



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap**

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap, sektionen för immunologi

Påverkar hundens mikrobiota immunförsvaret och kan det utnyttjas terapeutiskt?

Lovisa Aune

*Uppsala
2016*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2016:5

Påverkar hundens mikrobiota immunförsvaret och kan det utnyttjas terapeutiskt?

Has the canine microbiota any impact on the immune system and can it be used therapeutically?

Lovisa Aune

Handledare: *Caroline Fossum och Magnus Åbrink, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, sektionen för immunologi*

Examinator: *Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2016:5

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

Nyckelord: *mikrobiota, immunologi, immunförsvaret, probiotika, Tregs, Foxp3, IgA, Cd11c*

Key words: *microbiota, immunology, immune system, probiotics, Tregs, Foxp3, IgA, CD11c*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och folkhälsovetenskap, sektionen för immunologi

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

| | |
|--|----|
| SAMMANFATTNING | 1 |
| SUMMARY | 2 |
| INLEDNING | 3 |
| MATERIAL OCH METODER | 3 |
| LITTERATURÖVERSIKT | 4 |
| Mikrobiotans sammansättning hos hund | 4 |
| Immunförsvaret i magtarmkanalen..... | 4 |
| Mikrobiotans påverkan på immunförsvaret hos människa och mus | 5 |
| <i>IgA</i> | 5 |
| <i>Regulatoriska T-lymfocyter</i> | 6 |
| <i>Systemiska effekter</i> | 8 |
| Mikrobiotans påverkan på immunförsvaret hos hund | 9 |
| Immunologiska markörer vid gastroenteropati hos hund | 9 |
| Probiotikas påverkan på immunförsvaret | 10 |
| DISKUSSION | 11 |
| LITTERATURFÖRTECKNING | 14 |

Sammanfattning

En komplex samling av mikroorganismer utgör mikrobiotan i magtarmkanalen. Den består av bakterier, virus, svampar, arkéer och protozoer och har visats ha en viktig roll för värdjurets immunförsvar och hälsa. Ett stort antal studier har undersökt mikrobiotan i allmänhet och bakteriefloran i synnerhet. Tarmens mikrobiota har visats vara svår att studera och de bakterieodlingar som idag används för specifika patogena bakterier är inte lämpliga för tarmens bakterier. Det har länge inneburit att tarmfloran utgjort en outforskad domän men nya metoder gör att vi idag börjar få förståelse för bakterierna i magtarmkanalen. På senare tid har fokus riktats mot denna samling av mikroorganismer bland annat därför att mikrobiotan har visats spela en roll i uppkomsten och utvecklingen av flertalet sjukdomar i magtarmkanalen. Denna påverkan sker bland annat genom att mikroorganismerna inverkar på immunförsvaret hos värdjuret. Genom att tillföra probiotiska bakterier har studier visat att värdjurets immunförsvar kan påverkas vilket öppnar för möjligheten att använda probiotika i behandling av sjukdomar.

Mikrobiotan kan påverka både det medfödda och det adaptiva immunförsvaret men denna litteraturstudie fokuserar på immunoglobulin A (IgA) och regulatoriska T-lymfocyter (Tregs), två komponenter i det adaptiva immunförsvaret som i hög grad samspelar med mikroorganismerna i tarmen. Majoriteten av dagens forskning inom det här området har utförts på mus och människa och när det gäller andra djurslag såsom hund finns det många frågetecken. Intressant är om resultat från studier som utförts på mikrobiotans påverkan på människa och mus är applicerbara på hund. Studier visar att proteinet Foxp3 hos Tregs och integrinen CD11c hos dendritiska celler skulle kunna fungera som markörer på immunologisk tarmsjukdom hos hund och att dessa komponenter har liknande roll i immunförsvaret hos människa och mus. Den här litteraturstudien undersöker därför hur mikrobiotan påverkar de delar av det adaptiva immunförsvaret som används som immunologiska markörer hos hund och jämför det med studier gjorda på människa och mus. Likaså undersöks hur probiotika kan påverka immunförsvaret och om probiotika kan vara ett behandlingsalternativ vid vissa typer av sjukdomar.

Det är viktigt att vara medveten om och ta hänsyn till de artskillnader som finns och kan tänkas finnas när två olika arter jämförs i ett sådant här avseende. Flertalet studier antyder att resultat från en del av den humana och murina forskningen på mikrobiota och immunförsvar i flera avseenden kan appliceras på hund. Det behövs däremot fler studier som undersöker och fastställer vad som gäller för hund men tills dess ger studier gjorda på mus och människa en vägledning i dessa delar av hundens fysiologi och patologi. De studier som har utförts på probiotiska bakterier hos hund visar att flertalet bakteriearter har en positiv inverkan på värdens immunförsvar och hälsa vilket är lovande för användning av probiotika i terapeutiska sammanhang.

Summary

The gut microbiota is composed of a complex community of microorganisms which plays a crucial role in host immunity and health. The microbiota contains bacteria, viruses, fungi, archaea and protozoa and many studies have examined this area and more specifically bacteria in the gastrointestinal tract. Cultivation methods are useful tools when examining specific pathogens but these methods are not always suitable when it comes to the bacteria of the gut microbiota. Not until recently has more suitable tools emerged and progressed our understanding of the intestinal bacterial flora. Lately, there has been a mounting interest in this former unknown world of microbes partly because of their role in the origin and pathogenesis of several gastroenteropathies. This occurs partly through their impact on host immunity mechanisms. Several studies have likewise revealed an influence on the host's immune system by probiotic supplementation which suggests a possible therapeutic use for probiotics.

The microbiota affects both innate and adaptive immunity but this literature study focus on two specific components in the adaptive immune system which highly interact with the microbiota ; immunoglobulin A (IgA) and regulatory T cells (Tregs). The majority of today's studies within this area focus on man and mice and when it comes to other species, such as dogs, much remains to learn. A frequently asked question is if the human and murine studies on microbiota and the immune system could be used as models for canines. Recent studies have shown that Tregs expressing protein Foxp3 and dendritic cells expressing integrin CD11c could be used as immunological markers for inflammatory bowel disease in dogs and this shows similarity to their role in man and mice. This literature study therefore investigates how the microbiota affects those components of adaptive immunity that have been examined as immunological markers in inflammatory bowel disease in dogs and compares this with studies in man and mice. This study also investigates how probiotics may affect host immunity and if it could be a therapeutic alternative in the treatment of certain diseases.

When comparing two different species it is important to be aware of and consider the known and unknown differences between species. Several studies imply that parts of the human and murine research regarding microbiota and the immune system can act as a model in the dog. However, future studies investigating the interplay between canine microbiota and immune system are needed. Until then the existing studies on man and mice give us an insight in and greater understanding of canine immunology and pathology. Canine studies on probiotics prove that several probiotic bacterial strains have a positive impact on host immune system and health which is promising for a possible therapeutic use of probiotics.

INLEDNING

Flera sjukdomar hos hund har sitt ursprung i obalanser i magtarmkanalen och studier pekar nu på att tarmens mikrobiota har större betydelse än vi tidigare trott. Nya studier visar att kroniska enteropatier är kopplade till förändringar i tarmfloran och att även sjukdomstillstånd utanför magtarmkanalen, såsom autoimmuna sjukdomar, kan ha koppling till en förändrad mikrobiota då den samspelar med immunförsvaret (Belkaid & Hand, 2014). Således är det en viktig värld av mikroorganismer som vi nu börjar upptäcka och få förståelse för.

Tarmens mikrobiota är viktig för värddjurets hälsa eftersom den hjälper till vid digestion och metabolism av föda, förser enterocyterna med näring, tillsammans med epitelcellerna utgör en skyddande barriär mot patogener och stimulerar utvecklingen av immunförsvaret. Mikrober metaboliserar avstötta epitelceller, endogent mukus och osmältbara substrat, framför allt komplexa kolhydrater som stärkelse, cellulosa, pektin och fruktan. De fermenterar detta till kortkedjiga fettsyror (SCFAs) som propionat, butyrat och acetat vilka bland annat ger energi till bakteriernas metabolism, epitelcellernas tillväxt (Suchodolski, 2011) och påverkar immunförsvaret (Alexander *et al.*, 2014). Vidare pekar nya forskningsresultat på att tillskott av probiotika kan påverka värddjurets hälsa och immunstatus genom att inverka på tarmfloran (Grzeskowiak *et al.*, 2015) och kan således vara ett komplement i behandling av vissa sjukdomar.

Mikrobiotan påverkar både det medfödda och det adaptiva immunförsvaret hos värddjuret men denna litteraturstudie fokuserar på effekterna på immunoglobulin A (IgA) och regulatoriska T-lymfocyter (Tregs) i det adaptiva immunförsvaret. Det finns idag få studier på kopplingen mellan hundens immunförsvaret och mikrobiota. Då senare forskning på immunologiska markörer hos hundar med inflammatorisk tarmsjukdom (IBD) har visat en koppling till inflammationer i tarmen på liknande sätt som hos människa och mus är det möjligt att hundens immunförsvaret och mikrobiota samverkar på liknande sätt som hos dessa arter. Syftet med den här litteraturstudien är att undersöka hur mikrobiotan påverkar de delar av det adaptiva immunförsvaret som används som immunologiska markörer hos hund och att jämföra det med studier gjorda på människa och mus. Likaså undersöks hur probiotika kan påverka immunförsvaret och om det vid vissa typer av sjukdomar kan vara ett behandlingsalternativ.

MATERIAL OCH METODER

Litteraturstudien har utgångspunkt i vetenskapliga artiklar som erhållits genom sökningar i huvudsakligen databaserna PubMed och Web of Science. Ett urval av de sökord som använts enskilt och i kombination för att finna artiklar är microbiota, gut flora, immun*, inflammation, parameter, marker, probiotic*, prebiotic*, dog och canine. Artiklar erhöles likaså genom referenshänvisningarna i de artiklar som hittats vid litteratursökningen. Några artiklar har dessutom tillhandahållits av handledare. Då det utförts omfattande forskning inom detta område har även översiktsartiklar, så kallade "review"-artiklar, använts till litteraturstudien. Arbetet har avgränsats till att innefatta specifika komponenter i det adaptiva immunförsvaret, mikrobiotan i magtarmkanalen och probiotikas påverkan på immunsystemet.

LITTERATURÖVERSIKT

Mikrobiotans sammansättning hos hund

En komplex samling av mikroorganismer utgör mikrobiotan i magtarmkanalen. Den består av bakterier, virus, svampar, arkéer och protozoer och har visats spela en viktig roll för värdjurets immunförsvar och hälsa. Mikrobiotan innefattar ungefär 10^{10} till 10^{14} mikroorganismer, vilket är omkring 10 gånger mer än antalet celler som bygger upp värdjurets kropp.

Bakteriefloran i magtarmkanalen har visats vara svår att studera. Bakterieodlingar som används för specifika patogener är inte lämpligt att använda för tarmens mikrobiota. Numera används molekylära tekniker för att undersöka tarmfloran, till exempel PCR-amplifiering av 16S rRNA-genen (Suchodolski, 2011). På senare tid har oftast kvantitativ PCR (qPCR) och "fluorescence in situ hybridization" (FISH) använts som är känsligare än de gelbaserade teknikerna som tidigare använts. Begränsningen med qPCR och FISH är att de enbart får fram data på ett fåtal specifika bakteriegrupper. Nyligen har DNA-sekvensering som använder automatiserade "high-throughput sequencing platforms" kunnat ge mer information om tarmens mikrober (Hooda *et al.*, 2012).

I magsäcken finns ett bakterieantal på mellan 10^1 och 10^6 cfu/g magsäcksinnehåll. Mängden bakterier i duodenum och jejunum är relativt liten, vanligtvis 10^5 cfu/ml innehåll men kan vara högre hos vissa hundar. Distala delen av tunntarmen, t.ex. ileum, innehåller 10^7 cfu/ml och en större mångfald av bakterier än proximala delen. I kolon finns så mycket som 10^9 till 10^{11} cfu/g tarminnehåll och merparten av dessa utgörs av *Enterobacteriaceae* och genus *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus* och *Bifidobacterium*.

Mer än 99 % av mikrobiotan hos hund utgörs av fyra *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* och *Actinobacteria*. Resterande del av bakteriefloran i tarmen utgörs av *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi* samt några oklassificerade mikrober. Aerober och fakultativa anaerober finns generellt mest i tunntarmen och anaerober mest i tjocktarmen. I magsäcken finns övervägande *Helicobacter* spp. men här ses även genus *Lactobacillus*, *Streptococcus* och *Clostridium*. I hundens tunntarm finns runt 10 olika fyra och de övervägande bakteriegrupperna där är *Clostridia*, *Lactobacillales* och *Proteobacteria*. Vanligast i tjocktarmen är *Bacteroides* spp. och fyra *Firmicutes* och *Fusobacteria*. Detta har dock skilt sig åt mellan olika studier vilket skulle kunna bero på skillnader i metoder som använts. Bakterier är de mest studerade medlemmarna i mikrobiotan men nyligen har en stor mångfald bland virus upptäckts och merparten av dessa är bakteriofager (Suchodolski, 2011).

Immunförsvaret i magtarmkanalen

Den lymfatiska vävnaden som är kopplad till magtarmkanalen består av peyerska plack i tunntarmen, lymfoida folliklar i hela magtarmkanalen, mesenteriska lymfknutor och lamina

propria (LP). En av de viktigaste skyddsmekanismerna mot patogener och opportunistiska kommensaler är produktion av IgA i mukosan.

B-lymfocyter producerar IgA och för att göra detta måste de genomgå två steg: somatisk hypermutation och rekombination med klassswitch. IgA utsöndras i dimer form vilket innebär två IgA sammanbundna med en J-kedja som dessutom är skyddade av en sekretorisk komponent. Antikroppen hindrar patogener att ta sig över epitelcellerna och håller mikrobiotans sammansättning optimal för tarmhälsan.

I Peyerska plack utsöndrar dendritiska celler (DCs), som kommit i kontakt med antigen, IL-6 så att B-lymfocyter genomgår switch och börjar producera IgA. Follikulära T-hjälparceller (fTh) hjälper till med det genom att uttrycka CD40-ligand vilket interagerar med CD40 på B-lymfocyter som därefter genomgår switch till IgA. fTh uttrycker dessutom retinoinsyra som tillsammans med "transforming growth factor β " (TGF- β) inducerar fThs att differentiera främst till Tregs. B-lymfocyten tar sig sedan till närmaste mesenteriska lymfknuta där den får "homing"-integriner och slutligen återvänder till LP i tarmen för att där producera IgA.

I isolerade lymffolliklar och LP sker en T-lymfocytsberoende switch genom att B-lymfocyterna interagerar mer direkt med mikrobiotan. DCs i LP svarar på "microbe-associated molecular patterns" (MAMPs) på mikroorganismer genom att binda till dessa med "pattern-recognition receptors" (PRRs), som Toll-likareceptorer (TLRs), och receptorer för "nucleotide-binding oligomerization domain" (NOD). När TLRs binder till MAMPs påbörjas en intracellulär signalväg som slutligen aktiverar transkriptionsfaktorn NF κ B. Aktiverade DCs utsöndrar bland annat B-lymfocytsaktiverande faktor och proliferationsinducerande ligander som tillsammans med inducerbart kväveoxidsyntas leder till IgA-switch hos B-lymfocyter (Allenspach, 2011).

IgA stannar i mukosans immunsystem och därigenom undviks ett systemiskt svar på tarmbakterierna (Alexander *et al.*, 2014). Mukosans IgA-svar saknar karakteristika för klassiskt minne och kan därmed svara på de ständiga förändringarna i kommensalernas sammansättning (Belkaid & Hand, 2014).

Mikrobiotans påverkan på immunförsvaret hos människa och mus

IgA

Polymeriska IgA binder till polyimmunoglobulinreceptorn (pIgR) på epitelceller för att tas upp i cellen och efter att ha interagerat med den sekretoriska komponenten blir komplexet transporterat ut i tarmlumen som sekretoriskt IgA (SIgA). SIgA är viktigt för att förmedla tarmens mikrobiotainnehåll till immunförsvaret (Alexander *et al.*, 2014), påverka kommensalernas genuttryck och förhindra bakteriernas adhesion till epitelet (Belkaid & Hand, 2014). När SIgA binder till och bildar komplex med kommensaler kan den ta sig från lumen till mukosan genom att binda till en specialiserad IgA-receptor på microfoldceller (M-celler). SIgA presenterar därefter bakteriedelarna för toleransinducerande DCs, som uttrycker bland annat integrinen CD11c, vilka börjar producera IL-10 och har en benägenhet att inducera IgA-switch hos B-lymfocyter i Peyerska plack.

IgA-svar är beroende av de bakteriearter som finns närvarande i tarmen vilket tyder på informationsöverföring mellan IgA och mikrobiotan. Homeostasen med mikrobiotan upprätthålls av IgA genom att begränsa exponeringen för det systemiska immunförsvaret. IgA-svaret har en hög induktionströskel på ungefär 10^9 bakterier och är ett svar som börjar långsamt och är långlivat. Allt detta tyder på att IgA är en antiinflammatorisk antikropp som upprätthåller symbios med mikrobiotan snarare än att sätta igång immunsvaret mot den (Alexander *et al.*, 2014).

Regulatoriska T-lymfocyter i magtarmkanalen förser IgA^+ B-lymfocyter i mukosan med viktiga överlevnadsfaktorer (Alexander *et al.*, 2014). Tregs karakteriseras av att de uttrycker CD4, CD25 och transkriptionsfaktorn Foxp3 (Junginger *et al.*, 2012). Aktiverade Tregs har setts inducera B-lymfocyters switch och produktion av IgA *in vitro*. Vid reduktion av Tregs blir produktionen av IgA i tarmen avsevärt försämrad men den blir helt återställd vid transfer av aktiverade Tregs till möss med defekt T-lymfocyt-receptor. Det visar att Tregs verkar tillsammans med IgA^+ B-lymfocyter i mukosan för att inhibera värdens inflammatoriska svar och bibehålla magtarmkanalens mikrobiota, som i sin tur skyddar värden mot patogener (Alexander *et al.*, 2014).

Regulatoriska T-lymfocyter

De flesta aktiverade eller minnes- T-lymfocyter finns i vävnader som normalt är koloniserade av kommensaler, som hud och magtarmkanal. Idag anses en grundläggande avkänning av kommensaler spela en viktig roll i homeostasen medan aktiva svar mot tarmfloran associeras med patogener. Kommensalerna är viktiga för induktionen av regulatoriska svar. En central del i det regulatoriska svaret är perifer immunologisk tolerans och den kan inte etableras i frånvaro av signaler från tarmfloran. Immunologisk tolerans uppnås troligen via flertalet mekanismer och en av dessa är Tregs. Tregs kan uppkomma som differentierade celler från tymus (tTregs) eller från magtarmkanalen (iTregs) som svar på oralt antigen. Optimal tolerans mot antigener från kommensaler och omgivning uppnås genom den kombinerade effekten av Tregs inducerade från tymus och magtarmkanalen. (Belkaid & Hand, 2014).

Transkriptionsfaktorn Foxp3 är viktig för differentieringen av Tregs. Foxp3 kan induceras i tymocyter som svar på IL-2 och stimulering av T-lymfocyt-receptorn (TCR) och CD28. Den kan även uppregleras vid stimulering av TCR hos mogna $CD4^+$ T-lymfocyter i periferin i närvaro av TGF- β . CNS1 är en för Foxp3-transkription förstärkande gensekvens som är nödvändig för induktion av iTregs men som inte har betydelse för differentiering till tTregs eller upprätthållande av Foxp3-uttryck. Inflammatoriska cytokiner och kostimulatoriska signaler motverkar induktion av Foxp3 medan vitamin A-metaboliten retinoinsyra leder till ökad induktion av Foxp3. I en studie av Josefowicz *et al.* (2012) utvecklade möss med defekta iTregs uttalade patologiska förändringar associerade med T-hjälparcell 2 (Th2) i mukosan, såsom allergisk inflammation. I försöket visades brister i iTregs även förändra mikrobiotans sammansättning. En markant ökning av fylum *TM7* och *Alistipes* spp. i fylum *Bacteroidetes* och en minskning i förhållandet mellan *Firmicutes* och *Bacteroidetes* sågs hos dessa möss. Vidare såg Josefowicz *et al.* (2012) att tTregs i stort sett är tillräckliga för att

kontrollera tolerans mot kroppsegna antigen medan iTregs funktion troligen är att kontrollera inflammation i mukosan, som är mest utsatt för exogena substanser. Defekta iTregs resulterar alltså i en felreglering i immunförsvaret och Th2-medierad inflammation i tarmen vilket leder till störningar i mikrobiotan (Josefowicz *et al.*, 2012).

Något som visar på kommensalernas skyddande roll är att det i tarmen krävs kommensal aktivering av TLR för att främja vävnadsreparation och värdens överlevnad. Produkter från kommensaler kan verka genom att direkt eller indirekt kontrollera funktionen hos inflammatoriska celler. Ett exempel är att igenkännandet av kommensalers SCFAs är avgörande för regleringen av inflammation till följd av skada i tarmen och även i modeller av artrit och allergi (Belkaid & Hand, 2014). En del av de Tregs som induceras i kolon är specifika för kommensala antigen vilket visar att mikrobiotan är viktig för denna induktion och för kontrollen av homeostas i mukosan. Kommensaler kan även kontrollera DCs orala antigensampling i mukosan och i LP främja induktion av makrofager som är associerade med lokal tillväxt av Tregs. Indirekt kan mikrobiotan påverka initiering av oral tolerans genom att de kommensalspecifika Tregs som inducerats kan främja B-lymfocytens switch till IgA på ett antigenspecifikt vis (Belkaid & Hand, 2014).

Polysackarid A (PSA) produceras av en symbiotisk bakterie vid namn *Bacteroides fragilis* och har i ett försök visats skydda möss från kolit inducerad av *Helicobacter*, en kommensal med patogen potential, genom att inducera produktion av IL-10 och TGF- β 2 hos Foxp3⁺ Tregs. *B. fragilis* kunde i studien främja Tregs funktion och induktion genom att med PSA aktivera TLR2 uttryckt på T-lymfocyter och därigenom framkalla tolerans i mukosan (Round & Mazmanian, 2009). Istället för att inducera inflammatoriska svar dämpar följaktligen PSA från *B. fragilis*, genom induktion av Tregs, produktion av proinflammatoriska IL-17 för att bakterien ska kunna kolonisera kolons kryptor (Alexander *et al.*, 2014).

Nya upptäckter visar att också många andra mikroorganismer kan öka frekvensen av Tregs i kolon. En av de många mikrober som kan främja ackumulering av Tregs är *Clostridium*. Det gör bakterien genom att bland annat skapa en miljö rik på TGF- β . För en optimal induktion krävs dock den synergistiska effekten av flera klostridiumsorter då individuella arter endast har ringa effekt på immunförsvaret (Belkaid & Hand, 2014). I en studie av Atarashi *et al.* (2011) visade möss som är helt fria från mikroorganismer (GF-möss) och antibiotikabehandlade möss en signifikant minskning av Foxp3⁺ Tregs i kolons LP jämfört med möss med normal tarmflora som är fria från specifika patogener (SPF-möss). Vidare intog GF-möss i försöket avföring från möss innehållandes *Clostridium* och uppvisade då en kraftig ansamling av Tregs i kolons LP (Atarashi *et al.*, 2011). I en annan studie av GF-möss inducerades en kraftig ackumulation av Tregs i kolon vid kolonisering av en mix innehållandes 17 klostridiumarter. Även kolonisering av en enda eller upp till 5 olika arter från *Clostridia* ledde till en ökning av Tregs men inte i samma omfattning som vid mixen med 17 arter (Atarashi *et al.*, 2013). Det visar att bakteriearter sannolikt samarbetar för att inducera skyddande svar.

Exakt hur *Clostridia* inducerar Tregs är oklart men troligt är att bakteriemetaboliter som SCFAs medverkar till svaret. När man i ett försök gav möss acetat i dricksvatten skyddades de mot kolit och detta skedde genom att aktivera SCFA-receptorn (GPR43) på medfödda immunceller vilket har visats inducera Tregs i mukosa (Alexander *et al.*, 2014). I en studie av Arpaia *et al.* (2013) sågs likaså butyrat och propionat öka extratymisk CNS1-beroende differentiering av Tregs. Systemisk administration av butyrat var i försöken tillräckligt för att inducera extratymiska Tregs medan induktion av Tregs i kolon var beroende av lokal administration. SCFAs aktivering av GPR43 har visats vara tillräcklig för att inducera inhibering av histondeacetylas (Alexander *et al.*, 2014). Genom att inhibera histondeacetylaser reglerar butyrat genuttryck epigenetiskt och denna egenskap är en möjlig mekanism för ökad proliferation av Tregs i kolon (Belkaid & Hand, 2014). Arpaia *et al.* (2013) gav i ett försök butylerad stärkelse till möss som tidigare antibiotikabehandlats vilket resulterade i ökat antal Tregs i kolon jämfört med kontrollgruppen som gavs stärkelse. Även mängden intracellulärt Foxp3-protein per cell ökade både hos möss med och utan defekt i CNS1. Det tyder på att butyrat förutom att öka Foxp3⁺ Tregs även stöder redan existerande populationer av Tregs genom att stabilisera uttrycket av Foxp3-protein (Arpaia *et al.*, 2013).

Balans av regulatoriska T-lymfocyter och T-effektorlymfocyter

T-effektorlymfocyter (Teffs) verkar proinflammatoriskt i tarmen och de regulatoriska T-lymfocyterna reglerar bland annat detta inflammatoriska svar. En balans av dessa immunceller är därmed viktig för ett välfungerande immunsystem. Studier visar att kommensalers DNA påverkar balansen av Teffs och Tregs i tarmen via en TLR9-beroende mekanism. TLR9-defekta möss har en minskad frekvens av Tregs och minskad produktion av interferon γ (IFN- γ) och IL-17 av Teffs i tunntarmens LP. Denna skillnad ses inte i kolons LP vilket visar att den T-lymfocytreglerande signaleringen genom TLR9 är platsspecifik. Även TLR5-s signaler påverkar troligen balansen av Tregs och Teffs eftersom de setts stimulera Teffs och minska Foxp3⁺ Tregs *in vitro*. Då intestinala DCs uttrycker TLR5 i mycket högre grad än DCs i mjälten är TLR5 troligen en viktig väg för mikrobiella signaler och balans av immunceller i magtarmkanalen. Specifika DCs inducerar IL-23 när de känner av flagellin vilket också kan bidra till Tregs-Teffs-balansen eftersom IL-23 stimulerar utvecklingen av Th17 till effektorcell och har visats nedreglera Tregs (Alexander *et al.*, 2014).

Systemiska effekter

Förändringar i mikrobiotan påverkar inte enbart lokalt immunförsvar i tarmen utan också immunreaktioner i andra vävnader och organ. Behandling med bredspektrumantibiotika har visats minska antalet mikrober i magtarmkanalen vilket resulterade i trubbiga T- och B-lymfocytssvar mot intranasal influensainfektion. Rektal administrering av TLR-agonister återställde de skyddande immunsvaren vilket kan antyda att mikrobiella produkter från magtarmkanalen kan diffundera systemiskt. Antibiotikabehandling försämrade likaså adaptiva och medfödda svar vid exponering för lymfocytiskt choriomeningitvirus och mukosainfluensavirus. Magtarmkanalens krav på absorption kan resultera i en konstant diffusion av mikrobiella produkter som TLR- eller NOD-ligander och metaboliter till blodbanan vilket åtminstone delvis kan vara en förklaring till den systemiska inverkan (Belkaid & Hand, 2014).

Mikrobiotans påverkan på immunförsvaret hos hund

De senaste studierna som finns på hund, människa och gnagare tyder på att de fyra som utgör majoriteten av hundens mikrobiota är lika dem hos människa och gnagare som också utgörs till största del av *Firmicutes* och *Bacteroidetes*. Den största skillnaden är att *Fusobacteria* är en av de fyra som dominerar hos hund men inte hos människa eller gnagare (Deng & Swanson, 2015).

Hos hundar fria från mikroorganismer har man sett ett underutvecklat lymfsystem och minskade koncentrationer av immunoglobuliner. Däremot kunde de ändå få ett adekvat immunsvaret när de stimulerades med antigen. Hundarna uppvisade även tunnare villi och en minskning av lamina propria och mukosans yta (Suchodolski, 2011). Sjukdomar som bakterieöverväxt i tunntarmen (SIBO) och IBD hos människa har visats ha koppling till störningar i tarmfloran. Hos hund är begreppet SIBO tveksamt att använda då en studie visat att friska hundar kan ha bakterieantal som överstiger gränsvärdet för SIBO hos människa. Hundens IBD är däremot lik människans och utveckling av IBD hos hund har liksom hos människa kopplingar till samspelet mellan mikrobiotan, genetiska förutsättningar, diet och miljöfaktorer. Liknande förändringar i tarmfloran ses hos både hund och människa vid IBD (Hooda *et al.*, 2012). Det här tyder på att mikrobiotan påverkar även hundens magtarmsystem och immunförsvaret men att det kan finnas skillnader i jämförelse med människan.

Immunologiska markörer vid gastroenteropati hos hund

Det finns flertalet studier som undersöker olika immunologiska parametrar som kan fungera som markörer för sjukdomar i magtarmkanalen, såsom IBD. Ännu finns ingen biomarkör som på ett optimalt sätt kan användas vid diagnostisering av IBD. CD11c och Foxp3 är två komponenter i det adaptiva immunförsvaret som i studier visar intressanta resultat för framtida forskning om biomarkörer.

CD11c är en β 2-integrin på cellers yta som hos möss används för att identifiera DCs, vilka är viktiga för aktivering av det adaptiva immunförsvaret. Hos hund har de celler som uttrycker CD11c fenotyp och funktion som antyder att de är DCs medan CD11c hos människor inte enbart uttrycks på DCs utan även på makrofager och andra celltyper. I en studie av Kathrani *et al.* (2011) uppvisade hundar med IBD färre CD11c⁺ celler i duodenum, ileum och colon än hundar i den friska kontrollgruppen. Det här visar att uttryck av CD11c kan ha en roll i utvecklingen av IBD. CD11c har visats vara uttryckt på andra celltyper än DCs men i studien var det ett fåtal celler som inte antogs vara DCs och vars morfologi skilde sig från de DC-liknande cellerna vilket innebär att de uteslöts från analysen (Kathrani *et al.*, 2011). I en studie av Junginger *et al.* (2014) uppvisade hundar med IBD en minskning av DCs som uttrycker bland annat CD11c i magsäcken, duodenum och kolon. Denna förändring föreslås även i denna studie vara en del i patogenesen i IBD (Junginger *et al.*, 2014).

Junginger *et al.* (2012) har i en studie visat att hundar med IBD också har ett minskat antal Foxp3⁺ Tregs i tarmen. Det antyder att en defekt i balansen av Tregs leder till förlust av oral tolerans och utveckling av sjukdomen (Junginger *et al.*, 2012). I en senare studie av Maeda *et al.* (2016) sågs en signifikant minskning i antalet Foxp3⁺ celler i LP hos hundar med IBD

jämfört med friska hundar och hundar med intestinalt lymfom. Även denna studie indikerar att en förändring i antalet Foxp3⁺ Tregs bidrar till sjukdomsförloppet i IBD (Maeda *et al.*, 2016).

Probiotikas påverkan på immunförsvaret

Probiotika är levande mikroorganismer som vid konsumtion tillför hälsofördelar till värdjuret. Ett antal studier har undersökt probiotikas egenskaper och effekter på hundens mikrobiota. Tillskott av probiotika tros förändra tarmens mikrobiota men ett antal studier som utförts visar att förändringar i avföringens bakteriesammansättning övergår redan 2-3 dagar efter intag av probiotika (Garcia-Mazcorro & Minamoto, 2013).

Tabell 1. I tabellen visas en översikt över de sorter av *Lactobacillus* som använts i studier av probiotika och dess påverkan på immunförsvaret hos hund

| Probiotikasort | Effekt | Referens |
|--|--|----------------------------------|
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Ökning av bland annat neutrofiler, monocyter och IgG i serum. Minskning av kväveoxid i serum. | Baillon <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Dämpar LPS ¹ -inducerad produktion av IL-8 från HT-29-celler ² . | Kainulainen <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> | Hos hundar med kronisk enteropati ökade mRNA för och proteinnivåerna av IL-10. Hos kontrollgruppen ökade mRNA för IL-10. | Sauter <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> | Minskning av mRNA för IL-10 i duodenum och mRNA för IFN- γ i kolon hos hundar med kronisk diarré. | Sauter <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | Ökat antal monocyter och IgA i serum. | Chung <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | Ökad fagocytisk aktivitet hos leukocyter. | Strompfová <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> | Ökning av IgA i avföring. | Delucchi <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | Minskat antal allergenspecifika IgE mot <i>Dermatophagoides farinae</i> . | Marsella, 2009 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | Uppföljning 3 år efter administration av <i>L. rhamnosus</i> (Marsella, 2009) visade att vid allergenexponering är IL-10 lägre än hos kontrollgruppen. Ingen skillnad i allergenspecifika IgE eller TGF- β . | Marsella <i>et al.</i> , 2012 |

¹ Lipopolysackarider hos gramnegativa bakterier. ² Modeller för IECs *in vitro*.

En av de mekanismer som probiotika föreslås verka genom är induktion av Tregs. Några av de regulatoriska effekterna hos probiotika i samband med inflammatoriska sjukdomar och atopiskt eksem hos neonatala barn och småbarn tros vara associerat med induktion eller

expansion av Tregs och manipulation av DCs i mukosan mot en regulatorisk funktion (Belkaid & Hand, 2014).

Lactobacillus är ett av de bakteriegenus som har studerats i störst omfattning hos hund, människa och mus med avseende på probiotisk verkan. I tabell 1 ses en sammanställning av studier gjorda på olika sorter av *Lactobacillus* och deras effekt på immunförsvaret hos hund. Flertalet studier visar att probiotika förstärker specifika immunfunktioner hos unga hundar. En studie visade att tidig exponering för *Lactobacillus rhamnosus* minskade immunologiska markörer på atopisk dermatit, gav en signifikant minskning av allergen-specifika IgE under valparnas första 6 månader och effekt sågs även 3 år efter att probiotikan slutats ge (Grześkowiak *et al.*, 2015). Det är inte bara hos unga hundar som probiotika har positiva effekter. *Lactobacillus acidophilus* och *Lactobacillus johnsonii* hade i en studie välgörande effekter på cytokinmönstret och mikrobiotan i tarmen hos hundar med kronisk diarré och gav klinisk förbättring hos alla hundar (Grześkowiak *et al.*, 2015). Probiotisk tillförsel av *Lactobacillus* har följaktligen i flertalet studier visat en positiv påverkan på hundens immunförsvaret.

DISKUSSION

Hund, människa och mus är alla däggdjur och har visats ha många likheter i anatomi och fysiologi. Det finns däremot studier som visar artskillnader som kan ha betydelse för de slutsatser som dras för hund från humana och murina studier. Ett exempel är att Deng och Swanson (2015) såg att ett av de dominerande fylen i magtarmkanalen hos hund är *Fusobacteria*. Då människa och mus inte har detta fylum i samma omfattning kan det innebära att mikrobiotan hos hund påverkar värden på annat sätt än hos människa och mus. En annan skillnad som upptäckts är att flertalet hundar har visats vara friska trots att de har en bakteriemängd i tarmen som överstiger gränsvärdet för sjuklig bakterietillväxt i tarmen (SIBO) hos människa (Hooda *et al.*, 2012). Även detta visar på att magtarmkanalens mikrobiota och hälsa hos hund i vissa avseenden skiljer sig från människa vilket bör hållas i åtanke när andra arter används som modell för hund.

Det finns en ansenlig mängd forskning på främst möss men även på människa gällande mikrobiotans påverkan på immunförsvaret och det är ett aktuellt område där det regelbundet utförs nya studier. Det kan bli problematiskt när dessa resultat ska sammanställas då det för det första är ett brett ämnesområde med många komponenter inblandade, för det andra ständigt tillkommer ny forskning och för det tredje är ett område som i nuläget är långt ifrån klarlagt. När det kommer till samma område på hund lyser studierna med sin frånvaro. Gällandes hund har fokus legat på att kartlägga mikrobiotans sammansättning eller att utforska tarmfloras roll i kroniska enteropatier och även här är antalet studier klart begränsat. Den som är intresserad av hur mikrobiotan påverkar immunförsvaret hos hund hänvisas i nuläget till studier gjorda på mus och människa. Den stora frågan är då om dessa studier kan tillämpas på hund?

För att kunna besvara den frågan kan vi rikta blicken mot den forskning som gjorts på hundens enteropatier och vad den kan säga oss om samband mellan arterna. Några av de

biomarkörer som har hamnat i fokus i senare studier om immunologiska tarmsjukdomar hos hund och diagnos av dessa är CD11c hos DCs och Foxp3 hos Tregs. Vad gäller CD11c⁺ DCs har de visats minska i antal vid IBD hos hund men de är ännu inte väl utforskade och studierna utgör ett begränsat material (Iwasaki & Kelsall, 2001; Kathrani *et al.*, 2011). Däremot har det inom humanforskningen fokuserats mycket på Foxp3⁺ Tregs. Då ett par studier har visat att uttryck av Foxp3 minskar hos hundar med IBD (Junginger *et al.*, 2012; Maeda *et al.*, 2016) tyder det på att Tregs har liknande reglerande roll och betydelse i hundars immunförsvar och utveckling av IBD som hos människor. Reduktion av Tregs har setts i både studier på möss och människor i samband med förändringar i mikrobiotan och immunologiska patologier i tarmen vilket antyder att resultaten från dessa studier kan appliceras även på hund (Round & Mazmanian, 2009).

Flertalet sorter av probiotika är intressanta ur terapeutisk synvinkel då de visats påverka värddjurets mikrobiota och immunförsvar. Om vi med tillskott av probiotika till exempel kan öka fagocytisk aktivitet hos leukocyter och produktion av IgA kan probiotikan användas för att bekämpa patogener. Här har de potentiellt terapeutiska kandidaterna *L. fermentum*, *L. murinus* och *L. casei* visat framfötterna (Chung *et al.*, 2009; Delucchi *et al.*, 2014; Strompfová *et al.*, 2015). I de båda studierna av Sauter *et al.* (2005, 2006) visades en sammanblandning av tre sorter av *Lactobacillus* påverka den antiinflammatoriska cytokinen IL-10 som kan produceras av bland annat Foxp3⁺ Tregs. Nivåerna av IL-10 påverkades hos både friska hundar (ökning), hundar med kronisk enteropati (ökning) och hundar med kronisk diarré (minskning). Hos hundarna med kronisk diarré minskade även nivåerna av proinflammatoriskt IFN- γ när de fick probiotikablandningen (Sauter *et al.*, 2006). Denna regulatoriska påverkan är användbar vid sjukdomar som innebär en felaktig reglering av immunförsvaret. Om probiotika kan påverka Tregs är det av intresse vid behandling av autoimmuna sjukdomar och enteropatier såsom IBD där vi vill dämpa immunförsvaret. *B. fragilis* samt flera arter av *Clostridia* har visats främja Tregs i magtarmkanalen och det hade varit intressant att se studier på om dessa kan fungera som probiotika hos hund. Däremot är det av största vikt att inte få en ökning av patogena eller potentiellt patogena klostridiearter som *C. difficile* eller *C. perfringens* som ses i högre antal hos hundar med diarré (Baillon *et al.*, 2004). Därför vore studier på kommensala *Clostridium* utan eller med liten patogen potential intressanta för att se om de kan vara ett behandlingsalternativ eller – komplement vid enteropatier.

Två av studierna på *Lactobacillus* spp. (Chung *et al.*, 2009; Delucchi *et al.*, 2014) visar att vissa medlemmar av genuset kan ge ökade nivåer av IgA. I båda studierna användes friska hundar och effekterna av *L. murinus* (Delucchi *et al.*, 2014) och *L. casei* (Chung *et al.*, 2009) på hundarna undersöktes. Ingen av de andra studierna på arter inom *Lactobacillus* spp. visade att probiotika kan påverka halterna av IgA. Då nivåer av IgA har visats variera kraftigt i hundars avföring och påverkas av faktorer som ålder och ras (Delucchi *et al.*, 2014) kan studierna av Chung och Delucchi helt enkelt uppvisa en normal variation i avföring och inte en ökning av IgA på grund av probiotikan. Det är däremot troligt att olika arter inom *Lactobacillus* spp. påverkar hundens immunförsvar på olika sätt då det i båda studierna

uppmättes signifikanta skillnader i IgA-nivåer mellan de hundar som fick probiotika och de som fick placebo.

Då immunförsvaret även påverkas systemiskt av förändringar i mikrobiotan (Belkaid & Hand, 2014) antyder det att probiotika som förändrar tarmfloran kan vara aktuell likaså vid behandling av sjukdomar som inte rör magtarmkanalen. Dessutom kan probiotika vara ett viktigt komplement vid antibiotikabehandling, då tarmfloran rubbas med följd att immunförsvaret försämras.

Många av studierna på probiotika har flertalet begränsningar då de använt qPCR för att utforska utvalda bakteriegrupper, vilket inte utvärderar hela tarmfloras sammansättning och samspel (Hooda *et al.*, 2012). Det gör det svårt att dra några egentliga slutsatser från de studierna och nya försök med bättre metoder krävs för en ökad förståelse. Studierna är dessutom ofta gjorda på friska hundar där avföringsprover har analyserats istället för att titta på mukosan eller innehåll i magtarmkanalen. Ytterligare något som försvårar jämförande mellan studier är att probiotika används i vitt skilda koncentrationer i olika försök (Hooda *et al.*, 2012). Likaså har flera studier på immunceller, såsom DCs, haft sina brister. I studierna av Kathrani *et al.* (2011) och Junginger *et al.* (2014) har författarna inte kunnat säkerställa att de celler de undersökt verkligen är dendritiska celler då flertalet celler uttrycker samma molekyler. De har dock redogjort för detta eventuella bias som är väsentligt att ha i åtanke.

Slutligen är det viktigt att vara medveten om och ta hänsyn till artskillnader när olika djurslag jämförs i ett sådant här avseende. Flertalet artiklar antyder att vissa resultat från studier av mikrobiota och immunförsvaret i människa och mus även kan appliceras på hund och ge vägledning för fortsatta studier i hund. De studier av probiotiska bakterier som har utförts direkt i hund visar att flertalet bakteriearter har en positiv inverkan på värdens immunförsvaret och hälsa vilket är lovande för användning av probiotika i terapeutiska sammanhang.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Alexander, K. L., Targan, S. R. & Elson, C. O. (2014). Microbiota activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 260: 206–220. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12180>. [Accessed 2016-02-23].
- Allenspach, K. (2011). Clinical Immunology and Immunopathology of the Canine and Feline Intestine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 41: 345–360. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561611000180>. [Accessed 2016-02-15].
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J. & Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504: 451–455. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12726>. [Accessed 2016-03-05].
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S., Fritz, J. V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Ode, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M. & Honda, K. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 500: 232–236. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12331>. [Accessed 2016-03-05].
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K. & Honda, K. (2011). Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science*, 331: 337–341. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1198469>. [Accessed 2016-03-05].
- Baillon, M.-L. A., Marshall-Jones, Z. V. & Butterwick, R. F. (2004). Effects of probiotic Lactobacillus acidophilus strain DSM13241 in healthy adult dogs. *American journal of veterinary research*, 65(3), pp 338–343. Available from: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2004.65.338>. [Accessed 2016-03-06].
- Belkaid, Y. & Hand, T. W. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*, 157: 121–141. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414003456>. [Accessed 2016-02-23].
- Chung, J. Y., Sung, E. J., Cho, C. G., Seo, K. W., Lee, J., Bhang, D. H., Lee, H. W., Hwang, C. Y., Lee, W. K., Youn, H. Y. & Kim, C. J. (2009). Effect of Recombinant Lactobacillus Expressing Canine GM-CSF on Immune Function in Dogs. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 1401-1407. Available from : 10.4014/jmb.0904.04010. [Accessed 2016-03-04].
- Delucchi, L., Fraga, M., Perelmutter, K., Della Cella, C. & Zunino, P. (2014). Effect of native Lactobacillus murinus LbP2 administration on total fecal IgA in healthy dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78: 153. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3962280/>. [Accessed 2016-03-06].
- Deng, P. & Swanson, K. S. (2015). Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *British Journal of Nutrition*, 113(Supplement S1): S6–S17. Available from: http://journals.cambridge.org/article_S0007114514002943. [Accessed 2016-02-11].
- Garcia-Mazcorro, J. F. & Minamoto, Y. (2013). Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. *Archivos de medicina veterinaria*, 45: 111–124. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0301-732X2013000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en. [Accessed 2016-02-11].
- Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S. & Salminen, S. (2015). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, 34: 14–23. Available from:

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996415300032>. [Accessed 2016-02-07].
- Hooda, S., Minamoto, Y., Suchodolski, J. S. & Swanson, K. S. (2012). Current state of knowledge: the canine gastrointestinal microbiome. *Animal Health Research Reviews*, 13: 78–88. Available from: http://journals.cambridge.org/article_S1466252312000059. [Accessed 2016-02-11].
- Iwasaki, A. & Kelsall, B. L. (2001). Unique functions of CD11b+, CD8α+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 166: 4884–4890. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/166/8/4884.short>. [Accessed 2016-03-05].
- Josefowicz, S. Z., Niec, R. E., Kim, H. Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D. T. & Rudensky, A. Y. (2012). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature*, 482: 395–399. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature10772>. [Accessed 2016-03-05].
- Junginger, J., Lemensieck, F., Moore, P. F., Schwittlick, U., Nolte, I. & Hewicker-Trautwein, M. (2014). Canine gut dendritic cells in the steady state and in inflammatory bowel disease. *Innate Immunity*, 20: 145–160. Available from: <http://ini.sagepub.com/content/20/2/145>. [Accessed 2016-02-07].
- Junginger, J., Schwittlick, U., Lemensieck, F., Nolte, I. & Hewicker-Trautwein, M. (2012). Immunohistochemical investigation of Foxp3 expression in the intestine in healthy and diseased dogs. *Vet Res*, 43: 23. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1297-9716-43-23.pdf>. [Accessed 2016-03-04].
- Kainulainen, V., Tang, Y., Spillmann, T., Kilpinen, S., Reunanen, J., Saris, P. & Satokari, R. (2015). The canine isolate *Lactobacillus acidophilus* LAB20 adheres to intestinal epithelium and attenuates LPS-induced IL-8 secretion of enterocytes in vitro. *BMC Microbiology*, 15: 4. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/4>. [Accessed 2016-03-06].
- Kathrani, A., Schmitz, S., Priestnall, S. L., Smith, K. C., Werling, D., Garden, O. A. & Allenspach, K. (2011). CD11c+ Cells are Significantly Decreased in the Duodenum, Ileum and Colon of Dogs with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Comparative Pathology*, 145: 359–366. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997511000399>. [Accessed 2016-03-04].
- Maeda, S., Ohno, K., Fujiwara-Igarashi, A., Uchida, K. & Tsujimoto, H. (2016). Changes in Foxp3-Positive Regulatory T Cell Number in the Intestine of Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease and Intestinal Lymphoma. *Veterinary Pathology*, 53: 102–112. Available from: <http://vet.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0300985815591081>. [Accessed 2016-03-06].
- Marsella, R. (2009). Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG for the prevention of atopic dermatitis in dogs. *American journal of veterinary research*, 70: 735–740. Available from: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.70.6.735>. [Accessed 2016-03-06].
- Marsella, R., Santoro, D. & Ahrens, K. (2012). Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term clinical and immunological effects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146: 185–189. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242712000724>. [Accessed 2016-03-17].
- Round, J. L. & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9: 313–323. Available from: <http://www.nature.com/nri/journal/v9/n5/full/nri2515.html>. [Accessed 2016-02-07].
- Sauter, S. N., Allenspach, K., Gaschen, F., Gröne, A., Ontsouka, E. & Blum, J. W. (2005). Cytokine expression in an ex vivo culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: Modulation by probiotic bacteria. *Domestic Animal Endocrinology*, 29: 605–622. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0739724005000998>. [Accessed 2016-03-08].

- Sauter, S. N., Benyacoub, J., Allenspach, K., Gaschen, F., Ontsouka, E., Reuteler, G., Cavadini, C., Knorr, R. & Blum, J. W. (2006). Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhoea treated with an elimination diet*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90: 269–277. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0396.2005.00595.x>. [Accessed 2016-03-08].
- Strompfová, V., Kubašová, I., Farbáková, J., Gancarčíková, S., Mudroňová, D., Maďari, A. & Lauková, A. (2015). Experimental application of *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 in combination with chlorophyllin in dogs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 8681–8690. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-6724-9>. [Accessed 2016-02-07].
- Suchodolski, J. S. (2011). COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of Animal Science*, 89: 1520–1530. Available from: <http://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/89/5/1520>. [Accessed 2016-02-11].