

Undersökning av potentiella probiotiska organismer i tarmmikroflora hos häst med speciell hänsyn till *Lactobacillus* spp.

Maria Bohlin

Huvudhandledare: Karl-Erik Johansson
Biträdande handledare: Karel Krovacek
Inst. för biomedicin & veterinär folkhälsovetenskap

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Examensarbete 2006:43
ISSN 1652-8697
Uppsala 2006

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	1
Inledning	1
Litteraturoversikt	2
Mjölksyrabakterier	2
Lactobacillus spp.	2
Laboratoriemetoder vid odling samt identifiering av Lactobacillus spp.	3
PCR-tekniker	3
Probiotika	4
Urval av probiotiska bakterier	4
Probiotikans gynnsamma effekt	4
Probiotika och häst	5
Antibiotikaassocierad diarré hos häst	6
Material och metoder	6
Provtagningsmaterial	6
Inklusionskriterier	6
Exklusionskriterier	6
Utvalda hästar	6
Provtagningsmetodik	7
Laboratiematerial	7
Glidmedel	7
Peptonvatten	7
Spädningsvätska	7
MRS agar	7
Blodagar	7
Nedfrysningsbuljong	8
API-test	8
PCR	8
Sekvensering	8
Datorprogram vid sekvensanalys	8
Databaser för sekvensjämförelser	8
Laboratiemetodik	8
Gramfärgning	9
Metodbeskrivning PCR och sekvensanalys	10
Koklysat	10
PCR (polymerase chain reaction)	10
Agarosgelelektrofores	10
Rening av PCR-produkter	11
Sekvensreaktion	11
Sekvensering	11
Sekvensanalys	11
Resultat	12
Diskussion	16
Konklusion	18
Litteraturförteckning	18

SAMMANFATTNING

Syftet med detta examensarbete var att isolera och identifiera naturligt förekommande *Lactobacillus* spp. från faeces hos svenska hästar. Dessa laktobaciller skall sedan användas som probiotiska kandidater vid forskning kring antibiotikaassocierad diarré hos häst.

Åtta stycken ridskolehästar i åldern 6-10 år valdes ut för faecesprovtagning. Vid urval av presumtiva *Lactobacillus* spp. användes utodling på selektivt medium (Man Rogosa Sharp agar), samt gramfärgning. Totalt kunde 33 stycken isolat av presumtiva *Lactobacillus* spp. identifieras. Av dessa 33 isolat kunde 22 stycken identifieras med API-test. Av de kvarvarande 11 stycken oidentifierade isolaten, valdes 5 stycken isolat ut för identifiering med PCR och sekvensering av 16S rRNA genen.

Vid detta försök kunde *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. equi*, *L. mucosae* och en *Lactobacillus* sp, som inte har beskrivits i litteraturen, identifieras från normala tarmfloran hos friska svenska hästar. Dessutom kunde *Leuconostoc lactis* som också tillhör gruppen mjölksyrabakterier identifieras.

SUMMARY

The aim of this study was to isolate and identify *Lactobacillus* species indigenous to the gastrointestinal microflora of Swedish horses. These lactobacilli are to be used as probiotic candidates in research concerning antibiotic-associated diarrhoea in horses.

Eight horses, age 6-10 years, were selected from a riding school for collection of faeces samples. Man Rogosa Sharp medium and gram staining were used for the selection of supposed lactobacilli. We could identify 33 isolates of supposed lactobacilli. With the use of API tests 22 of these 33 isolates could be identified. Out of the remaining unidentified 11 isolates, five isolates were selected for identification by PCR and by sequencing of the 16S rRNA gene.

In this study we could identify *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. equi*, *L. mucosae* and a previously unknown *Lactobacillus* sp. in the indigenous gastrointestinal microflora of Swedish horses. We also could identify the lactic acid bacterium (LAB) *Leuconostoc lactis*.

INLEDNING

Idag ses ett ökande problem med patogena bakteriers resistens mot antibiotika, både inom human- och veterinärmedicin. Detta är bl.a. till följd av ett utbrett antibiotikaanvändande, vilket leder till att mängden verkningsfulla antibiotika mot farliga bakteriella patogener minskar. För att minska uppkomsten av antibiotikaresistens är det viktigt att minska användningen av antibiotika. Därför är användningen av probiotika och bioterapi ett område som bör utforskas.

Probiotika och dess potentiellt gynnsamma effekt är inget nytt. Redan på tidigt 1900-tal diskuterade Metchnikoff den gynnsamma effekten av syrad mjölk för människa (Metchnikoff, 1908). Det är dock först under de senaste 15 åren som probiotikaforskningen har intensifierats. Probiotika har bl.a. potential att användas

i profylaktiska syften och eftersom detta användningsområde på häst i nuläget är relativt outforskat är det speciellt intressant. Förhoppningarna är att probiotika skall kunna användas på häst i större utsträckning, med klara användningsregimer och med säkrare utförda vetenskapliga försök som grund för denna användning. Det mest optimala skulle vara utvecklandet av en säker probiotisk produkt utvecklad utifrån svenska hästars tarmmikroflora och behov. Detta skulle kunna öka sannolikheten för ett framgångsrikt resultat.

I nuläget finns det inte några redovisade probiotikastudier gjorda på svenska hästar under svenska förhållanden. Inom detta område finns det ett klart behov av forskning.

Syftet med detta examensarbete är att isolera och identifiera naturligt förekommande *Lactobacillus* spp. från faeces hos svenska hästar. Dessa laktobaciller skall sedan användas som probiotiska kandidater vid forskning kring antibiotikaassocierad diarré hos häst.

Detta försök begränsas till ett litet antal provtagna hästar p.g.a. tidsbegränsning vid utförandet av detta examensarbete.

LITTERATURÖVERSIKT

Mjölksyrabakterier

Mjölksyrabakterier är en grupp grampositiva bakterier med gemensamma morfologiska, metabola och fysiologiska karaktäristika. Bakterierna i gruppen är grampositiva, katalasnegativa, icke sporulerande, anaeroba stavar eller kocker. I gruppen ingår cirka 20 gener, men följande gener anses vara de huvudsakliga mjölksyrabakterierna: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* och *Weisella*. I hästens gastrointestinalkanal tillhör majoriteten av mjölksyrabakteriespecies genus *Lactobacillus* (Axelsson, 2004; Rafat et al, 2005; Stiles & Holzapfel, 1997).

Mjölksyrabakterierna kan producera antimikrobiella substanser. Vissa av dessa, t.ex. små organiska molekyler av låg massa, produceras vid sockerjäsning. Även många andra antimikrobiella komponenter produceras av olika mjölksyrabakterier. Exempel på dessa är väteperoxid, koldioxid, diacetyl och bakteriociner. Bakteriociner är ribosomalt syntetiserade föreningar, d.v.s. de är proteiner, som produceras av bakterier för att hämma tillväxt av andra bakterier. De kan bl.a. användas mot specifika patogener utan att störa normalfloran. Bakteriociner skiljer sig från antibiotika genom att de syntetiseras av ribosomer, värdcellerna är immuna mot dem, de har en annan verkningsmekanism och de har ett smalt spektrum (Ouwehand & Vesterlund, 2004).

***Lactobacillus* spp.**

Lactobacillus spp. är fakultativt anaeroba eller strikt anaeroba, katalas negativa, icesporulerande, orörliga, laktatproducerande, kockoida till långa stavar. Laktobaciller är vanligtvis grampositiva, men äldre kulturer kan tendera till att bli gramnegativa. De finns som en del av normalfloran i bl.a. munhålan, gastrointestinalkanalen, urinorganen och vagina hos djur och människor

(Axelsson, 2004; Danielsson-Tham & Greko, 2002; Morotomi et al, 2002; Murray et al, 2005).

Lactobacillus är det största genus inom gruppen mjölksyrabakterier. Det är en mycket heterogen grupp av bakterier med stor variation avseende fenotyp, biokemi och fysiologi. Denna variation märks bl.a. i skillnad av mol% G + C innehåll i bakteriernas DNA, där *Lactobacillus* har en variation på 32 – 55% (Axelsson, 2004).

I en studie har cirka 18 olika *Lactobacillus* stammar identifierats från häst. Bland dessa finns bl.a. *Lactobacillus salivarius*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. amylovorus*, *L. coryniformis* och *L. equi* (Morotomi et al, 2002). De vanligaste förekommande laktobacillerna är *L. salivarius* och *L. mucosae* (Rafat et al, 2005).

Förmågan att kunna adherera till värdceller tros påverka förmågan hos en specifik bakteriestam att kunna kolonisera värdens gastrointestinalkanal (Yuki et al, 2000). Det finns studier där specificitet hos, för arten naturligt förekommande, laktobaciller har påvisats för artens värdceller (Suegara et al, 1975). Naturligt förekommande laktobaciller, som har påvisats ha förmågan att adherera till hästens magsäcksepitel, är *L. salivarius*, *L. crispatus*, *L. reuteri* och *L. agilis* (Yuki et al, 2000).

Laboratoriemetoder vid odling samt identifiering av *Lactobacillus* spp.

För framodling av *Lactobacillus* spp. kan Man Rogosa Sharp (MRS) agar användas. Denna agar har utvecklats som ett selektivt medium vid isolering av *Lactobacillus* spp. av oralt, fekalt och mjölkproduktursprung (de Man et al, 1960).

Temperaturoptimum för laktobaciller är 30-40°C, men de växer mellan 5-53°C. Laktobaciller har en mikroaerofil ämnesomsättning, vilket gör att de kan växa både aerobt och anaerobt (Danielsson-Tham & Greko, 2002).

Det finns ett flertal olika sätt att skilja mellan olika species inom *Lactobacillus* spp. Det klassiska sättet är genom sockerjäsning, typ av mjölksyra som produceras, hydrolys av arginin, tillväxtkriterier och tillväxttemperatur. För att få en mer exakt klassificering krävs analys av peptidoglykan, elektroforetisk mobilitet av LDH (lactic acid dehydrogenase), mol% G + C i DNA och DNA-DNA homologistudier (Axelsson, 2004).

PCR-tekniker

För en snabb identifiering kan även PCR-tekniker användas (Axelsson, 2004). Vid PCR-tekniker amplifierar man en utvald gen m.h.a. PCR. Därefter sekvenserar, dvs. bestäms nukleotidsekvensen, för den genen, m.h.a. sekvenseringsprimers. Efter sekvensering identifieras bakteriestammen genom sekvensjämförelser med sekvenser deponerade i allmänt tillgängliga sekvensdatabaser.

En lämplig gen för denna sekvensering är 16S rRNA genen, som kodar för en av ribosomkomponenterna. Denna gen är på cirka 1500 nukleotider och finns hos alla bakterier. Nukleotidsekvensen hos denna gen är känd för många olika

bakteriestammar och är därför lämplig att använda sig av, när sekvensdata används vid identifiering av en bakteriestam (Johansson, 2003).

Med användande av sekvensering av 16S rRNA genen, kan särskiljning av *Lactobacillus* species ske effektivt och praktiskt. Dock har metoden inte tillräckligt hög upplösning för att kunna användas vid fullständig urskiljning av *Lactobacillus* stammar eller underarter (Zhong et al, 1998). För att få en särskiljning mellan olika *Lactobacillus* stammar kan en metod baserad på sekvensering av 16S-23S regionerna användas (Moreira et al, 2005).

Probiotika

Probiotika definieras som: ”oral probiotics are living micro-organisms, which upon ingestion in certain numbers, exert health benefits beyond inherent basic nutrition” (Guarner & Schaafsma, 1998, sid. 237). För att kunna fastställa probiotiska egenskaper hos en särskild stam av mjölksyrabakterier, krävs ”blinda” och placebokontrollerade undersökningar. Dessa undersökningar kan föregås av olika *in vitro* tester eller djurförsök, som t.ex. resistens mot gallsyror och adhesion till tarmmukosa (Guarner & Schaafsma, 1998).

Urval av probiotiska bakterier

Vid urval av potentiellt probiotiska bakterier till djur finns det ett flertal kriterier som måste uppfyllas. Bland dessa finns:

- Tolerans mot syra: för att kunna överleva passage genom magsäck och duodenum.
- Tolerans mot gallsyra: för att överleva passage genom främre delen av tunntarmen.
- Produktion av antimikrobiella substanser: för att konkurrera med patogena organismer.
- Adhesion till tarmens mukosa: för att få en effektiv kolonisation av tarmen och för att förhindra adhesion av andra mikroorganismer till adhesionsplatser.
- Goda tekniska egenskaper: tåla värme vid fodertillverkning, stabilitet hos stammen, överlevnad i produkten (Nousiainen et al, 2004).

Probiotikans gynnsamma effekt

Probiotika har i ett flertal fall visat sig ha gynnsam effekt. Hos människa stabiliserar probiotikasupplement innehållande *L. acidophilus* och *Bifidobacterium bifidum* tarmmikrofloran vid antibiotikabehandling (Madden et al, 2005).

Probiotika, innehållande bl.a. *L. casei* subsp. *rhamnosus* (LGG), förhindrar antibiotika associerad diarré och akut diarré hos människa (D’Souza et al, 2002; Rautanen et al, 1998; Vanderhoof et al, 1999), samt minskar risken för turistdiarré (Oksanen et al, 1990).

Vid supplementering med *L. fermentum* minskar utbredning och grad av atopisk dermatit hos unga barn med måttlig till grav sjukdom (Weston et al, 2005).

Probiotika, innehållande *B. infantis*, *B. bifidus* och *Staphylococcus thermophilus*, minskar incidens och grad av nekrotiserande enterokolit hos prematura spädbarn (Bin-Nun et al, 2005).

Mjölk med en tillsats innehållande *L. acidophilus* eller yoghurtkultur (innehållande *L. lactis* och *S. thermophilus*) minskar symtomen hos laktosintoleranta barn (Montes et al, 1995).

Hos immunodefekta möss kan probiotika ändra, och vissa probiotiska bakterier även öka, antikroppssvaret mot *Candida albicans* (Wagner et al, 2000).

Vid inducerad ulcerativ kolit hos laboratoriemöss kan *L. casei* bl.a. förbättra blodparametrar, minska viktnedgång, samt ge ett snabbare tillfrisknande än hos kontrollgruppen. *L. casei* förhindrar dock inte induktion av sjukdom (Herías et al, 2005).

Ett flertal mjölksyrabakteriespecies hämmar växt av svamp (Ström, 2005).

Probiotika och häst

Probiotisk behandling på häst är ett område där endast begränsad mängd forskning har gjorts. I en studie visar man att två olika kommersiella probiotiska produkter (den ena innehållande *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *S. faecium* och den andra *L. acidophilus*, *S. faecium*, *B. thermophilum* och *B. longum*) inte skyddar mot Salmonellainfektion eller Salmonellautsöndring hos kolikhästar. De förhindrar inte heller postoperativ diarré, minskar inte antalet dagar på djursjukhus eller kortar durationen på antibiotikabehandling hos kolikhästarna (Parraga et al, 1997). I en likande studie kan man inte heller påvisa att probiotika (innehållande *L. lactis*, *Enterococcus faecium*, jästceller och vitaminer) minskar Salmonellautsöndring, förekomst av feber, diarré eller leukopeni hos kolikhästar (Kim et al, 2001).

L. rhamnosus stam GG (LGG) är en probiotisk bakterie som har studerats mycket hos människa. Hos häst är LGG-kolonisation av tarmen dock sporadisk och dålig. Hos föl har LGG större förmåga att kunna kolonisera tarmen. Detta kan bero på att LGG har humant ursprung och därför inte är anpassad till den vuxna hästens mikroflora eller att bakterien inte kan adherera till epitelcellerna i tarmen (Weese et al, 2003).

L. pentosus är en potentiell probiotisk bakterie hos häst som är isolerad från hästens gastrointestinalkanal. Den innehar både in vitro och in vivo egenskaper som skulle kunna vara användbara i profylax och behandling av enteriska sjukdomar hos häst. Bakterien överlever transporten genom både vuxna hästars och föls gastrointestinalkanal. Dessutom kan bakterien hämma *Salmonella* spp, *Clostridium difficile* och *C. perfringens* in vitro (Weese et al, 2004). I ett försök med denna bakterie, kan den inte förhindra diarré hos neonatala föl. Istället påvisas ett samband mellan behandling med *L. pentosus* och utveckling av diarré (Weese & Rousseau, 2005).

Det finns dock studier med positiva resultat. I ett försök visar man att probiotika ökar tillväxten, ger bättre intestinal hälsa och minskar förekomsten av diarré hos neonatala föl. Probiotikan bestod av 5 *Lactobacillus* stammar (*L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. johnsonii* och *L. equi*) som isolerats från friska hästar (Yuyama et al, 2004).

Antibiotikaassocierad diarré hos häst

Antibiotikaassocierad diarré (AAD) är en allvarlig komplikation vid antibiotikabehandling av hästar. AAD är kopplat till behandling med ett flertal olika antibiotika. Bland annat påvisas akut kolit associerad med *C. perfringens* vid antibiotikabehandling (dihydrostreptomycin, penicillin, ampicillin, metronidazol, trimetoprim + sulfadiazin) av vuxna hästar (Båverud et al, 1997; Båverud et al 2003), samt hos fölston vid behandling av deras föl med erythromycin och rifampicin mot *Rhodococcus* pneumoni (Båverud et al, 1998). Vid tetracyklinbehandling i kombination med stress hos häst, påvisas diarré som följd (Baker et al, 1973).

MATERIAL OCH METODER

Provtagningsmaterial

Faecesprover togs från ridskolehästar på Djursholms ridskola i Stockholm.

Inklusionskriterier

1. Häst med en maximal ålder av 10 år
2. Kliniskt fri från uppenbar sjukdom enligt provtagarens bedömning

Exklusionskriterier

1. Antibiotikabehandlad inom det senaste året

Utvalda hästar

Av 65 tillgängliga ridskolehästar valdes åtta stycken ponnyer och hästar av varierande raser och kön, i åldern 6 – 10 år, ut för provtagning enligt inklusions- och exklusionskriterierna. Hästarna utfodrades med hö, havre, betför och mineraler, samt åt färskt gräs i hage. Hästarna redovisas i Tabell 1.

Tabell 1. Hästar som ingick i studien

Häst	Namn	Ras	Ålder	Kön
1	Walentino	Svenskt halvblod	6 år	Valack
2	Maberto	Svenskt halvblod	6 år	Valack
3	Pantara	Ponny av okänd härstamning	6 år	Sto
4	Hagens Zorba	Connemara	7 år	Sto
5	Paint Ball	Ponny av okänd härstamning	7 år	Valack
6	Miracoli	Ponny av okänd härstamning	8 år	Valack
7	Hagens Xtra	Connemara	9 år	Sto
8	Hagens Windsor	Connemara	10 år	Valack

Provtagningsmetodik

En handfull faeces samlades direkt rektalt från hästarna med en handskbeklädd hand och glidmedel. Proverna lades i förslutningsbara plastburkar med lock och transporterades i kylväska med kylklampar direkt till laboratoriet.

Inga tvångsmedel behövdes användas vid provtagningen.

Laboratoriematerial

Glidmedel

Apotekets glidmedel från ACO.

Peptonvatten

Innehållande 1 gram pepton (neutralized bacteriological peptone från Oxoid), 8,5 gram NaCl, 1000 ml destillerat vatten.

Spädningsvätska

Innehållande 0,1 % pepton, 0,85 % NaCl och destillerat vatten.

MRS agar

Man Rogosa Sharp tillverkad med MRS Boillon från Merck och Oxoid L11-agar från Oxoid.

Blodagar

Nötblodagar från SVA med blodagarbas bestående av 5 % nötblod.

Nedfrysningsbuljong

Innehållande BHI (brain heart infusion från Oxoid) + 17 % glycerol.

API-test

API 50 CH och API 50 CHL medium från Biomérieux användes. API CH 50 kan tillsammans med API 50 CHL medium användas för identifiering av *Lactobacillus* spp. och närstående släkten. Testet består av 50 biokemiska tester, som undersöker mikroorganismers kolhydratmetabolism.

PCR

Vid PCR-reaktionen användes PCR-apparaten PTC 200 från MJ Research.

PCR-produkten renades med GFX PCR – DNA and Gel Band Purification Kit från Amersham Bioscience.

Sekvensering

Sekvensreaktion utfördes genom “Cycle Sequencing” med Gene Amp PCR System 2700 från Applied Biosystems och Big Dye Terminator v3, 1 Cycle Sequencing Kit från Applied Bioscience användes.

Vid sekvenseringen användes 3100 Genetic Analyzer från Applied Biosystems.

Datorprogram vid sekvensanalys

Vid sekvensanalysen användes datorprogrammet Vector NTI Suite 9 från InforMax.

Databaser för sekvensjämförelser

Vid sekvensjämförelser användes databaserna Ribosomal Database Project - II och GenBank, som administreras av National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Laboratoriemetodik

1. 10 g faeces + 90 ml peptonvatten (0,2%) vägdes upp i dubbla Stomacherpåsar.
2. Proverna homogeniserades i Stomacher i 3 minuter.
3. Spädningsserie utfördes från 1:10 till 1:1000 000. 1 ml från Stomacherpåsen (spädning 1:10) överfördes till ett provrör med 9 ml spädningvätska. Därefter skedde noggrann blandning. Resterande spädningsserie gjordes genom att 1 ml överfördes från föregående spädning, dvs 1:10 tom 1:10 000, till nästkommande rör med 9 ml spädningvätska.
4. 0,1 ml från vardera rör i spädningsserien racklades ut på MRS-agar.
5. Odling anaerobt vid 37°C i 2-5 dygn.

6. Identifiering samt registrering av morfologiskt presumptiva *Lactobacillus* spp.: utväxta bakteriekoloniers makroskopiska och mikroskopiska morfologi studerades, samt gramfärgning utfördes.
7. Presumptiva *Lactobacillus* spp. (kolonier vars koloniutseende liknade de som vid gramfärgning visat sig vara grampositiva/gramvariabla kocker och stavar) ströks ut på MRS-agar och blodagar, samt odlades anaerobt vid 37°C i 2-5 dygn.
8. Utväxta bakteriekoloniers mikroskopiska och makroskopiska morfologi registrerades, samt gramfärgning utfördes.
9. Olika kolonier vars koloniutseende överensstämde med presumptiva *Lactobacillus* spp (grampositiva/gramvariabla kocker och stavar) ströks ut på MRS-agar eller blodagar från ursprungsplattorna (odling från spädningsserien) eller från renstrykningsplattorna (punkt 7), samt odlades anaerobt vid 37°C i 2-5 dygn.
10. Bakterierna från plattorna ströks om på blodagar för att få en tätare växt inför nedfrysning, samt odlades anaerobt vid 37°C i 2-5 dygn.
11. Nedfrysning: 2 ml nedfrysningsbuljong pipetterades ut på agarplattorna. Därefter slammades bakteriekolonierna upp i nedfrysningsbuljongen m.h.a. en rackla. Uppslamningen från vardera agarplatta överfördes till ett Nunc Cryo Tube Vials med en glaspipett. Proverna frystes ned i -70°C.
12. Nedfrysta prover odlades fram anaerobt på blod- samt MRS-agar vid 37°C i 24-48 timmar.
13. API 50 CH-test sattes med bakteriematerial från MRS-agar.
14. API 50 CH-testen avlästes efter 48 timmar ± 6 timmar i anaerob miljö vid 37°C.
15. Bakteriestammarna identifierades mha datoridentifieringsprogrammet för testet.
16. Testresultaten bedömdes, samt urval av isolat för vidare identifiering med PCR och sekvensering av 16S rRNA genen utfördes.
17. Fem stycken isolat från nedfrysta prover ströks ut på MRS-agar och odlades anaerobt vid 37°C i 2 dygn.
18. Identifiering utfördes med PCR och sekvensering av 16S rRNA genen.

Anaerob odling skedde i anaerobklocka (GasPack System) vid 37°C med AnaeroGen anaerobpåsar från Oxoid. Indikatorstrips användes för att säkerställa anaerob miljö vid odlingen.

Gramfärgning

1. Kristallviolett 1 minut
2. Avsköljning med vatten
3. Lugols lösning 1 minut
4. Avfärgning med acetonsprit

5. Avsköljning med vatten
6. Saffranin 10-20 sekunder
7. Avsköljning med vatten
8. Torkning

Metodbeskrivning PCR och sekvensanalys

Koklysat

Koklysatet framställdes genom att bakterieisolaten först tvättas i PBS. Därefter kokades isolaten i vatten för att frigöra det templat (DNA) som användes vid PCR-reaktionen.

PCR (polymerase chain reaction)

Först blandades en PCR-mastermix (redovisas i Tabell 2) till vilken 1 eller 3 µl templat (både ospädd och i spädning -1) tillsattes, dvs. totalt 4 stycken prover från varje isolat (1 st. ospädd 1 µl, 1 st. ospädd 3 µl, 1 st. spädning -1 1 µl, 1 st. spädning -1 3 µl).

Mastermix och templat kördes sedan i PCR-apparaten i 30 cykler för att framställa en PCR-produkt, dvs. en amplifiering av bakteriens 16S rRNA-gen.

Tabell 2. Innehåll mastermix

Koncentration	Mastermix	µl
	Vatten	34,8
1 x	10 x PE-buffert	5
0,2 mM x 4	10 mM chase = 2,5 mM/dNTP	4
1,5 mM	25 mM MgCl ₂	3
10 pmol	Primer U1 = 593	1
10 pmol	Primer U8 = Kag001	1
5 units/µl	Taqpolymeras PE	0,2

Agarosgelelektrofores

För att kontrollera att reaktionsblandningarna innehöll DNA-produkter av rätt storlek, utfördes en elektrofores i agarosgel. Först gjöts en agarosgel med brunnar. Till agarosgelen hade ethidiumbromid, vilket binder till DNA och fluorescerar i UV-ljus, tillsatts. Gelen placerades i en buffertlösning och i brunnarna pipetterades sedan PCR-produkten, med en tillsats av ett färgämne, bromfenolblått. Intill proverna hade även en storleksmarkör placerats. Därefter utfördes elektroforesen.

Efter den utförda elektroforesen kontrollerades förekomsten av DNA-produkter m.h.a. UV-ljus och gelen fotograferades.

Rening av PCR-produkter

De framtagna PCR-produkterna renades sedan, för att få fram en DNA-produkt så fri som möjlig från bl.a. fria nukleotider. Vid reningen användes GFX PCR - DNA and Gel Band Purification Kit.

Sekvensreaktion

Först blandades en sekvensmix (Tabell 3). Till sekvensmixen tillsattes templatet, dvs. 0,5 µl renad PCR-produkt. Därefter kördes sekvensreaktionen i 25 cykler. Efter sekvensreaktionen hade en sekvensprodukt, dvs. en amplifiering av utvalda regioner (generella regioner U1-U6 och U8) på 16S rRNA-genen, framställts.

Tabell 3. Innehåll i sekvensmixen

Innehåll	Mängd
Vatten	5,2 µl
Buffert	1,5 µl
Primer (1 pmol/µl)	1,8 µl
Big Dye	1 µl

Primrar som användes vid sekvensreaktionen redovisas i Tabell 4.

Tabell 4. Primrar

Målregion för primer	Benämning
U1	583
U2	584
U3	631
U4	538
U5	Kag011
U6	Kag006
U8	Kag008

Sekvensering

Först utfördes en fällning av sekvensprodukten genom att 27 µl 95% etanol, 1 µl 125 mM EDTA och 1 µl 3M Na-acetat tillsattes sekvensprodukten, samt tvätt med 40 µl 70% etanol med 15 minuter efterföljande centrifugering i 1600 rpm och därefter tillsattes 12 µl formamid. Därefter utfördes sekvenseringen.

Sekvensanalys

Efter sekvenseringen utfördes en redigering av sekvenserna, där de svårlästa avsnitten i början och slutet av sekvensen plockades bort. Därefter sattes sekvenserna ihop till en fullständig gen, en sk. contig, och PCR-primersekvenserna avlägsnades. Den fullständiga genen kontrollerades att det

fanns god överensstämmelse mellan delsekvenserna. Efter det jämfördes sekvenserna med befintliga sekvenser i databaserna Ribosomal Database Project - II och GenBank.

RESULTAT

Vid identifiering och registrering av presumptiva *Lactobacillus* spp. kunde 35 stycken olika bakteriekolonier hittas vid makroskopisk undersökning (punkt 6 i laboriemetodik). Vid gramfärgning och mikroskopisk morfologi av dessa, hade 18 stycken ett mikroskopiskt utseende överensstämmande med *Lactobacillus* spp. (grampositiv/gramvariabel stav). Av dessa 18 bedömdes 16 stycken som gramvariabla och övriga som grampositiva. 17 stycken bedömdes ej tillhöra *Lactobacillus* spp. Vid renstrykning av de 18 stycken presumptiva *Lactobacillus* spp., samt gramfärgning efter odling kunde ytterligare 4 stycken bedömas ej tillhöra *Lactobacillus* spp. (punkt 8 i laboriemetodik).



Figur 1. *Lactobacillus* på MRS-agar.

Vid framodling av olika kolonier med ett makroskopiskt utseende överensstämmande med presumptiva *Lactobacillus* spp. (grampositiva eller gramvariabla kocker eller stavar) från ursprungsplattorna, kunde växt enbart påvisas på en platta (punkt 9 i laboriemetodik). Detta moment upprepades och bakterier från renstrykningsplattorna samt från den platta på vilken bakterier hade växt fram, ströks ut (punkt 7 i laboriemetodik). Efter anaerob inkubering av dessa plattor kunde växt påvisas på 33 stycken plattor. Dessa 33 isolat fick benämningen nummer 1 t.o.m. 33 innan nedfrysning.

Vid framodling av de nedfrysta isolaten kunde växt påvisas på samtliga blodagarplattor, samt på alla MRS-plattor utom den för isolat nummer 25. API-test på isolat nummer 25 utfördes därför från blodagar istället för MRS-agar.

Vid avläsning av API CH 50-testerna registrerades ett jäsningsresultat som positivt (+) vid gult eller svart (brunn nummer 25) färgomslag, negativt (-) vid lila färg eller som osäkert (?) vid ett färgomslag som inte överensstämmer med positivt resultat. Vid avläsning av API-testet för isolat nummer 9 kunde ett genomgående negativ resultat påvisas. API-testet för isolat nummer 9 utfördes därför på nytt.



Figur 2. API-test för *Lactobacillus acidophilus* 3.

Resultaten från identifieringsprogrammet för API 50 CH redovisas i Tabell 5. De numerära benämningarna av bakterierna i Tabell 5 är de benämningar som isolaten fick i identifieringsprogrammet för API 50 CH.

Isolat vars identifiering bedömdes som ”unacceptabel profile/low discrimination/doubtful profile” av identifieringsprogrammet, bedömdes ej kunna identifieras säkert med API 50 CH. Dessa isolat var nummer 8, 9, 14, 18, 20, 26, 27, 28, 29, 32 och 33.

Isolat nummer 9, 14, 27, 29 och 32 valdes ut för identifiering med PCR och sekvensanalys av 16S rRNA genen.

Tabell 5. Resultat av API 50 CH samt ursprung

Isolat	API 50 CH	Häst
1	<i>L. plantarum</i> 2	Hagens Zorba
2	<i>L. acidophilus</i> 1	Hagens Zorba
3	<i>L. acidophilus</i> 1	Hagens Windsor
4	<i>L. plantarum</i> 2	Hagens Windsor
5	<i>L. acidophilus</i> 1	Hagens Windsor
6	<i>L. acidophilus</i> 1	Hagens Windsor
7	<i>L. acidophilus</i> 1	Hagens Windsor
10	<i>L. acidophilus</i> 3	Miracoli
11	<i>L. acidophilus</i> 1	Miracoli
12	<i>L. plantarum</i> 2	Miracoli
13	<i>L. fermentum</i>	Miracoli
15	<i>L. fermentum</i>	Miracoli
16	<i>Leuconostoc lactis</i>	Miracoli
17	<i>L. acidophilus</i> 3	Pantara
19	<i>L. plantarum</i> 2	Pantara
21	<i>L. acidophilus</i> 3	Pantara
22	<i>L. plantarum</i> 2	Pantara
23	<i>Leuconostoc lactis</i>	Miracoli
24	<i>L. acidophilus</i> 3	Maberto
25	<i>L. acidophilus</i> 3	Maberto
30	<i>L. plantarum</i> 2	Paint Ball
31	<i>L. fermentum</i>	Paint Ball

Vid kontroll av förekomst av DNA-produkter i agarogelen, kunde det med UV-ljus påvisas att samtliga prover med PCR-produkter innehöll DNA. PCR-produkten var även av rätt storlek och enbart ett band kunde påvisas i varje provfil. Utifrån bandens utseende valdes de fem proverna med tydligast och mest distinkta band ut för rening och sekvensanalys.

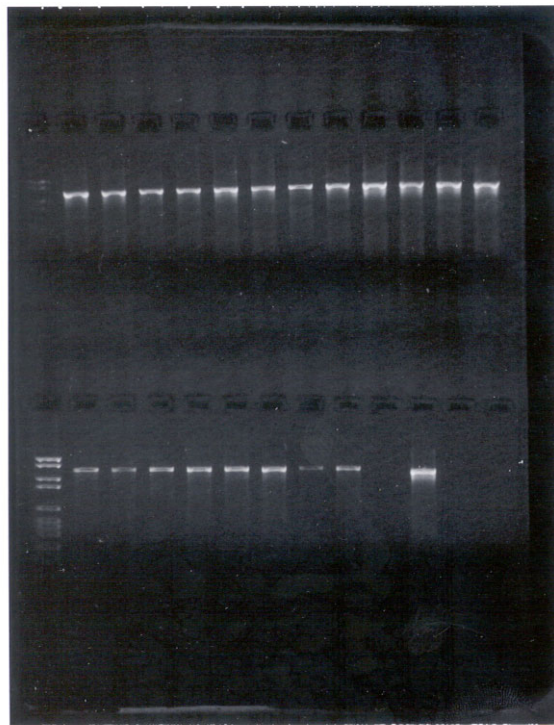


Bild 3. Agarosgelelektrofores av PCR-produkterna. Längst till vänster i övre och nedre raderna av provfilarna ses DNA-storleksmarkörer. I den övre raden finns reaktionsblandningarna för isolat nummer 9, 14 och 27 (fyra stycken reaktionsblandningar per isolat) sett från vänster till höger. I nedre raden finns reaktionsblandningarna för isolat nummer 29 och 32 sett från vänster till höger, samt en negativ och en positiv kontroll.

Vid sekvensanalysen av isolat nummer 9, 14 och 27 kunde en god upplösning av sekvensen ses med liten bakgrundstörning. U1-sekvensen hos isolat nummer 32 kunde inte användas eftersom det fanns mycket bakgrundstörning och sekvensen kunde inte läsas med god säkerhet. Vid jämförelse mot databaserna kunde en mycket god överensstämmelse ses hos alla isolat utom isolat nummer 29. Sekvenserna av isolaten 9, 14 och 27 representerar samma art, *L. equi*, men är ej identiska och har därför troligen olika ursprung. Sekvenserna av isolat nummer 29 representerar troligen en ny art inom genus *Lactobacillus*. Den kan eventuellt även representera en art, som inte tidigare har sekvenserats. Resultat redovisas i Tabell 6.

Tabell 6. Resultat av sekvensering av 16S rRNA och ursprung

	Antal nukleotider	Kommentar	Resultat	Häst
Isolat				
9	1467	Bra sekvensdata	<i>L. equi</i> (99,9% likhet med typstammen). En nukleotidskillnad mot typstammen.	Miracoli
14	1467	Bra sekvensdata	<i>L. equi</i> (99,9% likhet med typstammen). Ej identisk med isolat 9. Två nukleotidskillnader mot typstammen.	Miracoli
27	1467	Bra sekvensdata	<i>L. equi</i> (99,9% likhet med typstammen). Ej identisk med isolat 9 eller 14. Två nukleotidskillnader mot typstammen.	Maberto
29	628 + 856	Ej bra sekvensdata	<i>Lactobacillus</i> sp. Blir två contigs, som båda har högst sekvenslikhet (98,8 resp. 98,6%) med en bakteriestam, som ej har kunnat odlats (klon wet 199). <i>L. salivarius</i> hamnar också relativt högt på listan.	Paint Ball
32	1481	Bra sekvensdata	<i>L. mucosae</i> (99,9% likhet med stam RA2071, d.v.s. en nukleotidskillnad).	Walentino

DISKUSSION

Arbetet vid laborationerna har fungerat bra utan större svårigheter. Vid undersökning av den mikroskopiska morfologin kunde fastställas att merparten av de gramfärgade kolonierna var gramvariabla. Detta kan förklaras med att äldre lakobacillkulturer från mycket sura miljöer kan tendera till att bli gramnegativa (Danielsson-Tham & Greko, 2002). En annan förklaring kan vara felaktigt utförande vid gramfärgning.

Anledning till dåligt odlingsvar vid ursprungliga framodlingen av bakterieisolat i punkt 9 i laboratoriemetodik har ej kunnat fastställas. Flera olika anledningar har kunnat uteslutas. Bland dessa finns bristande anaerob miljö vid odlingen, vilket säkerställts genom användande av indikatorstrips i anaerobklockorna och felaktigt odlingsstemperatur, vilket säkerställts genom kontroll av värmeskåpens temperatur. En möjlighet kan vara dålig vitalitet hos bakterierna efter kylskåpsförvarning.

Det fullständigt negativa resultatet vid den första avläsning av API-testet för isolat nummer 9, kan ha orsakats av att inga bakterier överlevt vid uppslamningen i API 50 CH medium och att bakterierna dog under den anaeroba inkubationstiden i

värmeskåpet. Möjligheten att isolat nummer 9 ej är en laktobacill har uteslutits, eftersom ett annorlunda resultat kunde avläsas då isolatet testades en andra gång.

Vid urval av isolat för fortsatt identifiering med PCR och sekvensering av 16S rRNA genen, begränsades antalet isolat till 5 stycken. Begränsningen av antalet beror på tids- och ekonomisk begränsning. De isolat vars preliminära bakteriella identifiering vid API-testet redan hade påvisats (d.v.s. isolat 8 och 26) hos ett annat isolat, valdes bort vid urvalet. Av de kvarvarande isolaten valdes 5 stycken isolat ut, med utgångspunkt från den preliminära identifieringen. Urvalet anpassades till möjlighet att få så många nya identifierade *Lactobacillus*-stammar som möjligt.

Eftersom DNA-produkter kunde påvisas i samtliga PCR-prover efter elektrofores, kan slutsatsen dras att primrarna som användes var väl anpassade till den gen, vilken skulle amplifieras och att de är lämpliga att använda vid PCR av 16S rRNA-genen tillhörande *Lactobacillus* spp. Primrarna hade också bara amplifierat den gen som var avsedd att amplifieras, vilket kunde visas genom att PCR-produkten var av rätt storlek. Eftersom enbart ett band kunde ses i varje provfil, kunde man även påvisa att primrarna bara hade passat till de regioner på genen som de var avsedda för.

Anledningen till att U1-sekvensen inte kunde användas hos isolat nummer 32 kan vara att provet inte var helt torrt innan sekvenseringen, kontamination av provet eller en störning hos polymeren. Det var möjligt att identifiera bakterien, trots att U1-sekvensen inte kunde användas. Orsaken till att det blev två contigs, då sekvensen hos isolat nummer 29 sattes samman beror på att datorprogrammet inte kunde hitta överlappningarna. Detta beror på att sekvensen från U2-primern inte var tillräckligt lång.

I likhet med resultat från äldre studier har vid det här försöket *L. plantarum*, *L. equi* (Morotomi et al, 2002) och *L. mucosae* (Rafat et al, 2005) lyckats isoleras. Att vissa stammar som isolerats i tidigare försök inte har kunnat påvisas i detta försök, kan bero på att dessa ej finns hos de provtagna hästarna eller att vissa av stammarna ej har kunnat identifieras. Det går i nuläget inte att dra en parallell till resultat från tidigare liknande försök gjorda under svenska förhållanden, eftersom sådana försök inte existerar.

Fortsatt forskning kring dessa isolerade stammar behövs för att kunna fastställa dess probiotiska potential. I denna forskning bör bl.a. tolerans mot syra och gallsyra, adhesionsförmåga till tarmepitel, kolonisationsförmåga av tarm och produktion av antimikrobiella substanser fastställas. Därefter bör placebokontrollerade och ”blinda” försök utföras på hästar. Isolerade stammar bör även undersökas angående förekomst av resistensgener. Detta för att förhindra att resistensgener överförs till andra bakterier, vid användandet av en framställd probiotisk produkt innehållande de isolerade stammarna.

Utökad forskning bör även ske generellt inom användningsområdet probiotika på häst. Denna bör specifikt utföras på svenska hästar med stammar framtagna för att passa de svenska hästarna. Dessutom bör forskningen riktas mot probiotikaprofylax och -behandling vid specifika sjukdomar och agens.

Vid framtida liknande försök bör en större del av hästpopulationen inbegripas av försöket. Man bör bl.a. isolera laktobaciller från ett större antal hästar, från grupper av hästar med varierande geografisk lokalisation och från hästar med en

större åldersvariation (f.f.a. yngre hästar och föl) än vad som har kunnat genomföras i detta försök. Detta för att få ett material som bättre överensstämmer med den svenska hästpopulationen.

Fortsatt forskning bör utföras på isolat nummer 29 för att karakterisera bakterien närmare och se om den kan beskrivas som en ny art. Vid eventuell fortsatt forskning bör sekvenseringen göras om för att få en perfekt sekvens. Man bör också sekvensera de isolat, som inte säkert kunde identifieras i denna studie.

KONKLUSION

Vid detta försök kunde följande *Lactobacillus* spp identifieras: *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. equi*, *L. mucosae* och en ny *Lactobacillus* sp. från normala tarmfloran hos friska svenska hästar. Dessutom kunde mjölksyrabakterien *Leuconostoc lactis* påvisas.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. I: Lactic acid bacteria – microbiology and functional aspects, 3. ed. 1-66. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Baker, J.R, Leyland, A. (1973) Diarrhoea in the horse associated with stress and tetracycline therapy. *Vet Rec*, 583-584.
- Bin-Nun, A., Bromiker, R., Wilschanski, M., Kaplan, M., Rudensky, B., Caplan, M., Hammerman, C. (2005) Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 147, 192-196.
- Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Lindholm, A., Gunnarsson, A. (1997) *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Vet J* 29, 4, 279-284.
- Båverud, V., Franklin, A., Gunnarsson, A., Gustafsson, A., Hellander-Edman, A. (1998) *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet J* 30, 6, 482-488.
- Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Aspán, A., Gunnarsson, A. (2003) *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J* 35, 5, 465-471.
- de Man, J.C., Rogosa, M., Sharp, M.E. (1960) A medium for cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 23, 1, 130-135.
- Danielsson-Tham, M-L., Greko, C. (2002) Kompendium till laborationskurser i bakteriologi och bakteriologisk köttkontroll. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- D'Souza, A.L., Rajkumar, C., Cooke, J., Bulpitt, C.J. (2002) Probiotic in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* 324, 1361-1366.
- Guarner, F., Schaafsma, G.J. (1998) Probiotics. *Int J Food Microbiol* 39, 237-238.
- Herías, M.V., Koninkx, J.F.J.G., Vos, J.G., Huis in't Veld, J.H.J., van Dijk, J.E. (2005) Probiotic effects of *Lactobacillus casei* on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *Int J Food Microbiol* 103, 143-155.

- Johansson, Karl-Erik. (2003) Identifiering och karakterisering av bakterier genom sekvensanalys av genen för 16S rRNA. SVA-vet 3, 4-8.
- Kim, L., Morley, P.S., Traub-Dargatz, J.L., Salman, M.D., Gentry-Weeks, C. (2001) Factors associated with Salmonella shedding among equine colic patients at a veterinary teaching hospital. J Vet Med Assoc 218, 740-748.
- Madden, J.A.J., Plummer, S.F., Tang, J., Garaiova, I., Plummer, N.T., Herbison, M., Hunter, J.O., Shimada, T., Cheng, L., Shirakawa, T. (2005) Effects of probiotics on preventing disruption of the intestinal microflora following antibiotic therapy: A double-blind, placebo-controlled pilot study. Int Immunopharmacol 5, 1091-1097.
- Metchnikoff, E. (1908) The prolongation of life: optimistic studies. New York: GP Putnam's Sons.
- Montes, R.G, Bayless, T.M., Saavedra, J.M., Perman, J.A. (1995) Effects of milks inoculated with Lactobacillus acidophilus or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. J Dairy Sci 78, 1657-1664.
- Moreira, J.L.S., Mota, R.M., Horta, M.F., Teixeira, S.M.R., Neumann, E., Nicoli, J.R., Nunes, Á.C. (2005) Identification to the species level of Lactobacillus isolated in probiotic studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. BMC Microbiol 5, 15.
- Morotomi, M., Yuki, N., Kado, Y., Kushiro, A., Shimazaki, T., Watanabe, K., Yuyama, T. (2002) Lactobacillus equi sp. nov., a predominant intestinal Lactobacillus species of the horse isolated from faeces of healthy horses. Int J Syst Evol Microbiol 52, 211-214.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. (2005) Medical microbiology. 5. ed. Philadelphia: Elsevier Mosby.
- Nousiainen, J., Javanainen, P., Setälä, J., von Wright, A. (2004). Lactic acid bacteria as animal probiotics. I: Lactic acid bacteria – microbiology and functional aspects, 3. ed. 547-580. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Oksanen, P.J., Salminen, S., Saxelin, M., Hämäläinen, P., Ihanola-Vormisto, A., Muurasniemi-Isoviita, L., Nikkari, S., Oksanen, T., Pörsti, I., Salminen, E., Siitonen, S., Stuckey, H., Toppila, A., Vapaatalo, H. (1990) Prevention of travellers' diarrhea by Lactobacillus GG. Ann Med 22, 53-56.
- Ouwehand, A.C., Vesterlund, S. (2004) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. I: Lactic acid bacteria – microbiology and functional aspects, 3. ed. 375-395. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Parraga, M.E., Spier, S.J., Thurmond, M., Hirsh, D. (1997) A clinical trial of probiotic administration for prevention of Salmonella shedding in the postoperative period in horses with colic. J Vet Intern Med 11, 1, 36-41.
- Rafat, A.M, Jassim, A. Scott, P.T., Trebbin, A.L., Trott, D., Pollit, C.C. (2005) The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. FEMS Microbiol Lett 248, 75-81.
- Rautanen, T., Isolauri, E., Salo, E., Vesikari, T. (1998) Management of acute diarrhoea with low osmolarity oral rehydration solutions and Lactobacillus strain GG. Arch Dis Child 79, 157-160.
- Stiles, M.E. & Holzapfel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol 36, 1-29.
- Ström, K. (2005) Fungal inhibitory lactic acid bacteria: characterisation and application of Lactobacillus plantatum MiLAB 393. Akad.avh. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.

- Suegara, N., Morotomi, M., Watanabe, T., Kawai, Y., Mutai, M. (1975) Behaviour of microflora in the rat stomach: adhesion of lactobacilli to the keratinized epithelial cells of the rat stomach in vitro. *Infect Immun* 12, 1, 173-179.
- Vanderhoof, J.A., Whitney, D.B., Antonson, D.L., Hanner, T.L., Lupo, J.V., Young, R.J. (1999) Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 135, 564-568.
- Wagner, R.D., Dohnalek, M., Hilty, M., Vazquez-Torres, A., Balish, E. (2000) Effects of probiotic bacteria on humoral immunity to *Candida albicans* in immunodeficient bg/bg-nu/nu and bg/bg-nu/+ mice. *Rev Iberoam Microbiol* 17, 55-59.
- Weese, J.S., Anderson, M.E.C., Lowe, A., Monteith, G. (2003) Preliminary investigation of probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in horses: fecal recovery following oral administration and safety. *Can Vet J* 44, 299-302.
- Weese, J.S., Andersson, M.E.C., Lowe, A., Penno, R., Da Costa, T.M., Button, L., Goth, K.C. (2004) Screening the equine intestinal microflora for potential probiotic organisms. *Equine Vet J* 36, 4, 351-355.
- Weese, J.S., Rousseau, J. (2005) Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. *J Am Vet Med Assoc* 226, 2031-2034.
- Weston, S., Halbert, A., Richmond, P., Prescott, S.L. (2005) Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomized controlled trial. *Arch Dis Child* 90, 892-897.
- Yuki, N., Shimazaki, T., Kushiro, A., Watanabe, K., Uchida, K., Yuyama, T., Morotomi, M. (2000) Colonisation of the stratified squamous epithelium of the nonsecreting area of horse stomach by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 66, 11, 5030-5034.
- Yuyama, T., Yusa, S., Takai, S., Tsubaki, S., Kado, Y., Morotomi, M. (2004) Evaluation of a host-specific *Lactobacillus* probiotic in neonatal foals. *J Appl Res Vet Med* 2, 1, 26-33.
- Zhong, W., Millsap, K., Bialkowska-Hobrzanska, H., Reid, G. (1998) Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. *Appl Environ Microbiol* 64, 7, 2418-2423

Tack

Min familj för allt stöd under min veterinära utbildning.

Till min huvudhandledare Karl-Erik Johansson, SLU, och min biträdande handledare Karel Krovacek, SLU.

Till Lise-Lotte Fernström, SLU, för assistans vid laboratoriearbetet.

Till Marianne Persson, SVA, för hjälp vid PCR och sekvensanalys.

Till Djursholms ridskola för lån av hästar till provtagning.

Till ATG för deras finansiella bidrag till det projekt, som mitt arbete är en del av.