiarano ingredienti a base di pesce (n. 10: salmone intero fresco, aringa intera fresca, salmone disidratato, aringa disidratata, merluzzo disidratato, platessa fresca, lucioperca fresco ed altri; n. 21: olio di pesce). Analogamente a quest'ultimo prodotto, anche il n. 18 dichiara il pesce come ingrediente principale ("farina di pesce 26%" e "olio di pesce"), ma il totale degli omega-3 evidenziato con le analisi di laboratorio corrisponde solo all'8% del valore riportato in etichetta.

Tabella 8. Confronto tra le informazioni riguardanti il profilo acidico riportate nelle etichette e i risultati di laboratorio dei mangimi completi (Δ = differenza, espressa in %, rispetto ai dati dichiarati in etichetta).

Categoria	ID prodotto		% Etichetta	% Analisi	$\Delta\%$
Grocery	5	Tot. n-3	0.3	0.1	-67
		Tot. n-6	1.6	1.4	-13
Grain free	6	Tot. n-3	0.2	0.1	-50
		Tot. n-6	1.8	2.1	+17
	7	Tot. n-3	0.5	0.3	-40
		Tot. n-6	2.8	3	+7
	8	Tot. n-3	0.9	0.7	-22
		Tot. n-6	5.3	4.8	-9
	9	Tot. n-3	0.6	0.2	-67
		Tot. n-6	2.8	2	-29
	10	Tot. n-3	2.1	1.2	-43
		Tot. n-6	2.1	3.1	+48
EPA		0.5	0	-100	
		DHA	0.8	0.1	-88
Vegetariano	13	Tot. n-3	0.9	0.6	-33
		Tot. n-6	6	5.2	-13
Superpremium	15	Tot. n-3	0.7	0.4	-43
		DHA	0.2	0.1	-50
	17	EPA+DHA	0.2	0.1	-50

Dietetico	18	Tot. n-3	1.3	0.1	-92
		Tot. n-6	5.1	5.3	+4
	20	Tot. n-3	0.4	0.2	-50
		Tot. n-6	3.1	2.9	-7
		DHA	0.05	0	-100
	21	Tot. n-3	0.5	0.4	-20
		Tot. n-6	1.8	1.8	0
		EPA+DHA	0.15	0	-100

Per quanto riguarda i mangimi complementari (Tabella 9), 13 prodotti su 14 dichiarano in etichetta almeno un valore di acidi grassi superiore a quanto rilevato mediante analisi di laboratorio ($\Delta\%$ negativo). A differenza di quanto osservato nei mangimi completi, l'analisi di laboratorio non ha mai smentito la presenza di acidi grassi dichiarati nell'etichetta dei mangimi complementari. È possibile notare che spesso il contenuto di omega-3 dichiarato in etichetta è maggiore rispetto a quanto riscontrato dalle analisi, e viceversa la quantità di omega-6 risulta nella maggior parte dei casi superiore a quanto dichiarato dal produttore.

Tabella 9. Confronto tra le informazioni riguardanti il profilo acido riportate nelle etichette e i risultati di laboratorio dei mangimi complementari (Δ = differenza, espressa in %, rispetto ai dati dichiarati in etichetta).

Categoria	ID prodotto		% Etichetta	% Analisi	$\Delta\%$
Olio di salmone	1	EPA	9,8	2,7	-72
		DHA	11,9	2,9	-76
		Tot. n-3	30	11,1	-63
		LA	3,3	12,9	+291
		Tot. n-6	7	13,3	+90
	2	EPA	20	1,9	-5
		DHA	5	2,5	-50
		Tot. n-3	16	9,0	-44
		Tot. n-6	14	14,1	+1
	3	EPA	8,1	1,9	-77
		DHA	5,2	2,3	-56
		Tot. n-3	20	9,5	-53
	4	EPA	10	9,6	-4
		DHA	11	11	0
		Tot. n-3	29	23,5	-19
		Tot. n-6	3	4,3	+43
	7	EPA	13	2,2	-83
DHA		18,2	1,9	-90	

		Tot. n-6	2,2	23,7	+978
	8	EPA	6,3	2,1	-67
		DHA	10,2	1,8	-82
		Tot. n-3	26,7	12	-55
		Tot. n-6	9,5	16,2	+71
Olio di fegato di merluzzo	13	EPA	6,8	7,1	+4
		DHA	10,9	8,9	-18
		Tot. n-6	1,8	3,9	+117
Integratori a base di olio di pesce	14	EPA	17,8	19,5	+10
		DHA	12,2	11,5	-6
		Tot. n-3	34,4	31,9	-7
	15	EPA	18	19,8	+10
		DHA	12	11,4	-5
		ALA	0,5	0,9	+80
		LA	1,5	1,3	-13
	16	EPA + DHA	80	81,9	+2
	17	EPA	16	14,4	-10
		DHA	10	7,4	-26
		ALA	0,5	0,7	+40
		LA	1,1	0,9	-18
Integratori a base di oli vegetali	18	EPA + DHA + GLA	6,2	3,5	-44
	19	ALA	14,4	16,4	+14
		LA	51,1	47,3	-7
		GLA	17,8	13,3	-25
	21	EPA	1,2	1,8	+50
		DHA	1,7	1	-41
		ALA	5,5	3,3	-40
		LA	29,8	34	+14
		GLA	6,9	4,6	-33
		Tot. n-3	9,6	6	-37
Tot. n-6		36,7	38,5	+5	

3.5.4 Quantità di EPA e DHA fornita dai mangimi complementari

Nella Tabella 10 sono riportate le dosi di EPA+DHA espresse in mg/d per cani di 5, 15, 30 kg calcolate sulla base delle dosi consigliate da Bauer (2011). Le Tablelle 11-13 riportano invece la quantità di EPA+DHA che cani di 5, 15, 30 kg riceverebbero con l'assunzione di olio di salmone o integratori a base di olio di pesce in forma di gocce e perle seguendo le raccomandazioni riportate dal produttore in etichetta.

Queste quantità sono state calcolate a partire dai risultati ottenuti dalle analisi di laboratorio.

Tabella 10. Quantità di EPA+DHA raccomandate da Bauer (2011) come integrazione dietetica nei vari disordini clinici del cane.

Disordine clinico	EPA+DHA mg/kg ^{0,75}	EPA+DHA mg/d		
		5 kg	15 kg	30 kg
Disordini infiammatori o immunologici (es. atopia, IBD)	125	418	953	1602
Disordini cardiovascolari	115	385	877	1474
Nefropatie	140	468	1067	1795
Osteoartrite	310	1037	2363	3974
Iperlipidemia primaria	120	401	915	1538
Limite di sicurezza massimo stabilito da NRC (2006)	370	1237	2820	4743

Per poter commentare i risultati ottenuti, è importante effettuare una premessa sulle indicazioni presenti nell'etichetta dei prodotti considerati. Tutti gli oli di salmone riportano indicazioni che fanno riferimento alla qualità del pelo e della cute, come "indicato per la salute del pelo e della pelle", "per una pelle sana e un pelo lucido", "per un pelo folto e brillante", mentre solo in alcuni casi vengono riportate indicazioni che fanno riferimento alla capacità di migliorare la mobilità articolare (n. 3 e 5), al supporto del metabolismo (n. 3 e 9) e del sistema immunitario (n. 3, 5 e 9), alla salute del cuore (n. 4) e alla capacità di attenuare sintomi di malattie ed allergie (n. 6). Il produttore degli integratori a base di olio di pesce n. 14, 15 e 17 consiglia tali prodotti come adiuvanti nel trattamento dell'insufficienza renale cronica, della seborrea secca e oleosa, dell'ipertrigliceridemia e dell'infiammazione intestinale, così come per il supporto sistemico. Il prodotto n. 16 invece riporta l'indicazione "per il mantenimento del benessere dell'animale".

Nella Tabella 11 si può osservare che, in riferimento agli oli di salmone, nessun prodotto soddisfa le dosi raccomandate per i disordini elencati da Bauer (2011) per un cane di 5 kg. Tra gli integratori a base di olio di pesce, il prodotto n. 14 soddisfa le raccomandazioni per tutte le patologie e il n. 15 per tutte le patologie tranne l'osteoartrite, mentre il prodotto n. 16 solo per l'iperlipidemia e il n. 17 per nessuna patologia.

Tabella 11. Quantità di EPA, DHA e EPA+DHA (mg/d) assunta da un cane di 5 kg seguendo le raccomandazioni indicate dal produttore in etichetta. Il prodotto n. 3 non è presente perché destinato al gatto.

	No.	Posologia	EPA	DHA	EPA+DHA
Olio di salmone	1	3 ml	72	70	151
	2	5 ml	86	111	197
	4	2 ml	173	198	371
	5	2,5 ml	52	67	119
	6	3 ml	75	76	151
	7	1 ml	19	17	36
	8	5 ml	93	82	175
	9	5 ml	109	162	270
Integratori a base di olio di pesce	14	2,5 ml*	438	259	697
		7,5 ml**	1314	779	2092
	15	2,5 ml	445	257	702
	16	1 perla da 500 mg	363	47	410
	17	1 perla da 500 mg	72	37	109

**Posologia indicata per il supporto renale, intestinale e cutaneo, ** posologia indicata per il supporto sistemico.*

Dalla Tabella 12 si può osservare che, in riferimento agli oli di salmone, per un cane di 15 kg il prodotto n. 4 è l'unico che apporta un quantitativo che soddisfa le dosi raccomandate per tutte le patologie riportate, ad eccezione dell'osteoartrite. Le quantità di EPA+DHA dei prodotti n. 14 e 15 rientrano nelle dosi consigliate per tutte le patologie, quelle del prodotto n. 16 per tutte le patologie ad eccezione dell'osteoartrite, quelle del prodotto n. 17 per nessuna patologia.

Tabella 12. Quantità di EPA, DHA e EPA+DHA (mg/d) assunta da un cane di 15 kg secondo la posologia indicata dal produttore in etichetta. Il prodotto n. 3 non è presente perché destinato al gatto.

	No.	Posologia	EPA	DHA	EPA+DHA
Olio di salmone	1	9 ml	216	237	453
	2	10 ml	173	222	394
	4	7 ml	606	694	1300
	5	10 ml	209	267	476
	6	9 ml	224	229	453
	7	3 ml	59	51	110
	8	10 ml	186	164	350
	9	10 ml	217	323	541
Integratori a base di olio di pesce	14	10 ml *	1752	1037	2789
		20 ml *	3504	2073	5578
	15	10 ml	1779	1027	2806
	16	2 perle da 1000 mg	1450	188	1639
	17	4 perle da 500 mg	289	147	436

*Posologia indicata per il supporto renale, intestinale e cutaneo;

** posologia indicata per il supporto sistemico.

Nella Tabella 13 si può osservare che tra gli oli di salmone, solo il prodotto n. 4 apporta quantità di EPA+DHA che soddisfano le dosi raccomandate per tutte le patologie tranne per l'osteoartrite. Per quanto riguarda gli integratori a base di olio di pesce il prodotto n. 14 soddisfa le dosi per tutte le patologie, i n. 15 e 16 per tutte le patologie tranne l'osteoartrite, il n. 17 per nessuna patologia.

Tabella 13. Quantità di EPA, DHA e EPA+DHA (mg/d) assunta da un cane di 30 kg secondo la posologia indicata dal produttore in etichetta. Il prodotto n. 3 non è presente perché destinato al gatto.

	No.	Posologia	EPA	DHA	EPA+DHA
Olio di salmone	1	18 ml	431	475	906
	2	15 ml	259	333	592
	4	10,5 ml	909	1041	1950
	5	15 ml	314	400	714
	6	18 ml	447	458	905
	7	6 ml	117	102	219
	8	15 ml	278	246	525
	9	20 ml	434	650	1081
Integratori a base di olio di pesce	14	10 ml*	1752	1037	2789
		20 ml**	3504	2073	5578
	15	12,5 ml	2224	1284	3507
	16	3 perle da 1000 mg	2176	282	2458
	17	4 perle da 500 mg	289	147	436

*Posologia indicata per il supporto renale, intestinale e cutaneo;

** posologia indicata per il supporto sistemico.

3.6 Discussione e conclusione

In commercio sono presenti numerosi mangimi completi per il mantenimento di cani e gatti, differenti per qualità e composizione, ed alcuni di questi si dichiarano arricchiti con omega-3 per giustificare un valore aggiunto, dal momento che le proprietà benefiche di tali acidi grassi sono ben note. A questi si aggiunge un vasto mercato di mangimi complementari (oli di pesce e oli vegetali) per l'integrazione dietetica specifica di acidi grassi omega-3 e omega-6. Dato che in etichetta è obbligatorio riportare solo il contenuto dei grassi grezzi, spesso non è nota la quantità di singoli acidi grassi apportata dai mangimi completi. Anche nelle etichette di integratori a base di olio di pesce e di oli vegetali non sempre è riportata l'indicazione circa la composizione acidica, oppure le informazioni riportate sono poco dettagliate in quanto, in alcuni casi, indicano solo il totale degli omega-3 o omega-6 contenuti. Tutto ciò potrebbe risultare fuorviante perché, ad esempio, non tutti gli omega-3 hanno le stesse peculiarità e funzioni biologiche.

Il presente studio ha selezionato 22 mangimi completi secchi (crocchette) e li ha suddivisi in 5 categorie (superpremium, grocery, grain free, vegetariani e dietetici) definite dagli autori per poter categorizzare differenti qualità di prodotti presenti sul mercato. I risultati ottenuti dalle analisi svolte su tali mangimi hanno dimostrato che il profilo acidico dei mangimi completi selezionati è molto variabile. In particolare, gli acidi grassi saturi palmitico e stearico sono risultati presenti in quantità inferiori nelle crocchette della categoria dei vegetariani; al contrario sono risultati presenti in maggiori quantità nella categoria superpremium. Tale riscontro trova spiegazione nel fatto che gli acidi grassi palmitico e stearico sono forniti principalmente da alimenti di origine animale, come ad esempio grasso di pollo, maiale e bovino, ovvero ingredienti non presenti nei mangimi vegetariani composti esclusivamente da cereali e vegetali. Nei mangimi completi la fonte di grassi può derivare sia dall'inclusione di grassi animali e oli vegetali, sia dalla componente lipidica proveniente dalle farine animali e, seppur in misura minore, dai cereali inclusi nella formulazione. Dalla scelta delle fonti di grassi che il produttore include nel mangime, dipenderanno il contenuto di

EFA, il punto di fusione del grasso (saturazione), l'effetto sull'appetibilità, la suscettibilità all'ossidazione e il prezzo di mercato (Ahlstrøm et al., 2004). Inoltre, gli acidi grassi SFA e MUFA (e.g. palmitico, stearico e oleico) sono grassi considerati "facilitanti" perché aumentano l'appetibilità e la *texture* del pet food, forniscono energia e facilitano l'assorbimento delle vitamine liposolubili (Bauer, 2006a). A differenza dei grassi facilitanti, nella dieta sono richieste minori quantità di grassi funzionali (i.e. EFA e alcuni PUFA come EPA e DHA) e il loro contenuto inferiore è dimostrato anche dai risultati di questo studio.

Per quanto riguarda i PUFA, i mangimi che contengono olio di mais presentano i più elevati quantitativi di tale acido grasso, mentre i prodotti contenenti olio di soia non contengono LA in quantità particolarmente rilevanti (bisogna comunque considerare che i mangimi arricchiti di olio di mais e granoturco contengono tali oli tra i primi 4 ingredienti, mentre negli altri prodotti l'olio di soia è presente tra i gli ultimi ingredienti della lista). LA è un acido grasso di derivazione sia vegetale che animale, ma è presente maggiormente in oli vegetali come quelli di mais, soia e semi di girasole; per questo motivo, il maggior contenuto di LA si è riscontrato nei mangimi vegetariani. Confrontando i risultati ottenuti con quelli di Ahlstrøm et al. (2004), i quali avevano analizzato il profilo acidico di 12 mangimi secchi per cani (di cui due per il mantenimento di soggetti adulti e 10 per l'accrescimento), è emerso che i valori di LA erano simili (3.22 ± 1.34 nel presente studio VS 2.93 ± 0.81 %SS nello studio di Ahlstrøm).

In quantità nettamente inferiori rispetto a LA, altri PUFA rilevati dalle analisi dei mangimi completi analizzati sono ALA, DHA e EPA. Dai risultati ottenuti, ALA ha dimostrato una notevole variabilità all'interno delle categorie, tanto che sia il valore massimo che quello minimo sono stati registrati in due mangimi appartenenti alla stessa categoria (i.e. grain free). I risultati ottenuti sono molto simili a quelli riportati nello studio di Ahlstrøm et al. (2004) (0.32 ± 0.26 VS 0.29 ± 0.14). Tra i mangimi analizzati, quelli che contengono semi di lino presentano quantitativi di ALA generalmente superiori ai prodotti che non dichiarano di contenere semi di lino all'interno della stessa categoria, mentre l'unico contenente olio di canola presenta il quantitativo maggiore di ALA. EPA e DHA sono acidi grassi provenienti da fonti marine (i.e. pesci e alghe), ovvero ingredienti totalmente

assenti nei prodotti vegetariani; l'identificazione di DHA in un prodotto vegetariano risulta pertanto inaspettato e induce a pensare che ci sia stata una contaminazione durante la filiera di produzione. I risultati ottenuti riguardo al contenuto di EPA+DHA nelle crocchette analizzate sono diversi da quelli ottenuti da Ahlstrøm et al. (2004), i quali hanno riscontrato tali acidi grassi in tutti i mangimi da loro analizzati (0.03 ± 0.05 vs 0.12 ± 0.08); bisogna considerare però che i mangimi valutati nello studio citato erano per la maggior parte destinati all'accrescimento del cucciolo. È emerso inoltre che la vaghezza della dicitura degli ingredienti utilizzati nelle crocchette selezionate non permette di prevedere con accuratezza quali mangimi conterranno più o meno omega-3 e omega-6 ed è stato dimostrato che la presenza di ingredienti a base di pesce non è garanzia di un contenuto elevato di EPA e DHA.

Al di là della variabilità nel profilo acidico, in tutti i casi i valori minimi FEDIAF per grassi totali e LA sono stati rispettati per cani e gatti in mantenimento. Il contenuto di AA, invece, dalle analisi di laboratorio risulta assente in tutte le crocchette: come possibile spiegazione a tali valori, si potrebbe ipotizzare che il solvente utilizzato durante l'estrazione lipidica in laboratorio non abbia consentito un'adeguata identificazione degli acidi grassi ad elevato grado di insaturazione. Un prossimo obiettivo sarà quello di ripetere le analisi utilizzando un solvente differente, come il cloroformio.

Oltre ai mangimi completi, sono stati selezionati 21 mangimi complementari tra quelli maggiormente venduti secondo i siti di e-commerce più noti in ambito pet food e sono stati raggruppati in 4 categorie (olio di salmone, olio di fegato di merluzzo, integratori a base di olio di pesce in forma di gocce e perle, integratori a base di oli vegetali in forma di gocce e perle) in base alla tipologia di prodotto. Anche in questo caso il profilo acidico è risultato variabile, nonostante gli ingredienti riportati in etichetta fossero più specifici.

Dato che la composizione degli integratori a base di oli vegetali è estremamente diversificata (i.e. sono composti da svariati oli presenti in quantità differenti), le differenze nel contenuto di tali acidi grassi potrebbero essere dunque ascrivibili alla variabilità di questi prodotti; al contrario, è più difficile giustificare queste

differenze in prodotti composti da un unico ingrediente come l'olio di salmone o l'olio di fegato di merluzzo. Per quanto riguarda invece i prodotti a base di olio pesce, tale dicitura è molto vaga e, non esprimendo in etichetta la specie ittica utilizzata, non è possibile trarre conclusioni definitive sulla variabilità dei dati.

Come già discusso, l'acido palmitico proviene sia da fonti animali che vegetali ed è la componente maggiore degli acidi grassi saturi nei grassi animali. In uno studio condotto da Alasalvar et al. (2002) sulla composizione acidica di spigole allevate e selvatiche, gli autori hanno osservato che l'acido palmitico rappresenta circa il 20% degli acidi grassi totali identificati con concentrazioni maggiori nelle spigole selvatiche rispetto a quelle allevate (22.6% vs 20.5%). Un altro studio condotto da Özogul & Özogul (2007) su 4 specie di pesci selvatici marini (i.e. boga, sardina, cefalo comune, sugarello maggiore) ha ottenuto risultati simili riguardo al contenuto di acido palmitico.

Anche per quanto riguarda i MUFA è stata riscontrata un'ampia variabilità all'interno delle categorie: ad esempio, tra gli oli di salmone un prodotto ne contiene quantità nettamente inferiori rispetto agli altri prodotti della stessa categoria, e ciò potrebbe essere dovuto alla natura selvatica del salmone utilizzato; anche un altro prodotto dichiarava la natura selvatica del salmone utilizzato, ma dai risultati ottenuti questa dichiarazione risulta dubbia. Pure nello studio di Alasavar et al. (2002) l'acido oleico è risultato il monoinsaturo maggiormente riscontrato nella spigola ed è risultato significativamente più presente nei pesci allevati rispetto a quelli selvatici (21% vs 11%). Gli autori dello studio hanno affermato che tale riscontro è dovuto all'elevato contenuto di acido oleico nei mangimi per pesci utilizzati nell'itticoltura. Altri studi hanno tuttavia dimostrato come questo acido grasso presenti un'ampia variabilità tra le specie ittiche: da 5.6% nelle sardine a 20.8% nel boga nello studio di Ozogul & Ozogul (2007) e da 4.16% nelle sardine intere a 23.78% nel filetto di arringa nello studio di Dieu Huynh & Kitts (2009). La differenza nella composizione acidica del grasso del pesce catturato ed allevato è da imputare al diverso tipo di alimentazione consumata (i pesci allevati sono alimentati con mangimi molto grassi per migliorare le performance produttive) e dall'attività motoria decisamente inferiore negli animali allevati.

Per quanto riguarda il contenuto di PUFA, che rappresenta senza dubbio la categoria di acidi grassi di maggiore interesse quando si eseguono delle integrazioni di olio di pesce, è necessario fare delle premesse importanti. Come riportato da Dieu Huynh & Kitts (2009), molti studi sono stati eseguiti in passato sul contenuto dei grassi totali e sulla composizione acidica di diverse specie ittiche. Alcuni studi si sono concentrati soprattutto sul contenuto di PUFA con particolare riferimento agli omega-3, vista la loro implicazione sulla salute umana. È stato dimostrato che il profilo acidico dei pesci è fortemente influenzato dalla regione di provenienza, dal tipo di ambiente dove vengono pescati (i.e. acqua dolce VS acqua di mare), dalla stagione di cattura, dall'alimentazione e dalla natura del pesce (selvatico vs allevato) così come dal quantitativo di grasso totale nelle carni (pesci magri VS pesci grassi).

Nello studio di Alasavar et al. (2002) erano già stati ritrovati livelli di LA significativamente inferiori in spigole selvatiche rispetto a quelli di spigole allevate (3.2 vs 5.7%). In un'altra ricerca (Blanchet et al., 2005) sono stati ottenuti gli stessi risultati in salmoni e trote iridee selvatiche, e gli autori hanno affermato che le concentrazioni maggiori di LA nei pesci allevati sono da imputare all'uso degli oli vegetali nella loro dieta: Blanchet et al. (2005) hanno valutato il profilo acidico di salmoni allevati e catturati dimostrando che il quantitativo medio di omega-6 totali negli allevati è circa il 10% ($9.8 \pm 2.3\%$) e che in quelli catturati è di quattro volte inferiore. Tale valore è in accordo con la maggior parte dei risultati ottenuti negli oli di salmone analizzati in questo studio, mentre differisce sensibilmente dal totale degli omega-6 riscontrati in due campioni in particolare (media 22%). Ciò potrebbe far pensare che l'olio di salmone non sia l'unico ingrediente di tali prodotti. Dalla lettura dell'etichetta si evidenzia difatti che un campione riportava "100% olio di salmone", mentre l'altro più genericamente "olio di pesce". Tuttavia, il totale gli omega-6 nelle specie ittiche si attesta su valori molto inferiori a quelli riscontrati nei campioni in questione, come anche dimostrato nello studio di Dieu Huynh & Kitts (2008) effettuato su varie specie ittiche magre e grasse dove il totale degli omega-6 variava da 2.5% a 4.9% dei grassi totali.

Negli oli di salmone il quantitativo di EPA+DHA si è distinto in un prodotto che ne presenta concentrazioni nettamente superiori (20.64%). Anche in questo caso, questo profilo è da imputare all'origine selvatica del salmone utilizzato, come dimostrato nel confronto effettuato da Alasavar et al. (2002) tra il profilo acidico di spigole selvatiche ed allevate. È interessante notare come nello studio di Blanchet et al. (2005) il tenore di EPA+DHA è risultato maggiore nelle trote selvatiche rispetto a quelle allevate, mentre ciò non è stato rilevato nei salmoni selvatici analizzati nello stesso studio. Al contrario, il basso contenuto di EPA+DHA e l'elevato contenuto di LA di un altro campione confermerebbero la dubbia natura selvatica del salmone utilizzato in tale prodotto.

Rispetto agli oli di salmone, negli oli di fegato di merluzzo è risultato un più alto quantitativo di EPA+DHA. Pur rappresentando quindi una buona fonte di EPA e DHA, l'uso di questi prodotti è sconsigliato per l'elevata concentrazione di vitamina A e D, le quali possiedono dei valori limite massimi che potrebbero essere facilmente sconfinati con un'integrazione quotidiana di tale mangime complementare, portando a possibili ripercussioni sulla salute dell'animale (Lenox & Bauer, 2013). L'olio di fegato di merluzzo che contiene invece le maggiori quantità di LA (27.67%) riporta "olio di fegato di merluzzo e olio di cardo" in etichetta, pertanto l'olio di cardo potrebbe essere responsabile di tale valore. Al contrario, l'indicazione generica "olio di pesce" reperibile in molti prodotti di varie categorie non permette al consumatore di conoscere la specie ittica utilizzata né tantomeno quelle informazioni che rendono variabile la concentrazione di EPA e DHA. Tuttavia gli integratori a base di olio di pesce, proprio perché utilizzati come fonte di EPA e DHA, riportano tutti la concentrazione di questi acidi grassi in etichetta; diversamente tale informazione è riportata solamente in 6 su 9 oli di salmone e 1 su 4 oli di fegato di merluzzo.

In questo studio è stato dimostrato che, nella maggior parte dei casi, le dosi consigliate dai produttori di oli di salmone non intendono raggiungere dosaggi terapeutici specifici, diversamente dagli integratori a base di olio di pesce in forma di gocce e perle. Per tali prodotti, inoltre, non appare sempre corretto affidarsi alla posologia indicata, la quale andrebbe stabilita non meramente sulla base del peso

dell'animale, ma anche tenendo conto della patologia che si intende trattare. I mangimi complementari vengono generalmente somministrati per aumentare l'apporto di EFA e altri PUFA in animali che lo necessitano per problematiche estetiche, come quelle relative alla qualità del pelo, oppure per patologie specifiche. Numerosi studi sono stati svolti circa l'uso dell'olio di pesce nella terapia di diverse patologie (e.g. disordini infiammatori o immunologici, disordini cardiovascolari, insufficienza renale cronica, osteoartrite, iperlipidemia primaria) e le dosi raccomandate negli studi svolti in merito sono state riassunte da Bauer in una review pubblicata nel 2011 (le dosi consigliate si riferiscono al cane, in quanto nel gatto gli studi in merito sono scarsi e ancora poco è conosciuto riguardo all'uso sicuro dell'olio di pesce nella specie felina). Pertanto, se si vogliono raggiungere le dosi di EPA+DHA raccomandate per le specifiche patologie, sarà compito del medico veterinario consigliare la quantità di olio adeguata, considerando però che sarà necessario aumentarla. Va ricordato che l'integrazione con oli comporta un aumento della densità energetica della dieta, e oltre certi livelli può arrivare a generare degli squilibri nutrizionali. Gli integratori a base di olio di pesce, invece, sono appositamente formulati per concentrare EPA e DHA in modo da soddisfare le dosi terapeutiche con quantitativi di gocce o perle limitati. I produttori degli integratori a base di olio di pesce in forma di gocce e perle selezionati nel presente studio riportano in etichetta dosi che generalmente soddisfano quelle terapeutiche raccomandate da Bauer (2011), tranne quelle per l'osteoartrite che sono particolarmente elevate e perciò più difficilmente soddisfatte. Inoltre, solo un integratore non apporta quantitativi di EPA+DHA sufficienti a soddisfare le dosi raccomandate per tutte le patologie nei cani di diversa taglia. È interessante notare che questo integratore è prodotto dalla stessa azienda di altri due integratori e che in tutti e tre si è osservata l'accordanza tra quanto dichiarato e quanto riscontrato dalle analisi. Le dosi indicate dal produttore sono volontariamente più basse nel prodotto in forma di perle piuttosto che in forma di gocce, difatti è specificato in etichetta che il primo prodotto è indicato specialmente per cani di piccola taglia e gatti, e questo farebbe supporre che la concentrazione di EPA+DHA nelle perle sia in grado di soddisfare i fabbisogni

terapeutici in cani di peso ≤ 5 kg. In realtà effettuando i calcoli, tali fabbisogni terapeutici non sono soddisfatti nemmeno per cani di 1 kg di peso.

Un'ulteriore considerazione è che un altro prodotto suggerisce due dosaggi: uno più basso per il supporto renale, intestinale e cutaneo e uno più alto per il supporto sistemico. Appare evidente che seguendo il dosaggio più alto i quantitativi di EPA+DHA veicolati superano il limite di sicurezza massimo stabilito da NRC (2006) per cani di tutte le taglie; va considerato che, come riportato da Bauer (2011), il limite massimo stabilito da NRC (2006) può essere superato per le malattie renali e l'osteoartrite in base alla cronicità e alla gravità del disordine. Non è molto chiaro cosa si intende per "supporto sistemico", ma sicuramente tale dicitura non include né la patologia renale né l'osteoartrite, pertanto questo elevato dosaggio dovrebbe essere sconsigliato e/o il termine "supporto sistemico" chiarito.

Date le considerazioni fatte, la scelta tra i diversi integratori deve essere effettuata in base a quale acido grasso o famiglia di acidi grassi è necessario integrare nella dieta dell'animale. La scelta si dovrebbe dunque basare sulla motivazione clinica che rende necessaria l'integrazione dietetica di acidi grassi. Ad esempio, in caso di patologie cutanee dovute ad una alterazione della barriera lipidica, sarà necessaria un'integrazione dietetica di LA, associata o meno a GLA e/o omega-3 in base alla presenza o meno di infiammazione. Pertanto, la scelta può ricadere sugli integratori a base di oli vegetali ricchi di LA e GLA, i quali sono necessari nella terapia dietetica dei disturbi cutanei. Deve però essere fatta particolare attenzione al livello di ALA nella dieta dell'animale per evitare eccessivo squilibrio tra omega-6 e omega-3. Infatti, l'aumento di LA nella dieta deve essere seguito dall'aumento di ALA per mantenere il rapporto entro le raccomandazioni di NRC (2006). Invece, in caso di patologie che richiedano elevate dosi di EPA e DHA come l'osteoartrite, la scelta deve ricadere sugli integratori a base di olio di pesce e non sugli oli di salmone o di fegato di merluzzo, i quali ne apportano inferiori quantità. Gli oli di fegato di merluzzo infatti, vengono somministrati principalmente come fonte di vitamine liposolubili (A e D), mentre gli oli di salmone vengono somministrati principalmente per migliorare la qualità del pelo, come riportato dalle indicazioni di tali prodotti, senza necessariamente raggiungere dosi terapeutiche. Invece, gli

integratori a base di olio di pesce sono appositamente formulati come supplementi dietetici per pazienti con specifiche patologie. Dunque, nella scelta dell'integratore più adatto, la conoscenza della sua composizione acidica si pone come un valido aiuto nella gestione alimentare e terapeutica del paziente. Purtroppo, però, la composizione degli acidi grassi non è sempre presente nelle etichette di questi integratori e questo rappresenta un limite.

Infine, è emerso che in entrambi i tipi di mangimi i valori indicati in etichetta spesso non sono in accordo con i risultati delle analisi di laboratorio, superando il valore accettabile dovuto alla variabilità delle materie prime.

Per verificare l'affidabilità dei valori riportati sulle confezioni dei prodotti, è stato ritenuto utile confrontare i valori degli acidi grassi ottenuti dalle analisi svolte sui mangimi completi e complementari con le informazioni disponibili in etichetta. Alcuni dei mangimi selezionati, sia completi (n=10) che complementari (n=7), non dichiarano alcuna informazione riguardo al profilo acidico. Infatti, poiché non è obbligatorio per legge riportare in etichetta la quantità di acidi grassi contenuta nel mangime (Reg. CE 767/2009), tale informazione può essere o meno dichiarata. Le possibili spiegazioni alla discordanza tra i dati in etichetta e i risultati di laboratorio osservati nei mangimi completi sono molteplici. *In primis*, va sottolineata la variabilità nella scelta e nella qualità degli ingredienti che compongono i mangimi: non tutti i pesci contengono le medesime quantità di omega-3 (EPA e DHA), così come il contenuto di omega-3 (ALA) e omega-6 (LA, GLA, ecc.) è variabile tra le materie prime animali e vegetali impiegate nel pet food. I risultati del presente studio quindi dimostrano anche che identificare in etichetta ingredienti a base di pesce non è necessariamente una garanzia di elevati quantitativi di EPA e DHA nella dieta. In merito alle discordanze osservate tra i valori di laboratorio e le informazioni di etichetta, è già stato ampiamente dimostrato che le varie specie ittiche possiedono un profilo acidico differente (Dieu Huynh and Kitts, 2009) dovuto a fattori già menzionati in precedenza quali l'alimentazione, la stagione di pesca e la regione di provenienza. I produttori di olio di salmone, ad esempio, molte volte enfatizzano in etichetta l'origine selvatica del salmone e la provenienza da Paesi nordici, come Norvegia ed Alaska. Questo

perché, il salmone selvatico contiene maggiori quantità di omega-3 rispetto a quello allevato, la cui alimentazione si basa sull'utilizzo di alimenti commerciali arricchiti con oli vegetali (Alasalvar et al., 2002); mentre riguardo alla provenienza del pesce è stato dimostrato che esiste variabilità nella composizione acidica in base all'area geografica di pesca, ma non che i pesci provenienti da paesi nordici abbiano un più elevato quantitativo di omega-3. Budge et al. (2002) hanno osservato un differente profilo acidico tra pesci pescati in diverse zone dell'oceano atlantico nordoccidentale e hanno affermato che ciò è ascrivibile alla variabilità stagionale nella composizione del fitoplancton (dovuta alla temperatura e alla salinità dell'acqua, alla luce e ai nutrienti disponibili) che si ripercuote sulla composizione acidica degli organismi di più elevato livello trofico.

Dati i numerosi fattori che contribuiscono alla variabilità nella composizione nutrizionale degli ingredienti, il Regolamento CE 767/2009 stabilisce dei limiti di tolleranza applicabili alle discordanze tra i valori di etichetta e quelli risultanti dalle analisi di laboratorio. I limiti di tolleranza riguardano ad esempio i componenti analitici riportati in etichetta quali proteina grezza, fibra grezza, oli e grassi grezzi e umidità, mentre non sono stabiliti dei limiti di tolleranza per gli acidi grassi in particolare. È stata dunque considerata non accettabile una variazione superiore al 15%, come il Regolamento CE 767/2009 stabilisce per i limiti di tolleranza per oli e grassi grezzi, tra il valore di acido grasso dichiarato in etichetta e quello ottenuto in laboratorio. Risulta pertanto che tutti i mangimi completi presentano almeno un valore al di fuori del limite stabilito e nella maggior parte dei casi si tratta di valori riguardanti il contenuto di omega-3 totali o di EPA e/o DHA. Per quanto riguarda i mangimi complementari, solo due prodotti presentano valori che non superano il limite stabilito.

Alla luce di questi risultati, sarebbe opportuno che in etichetta venisse dichiarato il contenuto degli acidi grassi che si intendono valorizzare sulla confezione di mangimi completi e complementari. La legge dovrebbe prevedere l'obbligo per i produttori di dichiarare il quantitativo di tali nutrienti e imporre dei limiti di tolleranza per entrambe le categorie di mangimi. È infatti estremamente importante per il medico veterinario conoscere la reale composizione acidica del

mangime completo per decidere se è necessaria e possibile un'ulteriore integrazione dietetica di acidi grassi senza il superamento dei limiti massimi di EPA+DHA determinati da NRC nel cane e dei limiti di LA determinati da FEDIAF per il cucciolo nella prima fase di crescita. La conoscenza della composizione acidica dell'integratore permette al medico veterinario di scegliere il prodotto più adatto e le dosi da somministrare al paziente a seconda della patologia per la quale è necessario il supporto nutrizionale terapeutico.

In conclusione, il profilo acidico dei mangimi per cani e gatti analizzati in questo studio si è rivelato molto variabile, ciononostante i limiti FEDIAF sono rispettati in tutti i mangimi completi. Il fatto che in etichetta sia riportato l'uso di ingredienti a base di pesce non è garanzia di un contenuto elevato di EPA e DHA. Per quanto riguarda l'apporto specifico di EPA+DHA da parte dei mangimi complementari, le dosi consigliate non si sono rivelate terapeutiche per gli oli di salmone e la posologia degli integratori è risultata imprecisa. Spesso i valori degli acidi grassi riportati in etichetta si discostano da quelli di laboratorio superando i valori accettabili. La legge dovrebbe prevedere dei limiti di tolleranza e l'obbligo di dichiarare il contenuto di acidi grassi almeno per i mangimi complementari.

3.7 Bibliografia

- Alasalvar, C., Taylor, K.D.A., Zubcov, E., Shahidi, F., Alexis, M., 2002. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem.* 79, 145–150.
- Alexander, C., Cross, T.-W.L., Devendran, S., Neumer, F., Theis, S., Ridlon, J.M., Suchodolski, J.S., de Godoy, M.R.C., Swanson, K.S., 2018. Effects of prebiotic inulin-type fructans on blood metabolite and hormone concentrations and faecal microbiota and metabolites in overweight dogs. *Br. J. Nutr.* 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0007114518001952>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V, Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15718–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 979–984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605374104>
- Baldwin, K.; Bartges, J.; Buffington, T.; Freeman, L.M.; Grabow, M.; Legred, J.; Ostwald, D., 2010. AAHA Nutritional Assessment Guidelines for dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 46, 285–296. <https://doi.org/10.1142/S0219030303000673>
- Barko, P.C., McMichael, M.A., Swanson, K.S., Williams, D.A., 2018. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 9–25. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>
- Bauer, J.E., 2016. The essential nature of dietary omega-3 fatty acids in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 249, 1267–1272. <https://doi.org/10.2460/javma.249.11.1267>
- Bauer, J.E., 2011. Therapeutic use of fish oils in companion animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 239, 1441–1451. <https://doi.org/10.2460/javma.239.11.1441>
- Bauer, J.E., 2006. Facilitative and functional fats in diets of cats and dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229, 680–684. <https://doi.org/10.2460/javma.229.5.680>
- Beloshapka, A.N., Forster, G.M., 2016. Fecal Microbial Communities of Overweight and Obese Client-Owned Dogs Fed Cooked Bean Powders as Assessed by 454-Pyrosequencing. *J. Vet. Sci. Technol.* 7. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000366>
- Benno, Y., Nakao, H., Uchida, K., Mitsuoka, T., 1992. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 703–706. <https://doi.org/10.1292/jvms.54.703>
- Bierer, T.L., Bui, L.M., 2004. High-Protein Low-Carbohydrate Diets Enhance Weight Loss in Dogs. *J. Nutr.* 134, 2087–2089.
- Blake, A.B., Suchodolski, J.S., 2016. Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. *Anim. Front.* 6, 37. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0032>

- Blanchet, C., Lucas, M., Julien, P., Morin, R., Gingras, S., Dewailly, É., 2005. Fatty acid composition of wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* 40, 529–531. <https://doi.org/10.1007/s11745-005-1414-0>
- Blum, J.W., Zentek, J., Meyer, H., 1992. The effect of a different energy supply on the growth intensity and skeletal development of growing Great Danes. 2. Effect on insulin-like growth factor I and on thyroid hormones. *Zentralbl. Veterinarmed. A* 39, 568–74.
- Bolnick, D.I., Snowberg, L.K., Hirsch, P.E., Lauber, C.L., Org, E., Parks, B., Lusi, A.J., Knight, R., Caporaso, J.G., Svanbäck, R., 2014. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5500>
- Budge, S.M., Iverson, S.J., Bowen, W.D., Ackman, R.G., 2002. Among- and within-species variability in fatty acid signatures of marine fish and invertebrates on the Scotian Shelf, Georges Bank, and southern Gulf of St. Lawrence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 886–898. <https://doi.org/10.1139/f02-062>
- Calvani, R., Miccheli, A., Capuani, G., Tomassini Miccheli, A., Puccetti, C., Delfini, M., Iaconelli, A., Nanni, G., Mingrone, G., 2010. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype. *Int. J. Obes.* 34, 1095–1098. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.44>
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Ferrie, J., Gibson, G.R., Casteilla, L., Delzenne, N.M., Alessi, M.C., 2007. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491.P.D.C>
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., 2008. Changes in gut microbiota control metabolic diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470–81. <https://doi.org/10.2337/db07-1403.Additional>
- Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., Delzenne, N.M., 2007. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50, 2374–2383. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0791-0>
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van De Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091–1103. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G. a, Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C. a, Mcdonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W. a, Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. correspondence

- QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data
Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nat. Publ. Gr.* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- Case, L.P., Daristottle, L., Hayek, M.G., Raasch, M.F., 2010. *Canine and feline nutrition : a resource for companion animal professionals*, 3rd ed. Mosby.
- Cerf-Bensussan, N., Gaboriau-Routhiau, V., 2010. The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 735–744. <https://doi.org/10.1038/nri2850>
- Chandler, M., Cunningham, S., Lund, E.M., Khanna, C., Naramore, R., Patel, A., Day, M.J., 2017. Obesity and Associated Comorbidities in People and Companion Animals: A One Health Perspective. *J. Comp. Pathol.* 156, 296–309. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.03.006>
- Collado, M.C., Isolauri, E., Laitinen, K., Salminen, S., 2008. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 894–899. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.4.894>
- Davila, A.M., Blachier, F., Gotteland, M., Andriamihaja, M., Benetti, P.H., Sanz, Y., Tomé, D., 2013. Re-print of “intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host.” *Pharmacol. Res.* 69, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.01.003>
- Davis, J.E., Gabler, N.K., Walker-Daniels, J., Spurlock, M.E., 2008. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity* 16, 1248–1255. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.210>
- de La Serre, C.B., Ellis, C.L., Lee, J., Hartman, A.L., Rutledge, J.C., Raybould, H.E., 2010. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G440-448. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00098.2010>.
- Deng, P., Swanson, K.S., 2015. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *Br. J. Nutr.* 113, S6–S17. <https://doi.org/10.1017/S0007114514002943>
- Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járjai, Z., Fezza, F., Miura, G.I., Palmiter, R.D., Sugiura, T., Kunos, G., 2001. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410, 822–825. <https://doi.org/10.1038/35071088>
- Dieu Huynh, M., Kitts, D.D., 2009. Evaluating nutritional quality of pacific fish species from fatty acid signatures. *Food Chem.* 114, 912–918. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.10.038>
- Diez, M., Nguyen, P., Jeusette, I., Devois, C., Istasse, L., Biourge, V., 2002. Weight Loss in Obese Dogs: Evaluation of a High-Protein, Low-Carbohydrate Diet. *J. Nutr.* 132, 1685–1687. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1649S>
- Ding, S., Chi, M.M., Scull, B.P., Rigby, R., Schwerbrock, N.M.J., Magness, S., Jobin, C., Lund, P.K., 2010. High-fat diet: Bacteria interactions promote intestinal

- inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012191>
- Duncan, M., Davison, J.S., Sharkey, K.A., 2005. Review article: Endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22, 667–683. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02648.x>
- FEDIAF, 2017. Nutritional Guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.
- Finotello, F., Mastrorilli, E., Di Camillo, B., 2018. Measuring the diversity of the human microbiota with targeted next-generation sequencing. *Brief. Bioinform.* 19, 679–692. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw119>
- Fleissner, C.K., Huebel, N., Abd El-Bary, M.M., Loh, G., Klaus, S., Blaut, M., 2010. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br. J. Nutr.* 104, 919–929. <https://doi.org/10.1017/S0007114510001303>
- Forster, G.M., Stockman, J., Noyes, N., Heuberger, A.L., Broeckling, C.D., Bantle, C.M., Ryan, E.P., 2018. A Comparative Study of Serum Biochemistry, Metabolome and Microbiome Parameters of Clinically Healthy, Normal Weight, Overweight, and Obese Companion Dogs. *Top. Companion Anim. Med.* <https://doi.org/10.1053/J.TCAM.2018.08.003>
- Fraher, M.H., O'Toole, P.W., Quigley, E.M.M., 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 312–322. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.44>
- Furet, J.-P., Kong, L.-C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J.-L., Mariat, D., Corthier, G., Doré, J., Henegar, C., Rizkalla, S., Clément, K., 2010. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*.
- Garcia-Mazcorro, J., Minamoto, Y., 2013. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review *Microorganismos gastrointestinales en gatos y perros: una revisión breve.* *Arch. Med. Vet.* 45, 111–124. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200002>
- 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. *Microbiologyopen* 1, 340–347. <https://doi.org/10.1002/mbo3.36>
- Gérard, P., 2016. Gut microbiota and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 147–162. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2061-5>
- German, A.J., Ryan, V.H., German, A.C., Wood, I.S., Trayhurn, P., 2010. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. *Vet. J.* 185, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.004>
- Geurts, L., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., Knauf, C., Cani, P.D., 2014. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose

- metabolism: Novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Benef. Microbes* 5, 3–17. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0065>
- Gong, W., Kwak, I.Y., Pota, P., Koyano-Nakagawa, N., Garry, D.J., 2018. DrImpute: Imputing dropout events in single cell RNA sequencing data. *BMC Bioinformatics* 19, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2226-y>
- Goodrich, J.K., Di Rienzi, S.C., Poole, A.C., Koren, O., Walters, W.A., Caporaso, J.G., Knight, R., Ley, R.E., 2014. Conducting a microbiome study. *Cell* 158, 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.037>
- Greetham, H.L., Giffard, C., Hutson, R.A., Collins, M.D., Gibson, G.R., 2002. Bacteriology of the Labrador dog gut: A cultural and genotypic approach. *J. Appl. Microbiol.* 93, 640–646. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01724.x>
- Grønvold, A.M.R., L'Abée-Lund, T.M., Sørum, H., Skancke, E., Yannarell, A.C., MacKie, R.I., 2010. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 71, 313–326. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00808.x>
- Grześkowiak, L., Endo, A., Beasley, S., Salminen, S., 2015. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe* 34, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>
- Guard, B.C., Mila, H., Steiner, J.M., Mariani, C., Suchodolski, J.S., Chastant-Maillard, S., 2017. Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. *PLoS One* 12, 8–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175718>
- Haaf, T., 2011. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Curr. Protoc. Cell Biol.* 1988, 1–52. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03067.x>
- Hand, D., Wallis, C., Colyer, A., Penn, C.W., 2013. Pyrosequencing the Canine Faecal Microbiota: Breadth and Depth of Biodiversity. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053115>
- Hand, M.S., Lewis, L.D., 2010. *Small animal clinical nutrition*, 5th ed. Mark Morris Institute.
- 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 Microbiol. Ecol.* 76, 301–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x>
- 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 Microbiol. Ecol.* 84, 332–343. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12067>
- Hang, I., Heilmann, R.M., Grützner, N., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M., Atroshi, F., Sankari, S., Kettunen, A., de Vos, W.M., Zentek, J., Spillmann, T., 2013. Impact of diets with a high content of greaves-meal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin

- concentrations in healthy dogs. *BMC Vet. Res.* 9, 201. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-201>
- Hang, I., Rinttila, T., Zentek, J., Kettunen, A., Alaja, S., Apajalahti, J., Harmoinen, J., de Vos, W.M., Spillmann, T., 2012. Effect of high contents of dietary animal-derived protein or carbohydrates on canine faecal microbiota. *BMC Vet. Res.* 8, 90. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-90>
- Heid, C., Livak, K., Stevens, J., Williams, P., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Herstad, K.M.V., Gajardo, K., Bakke, A.M., Moe, L., Ludvigsen, J., Rudi, K., Rud, I., Sekelja, M., Skancke, E., 2017. A diet change from dry food to beef induces reversible changes on the faecal microbiota in healthy, adult client-owned dogs. *BMC Vet. Res.* 13, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1073-9>
- Hoffmann, A.R., Proctor, L.M., Surette, M.G., Suchodolski, J.S., 2016. The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Vet. Pathol.* 53, 10–21. <https://doi.org/10.1177/0300985815595517>
- Honneffer, J.B., Steiner, J.M., Lidbury, J.A., Suchodolski, J.S., 2017. Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics* 13, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1165-3>
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D.N., 2015. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21, 8836–8847. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Janssen, A.W.F., Kersten, S., 2015. The role of the gut microbiota in metabolic health. *FASEB J.* 29, 3111–3123. <https://doi.org/10.1096/fj.14-269514>
- Kieler, I.N., Shamzir Kamal, S., Vitger, A.D., Nielsen, D.S., Lauridsen, C., Bjornvad, C.R., 2017. Gut microbiota composition may relate to weight loss rate in obese pet dogs. *Vet. Med. Sci.* 3, 252–262. <https://doi.org/10.1002/vms3.80>
- Kil, D.Y., Swanson, K.S., 2011. Companion animals symposium: Role of microbes in canine and feline health. *J. Anim. Sci.* 89, 1498–1505. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3498>
- Kim, J., An, J.U., Kim, W., Lee, S., Cho, S., 2017. Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. *Gut Pathog.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0218-5>
- Kinross, J.M., Darzi, A.W., Nicholson, J.K., 2011. Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Med.* <https://doi.org/10.1186/gm228>
- Kuczynski, J., Lauber, C.L., Walters, W.A., Parfrey, L.W., Clemente, J.C., Gevers, D., Knight, R., 2012. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat. Rev. Genet.* 13, 47–58. <https://doi.org/10.1038/nrg3129>
- Kushner, R.F., Doerfler, B., 2008. Low-carbohydrate, high-protein diets revisited. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24, 198–203. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282f43a87>

- Lee, W.J., Hase, K., 2014. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat. Chem. Biol.* 10, 416–424. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1535>
- Lenox, C.E., 2015. Timely Topics in Nutrition: An overview of fatty acids in companion animal medicine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 246, 1198–1202. <https://doi.org/10.2460/javma.246.11.1198>
- Li, Q., Lauber, C.L., Czarnecki-Maulden, G., Pan, Y., Hannah, S.S., 2017. Effects of the dietary protein and carbohydrate ratio on gut microbiomes in dogs of different body conditions. *MBio* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01703-16>
- Liévin-Le Moal, V., Servin, A.L., 2006. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides and Microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 315–337. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.315>
- Lun, A.T.L., McCarthy, D.J., Marioni, J.C., 2016. A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor. *F1000Research* 5, 2122. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9501.2>
- Maier, L., Pruteanu, M., Kuhn, M., Zeller, G., Telzerow, A., Anderson, E.E., Brochado, A.R., Fernandez, K.C., Dose, H., Mori, H., Patil, K.R., Bork, P., Typas, A., 2018. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* 555, 623–628. <https://doi.org/10.1038/nature25979>
- Martin, F.P.J., Dumas, M.E., Wang, Y., Legido-Quigley, C., Yap, I.K.S., Tang, H., Zirah, S., Murphy, G.M., Cloarec, O., Lindon, J.C., Sprenger, N., Fay, L.B., Kochhar, S., Van Bladeren, P., Holmes, E., Nicholson, J.K., 2007. A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol. Syst. Biol.* 3. <https://doi.org/10.1038/msb4100153>
- Masuoka, H., Shimada, K., Kiyosue-Yasuda, T., Kiyosue, M., Oishi, Y., Kimura, S., Yamada, A., Hirayama, K., 2017. Transition of the intestinal microbiota of dogs with age. *Biosci. Microbiota, Food Heal.* 36, 27–31. <https://doi.org/10.12938/bmfh.BMFH-2016-021>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mentula, S., Harmoinen, J., Heikkilä, M., Westermarck, E., Rautio, M., 2005. Comparison between Cultured Small-Intestinal and Fecal Microbiotas in Beagle Dogs 71, 4169–4175. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4169>
- Middelbos, I.S., Boler, B.M.V., Qu, A., White, B.A., Swanson, K.S., Fahey, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>
- Mikkelsen, K.H., Allin, K.H., Knop, F.K., 2016. Effect of antibiotics on gut microbiota, glucose metabolism and body weight regulation: a review of the literature. *Diabetes Obes. Metab.* 18, 444–453.

<https://doi.org/10.1111/dom.12637>

- Muccioli, G.G., Naslain, D., Bäckhed, F., Reigstad, C.S., Lambert, D.M., Delzenne, N.M., Cani, P.D., 2010. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol. Syst. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.46>
- National Research Council, 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. National Academies Press.
- Nicholson, J.K., Holmes, E., Wilson, I.D., 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 431–438. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1152>
- Org, E., Mehrabian, M., Parks, B.W., Shipkova, P., Liu, X., Drake, T.A., Lusi, A.J., 2016. Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes* 7, 313–322. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1203502>
- Özogul, Y., Özogul, F., 2007. Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas. *Food Chem.* 100, 1634–1638. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.11.047>
- Park, H.J., Lee, S.E., Kim, H.B., Isaacson, R.E., Seo, K.W., Song, K.H., 2015a. Association of Obesity with Serum Leptin, Adiponectin, and Serotonin and Gut Microflora in Beagle Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 43–50. <https://doi.org/10.1111/jvim.12455>
- Park, H.J., Lee, S.E., Kim, H.B., Isaacson, R.E., Seo, K.W., Song, K.H., 2015b. Association of obesity with serum leptin, adiponectin, and serotonin and gut microflora in beagle dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 43–50. <https://doi.org/10.1111/jvim.12455>
- Park, H.J., Lee, S.E., Kim, H.B., Kim, J.H., Seo, K.W., Song, K.H., 2015. Fecal microbiota analysis of obese dogs with underlying diseases: a pilot study. *Korean J. Vet. Res.* 55, 205–208. <https://doi.org/10.14405/kjvr.2015.55.3.205>
- Pinna, C., Vecchiato, C.G., Zaghini, G., Grandi, M., Nannoni, E., Stefanelli, C., Biagi, G., 2016. In vitro influence of dietary protein and fructooligosaccharides on metabolism of canine fecal microbiota. *BMC Vet. Res.* 12, 53. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0672-1>
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., LeChatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J.-M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Li, S., Yang, H., Wang, J., Ehrlich, S.D., Nielsen, R., Pedersen, O., Kristiansen, K., Wang, J., 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>
- Rabot, S., Membrez, M., Bruneau, A., Gerard, P., Harach, T., Moser, M., Raymond, F., Mansourian, R., Chou, C.J., 2010. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol

- metabolism. *FASEB J.* 24, 4948–4959. <https://doi.org/10.1096/fj.10-164921>
- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C.F., Funai, K., Hayashi, D.K., Lyle, B.J., Martini, M.C., Ursell, L.K., Clemente, J.C., Van Treuren, W., Walters, W.A., Knight, R., Newgard, C.B., Heath, A.C., Gordon, J.I., 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* (80-). 341. <https://doi.org/10.1126/science.1241214>
- Salas-Mani, A., Jeusette, I., Castillo, I., Manuelian, C.L., Lionnet, C., Iraculis, N., Sanchez, N., Fernández, S., Vilaseca, L., Torre, C., 2018. Fecal microbiota composition changes after a body weight loss diet in Beagle dogs. *J. Anim. Sci.* 96, 3102–3111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jas/sky193>
- Sandri, M., Dal Monego, S., Conte, G., Sgorlon, S., Stefanon, B., 2016. Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. *BMC Vet. Res.* 13, 65. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0981-z>
- Santacruz, A., Collado, M.C., García-Valdés, L., Segura, M.T., Marítn-Lagos, J.A., Anjos, T., Martí-Romero, M., Lopez, R.M., Florido, J., Campoy, C., Sanz, Y., 2010. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br. J. Nutr.* 104, 83–92. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000176>
- Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martín-Matillas, M., Campoy, C., Moreno, L.A., Veiga, O., Redondo-Figuero, C., Garagorri, J.M., Azcona, C., Delgado, M., García-Fuentes, M., Collado, M.C., Sanz, Y., 2009. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity* 17, 1906–1915. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.112>
- Schloss, P.D., Handelsman, J., 2004. Status of the Microbial Census. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 686–691. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.686-691.2004>
- Shade, A., Handelsman, J., 2012. Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environ. Microbiol.* 14, 4–12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>
- Shen, J., Obin, M.S., Zhao, L., 2013. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 34, 39–58. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.001>
- 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. *Microb. Ecol.* 44, 186–197. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-0001-z>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H.M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P., 2008. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut

- microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Song, S.J., Lauber, C., Costello, E.K., Lozupone, C.A., Humphrey, G., Berg-Lyons, D., Gregory Caporaso, J., Knights, D., Clemente, J.C., Nakielny, S., Gordon, J.I., Fierer, N., Knight, R., 2013. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife* 2013, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.00458>
- Sotos, M., Nadal, I., Marti, A., Mart??nez, A., Martin-Matillas, M., Campoy, C., Puertollano, M.A., W??rnberg, J., Marcos, A., Sanz, Y., 2008. Gut microbes and obesity in adolescents. *Proc. Nutr. Soc.* 67, 11075. <https://doi.org/10.1017/S0029665108006290>
- Suchodolski, J., Jergens, A., 2016. Recent Advances and Understanding of Using Probiotic-Based Interventions to Restore Homeostasis of the Microbiome for the Prevention / Therapy of Bacterial Diseases. *Microbiol. Spectr.* 4, 1–14. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0025-2015.Correspondence>
- Suchodolski, J.S., 2016. Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *Vet. J.* <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>
- Suchodolski, J.S., 2011. Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: A Bigger World than We Thought. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 41, 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.12.006>
- 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 Microbiol. Ecol.* 66, 567–578. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x>
- 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 Microbiol.* 9, 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-210>
- Suchodolski, J.S., Dowd, S.E., Wilke, V., Steiner, J.M., Jergens, A.E., 2012. 16S rRNA gene pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the Duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039333>
- 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. *Vet. Microbiol.* 142, 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.002>
- 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, P.M., Cann, I.K.O., White, B.A., Fahey, G.C., 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.* 5, 639–649. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.162>
- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L., Gordon, J.I., 2008. Diet-Induced Obesity Is

- Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* 3, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M. a, Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–31. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Vilson, Å., Ramadan, Z., Li, Q., Hedhammar, Å., Reynolds, A., Spears, J., Labuda, J., Pelker, R., Björkstén, B., Dicksved, J., Hansson-Hamlin, H., 2018. Disentangling factors that shape the gut microbiota in German Shepherd dogs. *PLoS One* 13, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193507>
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B.J., Koeth, R., Levison, B.S., Dugar, B., Feldstein, A.E., Britt, E.B., Fu, X., Chung, Y.M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J.D., Allayee, H., Tang, W.H.W., Didonato, J.A., Lusis, A.J., Hazen, S.L., 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472, 57–65. <https://doi.org/10.1038/nature09922>
- Wang, Z., Xiao, G., Yao, Y., Guo, S., Lu, K., Sheng, Z., 2006. The Role of Bifidobacteria in Gut Barrier Function After Thermal Injury in Rats. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care* 61, 650–657. <https://doi.org/10.1097/01.ta.0000196574.70614.27>
- Wilson, I.D., Nicholson, J.K., 2017. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Transl. Res.* 179, 204–222. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002>
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C., Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C., 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* (80-). 249, 1431–1433.
- Wynn, S.G., 2009. Timely topics in nutrition: Probiotics in veterinary practice. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 606–613. <https://doi.org/10.2460/javma.234.5.606>
- Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>

Capitolo 4

Undeclared animal species in dry and wet novel and hydrolyzed protein diets for dogs and cats detected by microarray analysis

Rebecca Ricci¹, Daniele Conficoni¹, Giada Morelli¹, Carmen Losasso², Leonardo Alberghini¹, Valerio Giaccone¹, Antonia Ricci² and Iginio Andrighetto¹

¹Department of Animal Medicine, Production and Health, Viale Dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italy.

²Department of Food Safety, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale Dell'Università 10, 35020 Legnaro, Italy.

4.1 Abstract

Background: Although the European Pet Food Industry Federation (FEDIAF) stated that labels must be accurate and provide detailed information on the ingredients, mislabeling of pet food has been documented by several authors. This phenomenon is of particular concern when related to products used as elimination diets for the diagnosis of adverse food reaction (AFR) in dogs and cats because the presence of undeclared ingredients may negatively interfere with the trial and prevent the veterinarian from making an appropriate diagnosis. The aim of this study was to shed light upon the problem of contamination and mislabeling in both dry and wet novel protein diets (NPDs) and hydrolyzed protein diets (HPDs) using a microarray-based commercial kit which tests for the presence of 19 animal species. Results: Of the 40 analyzed products (9 dry NPDs, 22 wet NPDs, 6 dry HPDs and 3 wet HPDs), ten presented a content that correctly matched the label, while five did not contain the declared animal species, twenty-three revealed the presence of undeclared animal species, and two had a vague label that did not allow the evaluation of its accuracy. The most frequently contaminants identified in both dry and wet pet foods were pork, chicken and turkey. The presence of

undeclared animal species was higher in dry than wet pet foods; furthermore, a lower number of contaminating animal species was identified in HPDs than NPDs (4 vs 10), and a lower number of contaminated HPDs (6 out of 9, 67%) than contaminated NPDs was detected (24 out of 31, 77%). Thirteen out of 14 brands tested presented at least one mislabeled product. Conclusions: Mislabeled products seem to be a widespread issue in pet foods used as elimination diets. Contamination can occur in all types of products used for the purpose, although dry NPDs are the main issue. Due to the high risk of contamination, particular attention should be given to both the selection of raw material suppliers and the production process.

4.2 Abbreviations

AFR	Adverse food reaction
HPDs	Hydrolyzed protein diets
NPDs	Novel protein diets

4.3 Introduction

Mislabeled products are an important concern for people who require a controlled diet, and the issue has recently arisen in regard to dog and cat food as well. In a study conducted in the United Kingdom, when testing for the presence of bovine, chicken, porcine and horse DNA in 17 popular wet pet foods obtained from supermarkets, Maine et al. (2015) observed that cow, pig and chicken were included in 15 products even when not explicitly stated on their labels. Similarly, when testing a wide range of dog and cat foods (n=52) available in the US market (from both retail and online stores) for the presence of mitochondrial DNA of eight different animal species (i.e. bovine, caprine, ovine, chicken, goose, turkey, porcine, and equine), Okuma and Hellberg (2015) found that 38.5% of pet foods were potentially mislabeled because they either contained meat species not declared in the label or did not contain meat species that were. The pet food samples included in the studies by Maine et al. (2015) and by Okuma & Hellberg

(2015) were intended for the maintenance of dogs and cats. A more particular concern has been raised recently regarding the mislabeling of pet food products specifically formulated to contain a single source of protein (novel protein diets, NPDs) [3–5], which along with hydrolyzed protein diets (HPDs) are used as elimination diets for the diagnosis of adverse food reaction (AFR) in dogs and cats. The rationale behind these two dietary approaches is clearly explained in the review by Verlinden et al., 2006.

Since dietary trial is the only reliable method to diagnose AFR [7], the presence of undeclared animal species in NPDs and HPDs is a major concern when feeding a food-hypersensitive dog or cat an unpredictably contaminated product because any potentially allergenic protein may preclude significant remission of symptoms and mislead the clinician in diagnosing AFR [4]. Elimination diets, both NPDs and HPDs, are also used in dogs with chronic enteropathies to diagnose food-responsive diarrhea (FRD), antibiotic-responsive diarrhea (ARD) and steroid-responsive disease (SRD) on the basis of the dog's response to treatment [8,9].

When considering studies focused on the presence of contaminants in commercial elimination diets, Raditic et al. (2011) used an ELISA method to test four over-the-counter venison canine dry foods for the presence of soy, poultry and beef; Ricci et al. (2013) analyzed twelve canine dry pet foods used as dietary elimination trials with three zoological classes in mind (i.e. mammal, poultry and fish) via both PCR and a microscopy protocol, whereas in the study by Horvath-Ungerboeck et al. (2017), a real time PCR test was used on seven dry and five wet pet foods to identify five animal species (i.e. chicken, turkey, beef, mutton and pork).

Due to the higher stability of DNA molecules compared to proteins when exposed to high temperature, DNA-based protocols seem to be the most reliable methods for the identification of animal species in highly processed foods such as pet food [10].

In the three studies mentioned above, the protocols used for animal species identification were time-consuming and focused on detecting a limited number of animal species in a small number of canine pet food samples, most of which (23 out of 28) were dry [1–5].

The aim of this study was to shed light upon the problem of contamination and mislabeling in dry and wet pet foods used as elimination diets for the diagnosis of canine and feline AFR. Unlike the aforementioned studies, the current investigation adopted a rapid DNA-based microarray for the detection of 19 animal species in a single run. The presence of a contaminant was assumed whenever an animal species not declared in the ingredient list was detected by microarray analysis.

4.4 Materials and Methods

4.4.1 Sample recruitment

A total of 40 pet foods (15 dry and 25 wet) for dogs (n=36) and cats (n=4) produced by 14 different producers were collected from the market. The samples included single batches of 31 NPDs (9 dry and 22 wet) and 9 HPDs (6 dry and 3 wet). Pet foods labels were carefully read to identify every source of protein and fat in the ingredients list. From each pet food, an aliquot of 50 grams was sampled and sent to the laboratory for animal species identification. All the analyses were performed in the Food Microbiology laboratory of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Legnaro, Italy).

4.4.2 Animal species identification

All samples were treated according to the GeneTop Meat-V kit protocol (GeneTop, Taiwan -R.O.C.). The procedure is an accredited method of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana M. Aleandri [11]. The protocol is based on the extraction of the total DNA fraction, the amplification of specific DNA targets via polymerase chain reaction (PCR), and subsequent DNA microarray assay on solid matrix.

4.4.3 DNA extraction

An aliquot of 200 mg of either homogenized wet pet food or ground dry pet food was sampled under sterile conditions in duplicate for each product. The samples

were processed for DNA extraction using the DNeasy mericon food kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to manufacturer instructions. DNA quality and concentration were assessed after extraction by spectrophotometer (SmartSpec™ Plus spectrophotometer, Bio-Rad, USA).

4.4.4 DNA amplification and microarray assay

The reagents used for amplification and hybridization were all supplied with the GeneTop Meat-V kit (GeneTop, Taiwan - R.O.C.). Briefly, amounts of 22.25 µl of Meat-IV Mix and 0.25 µl of Taq were transferred in sterile PCR tubes kept at low temperature. PCR samples were prepared by adding 2.5 µl of the previously extracted DNA to the reaction mix. PCRs were carried out in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA) using the following PCR protocol: 2 min at 94°C followed by 30 cycles of 94°C for 30s, 60°C for 30s, and 72°C for 30s. A final elongation step was performed at 72°C for 10 min. The amplified samples were then stored at -20°C until use.

4.4.5 Microarray analysis

The microarray plate was designed to detect the presence of 19 animal species: bovine, buffalo, cat, chicken, dog, donkey, duck, hare, fish, goat, goose, horse, mice, porcine, poultry, rabbit, rat, sheep, turkey.

The protocol used for microarray identification was supplied by the manufacturer (GeneTop, Taiwan - R.O.C.). Briefly, the amplicons obtained by PCR were denatured by heating to 95 °C for 5 minutes and 30 seconds, then placed on ice. The pre-warmed (to room temperature) HA Buffer was pipetted in advance in each Meat-V Chip well and the liquid was spread over the surface of every chip. A 5 µl amount of the denatured amplicons was loaded in each well, and then the biochip was covered with adhesive film. The biochip was then incubated at 50°C for 40 min in the hybridization shaker (1000 rpm). The hybridization liquid was discarded and the wells were washed three times using 200 µl of Wash buffer. The Blocking reagent was prepared with a StrepAP and B buffer ratio of 1:1000, and a total 100 µl of the mixture was poured into each well and incubated for 20 min at

50°C. The biochip was washed 3 times with 200 µl of Wash buffer and then 200 µl of C buffer was added and discarded. The detection buffer composed of 2 µl of NBT/BCIP mixed with 98 µl of C buffer (ratio 1:50) was added to each well and the biochip was placed in the dark for 7 min. The detection buffer was discarded and the chip was rinsed with tap water twice. The dried biochip was then read using the GeneTop reader (GeneTop, Taiwan - R.O.C.) and by naked eye. According to the manufacturer, the test sensibility is 0.1%. The results were recorded in a Microsoft Excel spreadsheet (Microsoft Corporation, Redmond, WA).

4.5 Results

The following animal species were detected in at least one sample of the pet foods tested: bovine, chicken, duck, fish, goat, goose, horse, pork, poultry, rabbit, sheep and turkey. The following species instead were not detected in any sample: buffalo, cat, dog, donkey, hare, mice and rat.

The results obtained by DNA-based microarray assay are shown in Table 1.

The composition of 38 out of 40 samples was indicated on the label by a list of ingredients that clearly allowed the identification of the animal species included, whereas the remaining two product labels used terms like 'animal proteins' in sample ID 8 and 'hydrolyzed offal' in sample ID 15 that did not permit such identification. Despite their positivity for two and five animal species respectively, it was therefore impossible to state the inadequacy of these two product labels. For all the other 38 pet foods, label adequacy was evaluated as follows. Ten samples (one dry and nine wet; seven NPDs and three HPDs) were labeled correctly because only the DNA of the protein source stated in the ingredient list was detected (sample IDs: 14, 16, 18, 23-25, 27, 31, 35, 36). Five samples (one dry and four wet; four NPDs and one HPDs) were mislabeled because the DNA of the protein source stated in the ingredient list was not detected (sample IDs: 2, 17, 19, 28, 37); in particular, in three samples (ID 2,17,19) duck was not detected, in sample ID 28 the salmon declared on the label did not trigger positivity for fish, and in sample ID 37 the hydrolyzed poultry liver specified on the label did not

trigger the positivity expected either for chicken, turkey, or even poultry. In the remaining 23 samples, the DNA of the protein source stated in the ingredient list was detected, but the DNA of one to seven other protein sources not listed on the label was detected as well (Figure 1).

Figure 1. Number of hydrolyzed protein diets (HPDs) and novel protein diets (NPDs) presenting 0 to 7 undeclared animal species detected by microarray analysis.

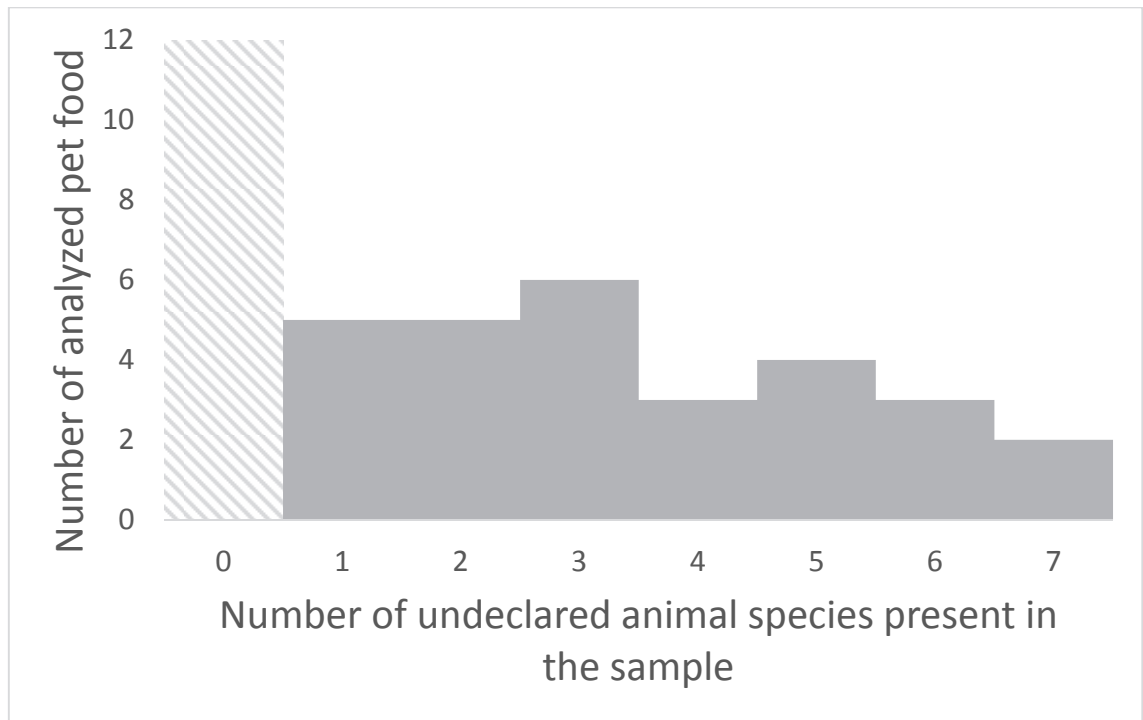


Table 2 shows the number of dry and wet pet foods positive to an animal species not declared on the label.

Table 2. Number and percentage (%) of dry and wet pet foods in which animal species not listed on the label were detected.

Animal species detected by the microarray	Number of pet foods in which the animal species was not listed in the label		Number and % of pet foods in which such unlisted species was detected	
	DRY pet foods	WET pet foods	DRY pet foods	WET pet foods
Sheep	12	24	4 (33.3%)	4 (16.7%)
Duck	11	21	2 (18.2%)	0 (0%)
Bovine	13	25	8 (61.5%)	6 (24%)
Goat	13	24	1 (7.7%)	0 (0%)
Goose	15	24	1 (6.7%)	0 (0%)
Horse	11	21	3 (27.3%)	1 (4.8%)
Pork	13	23	12 (92.3%)	13 (56.5%)
Chicken*	9	20	8 (88.9%)	10 (50%)
Poultry**	7	14	6 (85.7%)	5 (35.7%)
Fish	11	21	4 (36.4%)	0 (0%)
Turkey	13	23	11 (84.6%)	7 (30.4%)

* chicken or hydrolyzed chicken was declared on the label

** chicken, turkey, hydrolyzed chicken or duck or goose was declared on the label

The contaminants most frequently identified by the microarray kit in dry pet foods were pork, chicken, poultry and turkey, followed by bovine, fish and ovine, then horse; on the other hand, the least common contaminants were duck and goat. Regarding wet pet foods, pork was the most common contaminant, followed by chicken, poultry, turkey, bovine and sheep; the least common contaminant was horse, while fish, duck and goat were not detected in these samples. Since the microarray used in this study lacked a deer DNA detection well, it was impossible to both confirm the presence of venison in the three samples that listed such species on the label and identify venison contamination in the others.

In general, one dry sample out of 13 and nine wet samples out of 25 did not show any DNA contamination from animal species not listed on the label. Fewer animal species not listed on the label were identified in HPDs than in NPDs (4 vs 10, [Figure 1](#)); moreover, a higher number of contaminated HPDs (6 out of 9, 67%) than contaminated NPDs was detected (24 out of 31, 77%). More details are reported in [Table 3](#).

Table 3. Number and percentage (%) of hydrolyzed protein diets (HPDs) and novel protein diets (NPDs) in which animal species not listed on the label were detected.

Animal species detected by the microarray	Number of pet foods in which the animal species was not listed in the label		Number and % of pet foods in which such unlisted species was detected	
	HPDs	NPDs	HPDs	NPDs
Sheep	8	28	0 (0%)	8 (28.6%)
Duck	8	24	0 (0%)	2 (8.3%)
Bovine	8	30	1 (12.5%)	13 (43.3%)
Goat	8	29	0 (0%)	1 (3.4%)
Goose	8	29	0 (0%)	1 (3.4%)
Horse	8	24	0 (0%)	4 (16.7%)
Pork	8	28	5 (62.5%)	20 (71.4%)
Chicken*	1	28	0 (0%)	18 (64.3%)
Poultry**	1	20	0 (0%)	11 (55%)
Fish	8	24	1 (12.5%)	3 (12.5%)
Turkey	8	28	4 (50%)	14 (50%)

* chicken or hydrolyzed chicken was declared on the label

** chicken, turkey, hydrolyzed chicken or duck or goose was declared on the label

In HPDs, the most common contaminants detected by microarray analysis were pork, turkey, bovine and fish. Pork, chicken, poultry, turkey, bovine and sheep were the most common contaminants in NPDs. With the exception of brand L, at least one mislabeled product was identified in all the brands considered (Table 4).

Table 4. Number of mislabeled and correctly labeled dry and wet pet foods divided by brand.

Brand ID	DRY pet foods		WET pet foods	
	Mislabeled	Correctly labeled	Mislabeled	Correctly labeled
A	3	0	2	1
B	3	0	1	3
C	1	0	1	0
D	1	0	1	0
E	1	0	0	0
F	1	0	1	2
G	3	0	1	1
H	1	1	0	0
I	0	0	4	0
J	0	0	1	0
K	0	0	2	1
L	0	0	0	1
M	0	0	1	0
N	0	0	1	0

4.6 Discussion and conclusions

As stated by the European Pet Food Industry Federation (FEDIAF, 2011), pet food labels must be accurate and all ingredients unequivocally identified. This is particularly important for pet foods formulated as elimination diets for the purpose of diagnosing an adverse food reaction in dogs or cats because the accuracy of the label and correspondence with the ingredients actually included in the formula assume paramount importance in the success of the trial.

In this study, we performed microarray analysis on a total of 40 products formulated for dietary elimination trials in order to investigate possible contaminants and mislabeling. The ingredient list of samples ID 8 and ID 15 provided vague indications of meat content (i.e. 'animal proteins' and 'hydrolyzed offals', respectively), thereby precluding the identification of the animal species listed on label by reading alone. Therefore, any animal species may have been included, and although microarray analysis of these two products detected more than one species, the non-adequacy of the products cannot be stated with more accuracy. European Regulation (EC) No 767/2009 allows categories of ingredients to be listed on pet food labels, and many pet food products take advantage of this option. However, vague ingredient lists should not be acceptable in pet foods intended for the diagnosis of adverse food reactions. All the remaining 38 products had detailed ingredient lists, and meat species were clearly reported in their labels.

According to microarray results, only 25% of the products analyzed were suitable for effective AFR diagnosis. Although these findings demonstrate that producing an uncontaminated pet food is possible, three out of four commercial elimination diets would not be useful in allowing the clinician to obtain precise AFR diagnosis.

The five mislabeled samples whose declared animal species were not detected by the micro-array analysis can be construed as a commercial fraud punishable by law with additional complications for producers other than leading to mistaken diagnosis for food allergic animals. Samples listed as containing duck (ID 2,17,19) were instead positive to both poultry and chicken and/or turkey, and this may be considered intentional substitution with cheaper ingredients of avian origin. Commercial frauds in pet foods were reported in a previous study by Okuma et al.

(2015) where six products were not found to contain the meat species declared on the front of the package.

On the other hand, the consequences of including undeclared animal species in elimination diets have already been presented elsewhere [4]. The presence of one to multiple animal species not declared on the label of elimination diets was demonstrated by a PCR-based approach in previous studies [4,5], whereas the microarray analysis performed here was able to identify up to 19 animal species in a single run.

The most common animal species not declared on the labels of both dry and wet pet foods were pork, chicken and turkey. In the study by Horvath-Ungerboeck et al. (2017), the most common contaminants were beef (positive in 8/12 samples) and pork (positive in 6/12 samples). Since pork, poultry and beef are the animal species most commonly slaughtered in Europe for human consumption [14], they are the ones that provide the largest amount of animal by-products to pet food manufacturers. Given that their meat is cheaper than that of other species like duck, venison, and goat, economic reasons may underline the frequent detection of these animal species as contaminants, as suggested by Okuma et al. (2015). This may also be the reason why goat and duck were the contaminating animal species least frequently identified in this study. These species were not investigated in the recent study by Horvath-Ungerboeck et al. (2017), which considered only five animal species (chicken, turkey, beef, mutton and pork).

Our results showed that undeclared animal species were more commonly found in dry than wet pet foods. This is in contrast with the results by Okuma et al. (2015) in which the rate of mislabeled wet foods ($n=12/16$) was higher than that of mislabeled dry pet foods (2/17). In a study by Ricci et al. (2013) in which only dry pet foods were included, no comparison between dry and wet diets was possible, whereas Horvath-Ungerboeck et al. (2017) analyzed 8 dry complete diets and 4 canned (2 complete and 2 complementary) products, in which 6 dry (75%) and 3 canned (75%) resulted mislabeled. One possible reason for the more frequent contamination observed in dry products could be that the technological process does not allow thorough cleaning between the production of consecutive batches. Another reason might regard the quality of the incoming raw materials: the

dehydrated meat meals used in dry pet food production may be contaminated with other different meat meals during production, transport or storage. Whether this is a more significant possibility for meat meals than the meat-derivatives used for wet pet food production remains conjecture.

HPDs have been investigated less in previous studies on contamination in elimination diets: there was only 1 HPD in the 12 elimination examined in the study by Ricci et al. (2013) and only 2 HPDs in the 12 pet foods studied by Horvath-Ungerboeck et al. (2017). In the present study that includes 9 HPDs, stronger conclusions can be drawn. It may therefore be stated that fewer contaminating animal species were identified in HPDs than in NPDs and a lower number of contaminated HPDs was detected than NPDs. Even hypothesizing that producers take extra care when producing HPDs, contamination of hydrolysed raw material at their production site (and therefore prior to delivery to the pet food plant) or during transportation cannot be excluded. The present results demonstrated that even if pork was not mentioned in their ingredient list, five HPDs were positive to swine DNA. One of these five products labels stated “hydrolyzed animal offals” in the ingredient list, which does not exclude the presence of pork; however, the remaining four were chicken- and/or soy-based products. There is no way of knowing whether the swine DNA detected was derived from hydrolysed or non-hydrolysed swine protein or even swine fat; this notwithstanding, these samples were not listed as containing swine DNA and this can be construed as contamination. Since HPDs are used as elimination diets for the ARF diagnosis, contamination implies that the same consequences hypothesized for contaminated NPDs be taken into consideration. This means that both HPDs and NPDs may pose problems in the diagnosis of AFR.

Although only few products were collected for some brands (only one product for four brands and only two products for three brands), it may be stated that as observed in 13 of the 14 brands tested, mislabeling is a widespread phenomenon. In conclusion, microarray analysis suggested that in a survey of 38 pet food products formulated for the diagnosis of AFR in dogs and cats, 3 out of 4 were contaminated with one to seven animal species not listed on the label. This appears to be an issue that regards both novel and hydrolyzed protein diets, with

a higher number of contaminating animal species being detected in the former. Contamination also seems to occur more predominantly in dry than wet products, regardless of pet food producer. Particular attention should be given to both the production process due to the high risk of cross-contamination and the selection of raw material suppliers. Bearing this in mind, these results reflect the contamination of only the batches collected here, and therefore the mislabeling of a specific product cannot be generalized either to the respective producer's previous or future productive lots. Importantly, this study demonstrates that the production of uncontaminated products is possible, as confirmed by the ten pet foods (26%) that analysis found to be correctly labeled. When an adverse food reaction is suspected, a home-made elimination diet may be a reasonable alternative to commercial products because it allows a stricter control of the ingested ingredients and highly reduces the risk of contaminants that pose risks to the correct diagnosis of AFR.

4.7 References

1. Maine IR, Atterbury R, Chang K-C. Investigation into the animal species contents of popular wet pet foods. *Acta Vet Scand.* 2015;57:7.
2. Okuma T a., Hellberg RS. Identification of meat species in pet foods using a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. *Food Control.* Elsevier Ltd; 2015;50:9–17.
3. Raditic DM, Remillard RL, Tater KC. ELISA testing for common food antigens in four dry dog foods used in dietary elimination trials. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2011;95:90–7.
4. Ricci R, Granato A, Vascellari M, Boscarato M, Palagiano C, Andrighetto I, et al. Identification of undeclared sources of animal origin in canine dry foods used in dietary elimination trials. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2013;97 Suppl 1:32–8.
5. Horvath-Ungerboeck C, Widmann K, Handl S. Detection of DNA from undeclared animal species in commercial elimination diets for dogs using PCR. *Vet Dermatol.* 2017;1–6.
6. Verlinden A, Hesta M, Millet S, Janssens GPJ. Food allergy in dogs and cats: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006;46:259–73.
7. Mueller RS, Olivry T. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (4): can we diagnose adverse food reactions in dogs and cats with in vivo or in vitro tests? *BMC Vet Res.* BioMed Central; 2017;13:275.
8. Mandigers PJJ, Biourge V, Van Den Ingh TSGAM, Ankringa N, German AJ. A Randomized, Open-Label, Positively-Controlled Field Trial of a Hydrolyzed Protein Diet in Dogs with Chronic Small Bowel Enteropathy. *J Vet Intern Med.* 2010;24:1350–7.
9. Allenspach K, Culverwell C, Chan D. Long-term outcome in dogs with chronic enteropathies: 203 cases. *Vet Rec.* 2016;178:368.
10. Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Sci.* 2009;83:165–74.
11. Accredia. Accredited tests databank [Internet]. 2016 [cited 2018 Feb 14]. Available from: http://www.accredia.it/accredia_labsearch.jsp?ID_LINK=293&area=7&numeroaccr=0201&classification=M&isRestricted=&TL=&LBC=&dipartimento=S
12. European Pet Food Industry Federation (FEDIAF). Code of Good Labelling Practice for Pet Food. 2011;1–63.
13. Council of the European Union. Regulation (EC) No 767/2009 of the European Parliament and of the Council of 13 July 2009. *Off J Eur Union.* 2009;1–28.
14. FAO. FAOSTAT [Internet]. <http://www.fao.org/faostat>. 2018 [cited 2018 Feb 14]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>

Capitolo 5

Evaluation of microbial contamination and effects of storage in raw-meat pet foods purchased online

Giada Morelli¹, Paolo Catellani¹, Riccardo Miotti Scapin¹, Sofia Bastianello¹, Daniele Conficoni¹, Barbara Contiero¹, Rebecca Ricci¹

¹Department of Animal Medicine, Production and Health, University of Padua, Viale dell'Università 16, Legnaro PD 35020 Italy

5.1 Abstract

Feeding raw meat-based diets to dogs and cats has become a widespread practice, and pet owners can easily purchase the ingredients from specialized websites. The objectives of this study were to assess the microbiological quality of raw-meat pet foods bought online and to evaluate the effects of storage at different temperatures for several days.

Twenty-nine raw-meat pet foods were submitted to quantitative bacteriology and analyzed for the presence of *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. Every sample was tested right after the delivery (T0), after 24 or 48 h (T2) and after 72 h (T3), both at 2° C and 7° C. The mean scores for the total viable count (TVC) resulted 5.9×10^6 cfu/g (SD = 4.8×10^7 cfu/g), while those for *Escherichia coli* and fecal coliforms (FC) were 1.1×10^4 cfu/g (SD = 2.5×10^5 cfu/g) and 3.3×10^3 cfu/g (SD = 6.5×10^4 cfu/g), respectively. The samples stored at 2° C had a significant increase of all parameters (TVC: $p < .0001$; E. coli: $p = 0.027$; FC: $p = 0.040$) through time. Significant differences between analyses performed at 2° C and 7° C were found for TVC ($p = 0.0007$). No sample resulted positive for *Salmonella spp.*, while *L. monocytogenes* was isolated from 19 products and *Y. enterocolitica* from three products.

The microbiological quality of raw-meat pet foods sold online appears to be poor, reaching greater levels of bacterial contaminations if not stored properly. Also, potentially zoonotic bacteria were detected on the analyzed samples.

5.2 Abbreviations

CFU	Colony-forming unit
FC	Fecal coliforms
RMBD	Raw meat-based diet
TVC	Total viable count

5.3 Introduction

Raw meat-based diets (RMBDs) for dogs and cats have become very popular over recent years. Feeding pets with fresh uncooked animal products and byproducts like meat, offal and bones as a healthier alternative to dry or canned pet food has been associated with many benefits according to the owners who support these regimens (Freeman et al., 2013). However, the claimed advantages of RMBDs have not been clearly supported with scientifically valid data yet, whereas some of the associated animal and public health risks have been incontrovertibly documented (Freeman et al., 2013; LeJeune and Hancock, 2001). Whether intended for the consumption by humans or pets, in fact, raw meat products are commonly contaminated with a variety of bacteria, some of which could be potentially zoonotic pathogens. RMBDs pose a risk not only to the animals consuming them, but also to the people who handle the contaminated ingredients and who come into contact with subclinically infected pets (LeJeune and Hancock, 2001). Salmonellosis, listeriosis and yersiniosis are some of the most common foodborne zoonoses monitored by the European Food Safety Authority (EFSA, 2017), and the interaction with pets, especially those eating contaminated raw meat, is considered one infection risk factor (LeJeune & Hancock, 2001). Along with the widespread recognition of RMBDs by pet owners, some websites have been thus created to meet the growing demand of raw products. Commercial RMBDs for

pets are now sold from specific online shops, from which it is possible to purchase frozen skeletal muscles as well as internal organs, cartilage and bones from mammals, poultry or fish. Since sellers are not required to comply any regulation forcing strict controls on the preparation and on the distribution of raw-meat pet foods, concerns may arise about the wholesomeness of such items.

The aims of this study were therefore to evaluate the microbiological quality (total viable count) and the hygiene quality (*Escherichia coli*) of commercially available RMBDs purchased online, as well as to assess the presence of certain pathogenic bacteria (*Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*). As poor domestic storage conditions may be a contributory factor in RMBDs spoilage afterwards, a further goal was then to evaluate the microbiological features of the same products when stored at different temperatures for multiple days, simulating an improper food handling practice followed by the customer.

5.4 Materials e Methods

Twenty-nine commercially available RMBD products for pets were purchased from three online stores. The frozen items were delivered within 48 hours after the purchase and were immediately stored at -18°C at the Food Microbiology Laboratory of the University of Padua until evaluation.

Among the collected products, 27 samples included meat and animal by-products derived from a single animal species and two samples from two animal species. More precisely, the animal sources of the analyzed products were beef (n=20), turkey (n=3), chicken (n=2), lamb (n=2), duck (n=1), rabbit (n=1), horse (n=1) and salmon (n=1). The beef-based products included meat (n=1), bones (n=1), cartilage (i.e. tracheas, ears, muzzle; n=5), offal (i.e. green tripe, liver, kidney, omasum, heart, spleen, udder; n=10, of which 7 single internal organs and 3 mixes), and mixtures of all the parts just listed (n=3). The poultry-based products included turkey meat (n=1), chicken and turkey offal (n=1), chicken byproducts (n=1) and duck mixture (n=1); another product was a turkey and rabbit mixture. The lamb-based products included one green tripe and a mixture of meat and offal; the

horse-based product included only meat while the salmon-based one was a mixture. Except for cartilages and bones, all products were made of minced meat and/or offal.

Within 24 hours of delivery (T0), the frozen items were thawed at 2 °C and submitted to the bacterial analyses. The products were processed while still cold and manipulated with sterile tools in an aseptic environment to prevent substantial bacterial growth. One 20-g sample for the quantitative analyses (i.e. total viable count, TVC; fecal coliforms, FC; *Escherichia coli*) and three 25-g samples for the qualitative analyses (i.e. research of the following three bacterial species: *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*) were obtained from each product. The aliquots were collected twice more and stored in sterile containers at 2°C or 7°C for the repetition of the analyses in the following 24 or 48 h (T1 and T2, respectively) and 72 h (T3). This was performed to mimic a proper refrigerated storage condition (i.e. 2°C) or an improper one (i.e. 7°C), and to evaluate the changes of the microbial load within few days after thawing.

5.4.1 Quantitative microbiology

In a sterile sealed plastic bag, each 20-g sample was mixed to 180 mL of sterile saline solution (0.85% NaCl) and homogenized in a paddle blender (Stomacher 400, Seward, Worthing, UK) for one minute; the dilutions were then filtered and poured into sterile containers, and serial 10-fold dilutions were performed. Plate Count Agar (PCA; Oxoid Limited, Basingstoke, UK) was used to culture aerobic bacteria and Chromocult® Coliform agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used to culture *E. coli* (ISO 9308-1:2014). The inoculated Petri dishes were incubated for 48±3 hours at 35°C±1°C according to the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) Official Methods 990.12 and 991.14, respectively. The microbial counts were determined by applying the formula given in ISO 18593:2004 and expressed as cfu/g.

5.4.2 *Salmonella* spp. cultures

The samples (25 g of each) were analyzed for the presence of *Salmonella* species according to ISO 6579:2002. Twenty-five g of each sample were put in a sterile container along with 225 ml of buffered peptoned water (BPW) and incubated at 37°C for 24 h. One ml of culture was then inoculated in tubes containing 9 ml of Rappaport Vassiliadis broth (RV; Oxoid Limited, Basingstoke, UK) which were subsequently incubated at 42°C for 24 h. The subculture broth was inoculated onto Xylose-lysine-tergitol 4 (XLT-4) agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and incubated aerobically at 37°C for 24 h. Colonies showing typical morphology were identified via biochemical method. The presumptive *Salmonella* colonies were serologically confirmed for the presence of O-antigens.

5.4.3 *Listeria monocytogenes* culture

The samples were analyzed for the presence of *L. monocytogenes* according to ISO 11290-1:1996. Twenty-five g of each product were put in a sterile container along with 225 ml of Fraser Broth Half Concentration (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and incubated at 30°C for 24 h. Then, 0.1 ml of culture was collected and inoculated in tubes containing 10 ml of Fraser broth which were subsequently incubated at 37°C for 24/48 h. The subculture broth was inoculated onto Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti (ALOA) dishes (Biolife Italiana s.r.l., Milano) and incubated at 37°C for 24/48 h. The following tests were performed on the suspected strains: Gram staining, hemolytic activity, Camp test, biochemical identification with API Listeria (bio-Mérieux).

5.4.4 *Yersinia enterocolitica* cultures

The samples were 1:100 dilutions and put in a sterile container with Yersinia ITC Broth (Biolife Italiana s.r.l., Milano) and incubated at 25°C for 48 h. Then the subculture broth was inoculated onto Yersinia Selective Agar Base dishes (CIN agar; Biolife Italiana s.r.l., Milano) and incubated at 30°C for 24 h. Colonies with a typical bulls-eye appearance were identified by the use of biochemical tests.

5.4.5 Statistical analyses

Statistical analyses were performed with SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The data collected from the survey were transferred into a spreadsheet (Excel, Microsoft) and submitted to descriptive analysis. When the microbial counts were below the detection level value, a reference value was assumed (i.e. 50 if <100). The data converted to Log₁₀ were processed by non-parametric analysis (Mann-Whitney U-test for independent samples) to test the effects of time and temperature using an ANOVA linear model. Post-hoc pairwise comparisons were performed using Bonferroni correction. Significance levels were defined as $P < 0.05$.

5.5 Results

Immediately after thawing (T0), the mean quantitative score for TVC of the 29 analyzed raw-meat pet foods was 5.9×10^6 cfu/g (SD = 4.8×10^7 cfu/g). The most contaminated products were minced lamb meat mixed with lamb green tripe (1.1×10^8 cfu/g) and bovine green tripe (6.0×10^7 cfu/g); the least contaminated products were bovine muzzle (5.0×10^4 cfu/g) and horse meat (9.0×10^4 cfu/g).

The quantitative scores for *E. coli* ranged from 8.0×10^2 to 8.2×10^6 cfu/g (mean value = 1.1×10^4 , SD = 2.5×10^5) and the ones for FC ranged from 1.0×10^2 to 1.8×10^6 cfu/g (mean value = 3.3×10^3 , SD = 6.5×10^4). Values below the detectable level were found in three products which were bovine trachea, muzzle and bone.

Table 1 shows the results of the storage tests performed in time and temperature abuse conditions. The analyzed microflora grew abundantly even at low temperature as its size exceeded 10^8 cfu/g after 3 d of storage at 2 °C. Starting from 24 h after thawing, the contamination of raw-meat pet foods significantly increased with time, both at 2 and 7 °C. The signs of spoilage were less delayed and more severe at 7 °C, however *E. coli* and FC remained constant with time.

Table 1. Microbiological changes (log₁₀ cfu/g; mean ± SE) of raw-meat pet foods stored at 2 °C and 7 °C.

	T0	T1	T2	T3	p
TVC, 2 °C	6.77 ± 0.17 ^b	7.44 ± 0.22 ^b	7.53 ± 0.28 ^{ab}	8.32 ± 0.18 ^a	<0.0001
TVC, 7 °C	\	7.93 ± 0.17 ^b	8.32 ± 0.21 ^{ab}	8.83 ± 0.15 ^a	0.0008
E. coli, 2 °C	4.05 ± 0.27 ^b	4.30 ± 0.37 ^{ab}	4.71 ± 0.46 ^{ab}	5.23 ± 0.29 ^a	0.027
E. coli, 7 °C	\	5.03 ± 0.35	5.97 ± 0.44	5.11 ± 0.32	>0.05
FC, 2 °C	3.52 ± 0.23 ^b	3.81 ± 0.32 ^{ab}	3.99 ± 0.40 ^{ab}	4.48 ± 0.25 ^a	0.040
FC, 7 °C	\	4.59 ± 0.33	4.52 ± 0.41	4.84 ± 0.30	>0.05

†TVC, Total Viable Count; FC, Fecal coliforms

‡ different significance levels were denoted with different letters (a, b)

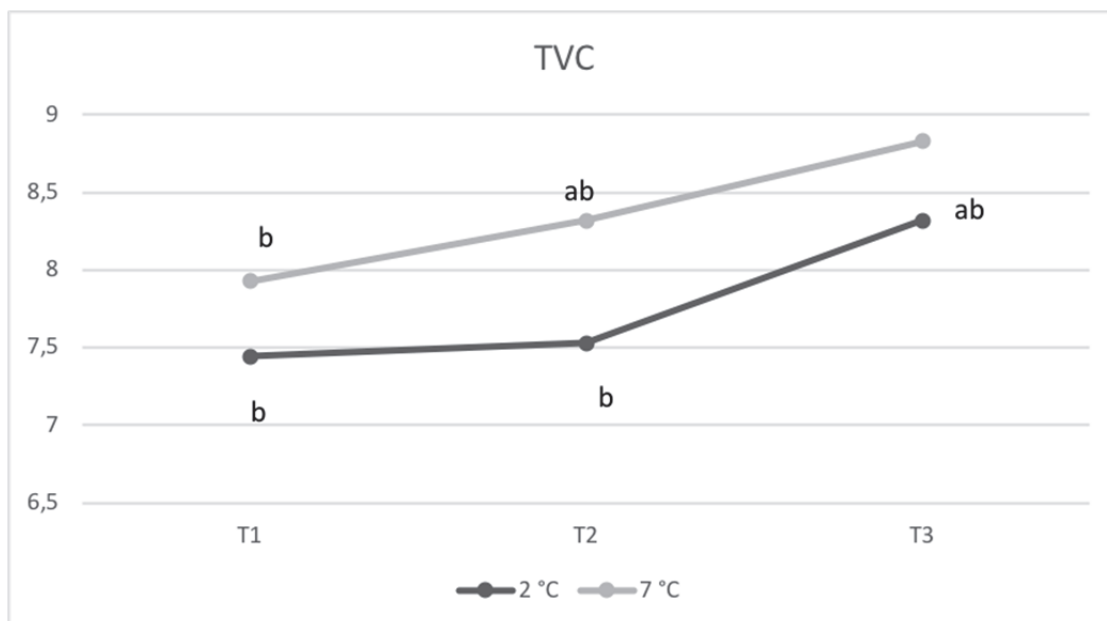
Overall, the storage at higher temperatures affected the microbial growth of the samples significantly (Table 2).

Table 2. Microbiological loads (\log_{10} cfu/g; mean_{T1-T3} \pm SE_{T1-T3}) of raw-meat pet foods stored at 2 °C or 7 °C.

	2°	7°	p
TVC	7.76 \pm 0.12	8.36 \pm 0.12	0.0007
E. coli	4.75 \pm 0.22	5.37 \pm 0.23	0.052
FC	4.10 \pm 0.19	4.65 \pm 0.20	0.047

The statistical differences in time-temperature abuse conditions are reported in [Figure 1](#).

[Figure 1](#). Effects of time and temperature on the TVC (\log_{10} cfu/g) of the analyzed raw-meat pet foods. Different significance levels were denoted with different letters (a,b).



No *Salmonella* spp. were isolated from the analyzed samples, while *L. monocytogenes* was isolated from 19 products and *Y. enterocolitica* from 3 products (i.e. bovine offal mix, turkey and rabbit mix, lamb meat plus green tripe). Sixteen products resulted positive also for other *Listeria* species and none of the abovementioned bacteria were isolated from two products only (i.e. bovine liver and kidney).

5.6 Discussion and conclusions

The purchase of pet food from the internet has become very popular in the last years, and many online stores sell now raw meat-based products intended for the domestic consumption by dogs and cats. From a survey by this author (data not published yet), it emerged that 28% of the interviewed RMBD-feeding dog owners was used to obtain raw ingredients through some websites. It is well known that particular care should be taken when processing raw meat-based products in order to prevent inappropriate contamination levels and to minimize microbial growth. The maintenance of the cold chain and the respect of strict hygiene criteria during preparation but also during transportation should therefore be guaranteed by raw pet food producers. However, the lack of controls and regulations may raise questions about the quality of raw meat-based products intended for dogs and cats, and this study aimed to investigate the microbial load of such products specifically sold online.

For what concerns the quantitative microbiology of the analyzed samples, the high values detected already immediately after thawing suggested a deteriorating quality of the original RMBD products. Considered that the European Union has imposed limit values of 5×10^6 cfu/g for the total count of the bacteria allowed to be detected on minced meat for human consumption (EC 2073/2005), 18 products out of the 29 analyzed in this study surpassed the threshold and would not be therefore acceptable. Similarly, considering the hygiene criteria for *E. coli* and fecal coliforms whose threshold is 5×10^2 cfu/g for both (EC 2073/2005), 26 and 17 products respectively would not be judged fit for human consumption. In a recent Dutch study by Van Bree and colleagues (van Bree et al., 2018), 35 commercial RMBDs were tested for total bacterial count and a mean value of 2.3×10^5 cfu/g was found. The microbiological quality of the diets tested in such research was considered acceptable since none surpassed the abovementioned legal limit (EC 2073/2005), while 40% of the products did not meet the minimum hygiene thresholds for *E. coli* (van Bree et al., 2018). A higher percentage of commercial RMBDs not complying with the European legal limit for *E. coli* was found in Sweden by Nilsson (Nilsson, 2015), as 59% of the analyzed products (total n = 39)

showed values greater than 5×10^2 cfu/g. It is noteworthy that the latter study included some raw meat products purchased from the internet.

Overall, the frequencies and quantities of *E. coli* found in this study are averagely similar to higher than the results obtained in other studies performed worldwide so far (Nilsson, 2015; Strohmeyer et al., 2006; van Bree et al., 2018; Weese et al., 2005), while the mean but also the maximum TVC values were the highest recorded in commercially available RMBDs, seen the scores of 2.5×10^5 cfu/g reached in the study by Freeman and Michel (Freeman and Michel, 2001) and 5.0×10^6 cfu/g in the study by Van Bree et al. (van Bree et al., 2018). Therefore, it is possible to hypothesize that raw meat-based ingredients purchased online might be generally more contaminated than commercial RMBDs which are sold by pet stores and retailers. Predictably, the most contaminated products collected for this research were the ones including green tripe, while the least contaminated were bones and cartilaginous parts. As for the rest, it is difficult to make comparisons based on raw meat product type or animal source because the ingredients of the diets analyzed in other studies were not specified in detail.

Meat is commonly recognized as one of the most perishable foods because its chemical composition favors microbial growth up to unacceptable levels that significantly contribute to deterioration or spoilage (Doulgeraki et al., 2012). The microbial load of the products analyzed in this study grew considerably over time, suggesting that defrosted RMBDs should be consumed within one day as usually reported on their labels. Furthermore, along with storage time, higher temperatures developed a more suitable environment for bacterial growth in the analyzed products. Storage temperature is considered the most important factor for proper meat conservation because it affects the bacterial growth rate and the final cell count (Doulgeraki et al., 2012). In fact, the literature demonstrated that storing meat at lower than 4°C immediately after slaughtering, during transport and storage is critical for its hygiene, safety and shelf life (Dave and Ghaly, 2011). However, time-temperature abuse due to improper consumer food handling practices has been reported as one of the most common contributory factors in bacterial outbreaks (Roccatò et al., 2015). Seen the high initial microbial loads of the analyzed products, particular care must be hence taken by owners in

managing and handling commercial RMBDs purchased from the internet in order to prevent further and faster contaminations.

It is no surprise that raw meat, whether sold for human or animal consumption, can be contaminated with a variety of pathogenic bacteria despite the care used during its processing (LeJeune and Hancock, 2001). The risk of food-borne illnesses in pet animals consuming RMBDs is therefore a major concern, but the public health risk of infections should be also plentifully considered since zoonotic pathogens may be transmitted directly when handling the raw ingredients or indirectly by the fecal-oral route.

Microorganisms of the genus *Salmonella* are the ones which received the most attention in pet food investigations because of their well-known zoonotic potential. Even if *Salmonella*-related gastroenteritis in dogs (Chengappa et al., 1993; Morley et al., 2006; Stone et al., 1993) and fatal septicemia in cats (Stiver et al., 2003) have been reported, pets can more commonly become subclinical carriers and the main concern is thus related to the possible infection of humans as a result of direct contacts or environmental contaminations. The literature demonstrated that *Salmonella* is frequently found in feces from dogs consuming contaminated raw meat (Finley et al., 2007; Joffe and Schlesinger, 2002; Lefebvre et al., 2008; Leonard et al., 2011; Morley et al., 2006; Stone et al., 1993), and pet-to-person transmission of this pathogen may happen if carrier animals are handled without observing proper hygienic practices (LeJeune and Hancock, 2001). No *Salmonella spp.* were found in the RMBDs samples collected for this study, in line with the results obtained in a previous investigation by Freeman and Michel (Freeman & Michel, 2001). However, many works reported the presence of *Salmonella* in both homemade and commercial RMBDs instead, with prevalence rates ranging from 2 to 100% of the tested raw samples (Chengappa et al., 1993; Finley et al., 2008; Fredriksson-Ahomaa et al., 2017; Joffe and Schlesinger, 2002; Lenz et al., 2009; Morley et al., 2006; Nemser et al., 2014; Stone et al., 1993; Strohmeyer et al., 2006; van Bree et al., 2018; Weese et al., 2005). Interestingly, a recent publication attributed the onset of salmonellosis in two cats to the feeding of frozen commercial poultry RMBDs bought on the internet (Giacometti et al., 2017).

L. monocytogenes was already found in 16% and 54% of raw food analyzed by Nemser and colleagues (Nemser et al., 2014) and by Van Bree and colleagues (van Bree et al., 2018), respectively; in the same studies, 17% and 43% of the samples confirmed also to be positive for other *Listeria* species. In the present investigation, the prevalence of these bacteria was higher as *L. monocytogenes* and other *Listeria* species were found in 65% and 55% of the analyzed products. In dogs' feces a low prevalence of *Listeria* was detected (Weber et al., 1995) and few clinically manifest infections caused by *L. monocytogenes* were documented (Palerme et al., 2016; Pritchard et al., 2016; Schroeder and van Rensburg, 1993), one of which was a case of abortion in a bitch fed raw meat products (Weber and Plagemann, 1991). Despite the mainly asymptomatic role in pets' and the relatively limited spreading potential through their feces, *L. monocytogenes* can cause a severe disease in humans even several weeks after exposure and symptoms range from flu-like to more serious infections such as meningitis and other potentially life-threatening complications, especially in people with weak immune systems (van Bree et al., 2018). Seen the high prevalence of *L. monocytogenes* found in the analyzed products, the handling of such RMBDs may become a concrete source of environmental contamination thus contributing to a significant infection risk for pet owners if appropriate hygiene precautions are not taken.

Y. enterocolitica is another microorganism frequently isolated from raw meat, and dogs can be subclinically infected with serotypes that are pathogenic to their species but also to humans (LeJeune and Hancock, 2001). In fact, the development of canine *Yersinia*-related enteritis as well as the transmission of this pathogen from dogs to people have been documented (David Wilson et al., 1976; Fenwick et al., 1994; Fredriksson-Ahomaa et al., 2001; Gutman et al., 1973). Although *Y. enterocolitica* is more frequently isolated from pork meat (Fredriksson-Ahomaa et al., 2017, 2001; LeJeune and Hancock, 2001), in this study it was found in three products made of different meat sources (i.e. bovine, turkey mixed with rabbit, lamb). In a recent study by Fredriksson-Ahomaa and colleagues (Fredriksson-Ahomaa et al., 2017), *Y. enterocolitica* was detected in 10 out of 88 RMBD

products, especially in those containing pork, as well as in the feces of one dog (out of 29) and one cat (out of 2) fed with those diets.

Feeding RMBDs is a current trend among pet owners and purchasing frozen ingredients from the internet is becoming a common practice. This study showed that RMBDs sold online could reach very high levels of bacterial contamination that may further increase if such products are not stored properly at home. Moreover, zoonotic meat-borne bacteria like *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* were found on the analyzed products, making the feeding and handling of raw meat-based ingredients become a potential health hazard to pets and in-contact humans.

5.7 References

- Alasalvar, C., Taylor, K.D.A., Zubcov, E., Shahidi, F., Alexis, M., 2002. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem.* 79, 145–150.
- Alexander, C., Cross, T.-W.L., Devendran, S., Neumer, F., Theis, S., Ridlon, J.M., Suchodolski, J.S., de Godoy, M.R.C., Swanson, K.S., 2018. Effects of prebiotic inulin-type fructans on blood metabolite and hormone concentrations and faecal microbiota and metabolites in overweight dogs. *Br. J. Nutr.* 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0007114518001952>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V, Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15718–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 979–984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605374104>
- Baldwin, K.; Bartges, J.; Buffington, T.; Freeman, L.M.; Grabow, M.; Legred, J.; Ostwald, D., 2010. AAHA Nutritional Assessment Guidelines for dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 46, 285–296. <https://doi.org/10.1142/S0219030303000673>
- Barko, P.C., McMichael, M.A., Swanson, K.S., Williams, D.A., 2018. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 9–25. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>
- Bauer, J.E., 2016. The essential nature of dietary omega-3 fatty acids in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 249, 1267–1272. <https://doi.org/10.2460/javma.249.11.1267>
- Bauer, J.E., 2011. Therapeutic use of fish oils in companion animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 239, 1441–1451. <https://doi.org/10.2460/javma.239.11.1441>
- Bauer, J.E., 2006. Facilitative and functional fats in diets of cats and dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229, 680–684. <https://doi.org/10.2460/javma.229.5.680>
- Beloshapka, A.N., Forster, G.M., 2016. Fecal Microbial Communities of Overweight and Obese Client-Owned Dogs Fed Cooked Bean Powders as Assessed by 454-Pyrosequencing. *J. Vet. Sci. Technol.* 7. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000366>
- Benno, Y., Nakao, H., Uchida, K., Mitsuoka, T., 1992. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 703–706. <https://doi.org/10.1292/jvms.54.703>
- Bierer, T.L., Bui, L.M., 2004. High-Protein Low-Carbohydrate Diets Enhance Weight Loss in Dogs. *J. Nutr.* 134, 2087–2089.
- Blake, A.B., Suchodolski, J.S., 2016. Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. *Anim. Front.* 6, 37. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0032>

- Blanchet, C., Lucas, M., Julien, P., Morin, R., Gingras, S., Dewailly, É., 2005. Fatty acid composition of wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* 40, 529–531. <https://doi.org/10.1007/s11745-005-1414-0>
- Blum, J.W., Zentek, J., Meyer, H., 1992. The effect of a different energy supply on the growth intensity and skeletal development of growing Great Danes. 2. Effect on insulin-like growth factor I and on thyroid hormones. *Zentralbl. Veterinarmed. A* 39, 568–74.
- Bolnick, D.I., Snowberg, L.K., Hirsch, P.E., Lauber, C.L., Org, E., Parks, B., Lusi, A.J., Knight, R., Caporaso, J.G., Svanbäck, R., 2014. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5500>
- Budge, S.M., Iverson, S.J., Bowen, W.D., Ackman, R.G., 2002. Among- and within-species variability in fatty acid signatures of marine fish and invertebrates on the Scotian Shelf, Georges Bank, and southern Gulf of St. Lawrence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 886–898. <https://doi.org/10.1139/f02-062>
- Calvani, R., Miccheli, A., Capuani, G., Tomassini Miccheli, A., Puccetti, C., Delfini, M., Iaconelli, A., Nanni, G., Mingrone, G., 2010. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype. *Int. J. Obes.* 34, 1095–1098. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.44>
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Ferrie, J., Gibson, G.R., Casteilla, L., Delzenne, N.M., Alessi, M.C., 2007. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>.P.D.C.
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., 2008. Changes in gut microbiota control metabolic diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470–81. <https://doi.org/10.2337/db07-1403>.Additional
- Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., Delzenne, N.M., 2007. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50, 2374–2383. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0791-0>
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van De Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091–1103. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G. a, Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C. a, Mcdonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W. a, Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. correspondence

- QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data
Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nat. Publ. Gr.* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- Case, L.P., Daristotle, L., Hayek, M.G., Raasch, M.F., 2010. Canine and feline nutrition : a resource for companion animal professionals, 3rd ed. Mosby.
- Cerf-Bensussan, N., Gaboriau-Routhiau, V., 2010. The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 735–744. <https://doi.org/10.1038/nri2850>
- Chandler, M., Cunningham, S., Lund, E.M., Khanna, C., Naramore, R., Patel, A., Day, M.J., 2017. Obesity and Associated Comorbidities in People and Companion Animals: A One Health Perspective. *J. Comp. Pathol.* 156, 296–309. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.03.006>
- Collado, M.C., Isolauri, E., Laitinen, K., Salminen, S., 2008. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 894–899. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.4.894>
- Davila, A.M., Blachier, F., Gotteland, M., Andriamihaja, M., Benetti, P.H., Sanz, Y., Tomé, D., 2013. Re-print of “intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host.” *Pharmacol. Res.* 69, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.01.003>
- Davis, J.E., Gabler, N.K., Walker-Daniels, J., Spurlock, M.E., 2008. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity* 16, 1248–1255. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.210>
- de La Serre, C.B., Ellis, C.L., Lee, J., Hartman, A.L., Rutledge, J.C., Raybould, H.E., 2010. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G440-448. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00098.2010>
- Deng, P., Swanson, K.S., 2015. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *Br. J. Nutr.* 113, S6–S17. <https://doi.org/10.1017/S0007114514002943>
- Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járjai, Z., Fezza, F., Miura, G.I., Palmiter, R.D., Sugiura, T., Kunos, G., 2001. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410, 822–825. <https://doi.org/10.1038/35071088>
- Dieu Huynh, M., Kitts, D.D., 2009. Evaluating nutritional quality of pacific fish species from fatty acid signatures. *Food Chem.* 114, 912–918. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.10.038>
- Diez, M., Nguyen, P., Jeusette, I., Devois, C., Istasse, L., Biourge, V., 2002. Weight Loss in Obese Dogs: Evaluation of a High-Protein, Low-Carbohydrate Diet. *J. Nutr.* 132, 1685–1687. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1649S>
- Ding, S., Chi, M.M., Scull, B.P., Rigby, R., Schwerbrock, N.M.J., Magness, S., Jobin, C., Lund, P.K., 2010. High-fat diet: Bacteria interactions promote intestinal

- inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One* 5.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012191>
- Duncan, M., Davison, J.S., Sharkey, K.A., 2005. Review article: Endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22, 667–683. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02648.x>
- FEDIAF, 2017. Nutritional Guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.
- Finotello, F., Mastrorilli, E., Di Camillo, B., 2018. Measuring the diversity of the human microbiota with targeted next-generation sequencing. *Brief. Bioinform.* 19, 679–692. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw119>
- Fleissner, C.K., Huebel, N., Abd El-Bary, M.M., Loh, G., Klaus, S., Blaut, M., 2010. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br. J. Nutr.* 104, 919–929.
<https://doi.org/10.1017/S0007114510001303>
- Forster, G.M., Stockman, J., Noyes, N., Heuberger, A.L., Broeckling, C.D., Bantle, C.M., Ryan, E.P., 2018. A Comparative Study of Serum Biochemistry, Metabolome and Microbiome Parameters of Clinically Healthy, Normal Weight, Overweight, and Obese Companion Dogs. *Top. Companion Anim. Med.* <https://doi.org/10.1053/J.TCAM.2018.08.003>
- Fraher, M.H., O’Toole, P.W., Quigley, E.M.M., 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 312–322.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.44>
- Furet, J.-P., Kong, L.-C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J.-L., Mariat, D., Corthier, G., Doré, J., Henegar, C., Rizkalla, S., Clément, K., 2010. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery–induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*.
- Garcia-Mazcorro, J., Minamoto, Y., 2013. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs : a brief review *Microorganismos gastrointestinales en gatos y perros : una revisión breve.* *Arch. Med. Vet.* 45, 111–124.
<https://doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200002>
- 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. *Microbiologyopen* 1, 340–347. <https://doi.org/10.1002/mbo3.36>
- Gérard, P., 2016. Gut microbiota and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 147–162.
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-2061-5>
- German, A.J., Ryan, V.H., German, A.C., Wood, I.S., Trayhurn, P., 2010. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. *Vet. J.* 185, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.004>
- Geurts, L., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., Knauf, C., Cani, P.D., 2014. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose

- metabolism: Novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Benef. Microbes* 5, 3–17. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0065>
- Gong, W., Kwak, I.Y., Pota, P., Koyano-Nakagawa, N., Garry, D.J., 2018. DrImpute: Imputing dropout events in single cell RNA sequencing data. *BMC Bioinformatics* 19, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2226-y>
- Goodrich, J.K., Di Rienzi, S.C., Poole, A.C., Koren, O., Walters, W.A., Caporaso, J.G., Knight, R., Ley, R.E., 2014. Conducting a microbiome study. *Cell* 158, 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.037>
- Greetham, H.L., Giffard, C., Hutson, R.A., Collins, M.D., Gibson, G.R., 2002. Bacteriology of the Labrador dog gut: A cultural and genotypic approach. *J. Appl. Microbiol.* 93, 640–646. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01724.x>
- Grønvold, A.M.R., L'Abée-Lund, T.M., Sørum, H., Skancke, E., Yannarell, A.C., MacKie, R.I., 2010. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 71, 313–326. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00808.x>
- Grześkowiak, L., Endo, A., Beasley, S., Salminen, S., 2015. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe* 34, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>
- Guard, B.C., Mila, H., Steiner, J.M., Mariani, C., Suchodolski, J.S., Chastant-Maillard, S., 2017. Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. *PLoS One* 12, 8–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175718>
- Haaf, T., 2011. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Curr. Protoc. Cell Biol.* 1988, 1–52. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03067.x>
- Hand, D., Wallis, C., Colyer, A., Penn, C.W., 2013. Pyrosequencing the Canine Faecal Microbiota: Breadth and Depth of Biodiversity. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053115>
- Hand, M.S., Lewis, L.D., 2010. *Small animal clinical nutrition*, 5th ed. Mark Morris Institute.
- 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 Microbiol. Ecol.* 76, 301–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x>
- 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 Microbiol. Ecol.* 84, 332–343. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12067>
- Hang, I., Heilmann, R.M., Grützner, N., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M., Atroshi, F., Sankari, S., Kettunen, A., de Vos, W.M., Zentek, J., Spillmann, T., 2013. Impact of diets with a high content of greaves-meal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin

- concentrations in healthy dogs. *BMC Vet. Res.* 9, 201. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-201>
- Hang, I., Rinttila, T., Zentek, J., Kettunen, A., Alaja, S., Apajalahti, J., Harmoinen, J., de Vos, W.M., Spillmann, T., 2012. Effect of high contents of dietary animal-derived protein or carbohydrates on canine faecal microbiota. *BMC Vet. Res.* 8, 90. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-90>
- Heid, C., Livak, K., Stevens, J., Williams, P., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Herstad, K.M.V., Gajardo, K., Bakke, A.M., Moe, L., Ludvigsen, J., Rudi, K., Rud, I., Sekelja, M., Skancke, E., 2017. A diet change from dry food to beef induces reversible changes on the faecal microbiota in healthy, adult client-owned dogs. *BMC Vet. Res.* 13, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1073-9>
- Hoffmann, A.R., Proctor, L.M., Surette, M.G., Suchodolski, J.S., 2016. The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Vet. Pathol.* 53, 10–21. <https://doi.org/10.1177/0300985815595517>
- Honneffer, J.B., Steiner, J.M., Lidbury, J.A., Suchodolski, J.S., 2017. Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics* 13, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1165-3>
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D.N., 2015. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21, 8836–8847. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Janssen, A.W.F., Kersten, S., 2015. The role of the gut microbiota in metabolic health. *FASEB J.* 29, 3111–3123. <https://doi.org/10.1096/fj.14-269514>
- Kieler, I.N., Shamzir Kamal, S., Vitger, A.D., Nielsen, D.S., Lauridsen, C., Bjornvad, C.R., 2017. Gut microbiota composition may relate to weight loss rate in obese pet dogs. *Vet. Med. Sci.* 3, 252–262. <https://doi.org/10.1002/vms3.80>
- Kil, D.Y., Swanson, K.S., 2011. Companion animals symposium: Role of microbes in canine and feline health. *J. Anim. Sci.* 89, 1498–1505. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3498>
- Kim, J., An, J.U., Kim, W., Lee, S., Cho, S., 2017. Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. *Gut Pathog.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0218-5>
- Kinross, J.M., Darzi, A.W., Nicholson, J.K., 2011. Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Med.* <https://doi.org/10.1186/gm228>
- Kuczynski, J., Lauber, C.L., Walters, W.A., Parfrey, L.W., Clemente, J.C., Gevers, D., Knight, R., 2012. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat. Rev. Genet.* 13, 47–58. <https://doi.org/10.1038/nrg3129>
- Kushner, R.F., Doerfler, B., 2008. Low-carbohydrate, high-protein diets revisited. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24, 198–203. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282f43a87>

- Lee, W.J., Hase, K., 2014. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat. Chem. Biol.* 10, 416–424. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1535>
- Lenox, C.E., 2015. Timely Topics in Nutrition: An overview of fatty acids in companion animal medicine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 246, 1198–1202. <https://doi.org/10.2460/javma.246.11.1198>
- Li, Q., Lauber, C.L., Czarnecki-Maulden, G., Pan, Y., Hannah, S.S., 2017. Effects of the dietary protein and carbohydrate ratio on gut microbiomes in dogs of different body conditions. *MBio* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01703-16>
- Liévin-Le Moal, V., Servin, A.L., 2006. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides and Microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 315–337. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.315>
- Lun, A.T.L., McCarthy, D.J., Marioni, J.C., 2016. A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor. *F1000Research* 5, 2122. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9501.2>
- Maier, L., Pruteanu, M., Kuhn, M., Zeller, G., Telzerow, A., Anderson, E.E., Brochado, A.R., Fernandez, K.C., Dose, H., Mori, H., Patil, K.R., Bork, P., Typas, A., 2018. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* 555, 623–628. <https://doi.org/10.1038/nature25979>
- Martin, F.P.J., Dumas, M.E., Wang, Y., Legido-Quigley, C., Yap, I.K.S., Tang, H., Zirah, S., Murphy, G.M., Cloarec, O., Lindon, J.C., Sprenger, N., Fay, L.B., Kochhar, S., Van Bladeren, P., Holmes, E., Nicholson, J.K., 2007. A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol. Syst. Biol.* 3. <https://doi.org/10.1038/msb4100153>
- Masuoka, H., Shimada, K., Kiyosue-Yasuda, T., Kiyosue, M., Oishi, Y., Kimura, S., Yamada, A., Hirayama, K., 2017. Transition of the intestinal microbiota of dogs with age. *Biosci. Microbiota, Food Heal.* 36, 27–31. <https://doi.org/10.12938/bmfh.BMFH-2016-021>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mentula, S., Harmoinen, J., Heikkilä, M., Westermarck, E., Rautio, M., 2005. Comparison between Cultured Small-Intestinal and Fecal Microbiotas in Beagle Dogs 71, 4169–4175. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4169>
- Middelbos, I.S., Boler, B.M.V., Qu, A., White, B.A., Swanson, K.S., Fahey, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>
- Mikkelsen, K.H., Allin, K.H., Knop, F.K., 2016. Effect of antibiotics on gut microbiota, glucose metabolism and body weight regulation: a review of the literature. *Diabetes Obes. Metab.* 18, 444–453.

<https://doi.org/10.1111/dom.12637>

- Muccioli, G.G., Naslain, D., Bäckhed, F., Reigstad, C.S., Lambert, D.M., Delzenne, N.M., Cani, P.D., 2010. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol. Syst. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.46>
- National Research Council, 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. National Academies Press.
- Nicholson, J.K., Holmes, E., Wilson, I.D., 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 431–438. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1152>
- Org, E., Mehrabian, M., Parks, B.W., Shipkova, P., Liu, X., Drake, T.A., Lusic, A.J., 2016. Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes* 7, 313–322. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1203502>
- Özogul, Y., Özogul, F., 2007. Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas. *Food Chem.* 100, 1634–1638. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.11.047>
- Park, H.J., Lee, S.E., Kim, H.B., Isaacson, R.E., Seo, K.W., Song, K.H., 2015a. Association of Obesity with Serum Leptin, Adiponectin, and Serotonin and Gut Microflora in Beagle Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 43–50. <https://doi.org/10.1111/jvim.12455>
- Park, H.J., Lee, S.E., Kim, H.B., Isaacson, R.E., Seo, K.W., Song, K.H., 2015b. Association of obesity with serum leptin, adiponectin, and serotonin and gut microflora in beagle dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 43–50. <https://doi.org/10.1111/jvim.12455>
- Park, H.J., Lee, S.E., Kim, H.B., Kim, J.H., Seo, K.W., Song, K.H., 2015. Fecal microbiota analysis of obese dogs with underlying diseases: a pilot study. *Korean J. Vet. Res.* 55, 205–208. <https://doi.org/10.14405/kjvr.2015.55.3.205>
- Pinna, C., Vecchiato, C.G., Zaghini, G., Grandi, M., Nannoni, E., Stefanelli, C., Biagi, G., 2016. In vitro influence of dietary protein and fructooligosaccharides on metabolism of canine fecal microbiota. *BMC Vet. Res.* 12, 53. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0672-1>
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., LeChatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J.-M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Li, S., Yang, H., Wang, J., Ehrlich, S.D., Nielsen, R., Pedersen, O., Kristiansen, K., Wang, J., 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>
- Rabot, S., Membrez, M., Bruneau, A., Gerard, P., Harach, T., Moser, M., Raymond, F., Mansourian, R., Chou, C.J., 2010. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol

- metabolism. *FASEB J.* 24, 4948–4959. <https://doi.org/10.1096/fj.10-164921>
- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C.F., Funai, K., Hayashi, D.K., Lyle, B.J., Martini, M.C., Ursell, L.K., Clemente, J.C., Van Treuren, W., Walters, W.A., Knight, R., Newgard, C.B., Heath, A.C., Gordon, J.I., 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* (80-). 341. <https://doi.org/10.1126/science.1241214>
- Salas-Mani, A., Jeusette, I., Castillo, I., Manuelian, C.L., Lionnet, C., Iraculis, N., Sanchez, N., Fernández, S., Vilaseca, L., Torre, C., 2018. Fecal microbiota composition changes after a body weight loss diet in Beagle dogs. *J. Anim. Sci.* 96, 3102–3111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jas/sky193>
- Sandri, M., Dal Monego, S., Conte, G., Sgorlon, S., Stefanon, B., 2016. Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. *BMC Vet. Res.* 13, 65. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0981-z>
- Santacruz, A., Collado, M.C., García-Valdés, L., Segura, M.T., Marítn-Lagos, J.A., Anjos, T., Martí-Romero, M., Lopez, R.M., Florido, J., Campoy, C., Sanz, Y., 2010. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br. J. Nutr.* 104, 83–92. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000176>
- Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martín-Matillas, M., Campoy, C., Moreno, L.A., Veiga, O., Redondo-Figuero, C., Garagorri, J.M., Azcona, C., Delgado, M., García-Fuentes, M., Collado, M.C., Sanz, Y., 2009. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity* 17, 1906–1915. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.112>
- Schloss, P.D., Handelsman, J., 2004. Status of the Microbial Census. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 686–691. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.686-691.2004>
- Shade, A., Handelsman, J., 2012. Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environ. Microbiol.* 14, 4–12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>
- Shen, J., Obin, M.S., Zhao, L., 2013. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 34, 39–58. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.001>
- 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. *Microb. Ecol.* 44, 186–197. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-0001-z>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H.M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P., 2008. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut

- microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Song, S.J., Lauber, C., Costello, E.K., Lozupone, C.A., Humphrey, G., Berg-Lyons, D., Gregory Caporaso, J., Knights, D., Clemente, J.C., Nakielny, S., Gordon, J.I., Fierer, N., Knight, R., 2013. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife* 2013, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.00458>
- Sotos, M., Nadal, I., Marti, A., Martínez, A., Martín-Matillas, M., Campoy, C., Puertollano, M.A., Wernberg, J., Marcos, A., Sanz, Y., 2008. Gut microbes and obesity in adolescents. *Proc. Nutr. Soc.* 67, 11075. <https://doi.org/10.1017/S0029665108006290>
- Suchodolski, J., Jergens, A., 2016. Recent Advances and Understanding of Using Probiotic-Based Interventions to Restore Homeostasis of the Microbiome for the Prevention / Therapy of Bacterial Diseases. *Microbiol. Spectr.* 4, 1–14. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0025-2015.Correspondence>
- Suchodolski, J.S., 2016. Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *Vet. J.* <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>
- Suchodolski, J.S., 2011. Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: A Bigger World than We Thought. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 41, 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.12.006>
- 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 Microbiol. Ecol.* 66, 567–578. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x>
- 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 Microbiol.* 9, 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-210>
- Suchodolski, J.S., Dowd, S.E., Wilke, V., Steiner, J.M., Jergens, A.E., 2012. 16S rRNA gene pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the Duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039333>
- 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. *Vet. Microbiol.* 142, 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.002>
- 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, P.M., Cann, I.K.O., White, B.A., Fahey, G.C., 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.* 5, 639–649. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.162>
- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L., Gordon, J.I., 2008. Diet-Induced Obesity Is

Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* 3, 213–223.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>

- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M. a, Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–31. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Vilson, Å., Ramadan, Z., Li, Q., Hedhammar, Å., Reynolds, A., Spears, J., Labuda, J., Pelker, R., Björkstén, B., Dicksved, J., Hansson-Hamlin, H., 2018. Disentangling factors that shape the gut microbiota in German Shepherd dogs. *PLoS One* 13, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193507>
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B.J., Koeth, R., Levison, B.S., Dugar, B., Feldstein, A.E., Britt, E.B., Fu, X., Chung, Y.M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J.D., Allayee, H., Tang, W.H.W., Didonato, J.A., Lusic, A.J., Hazen, S.L., 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472, 57–65. <https://doi.org/10.1038/nature09922>
- Wang, Z., Xiao, G., Yao, Y., Guo, S., Lu, K., Sheng, Z., 2006. The Role of Bifidobacteria in Gut Barrier Function After Thermal Injury in Rats. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care* 61, 650–657.
<https://doi.org/10.1097/01.ta.0000196574.70614.27>
- Wilson, I.D., Nicholson, J.K., 2017. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Transl. Res.* 179, 204–222.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002>
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C., Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C., 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* (80-). 249, 1431–1433.
- Wynn, S.G., 2009. Timely topics in nutrition: Probiotics in veterinary practice. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 606–613.
<https://doi.org/10.2460/javma.234.5.606>
- Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227.
<https://doi.org/10.1038/nature11053>

Parte II

Sommario

Abstract (italiano)	II
Abstract (inglese)	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
Abbreviazioni	III
1 – INTRODUZIONE	1
1.1 - Il microbiota intestinale	1
1.2 Metodiche di caratterizzazione del microbiota intestinale	2
1.2.1 Metodi di coltura tradizionale.....	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.2.2 Metodi di biologia molecolare	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.3 Composizione del microbiota intestinale canino	5
1.4 Ruolo e funzioni del microbiota intestinale canino	8
1.5 Fattori che influenzano e modificano il microbiota intestinale canino	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.6 Il microbiota intestinale e l'obesità	10
1.6.1 Come l'obesità influenza la salute degli animali	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.6.2 Il ruolo del microbiota intestinale nell'obesità.....	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.6.3 Il microbiota svolge un ruolo fondamentale nell'acquisizione di energia...	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.6.4 C'è differenza fra microbiota intestinale di soggetti magri e obesi?.	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.6.5 L'obesità come causa di patologie sistemiche	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.6.6 Le alterazioni del microbiota intestinale sono causa o conseguenza dell'obesità?	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.7 Probiotici	17
1.7.1 Definizione di probiotici	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.7.2 Lavori che supportano l'efficacia dei probiotici nel cane ...	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.7.3 Probiotici a scopo terapeutico.	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.7.4 Probiotici e obesità.....	<i>Errore. Il segnalibro non è definito.</i>
1.8 Scopo della ricerca	23
2 – MATERIALI E METODI	25
2.1 Animali e metadati	25
2.2 Raccolta dei campioni fecali ed estrazione del DNA batterico	26
2.3 Analisi bioinformatica	27
3 – RISULTATI	30
4 – DISCUSSIONE	30
5 – CONCLUSIONI	39
6 – BIBLIOGRAFIA	44

Capitolo 1 bis

Caratteristiche del microbiota fecale in cani normopeso e sovrappeso appartenenti a razze differenti

1.1 Abstract

L'obesità è una condizione patologica multifattoriale che sta coinvolgendo un numero sempre maggiore di cani in tutto il mondo. Nella patogenesi dell'obesità interagiscono in maniera complessa diversi fattori, e pare che anche il microbiota intestinale possa incidere sull'equilibrio nutrizionale e metabolico dell'organismo. Anche se non in maniera univoca, negli ultimi anni diversi studi effettuati sia nel topo che nell'uomo hanno evidenziato una modificazione nella composizione del microbiota intestinale nei soggetti obesi. Negli ultimi anni si sta dunque assistendo ad un incremento di pubblicazioni in merito al ruolo del microbiota nella patogenesi dell'obesità, ma sono ancora pochissimi gli studi incentrati sulla flora enterica del cane.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di investigare se delle alterazioni nel microbiota intestinale potessero essere associate alla condizione di obesità canina. Per evitare che l'effetto della condizione corporea venisse mascherato da altri fattori, i cani sono stati selezionati in base a età, razza, stato riproduttivo, stato salute e tipo di dieta. Mediante il sequenziamento del gene batterico 16S rRNA è stata valutata la composizione del microbiota fecale in 15 cani normopeso (di cui 7 Labrador Retriever e 8 Border Collie; BCS 4-5/9) e 14 sovrappeso (di cui 8 Labrador Retriever e 6 Border Collie; BCS 6-8/9).

I phyla batterici *Firmicutes* e *Bacteroidetes* sono stati quelli maggiormente rappresentati ($51.5 \pm 10.0\%$ e $33.4 \pm 8.5\%$, rispettivamente), mentre le classi principali sono risultate *Bacteroidia* ($33.3 \pm 8.5\%$), *Clostridia* ($29.9 \pm 9.0\%$) e *Negativicutes* ($13.7 \pm 9.3\%$). L'analisi bioinformatica ha stabilito che nessun taxa batterico differiva significativamente per condizione corporea, razza o stile di vita. Tra le varie categorie non sono state registrate differenze nemmeno circa la numerosità delle specie batteriche e l'uniformità delle abbondanze proporzionali presenti nei campioni (*beta diversity*). Una tendenza alla diversificazione è stata vista per quanto riguarda lo stile di vita (indoor vs outdoor).

Dal test PERMANOVA è però emerso che i fattori che hanno maggiormente influenzato la diversità del microbiota dei cani coinvolti in questo studio sono stati alcuni componenti della loro dieta: la quantità di proteine presenti nei mangimi ha avuto un impatto sulla composizione del microbiota in termini di OTU ($p = 0.071$) e di ordini batterici ($p = 0.098$), così come sull'indice *beta diversity* di OTU ($p = 0.08$) e classi batteriche ($p = 0.099$); a livello di famiglie batteriche pare abbiano avuto un ruolo anche le ceneri ($p = 0.094$).

Alla luce di questi risultati, pare che il microbiota intestinale canino sia univoco per ogni soggetto, mostrando una considerevole variazione interindividuale al di là della condizione corporea e della razza di appartenenza. Ancor più delle caratteristiche proprie del cane, la quantità di determinati nutrienti presente nella dieta gioca un ruolo importante nella composizione della flora enterica. Per chiarire il ruolo del microbiota intestinale nell'insorgenza dell'obesità canina, sono auspicabili future ricerche che includano un maggior numero di soggetti e aventi condizioni corporee più estreme.

1.2 Abbreviazioni

ALP	Alanina aminotransferasi
ALT	Fosfatasi alcalina
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
ANGPTL-4	Angiopietin-like 4
BCS	Body condition score
CLA	Acido linoleico coniugato
DIO	Diet-induced obesity
DNA	Acido desossiribonucleico
FISH	Fluorescent in situ hybridization
FOS	Oligofruttosaccaridi
GALT	Tessuto linfoide intestinale
GF	Germ free

GI	Gastro-intestinale
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GLP-2	Glucagon-like protein-2
GPCR	G protein-coupled receptor
HFD	High fat diet
HOMA-IR	Homeostatic model assessment of insulin resistance
HPLC	High protein/low carbohydrate diet
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleuchina
LAB	Lactic acid bacteria
LPHC	High carbohydrate/low protein diet
LPS	Lipopolisaccaridi batterici
ND	Normal diet (dieta di controllo)
NGS	Next generation sequencing
OTU	Unità tassonomica operativa
PCR	Polymerase chain reaction
PPAR- γ	Recettori gamma attivati da proliferatori perossisomiali
qPCR	PCR quantitativa
rRNA	Acido ribonucleico ribosomiale
SCFA	Short chain fatty acids
TER	Resistenza elettrica trans-epiteliale
TLR	Toll-like receptors
TNF α	Tumor necrosis factor α
UFC	Unità formanti colonia

1.3 Introduzione

1.3.1 Il microbiota intestinale

Il tratto gastro-intestinale (GI) degli animali e dell'uomo ospita miliardi di microrganismi che svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento della salute intestinale e di quella generale dell'organismo. Questo complesso ecosistema viene globalmente definito come "microbiota intestinale" ed è composto da una enorme varietà di microrganismi, circa 10^{12} - 10^{14} , fra cui batteri, archea, protozoi, miceti e virus. In un soggetto adulto, il numero di cellule che compongono il microbiota intestinale è approssimativamente 10 volte superiore rispetto a quello dell'organismo ospite, ed è stato stimato che circa il 98% di questo complesso insieme sia rappresentato da microrganismi di natura batterica (Suchodolski, 2011).

Dal punto di vista del complesso genetico, l'insieme dei geni che compongono i microrganismi che vivono nel sistema digerente viene definito "microbioma" (Suchodolski e Jergens, 2016); pertanto, il "microbiota" è l'insieme di tutte le comunità microbiche, mentre il microbioma è l'insieme dell'espressione genetica di queste comunità, anche se spesso questi due termini vengono usati indistintamente.

Lo studio e la manipolazione dei microrganismi intestinali ha interessato fortemente la comunità scientifica nell'ultimo decennio per il suo potenziale coinvolgimento in molteplici processi fisiopatologici che avvengono nell'ospite. Dagli studi effettuati finora è emerso che il microbiota intestinale possiede una composizione unica in ogni soggetto, sia negli umani che negli animali (Deng and Swanson, 2015); anche il microbiota di fratelli e di gemelli differisce nella composizione, seppur in misura inferiore rispetto a individui non correlati geneticamente (Turnbaugh et al., 2009). Gli studi volti a individuare e comprendere la composizione del microbiota intestinale hanno comunque dimostrato una notevole somiglianza nella flora intestinale, perlomeno ai più alti livelli filogenetici, tra l'uomo e gli altri mammiferi, in particolare gli animali monogastrici come il cane (Swanson et al., 2011). L'identificazione di un "core" microbiota, ossia un nucleo fondamentale di batteri comune alla maggior parte degli esseri viventi, è il primo passo necessario per capire quali microrganismi devono

sempre essere presenti nell'intestino di un organismo in salute (Shade e Handelsman, 2012).

1.3.2 Metodiche di caratterizzazione del microbiota intestinale

Il notevole progresso nello studio del microbiota intestinale degli ultimi anni è stato possibile grazie a un enorme sviluppo in ambito tecnologico e all'impiego di nuove metodologie più precise e informative. Le tecniche impiegate in passato per la caratterizzazione del microbiota intestinale, infatti, si sono basate principalmente su metodi di coltura cellulare, mentre al giorno d'oggi vengono utilizzate tecniche avanzate di sequenziamento del DNA che permettono un riconoscimento preciso dei microrganismi isolati.

I metodi di coltura classici, come spiegato nella review prodotta da Garcia-Mazcorro e Minamoto (2013), si basano sull'identificazione fenotipica dei microrganismi attraverso la loro crescita su substrati posti a determinate condizioni (e.g. a una certa temperatura). Tali metodi hanno il vantaggio di essere relativamente poco costosi, ampiamente disponibili, semplici da utilizzare e adatti per studi biochimici e fisiologici, perciò sono stati ampiamente utilizzati per caratterizzare la microflora gastrointestinale fino a un decennio fa. Tuttavia, l'utilità di questa tecnica è stata ed è tuttora oggetto di discussione in quanto non abbastanza rappresentativa: la coltura tradizionale presenta dei grossi limiti, primo fra tutti quello di dover utilizzare dei terreni specifici per la crescita di determinati tipi di batteri ma che al tempo stesso non ne permettono lo sviluppo di altri. Questa metodica si dimostra estremamente valida per la rilevazione diretta di ceppi batterici specifici, ma per l'analisi globale del microbiota intestinale risulta inefficace, in quanto permetterebbe la crescita selettiva di soltanto alcune delle numerose tipologie di microrganismi (Garcia-Mazcorro e Minamoto, 2013). Ciò è vero specialmente per le numerose specie batteriche che richiedono strette condizioni di anaerobiosi, le quali sono difficilmente ottenibili mediante tecniche di laboratorio standard (Greetham et al., 2002). Inoltre, per poter sopravvivere nel tratto digerente, molti batteri richiedono particolari interazioni mutualistiche con altre popolazioni batteriche o con l'ospite stesso che non sono riproducibili nei terreni di coltura (Greetham et al., 2002).

Le tecniche d'indagine biomolecolare per la caratterizzazione del microbiota intestinale si basano sul sequenziamento del DNA o RNA batterico rilevato in campioni fecali, in biopsie intestinali o nel contenuto luminale.

Per l'identificazione dei batteri, in particolar modo, si prende in riferimento il gene ribosomiale 16S rRNA. Nei batteri, la molecola di rRNA 16S contiene regioni altamente conservate e regioni variabili (da V1 a V9); dunque in questo gene, oltre alle sequenze comuni in tutti i batteri, sono presenti anche alcune porzioni genomiche variabili che permettono l'identificazione fra le varie specie batteriche e la loro classificazione nelle diverse linee filogenetiche (Garcia-Mazcorro e Minamoto, 2013).

Dal momento che il microbiota intestinale è un ecosistema complesso, l'approccio ideale consiste nell'amplificazione del gene 16S rRNA mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) combinata con la quantificazione diretta di specifici taxa batterici con *quantitative PCR* (qPCR), la visualizzazione diretta sul campione con *fluorescent in situ hybridization* (FISH), e /o l'analisi degli ampliconi con *next generation sequencing* (NGS) (Goodrich et al., 2014; Kuczynski et al., 2012; Suchodolski, 2016).

La PCR è una delle metodologie molecolari più utilizzate in campo scientifico e viene utilizzata anche per la caratterizzazione del microbiota intestinale. Questa particolare tecnica consente di moltiplicare in vitro sequenze nucleotidiche del DNA consentendo quindi di amplificare e rendere analizzabili anche piccolissime quantità di materiale genetico. La PCR è in grado di generare numerose copie di una determinata sequenza genetica, ottenendo così gli ampliconi, cioè frammenti di DNA amplificati (Heid et al., 1996). Il limite della tradizionale PCR sta nel fatto che amplifica, ma non quantifica i segmenti estrapolati; per ovviare a questa problematica è stata introdotta la qPCR, ossia una tecnica che permette l'amplificazione e la quantificazione del DNA simultaneamente. Tuttavia, siccome alcune specie batteriche possiedono copie multiple del gene 16s rRNA (i.e. da una a 15), i risultati della qPCR non possono essere direttamente correlati alla conta batterica assoluta (Suchodolski, 2016). Inoltre, il numero di cellule batteriche può non essere direttamente valutato dal metodo in tempo reale perché il contenuto del genoma cellulare batterico varia con la fase di crescita degli organismi (Garcia-Mazcorro e Minamoto, 2013).

Un'altra tecnica utilizzata è la cosiddetta ibridazione fluorescente in situ (FISH), che permette la valutazione visiva al microscopio di determinate porzioni genetiche mediante l'utilizzo di sonde (i.e. oligonucleotidi) fluorescenti capaci di legarsi in modo specifico ai geni batterici di interesse, permettendone quindi la classificazione, lo studio morfologico e la distribuzione spaziale dei microrganismi nel tratto gastro-intestinale (Haaf, 2011).

L'identità di ciascun amplicone del gene 16S rRNA può essere stimata valutando l'ordine delle coppie di basi (i.e. sequenziamento). Questa tecnica è stata ampiamente utilizzata soprattutto negli anni '90 grazie al principale metodo Sanger, utilizzando composti analoghi alle basi azotate che agiscono come inibitori specifici della DNA polimerasi interrompendo così la catena ad una sequenza ben precisa (Fraher et al., 2012; Garcia-Mazcorro and Minamoto, 2013). Questa tecnica risulta però essere efficace per l'analisi di piccole porzioni genetiche, e infatti il limite di questo metodo è proprio caratterizzato dagli elevati costi di applicazione e dall'impiego di molto tempo per l'analisi del microbiota intestinale, in quanto i geni da analizzare sono molto numerosi. Recentemente sono state sviluppate tecniche molto più complesse, definite come tecniche di *next generation sequencing*, come ad esempio il Pirosequenziamento-454 (Roche Diagnostics GmbH Ltd, Mannheim, Germania) e l'Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA), che sono in grado di sequenziare molti frammenti di DNA contemporaneamente e in maniera molto più efficiente (con una accuratezza di circa il 99%) (Fraher et al., 2012).

Negli ultimi anni sono stati sviluppati dei software bioinformatici per l'analisi del microbioma (anche gratuiti come ad esempio il QIIME) in grado di elaborare migliaia di sequenze batteriche generando le "unità operative tassonomiche" (OTU). In filogenesi una OTU consiste nella definizione di una specie o di un gruppo di specie basata sulla similarità di sequenza, ovvero cluster di sequenze simili del gene 16S rRNA che rappresentano determinate specie batteriche. Specie, genere, famiglia e phylum sono convenzionalmente definiti con un valore di corrispondenza filogenetica del 97%, 95%, 90% e 80% rispettivamente, basandosi sulla lunghezza intera (circa 1540 bp) della sequenza del gene 16S rRNA (Schloss e Handelsman, 2004). I gradi di somiglianza possono essere ottenuti inserendo le sequenze geniche in banche dati specializzate

(e.g. VAMPS, MG-RAST71, QIIME database) e le percentuali delle OTU vengono trasformate in abbondanza relativa dei batteri per ogni livello tassonomico.

Grazie a queste metodiche moderne è quindi possibile determinare le proporzioni delle diverse popolazioni microbiche all'interno di comunità complesse. Ancora oggi, comunque, le varie tecniche utilizzate per la classificazione e il riconoscimento dei microrganismi appartenenti al microbiota sono in continuo sviluppo (Garcia-Mazcorro and Minamoto, 2013; Goodrich et al., 2014; Kuczynski et al., 2012).

1.3.3 Composizione del microbiota intestinale canino

La maggior parte degli studi svolti finora per caratterizzare il microbiota intestinale del cane è stata condotta analizzando campioni fecali (Barko et al., 2018), in quanto sono i più facilmente ottenibili e non richiedono pratiche invasive per l'animale. Al contrario, soltanto un numero ridotto di studi sono stati condotti ottenendo materiale biotico dalle diverse sedi del tratto GI (Suchodolski et al., 2012, 2010, 2009). È importante specificare la tipologia di campione analizzato quando si comparano i risultati dei vari studi, in quanto le popolazioni batteriche possono differire significativamente (Mentula et al., 2005; Suchodolski et al., 2008).

Oltre al tipo di matrice analizzata, anche la localizzazione del sito di prelievo deve essere specificata, perché i batteri che colonizzano il tratto digerente aumentano in concentrazione e in diversificazione man mano che si procede in senso oro-caudale. Infatti, da uno studio di Sucholdoski et al. (2008) condotto su 6 cani Beagle sani e avente lo scopo di individuare la variabilità della comunità microbica intestinale (mediante analisi del gene 16S rRNA) nei diversi tratti intestinali, è risultato che i phyla batterici predominanti sono i *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* (Figura 1). È emerso inoltre che i *Clostridiales* predominavano nel duodeno (40%) e nel digiuno (39%) ed erano altamente abbondanti nell'ileo (25%) e nel colon (26%). I *Fusobacteriales* e i *Bacteroidales* erano invece la componente più abbondante nell'ileo (33%) e nel colon (30%). Gli *Enterobacteriales* erano più comunemente presenti nel piccolo intestino rispetto al colon. Infine, i *Lactobacillales* erano presenti comunemente in tutte le parti dell'intestino. Anche nella review di Grzeškowiak et al. (2015) è stato riscontrato che i batteri appartenenti al genere *Lactobacillus* abitano in maniera indifferenziata tutto il tratto GI, con una concentrazione variabile tra 10^4 e 10^8

CFU/ml, con svariate specie fra cui la predominante è il *Lactobacillus acidophilus*. A livello gastrico predomina la presenza del genere batterico *Helicobacter* per la sua grande capacità adattativa in un ambiente acido come quello presente nello stomaco (Grzeńkowiak et al., 2015).

Figura 1. Principali microrganismi presenti nel tratto gastrointestinale canino (tratto da Schmitz e Suchodolski, 2016).

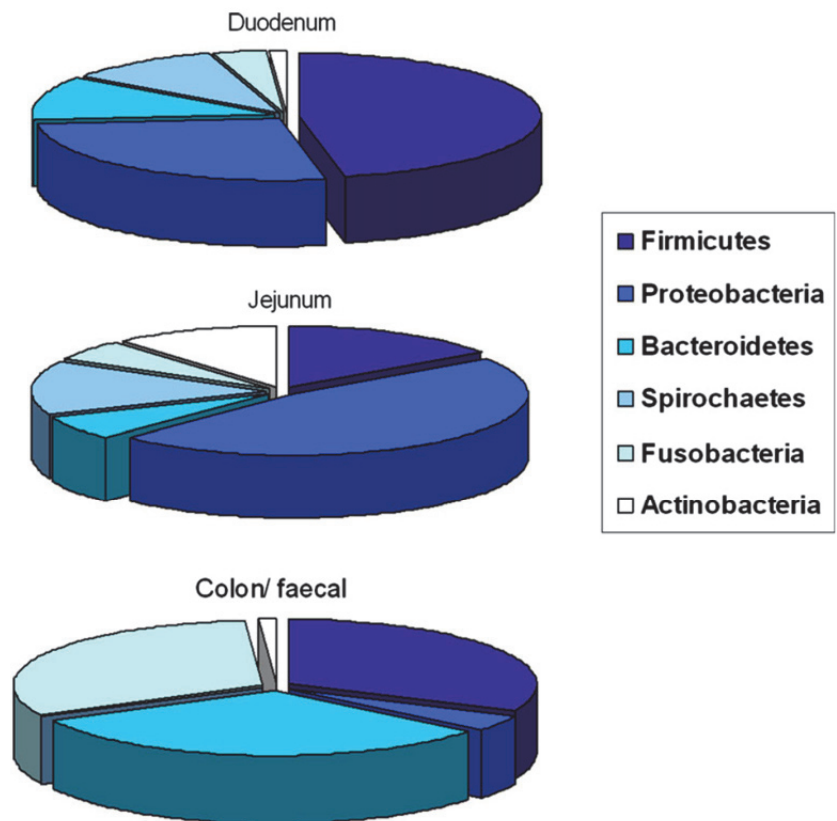


Fig. 1 Distribution of typical bacterial phyla within different compartments of the intestinal tract in dogs.

© 2016 The Authors. *Veterinary Medicine and Science* Published by John Wiley & Sons Ltd. *Veterinary Medicine and Science* (2016), 2, pp. 71–94

Lo sviluppo della comunità microbica all'interno dell'ospite avviene solamente dopo la nascita, poiché durante lo sviluppo fetale intrauterino l'ambiente gastroenterico è pressoché sterile. Il primo contatto con alcuni microrganismi e la successiva colonizzazione avviene durante la nascita tramite il passaggio attraverso il canale del parto; dopodiché, durante il primo anno di vita dell'animale, la composizione di questo microbiota primordiale si arricchisce e subisce delle modifiche (tra cui il passaggio ad

una flora prevalentemente anaerobica) per poi raggiungere un rapporto stabile e simbiotico con l'organismo ospite (Guard et al., 2017; Yatsunencko et al., 2012).

Un recentissimo lavoro svolto da Guard et al. (2017) ha valutato le differenze del microbiota intestinale dei cuccioli durante le prime fasi dello sviluppo. Nello specifico, la microflora di 30 cuccioli è stata analizzata mediante dei campioni fecali prelevati a 2, 21, 42 e 56 giorni dalla nascita (per un totale di 120 campioni), e sono state analizzate anche le feci provenienti dalle 16 madri. I risultati ottenuti hanno dimostrato che, in base al periodo in cui era stato fatto il prelievo, la popolazione batterica era significativamente differente anche quando paragonata a quella materna, cominciando a raggiungere una stabilità organizzativa solo dopo il 42° giorno di vita.

Negli studi condotti finora è stata riscontrata una notevole somiglianza nella composizione filogenetica batterica del microbiota intestinale presente nell'uomo e negli animali, e il microbiota intestinale canino risulta quello più rappresentativo fra gli animali domestici (Deng and Swanson, 2015; Hoffmann et al., 2016; Swanson et al., 2011). *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* sono i principali phyla batterici presenti nell'intestino del cane, e sono anche i gruppi maggiormente rappresentati nel microbiota intestinale umano (Deng e Swanson, 2014). Altri phyla presenti in proporzioni generalmente basse sono *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* e *Tenericutes* (Garcia-Mazcorro e Minamoto, 2013). Anche se molti studi concordano nell'aver riscontrato la presenza di questi phyla batterici, spesso non risultano concordi fra loro riguardo le proporzioni di queste popolazioni batteriche all'interno del tratto enterico. Queste incongruenze sono dovute principalmente a due cause: la prima, e sicuramente la più importante, è ascrivibile al tipo di metodica utilizzata per il riconoscimento delle popolazioni microbiche all'interno del tratto gastro intestinale. Infatti, sebbene negli ultimi anni vengano utilizzate le nuove tecniche "next generation", vi possono essere delle differenze nel loro utilizzo o anche nella gestione dei campioni fecali o delle biopsie intestinali (e.g. numero di campioni prelevati da ciascun soggetto, frequenza, modalità e conservazione). La seconda causa, invece, è ascrivibile alla variabilità individuale, la quale giustifica delle differenze anche minime nella composizione del microbiota intestinale di ciascun soggetto. Ad esempio, in uno svolto da Middelbos et al. (2010) è

stato utilizzato un metodo di pirosequenziamento-454 su campioni fecali di cani sani e sono stati caratterizzati i seguenti phyla batterici principali: *Fusobacteria* (23–40%), *Bacteroidetes* (31–34%), *Firmicutes* (14–28%), *Proteobacteria* (5–7%) e *Actinobacteria* (0.8–1.4%). In un altro studio condotto dagli stessi autori (Swanson et al., 2011), è stato utilizzato un metodo di sequenziamento differente utilizzando gli stessi campioni di feci e sono state ottenute invece queste proporzioni: *Bacteroidetes* (37–38%), *Firmicutes* (31–35%), *Proteobacteria* (13–15%), *Fusobacteria* (7–9%) e *Actinobacteria* (1%). Risulta evidente che i dati ottenuti nei due studi (soprattutto per quanto riguarda i *Fusobacteria*) non coincidono, ed essendo stati utilizzati gli stessi campioni è chiaro che la differenza è dovuta alla metodologia di analisi impiegata (Garcia-Mazcorro e Minamoto, 2013).

Oltre alla variabilità inter-individuale, di fondamentale importanza è anche la variabilità intra-individuale dovuta alla diversa distribuzione che questi microrganismi adottano lungo i diversi tratti dell'apparato gastroenterico, come già accennato, ma anche a molti altri fattori. In uno studio (Garcia-Mazcorro et al., 2012) è stato dimostrato che l'analisi del microbiota in cani sani a distanza di 15 giorni ha prodotto un coefficiente di variazione intra-individuale dal 2 al 141%.

1.3.4 Ruolo e funzioni del microbiota intestinale canino

Il microbiota intestinale svolge delle importanti funzioni metaboliche all'interno dell'organismo ospite. Le ricerche circa le funzioni del microbiota intestinale sono state condotte per lo più nell'uomo e nel topo da laboratorio, e solo negli ultimi anni si è mostrato interesse per il microbiota canino in relazione alle similitudini funzionali riscontrate (Kinross et al., 2011).

Una delle principali caratteristiche funzionali del microbiota intestinale è rappresentato dalla sua influenza sul metabolismo dei nutrienti all'interno dell'organismo ospite, in particolar modo di carboidrati, proteine e vitamine. Per quanto riguarda i carboidrati, ad esempio, vi sono alcuni microrganismi appartenenti ai phyla *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* che possiedono capacità fermentative in grado di metabolizzare anche le molecole più complesse rappresentate dai polisaccaridi (es. amido), determinando la produzione di acidi grassi a catena corta (*short chain fatty acids*, SCFA). Gli SCFA maggiormente prodotti sono gli

acidi propionico, butirrico, acetico e lattico che successivamente vengono assorbiti ed utilizzati direttamente dall'organismo ospite, fungendo da importante fonte energetica (Jandhyala et al., 2015). Si stima che la fermentazione microbica intestinale nel cane riesce a coprire circa il 2-7% del fabbisogno energetico di mantenimento (Wynn, 2009). Per quanto riguarda invece il metabolismo delle proteine, è stato osservato che i batteri facenti parte del microbiota intestinale hanno la capacità di idrolizzare le proteine derivanti dalla dieta alimentare mediante l'utilizzo di enzimi extracellulari (e.g. peptidasi e proteasi) e di scomporle in peptidi e amminoacidi. Questi ultimi possono poi essere introdotti all'interno della cellula batterica dove vengono ulteriormente metabolizzati attraverso processi di transaminazione e deaminazione, determinando la produzione anche di amminoacidi *de novo*, oppure possono essere assimilati direttamente dall'epitelio intestinale (Davila et al., 2013). Altri prodotti del metabolismo batterico sono rappresentati soprattutto da cobalamina, vitamina K, folati, biotina, tiamina (Honneffer et al., 2017) e dagli enzimi responsabili della deidrossilazione e deconiugazione di diversi metaboliti endogeni ed esogeni (Kinross et al., 2011).

Il microbiota intestinale svolge importantissime funzioni anche per quanto riguarda il metabolismo di farmaci e altri xenobiotici. Le interazioni più importanti riguardano alcune biotrasformazioni nel metabolismo riduttivo e nelle reazioni idrolitiche (in particolare dei coniugati) oltre che decarbossilazioni, dealchilazioni, dealogenazioni e deaminazioni. Ad esempio, è stata descritta la capacità riduttiva nei confronti di idrocarburi aromatici da parte di batteri appartenenti al genere *Clostridia* ed *Eubacteria* (Wilson e Nicholson, 2017). Esso svolge inoltre una funzione di nitroriduzione che porta alla formazione di amine a partire dalla metabolizzazione di farmaci contenenti nitro-gruppi fondamentali (e.g. benzodiazepine).

Il microbiota intestinale funge inoltre da vera e propria barriera contro determinati agenti patogeni, poiché, grazie all'occupazione dei siti d'attacco e alla produzione di sostanze antimicrobiche selettive, riesce a impedirne la proliferazione e l'adesione sulla mucosa intestinale (Kil and Swanson, 2011; Liévin-Le Moal and Servin, 2006).

1.3.5 Il microbiota intestinale e l'obesità

L'obesità è definita come un accumulo eccessivo di tessuto adiposo nel corpo, e negli animali da compagnia viene quantificata sulla base di un metodo di valutazione soggettivo chiamato *body condition score* (BCS). Tale misurazione viene effettuata mediante l'ispezione visiva dell'animale (dall'alto, di fianco) e la palpazione per rilevare determinate prominenze ossee (e.g. coste, vertebre lombari, ossa pelviche)(Baldwin et al., 2010); la [Figura 2](#) riporta la scala del BCS con i punteggi da 1 a 9 e le relative stime della massa grassa corporea.

La condizione di sovrappeso/obesità si verifica quando l'apporto di energia supera nettamente la spesa energetica per un periodo di tempo significativo. Attualmente, la prevalenza stimata di pets sovrappeso o obesi si aggira tra il 20% e il 59%, ed è un trend in continua crescita (Chandler et al., 2017). I fattori principali che influenzano la condizione corporea del cane sono notoriamente la dieta insieme all'esercizio fisico, ed essi risultano essere sicuramente fondamentali. Tendenzialmente, i soggetti maggiormente colpiti sono quelli che vengono alimentati senza un rigoroso controllo oppure ad libitum, e quelli sedentari o che non fanno abbastanza movimento. Studi recenti hanno suggerito che l'obesità nell'uomo può avere anche una componente genetica, e si pensa che questo concetto possa essere determinante anche nel mondo canino, dove infatti sono segnalate delle predisposizioni di razza in cui le influenze genetiche sembrano essere plausibili (Chandler et al., 2017).

Figura 2. Linee guida per la valutazione del BCS canino (available at: https://www.library.tufts.edu/vet/images/bcs_dog.pdf).

BODY CONDITION SYSTEM

TOO THIN	1	Ribs, lumbar vertebrae, pelvic bones and all bony prominences evident from a distance. No discernible body fat. Obvious loss of muscle mass.	 1	
	2	Ribs, lumbar vertebrae and pelvic bones easily visible. No palpable fat. Some evidence of other bony prominence. Minimal loss of muscle mass.		
	3	Ribs easily palpated and may be visible with no palpable fat. Tops of lumbar vertebrae visible. Pelvic bones becoming prominent. Obvious waist and abdominal tuck.		
IDEAL	4	Ribs easily palpable, with minimal fat covering. Waist easily noted, viewed from above. Abdominal tuck evident.	 4	
	5	Ribs palpable without excess fat covering. Waist observed behind ribs when viewed from above. Abdomen tucked up when viewed from side.		
TOO HEAVY	6	Ribs palpable with slight excess fat covering. Waist is discernible viewed from above but is not prominent. Abdominal tuck apparent.	 5	
	7	Ribs palpable with difficulty; heavy fat cover. Noticeable fat deposits over lumbar area and base of tail. Waist absent or barely visible. Abdominal tuck may be present.		
	8	Ribs not palpable under very heavy fat cover, or palpable only with significant pressure. Heavy fat deposits over lumbar area and base of tail. Waist absent. No abdominal tuck. Obvious abdominal distention may be present.		
	9	Massive fat deposits over thorax, spine and base of tail. Waist and abdominal tuck absent. Fat deposits on neck and limbs. Obvious abdominal distention.		

The **BODY CONDITION SYSTEM** was developed at the Nestlé Purina Pet Care Center and has been validated as documented in the following publications:

Mowby D, Bartges JW, Moyers T, et. al. *Comparison of body fat estimates by dual-energy x-ray absorptiometry and deuterium oxide dilution in client owned dogs.* *Compendium* 2001; 23 (9A): 70

Laflamme DP. *Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs.* *Canine Practice* July/August 1997; 22:10-15

Kealy, et. al. *Effects of Diet Restriction on Life Span and Age-Related Changes in Dogs.* *JAVMA* 2002; 220:1315-1320

Call 1-800-222-VETS (8387), weekdays, 8:00 a.m. to 4:30 p.m. CT

La condizione di obesità è caratterizzata da fenomeni di natura infiammatoria di lieve entità dati dalla presenza costante di alcune molecole proteiche dette adipochine, ossia citochine prodotte e secrete specificamente dagli adipociti e dai macrofagi del tessuto adiposo (e.g. leptina, adiponectina, TNF α , IL-6) (German et al., 2010). Le adipochine possiedono grandi capacità regolatrici in vari sistemi biologici tra cui il sistema immunitario, l'emostasi, l'angiogenesi, il bilanciamento dei fluidi e nelle funzioni neurotrofiche (German et al., 2010). Nel cane, così come negli altri animali da compagnia e nell'uomo, è noto che l'obesità abbia ripercussioni negative sulla salute e sulla longevità. I soggetti obesi umani hanno maggiori probabilità di sviluppare o aggravare ulteriori situazioni patologiche fra cui il diabete di tipo II, l'ipertensione, disfunzioni del tratto respiratorio e urinario, problemi epatici e osteoarticolari (German et al., 2010). Nell'ultimo decennio questo concetto sta coinvolgendo anche la medicina veterinaria soprattutto per quanto riguarda il cane e il gatto (Chandler et al., 2017).

La prima evidenza che il microbiota intestinale potesse influenzare in qualche modo il tessuto adiposo all'interno dell'organismo fu riscontrata già nel 1983 da Wostmann e collaboratori nei loro studi condotti in topi di laboratorio cosiddetti *germ free* (GF), ovvero privi di qualsiasi tipologia di flora batterica ed alimentati in condizioni di sterilità. Questi topi, a differenza della controparte normale (i.e. non GF), necessitavano del 30% in più di energia per mantenere il proprio peso e dovevano quindi assumere una maggiore quantità di cibo (Gérard, 2016). In un lavoro svolto invece da Bäckhed et al. (2004) furono inoltre dimostrate le differenze in percentuale di grasso corporeo fra soggetti GF e la controparte convenzionale, riscontrando una quantità nettamente maggiore di tessuto adiposo nei topi normali (+42% di grasso corporeo totale e 47% di grasso a livello delle gonadi) rispetto ai GF (Bäckhed et al., 2004). Sempre nello stesso lavoro, Bäckhed e colleghi (2004), inoculando sperimentalmente la flora batterica prelevata da topi convenzionali in topi GF, dimostrarono in questi soggetti un rapido accrescimento della massa grassa pari a circa il 60% in sole due settimane e segnalando fenomeni di resistenza all'insulina. Inoltre, con questa inoculazione si determinò la riduzione dell'espressione di un particolare enzima riscontrabile nel torrente circolatorio, l'angiopoietin-like 4 (ANGPTL-4), che

agisce come inibitore della lipoproteina lipasi (LPL), enzima deputato a sua volta al metabolismo dei trigliceridi. La ridotta espressione della ANGPTL-4 è seguito un aumento dell'attività della lipoproteina lipasi che ha determinato a sua volta un aumento dell'attività degli adipociti mediante un maggiore *uptake* di acidi grassi e accumulo di trigliceridi. A corroborare l'azione di questo meccanismo che vede coinvolta l'ANGPTL-4, è stato osservato che, in topi GF modificati geneticamente e in cui era stato soppresso questo enzima, il grado di adiposità era uguale a quello dei topi convenzionali. Questo suggerisce l'ipotesi che il microbiota intestinale possa modulare il rilascio dell'ANGPTL-4 dimostrando il suo potenziale ruolo come fattore influente sull'aumento di peso (Bäckhed et al., 2004).

In una successiva ricerca di Bäckhed et al. (2007), è stato osservato che i soggetti GF erano completamente protetti dall'obesità indotta dalla dieta (*diet induced obesity*, DIO) e ciò è stato associato ad un aumento di un particolare enzima a carico dei muscoli scheletrici e del fegato, la proteina chinasi attivata da adenosina monofosfato (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*, AMPK). Questa particolare proteina svolge un ruolo di sorveglianza sullo stato energetico cellulare e stimola l'ossidazione degli acidi grassi nel tessuto periferico. Secondo questa ipotesi, il microbiota sarebbe in grado di sopprimere la funzione stimolante di questo enzima riducendo quindi l'ossidazione degli acidi grassi a livello muscolare attraverso un percorso metabolico che termina con la fosforilazione della AMPK (Bäckhed et al., 2007). In un ulteriore studio, Rabot et al. (2010) hanno visto che nei topi GF alimentati con una dieta ricca di grassi (*high fat diet*, HFD) vi era una maggiore sensibilità all'insulina e una migliore gestione del glucosio a livello ematico rispetto ai topi convenzionali alimentati con la stessa tipologia di dieta. Questo, associato ad una ridotta ipercolesterolemia e una aumentata escrezione di colesterolo attraverso le feci, suggerisce un metabolismo del colesterolo diverso nei soggetti privi di microbiota (Rabot et al., 2010).

Infine, Fleissner e colleghi (2010) hanno condotto qualche anno dopo uno studio simile a quello effettuato da Bäckhed et al. (2007) usando un altro tipo genetico di topo da laboratorio per verificare l'effetto della variabilità individuale. Essi confermarono che i soggetti GF erano resistenti agli effetti obesogeni di una dieta ad alto contenuto di saccarosio e olio di palma. Lo stesso gruppo di topi però ha dimostrato una scarsa

resistenza agli effetti dovuti alla somministrazione di una dieta povera di saccarosio e HFD, inducendo quindi a pensare che la composizione dietetica e/o il patrimonio genetico individuale possono influenzare l'insorgenza della DIO in soggetti GF (Fleissner et al., 2010).

Gran parte degli studi che hanno cercato di indagare quali fossero le differenze nella composizione del microbiota intestinale fra individui normopeso e obesi hanno dimostrato che nei due casi è distinguibile dal rapporto fra i due phyla batterici *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (Shen et al., 2013). Nei soggetti obesi si è osservato un aumento del phylum *Firmicutes* a discapito dei *Bacteroidetes* (Turnbaugh et al., 2008), ma questo rapporto alterato, studiato soprattutto nei topi di laboratorio, non è mai stato associato a delle modifiche nella capacità di assorbimento energetico a livello intestinale (Shen et al., 2013). Ciò suggerisce che l'alterazione del rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* influisce sul peso dell'animale coinvolgendo vari meccanismi non necessariamente legati al grado di assorbimento energetico. Inoltre, il concetto che l'obesità sia legata a una differenza nella composizione microbica fra soggetti normopeso e sovrappeso risulta essere contrastato da altri studi in cui non sono state riscontrate queste alterazioni o addirittura si è osservato un aumento dei *Bacteroidetes* negli individui obesi (Shen et al., 2013). In conclusione, rimane incerto se questa variazione microbica possa essere un utile marker che contraddistingue le condizioni di sovrappeso e obesità.

Un altro parametro utilizzabile come riferimento in caso di alterazioni del microbiota intestinale è riscontrabile nelle analisi delle urine. Come descritto nei lavori svolti da Nicholson et al. (2005), Martin et al. (2007) e Wang et al. (2011), le quantità di metaboliti presenti a livello urinario sono influenzate anche dal microbiota intestinale, poiché il metabolismo batterico genera prodotti specifici come gli ippurati e la trimetilammina; pertanto un aumento o una diminuzione di tali sostanze nelle urine rispecchiano potenzialmente delle variazioni microbiche intestinali. In uno studio condotto su pazienti umani (Calvani et al., 2010), sono stati presi in considerazione 15 soggetti obesi senza sintomi clinici gastroenterici o problemi renali e che non avevano assunto probiotici, prebiotici o antibiotici negli ultimi 3 mesi prima della sperimentazione. Da essi sono stati prelevati e analizzati dei campioni di urina e i

risultati ottenuti hanno riportato concentrazioni significativamente inferiori di ippurato e trigonellina nelle urine di soggetti obesi rispetto a quelle identificate nel gruppo di controllo di soggetti magri aventi la stessa età, al contrario del 2-idrossi-isobutirrato che invece risultava essere aumentato rispetto a quello nelle urine degli individui normopeso.

Analizzando a un livello più specifico i cambiamenti che avvengono all'interno degli stessi phyla batterici, in soggetti affetti da obesità e da diabete di tipo 2 è stato osservato un aumento di batteri patogeni o potenziali opportunisti e una riduzione dei batteri produttori di SCFA. In due studi condotti su donne in gravidanza sovrappeso e obese (Collado et al., 2008; Santacruz et al., 2010) è stato osservato un aumento significativo in proporzione dello *Staphylococcus aureus* (patogeno del phylum *Firmicutes*) e delle *Enterobacteriaceae*, (tra cui *E. coli*) rispetto a donne in gravidanza normopeso.

Anche in un ulteriore studio condotto su topi di laboratorio da Cani et al. (2008), sono state analizzate le possibili alterazioni dei batteri produttori di SCFA, come ad esempio il genere *Bifidobacterium*. Questo genere batterico risultava essere significativamente ridotto in soggetti obesi; inoltre, risultava ridotta anche la percentuale del genere *Bifidobacterium* in soggetti resi obesi tramite alimentazione di tipo HFD, in coincidenza con una funzione ridotta della barriera mucosale intestinale e la comparsa di endotossemia metabolica.

Un altro batterio appartenente al phylum dei *Firmicutes*, il *Faecalibacterium prausnitzii*, svolge importanti funzioni nel metabolismo dell'ospite producendo butirrato a partire da carboidrati non digeribili e metaboliti antinfiammatori (Sokol et al., 2008). Nello studio di Furet et al. (2010) questo batterio è risultato essere significativamente meno abbondante in soggetti umani obesi affetti da diabete di tipo 2 rispetto alla controparte sana, nonostante vi fossero delle differenze legate al sesso, all'età e all'origine geografica degli individui posti in analisi che potrebbero avere inficiato sull'oggettività dei risultati. Successivamente, però, Qin et al. (2012) hanno confermato che una disbiosi intestinale caratterizzata da un aumento di patogeni opportunisti a discapito dei batteri produttori di SCFA è un segno distintivo in soggetti affetti da diabete di tipo 2.

Alcuni studi sono stati condotti per valutare il microbiota intestinale di soggetti in fase di dimagrimento e, coerentemente con i precedenti studi in cui venivano osservate differenze fra soggetti obesi e magri, sono stati osservati dei cambiamenti. Ad esempio, nello studio condotto da Sotos et al. (2008), è stata analizzata la composizione microbica intestinale in soggetti umani adolescenti (età media di 15 anni) sottoposti a un periodo di dimagrimento di tre mesi attraverso restrizione alimentare ed esercizio fisico. In particolare, è stato riscontrata una riduzione significativa delle *Enterobacteriaceae* fecali e dei batteri solfato-riduttori. In uno studio analogo (Santacruz et al., 2009) sono stati presi sempre in considerazione dei soggetti umani adolescenti (età compresa fra i 13 e i 15 anni) in fase di dimagrimento attraverso restrizione alimentare ed esercizio fisico per 10 settimane, e i risultati ottenuti dalle analisi di campioni fecali hanno indicato un aumento significativo dei *Lactobacillus* spp. e dei *Bacteroidetes fragilis* e una diminuzione significativa dei *Clostridium coccoides*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium adolescentis*.

Turnbaugh et al. (2006) sono stati i primi autori ad effettuare il trapianto di microbiota provenienti da topi obesi e magri in topi *wild-type* convenzionali, e il risultato è stato un aumento di tessuto adiposo in quei soggetti che avevano ricevuto il microbiota da topi obesi. In seguito a questi risultati, due anni dopo, gli stessi ricercatori (Turnbaugh et al., 2008) hanno voluto indagare più approfonditamente se l'obesità fosse indotta dalla composizione stessa del microbiota e/o se questa fosse a sua volta influenzata dal tipo di dieta seguita; per cui, topi GF hanno ricevuto il microbiota appartenente o a topi alimentati con una alimentazione ricca di grassi (HFD) e quindi soggetti con obesità indotta dall'alimentazione (DIO), oppure a soggetti che seguivano un'alimentazione standardizzata per il mantenimento del peso. Nei topi inoculati con microbiota proveniente da topi alimentati HFD si è visto un sostanziale aumento della massa grassa in poche settimane rispetto a quelli ricevuti il microbiota della controparte alimentata normalmente. Questo studio è stato poi esteso anche alla specie umana, trapiantando il microbiota intestinale di persone volontarie in topi di laboratorio, nello specifico sono state arruolate quattro coppie di donne gemelle di cui una sola coppia presentava una condizione di obesità. Il risultato ottenuto è stato un incremento significativo della massa grassa solo nei topi in cui era stato inoculato il microbiota intestinale proveniente dalla coppia obesa (Ridaura et al., 2013).

Molti studi hanno cercato di capire se le differenze nel microbiota intestinale effettivamente siano causa o effetto dell'obesità, sia nei soggetti umani che in topi. Uno studio effettuato da de La Serre et al. (2010) per valutare il contributo di un microbiota alterato nello sviluppo dell'infiammazione sistemica legata alla DIO ha dimostrato le differenze microbiche in relazione allo stato infiammatorio intestinale e al tipo di dieta somministrata in tre gruppi di topi così caratterizzati: un gruppo alimentato con una dieta HFD e a rischio di sviluppo della DIO (DIO-P), un gruppo di topi geneticamente resistenti alla HFD (DIO-R) e un terzo gruppo di topi alimentati con una dieta povera di grassi (LFD). In conclusione, è stato dimostrato che la dieta HFD ha significativamente ridotto il numero totale di batteri nell'intestino cieco e aumentato la proporzione di *Bacteroidetes* e *Clostridiales* nei ratti DIO-P (obesi) e DIO-R (non obesi), suggerendo che questi cambiamenti deriverebbero dalla dieta di tipo HFD e non sarebbero legati all'obesità. Alcuni autori, quindi, propongono il concetto che l'obesità sia causata da cambiamenti indotti da una dieta HFD nel microbiota intestinale e tali cambiamenti sarebbero responsabili degli aumentati livelli di LPS e dell'infiammazione nel lume intestinale (de La Serre et al., 2010). Questo concetto è stato esteso anche nell'uomo sostenendo che la presenza di batteri produttori di endotossine a livello intestinale possa essere un fattore contribuyente, piuttosto che una conseguenza, all'obesità e alla resistenza all'insulina. In conclusione, l'obesità modifica la composizione microbica dell'intestino e queste alterazioni svolgono poi un ruolo eziologico nello sviluppo di obesità e insulino-resistenza, ma non si sa ancora con esattezza quali meccanismi siano coinvolti.

1.3.6 Il microbiota intestinale di cani obesi: stato dell'arte

Le ricerche sul microbiota intestinale relative all'obesità nella specie canina che sono state condotte finora sono poche e sono appunto recenti.

Il primo studio di questo genere è stato condotto nel 2013 da Handl e colleghi, in cui l'obiettivo è stato quello di caratterizzare il microbiota intestinale di cani obesi e magri, sia di proprietà che di laboratorio, per evidenziarne le differenze. Per questo studio sono stati presi in esame 22 cani magri (BCS compreso tra 4 e 6) e 21 cani obesi (BCS compreso tra 7 e 9). Da ciascun soggetto è stato prelevato un campione fecale dopo

defecazione naturale e tutti sono stati successivamente analizzati mediante qPCR e pirosequenziamento del gene 16S rRNA. In tutti i soggetti reclutati è stata ritrovata ampia presenza del phylum batterico *Firmicutes* (>90%) e in misura minore dei phyla *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*. Il phylum *Actinobacteria* è risultato essere significativamente più abbondante nei cani obesi presi in esame in questo studio rispetto ai soggetti magri, così come il genere batterico *Roseburia* (0.66% vs 0.21%). Scendendo più nel particolare, gli ordini batterici più abbondanti ritrovati nelle feci di tutti i soggetti sono stati *Clostridiales*, *Lactobacillales*, *Erysipelotrichales* (phylum *Firmicutes*) e *Fusobacteriales* (phylum *Fusobacteria*), ma con delle differenze statisticamente non significative tra i due gruppi di cani oggetto di studio. Per quanto riguarda invece i cani da laboratorio (9 femmine intere, razza Beagle, adulti sani, età 4.1 ± 0.6 anni, peso 8.5 ± 0.4 kg), il passaggio ad un regime alimentare *ad libitum* ha avuto una influenza statisticamente significativa su molti gruppi batterici. Nei 5 cani sottoposti a ingrasso, è stato rilevato un aumento significativo dell'ordine *Clostridiales*.

nine healthy adult research Beagle dogs. I dati ottenuti da questa ricerca suggeriscono che non vi sono delle considerevoli alterazioni nella composizione del microbiota intestinale del cane in relazione alla sua condizione corporea, anche se, come spiegano gli stessi autori, potrebbe essere dovuto ai vari fattori confondenti (e.g. genere, razza, parentela) e ambientali.

Successivamente va menzionata la ricerca eseguita da Park e colleghi (2015): in questo studio sono stati selezionati 14 Beagle tra i 3 e i 5 anni in perfetta salute che sono stati suddivisi in due gruppi; nel primo gruppo, composto da 7 soggetti, è stata indotta l'obesità attraverso alimentazione *ad libitum* con un mangime commerciale, mentre il secondo gruppo è stato alimentato con lo stesso alimento utilizzando però delle dosi adeguate al mantenimento del peso corporeo. Anche in questo caso, per la valutazione delle possibili differenze dei soggetti tra i due gruppi riguardanti la composizione del microbiota intestinale sono stati raccolti dei campioni fecali, successivamente analizzati mediante tecniche PCR e sequenziamento del gene 16S-rRNA. I risultati ottenuti si discostano da quelli riportati dallo studio citato precedentemente (Handl et al., 2013), poiché è stata osservata una dominanza del

phylum *Firmicutes* (85%) nei soggetti magri, al contrario dei soggetti obesi in cui invece il phylum più rappresentativo si è rivelato quello dei *Proteobacteria* (76%). Anche per quanto riguarda l'ordine *Clostridiales* il risultato è differente fra i due studi: rispetto a quanto osservato da Handl et al. (2013), nello studio di Park e colleghi (2015) questo ordine è risultato meno abbondante nei soggetti obesi in cui invece era significativamente più elevata la quantità di batteri appartenenti all'ordine *Pseudomonadales*. Anche il genere *Lactobacillus* è risultato marcatamente più abbondante nel gruppo di cani normopeso rispetto a quelli in sovrappeso.

In un secondo studio pubblicato dagli stessi autori nello stesso anno (Park et al., 2015a), è stato analizzato il microbiota fecale di cani obesi aventi altre patologie concomitanti. I campioni fecali di 10 cani, di cui due sani, due obesi, e due obesi e sofferenti di altre patologie (e.g. pemfigo, epatite cronica, iperadrenocorticismo, narcolessia, otite media e filariosi) sono stati sottoposti a pirosequenziamento del gene 16S rRNA. È emerso che il phylum predominante variava a seconda della malattia (i.e. *Firmicutes* nei pazienti con pemfigo, otite media e narcolessia; *Fusobacteria* in quelli con epatite cronica e iperadrenocorticismo; *Proteobacteria* in quelli con filariosi). In generale, è stata osservata una ridotta varietà delle comunità batteriche nei soggetti obesi, ulteriormente diminuita nel paziente con problemi epatici.

Nel 2016, Beloshapka et al. Hanno valutato il microbiota intestinale di 30 cani sovrappeso od obesi sottoposti a un piano di dimagrimento, con o senza l'inclusione di fibre fermentescibili (i.e. polvere di fagioli). All'inizio dello studio, si è visto che i *Firmicutes* componevano l'88-94% delle sequenze batteriche rilevate, seguiti dai *Fusobacteria* (0.9-9.5%), dagli *Actinobacteria* (1.4-4.5%), dai *Proteobacteria* (0.2-0.5%) e dai *Bacteroidetes* (0.06-0.3%). I generi batterici più rappresentati sono risultati invece *Clostridium*, *Blautia*, *Lachnospiraceae* indefinite, *Ruminococcus* indefiniti, *Fusobacterium*, *Dorea*, e *Catenibacterium*. La combinazione di dieta e perdita di peso hanno provocato dei cambiamenti significativi nelle proporzioni di alcuni *taxa* batterici nell'arco di 4 settimane, tuttavia gli autori hanno concluso che il microbiota intestinale dei soggetti reclutati è complessivamente rimasto stabile.

Al fine di investigare la relazione tra microbiota intestinale, perdita di peso ed esercizio fisico, 12 cani obesi sono stati reclutati da Kieler e colleghi nel 2017. Tutti i cani sono stati sottoposti per 12 settimane a un regime alimentare restrittivo e 6 animali anche a uno specifico programma di allenamento. Dalle analisi dei campioni rettali, è emerso che il microbiota dei cani era dominato dai generi *Fusobacterium* (~20–50%) e *Bacteroides* (~15–35%). A seguito dell'introduzione della dieta di dimagrimento e dell'esercizio fisico, una differenza significativa è stata osservata dopo 6 e dopo 12 settimane per i generi *Suterella*, *Fusobacterium* e *Megamonas*; tra la sesta e la dodicesima settimana, invece, non sono stati rilevati cambiamenti considerevoli. La diminuzione del genere *Megamonas* era correlata ($R^2 = 0.68$, $P = 0.06$) alla perdita di peso maggiore ($\geq 1\%$ del peso corporeo a settimana) dopo 6 settimane, così come una porzione della famiglia *Ruminococcaceae* dopo 12 settimane ($P = 0.02$, $q = 0.92$). L'inclusione dell'esercizio fisico non ha avuto un impatto sulla composizione del microbiota intestinale, mentre può essere possibile che la velocità della perdita di peso possa essere stata dovuta proprio a un cambiamento nella composizione del microbiota e alla produzione dei suoi metaboliti, dato che gli acidi acetico e propionico fecali erano presenti in quantità inferiori nei cani con perdita di peso più rapida.

Uno degli approcci terapeutici proposti per contrastare l'obesità si basa sulla modulazione del regime alimentare attraverso l'applicazione di una dieta ricca di proteine e povera di carboidrati (*high protein/low carbohydrate diet*, HPLC), sia in ambito umano che nel cane (Bierer and Bui, 2004; Diez et al., 2002; Kushner and Doerfler, 2008; Li et al., 2017). Tuttavia, gli effetti che questa tipologia di alimentazione ha sul microbiota intestinale canino non sono ancora conosciuti. A questo proposito, è stato condotto uno studio (Li et al., 2017) su 63 cani (31 Labrador e 32 Beagle, 31 normopeso e 32 obesi) caratterizzato da due fasi: la prima fase prevedeva la somministrazione a tutti i cani di una dieta di mantenimento per una durata di quattro settimane, mentre la seconda era caratterizzata dalla somministrazione di una alimentazione di tipo HPLC (49.4% di proteine e 10.9% di carboidrati) oppure ricca di carboidrati e bassa di proteine (*low protein/high carbohydrate*, LPHC: 25% di proteine e 38.8% carboidrati) per un ulteriore periodo di quattro settimane. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il rapporto tra proteine e carboidrati nella dieta influenza

notevolmente il microbiota intestinale canino e questo effetto è risultato più significativo nei cani obesi rispetto a quelli magri, indipendentemente dalla razza. Le maggiori alterazioni sono comunque state osservate a seguito del cambio di dieta, infatti il rapporto Bacteroidetes/Firmicutes non differiva ($P > 0.05$) inizialmente tra cani normopeso e sovrappeso alimentati con la dieta di mantenimento. L'assunzione delle diete HPLC e LPHC nella seconda fase ha portato ad una maggiore uniformità nelle proporzioni batteriche in entrambi i casi, ma non ad una aumentata quantità delle specie batteriche rispetto a quella ottenuta a seguito del consumo della dieta nella prima fase. Il profilo nutrizionale della dieta ha invece influito sui phyla principali, ovvero *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, segnando un aumento significativo dei primi con la dieta HPLC sia in cani normopeso che sovrappeso.

Come descritto in una recente pubblicazione, Alexander et al. (2018) hanno valutato gli effetti dell'integrazione di un determinato prebiotico (i.e. fruttani *inulin-type*) nella dieta di cani sovrappeso. Seguendo un protocollo a quadrato latino 3x3, 9 Beagle sovrappeso alimentati con la stessa dieta hanno ricevuto il prebiotico nella dose di 1 g/d, il prebiotico nella dose di 2 g/d, oppure un placebo (i.e. cellulosa) durante periodi sperimentali di 14 giorni separati da intervalli di ulteriori 14 giorni. Dai risultati è emerso che il trattamento non ha determinato variazioni nel numero (*alpha diversity index*) né nell'abbondanza relativa dei taxa (*beta diversity index*). Delle differenze significative sono state rintracciate nella famiglia *Erysipelotrichaceae*, poiché *Coprobacillus* è risultato nettamente inferiore nelle feci dei cani riceventi il probiotico ad alto dosaggio. *Erysipelotrichaceae*, *Turicibacter* e *Anaerobiospirillum* hanno dimostrato una tendenza ad essere differenti nei vari gruppi di cani. Al contrario di quanto ipotizzato in partenza dagli autori, non si sono verificati cambiamenti significativi nell'abbondanza relativa di *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Fusobacterium* o *Desulfovibrio*, come constatato in studi precedenti.

In uno studio attualmente in fase di pubblicazione (Forster et al., 2018), oltre a numerosi parametri metabolici, gli autori hanno esaminato anche la composizione del microbiota fecale in cani normopeso (NW; BCS 4-5/5, n=17), sovrappeso (OW; BCS 6-7/5, n=27) e obesi (OB; BCS 8-9/5, n=17). In generale i phyla *Firmicutes* e *Bacteroidetes*

sono risultati i due predominanti, ma la loro distribuzione nei vari gruppi di cani non ha raggiunto una difformità statisticamente significativa. Differenze considerevoli sono state rilevate invece per quanto riguarda *Erysipelotrichi*, *Erysipelotrichales*, *Erysipelotrichaceae* e *Eubacterium* (classe, ordine, famiglia, e genere, rispettivamente) presenti in quantità inferiore negli OB. Al contrario, i cani OB hanno dimostrato presenze relativamente maggiori della classe *Actinobacteria* e dell'ordine *Bifidobacteriales*. Non sono invece state riscontrate differenze significative a nessun livello tassonomico tra cani NW e OW. La famiglia *Lachnospiraceae* era considerevolmente più abbondante nei cani NW e OW rispetto agli OB, così come il genere *Blautia* e la specie *Eubacterium bifforme*. La famiglia *Ruminococcaceae* è risultata più abbondante negli NW rispetto agli OB, mentre il genere *Clostridium* e la specie *Prevotella copri* erano più abbondanti negli OW rispetto agli OB. Per quanto riguarda invece le analisi metabolomiche di plasma, feci e urine, la maggioranza dei metaboliti identificati seguivano un trend simile in OW e OB rispetto ai NW, dimostrando differenze prevedibilmente più marcate tra NW e OB. La ridotta abbondanza di numerosi acidi grassi nelle feci di OW e OB suggeriva la presenza di infiammazione cronica subclinica e stress ossidativo associate alla condizione corporea.

In un altro recente studio sempre in via di pubblicazione (Salas-Mani et al., 2018), l'obiettivo è stato quello di valutare i cambiamenti nel microbiota intestinale di cani obesi prima (T0) e dopo un piano di dimagrimento di 17 settimane (T1). Il phylum più abbondante è risultato *Firmicutes* (T0, 74.27 ± 0.08%; T1, 69.38 ± 0.07%), seguito da *Bacteroidetes* (T0, 12.68 ± 0.08%; T1, 16.68 ± 0.05%), *Fusobacteria* (T0, 7.45 ± 0.02%; T1, 10.18 ± 0.03%), *Actinobacteria* (T0, 4.53 ± 0.02%; T1, 3.34 ± 0.01%), e *Proteobacteria* (T0, 1.06 ± 0.01%; T1, 1.40 ± 0.00%). Il phylum *Firmicutes* includeva le classi *Clostridia*, *Bacilli* ed *Erysipelotrichi*, le cui proporzioni differivano nei due tempi: a T1, le proporzioni di *Clostridia* erano diminuite (T0, 59.35 ± 0.06%; T1, 33.20 ± 0.09%) and *Bacilli* (T0, 7.86 ± 0.02%; T1, 2.59 ± 0.01%), mentre gli *Erysipelotrichi* erano aumentati (T0, 7.05 ± 0.02%; T1, 32.53 ± 0.011%). Ancor più nello specifico, i generi più abbondanti a T0 erano *Clostridium* (famiglia *Clostridiaceae*) e *Blautia* (famiglia *Lachnospiraceae*), entrambi appartenenti alla classe *Clostridia*; diversamente, a T1 il

genere più presente è risultato *Allobaculum* (famiglia *Erysipelotrichidae*). Sempre a livello di genere, a fine protocollo si è rilevata una riduzione significativa soltanto per *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Dorea*, assieme ad un aumento di *Allobaculum*. Le specie batteriche più abbondanti invece sono risultate *C. hiranonis* ($21.83 \pm 0.05\%$) e *B. producta* (9.81 ± 0.02) a T0, e *Allobaculum spp.* ($30.13 \pm 0.11\%$) and *C. hiranonis* (9.22 ± 0.03) a T1. In generale, il numero totale stimato di specie batteriche era maggiore a T1 (Chao index; $P = 0.014$), nonostante la biodiversità di specie simile (Shannon–Weaver diversity index, $P = 0.186$) e le proporzioni ben conservate (Equitability, $P = 0.778$); le differenze circa biodiversità complessiva del microbiota a T0 e T1 sono risultate significative ($P = 0.01$), anche se il profilo delle due comunità mostrava un livello di separazione molto basso (Anosim's R value = 0.39).

1.3.7 Scopo della ricerca

L'obiettivo di questo studio è stato quello di caratterizzare il microbiota intestinale in cani normopeso e cani obesi appartenenti a due razze differenti, rispettivamente una razza con predisposizione all'obesità e una razza senza predisposizione all'obesità.

La scelta di queste razze è ricaduta sul Labrador Retriever e sul Border Collie: il Labrador è uno dei cani da compagnia più diffusi in Italia e la razza è nota per l'elevata frequenza con cui sviluppa obesità; il Border Collie è un cane divenuto molto popolare negli ultimi anni, e la sua attitudine al lavoro e allo sport lo rendono un cane generalmente attivo e in condizione corporea ideale.

Questa indagine si è posta il fine di rispondere ai seguenti quesiti:

- Esistono differenze nella composizione del microbiota intestinale tra cani normopeso e cani obesi appartenenti alla stessa razza?
- Esistono differenze nella composizione del microbiota intestinale tra cani normopeso e cani obesi appartenenti a razze diverse?

Per ottenere delle risposte affidabili ai quesiti di cui sopra, si è voluto ridurre al minimo la variabilità di tutti gli elementi che potrebbero influenzare la composizione del microbiota nell'individuo: età, stato riproduttivo, stato di salute, alimentazione, assunzione di farmaci.

A tale scopo è stato fondamentale, quindi, effettuare un attento reclutamento dei soggetti che hanno composto la popolazione sperimentale, attraverso un'accurata

raccolta di segnalamento e anamnesi, nonché effettuando una visita clinica che permettesse di escludere i soggetti malati.

1.4 Materiali e metodi

1.4.1 Animali e metadati

Al fine di reclutare i cani da includere nello studio, degli annunci sono stati divulgati tramite e-mail, volantini cartacei e inserzioni su social network (Facebook); inoltre, sono stati contattati alcuni clienti dell'Ospedale Veterinario OVUD afferente al dipartimento MAPS dell'Università di Padova, nonché altri veterinari operanti in cliniche private e allevatori.

Per potere essere inclusi in questo studio, i soggetti dovevano necessariamente rispettare i seguenti requisiti:

- razza Labrador Retriever o Border Collie;
- età 1-7 anni (giovani adulti)
- giovani adulti (3-5 anni);
- maschi e femmine interi, equi-distribuiti all'interno delle due razze;
- perfetta condizione di salute (cani sani, senza segni di malattia in corso);
- nessuna assunzione di farmaci antibiotici e cortisonici negli ultimi 6 mesi;
- alimentazione con mangimi commerciali secchi (crocchette), mantenendo per almeno 4 settimane lo stesso prodotto.

Da ogni soggetto arruolato sono dunque stati raccolti i seguenti dati:

- Segnalamento (nome, razza, età, sesso);
- Anamnesi (condizione di salute, eventuali patologie pregresse, accertamento che l'animale non stesse assumendo farmaci);
- Gestione alimentare (nome dell'alimento e di eventuali integratori, dosi giornaliere);
- Attività fisica (quantità e qualità dell'esercizio giornaliero);
- Stile di vita (tempo trascorso prevalentemente dentro casa – *indoor*, o all'esterno - *outdoor*);
- Peso;

- BCS (cani normopeso: peso secondo standard di razza $\pm 10\%$, BCS 4/9 o 5/9; cani sovrappeso: peso superiore al 10% rispetto allo standard di razza, BCS 6/9, 7/9, 8/9 o 9/9).

Tutte le informazioni circa i cani e le caratteristiche nutrizionali dei mangimi da essi consumati (i.e. % sul tal quale di umidità; proteina grezza, PG; grassi grezzi, EE; fibra grezza, FG; ceneri grezze, CEN) sono state trasferite in un foglio di calcolo (Excel, Microsoft). Qualora l'umidità non fosse riportata in etichetta perché inferiore al 14% (come ammesso dal Reg. CE 767/2009), è stato considerato un valore standard pari all'8%. Per differenza è stato calcolato il contenuto di carboidrati (estrattivi inazotati, EI) di ogni mangime mediante la formula:

$$EI = 100 - \text{umidità} - PG - EE - FG - CEN,$$

mentre per il valore energetico (Kcal/100g) si è reso necessario ricavare l'Energia Metabolizzabile (EM) usando il fattore di Atwater modificato (NRC, 2006) come descritto nella seguente formula:

$$EM = (PG \%tq * 3,5) + (EE \%tq * 8,5) + (EI \%tq * 3,5).$$

1.4.2 Raccolta dei campioni fecali ed estrazione del DNA batterico

I campioni fecali sono stati raccolti da ogni cane immediatamente dopo defecazione spontanea. Un tampone fecale (Fecal SwabTM, Copan Diagnostics Inc., USA) è stato inserito all'interno delle feci fresche di ogni cane facendo attenzione alle contaminazioni ambientali (e.g. no contatto col suolo o con fili d'erba). I campioni raccolti sono stati conservati a temperatura di refrigerazione (4°C) fino al momento della consegna presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) entro 24 h circa.

Il DNA batterico è stato estratto il prima possibile dopo la ricezione del campione e stoccato a -80°C. Per garantire una migliore rappresentatività delle comunità batteriche intestinali, due estrazioni di DNA totale sono state eseguite per ciascun campione mediante un apposito kit commerciale *column based DNA Stool Mini* (Qiagen, United States).

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata allestita per l'amplificazione delle regioni ipervariabili V3- V4 del gene codificante per l'RNA16S ribosomiale (rDNA16S), mediante l'uso di primer specifici. Gli ampliconi sono stati sequenziati su una piattaforma Illumina MiSeq (LGC Genomics GmbH, Berlin, Germania) usando la coppia di primers descritta da Klindworth et al. (2013).

1.4.3 Analisi bioinformatica

I campioni raccolti (in doppia replica) sono stati sequenziati su piattaforma Illumina MiSeq. Le *read* risultanti dal sequenziamento sono state preprocessate mediante l'utilizzo della pipeline QIIME2 (versione 2017.12)(Caporaso et al., 2010), eseguendo gli step di quality filtering, appaiamento delle *read paired end*, chimera *checking* e *OUT clustering*. La *Feature Table* così ottenuta è stata poi analizzata con una pipeline implementata *in-house* in ambiente R (versione 3.4.3, "Kite-Eating Tree")(R Core Team, 2018). La *count table* è stata inizialmente sottoposta a procedura di normalizzazione mediante l'utilizzo del pacchetto *scrn* (Lun et al., 2016) e di *zero-imputation* mediante il tool *DrImpute* (Gong et al., 2018). Questa fase di preprocessing del dato si rende, infatti, particolarmente importante in dataset provenienti da sequenziamento del gene *16S rDNA*, in quanto normalmente afflitti da un livello di sparsità (presenza di *count 0* nella *Feature Table*) superiore rispetto alle *count table* ottenute da sequenziamento *shotgun*.

Dopo il preprocessing, sono state effettuate analisi volte alla caratterizzazione del microbiota del singolo campione (Tabella 1).

Tabella 1. *Analisi bioinformatiche effettuate in questo studio.*

Cluster analysis:	Tecnica di classificazione non supervisionata che raggruppa i campioni in base ad una distanza prestabilita
Heatmap su dati di presenza/assenza:	Visualizzazione delle differenze fra campioni in termini di distanza su dato di presenza/assenza
Heatmap sulle abbondanze proporzionali:	Visualizzazione delle differenze fra campioni in termini di distanza su dato di abbondanza proporzionale
Alpha diversity indices:	Misure quantitative che descrivono la complessità ecologica dei campioni (numero di taxa presenti, equità

	nella distribuzione nei diversi taxa,...)
Test per differenze su alpha diversity indices:	Ricerca di differenze statisticamente significative fra alpha diversity di diverse sottopopolazioni
Beta diversity measures:	Misure di distanza fra campioni basate sulle abbondanze dei taxa utili ad evidenziare differenze a livello di composizione tassonomica
Level prevalente:	Identificazione, a diversi livelli tassonomici, del taxon prevalente
Barplot sulle abbondanze proporzionali:	Rappresentazione della composizione del microbiota dei campioni basata sull'abbondanza proporzionale dei taxa presenti
Permanova per vedere l'influenza dell'alimentazione sulla composizione microbica:	Test statistico per identificare eventuali fattori discriminanti nell'identificare campioni appartenenti a gruppi diversi

In particolare, sono state solte le seguenti analisi ad ogni livello tassonomico (OTU → Phylum; fra parentesi si riportano eventuali tool utilizzati allo scopo):

- Cluster analysis per razza, lifestyle (indoor/outdoor) e condizione fisica (thin/fat):
- Heatmap su dato di presenza/assenza
- Heatmap sulle abbondanze proporzionali
- Alpha diversity (indici di Chao1 e Pielou) per razza, lifestyle e condizione fisica (DiversitySeq; Finotello et al., 2018)
- Test per differenze su alpha diversity per razza, lifestyle e condizione fisica (Kruskall test)
- Beta diversity (misure di dissimilarità: binomial, Bray-Curtis, Canberra, Jaccard, Kulczynski, horn) (phyloseq; McMurdie and Holmes, 2013)
- Level prevalente per razza, lifestyle e condizione fisica
- Barplot sulle abbondanze proporzionali
- Permanova per vedere l'influenza dell'alimentazione sulla composizione microbica (vegan; Oksanen et al., 2018).

Indagare sulla possibile differenza nella composizione del microbiota intestinale considerando diversi fattori di ripartizione:

- Condizione fisica (cani magri vs. cani grassi)
- Lifestyle (indoor vs. outdoor)
- Razza (Border Collie vs. Labrador)
- Composizione dell'alimentazione (macronutrienti e Kcal assunte)

1.5 Risultati

Per questo studio sono stati recuperati i campioni fecali di 29 cani, di cui 15 Labrador Retriever e 14 Border Collie. Le caratteristiche dei cani sono riportate nelle Tabelle 2 e 3. Sulla base della loro condizione corporea, 15 cani sono stati giudicati normopeso (di cui 7 Labrador Retriever e 8 Border Collie) e 14 sovrappeso (di cui 8 Labrador e 6 Border Collie) (Tabella 4).

Nella Tabella 5 sono riportate le caratteristiche nutrizionali principali dei mangimi assunti dai cani in questione.

Tabella 2. Caratteristiche dei cani di razza Labrador Retriever reclutati per lo studio.

	Nome (ID)	Età (anni)	Sesso	Peso (kg)	BCS (/9)	Lifestyle
	Lucky (1)	3,5	MI	36,1	6	outdoor
	Sissi (2)	7,3	FI	32	8	indoor
	Axel (3)	3,1	MI	35	5	outdoor
	Lord (7)	1,1	MI	34	5	outdoor
	Cesare (8)	1,4	MI	36	5	outdoor
	Banjo (9)	2,8	MI	34	5	outdoor
	Lilli (11)	3,2	FI	35	7	outdoor
	Zelda (12)	1,3	FI	29	7	outdoor
	Lacky (16)	7,2	MI	39	7	indoor
	Neve (19)	2,0	FI	27,4	7	indoor
	Petra (20)	2,6	FI	40	5	outdoor
	Blanco (21)	2,6	MI	30	5	indoor
	Gas (23)	6,2	MI	38	7	indoor
	Oliver (26)	6,0	MI	40	8	outdoor
	Zoe (28)	2,7	FI	30	5	outdoor
media		3,5		34,4	6	
DS		2,1		4,0	1	
mediana		2,8		35,0	6	
min		1,1		27,4	5	
max		7,3		40	8	

Tabella 3. Caratteristiche dei cani di razza Border Collie reclutati per lo studio.

	Nome (ID)	Età (anni)	Sesso	Peso (kg)	BCS (/9)	Lifestyle
	Shiver (4)	5,1	MI	18,7	4	indoor
	Asso (5)	5,9	MI	21	6	indoor
	Olli (6)	1,2	FI	20	5	outdoor
	Eisel (10)	1,2	FI	17	5	outdoor
	Gange (13)	3,8	MI	19	5	indoor
	Astro (14)	3,1	MI	21,8	6	outdoor
	Iron (15)	2,2	MI	21,5	7	outdoor
	Mia (17)	1,1	FI	18,6	6	indoor
	Thiago (18)	1,4	MI	20	5	outdoor
	Frida (22)	5,3	FI	20	6	indoor
	Spritz (24)	1,1	MI	16	4	indoor
	Arya (25)	1,5	FI	12,5	4	indoor
	Kate (27)	3,8	FI	19	4	outdoor
	Emy (29)	3,4	FI	21,7	7	indoor
media		2,9		19,1	5	
DS		1,7		2,5	1	
mediana		2,6		19,5	5	
min		1,1		12,5	4	
max		5,9		21,8	7	

Tabella 4. Condizione corporea dei cani reclutati.

	Normopeso (BCS 4-5/9)		Sovrappeso (BCS 6-9/9)	
	M	F	M	F
Labrador	5	2	4	4
Border	4	4	3	3

Tabella 5. Caratteristiche dei mangimi consumati dai cani reclutati per lo studio.

	PRT %	GRA %	CEN %	FIB %	H2O %	CARB %	EM (kcal/100 g)
media	26,6	14,7	7,3	3,1	8,4	39,9	357,5
ds	4,3	3,6	1,1	0,8	1,2	8,6	17,2
mediana	25,5	14,0	7,8	3,0	8,0	41,6	356,7
min	19,0	9,0	5,0	2,0	7,0	18,0	328,5
max	38,0	22,0	9,0	5,0	12,0	53,0	390,0

Mediante le analisi del DNA batterico fecale sono stati identificati complessivamente 8 phyla (più un gruppo non definito), 14 classi (più 3 gruppi non definiti), 19 ordini (più 4 gruppi non definiti), 41 famiglie (più 9 gruppi non definiti), 58 generi (più 17 gruppi non definiti).

Dai risultati della valutazione del microbiota intestinale è dunque emerso che *Firmicutes* e *Bacteroidetes* sono i maggiori phyla batterici rappresentati ($51.5 \pm 10.0\%$ e $33.4 \pm 8.5\%$, rispettivamente) (Figura 3); le classi principali sono risultate *Bacteroidia* ($33.3 \pm 8.5\%$), *Clostridia* ($29.9 \pm 9.0\%$) e *Negativicutes* ($13.7 \pm 9.3\%$) (Figura 4), mentre gli ordini maggiormente rilevati sono stati *Bacteroidales* ($33.3 \pm 8.5\%$), *Clostridiales* ($29.9 \pm 9.0\%$) e *Selenomonadales* ($13.7 \pm 9.3\%$) (Figura 5); scendendo ulteriormente nella classificazione tassonomica, le famiglie più rappresentate sono state *Bacteroidaceae* ($17.4 \pm 8.3\%$), *Lachnospiraceae* ($16.4 \pm 6.7\%$), *Prevotellaceae* ($14.2 \pm 5.1\%$) e *Veillonellaceae* ($11.7 \pm 9.8\%$). Infine, i generi *Bacteroides* ($17.4 \pm 8.3\%$), *Megamonas* ($11.6 \pm 9.7\%$), *Prevotella* ($8.8 \pm 4.9\%$), *Alloprevotella* ($5.4 \pm 2.8\%$), *Faecalibacterium* ($4.7 \pm 2.9\%$) e *Catenibacterium* ($2.9 \pm 3.1\%$) sono risultati i principali, mentre alcuni non sono stati precisamente identificati (*Incertae Sedis*, $9.0 \pm 4.2\%$).

Figura 3. *Abbondanza proporzionale dei phyla batterici rilevati nel microbiota intestinale dei cani coinvolti in questo studio, suddivisi per condizione corporea.*

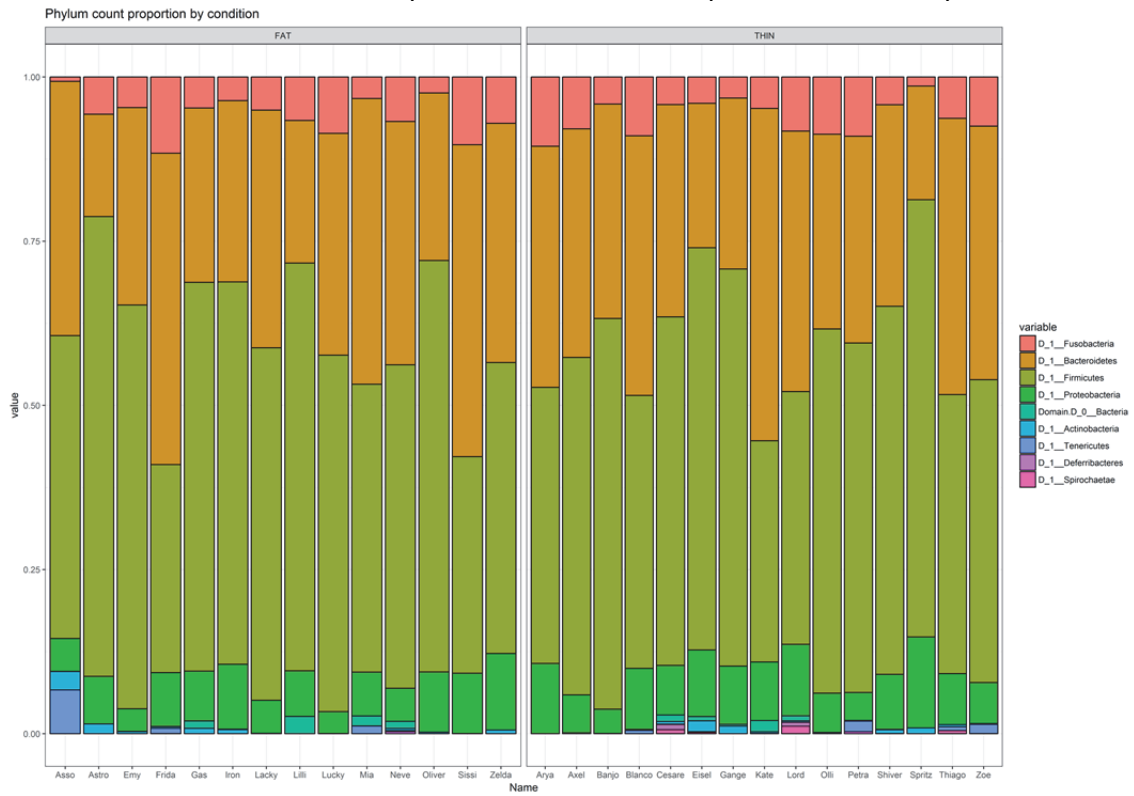


Figura 4. *Abbondanza proporzionale delle classi batteriche rilevate nel microbiota intestinale dei cani coinvolti in questo studio, suddivisi per condizione corporea.*

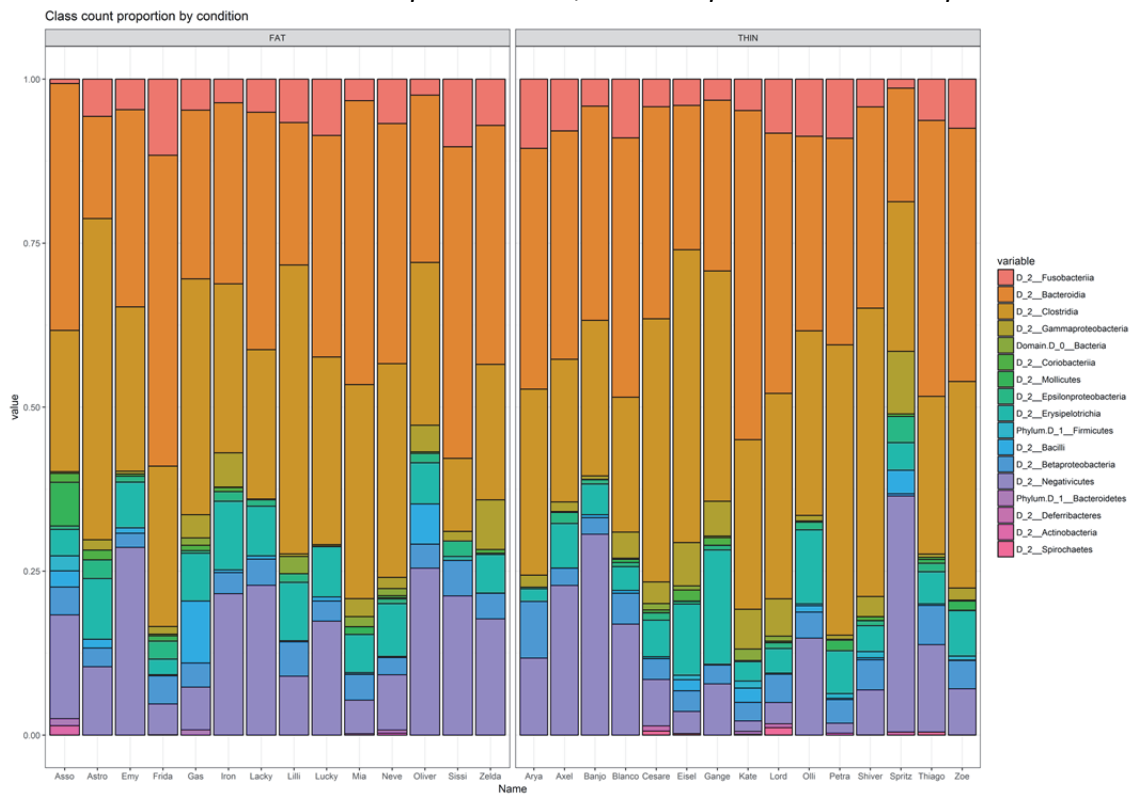
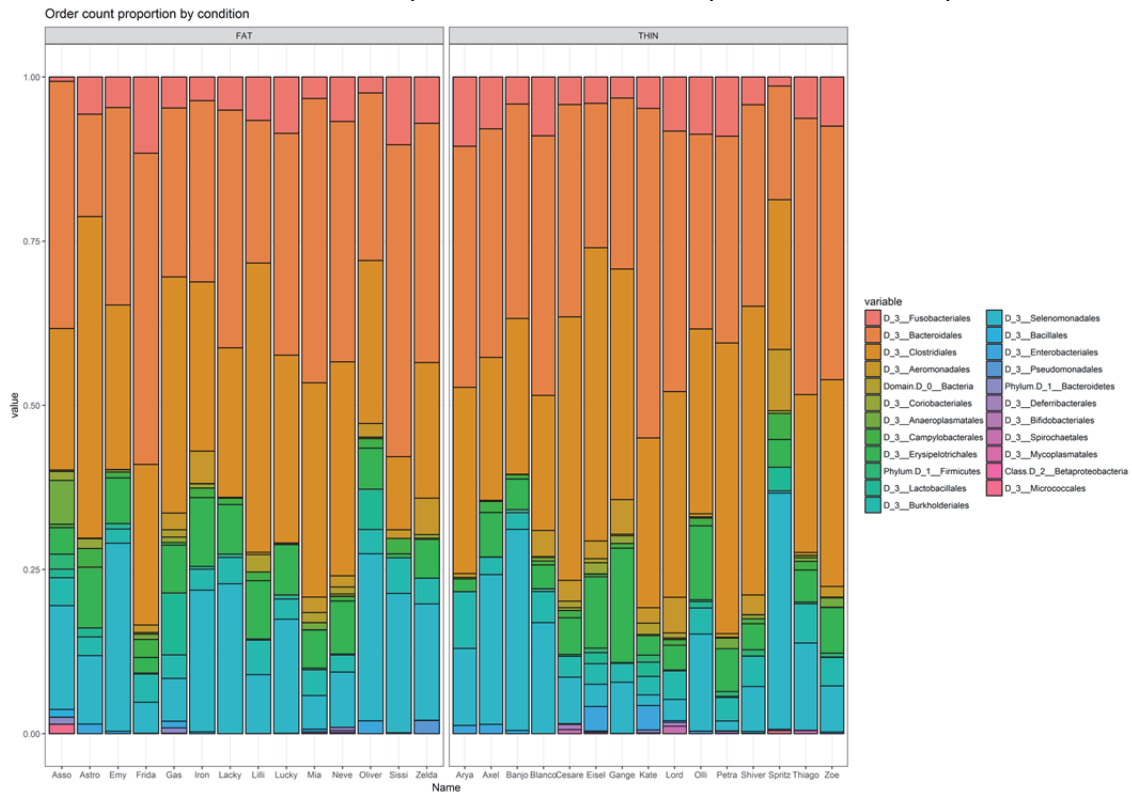
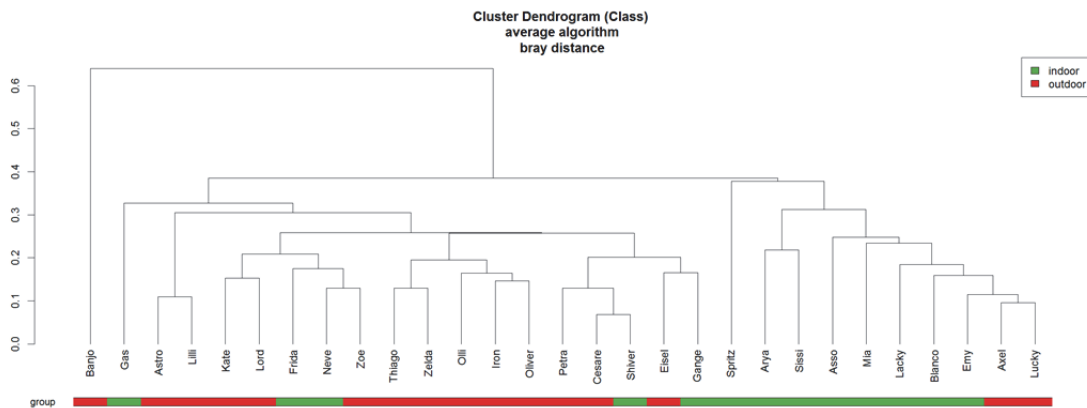


Figura 5. *Abbondanza proporzionale degli ordini batterici rilevati nel microbiota intestinale dei cani coinvolti in questo studio, suddivisi per condizione corporea.*



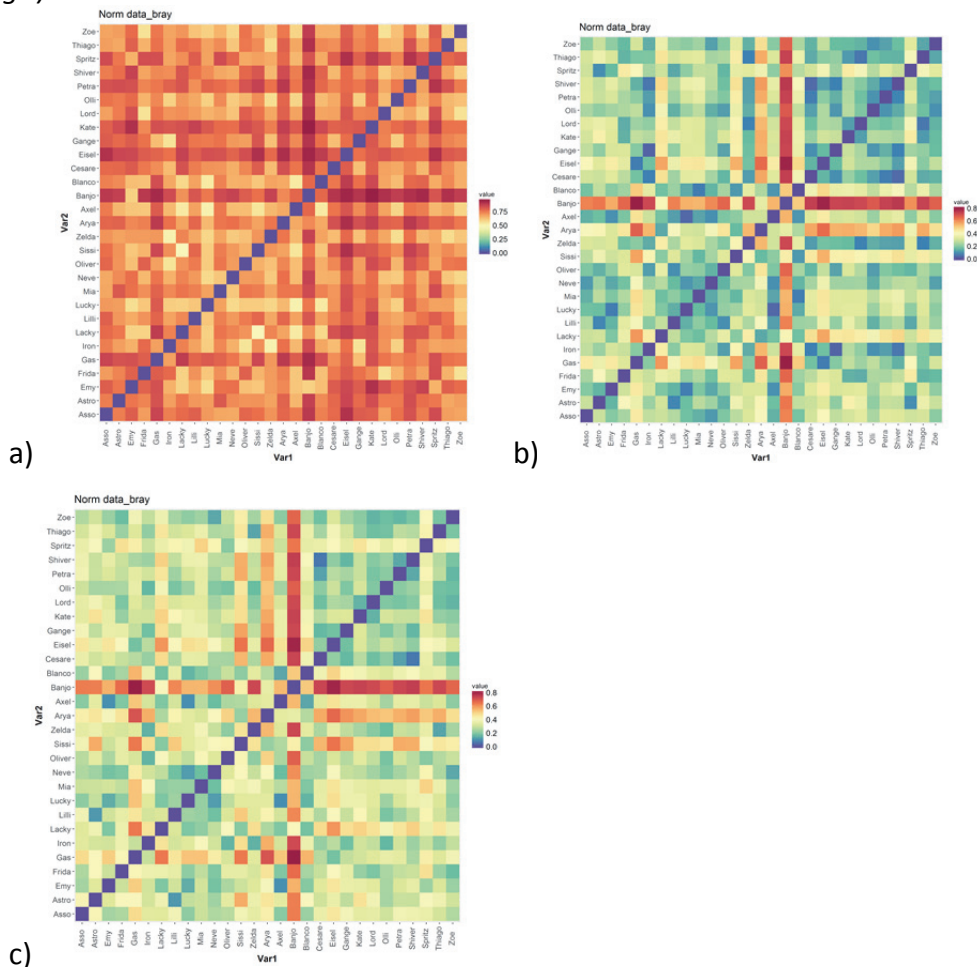
Per quanto riguarda le *cluster analyses*, non sono stati rinvenuti dei raggruppamenti significativi nei cani reclutati ($p > 0.05$). Come si può notare in [Figura 6](#), una tendenza alla similarità nella composizione del microbiota a livello di classi batteriche è stata notata circa lo stile di vita.

Figura 6. *Clustering dei cani coinvolti in questo studio suddivisi per stile di vita basato sulle classi batteriche rilevate nel loro microbiota intestinale.*



Le *heatmap* raffigurate in [Figura 7](#) dimostrano ulteriormente quanto ogni soggetto coinvolto in questo studio possieda un microbiota intestinale differente da quello di tutti gli altri individui ai vari livelli tassonomici batterici.

Figura 7. *Heatmap* su dissimilarità Bray-Curtis (il colore rappresenta il valore della distanza; blu: campioni molto vicini, rosso: campioni molto lontani) per quanto concerne OTU (a), phyla (b) e classi (c) rilevati nel microbiota intestinale dei cani coinvolti in questo studio, suddivisi per condizione corporea (sx: cani obesi, dx: cani magri).



Il test di *Alpha diversity* (i.e. misure interne al singolo campione che ne quantificano la complessità) ha dato esito a dei valori di *richness* (i.e. numerosità delle specie batteriche presenti nel campione) e *evenness* (i.e. uniformità delle abbondanze proporzionali delle specie presenti nel campione) statisticamente non differenti fra i microbiota dei vari gruppi di cani. I dati (Kruskal-Wallis rank sum test: p-values) riguardanti le classi batteriche sono riportati di seguito:

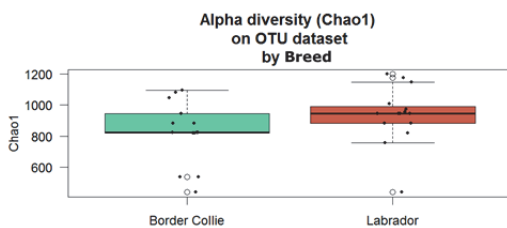
- Richness (Chao1):

- Condizione corporea: p-value = 0.3963
- Razza: p-value = 0.3963
- Stile di vita: p-value = 0.1651
- Evenness:
 - Condizione corporea: p-value = 0.6945
 - Razza: p-value = 0.7934
 - Stile di vita: p-value = 0.456

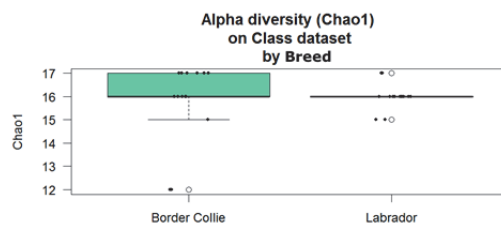
Anche in questo caso, come si può notare in [Figura 8](#), non emerge una netta distinzione fra i gruppi di cani presi in considerazione.

Figura 8. Boxplot per gruppi dei valori di alpha diversity (Box: 1°- 3° quartile (IQR) con mediana; Baffo inferiore: $Q_1 - 1.5 \text{ IQR}$; Baffo superiore: $Q_3 + 1.5 \text{ IQR}$) basati sulle OTU (a,c,e) e sulle classi batteriche (b,d,f) rilevate nel loro microbiota intestinale; i cani sono suddivisi per razza (a,b), condizione corporea (c,d) e stile di vita (e,f)

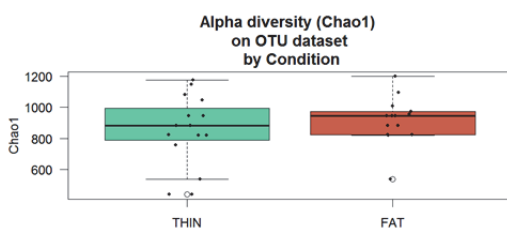
a)



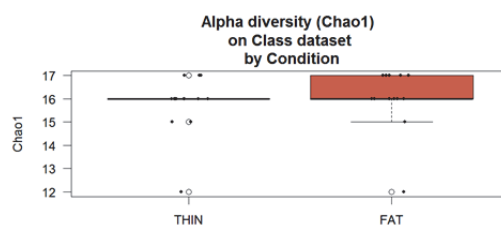
b)



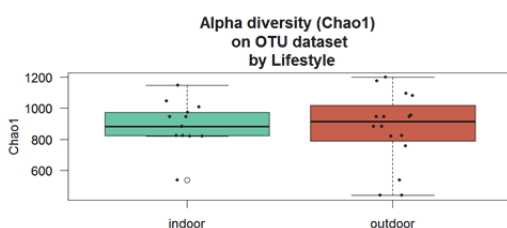
c)



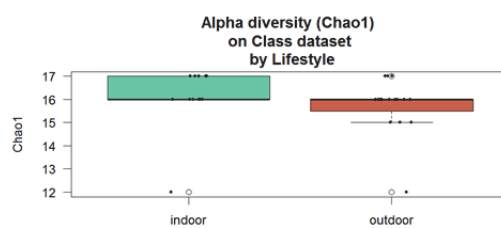
d)



e)



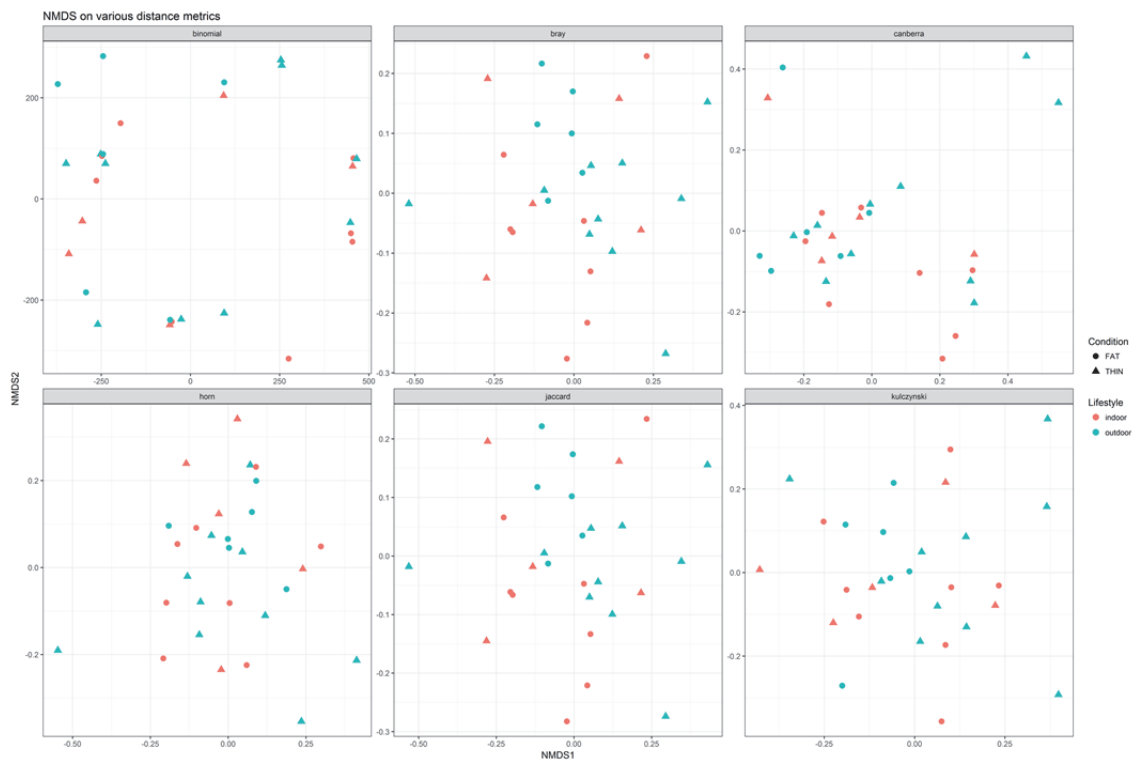
f)



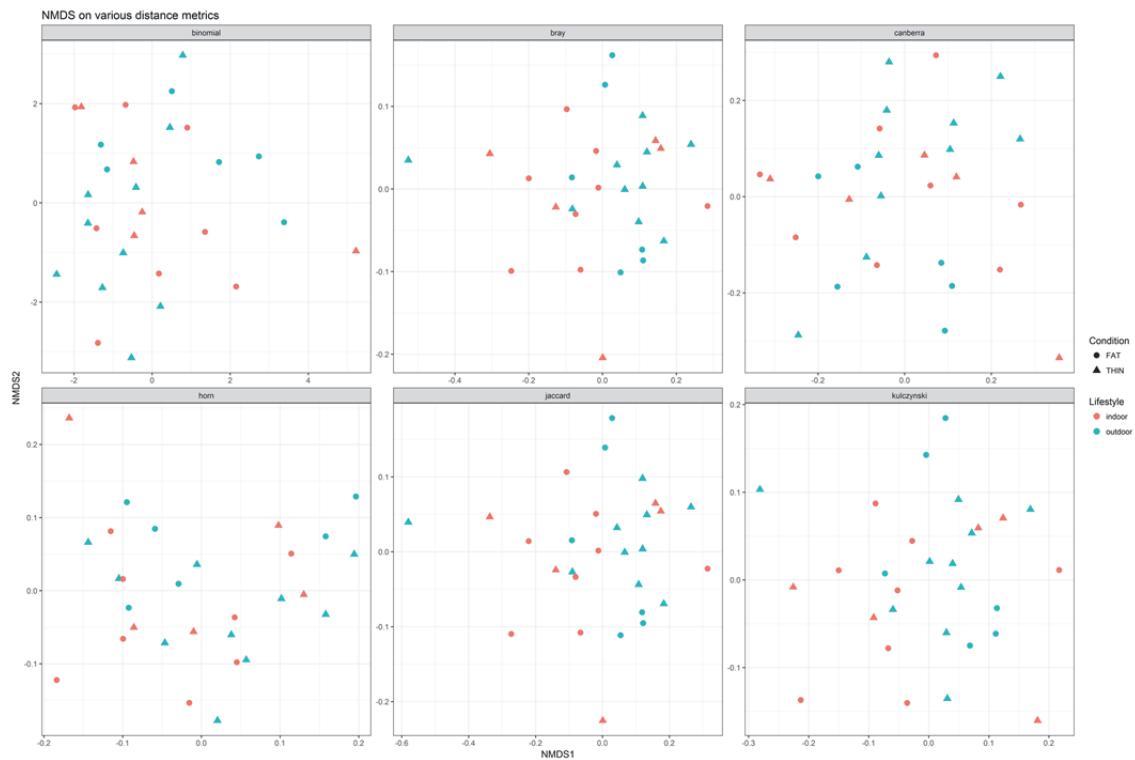
Anche la valutazione della *beta diversity* (i.e. la misura della differenza fra più campioni) non ha evidenziato grandi differenze a livello di composizione tassonomica nel microbiota intestinale dei cani in base alla condizione corporea o allo stile di vita. Come si può notare nella [Figura 9](#), non sono evidenti dei raggruppamenti ben distinti dei soggetti inclusi nello studio sulla base delle caratteristiche analizzate.

Figura 9. NMDS plot della distanza tra i campioni misurata usando vari indici di dissomiglianza (campioni vicini sul piano hanno minore distanza) basati sulle OTU (a) e sulle classi batteriche (b) rilevate nel microbiota intestinale dei cani suddivisi per condizione corporea (forma del simbolo) e stile di vita (colore del simbolo).

a)



b)



Infine, dal test PERMANOVA è emerso che i fattori che maggiormente influenzano la diversità del microbiota dei cani coinvolti in questo studio sono alcuni componenti della dieta. Pur non raggiungendo una significatività statistica, la quantità di proteine presenti nei mangimi tendenzialmente ha un impatto sulla composizione del microbiota in termini di OTU ($p = 0.071$) e di ordini batterici ($p = 0.098$), così come sull'indice *beta diversity* di OTU ($p = 0.08$) e classi batteriche ($p = 0.099$). Sulla composizione del microbiota a livello di famiglie batteriche pare abbiano un ruolo anche le ceneri ($p = 0.094$).

1.6 Discussione e conclusioni

I dati ottenuti da questo studio hanno rivelato che non ci sono considerevoli differenze fra il microbiota intestinale di cani di razza Labrador rispetto a quelli di razza Border Collie, né fra cani normopeso rispetto a quelli in sovrappeso. Seppure non significativamente, una lieve tendenza alla diversificazione fra gruppi è stata osservata quando sono stati comparati i cani con uno stile di vita “indoor” nei confronti di quelli “outdoor”.

In generale, i principali taxa batterici rilevati nei campioni analizzati in questo studio sono quelli già rintracciati in molti altri studi sul microbiota canino (Blake e Suchodolski, 2016; Deng and Swanson, 2015; Grześkowiak et al., 2015; Hoffmann et al., 2016). Questi risultati discostano però da quelli di altri studi pubblicati finora in cui il microbiota intestinale di cani sovrappeso e obesi ha rivelato delle differenze significative a vari livelli tassonomici nei confronti del microbiota di cani normopeso (Forster et al., 2018; Handl et al., 2013; Park et al., 2015b), seppure nemmeno in tali lavori è stato possibile *clusterizzare* nettamente i due gruppi di cani. Tale esito può essere dovuto alla condizione corporea non estremizzata dei cani reclutati nel presente studio, poiché soltanto due cani potevano essere definiti come veramente obesi (BCS 8/9); nello studio di Forster et al. (2018), infatti, le maggiori differenze nella composizione del microbiota intestinale sono state determinate fra soggetti normopeso (BCS 4-5/9) e obesi (BCS 8-9/9), mentre quelli sovrappeso (BCS 6-7/9) mostravano caratteristiche intermedie.

Sicuramente l'assenza di soggetti con obesità marcata va considerata come un punto debole, assieme alla numerosità ridotta dei campioni, e i limiti di questo studio potrebbero avere influito sui risultati. È altresì necessario, però, accentuare la discussione sui criteri di selezione dei soggetti reclutati per questo lavoro. Al fine di avere un panorama “realistico” del microbiota intestinale canino, sono stati scelti vari cani di proprietà, al contrario di altri studi in cui sono stati presi in considerazione dei Beagle di laboratorio (Alexander et al., 2018; Handl et al., 2013; Li et al., 2017; Park et al., 2015b; Salas-Mani et al., 2018), ognuno proveniente da un nucleo familiare diverso per evitare casi di parentela, fattore che si è visto influenzare notevolmente il grado di similitudine della composizione del microbiota intestinale (Turnbaugh et al., 2009; Vilson et al., 2018; Yatsunencko et al., 2012). La scelta di due razze specifiche, ovvero

Labrador Retriever e Border Collie, è stata ritenuta necessaria per due motivi: il primo, per ridurre al minimo la variabilità del microbiota intestinale che può essere associata alla razza di appartenenza del cane; il secondo, per confrontare il microbiota intestinale di una razza predisposta all'obesità (i.e. Labrador) con quello di una razza che non lo è (i.e. Border Collie) e che, anzi, in virtù del temperamento attivo e dinamico tende a essere incline alla magrezza. È stato osservato che la razza ha influito notevolmente sulla composizione del microbiota intestinale canino in uno studio di Simpson et al. (2002), ma la maggioranza dei lavori pubblicati finora non ha avuto alla base una selezione dei soggetti che comprendesse soltanto determinate razze distinguendo quelle predisposte allo sviluppo di obesità (Beloshapka and Forster, 2016; Forster et al., 2018; Handl et al., 2013; Kieler et al., 2017; Park et al., 2015a).

Sono stati volutamente esclusi i soggetti castrati e sterilizzati, poiché è stato dimostrato come la gonadectomia e l'influenza degli ormoni sessuali abbiano un effetto notevole sulla composizione del microbiota intestinale (Bolnick et al., 2014; Org et al., 2016). Gli studi effettuati finora hanno coinvolto principalmente cani di proprietà castrati e sterilizzati (Beloshapka and Forster, 2016; Forster et al., 2018; Handl et al., 2013; Kieler et al., 2017) oppure Beagle di laboratorio dichiaratamente o presumibilmente interi (Alexander et al., 2018; Handl et al., 2013; Li et al., 2017; Park et al., 2015b). Purtroppo, in questa fase dello studio, la differenza fra cani maschi e femmine non è stata valutata.

Si è preferito reclutare cani adulti giovani (i.e. 1-7 anni) per confrontare il microbiota intestinale di soggetti appartenenti alla stessa fascia d'età. È stato dimostrato infatti come cuccioli, adulti e anziani possiedano delle differenze nella composizione dovute all'età (Benno et al., 1992; Guard et al., 2017; Masuoka et al., 2017; Simpson et al., 2002; Vilson et al., 2018).

Tutti i cani coinvolti in questo studio erano completamente sani, ed è stato un criterio di selezione imprescindibile per poter identificare eventuali differenze nel microbiota intestinale in relazione all'obesità come unica condizione patologica. Moltissimi studi hanno dimostrato come il microbiota di individui affetti da varie patologie sia generalmente differente da quello di individui sani (Barko et al., 2018; Blake and Suchodolski, 2016; Janssen and Kersten, 2015; Lee and Hase, 2014), e una ricerca di Park e colleghi (2015a) ha confermato il fatto che cani obesi possiedono un microbiota

intestinale diverso qualora siano affetti da una ulteriore patologia. Inoltre, ai proprietari dei cani è stato chiesto se i loro animali fossero stati trattati di recente con antibiotici e/o cortisonici perché è ormai ben riconosciuta la loro capacità istantanea di alterare la flora microbica intestinale (Grønvold et al., 2010; Maier et al., 2018; Mikkelsen et al., 2016; Suchodolski et al., 2009). Pertanto, siccome gli effetti di tali farmaci sul microbiota possono durare per qualche settimana dopo la somministrazione, è stato deciso di reclutare soltanto cani che non avessero assunto antibiotici e/o cortisonici nei sei mesi precedenti per dare tempo alla flora microbica di ripristinarsi allo stato originario.

Uno studio recente (Vilson et al., 2018) ha dimostrato per la prima volta che l'ambiente esterno influisce sulla composizione del microbiota dei cani, poiché si sono viste differenze statisticamente significative sulla diversità della flora microbica intestinale di animali cresciuti in campagna o in città. Nel presente studio le maggiori differenze sono state rinvenute fra cani che trascorrono la maggior parte della giornata all'aperto (i.e. outdoor) oppure in casa (i.e. indoor). Ciò potrebbe essere dovuto a un maggiore o minore contatto con l'ambiente esterno, rispettivamente, ma anche l'interazione con l'uomo potrebbe giocare un ruolo in questo senso. Una ricerca sulle comunità microbiche presenti nei vari distretti corporei (Song et al., 2013) ha evidenziato che cani e relativi proprietari possiedono dei microbiota più simili fra loro, e addirittura che i proprietari dispongono di taxa batterici che le persone senza cani non hanno. Pertanto, è probabile che l'interazione con l'essere umano possa essere un fattore influente sulla composizione del microbiota dei cani "indoor".

Molti studi hanno già dimostrato come il tipo di alimentazione (e.g. commerciale, carne cotta, carne cruda) influenzi la composizione del microbiota canino (Hang et al., 2013, 2012; Herstad et al., 2017; Kim et al., 2017; Li et al., 2017; Sandri et al., 2016), talvolta sovrastando anche i fattori elencati finora. Per non incorrere in tale evenienza, gli animali coinvolti in questo studio sono stati selezionati anche in base al tipo di dieta, ovvero tutti dovevano essere alimentati con un mangime commerciale secco di mantenimento. A differenza di altri studi in cui è stato somministrato lo stesso mangime a tutti i cani, per questa ricerca è stato mantenuto il prodotto a cui ogni soggetto era solito mangiare da almeno un mese per avere una rappresentazione più realistica della popolazione canina domestica. Ciò ha inevitabilmente comportato il

fatto che, nonostante fossero tutti abituati alla stessa tipologia di alimento, la composizione analitica fosse variegata e che ogni cane assumesse giornalmente quantità differenti dei vari nutrienti. Come dimostrato dall'analisi bioinformatica, i fattori che hanno influito maggiormente sulla composizione del microbiota dei cani reclutati sono stati alcuni nutrienti della dieta, in particolar modo le proteine. Qualche studio ha già dimostrato, infatti, come le proteine abbiano una forte capacità di modulare il microbiota intestinale canino (Hang et al., 2013; Li et al., 2017; Pinna et al., 2016).

Nonostante l'accurata selezione dei soggetti effettuata per questa ricerca, e vista l'assenza di caratteristiche significativamente correlabili, si può dedurre che la componente individuale è il fattore predominante che determina la composizione del microbiota intestinale del cane (Garcia-Mazcorro et al., 2012; Hand et al., 2013; Handl et al., 2011). Ulteriori studi e maggiori approfondimenti sono necessari per rafforzare i risultati finora ottenuti.

In conclusione, nell'ultimo decennio il microbiota intestinale ha destato molto interesse nella comunità scientifica dato l'importante ruolo che assume nel mantenimento dello stato di salute generale dell'organismo ospite. Sia nell'uomo che nel cane, un microbiota intestinale alterato sembra essere collegato a molte condizioni patologiche, e l'ipotesi che esso possa contribuisca all'insorgenza dell'obesità sembra plausibile, sebbene i meccanismi coinvolti non siano ancora del tutto chiari.

Dai risultati ottenuti in questo studio non sono state riscontrate notevoli differenze a nessun livello tassonomico nel microbiota intestinale di soggetti in sovrappeso rispetto ai normopeso, né se ne sono evidenziate fra due razze canine distinte, nonostante una fosse predisposta allo sviluppo dell'obesità. Una lieve evidenza di associazione è stata invece osservata fra la composizione del microbiota e lo stile di vita (indoor vs outdoor). La variabilità interindividuale è comunque risultata più forte della variabilità analizzata fra i vari raggruppamenti. Per quanto riguarda invece la dieta, si è visto che il macronutriente più significativo nel determinare la composizione microbica è rappresentato dalle proteine, mentre alcune differenze notate anche per effetto dell'apporto calorico giornaliero e delle ceneri.

Per una migliore comprensione del ruolo del microbiota intestinale nello sviluppo dell'obesità canina si auspicano in futuro degli studi con numerosità campionarie maggiori e una selezione altrettanto accurata dei soggetti, includendo anche individui con le caratteristiche da valutare estremizzate.

1.7 Bibliografia

- Alexander, C., Cross, T.-W.L., Devendran, S., Neumer, F., Theis, S., Ridlon, J.M., Suchodolski, J.S., de Godoy, M.R.C., Swanson, K.S., 2018. Effects of prebiotic inulin-type fructans on blood metabolite and hormone concentrations and faecal microbiota and metabolites in overweight dogs. *Br. J. Nutr.* 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0007114518001952>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V, Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15718–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 979–984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605374104>
- Baldwin, K.; Bartges, J.; Buffington, T.; Freeman, L.M.; Grabow, M.; Legred, J.; Ostwald, D., 2010. AAHA Nutritional Assessment Guidelines for dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 46, 285–296. <https://doi.org/10.1142/S0219030303000673>
- Barko, P.C., McMichael, M.A., Swanson, K.S., Williams, D.A., 2018. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 9–25. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>
- Beloshapka, A.N., Forster, G.M., 2016. Fecal Microbial Communities of Overweight and Obese Client-Owned Dogs Fed Cooked Bean Powders as Assessed by 454-Pyrosequencing. *J. Vet. Sci. Technol.* 7. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000366>
- Benno, Y., Nakao, H., Uchida, K., Mitsuoka, T., 1992. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 703–706. <https://doi.org/10.1292/jvms.54.703>
- Bierer, T.L., Bui, L.M., 2004. High-Protein Low-Carbohydrate Diets Enhance Weight Loss in Dogs. *J. Nutr.* 134, 2087–2089.
- Blake, A.B., Suchodolski, J.S., 2016. Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. *Anim. Front.* 6, 37. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0032>
- Bolnick, D.I., Snowberg, L.K., Hirsch, P.E., Lauber, C.L., Org, E., Parks, B., Lusi, A.J., Knight, R., Caporaso, J.G., Svanbäck, R., 2014. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5500>
- Calvani, R., Miccheli, A., Capuani, G., Tomassini Miccheli, A., Puccetti, C., Delfini, M., Iaconelli, A., Nanni, G., Mingrone, G., 2010. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype. *Int. J. Obes.* 34, 1095–1098. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.44>
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., 2008. Changes in gut microbiota control metabolic diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470–81. <https://doi.org/10.2337/db07-1403>. Additional

- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G. a, Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C. a, Mcdonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W. a, Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. correspondence QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nat. Publ. Gr.* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- Chandler, M., Cunningham, S., Lund, E.M., Khanna, C., Naramore, R., Patel, A., Day, M.J., 2017. Obesity and Associated Comorbidities in People and Companion Animals: A One Health Perspective. *J. Comp. Pathol.* 156, 296–309. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.03.006>
- Collado, M.C., Isolauri, E., Laitinen, K., Salminen, S., 2008. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 894–899. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.4.894>
- Davila, A.M., Blachier, F., Gotteland, M., Andriamihaja, M., Benetti, P.H., Sanz, Y., Tomé, D., 2013. Re-print of “intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host.” *Pharmacol. Res.* 69, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.01.003>
- de La Serre, C.B., Ellis, C.L., Lee, J., Hartman, A.L., Rutledge, J.C., Raybould, H.E., 2010. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G440-448. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00098.2010>.
- Deng, P., Swanson, K.S., 2015. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *Br. J. Nutr.* 113, S6–S17. <https://doi.org/10.1017/S0007114514002943>
- Diez, M., Nguyen, P., Jeusette, I., Devois, C., Istasse, L., Biourge, V., 2002. Weight Loss in Obese Dogs: Evaluation of a High-Protein, Low-Carbohydrate Diet. *J. Nutr.* 132, 1685–1687. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1649S>
- Finotello, F., Mastroianni, E., Di Camillo, B., 2018. Measuring the diversity of the human microbiota with targeted next-generation sequencing. *Brief. Bioinform.* 19, 679–692. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw119>
- Fleissner, C.K., Huebel, N., Abd El-Bary, M.M., Loh, G., Klaus, S., Blaut, M., 2010. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br. J. Nutr.* 104, 919–929. <https://doi.org/10.1017/S0007114510001303>
- Forster, G.M., Stockman, J., Noyes, N., Heuberger, A.L., Broeckling, C.D., Bantle, C.M., Ryan, E.P., 2018. A Comparative Study of Serum Biochemistry, Metabolome and Microbiome Parameters of Clinically Healthy, Normal Weight, Overweight, and Obese Companion Dogs. *Top. Companion Anim. Med.* <https://doi.org/10.1053/J.TCAM.2018.08.003>
- Fraher, M.H., O’Toole, P.W., Quigley, E.M.M., 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 312–322. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.44>

- Furet, J.-P., Kong, L.-C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J.-L., Mariat, D., Corthier, G., Doré, J., Henegar, C., Rizkalla, S., Clément, K., 2010. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery–induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*.
- Garcia-Mazcorro, J., Minamoto, Y., 2013. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs : a brief review Microorganismos gastrointestinales en gatos y perros : una revisión breve. *Arch. Med. Vet.* 45, 111–124. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200002>
- 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. *Microbiologyopen* 1, 340–347. <https://doi.org/10.1002/mbo3.36>
- Gérard, P., 2016. Gut microbiota and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 147–162. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2061-5>
- German, A.J., Ryan, V.H., German, A.C., Wood, I.S., Trayhurn, P., 2010. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. *Vet. J.* 185, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.004>
- Gong, W., Kwak, I.Y., Pota, P., Koyano-Nakagawa, N., Garry, D.J., 2018. DrImpute: Imputing dropout events in single cell RNA sequencing data. *BMC Bioinformatics* 19, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2226-y>
- Goodrich, J.K., Di Rienzi, S.C., Poole, A.C., Koren, O., Walters, W.A., Caporaso, J.G., Knight, R., Ley, R.E., 2014. Conducting a microbiome study. *Cell* 158, 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.037>
- Greetham, H.L., Giffard, C., Hutson, R.A., Collins, M.D., Gibson, G.R., 2002. Bacteriology of the Labrador dog gut: A cultural and genotypic approach. *J. Appl. Microbiol.* 93, 640–646. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01724.x>
- Grønvold, A.M.R., L'Abée-Lund, T.M., Sørum, H., Skancke, E., Yannarell, A.C., MacKie, R.I., 2010. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 71, 313–326. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00808.x>
- Grześkowiak, L., Endo, A., Beasley, S., Salminen, S., 2015. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe* 34, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>
- Guard, B.C., Mila, H., Steiner, J.M., Mariani, C., Suchodolski, J.S., Chastant-Maillard, S., 2017. Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. *PLoS One* 12, 8–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175718>
- Haaf, T., 2011. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Curr. Protoc. Cell Biol.* 1988, 1–52. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03067.x>
- Hand, D., Wallis, C., Colyer, A., Penn, C.W., 2013. Pyrosequencing the Canine Faecal Microbiota: Breadth and Depth of Biodiversity. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053115>
- 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 Microbiol. Ecol.* 76, 301–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x>
- 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 Microbiol. Ecol.* 84, 332–343. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12067>
- Hang, I., Heilmann, R.M., Grützner, N., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M., Atroshi, F., Sankari, S., Kettunen, A., de Vos, W.M., Zentek, J., Spillmann, T., 2013. Impact of diets with a high content of greaves-meal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin concentrations in healthy dogs. *BMC Vet. Res.* 9, 201. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-201>
- Hang, I., Rinttila, T., Zentek, J., Kettunen, A., Alaja, S., Apajalahti, J., Harmoinen, J., de Vos, W.M., Spillmann, T., 2012. Effect of high contents of dietary animal-derived protein or carbohydrates on canine faecal microbiota. *BMC Vet. Res.* 8, 90. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-90>
- Heid, C., Livak, K., Stevens, J., Williams, P., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Herstad, K.M.V., Gajardo, K., Bakke, A.M., Moe, L., Ludvigsen, J., Rudi, K., Rud, I., Sekelja, M., Skancke, E., 2017. A diet change from dry food to beef induces reversible changes on the faecal microbiota in healthy, adult client-owned dogs. *BMC Vet. Res.* 13, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1073-9>
- Hoffmann, A.R., Proctor, L.M., Surette, M.G., Suchodolski, J.S., 2016. The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Vet. Pathol.* 53, 10–21. <https://doi.org/10.1177/0300985815595517>
- Honneffer, J.B., Steiner, J.M., Lidbury, J.A., Suchodolski, J.S., 2017. Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics* 13, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1165-3>
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D.N., 2015. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21, 8836–8847. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Janssen, A.W.F., Kersten, S., 2015. The role of the gut microbiota in metabolic health. *FASEB J.* 29, 3111–3123. <https://doi.org/10.1096/fj.14-269514>
- Kieler, I.N., Shamzir Kamal, S., Vitger, A.D., Nielsen, D.S., Lauridsen, C., Bjornvad, C.R., 2017. Gut microbiota composition may relate to weight loss rate in obese pet dogs. *Vet. Med. Sci.* 3, 252–262. <https://doi.org/10.1002/vms3.80>
- Kil, D.Y., Swanson, K.S., 2011. Companion animals symposium: Role of microbes in canine and feline health. *J. Anim. Sci.* 89, 1498–1505. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3498>
- Kim, J., An, J.U., Kim, W., Lee, S., Cho, S., 2017. Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by

- the Illumina MiSeq platform. *Gut Pathog.* 9, 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s13099-017-0218-5>
- Kinross, J.M., Darzi, A.W., Nicholson, J.K., 2011. Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Med.* <https://doi.org/10.1186/gm228>
- Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplles J., Quast C., et al. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41(1).
- Kuczynski, J., Lauber, C.L., Walters, W.A., Parfrey, L.W., Clemente, J.C., Gevers, D., Knight, R., 2012. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat. Rev. Genet.* 13, 47–58. <https://doi.org/10.1038/nrg3129>
- Kushner, R.F., Doerfler, B., 2008. Low-carbohydrate, high-protein diets revisited. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24, 198–203.
<https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282f43a87>
- Lee, W.J., Hase, K., 2014. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat. Chem. Biol.* 10, 416–424. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1535>
- Li, Q., Lauber, C.L., Czarnecki-Maulden, G., Pan, Y., Hannah, S.S., 2017. Effects of the dietary protein and carbohydrate ratio on gut microbiomes in dogs of different body conditions. *MBio* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01703-16>
- Liévin-Le Moal, V., Servin, A.L., 2006. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides and Microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 315–337.
<https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.315>
- Lun, A.T.L., McCarthy, D.J., Marioni, J.C., 2016. A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor. *F1000Research* 5, 2122.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.9501.2>
- Maier, L., Pruteanu, M., Kuhn, M., Zeller, G., Telzerow, A., Anderson, E.E., Brochado, A.R., Fernandez, K.C., Dose, H., Mori, H., Patil, K.R., Bork, P., Typas, A., 2018. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* 555, 623–628. <https://doi.org/10.1038/nature25979>
- Martin, F.P.J., Dumas, M.E., Wang, Y., Legido-Quigley, C., Yap, I.K.S., Tang, H., Zirah, S., Murphy, G.M., Cloarec, O., Lindon, J.C., Sprenger, N., Fay, L.B., Kochhar, S., Van Bladeren, P., Holmes, E., Nicholson, J.K., 2007. A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol. Syst. Biol.* 3. <https://doi.org/10.1038/msb4100153>
- Masuoka, H., Shimada, K., Kiyosue-Yasuda, T., Kiyosue, M., Oishi, Y., Kimura, S., Yamada, A., Hirayama, K., 2017. Transition of the intestinal microbiota of dogs with age. *Biosci. Microbiota, Food Heal.* 36, 27–31.
<https://doi.org/10.12938/bmfh.BMFH-2016-021>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mentula, S., Harmoinen, J., Heikkilä, M., Westermarck, E., Rautio, M., 2005.

- Comparison between Cultured Small-Intestinal and Fecal Microbiotas in Beagle Dogs 71, 4169–4175. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4169>
- Middelbos, I.S., Boler, B.M.V., Qu, A., White, B.A., Swanson, K.S., Fahey, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>
- Mikkelsen, K.H., Allin, K.H., Knop, F.K., 2016. Effect of antibiotics on gut microbiota, glucose metabolism and body weight regulation: a review of the literature. *Diabetes Obes. Metab.* 18, 444–453. <https://doi.org/10.1111/dom.12637>
- Nicholson, J.K., Holmes, E., Wilson, I.D., 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 431–438. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1152>
- Oksanen J., Blanchet F.G., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlenn D., Minchin P. R., O'Hara R. B., Simpson G. L., Solymos P., Stevens M. H. H., Szoecs E., Wagner H., 2018. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-2. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Org, E., Mehrabian, M., Parks, B.W., Shipkova, P., Liu, X., Drake, T.A., Lusi, A.J., 2016. Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes* 7, 313–322. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1203502>
- Park, H.J., Lee, S.E., Kim, H.B., Isaacson, R.E., Seo, K.W., Song, K.H., 2015a. Association of Obesity with Serum Leptin, Adiponectin, and Serotonin and Gut Microflora in Beagle Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 43–50. <https://doi.org/10.1111/jvim.12455>
- Park, H.J., Lee, S.E., Kim, H.B., Isaacson, R.E., Seo, K.W., Song, K.H., 2015b. Association of obesity with serum leptin, adiponectin, and serotonin and gut microflora in beagle dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 43–50. <https://doi.org/10.1111/jvim.12455>
- Park, H.J., Lee, S.E., Kim, H.B., Kim, J.H., Seo, K.W., Song, K.H., 2015. Fecal microbiota analysis of obese dogs with underlying diseases: a pilot study. *Korean J. Vet. Res.* 55, 205–208. <https://doi.org/10.14405/kjvr.2015.55.3.205>
- Pinna, C., Vecchiato, C.G., Zaghini, G., Grandi, M., Nannoni, E., Stefanelli, C., Biagi, G., 2016. In vitro influence of dietary protein and fructooligosaccharides on metabolism of canine fecal microbiota. *BMC Vet. Res.* 12, 53. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0672-1>
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., LeChatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J.-M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Li, S., Yang, H., Wang, J., Ehrlich, S.D., Nielsen, R., Pedersen, O., Kristiansen, K., Wang, J., 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>

- R Core Team, 2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rabot, S., Membrez, M., Bruneau, A., Gerard, P., Harach, T., Moser, M., Raymond, F., Mansourian, R., Chou, C.J., 2010. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J.* 24, 4948–4959. <https://doi.org/10.1096/fj.10-164921>
- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C.F., Funai, K., Hayashi, D.K., Lyle, B.J., Martini, M.C., Ursell, L.K., Clemente, J.C., Van Treuren, W., Walters, W.A., Knight, R., Newgard, C.B., Heath, A.C., Gordon, J.I., 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* (80-.). 341. <https://doi.org/10.1126/science.1241214>
- Salas-Mani, A., Jeusette, I., Castillo, I., Manuelian, C.L., Lionnet, C., Iraculis, N., Sanchez, N., Fernández, S., Vilaseca, L., Torre, C., 2018. Fecal microbiota composition changes after a body weight loss diet in Beagle dogs. *J. Anim. Sci.* 96, 3102–3111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jas/sky193>
- Sandri, M., Dal Monego, S., Conte, G., Sgorlon, S., Stefanon, B., 2016. Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. *BMC Vet. Res.* 13, 65. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0981-z>
- Santacruz, A., Collado, M.C., García-Valdés, L., Segura, M.T., Maritn-Lagos, J.A., Anjos, T., Martí-Romero, M., Lopez, R.M., Florido, J., Campoy, C., Sanz, Y., 2010. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br. J. Nutr.* 104, 83–92. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000176>
- Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martin-Matillas, M., Campoy, C., Moreno, L.A., Veiga, O., Redondo-Figuero, C., Garagorri, J.M., Azcona, C., Delgado, M., García-Fuentes, M., Collado, M.C., Sanz, Y., 2009. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity* 17, 1906–1915. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.112>
- Schloss, P.D., Handelsman, J., 2004. Status of the Microbial Census. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 686–691. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.686-691.2004>
- Shade, A., Handelsman, J., 2012. Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environ. Microbiol.* 14, 4–12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>
- Shen, J., Obin, M.S., Zhao, L., 2013. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 34, 39–58. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.001>
- 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. *Microb. Ecol.* 44, 186–197. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-0001-z>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux,

- J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H.M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P., 2008. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 16731–16736.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Song, S.J., Lauber, C., Costello, E.K., Lozupone, C.A., Humphrey, G., Berg-Lyons, D., Gregory Caporaso, J., Knights, D., Clemente, J.C., Nakielny, S., Gordon, J.I., Fierer, N., Knight, R., 2013. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife* 2013, 1–22.
<https://doi.org/10.7554/eLife.00458>
- Sotos, M., Nadal, I., Marti, A., Mart??nez, A., Martin-Matillas, M., Campoy, C., Puertollano, M.A., W??rnberg, J., Marcos, A., Sanz, Y., 2008. Gut microbes and obesity in adolescents. *Proc. Nutr. Soc.* 67, 11075.
<https://doi.org/10.1017/S0029665108006290>
- Suchodolski, J., Jergens, A., 2016. Recent Advances and Understanding of Using Probiotic-Based Interventions to Restore Homeostasis of the Microbiome for the Prevention / Therapy of Bacterial Diseases. *Microbiol. Spectr.* 4, 1–14.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0025-2015>.Correspondence
- Suchodolski, J.S., 2016. Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *Vet. J.* <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>
- Suchodolski, J.S., 2011. Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: A Bigger World than We Thought. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 41, 261–272.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.12.006>
- 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 Microbiol. Ecol.* 66, 567–578. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x>
- 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 Microbiol.* 9, 210.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-210>
- Suchodolski, J.S., Dowd, S.E., Wilke, V., Steiner, J.M., Jergens, A.E., 2012. 16S rRNA gene pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the Duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One* 7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039333>
- 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. *Vet. Microbiol.* 142, 394–400.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.002>
- 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, P.M., Cann, I.K.O., White, B.A.,

- Fahey, G.C., 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.* 5, 639–649. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.162>
- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L., Gordon, J.I., 2008. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* 3, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M. a, Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–31. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Vilson, Å., Ramadan, Z., Li, Q., Hedhammar, Å., Reynolds, A., Spears, J., Labuda, J., Pelker, R., Björkstén, B., Dicksved, J., Hansson-Hamlin, H., 2018. Disentangling factors that shape the gut microbiota in German Shepherd dogs. *PLoS One* 13, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193507>
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B.J., Koeth, R., Levison, B.S., Dugar, B., Feldstein, A.E., Britt, E.B., Fu, X., Chung, Y.M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J.D., Allayee, H., Tang, W.H.W., DiDonato, J.A., Lusis, A.J., Hazen, S.L., 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472, 57–65. <https://doi.org/10.1038/nature09922>
- Wilson, I.D., Nicholson, J.K., 2017. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Transl. Res.* 179, 204–222. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002>
- Wynn, S.G., 2009. Timely topics in nutrition: Probiotics in veterinary practice. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 606–613. <https://doi.org/10.2460/javma.234.5.606>
- Yatsunenko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>