



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Hundens mikrobiom efter antibiotikabehandling

The canine gut microbiome after antibiotic
treatment

Adam MacCormack

*Uppsala
2019*

Hundens mikrobiom efter antibiotikabehandling

The canine gut microbiome after antibiotic treatment

Adam MacCormack

Handledare: *Erik Pelve, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

Examinator: *Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kursansvarig institution: Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kurskod: EX0862

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: mikrobiom, mikrobiota, tarmbakterier, hund, antibiotikabehandling, antibiotikaresistens

Key words: microbiome, microbiota, dog, canine, antibiotic treatment, antibiotic resistance

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	4
Litteraturoversikt.....	4
Normalfloras sammansättning och funktion	4
Människans mikrobiom efter antibiotikabehandling	5
Hundens mikrobiom efter antibiotikabehandling.....	6
Diskussion.....	7
Litteraturlista.....	11

SAMMANFATTNING

Hundens intestinala mikrobiom är ett komplext samspel av organismer med många viktiga funktioner som är essentiella för djurets välmående på en systemisk nivå. Användning av antibiotika är vanlig vid bakteriella infektioner, men vi vet lite om hur antibiotika påverkar hundens mikrobiom på lång sikt och vad följderna av potentiella störningar i mikrobiomet skulle kunna vara. Målet med denna litteraturstudie är att ta reda på hur mikrobiomets sammansättning förändras hos hund efter en antibiotikabehandling, och vilka hälsoeffekter förändringen skulle kunna leda till. De flesta studier finner att antibiotika kan ge både kortvariga och långvariga förändringar på mikrobiomet, några bakterier återhämtar sig efter en avslutad behandling medan andra ibland inte gör det. Det finns stora individuella skillnader i mikrobiomets sammansättningar hos försöksdjur både före och efter behandlingar, och vissa bakteriegrupper kan reagera helt olika på antibiotika beroende på individ. *Bacteroides spp.* verkar i flera studier ha problem med återhämtning. Generellt verkar antibiotika sänka diversiteten i mikrobiomet, både hos hund och människa, vilket kan kopplas till en ökad risk framförallt för gastrointestinala sjukdomar. Resistensgener hos tarmbakterier kan dessutom finnas kvar under mycket lång tid efter en antibiotikabehandling. En studie hos människor fann resistenta bakterier som uppstod av antibiotikabehandlingen fyra år efter den avslutades; det visar att det inte krävs ett konstant selektionstryck för att resistens ska persistera i tarmen.

Vissa bakterier i *Bacteroides* har immunmodulerande egenskaper och kan vara viktiga för uppkomsten av vissa sjukdomar. I många studier analyseras dock inte förändringar i mikrobiomet på artnivå och det kan vara svårt att dra säkra slutsatser när resultatet enbart nämner förändringar i större bakteriegrupper, som genuset *Bacteroides*. I de flesta studier används fekala prover snarare än direkta prover på tarmslemhinnan för att undersöka tarmens bakteriesammansättning, men en studie visar att effekten av antibiotika är starkare på de fekala proverna än på slemhinneproverna. Detta skulle kunna vara en viktig observation för relevansen av resultaten från flera studier.

Ett av de stora problemen som än så länge är tydligt att se är främjandet av antibiotikaresistens i mikrobiomet. Mikrobiomet agerar med stor sannolikhet som en reservoar av resistensgener och kan bidra till spridning av dem. Detta gäller speciellt för hundar, och andra djur, som bär på resistensgener då det med hanteringen av deras avföring medföljer en risk för en spridning till både människor och andra djur. Det står klart att vår nuvarande okunskap är problematisk ur ett vårdperspektiv med tanke på både resistensutveckling och förändringar i mikrobiomet, som kan vara viktiga faktorer att tänka på. Hunden står levnadsmiljömässigt nära människan och delar stora delar av sitt mikrobiom med oss. Vad vi i framtiden lär oss om antibiotikans effekt på hundens mikrobiom skulle kunna förändra hur vi använder oss av antibiotika.

SUMMARY

The intestinal microbiome of the dog harbours a complex ecosystem of microorganisms and plays an important role in the systemic level health of its animal host. Antibiotics are a common choice of treatment during bacterial infection, but our knowledge of its long-term effects on the microbiome as well as the consequences of the potential disruption it causes is limited. The aim of this literature review is to investigate current available research in order to find out how the composition of the dog microbiome might change after an antibiotic treatment, and to look into what health effects such a change could result in. Most studies find that an antibiotic treatment can cause both short-term and long-term changes to the microbiome, some bacterial groups seem to recover over time while others do not. There are major individual differences in the composition of the microbiome among tested animals both before the treatment is administered and after, and some bacterial groups react differently to antibiotics in different individuals. *Bacteroides* seems to generally struggle with recovery post-treatment. Overall antibiotics tend to lower the diversity of the microbiome, both in animals and humans, which is shown to correlate with gastrointestinal disease. Additionally, resistance genes among intestinal bacteria can remain for a long time after a completed antibiotic treatment. One study on humans was able to detect resistance genes among intestinal bacteria in high amounts four years after antibiotic treatment had been concluded. This shows that resistance in the intestine can persist for a long time even after selection pressure promoting it has ceased.

Some bacteria found within *Bacteroides* possess immunomodulating attributes and may be important in the pathogenesis of certain types of disease. Many studies omit to analyze the microbiome on a species level which can make it hard to draw meaningful conclusions when change is presented solely for larger bacterial groups, such as the genus *Bacteroides*. In most studies fecal samples are preferred over mucosal samples when looking at species composition in the gut, but one study shows that the effects of antibiotic treatment are more pronounced in fecal samples compared to mucosal samples. This could be something to consider when interpreting results of other studies.

A clear problem is the promotion of antibiotic resistance within the microbiome. It is very likely that the microbiome is acting as a reservoir of resistance genes, and is contributing to their spread. This holds especially true for dogs who are carriers of resistant bacteria as the mandatory handling of their feces by owners and practitioners comes with a high risk of spreading resistance. Future research on the effects of antibiotic treatment on the canine microbiome could change how we use antibiotics, but currently our ignorance on the subject is a cause for concern as it may have an important impact on canine health.

INLEDNING

Mikrobiomet i mag- och tarmkanalen består av en mängd mikroorganismer med hög populationsdensitet och stor diversitet. Bakterier utgör den största delen, men det finns vanligen även protozoer och mindre mängder av andra typer av mikroorganismer. Bakteriepopulationerna i tarmen är fördelade efter anatomiska regioner och sammansättningen skiljer sig mellan dem. (Mackie *et al.*, 1999). Mikrobiotan syftar oftast på bakteriepopulationerna. Tarmmikrobiotan anses vara en viktig miljöfaktor med effekter på kroppens metabolism, hjärt- och kärlsjukdomar och hjärnans aktivitet (Lee and Hase, 2014); tarmens mikrobiom har även signifikanta effekter på den anatomiska, immunologiska och fysiologiska utvecklingen hos sitt värdjur. Mikrobiomets inhemska populationer (normalfloran) kan stimulera värdjurets immunsvaret och förhindra att främmande, möjligtvis patogena, mikroorganismer koloniserar tarmen; men även opportunistiska patogener ingår i normalfloran och kan under gynnsamma förhållanden ge systemiska infektioner. Normalfloran kan även syntetisera vitamin K och B komplex, och är viktig ur en nutritionell synpunkt. (Berg, 1996). Vidare kan den, med enzymer som hjälper värdjuret, bryta ner komplexa kolhydrater och även fermentera epitelceller som stöts bort från tarmslemhinnan (Sunvold *et al.*, 1995). Hundar har ett rikt mikrobiom med många olika grupper av bakterier, och signifikanta individuella skillnader i sammansättning som kan påverkas av diet, miljö, ålder och andra individuella faktorer. En hunds mikrobiom är för det mesta stabilt med mindre normala fluktuationer och kan ofta motstå större förändringar vid instabil miljö, som till exempel vid ändring av diet. (Simpson *et al.*, 2002; Suchodolski *et al.*, 2009). Vi vet idag inte mycket om vilken påverkan ändringar av mikrobiomet kan ha på en hund på längre sikt. Mer kunskap om hundens mikrobiom skulle kunna ge upphov till nya sätt att bekämpa sjukdomar och kan ge en bättre, mer omfattande utgångspunkt för att förstå hundens fysiologi.

Antibiotika är antimikrobiella substanser som idag vanligen används för behandling av bakteriella infektioner och även för profylaktisk behandling vid till exempel operation. Trots vår höga användning av antibiotika är det inte ofta man funderar på vilken påverkan det kan ha på tarmmikrobiomet, som till största delen utgörs av bakterier, och i sin tur på patienten. Förutom de fysiologiska effekterna administrering av antibiotika och en följande förändring av mikrobiomet potentiellt skulle kunna medföra är även resistensläget ett växande problem och måste alltid tas i beaktning då antibiotika används. Utvecklingen av nya resistenta stammar är en risk som medföljer varje behandling, även om behandlingen är lyckad och korrekt genomförd, särskilt vad gäller bakterier i tarmmikrobiomet (Carlet, 2012).

Kunskaper om hundens intestinala mikrobiom ligger efter människans, men har på senare tid börjat komma ikapp (Swanson *et al.*, 2011). Det har visat sig att hundar även kan ha en viktig inverkan både på spridningen av vissa zoonoser och på det mänskliga mikrobiomet (Grześkowiak *et al.*, 2015), vilket troligen bidrar till ett ökat intresse.

Det finns fortfarande många obesvarade frågor om mikrobiomets roll hos hundar och ny information publiceras löpande. För att få en bättre inblick i den påverkan antibiotika kan ha på hundens tarmmikrobiom ställs frågorna: Hur påverkas mikrobiomets sammansättning efter en antibiotikabehandling? Vilka långtidskonsekvenser kan en antibiotikabehandling få för resistensläget och funktion hos mikrobiomet? Syftet med denna litteraturstudie är att sammanställa tillgänglig information och försöka besvara dessa frågor.

MATERIAL OCH METODER

För att finna information användes databaserna Google Scholar, Web of Science, Scopus och PubMed. Google Scholar användes mest.

Sökord:

(antibiotic* OR antimicrob*) AND ("gut flora" OR microbiom*) AND (canine OR dog)
(normal OR healthy) AND ("gut flora" OR microbiome) AND (canine OR dog)
(canine OR dog) AND gut (microbiota OR microbiome) AND function

För att hitta ytterligare information användes referenser till funna artiklar.

LITTERATURÖVERSIKT

Normalfloras sammansättning och funktion

Suchodolski *et al.* (2008) har i en studie funnit flera grupper av bakterier i hundens tarm, och bestämde koncentrationen av de olika grupperna i olika delar av tarmen. Med 16S-rRNA-sekvensering kom de fram till en översiktlig sammansättning i tarmen, uppdelat i grupperna: *Firmicutes* (47.7%), *Proteobacteria* (23.3%), *Fusobacteria* (16.6%), och *Bacteroidetes* (12.4%). Fortsättningsvis fann de att *Clostridiales* dominerade i duodenum och jejunum, medan *Fusobacteriales* och *Bacteroidales* var de vanligaste grupperna i ileum och colon.

De kommensala bakterierna som utgör normalfloran underlättar syntes, extraktion och absorption av många olika metaboliter (Lee and Hase, 2014). Glukosupptaget i tarmen är högre med en tarmflora än utan. En studie hos möss visade att möss utan tarmbakterier, där tarmfloran helt hade tagits bort, behövde inta en högre mängd kalorier för att upprätthålla normal kroppsvikt jämfört med möss som hade en normal tarmflora. (Backhed *et al.*, 2004).

Bacteroides thetaiotaomicron är en bakterie som hos människor och möss visats interagera med många metaboliska processer. *B. thetaiotaomicron* producerar flera enzymer för nedbrytning av polysackarider som är unika för den, och underlättar även absorption av näringsämnen som den processar. Den kan reglera signalämnen som produceras av epitelceller och är viktiga för fettinlagring, vilket kan vara en viktig miljöfaktor för fettupptag. (Xu and Gordon, 2003).

Tarmmikrobiotan hos hund kan fermentera kolhydrater, som ingår i hundens diet, men denna process är inte essentiell för hundens energibehov. Mikrobiotan är snarare viktig för hundens gastrointestinala hälsa, och kan vid instabilitet eller dysbios kopplas till en pågående eller kommande inflammation. (Kamada *et al.*, 2013b; Swanson *et al.*, 2011). Den interagerar med immunförsvaret och hjälper till att skydda kroppen från patogener på många sätt. En av mikrobiotans huvudfunktioner är att skydda från kolonisering av patogena bakteriestammar i tarmen, och förhindra en överdriven tillväxt av endogena mikroorganismer som kan orsaka skada i för höga antal. Mikrobiotan åstadkommer detta genom olika mekanismer. Vissa kommensala bakterier, till exempel *Escherichia coli*, kan producera bakteriociner som inhiberar tillväxt av andra närrelaterade bakterier. Mikrobiotan är även viktig för att immunförsvaret ska fungera effektivt, och kan till exempel genom produktion av pro-IL-1 β (en prekursor till en cytokin) hjälpa immunceller att snabbt reagera på hot i tarmen. Andra mekanismer kommensala bakterier uttrycker för att skydda värdjuret från patogent angrepp är lokal pH-reglering, virulensreglering av patogen, och konkurrens av begränsade resurser. Störningar eller låg diversitet i tarmmikrobiotan kan underlätta kolonisering och infektion för patogena bakterier och, beroende på bakterien, leda till gastrointestinala sjukdomar. (Kamada *et al.*, 2013a). Interaktionerna med immunförsvaret är många och mikrobiomet kan ses som en del av en

organism, snarare än något separat. Immunförsvaret är anpassat, delvis av mikrobiotan själv, till att inte reagera på den egna mikrobiotan. Vidare påverkar och styr mikrobiotan immunresponser på en systemisk nivå och kan vid förändring till och med leda till autoimmuna sjukdomar. (Cénit *et al.*, 2014).

Bacteroides fragilis har visats kunna reglera felaktig T-cellsrespons hos människor genom att uttrycka molekyler som kommunicerar med immunsystemet (PSA). Hos möss koloniserade med *Helicobacter hepaticus* visade man att bakterierna inducerade svår kolit, men om mössen även koloniserades med *B. fragilis* som kunde uttrycka PSA blev inflammationen kraftigt reducerad. När kolonisering tillsammans med en stam av *B. fragilis* som inte kunde producera PSA istället prövades sågs inga skyddande effekter. (Mazmanian *et al.*, 2008).

Hundens intestinala mikrobiota har funnits likna människans till en hög grad och skulle kunna användas som en modell för hälsa och sjukdomar hos den mänskliga tarmmikrobiotan (Swanson *et al.*, 2011). Människan bör därför kunna användas för att dra någorlunda relevanta slutsatser om hundens mikrobiom. Människans mikrobiota domineras av *Firmicutes* och *Bacteroidetes* (Gill *et al.*, 2006).

Man fann i en studie på människa ett starkt samband mellan en minskning av bakterier som ingår i *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales* och *Clostridiales* och Crohns sjukdom. Samtidigt sågs en ökning av flera bakteriegrupper, däribland *Enterobacteriaceae*. Man observerade i samma studie ett samband mellan antibiotikaanvändning och förändringar i mikrobiotan. Antibiotika fanns förstärka dysbiosen (den onormala kompositionen av mikrobiotan) och hade speciellt starka effekter på *Bacteroides*, *Clostridiales*, och *Erysipelotrichaceae*. Antibiotikan hade en starkare effekt på de fekala proven än på proverna som togs av tarmmukosan. (Gevers *et al.*, 2014). Man har i flera andra studier funnit samband mellan en minskning av bakteriell diversitet i den intestinala mikrobiotan och Crohns sjukdom (Manichanh *et al.*, 2006; Ott, 2004).

Människans mikrobiom efter antibiotikabehandling

Jakobsson *et al.* (2010) följde förändringar i tarm och -halsmikrobiomet hos tre människor som hade ett magsår eller ett duodenalt sår och behandlades med metronidazol, clarithromycin och omeprazol. Deras förändringar jämfördes med en kontrollgrupp utan behandling som också bestod av tre människor. De fann att *Actinobacteria* minskade kraftigt under behandlingen, och effekten kvarstod tills strax efter avslutad behandling. Den bakteriella diversiteten minskade under behandlingen men återhämtade sig efter avslutad behandling, även om mindre förändringar fortfarande kunde ses en tid efter. Makrolidresistensgener som inte fanns innan behandling kunde hittas i höga kvantiteter upp till fyra år efter avslutad behandling, vilket de menar tyder på en hög nivå av persistens hos makrolidresistenta bakterier.

Resultat från en studie på åtta friska människor visade att en behandling på endast sju dagar med clindamycin ledde till långvariga förändringar i den intestinala mikrobiotan som kunde detekteras upp till två år efter sista dos. Studien fokuserade på *Bacteroides spp.* och använde sig av fekala prover. Diversiteten av bakteriegruppen hos människorna sjönk och den uppvisade kraftigt förhöjda resistensnivåer, jämfört med en kontrollgrupp som inte behandlades alls med antibiotika. Resistensen kunde detekteras i höga nivåer i två år efter avslutad behandling. (Löfmark *et al.*, 2006). I en vidare analys fann de bland annat att hos en individ kunde inte *Bacteroides* återfinnas överhuvudtaget i nio månader efter avslutad behandling. Slutligen säger de att den vida accepterade idén som säger att mikrobiotan återhämtar sig inom några veckor

efter avslutad antibiotikabehandling inte stämmer, och att mer försiktighet bör vidtas vid användning av antibiotika. (Jernberg *et al.*, 2007).

Hundens mikrobiom efter antibiotikabehandling

I en studie av Grønvold *et al.* (2009) undersöktes den fekala mikrobiotan hos sju friska hundar före, under och efter oral amoxicillinbehandling. Hundarna var av tre olika raser (fyra Gordon setter, en blandras och två Whippet) och av olika åldrar, och uppvisade inga tecken på sjukdom under hela försöket. *E. coli* användes som indikatororganism för övervakning av antibiotikaresistens och uppvisade normala resistensmönster hos alla testade hundar före behandling. Resistensmönster bestämdes hos de fyra hundar som var av samma ras och delade hem. Hos en av hundarna (hund 1) förblev resistensmönstret hos testade *E. coli* oförändrat, medan det hos de övriga tre hundarna (hund 2, 4 och 5) uttryckte en förändring efter fyra till sju dagar av behandling. Resistens mot flera antibiotika (tetracyclin, amoxicillin och streptomycin) observerades hos bakterier från alla tre. *E. coli* från två av dessa tre (hund 4 och 5) uttryckte även resistens mot sulfonamider, trimetoprim och gentamicin. Två veckor efter behandlingen hade endast en hund (hund 2) *E. coli* som uppvisade resistens, då mot amoxicillin och streptomycin. Hos de två andra hundarna med bakterier som tidigare uppvisade resistens hade resistensmönstren återgått till samma som innan behandling.

I studien gjordes även analyser av förändringen och variationen hos bakteriepopulationer i hundarnas feces. Prover innan amoxicillinbehandlingen som analyserades med gelelektrofores visade på att varje hund hade en unik populationssammansättning och att den varierar mer mellan olika hundar än den varierar över tid i en individ. Fem hundar (hund 1-5) visade gemensamma tendenser till förändring av populationssammansättning efter behandling jämfört med före. En hund (hund 5) hade kraftiga förändringar efter tre dagar av behandling, och uppvisade efter fem behandlingsdagar en ny populationssammansättning som skiljde sig både från den innan behandling och den som uppstod tidigare under behandlingen. Populationssammansättningen hos hunden höll sig efter denna förändring oförändrad under resten av behandlingen och minst 14 dagar efter behandlingen avslutades. Resten av hundarna (hund 6-8) hade en låg variation i populationsammansättning och man kunde inte dra någon slutsats om behandlingens påverkan hos dem. Förändringarna som påvisades hos hund 5 med gelelektrofores analyserades vidare genom sekvensering av några band från gelen, för att se vilka bakterier det var som ökade och vilka som försvann. *Bacteroides*, som består av gram-negativa bakterier, och *Anaerobiospirillum succiniciproducens* representerades av banden som försvann under behandlingen. Ett band som tolkades som svagare under behandlingen matchade *Bacteroides coprophilus* till 92%. Alla nya band som uppkom och de band som tolkades som starkare tillhörde *Enterobacteriaceae*, en gram-negativ bakteriefamilj. Ett band som till 99% matchade *Fusobacterium russii*, en gram-negativ anaerob, verkade vara opåverkat av amoxicillinbehandling. För ytterligare information användes även en qPCR-metod som mäter koncentrationen av specifikt valda bakteriegrupper. Denna metod användes för analys av prover från tre hundar (hund 1, 2 och 5). Resultaten visade att mängden *E. coli* ökade i närvaro av amoxicillin hos alla tre hundar, medan *Enterococcus* ökade hos två av hundarna. *Lactobacillus* höll sig mer eller mindre oförändrad hos alla tre hundar, men mängden *Bacteroides*-lika, *Campylobacter* och *Clostridium perfringens*-lika grupper minskade hos två av hundarna. Under perioden 5-7 dagar av behandling ökade *Campylobacter* hos två av hundarna. En vecka efter avslutad behandling minskade *Enterococcus* till en lägre nivå än innan behandling hos alla tre hundar, medan *E. coli* och *Campylobacter* minskade hos två av dem. *Bacteroides*-lika och *C. perfringens*-lika bakterier ökade hos två av hundarna efter behandlingen avslutats. Den *Lactobacillus*-lika gruppen hade ökat markant en vecka efter amoxicillinet togs bort hos en av hundarna (hund 1, den yngsta) medan gruppen ökade betydligt

mindre hos de andra två hundarna. *Bacteroides*-lika gruppen ökade inte alls hos den yngsta hunden, medan den ökade till liknande eller högre nivåer än innan behandling hos de äldre hundarna.

En annan studie, av Suchodolski *et al.* (2009), undersökte effekten av tylosinbehandling på den jejunala mikrobiotan hos fem Beaglehundar. Prover av jejunal mukosa togs, via jejunala fistlar som redan fanns på hundarna, dag 0, dag 14 och dag 28 efter påbörjad behandling. Behandlingen pågick i 14 dagar. Studien kom fram till att den mikrobiella diversiteten överlag minskade, endast två av hundarna hade återfått en diversitet som liknade den innan behandling efter 28 dagar. Det fanns individuella skillnader för variationen inom vissa bakteriegrupper, till exempel för gruppen *Bacillales* som ökade hos två hundar och minskade hos tre hundar. Flera bakteriegrupper minskade under behandlingen, till exempel *Fusobacteria* och *Bacteroidales*, medan andra ökade, till exempel *Enterococcus*-lika bakterier och *Pasteurella spp.* Proportionen av *E. coli*-lika bakterier hade vid dag 28 ökat, vilket inte är förvånande då *E. coli*-gruppen är naturligt resistent mot tylosin (Suchodolski *et al.*, 2009). Flera bakterietaxa minskade och hade inte återhämtat sig till dag 28, bland dessa var *Prevotellaceae*, *Streptomyces spp.*, *Spirochaetes* och *Helicobacteriaceae*. Vissa bakteriegrupper som förväntades vara känsliga mot tylosin observerades öka, hos en av hundarna ökade mängden *C. perfringens* kraftigt till dag 14. Ökningen av *C. perfringens* hos denna hund antogs bero på resistens. Den generella ökningen av *Pasteurella spp.* var oväntad och svår att förklara. Förändringarna i mikrobiotan observerades inte leda till någon kortsiktig tarmsjukdom hos hundarna.

I sin diskussion nämner Suchodolski *et al.* (2009) att mikrobiotans förändringar överlag skedde i enlighet med tre olika mönster: bakteriegrupper vars proportion minskade till dag 14 men återhämtade sig till dag 28, bakteriegrupper vars proportion minskade till dag 14 och sedan inte återhämtade sig till dag 28, och bakteriegrupper vars proportion ökade till dag 14 men minskade tillbaka till grundnivån till dag 28.

I vilken mån resistent bakterier kan etablera sig i närvaro av antibiotika har också undersökts. Kolonisering och persistens av resistent bakteriestammar i tarmmikrobiotan underlättas av en pågående antibiotikabehandling, detta visades i en studie av Trott *et al.* (2004). De använde sig av 16 blandrashundar för att undersöka hur koloniseringsgraden av en stam *E. coli* med resistens mot tredje generationens cefalosporiner och flourokinoloner (MDREC) skiljer sig mellan en grupp som står på oral enrofloxacinbehandling (grupp A) och en grupp som inte gör det (grupp B), genom fekala prover. Behandlingen pågick i 21 dagar. Efter tre dagar av behandling hade mängden fekala coliformer minskat till en nivå lägre än den lägsta detekterbara hos behandlingsgruppen. Hundarna i båda grupperna hade givits en dos av buljong med MDREC-bakterier i sitt foder efter sju dagar av behandling. Hundarna i den grupp A hade efter detta signifikant mer MDREC-bakterier än hundarna i grupp B, och bakterierna kunde dessutom uppmätas i feces under en längre tid hos grupp A (26.8 ± 10.5 dagar) än grupp B (8.5 ± 5.4 dagar).

DISKUSSION

I studien av Grønvold *et al.* (2009) sågs relativt tydliga resultat vad gäller utvecklingen av resistens hos *E. coli* i tarmmikrobiotan hos hundarna som behandlades. Resistens mot flera antibiotikagrupper utvecklades snabbt till detekterbara nivåer hos åtminstone tre av hundarna. Trots att det bara var amoxicillin som gavs uppvisade bakterierna, förutom amoxicillinresistens,

resistens även mot streptomycin, tetracyklin, sulfonamider, trimetoprim och gentamicin. Denna utbredda resistensutveckling är intressant och skulle kunna bero på till exempel korsresistens. Det är även möjligt att resistensgenerna redan fanns i miljön eller direkt i mikrobiomet, och det bara krävdes ett ringa selektionstryck för att flera grupperade resistensgener skulle uttryckas. Resistensgener kan överföras från bakterie till bakterie via konjugation, och denna process kan induceras eller underlättas av antibiotika (Jutkina *et al.*, 2018). *Enterobacteriaceae* ökade enligt gelelektroforesen, som analyserar RNA för både artbestämning och kvantifiering, då band som representerade gruppen ökade i intensitet. Det är ett tecken på att det finns resistens inom gruppen (där *E. coli* ingår), eftersom det förklarar ökningen och anses troligt. Extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) producerande *Enterobacteriaceae* är relativt vanliga och hund är en trolig reservoar (Hordijk *et al.*, 2013), så det är inte förvånande att resistens snabbt verkar ha uppstått.

Studien av Grønvold *et al.* (2009) fastställer även att amoxicillinbehandling kan ge signifikanta förändringar på sammansättningen av den fekala mikrobiotan hos hundar, och att förändringarna kan skilja sig stort mellan olika individer. Grupperna som minskade efter behandlingen och inte återhämtade sig fullständigt inom en vecka var *Enterococcus* (hos alla), *E. coli* och *Campylobacter* (hos två), och *Bacteroides* (hos den yngsta). Minskningen av *E. coli* leder till en ökad infektionskänslighet från virulenta varianter av *E. coli* då normala tarmbakterier, som tidigare nämnt, konkurrerar med närbesläktade arter. En minskning av *Bacteroides* skulle kunna leda till en ökad risk för inflammatoriska sjukdomar. Detta baserat på sambandet som observerats hos människa mellan en minskning av *Bacteroidales* (där *Bacteroides* ingår) och Crohns sjukdom, och på de immunomodulerande egenskaperna *B. fragilis* har uppvisat hos människor. Det är dock mycket svårt att dra relevanta slutsatser till vad en minskning specifikt av dessa grupper skulle kunna innebära då de innehåller en stor mängd olika bakteriearter med unika egenskaper. För en klarare bild krävs en bestämning av mikrobiotans förändringar på artnivå.

Studien av Suchodolski *et al.* (2009) testade tylosin, som är en makrolid. I denna studie kollade man inte på resistensutveckling, utan fokuserade endast på bakteriella förändringar i mikrobiotan. De grupper som efter behandling inte återhämtade sig var *Prevotellaceae*, *Streptomyces spp.*, *Spirochaetes* och *Helicobacteriaceae*. En minskning av en apatogen art inom en av dessa grupper skulle kunna leda till att kolonisering av en patogen art underlättas, då den likartade konkurrensen som skulle ha funnits mellan dem försvinner. Även här är det svårt att dra tydliga slutsatser, mycket lämnas till framtida forskning och djupare analyser av data som finns tillgänglig.

Gemensamt för resultatet av studierna om antibiotikans påverkan verkar vara en generell minskning i bakteriell diversitet, med några bakteriegrupper som får svårare att återhämta sig än andra. Vilka långtidseffekter dessa förändringar faktiskt kan leda till är i nuläget oklart då forskning saknas, men baserat på litteraturstudien går det att dra några spekulativa slutsatser. En minskning i tarmmikrobiotans diversitet gör att patogena bakterier lättare kan kolonisera tarmen och orsaka gastrointestinala sjukdomar (Kamada *et al.*, 2013a), och har även kopplats till Crohns sjukdom (Manichanh *et al.*, 2006; Ott, 2004). Om det bevisas att antibiotikabehandling kan bidra till en ökad risk för detta kan det vara av hög relevans för den kliniska användningen av antibiotika, då man bestämmer vilken antibiotika som är lämplig. Antibiotika för att behandla dysbios är också en möjlighet för behandling av sjukdomar där dysbios är en fastställd orsak, även om det i flera fall råder osäkerhet om dysbios korrelerar till eller orsakar sjukdom (Kamada *et al.*, 2013b; Minamoto *et al.*, 2014). En sådan behandling skulle behöva vara konstruerad så att den inte oavsiktligt stör mikrobiotan ytterligare. Tylosin kan till exempel användas för att behandla en typ av diarré hos hund, det är

dock oklart vad som orsakar sjukdomen och genom vilken verkningsmekanism tylosin behandlar den (Kilpinen *et al.*, 2011). Man vet inte etiologin till sjukdomen.

Persistensen hos antibiotikaresistenta bakterier i tarmen är en anledning till oro, och det finns forskning som diskuterar hur resistens kan kvarstå under lång tid i miljön. Antibiotikaresistenta bakterier kan selekteras för i miljön vid mycket låga koncentrationer av antibiotika och resistensmutationerna kan kvarstå även långt efter att selektionstrycket av antibiotika avlägsnats, skriver Andersson och Hughes (2014) i sin artikel. En resistensmutation för ofta med sig en kostnad som gör att bakterien blir sämre på att konkurrera mot andra bakterier, en lägre fitness-nivå. Men detta behöver inte alltid vara fallet, då en resistensmutation kan finnas i stort sett utan att påverka fitness-nivå (Andersson and Hughes, 2010). Bakterierna i mag - tarmkanalen är givetvis inget undantag, detta talar ytterligare för risken att resistensgener länge kan finnas kvar i mikrobiotan efter en antibiotikabehandling. Studien på människor av Jakobsson *et al.* (2010) hittade resistensgener fyra år efter behandling, något som stärker detta resonemang. I studien av Löfmark *et al.* (2006) uppvisar de resistenta bakterierna också en hög nivå av persistens, något som de i sin diskussion nämner kan bero på en anpassad eller opåverkad fitness-nivå. I studien av Trott *et al.* kan persistensen av MDREC-bakterierna hos hundarna som behandlades med enrofloxacin antas bero på en svagare (och mindre varierad) normalflora, vilket tillät dem att kolonisera tarmen till en högre grad. Risken för fekal spridning av resistens i klinisk miljö kan antas vara högre på ett djursjukhus än på ett humant sjukhus, då hygienåtgärder är svårare att lära till djur än människor, varför hundar som bär på resistensgener kan vara extra problematiskt. Resistensgener skulle kunna spridas från bärarna till både djurvårdspersonal och andra patienter, där de kan vara mycket persistenta.

Något annat som är relevant att diskutera är antalet försöksdjur (eller människor) som vanligtvis verkar användas i denna typ av försök. Generellt verkar det vara mycket små försöksgrupper, ofta under tio subjekt. Små försöksgrupper har en högre risk att ge resultat som inte är representativa för en större population, och ger inte lika tillförlitliga resultat som en motsvarande större grupp. En stor försöksgrupp skulle kunna anses som särskilt viktig i studier om mikrobiomet då det finns så mycket som kan skilja sig mellan individer, miljö (bland annat mikrobiomets startkomposition) och genetiska förutsättningar (immunförsvarsinteraktioner och liknande) kan påverka resultat. Tidsramen på studierna kan också ses som bristande om man vill kunna dra slutsatser för långtidskonsekvenser. För hundstudierna var den längsta tiden som gick mellan en avslutad antibiotikabehandling och sista analys av mikrobiotan 41 dagar, då i studien av Trott *et al.* (2004) där man endast kollade på persistens hos en resistent bakteriestam.

I de ovannämnda studierna användes främst två olika provmetoder för att analysera effekterna av behandling. Den mer invasiva metoden som användes var direkta prover av tarmmukosan. Den andra, mer indirekta, metoden som användes var fekala prover; denna metod var också den vanligare metoden då den är mindre invasiv. Resultatet från de fekala proverna antogs åtminstone till viss del kunna indikera förändringar även högre upp i tarmen. Som nämns i litteraturoversikten verkar antibiotika påverka sammansättningen hos de fekala proverna till en större grad än hos tarmmukosaproverna, vilket är något som måste tas i åtanke vid dessa typer av studier. Om detta är viktigt för de slutsatser som drogs i påverkade studier är osäkert, men det är en definitiv risk för misstolkande av resultat som måste tas i beaktning. Även analyseringsmetod för proverna kunde skilja sig, med olika metoder som PCR, gelelektrofores och plattodlingar. Varje metod har egna brister och ger systematiska bias för vilka bakterier som kan identifieras, till exempel går inte alla tarmbakterier att odla och man får en misrepresentation av mikrobiotans sammansättning om man enbart utgår från plattodlingar (Suchodolski *et al.*, 2008). Hantering av proverna och tid mellan provtagning och analys kan även spela en stor roll, då både aeroba och anaeroba ska testas (Suchodolski *et al.*, 2008).

Olika metoder passar olika väl beroende på vad studien vill undersöka. För att få ett så säkert och fullständigt resultat som möjligt krävs en kombination av undersökningsmetoder, och en medvetenhet om bristerna som varje metod har.

Ingen studie som presenterats går igenom hela mikrobiomet på artnivå, vilket också påverkar vilka slutsatser man kan dra. Det kan finnas många olika bakterier inom en taxonomisk grupp med helt olika betydelser för mikrobiomet och sin värd. I studien av Grønvold *et al.* (2009) kollar man på flera genus och några få arter, vilket är relativt små grupper. I studien av Suchodolski *et al.* (2008) där man analyserade mikrobiometets sammansättning kollade man främst på klasser och redovisade även vilka fylum som dominerade i olika delar av tarmen. Ett fylum är en mycket övergripande taxonomisk grupp, och en klass är endast ett steg under. Detta bör tas i beaktning när man drar slutsatser om tarmens bakterier.

Efter en antibiotikabehandling verkar alltså mikrobiomet påverkas på ett flertal sätt. Den mest vedertagna slutsatsen är att den bakteriella diversiteten minskar, även på lång sikt, men vilken konsekvens detta kan ha är inte lika välutforskat. Det finns en korrelation mellan en låg bakteriell diversitet (eller dysbios) i tarmen och vissa inflammatoriska sjukdomar, men detta samband har inte någon fastställd kausalitet ännu. Det är oklart om dysbios orsakar eller orsakas av dessa sjukdomar. Antibiotikaresistens har påvisats kunna uppstå och persistera under lång tid i tarmen som en konsekvens av antibiotikabehandling. Det ger en stor risk för spridning av resistensen till miljön och även en risk för problem vid en framtida infektion som kräver antibiotikabehandling. Det verkar också som att det finns stora individuella skillnader i hur mikrobiomet reagerar på antibiotika, vilket beror på faktorer som genetik och miljöskillnader. Studier på människor är mer djupgående och har nått en mer ingående nivå av kunskap.

I denna litteraturstudie diskuteras endast kortfattat vad antibiotika kan ha för inverkan på hundens mikrobiom och vilka konsekvenser dessa förändringar kan ha. Det finns fortfarande mycket lite forskning inom området och om vilka specifika hälsoeffekter som kan uppstå hos hund, trots vår extensiva användning av antibiotika för att behandla bakteriella sjukdomar. Mikrobiomet har onekligen visats ha viktiga implikationer för värddjurets hälsa och välmående, och mer kunskap skulle kunna betyda mycket för dagens behandlingsmetoder. Hundens närhet till människan ger ytterligare anledning till varför framtida forskning inom området är viktig och varför vi bör visa ett större intresse för hundens mikrobiom.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Andersson, D.I. & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8 (4), ss. 260–271.
- Andersson, D.I. & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 12 (7), ss. 465–478.
- Berg, R.D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*, vol. 4 (11), ss. 430–435.
- Carlet, J. (2012). The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, vol. 1 (1), s. 39.
- Cénit, M.C., Matzaraki, V., Tigchelaar, E.F. & Zhernakova, A. (2014). Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1842 (10), ss. 1981–1992 (From genome to function).
- Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L.A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S.J., Yassour, M., Morgan, X.C., Kostic, A.D., Luo, C., González, A., McDonald, D., Haberman, Y., Walters, T., Baker, S., Rosh, J., Stephens, M., Heyman, M., Markowitz, J., Baldassano, R., Griffiths, A., Sylvester, F., Mack, D., Kim, S., Crandall, W., Hyams, J., Huttenhower, C., Knight, R. & Xavier, R.J. (2014). The Treatment-Naive Microbiome in New-Onset Crohn's Disease. *Cell Host & Microbe*, vol. 15 (3), ss. 382–392.
- Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M. & Nelson, K.E. (2006). Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*, vol. 312 (5778), ss. 1355–1359.
- Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S. & Salminen, S. (2015). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, vol. 34, ss. 14–23.
- Grønvold, A.-M.R., L'Abée-Lund, T.M., Sørum, H., Skancke, E., Yannarell, A.C. & Mackie, R.I. (2009). Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 71 (2), ss. 313–326.
- Hordijk, J., Schoormans, A., Kwakernaak, M., Duim, B., Broens, E., Dierikx, C., Mevius, D. & Wagenaar, J.A. (2013). High prevalence of fecal carriage of extended spectrum β -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. *Frontiers in Microbiology*, vol. 4. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00242>.
- Jakobsson, H.E., Jernberg, C., Andersson, A.F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J.K. & Engstrand, L. (2010). Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLOS ONE*, vol. 5 (3), s. e9836.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C. & Jansson, J.K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME Journal*, vol. 1 (1), ss. 56–66.
- Jutkina, J., Marathe, N.P., Flach, C.-F. & Larsson, D.G.J. (2018). Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Science of The Total Environment*, vol. 616–617, ss. 172–178.
- Kamada, N., Chen, G.Y., Inohara, N. & Núñez, G. (2013a). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology*, vol. 14 (7), ss. 685–690.
- Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G.Y. & Núñez, G. (2013b). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, vol. 13 (5), ss. 321–335.
- Kilpinen, S., Spillmann, T., Syrjä, P., Skrzypczak, T., Louhelainen, M. & Westermarck, E. (2011). Effect of tylosin on dogs with suspected tylosin-responsive diarrhea: a placebo-controlled, randomized, double-blinded, prospective clinical trial. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 53 (1), s. 26.
- Lee, W.-J. & Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology*, vol. 10 (6), ss. 416–424.

- Löfmark, S., Jernberg, C., Jansson, J.K. & Edlund, C. (2006). Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 58 (6), ss. 1160–1167.
- Mackie, R.I., Sghir, A. & Gaskins, H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 69 (5), ss. 1035s–1045s.
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J. & Dore, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, vol. 55 (2), ss. 205–211.
- Mazmanian, S.K., Round, J.L. & Kasper, D.L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, vol. 453 (7195), ss. 620–625.
- Minamoto, Y., Dhanani, N., Markel, M.E., Steiner, J.M. & Suchodolski, J.S. (2014). Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, vol. 174 (3–4), ss. 463–473.
- Ott, S.J. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, vol. 53 (5), ss. 685–693.
- Simpson, J.M., Martineau, B., Jones, W.E., Ballam, J.M. & Mackie, R.I. (2002). Characterization of Fecal Bacterial Populations in Canines: Effects of Age, Breed and Dietary Fiber. *Microbial Ecology*, vol. 44 (2), ss. 186–197.
- Suchodolski, J.S., Camacho, J. & Steiner, J.M. (2008). Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 66 (3), ss. 567–578.
- Suchodolski, J.S., Dowd, S.E., Westermarck, E., Steiner, J.M., Wolcott, R.D., Spillmann, T. & Harmoinen, J.A. (2009). The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiology*, vol. 9 (1), s. 210.
- Sunvold, G.D., Fahey, G.C., Merchen, N.R., Titgemeyer, E.C., Bourquin, L.D., Bauer, L.L. & Reinhart, G.A. (1995). Dietary fiber for dogs: IV. In vitro fermentation of selected fiber sources by dog fecal inoculum and in vivo digestion and metabolism of fiber-supplemented diets. *Journal of Animal Science*, vol. 73 (4), ss. 1099–1109.
- 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., White, B.A. & Fahey Jr, G.C. (2011). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *The ISME Journal*, vol. 5 (4), ss. 639–649.
- Trott, D.J., Filippich, L.J., Bensink, J.C., Downs, M.T., McKenzie, S.E., Townsend, K.M., Moss, S.M. & Chin, J.J.-C. (2004). Canine model for investigating the impact of oral enrofloxacin on commensal coliforms and colonization with multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 53 (5), ss. 439–443.
- Xu, J. & Gordon, J.I. (2003). Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100 (18), ss. 10452–10459.