

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Untersuchungen zur mikrobiologischen Diagnostik und
antibiotischen Therapie bei Hunden mit Durchfall

von Melanie Werner

aus Fürth

München 2021

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin P. Märtlbauer
Priv.-Doz. Dr. Elke Rauch
Priv.-Doz. Dr. Nadja Jeßberger
Univ.-Prof. Dr. Karin Schwaiger

Tag der Promotion: 17.07.2021

Mutt, Timmi, Luna

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
II.	PUBLIKATION 1: ÜBERSICHTSARTIKEL	5
III.	PUBLIKATION 2: ORIGINAL-PUBLIKATION ZUR STUDIE 1.....	51
IV.	PUBLIKATION 3: ORIGINAL-PUBLIKATION ZUR STUDIE 2.....	63
V.	DISKUSSION.....	77
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	91
VII.	SUMMARY	95
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	99
IX.	DANKSAGUNG.....	113

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
≥	Vergleichszeichen: größer als oder gleich wie
<	Vergleichszeichen: kleiner als
°C	Grad Celsius
16S-rRNA	16S-ribosomale-Ribonukleinsäure
Abb.	Abbildung
AD	akuter Durchfall
AHDS	akutes hämorrhagisches Durchfallssyndrom
bzw.	beziehungsweise
CADS-Index	canine acute diarrhea severity index
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
ca.	circa
<i>C. hiranonis</i>	<i>Clostridium hiranonis</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
d. h.	das heißt
DI	Dysbiose-Index
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	et alii (und andere)
FMT	fäkale Mikrobiota-Transplantation
i. v.	intravenös
KBE	koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
v. a.	vor allem
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Durchfallerkrankungen stellen einen wichtigen Krankheitskomplex in der tierärztlichen Praxis dar. So befragten HUBBARD et al. und EDWARDS et al. Hundehalter nach dem Auftreten von Durchfall in den letzten 2 Wochen. Zwischen 2,2 % und 14,9 % gaben an, dass ihr Hund in diesem Zeitraum mindestens einmal Durchfall zeigte (EDWARDS et al., 2004; HUBBARD et al., 2007). Meist handelt es sich beim akuten unkomplizierten Durchfall um eine selbstlimitierende Erkrankung – der Auslöser ist oft nicht nachvollziehbar. Infektiöse bakterielle Ursachen sind selten für das Durchfallgeschehen verantwortlich (CAVE et al., 2002; MARKS und KATHER, 2003; SABSHIN et al., 2012; ANDERSEN et al., 2018). Das Wohlbefinden der Tiere kann bei dieser akuten, in der Regel selbstlimitierenden Erkrankung durch symptomatische Therapie verbessert werden.

Für den chronischen Durchfall des Hundes sind häufig Futtermittelunverträglichkeiten verantwortlich, weswegen oft eine Umstellung auf eine geeignete Diät zur klinischen Besserung der Patienten führt (ALLENSPACH et al., 2016; KAWANO et al., 2016; VOLKMANN et al., 2017; CERQUETELLA et al., 2020; TØRNQVIST-JOHNSEN et al., 2020). Über infektiöse bakterielle Ursachen des chronischen Durchfalls ist nur wenig bekannt.

Die intestinale Mikrobiota stellt ein komplexes Ökosystem an diversen, vor allem anaeroben, Bakterien im Darmlumen dar (SOMMER und BÄCKHED, 2013). Die Mikrobiota als Alliierte des Wirtes leistet einen wichtigen Beitrag zum Schutz vor pathogenen Bakterien (KIM et al., 2017). Zudem kann sie immun-modulatorisch wirken und stellt metabolische Abbauprodukte bereit, die im Körper genutzt werden können (APPLEBY und WALTERS, 2014; FJALSTAD et al., 2018). Bei verschiedenen Erkrankungen wie dem akuten und chronischen Durchfall kann es zu einer Störung der Mikrobiota und zu einer Dysbiose kommen (SUCHODOLSKI et al., 2012; HONNEFFER et al., 2014; MINAMOTO et al., 2015; ALSHAWAQFEH et al., 2017). Außerdem können Medikamente, wie zum Beispiel Antibiotika, einen nicht unerheblichen Einfluss auf die intestinale Mikrobiota nehmen (MANCHESTER et al., 2019; WHITTEMORE et al., 2019; PILLA et al., 2020). Informationen über den Einfluss von Durchfallerkrankungen und von Antibiotika auf die intestinalen Bakterien können daher helfen,

Krankheitsprozesse besser zu verstehen und Medikamente gezielter einzusetzen. Das intestinale Mikrobiom stellt die Gesamtheit des Genoms aller Mikroorganismen im Darm dar (TURNBAUGH et al., 2007).

Neue molekulargenetische Methoden sind dafür geeignet, die Mikrobiota im Kot zu evaluieren und somit Informationen über dieses komplexe intestinale Ökosystem zu geben. Ein polymerase-chain-reaction(PCR)-basiertes Verfahren ist der Dysbiose-Index (DI). Dieser Index ist eine numerische Größe und wird unter Zuhilfenahme der Menge an Bakterien sieben verschiedener Gruppen (*Turicibacter*, *Streptococcus*, *Escherichia (E.) coli*, *Blautia*, *Fusobacterium*, *Clostridium (C.) hiranonis* und Gesamtbakterienanzahl) kalkuliert. Ein $DI \geq 2$ wird als Dysbiose, ein Index < 0 als Normobiose definiert. Dazwischen besteht ein Graubereich (ALSHAWAQFEH et al., 2017; HEILMANN und STEINER, 2018).

Eine traditionellere Methode zur bakteriellen Diagnostik aus Kotproben stellt die kulturelle Untersuchung dar (BAUER et al., 2001). Dieses Verfahren wird, im Gegensatz zum DI, in Deutschland seit Jahrzehnten von verschiedenen Laboren angeboten und breit in der Tiermedizin genutzt. Dabei wird von verschiedenen kommerziellen Laboren nicht nur an den einsendenden Tierarzt berichtet, ob sogenannte klassische enteropathogene Bakterien vorhanden sind, sondern auch eine Interpretation der Darmflora vorgenommen. Dies basiert jedoch allein auf dem aeroben Wachstum der Bakterien.

Weiterhin kann mit Hilfe von klassischen kulturellen Methoden auch auf Antibiotikaresistenzen getestet werden. Häufig werden hierbei nur einzelne koloniebildende Einheiten (KBE) gewählt und ein Resistenztest durchgeführt (GRONVOLD et al., 2010). Dabei spiegelt das Resistenzmuster dieser einzelnen KBEs jedoch nicht das Resistenzverhalten der gesamten intestinalen Mikrobiota wider, und die Translation der gewonnenen Informationen auf die intestinale Resistenzlage erscheint schwierig.

Antibiotika können die Resistenzlage der intestinalen Mikrobiota hochgradig verändern und sollten deswegen nur nach korrekter Indikationsstellung gegeben werden. Sie können zudem negative Symptome beim Individuum verursachen und die ansässige Mikrobiota negativ beeinflussen (KUNKLE et al., 1995; WILLARD et al., 1998; SCHULZ et al., 2011; PILLA und SUCHODOLSKI, 2019). Dennoch werden Antibiotika beim akuten unkomplizierten Durchfall des Hundes noch in 30

– 70 % der Fälle eingesetzt, obwohl selten eine klare Indikation gegeben ist (GERMAN et al., 2010; SINGLETON et al., 2019; LUTZ et al., 2020). Häufig basiert die Verschreibung dieser Medikamentengruppe beim akuten Durchfall auf anekdotischem Wissen von Tierärzten. Beim chronischen Durchfall werden Antibiotika ebenfalls öfter als benötigt eingesetzt (KILPINEN et al., 2011; KILPINEN et al., 2015). Auch hier sollten sie nur nach klarer Indikationsstellung verabreicht werden. Negative Effekte auf Wirt und Mikrobiota sollten trotz einer eventuellen Besserung des Durchfallgeschehens durch Antibiotikagabe bei chronischen Enteropathien unbedingt mitberücksichtigt werden.

Ziel der ersten Publikation war es, einen Überblick über die vorhandene Literatur zum Einsatz und zu möglichen Indikationen von Antibiotika bei Hunden mit verschiedenen Formen akuter Durchfallerkrankungen zu geben. Zudem wurden in dieser Publikation Informationen über Antibiotika zu klinischen Nebenwirkungen, zum Einfluss auf die intestinale Mikrobiota und zur Entwicklung von Resistenzen zusammengefasst. Ebenso wurden Hinweise zu Alternativen zur antibiotischen Therapie bei akuten Durchfällen gegeben.

Ziel der zweiten Publikation war es, die mikrobielle fäkale Zusammensetzung bei Hunden mit chronischem Durchfall im Vergleich zu gesunden Kontrollhunden mit Hilfe verschiedener diagnostischer Mittel zu evaluieren. Hierbei wurde zum einen der DI und zum anderen eine bakterielle Kotkultur, welche bei drei verschiedenen kommerziellen deutschen veterinärmedizinischen Laboren geblindet durchgeführt wurde, herangezogen. Diese verschiedenen mikrobiologischen Diagnostika wurden abschließend untereinander auf Übereinstimmung untersucht. Diese Arbeit wird im Folgenden auch als Studie 1 bezeichnet.

Ziel der dritten Publikation war es zu untersuchen, ob Hunde mit akutem unkompliziertem Durchfall klinisch von einer antibiotischen Therapie im Vergleich zu einer Placebogruppe profitieren. Amoxicillin-Clavulansäure wurde zu diesem Zweck für 7 Tage oral eingegeben. Dieses Antibiotikum wurde in der Studie gewählt, da es eines der am häufigsten verwendeten Antibiotika beim akuten Durchfall des Hundes handelt. Der Einfluss des akuten Durchfallgeschehens und der Antibiotikagabe auf die intestinale Mikrobiota wurde evaluiert.

Nicht zuletzt wurde der Verlauf (vor, während und nach der Antibiotika- oder Placebo-Therapie) des Anteils der amoxicillinresistenten fäkalen *E. coli* an der

Gesamtheit der isolierbaren fäkalen *E. coli* mit Hilfe von klassischer Mikrobiologie untersucht. Diese Arbeit wird als Studie 2 bezeichnet.

II. PUBLIKATION 1: ÜBERSICHTSARTIKEL

Antibiotikaeinsatz beim akuten Durchfall des Hundes – Übersicht potenzieller Risiken, Indikationen und Alternativen

Melanie Werner

Medizinische Kleintierklinik, Zentrum für klinische Tiermedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Stefan Unterer

Medizinische Kleintierklinik, Zentrum für klinische Tiermedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Tierärztliche Praxis Kleintiere: veröffentlicht

Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2021; 49(02): 110-120; DOI:

10.1055/a-1395-2001

Übersichtsartikel

Antibiotikaeinsatz beim akuten Durchfall des Hundes – Übersicht potenzieller Risiken, Indikationen und Alternativen

Use of antimicrobials in acute canine diarrhea – overview of potential risks, indications and alternatives

Autoren

Melanie Werner, Stefan Unterer

Institut

Medizinische Kleintierklinik, Zentrum für Klinische Tiermedizin,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Schlüsselwörter

Kanin, Gastroenteritis, Metronidazol, Mikrobiom, Mikrobiota

Key words

Canine, gastroenteritis, metronidazole, microbiome, microbiota

eingereicht 31.12.2020

akzeptiert 09.02.2021

Bibliografie

Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2021; 49(02): 110-120

DOI: 10.1055/a-1395-2001

© 2021. Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14,

70469 Stuttgart, Germany

ISSN 1434-1239

Korrespondenzadresse

Melanie Werner

Medizinische Kleintierklinik

Zentrum für Klinische Tiermedizin

Ludwig-Maximilians-Universität München

Veterinärstraße 13

80539 München

Deutschland

melanie.werner@medizinische-kleintierklinik.de

Zusammenfassung

Antibiotika werden bei Hunden mit Magen-Darm-Problemen wie akutem Durchfall (AD) in Deutschland häufig eingesetzt. In Einklang mit den weltweiten Bemühungen, den Antibiotikaeinsatz einzuschränken, soll diese Literaturübersicht einen Überblick über den rationalen und sinnvollen Einsatz von Antibiotika beim AD liefern. Antibiotika können zu gastrointestinalen Nebenwirkungen, negativen Auswirkungen auf die intestinale Mikrobiota und zur Entstehung von Resistenzen führen. Es gibt auch Hinweise darauf, dass chronische immunologische Erkrankungen durch die Verabreichung von Antibiotika ausgelöst werden können. Daher sollten sie bei unkompliziertem AD ohne Anzeichen einer Sepsis oder einer systemischen Entzündungsreaktion nicht verabreicht werden. Darüber hinaus spielen enteropathogene Bakterien bei der Ätiologie akuter Durchfälle beim Hund kaum eine Rolle. Bei bestimmten Krankheitsbildern, wie dem akuten hämorrhagischen Durchfallsyndrom, wird eine Antibiotikatherapie nur dann empfohlen, wenn Hinweise auf eine bakterielle Translokation mit nachfolgender Sepsis vorliegen. Dagegen ist die Gabe von Antibiotika bei der Parvovirose aufgrund der immunologischen Inkompetenz des Hundes, die durch die hochgradige Neutropenie verursacht wird, unumgänglich.

Abstract

Antibiotics are frequently used in Germany in dogs with gastrointestinal disorders such as acute diarrhea. In line with global efforts to limit antibiotic use, this literature review aims to provide a guideline for the rational and judicious use of antibiotics in acute canine diarrhea. Antibiotics can lead to gastrointestinal side effects, negative effects on the intestinal microbiota and increased occurrence of resistant bacteria. There is also evidence that chronic immunological diseases can be triggered by the administration of antibiotics. Therefore, they should not be given in acute uncomplicated diarrhea without signs of sepsis or systemic inflammatory reaction. In addition, enteropathogenic bacteria usually do not play a role in the etiology of acute diarrhea. For certain clinical pictures such as acute hemorrhagic diarrhea syndrome, antibiotic therapy should only be recommended if there

are indications of bacterial translocation with subsequent sepsis. In the case of parvovirus, on the other hand, the administration of antibiotics is unavoidable due to the immunological incompetence of the dog caused by the severe neutropenia.

Einleitung

Antibiotika spielen seit ihrer Einführung in den 1940er Jahren eine zentrale Rolle in der Human- und Veterinärmedizin. Die in der Veterinärmedizin am häufigsten verwendeten Antibiotika sind Amoxicillin-Clavulansäure und Metronidazol. Gastrointestinale Erkrankungen stellen einen der häufigsten Gründe für den Einsatz von Antibiotika dar (1-4). In den letzten Jahrzehnten hat die Entwicklung multiresistenter Keime und schwer behandelbarer bakterieller Infektionen zugenommen. Dies hat das moderne Medizinwesen dazu veranlasst, auf eine Einschränkung des Einsatzes von Antibiotika zu drängen (5-7). In verschiedenen Ländern gibt es inzwischen Bestrebungen, Leitlinien für den Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin zu erstellen (8-10). Darüber hinaus bestehen in einigen Ländern Einschränkungen durch den Gesetzgeber. Antibiotika werden in Deutschland jedoch nach wie vor ohne klare Indikation bei Hunden mit akutem und chronischem Durchfall angewendet. Bezüglich des akuten Durchfalls (AD) haben Erhebungen gezeigt, dass in verschiedenen Ländern in 30–71% der Fälle Antibiotika zum Einsatz kamen, obwohl es oft keine oder nur eine unzureichende Indikation und keine eindeutige mikrobiologische Diagnose gab (11-14). Abb. 1 veranschaulicht die Resultate einer Umfrage unter Tierärzten: Anders als in Schweden, wo der Antibiotikaeinsatz in der Tiermedizin seit einigen Jahren gesetzlich stark reglementiert ist, werden in Deutschland und Österreich Antibiotika immer noch häufig bei Hunden mit AD eingesetzt. Ziel dieser Literaturübersicht ist zu zeigen, wie Antibiotika auf den Organismus und die kohärente Mikrobiota wirken. Darüber hinaus werden die Indikationen für die Gabe von Antibiotika bei AD beschrieben und aufgezeigt, wann sich durch deren Anwendung kein zusätzlicher Nutzen ergibt.

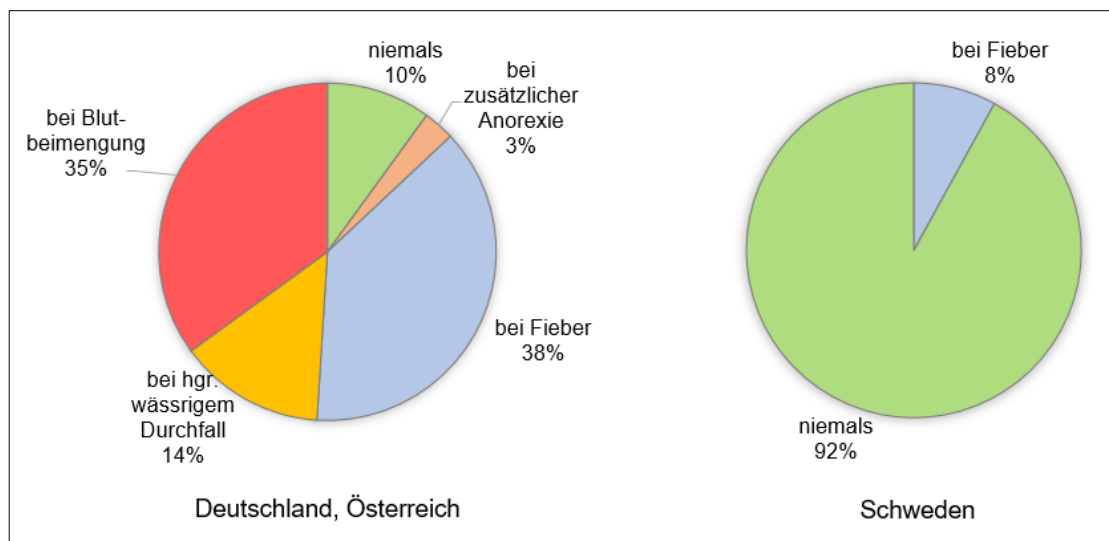


Abb. 1 Umfrage unter Tierärzten zu den persönlichen Indikationen für eine antibiotische Therapie bei Hunden mit akutem Durchfall. Daten zur Verfügung gestellt durch die AniCura. Quelle: © M. Werner.

Fig. 1 Survey among veterinarians regarding the personal indication for antibiotic therapy in dogs with acute diarrhea. Data provided by AniCura. Source: © M. Werner.

Einfluss von Antibiotika auf den Gastrointestinaltrakt

Gastrointestinale Nebenwirkungen

Prinzipiell können Antibiotika gastrointestinale Symptome verschlimmern oder verursachen (15, 16). Dieser Effekt hängt von der verwendeten Substanz und vom Alter des Tieres ab (17). Darüber hinaus scheinen die Verabreichungsform des Antibiotikums sowie individuelle Unterschiede relevant zu sein (17). Antibiotika-assoziierte gastrointestinale Symptome wurden bei Menschen, Katzen und Hunden beschrieben (16-25). Bei Hunden sind Informationen über die Anwendung von Metronidazol bei gesunden Tieren bekannt. In einer Studie kam es bei 56% der gesunden Hunde unter der Gabe von Metronidazol Durchfall. Dieser trat 2–3 Tage nach Beginn der Verabreichung auf und verbesserte sich 2–3 Tage nach Absetzen des Antiinfektivums (25). In einer anderen Studie entwickelten 41% der gesunden Hunde während der kombinierten Behandlung mit

Metronidazol und Enrofloxacin Hyporexie, 77% Erbrechen und 100% Durchfall (20). Unter Doxycyclin wurden in einer retrospektiven Studie mit fast 400 Hunden, die unterschiedliche infektiöse Erkrankungen hatten, weniger Nebenwirkungen festgestellt: Erbrechen bei 18,3% und Durchfall bei 7% der Hunde (24).

Studien an gesunden Versuchskatzen untersuchten die gastrointestinalen Nebenwirkungen von Clindamycin und Amoxicillin-Clavulansäure (19, 21). Die Anwendung von Clindamycin führte bei 37,5–50% der Tiere zu Hyporexie und bei 87,5% zu Erbrechen. Alle Katzen hatten während der Anwendung mindestens einmal Durchfall (21). Unter Amoxicillin-Clavulansäure zeigten 53,8% der Katzen Erbrechen und eine veränderte Kotkonsistenz (19).

Bei einer akuten Gastroenteritis scheinen Antibiotika die Symptome nicht zu verschlimmern (26-28), doch können sie eine längerfristige Verschiebung der intestinalen Mikrobiota zur Folge haben (25, 29-31). In einer Studie verschlechterte Amoxicillin-Clavulansäure bei Hunden mit AD im Vergleich zu einem Placebo weder die klinischen Symptome noch die Kotkonsistenz (26). Ähnliche Ergebnisse sind in 2 Arbeiten zur Anwendung von Metronidazol bei AD dokumentiert (27, 28).

Humanmedizinischen Studien zufolge führte eine Antibiotikagabe in 14–33,9% der Fälle zu Durchfall (17). Dies trat häufiger bei hospitalisierten Patienten auf und die Inzidenz unterschied sich nicht zwischen Kindern und Erwachsenen (32, 33). Patienten mit zusätzlichen Erkrankungen, immunsupprimierte Menschen und Menschen im fortgeschrittenen Alter neigten zu einem Antibiotika-assoziierten Durchfallgeschehen (17, 34). In der Humanmedizin fanden sich die Nebenwirkungen im Gegensatz zu den verfügbaren Studien an Hunden und Katzen häufiger bei Penizillinen, Cephalosporinen sowie Clindamycin und weniger häufig bei Fluorchinolonen und Makrolidantibiotika (18, 35-37). Der Durchfall trat während der Antibiotikatherapie und noch bis zu 8 Monate nach der Behandlung auf und dauerte in manchen Fällen mehrere Monate an (32, 33, 37-41). Beim Menschen entwickelt sich eine Antibiotika-getriggerte Diarrhö hauptsächlich im Zusammenhang mit *Clostridioides difficile*-Infektionen (18, 32, 34, 35, 40-44). Diese mit einer schweren Kolitis

verbundene Infektion wird durch die Veränderung der protektiven Darmmikrobiota durch Antibiotika ermöglicht (42-44). Darüber hinaus sind andere schwere durch Antibiotika verursachte Formen von Kolitis dokumentiert (41, 45). In der Veterinärmedizin gibt es diesbezüglich wenige Veröffentlichungen. In einem Fallbericht wurde über eine nekrotisierende Kolitis unter antibiotischer Therapie bei einem Hund berichtet (46).

Fazit: Gastrointestinale Symptome wie Durchfall, Erbrechen und Anorexie können als Nebenwirkung einer Antibiotikatherapie auftreten.

Veränderung der intestinalen Mikrobiota

Bakterien repräsentieren den größten Anteil aller Mikroorganismen im Darm mit über 1000 Spezies und einer Gesamtzahl von $> 10^{14}$, wobei es sich zumeist um Anaerobier handelt (47). Das Darmmikrobiom ist empfindlich gegenüber Antibiotika, die sich im Darm anreichern (48-52). Zusätzlich können Veränderungen des intestinalen Mikrobioms eine Überwucherung mit pathogenen Bakterienarten begünstigen (52-55). Primär geschieht dies bei allen Antibiotika, die biliär ausgeschieden oder oral verabreicht werden (56). In verschiedenen Studien hing die Veränderung des intestinalen Mikrobioms von der Wirkstoffklasse, der Tierspezies und dem Alter des Tieres ab (29-31, 48-51, 56-62). Grundsätzlich hatte die Verabreichung von Antibiotika eine reduzierte Anzahl von Bakterien im Darmtrakt zur Folge (49, 50, 63, 64). Bei Patienten mit chronischer Enteropathie und gestörter Darmbarrierefunktion konnte es durch Reduktion der an der Schleimhaut anhaftenden intestinalen Mikrobiota zu einem verminderten Stimulus auf das intestinale immunologische Netzwerk kommen; eine Entzündungsreaktion im Darmtrakt wurde dadurch reduziert (65-67). Dies ist eine Theorie, warum Antibiotika bei einigen Tieren eine Verbesserung der chronischen gastrointestinalen Symptome (sog. Antibiotika-responsiver Durchfall) bewirken. Antibiotika reduzieren jedoch auch die bakterielle Diversität, und bestimmte funktionelle Gruppen, die eine positive Wirkung haben, können unterdrückt oder eliminiert werden (57, 64, 68, 69). Diese Veränderungen können, je nach Antibiotikum und Spezies, Monate bis Jahre bestehen bleiben (29, 56, 68-70).

Bei Hunden ergaben verschiedene Studien, dass die häufig verwendeten Antibiotika Tylosin und Metronidazol zu hochgradigen Verschiebungen hinsichtlich der Relation verschiedener Bakteriengruppen zueinander führten und dass diese Veränderungen auch nach Absetzen des Antibiotikums langfristig anhielten. Beide Substanzen wurden in jeweils einer Studie bei gesunden Hunden eingesetzt und das Mikrobiom während und nach der Antibiotikatherapie mittels 16s-rRNA-Sequenzierung und quantitativer PCR untersucht. Darüber hinaus wurde in beiden Studien der Dysbiose-Index bestimmt (25, 29). In diesem neuen molekularbiologischen Test zur Dokumentation einer Dysbiose wird aus 7 wichtigen Darmbakteriengruppen und der Gesamtmenge der Bakterien eine Zahl, der Dysbiose-Index, generiert. Ein Wert > 2 repräsentiert eine dysbiotische Mikrobiota, ein Wert < 0 ein physiologisches, normobiotisches Mikrobiom (71). Bei Tylosin und Metronidazol konnte sowohl eine geringere Diversität als auch eine geringere Anzahl an Bakterien im Kot festgestellt werden. Beide Substanzen führten zu einer Dysbiose, die bei manchen Hunden auch noch Wochen nach der Therapie vorlag (25, 29). Charakteristisch für diese Antibiotika war eine hochgradige Reduktion der Anzahl von *Clostridium (C.) hiranonis* (25, 29) (Abb. 2).

Dieses Bakterium spielt bei Hunden eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung eines gesunden Darmstoffwechsels (25, 72). *C. hiranonis* konvertiert die durch die Galle ausgeschiedenen primären Gallensäuren in sekundäre Gallensäuren (25, 71-73). Sekundäre Gallensäuren sind wichtig für die Erhaltung eines antiinflammatorischen Milieus im Darmtrakt und helfen zusätzlich, potenziell pathogene Keime wie *Clostridioides difficile* zu unterdrücken (73, 74). Bei fehlender Konversion fallen zu viele primäre Gallensäuren im Kot an. Dies kann zu einem sog. "Gallensäuredurchfall", einer osmotischen Art von Diarrhö, führen (75-77). Eine durch Metronidazol und Tylosin verursachte Reduktion von verschiedenen funktionellen Bakterien und insbesondere von *C. hiranonis* kann einen negativen Einfluss auf den Magen-Darm-Trakt haben. Der Einsatz dieser Antibiotika sollte daher bei akuter Gastroenteritis, einer Erkrankung, die selbstlimitierend ist und bei der es ohne den Einsatz von Antibiotika schnell wieder zu einer Normobiose kommt, möglichst

vermieden werden.

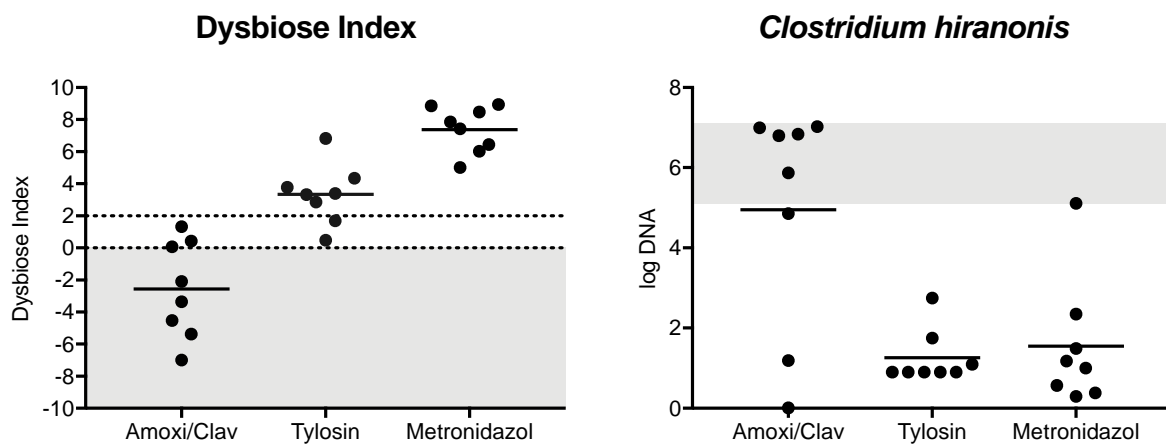


Abb. 2 Dysbiose-Index und Anzahl an *Clostridium hiranonis* im Kot von Hunden unter 3 verschiedenen antibiotischen Therapien (25, 26, 29). Ein Dysbiose-Index < 0 indiziert eine Normobiose, ein Wert > 2 eine Dysbiose. Werte zwischen 0 und 2 entsprechen einem Graubereich. Während Tylosin und Metronidazol zu einer Dysbiose führen, zeigt sich diese Veränderung unter Amoxicillin-Clavulansäure weniger. Zudem bewirken Tylosin und Metronidazol eine Reduktion der Anzahl fäkaler *C. hiranonis*. Quelle: © M. Werner.

Fig. 2 Dysbiosis index and abundance of *Clostridium hiranonis* in the feces of dogs under 3 different antibiotic therapies (25, 26, 29). A dysbiosis index < 0 indicates normobiosis, while a dysbiosis index > 2 indicates dysbiosis. Values between 0 and 2 correspond to a grey zone. While tylosin and metronidazole lead to dysbiosis, this change is less evident under amoxicillin-clavulanic acid. In addition, tylosin and metronidazole lead to a reduction in the abundance of fecal *C. hiranonis*. Source: © M. Werner.

Amoxicillin-Clavulansäure indizierte in 2 Studien weniger Veränderungen des intestinalen Mikrobioms als andere Antibiotika (26, 31). Der Dysbiose-Index und die Anzahl von *C. hiranonis* veränderten sich kaum (26) (Abb. 2). Eine Arbeit zeigte, dass die Mikrobiota bereits eine Woche nach Absetzen von Amoxicillin bzw. Amoxicillin-Clavulansäure wieder in ihren normobiotischen Ausgangszustand zurückkehrte (58). Die Unterschiede

zwischen den verschiedenen Antibiotika sind durch das differierende Wirkungsspektrum und die Wirkungsart erklärbar. Während Tylosin und Metronidazol die anaerobe Flora durch ihre Wirkung deutlich verändern, hat Amoxicillin-Clavulansäure sein Wirkungsspektrum im aeroben Bereich. Deshalb wirkt dieses Antibiotikum nicht so stark auf die, nahezu vollständig anaerobe, gastrointestinale Mikrobiota (78). In einer Studie wurde Ratten jeweils ein Lincosamid (Clindamycin oder Lincomycin), ein Glykopeptid (Vancomycin), ein Makrolidantibiotikum (Roxithromycin), ein Fluorchinolon (Sparfloxacin) oder ein Aminoglykosid (Streptomycin) verabreicht und die Veränderung des Gallensäuren-pools durch die Antibiotika verglichen (48). Bei allen getesteten Antibiotika kam es zu einer signifikanten Verschiebung hinsichtlich Zusammensetzung und Menge der intestinalen Gallensäuren. Die Lincosamid-Gruppe zeigte die deutlichsten Veränderungen mit einer signifikanten Reduktion der sekundären Gallensäuren, während die Veränderungen durch das Makrolidantibiotikum und das Aminoglykosid am geringsten ausfielen (48).

In der Humanmedizin existieren Studien zu Veränderungen des Mikrobioms und Metaboloms auf die Applikation von vielen weiteren Antibiotika (49, 56, 68, 69). Es kristallisierte sich heraus, dass besonders bei sehr jungen Individuen lange bestehende Veränderungen auftraten (50, 63, 70). Exemplarisch soll der Einfluss von Clindamycin herausgegriffen werden: Es bewirkte eine deutliche und lang anhaltende Veränderung des intestinalen Mikrobioms, das nach den Ergebnissen einer 16sRNA-Sequenzierung auch noch Jahre nach der Antibiotikungabe verändert war (56, 79). Sowohl humanmedizinische Studien als auch die tiermedizinischen Studien zu Metronidazol und Tylosin konnten zeigen, dass die Mikrobiota bei einigen Individuen nach Absetzen des Antibiotikums für längere Zeit verändert blieb. Welche Faktoren dafür verantwortlich sind, warum einige Individuen nach kurzer Zeit wieder ein normales Mikrobiom aufweisen und andere längerfristige Veränderungen der Mikrobiota zeigen, blieb unklar.

Nach einer Behandlung mit Antibiotika können Maßnahmen zur Modulation der intestinalen Mikrobiota (z. B. eine Kottransplantation) helfen, schneller wieder einen physiologischen Zustand der Mikrobiota zu etablieren (80, 81). In der Humanmedizin stellt eine Kottransplantation eine sehr wichtige

therapeutische Maßnahme bei Patienten mit einer Überwucherung von *Clostridioides difficile* nach Antibiotikagabe dar (80, 82). Zusätzlich ist es Ziel der Forschung, pharmakologische Strategien zu entwickeln, um den Einfluss von Antibiotika auf den Gastrointestinaltrakt zu vermindern. In einer Studie konnte die gleichzeitige Gabe einer β -Laktamase zusammen mit einem Penizillin die Wirkung des Antibiotikums auf die intestinale Mikrobiota vermindern (61). Kommerzielle Präparate dieser Wirkstoffgruppe gibt es nicht.

Fazit: Antibiotika können zu einer Veränderung der intestinalen Mikrobiota und der Metaboliten führen. Der Schweregrad hängt von der Art des Antibiotikums, der Applikationsdauer und individuellen Faktoren des Patienten ab.

Der Gastrointestinaltrakt als Reservoir resistenter Bakterien

Die Gabe von Antibiotika hat auch das vermehrte Auftreten resistenter Bakterien zur Folge. Dabei stellt der Intestinaltrakt ein Reservoir an Bakterien dar, in dem natürlicherweise resistente Isolate vorkommen. Die Anteil der Hunde, bei denen mit klassischer Mikrobiologie resistente intestinale Bakterien gefunden werden konnten, lag zwischen 39,8% und 63% (83, 84). Der Anteil dieser resistenten Bakterien am gesamten Mikrobiom ist aber gering. So zeigten bei gesunden Hunden aus Privathaushalten nur ca. 2,5% der fäkalen Stämme von *Escherichia (E.) coli* eine Resistenz gegen Ampicillin (85). Antibiotika beeinflussen die Resistenzmuster von Bakterien (86-88). Im einzelnen Organismus veränderte ein verabreichtes Antibiotikum das Verhältnis zwischen resistenten und sensiblen Stämmen zugunsten der gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum resistenten Bakterien (89) (Abb. 3). Eine Studie verglich beispielsweise das Resistenzmuster von fäkalen *E. coli* bei 13 Hunden unter Cephalexingabe mit dem gesunder Kontrollhunde. In der Antibiotikagruppe war eine Cefotaximresistenz signifikant häufiger (62%) nachweisbar als in der Kontrollgruppe (0%) (90). Dieser Zusammenhang wurde in der Humanmedizin bereits bei multiresistenten gramnegativen Bacilli, vancomycinresistenten Enterococci, *E. coli* sowie bei Pilzarten wie *Candida* dokumentiert (91-93). In einer Studie nahm der Anteil der

ampicillinresistenten *E. coli*-Kolonien unter Therapie mit Ampicillin von 2% auf 100% zu. Drei Wochen nach Absetzen des Ampicillins betrug der Anteil der resistenten *E. coli*-Kolonien noch 65% (93). Der hohe Anteil resistenter Keime kann zu einem erhöhten Risiko der Übertragung von Resistenzgenen zwischen verschiedenen Bakterienisolaten beitragen (94, 95).

Das Vorkommen resistenter intestinaler Bakterien ist nicht generell als pathologisch für das Individuum anzusehen. Werden diese jedoch in großer Menge ausgeschieden, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass z. B. bei aufsteigenden Harnwegsinfektionen oder Wundinfektionen eine schwer behandelbare Infektion vorliegt. Ebenso wie bei der Veränderung der intestinalen Mikrobiota, ließ sich auch in Hinblick auf den Anteil an resistenten Bakterien zeigen, dass die Veränderungen nach Absetzen des Antibiotikums bestehen bleiben. So kann sich bei Gabe verschiedener Antibiotika innerhalb einer kurzen Zeit schnell ein Reservoir von multipel resistenten Bakterien im Darmtrakt bilden (Abb. 3). In einer Studie zur Gabe von Amoxicillin-Clavulansäure bei Hunden mit AD stieg der Anteil der amoxicillinresistenten fäkalen *E. coli* von 0,2% vor der Antibiotikagabe signifikant auf 100% während der Antibiotikagabe an. Auch 3 Wochen nach Absetzen des Antibiotikums lag der Anteil amoxicillinresistenter *E. coli* immer noch signifikant höher (10%) als in der Kontrollgruppe (0,1%) (26).

Bereits vor einigen Jahrzehnten erfolgten Untersuchungen zur Übertragung resistenter Bakterien von Tieren auf die Umwelt und den Menschen (96). Es wurde geschätzt, dass etwa 4% der in der Humanmedizin nachgewiesenen Antibiotikaresistenzen ursprünglich vom Tier auf den Menschen übertragen wurden (97, 98). Einige Studien belegen, dass sich antibiotikainduzierte resistente Bakterien von Tieren in der Umwelt verbreiten und auf den Menschen übertreten können. Eine Arbeit untersuchte das Auftreten von gleichen *E. coli*-Isolaten im Kot von Hunden und ihren Besitzern. Hierzu wurden 13 Hunde und 18 Kontaktpersonen longitudinal verfolgt. Eine Person wies die identische Markersequenz für eine Ampicillinresistenz (ST-78) auf wie ihr Kontakthund (99). Bei einer Untersuchung zur Übertragung von resistenten *E. coli* in Schweinehaltungsbetrieben zeigten sich signifikante Ähnlichkeiten

zwischen den Bakterienstämmen der Schweine und denen der betreuenden Landwirte (100).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) warnt vor der Ausbreitung weiterer Resistenzen und der Entwicklung unheilbarer bakterieller Infektionen. Eine antibiotische Therapie ist generell nur nach Stellung der konkreten Indikation und unter Einhaltung nationaler und internationaler Vorgaben zu rechtfertigen (5, 9).

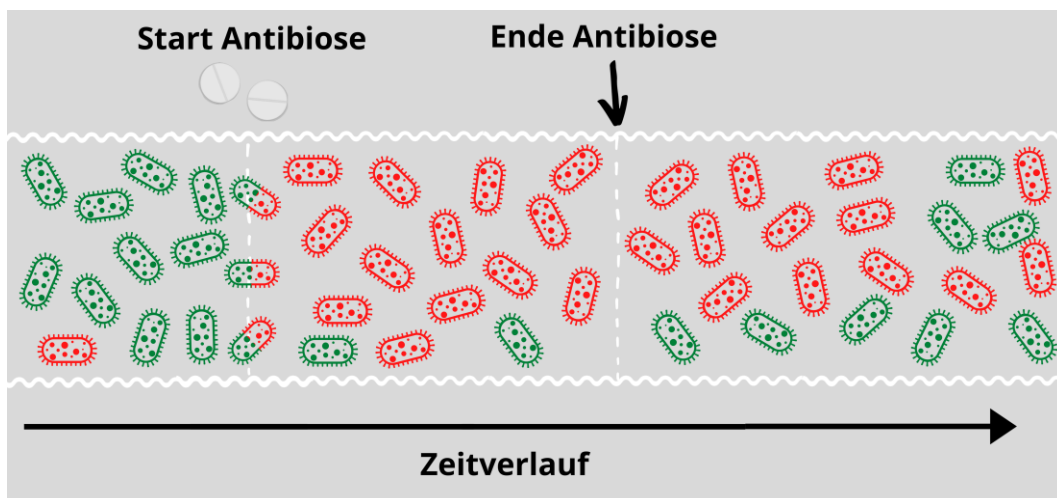


Abb. 3 Darstellung der Veränderung der Anzahl resistenter Bakterien im intestinalen Mikrobiom (56). Vor der antibiotischen Therapie finden sich überwiegend auf das verabreichte Antibiotikum sensible Isolate (grün). Durch die antibiotische Behandlung können sich aus sensiblen Isolaten resistente Klone (rot) entwickeln oder sich zuvor schon vorhandene resistente Klone vermehren. Nach Absetzen des Antibiotikums kann es Wochen bis Jahre dauern, bis der physiologische Zustand wiederhergestellt ist. Quelle: © M. Werner.

Fig. 3 Shift in the abundance of resistant bacteria of the intestinal microbiome (56). Prior to antibiotic therapy, sensitive isolates (green) can mainly be found in the intestinal microbial composition. Due to the antibiotic treatment, resistant clones (red) can develop out of sensitive isolates and the previously existing resistant clones can multiply. After discontinuation of the antibiotic, it may take weeks to years before normal conditions are restored. Source: © M. Werner.

Fazit: Der Einsatz von Antibiotika führt zur vermehrten Entstehung resistenter Bakterien. Antibiotika dürfen nur nach gezielter Indikationsstellung eingesetzt werden.

Trigger chronischer immunologischer Erkrankungen

Beim Menschen wurde das Vorkommen von chronischen immunologisch bedingten Erkrankungen nach einer Antibiotikagabe im jungen Lebensalter beschrieben (101, 102). Die Verabreichung von Antibiotika im Rahmen einer akuten infektiösen Enteritis ließ sich als Risikofaktor für das Auftreten eines chronischen Reizdarmsyndroms identifizieren (103). Einer Studie zufolge kann bei Kindern die Gabe von Antibiotika während einer Magen-Darm-Erkrankung zu chronischem Durchfall führen (104). Eine Metaanalyse von 11 Studien untersuchte die Zusammenhänge zwischen Antibiotikatherapie und Auftreten von Morbus Crohn. Es zeigte sich, dass Patienten nach einer Antibiotikatherapie mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an Morbus Crohn erkrankten (105). Individuen, die in der Kindheit (v. a. im 1. Lebensjahr) Antibiotika erhielten, hatten außerdem ein erhöhtes Risiko, eine Lebensmittelallergie zu entwickeln (106, 107). Eine Metaanalyse mit 800000 Kindern bestätigte den Zusammenhang zwischen einer Antibiotikagabe im frühen Kindesalter und der Entwicklung von Allergien (108). Dieser Zusammenhang erwies sich in verschiedenen Untersuchungen auch abhängig vom eingesetzten Antibiotikum: Er war bei Makroliden und Cephalosporinen am stärksten (109), während sich für Penizilline ein niedriges Risiko für die Entwicklung immunologischer Erkrankungen ergab (109, 110). Die Erklärung für diese Zusammenhänge finden sich im Mikrobiom und Resistom (Gesamtheit der Resistenzgene der intestinalen Mikrobiota), die durch die Antibiotikagabe verändert werden (111, 112). Die Dysbiose, das dadurch hervorgerufene proinflammatorische intestinale Milieu und die Immunantwort auf das veränderte intestinale Mikrobiom führen zur Ausbildung allergischer Erkrankungen. Der Einsatz von Antibiotika ist besonders in der frühkindlichen und perinatalen Phase nur noch bei enger und zielgerichteter Indikationsstellung zu vertreten. Auch in der Veterinärmedizin gibt es Hinweise darauf, dass akute Erkrankungen, bei denen häufig Antibiotika zum Einsatz kommen, zu chronischen

Enteropathien führen können. Nach den Resultaten von 2 Studien bei Hunden stellt eine schwergradige akute Enteritis mit Störung der Darmbarriere ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung chronischer Durchfallerkrankungen dar. Inwieweit eine Antibiotikagabe in der Phase der akuten Enteritis eine Rolle hinsichtlich langfristiger Konsequenzen spielt, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt (113, 114).

Fazit: Antibiotikatherapien erhöhen in der Humanmedizin das Risiko von Langzeitkonsequenzen. Die Zerstörung der intestinalen Mikrobiota v. a. in den ersten Lebensmonaten wird als sehr kritisch gesehen. In der Veterinärmedizin fehlen bislang Studien, die diese Kausalität beim Hund darstellen.

Antibiotikaeinsatz beim akuten Durchfall des Hundes

AD ist ein sehr häufiges Krankheitsbild des Hundes (115), wobei die Patienten nicht immer dem Tierarzt vorgestellt werden. Häufig handelt es sich um eine leichte, selbstlimitierende Durchfallerkrankung (115-117). Es gibt jedoch auch schwere Verlaufsformen, die einer intensiven Behandlung bedürfen. Im Folgenden werden Studien zum Antibiotikaeinsatz bei verschiedenen Arten von AD vorgestellt.

Ursachen für AD sind z. B. diätetische Veränderungen, Stress oder Infektionserreger (115-121). Die Rolle bakterieller Ursachen für AD beim Hund wurde in den letzten Jahren kritisch überdacht. Zwei unabhängige Studien lassen vermuten, dass bakterielle Infektionen nur sehr selten die Ursache von akuten Enteritiden darstellen (118, 122). Meist blieb die Ursache der Erkrankung ungeklärt (123). Laut einer Umfrage wurden nur bei 3,2% der Fälle von AD diagnostische Tests in der Praxis durchgeführt (11). Folglich basiert die Therapieentscheidung auf den klinischen Symptomen und dem Erfahrungsschatz des behandelnden Veterinärs. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Antibiotika empirisch eingesetzt.

Akuter unkomplizierter Durchfall

Umfragen unter Tierärzten ergaben, dass vor allem β -Laktam-Antibiotika und Metronidazol beim unkomplizierten AD des Hundes Anwendung finden

(2, 11). In den letzten Jahren wurde der Nutzen dieser Substanzen bei Hunden mit unkompliziertem AD untersucht (26-28). Unkomplizierter Durchfall wurde definiert als fehlende Indikation für Hospitalisation sowie Fehlen von Fieber und anderen Entzündungskriterien. Eine Arbeit zum Einsatz von Amoxicillin-Clavulansäure zeigte keine schnellere Verbesserung eines klinischen Aktivitätsindex im Vergleich zur Placebogruppe. Ein normaler Aktivitätsindex wurde in beiden Gruppen nach 2–3 Tagen erreicht (26). Zwei prospektive klinische Studien untersuchten den Nutzen von Metronidazol (27, 28). Die mediane Zeit bis zum Erlangen eines unauffälligen klinischen Krankheitsaktivitätsindex betrug in beiden Arbeiten in der Antibiotika- wie in der Placebogruppe wenige Tage. Die Studie von Langlois et al. (27, 28) zeigte eine signifikant kürzere Krankheitsdauer bei Hunden der Metronidazolgruppe (2,1 Tage) im Vergleich zur Placebogruppe (3,6 Tage), während sich in der Studie von Shmalberg et al. (27, 28) keine schnellere klinische Verbesserung in der Metronidazolgruppe im Vergleich zur Placebogruppe einstellte (4,6 Tage vs. 4,8 Tage). Im Zusammenhang mit den langfristigen und massiven Veränderungen der intestinalen Mikrobiota durch Metronidazol erscheint der in der Studie von Langlois et al. (27, 28) gezeigte klinische Nutzen den Einsatz von Metronidazol nicht zu rechtfertigen.

Bei einer Umfrage unter Tierärzten wurden Informationen von 3189 Hunden mit AD gesammelt. Die am häufigsten eingesetzte Wirkstoffgruppe zur Behandlung von AD stellten Antibiotika (49,7% der Fälle) dar. Es konnte jedoch kein statistischer Zusammenhang zwischen der Gabe von Antibiotika und der Dauer bis zur Genesung des Hundes gezeigt werden. Dieser ließ sich nur für diätetische Veränderungen und die Verabreichung von Nahrungsergänzungsmitteln (z. B. Probiotika) nachweisen (11).

Fazit: Ungezielte, routinemäßige Antibiotikagaben sind bei Hunden mit akutem unkompliziertem Durchfallgeschehen nicht gerechtfertigt. Diätetische Maßnahmen und die Gabe von Nahrungsergänzungsmitteln wie Probiotika führen in der Regel zu einer schnellen klinischen Verbesserung.

Akutes hämorrhagisches Durchfallsyndrom

Akuter blutiger Durchfall unbekannter Genese in Zusammenhang mit einem starken Flüssigkeitsverlust über den Darmtrakt ist beim Hund ein häufig auftretendes Krankheitsbild und wurde als akutes hämorrhagisches Durchfallsyndrom (AHDS) bezeichnet (124). In den letzten Jahren zeigten verschiedene Studien, dass eine Überwucherung mit toxinbildenden *C. perfringens* im Darmtrakt als Auslöser wahrscheinlich ist (125, 126). *C. perfringens*-Stämme mit Genen, die für das porenformende Toxin NetF kodieren, kamen bei etwa der Hälfte der Hunde mit AHDS vor, wurden jedoch kaum bei gesunden Hunden oder bei Hunden mit akutem nicht blutigem Durchfall nachgewiesen (127). Dieses NetF-Toxin scheint in Kombination mit verschiedenen anderen von *C. perfringens* produzierten Toxinen eine wichtige Rolle beim AHDS zu spielen. Trotz der mikrobiellen Ätiologie ist das AHDS keine kontagiöse Erkrankung, da die Toxinfreisetzung bei der Proliferation von *C. perfringens* im Körper des Patienten eine Schädigung der Darmschleimhaut bewirkt. Somit erscheint eine antibiotische Therapie bei einem komplikationslosen Verlauf des AHDS wenig sinnvoll. Darüber hinaus ergaben 2 prospektive Studien, dass die Verabreichung von Amoxicillin-Clavulansäure allein oder in Kombination mit Metronidazol nicht zu einer schnelleren klinischen Verbesserung der Hunde mit AHDS führte (128, 129). Zu beachten ist, dass es bei Hunden mit AHDS durch die Zerstörung der Darmbarriere zu einer Translokation von intestinalen Bakterien kommen kann. Bei manchen Individuen hat dies eine Sepsis zur Folge. Somit sollten die in Tab. 1 genannten Sepsiskriterien auch beim AHDS-Patienten herangezogen werden, um über die Notwendigkeit einer antibiotischen Therapie zu entscheiden (130). Einschränkend ist jedoch zu sagen, dass auch durch den Gewebeuntergang beim AHDS-Patienten eine gewisse Neutrophilie mit milder Linksverschiebung entstehen kann, ohne dass eine Bakteriämie vorliegt (129, 130). Eine Neutrophilie mit Linksverschiebung ist daher nicht als alleiniges Kriterium zur Entscheidung über eine antibiotische Therapie heranzuziehen (130).

Tab. 1 Klinische und labordiagnostische Indikationen für eine antibiotische Therapie bei Hunden mit akutem Durchfall (139). Die Parameter sollten nach Rehydratation und analgetischer Therapie evaluiert werden.

Table 1 Clinical and laboratory indications for antibiotic therapy in dogs with acute diarrhea (139). Parameters should be evaluated following rehydration and analgesic therapy.

Parameter	Befund
Rektale Körpertemperatur	< 37,2 °C oder > 39,2 °C
Herzfrequenz	> 140/min
Atemfrequenz und CO ₂ -Partialdruck	> 40/min und/oder PCO ₂ > 32 mmHg (venös oder arteriell)
Leukozyten	< 5000 oder > 19500 Zellen/ μ l oder mindestens 5% der Leukozyten als stabkernige neutrophile Granulozyten

Die wichtigste therapeutische Maßnahme bei AHDS-Patienten ist der Ausgleich des meist hochgradigen Flüssigkeitsverlustes durch intravenöse Infusionstherapie. Eine zusätzliche symptomatische Behandlung kann unterstützend wirken (124).

Fazit: Eine antibiotische Behandlung bringt bei Hunden mit einem unkomplizierten Verlauf eines AHDS keinen Vorteil. Nur bei Anzeichen einer systemischen Entzündungsreaktion sollte antibiotisch behandelt werden.

Parvovirose

Die Parvovirose ist eine durch das kanine Parvovirus hervorgerufene Erkrankung bei jungen, noch nicht vollständig grundimmunisierten oder adulten, nicht geimpften Hunden (140). Im akuten Stadium ist sie durch Leukopenie, akute, oft blutige Durchfälle und einen raschen Flüssigkeitsverlust gekennzeichnet. In Studien endete die Erkrankung

unbehandelt bei 90% der Hunde tödlich (140-142).

Zelldestruktion, intestinale Hypomotilität, Dysbiose, intestinale Entzündung und Gewebenekrose zerstören die intestinale Schleimhautbarriere (143, 144). Dadurch kann sich durch Übertritt von Bakterien aus dem Darmlumen in den Blutstrom eine Bakteriämie entwickeln (143). Die zusätzliche hochgradige Leukopenie schränkt das Immunsystem so stark ein, dass die übergetretenen Bakterien nicht adäquat abgewehrt werden können (140, 145, 146). Da das Risiko einer Sepsis bei Parvovirosepatienten mit Durchfall und Leukopenie als sehr hoch eingeschätzt wird, ist generell eine antibiotische Therapie zu empfehlen (140, 144, 147). In erster Linie kommen β -Laktam-Antibiotika in Kombination mit Clavulansäure zum Einsatz. Bestehen unter dieser antibiotischen Monotherapie im Verlauf der Erkrankung weiterhin Sepsiskriterien, kann die Antibiotikatherapie erweitert werden (140, 148). Welche Wirkstoffkombinationen sich am besten eignen, ist noch nicht definiert. Empfohlen werden Breitspektrumantibiotika mit guter Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien. Die Hunde sollten außerdem engmaschig überwacht werden. Die symptomatische Behandlung umfasst den Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten durch intravenöse Infusionstherapie, frühe enterale Ernährung und die Gabe von Antiemetika und Analgetika (140). Bei Hinweisen auf eine gastrointestinale Blutung können Gastroprotektiva und Bluttransfusionen notwendig werden (140, 142, 148, 149). In schweren Fällen kann eine antivirale Therapie mit Interferon- ω zum Einsatz kommen (150). Parasitäre Begleiterkrankungen sollten ebenfalls behandelt werden (140).

Fazit: Die Kombination von zerstörter Darmbarriere (blutiger Durchfall) und beeinträchtigter Immunabwehr (Neutropenie) führt bei Hunden mit Parvovirose sehr häufig zu einer Sepsis. Deshalb müssen alle Hunde mit einem klinisch relevanten Verlauf dieser Infektionserkrankung antibiotisch behandelt werden.

Rolle von enteropathogenen Bakterien beim akuten Durchfall des Hundes

Die Rolle von enteropathogenen Keimen bei Hunden mit Durchfall wird seit vielen Jahren diskutiert. In einigen Studien ließen sich enteropathogene

Bakterien im Gastrointestinaltrakt gesunder Hunde nachweisen und waren Teil der physiologischen intestinalen Mikrobiota. Die Autoren dieser Studien gehen daher davon aus, dass enteropathogene Keime beim Hund nur sehr selten zu einer Erkrankung führen (121, 122, 151-153). Somit sollte der Nachweis eines potenziell enteropathogenen Keims in einer bakteriologischen Kotkultur nicht als alleiniges Entscheidungskriterium für den Einsatz eines Antibiotikums gelten. Nur bei Vorliegen von klinischen (z. B. Fieber) und labordiagnostischen Hinweisen (z. B. entzündliches Blutbild) auf eine systemische Entzündungsreaktion sollte ein Patient mit AD antibiotisch behandelt werden. Eine unnötige antibiotische Behandlung ist zu vermeiden, da dadurch die schützende intestinale Mikrobiota zerstört werden kann. In der Folge erhalten enteropathogene Bakterien einen Wachstumsvorteil und die Tiere können zu Dauerausscheidern dieser Erreger (z. B. Salmonellen) werden (121, 152-154).

Fazit: Im Gegensatz zum Menschen scheinen enteropathogene Keime beim Hund als Auslöser von AD eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Erkennen von Indikationen für eine antibiotische Therapie beim akuten Durchfall

Generell gibt es bei allen genannten Arten des AD verschiedene Kriterien, die zur Entscheidung für oder gegen eine antibiotische Therapie herangezogen werden müssen. Antibiotika sollten eingesetzt werden, wenn eine Infektion mit primär enteropathogenen Keimen bzw. eine bakterielle Translokation zur systemischen Entzündungsreaktion führt oder ein hohes Risiko für die Entwicklung einer Sepsis besteht. Kriterien zur Entscheidung stellen hierfür zum einen die immunologische Konstitution des Hundes und zum anderen die gängigen Sepsiskriterien aus der Humanmedizin dar (143, 155-158). In Abb. 4 sind die verschiedenen Indikationen für eine antibiotische Therapie beim AD als Entscheidungsbaum dargestellt.

Immunsupprimierte Hunde sowie Hunde, die Immunsuppressiva erhalten, sollten engmaschig auf eine systemische Entzündungsreaktion kontrolliert werden (131, 132). Besondere Vorsicht ist auch bei Tieren geboten, bei

denen in der Leber keine adäquate Abwehr von translozierten Bakterien aus dem Darm erfolgen kann. Dies war in Studien bei Hunden mit einer hochgradigen Leberfunktionsstörung und Patienten mit einem portosystemischen Shunt der Fall (133-136).

Die aus der Humanmedizin bekannten Sepsiskriterien bzw. SIRS-Kriterien wurden an die Tiermedizin adaptiert (137). Sie können ein Hilfsmittel zur Entscheidung für oder gegen eine antibiotische Behandlung darstellen. Wichtig ist, diese Kriterien immer in Zusammenhang mit dem klinischen Allgemeinbefinden und dem Hydratationsstatus des Patienten zu betrachten (138). Dehydrierte Patienten können Veränderungen aufweisen, die auch bei einer Sepsis auftreten. Deshalb sollten Sepsiskriterien erst nach Ausgleich des Flüssigkeitsdefizits zur Diagnosestellung herangezogen werden. Bei einem rehydrierten Hund müssen mindestens 2 der 4 in Tab. 1 aufgeführten Kriterien erfüllt sein, um den Einsatz von Antibiotika zu rechtfertigen.

Bei starker Beeinträchtigung des kardiovaskulären Systems und des zellulären Stoffwechsels im Rahmen einer Sepsis kann es zu einem septischen Schock kommen. Dieser ist v. a. durch einen systolischen Blutdruck < 90 mmHg gekennzeichnet, der sich durch intravenöse Flüssigkeitsgabe nicht steigern lässt (159, 160).

Neben den in Tab. 1 genannten Veränderungen des Leukogramms muss auf eine Hypoglykämie geachtet werden. Bei septischen Patienten können zudem Hypalbuminämie, Hypokalzämie und Hyperbilirubinämie sowie verlängerte Gerinnungszeiten infolge einer systemischen Verbrauchskoagulopathie auftreten (138, 161). Patienten, die zunächst als nicht septisch eingestuft werden, jedoch eine starke Durchfallerkrankung durchmachen und ein gestörtes Allgemeinbefinden aufweisen, sollten klinisch engmaschig überwacht werden (z. B. stündliche Erhebung von Vitalparametern, Blutdruck, Glukosekonzentration).

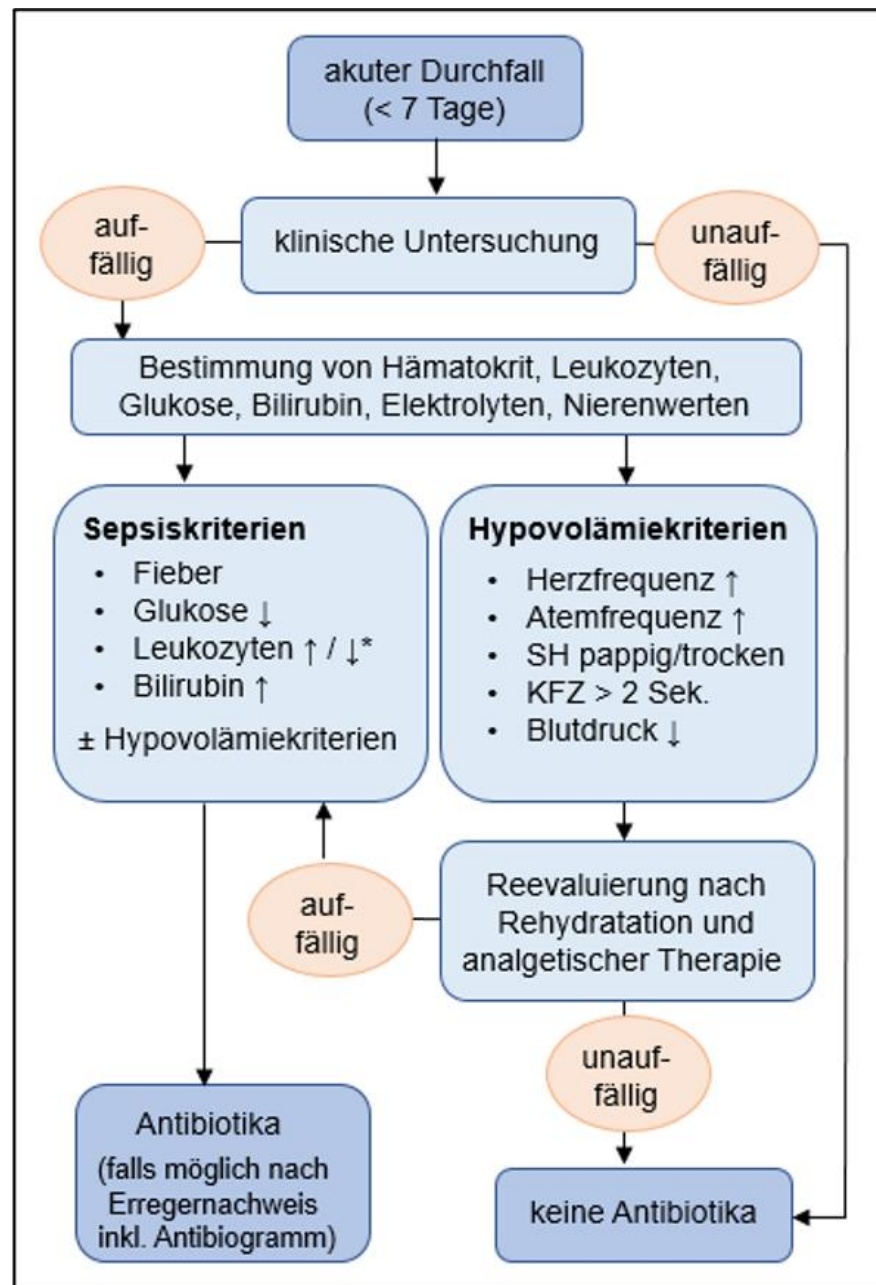


Abb. 4 Entscheidungsbaum zur Indikation einer antibiotischen Therapie beim akuten Durchfall des Hundes (9, 131-139). * < 5000 oder > 19500 Zellen/ μ l oder mindestens 5% der Leukozyten als stabkernige neutrophile Granulozyten. Detaillierte Ausführungen zu den Veränderungen der Parameter finden sich im Text. Quelle: © M. Werner.

Fig. 4 Decision tree for the indication of antibiotic therapy for acute diarrhea in dogs (9, 131-139). * < 5000 or > 19500 cells/ μ l or at least 5% banded neutrophils. Detailed explanations of the changes in the mentioned parameters are provided in the text. Source: © M. Werner.

Fällt anhand der genannten Kriterien die Entscheidung für eine antibiotische Therapie, sollte vor deren Beginn, wenn möglich, eine bakteriologische Untersuchung mit Antibiotogramm eingeleitet werden (9). Als Substrat eignet sich beim septischen Patienten am besten Blut. Bei bildgebenden Hinweisen auf eine Infektion von Lymphknoten oder Gallenblase ist auch eine bakteriologische Untersuchung von aspiriertem Lymphknotenmaterial oder Gallenflüssigkeit möglich (143, 155, 161). Eine Kotkultur auf enteropathogene Keime könnte zusätzlich helfen, einen verantwortlichen Keim zu identifizieren. Im Bereich der anaeroben Mikrobiota wirksame Antibiotika (z. B. Nitroimidazole wie Metronidazol) waren bei einer bakteriellen Infektion nicht ausreichend (9). Eine empirische Therapie mit Amoxicillin-Clavulansäure (25 mg/kg i. v. alle 6–8 Stunden), eventuell in Kombination mit Marbofloxacin (2–4 mg/kg i. v. alle 24 Stunden), kann erfolgen, bis das Antibiotogramm vorliegt. Zusätzlich sollte, wegen der oben erwähnten negativen Beeinflussung des Mikrobioms durch Metronidazol, bei Vorliegen einer Giardieninfektion als Ursache von akutem Durchfall in erster Linie mit Fenbendazol und nicht mit dem ebenso hierfür zugelassenen Metronidazol behandelt werden.

Fazit: Hunde mit AD sollten antibiotisch behandelt werden, wenn sie Anzeichen einer systemischen Entzündungsreaktion aufweisen. Immunsupprimierte Patienten müssen engmaschig überwacht werden.

Alternative Modulation der intestinalen Mikrobiota beim akuten Durchfall

In den meisten Fällen gibt es bei Hunden mit AD keine Indikation für die Anwendung von Antibiotika. Diätische Maßnahmen, die Gabe von Nahrungsergänzungsmitteln und eine Kottransplantation können helfen, die intestinale Mikrobiota zu modulieren.

Bei Probiotika handelt es sich um Produkte mit lebenden Mikroorganismen, die einen gesundheitlichen Vorteil bringen (162). Die positiven Wirkungen basieren auf der Verdrängung von Pathogenen, Immunmodulation und Stärkung der intestinalen Barrierefunktion (163-165). Präbiotika sind unverdauliche Kohlenhydrate, die als Substrate für intestinale Bakterien

dienen können (166, 167).

Über den Einsatz von Probiotika zur Prophylaxe und Therapie des AD bei Hunden gibt es verschiedene Studien. Beim akuten unkomplizierten Durchfall konnte durch die Gabe von probiotischen oder synbiotischen Produkten mit *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* und *Bacillus coagulans* eine schnellere Verbesserung von klinischen Parametern und Kotkonsistenz erzielt werden (168-176). Bei Hunden mit Parvovirose, die eine probiotische Kombination verschiedener Lactobazillen und Bifidobakterien erhielten, ergaben sich im Vergleich zur Placebogruppe eine schnellere klinische Verbesserung sowie höhere Lymphozytenzahlen an Tag 5 der Applikation (177).

In der Europäischen Union unterliegen Probiotika als Futtermittelzusatzstoffe einer gesetzlichen Regelung. Derzeit sind in Deutschland zur Anwendung beim Hund 2 *Enterococcus-faecium*-Stämme, ein *Lactobacillus-acidophilus*-Stamm und ein *Bacillus-subtilis*-Stamm zugelassen. Dementsprechend enthalten für den Hund deklarierte Probiotika nur diese 4 Stämme. Generell sind aber eher Produkte mit einer hohen Anzahl an Bakterien und mit mehreren verschiedenen Stämmen zu empfehlen, weswegen auch auf Präparate aus der Humanmedizin ausgewichen werden sollte.

Bei der "fäkalen Mikrobiota-Transplantation" (FMT) wird der Kot eines Spenders oral oder rektal auf einen Empfänger übertragen (81, 82, 178). Die positive Wirkung wird durch die intestinale Rekolonisierung mit einer physiologischen Mikrobiota erklärt. Mit der hierdurch zunehmenden Diversität des Mikrobioms werden auch metabolische Fähigkeiten verbessert und pathogene Bakteriengruppen verdrängt (178, 179). Bei Welpen mit Parvovirose konnte ein positiver Effekt durch eine zusätzlich zur Standardtherapie vorgenommene rektale FMT dokumentiert werden (180). In Fallberichten (8 Hunde mit AD, 1 Hund mit Inflammatory Bowel Syndrom und jeweils 1 Katze mit chronischem Durchfall, bzw. ulzerativer Kolitis) ließ sich durch FMT eine klinische Verbesserung erreichen (179, 181, 182). Eine prospektive Studie bei Hunden mit AD zeigte beim Einsatz von FMT eine schnellere klinische und mikrobielle Verbesserung als bei Anwendung von

Metronidazol (72). Eine FMT sollte nach einem standardisierten Schema erfolgen, das der in diesem Abschnitt zitierten Literatur zu entnehmen ist.

Fazit: Mittels FMT oder hochdosierten Probiotika mit mehreren Bakterienstämmen können Dysbiosen bei Patienten mit AD, die im Rahmen der akuten gastrointestinalen Erkrankung oder infolge einer Antibiotikatherapie auftreten, schnell korrigiert werden.

Reduktion antibiotikaassoziierter gastrointestinaler Nebenwirkungen

Verschiedene Arbeiten untersuchten, inwieweit eine Gabe von Probiotika antibiotikaassoziierten Durchfall reduzieren kann. Bei mit Metronidazol behandelten Hunden mit AD war der Anteil der Tage mit normalem Kotabsatz in der Probiotikagruppe höher als bei Hunden, die nur Metronidazol erhielten (183). Gesunde Versuchshunde mit durch Metronidazol und Enrofloxacin ausgelöstem Durchfall wiesen bei Anwendung von Probiotika bessere Kotkonsistenzwerte auf als ohne diese Behandlung (20). Eine weitere Studie zeigte einen positiven Effekt auf die Durchfalldauer bei durch Lincomycin induziertem Durchfall (184). In dieser Untersuchung entwickelten außerdem Hunde, die zeitgleich mit dem Antibiotikum das Probiotikum erhielten, gar keine Diarrhö (184). Dies spiegelt Ergebnisse aus der Humanmedizin wider. Hier wird empfohlen, gleichzeitig mit der antibiotischen Therapie Probiotika zu verabreichen (185-187). Die Gabe von Probiotika muss zeitgleich mit der antibiotischen Therapie gestartet werden und sollte nach deren Abschluss weitergeführt werden, wobei hierfür generell eine Dauer von mindestens 14 Tagen empfohlen wird. Eine FMT wäre denkbar. Studien hierzu fehlen in der Tiermedizin. In der Humanmedizin zeigte eine Arbeit weniger Veränderungen des Mikrobioms und eine geringere Entwicklung resistenter Bakterien durch eine auf die Gabe von Amoxicillin-Clavulansäure folgende Auto-FMT (188).

Fazit: Nebenwirkungen von Antibiotika lassen sich in manchen Fällen durch die gleichzeitige Gabe von Probiotika abschwächen.

Fazit für die Praxis

Antibiotika können zu gastrointestinalen Nebenwirkungen, vermehrten Resistenzen sowie langfristigen Veränderungen des intestinalen Mikrobioms führen und sollten deshalb beim akuten unkomplizierten Durchfall des Hundes vermieden werden. Spezielle Krankheitsbilder, bei denen eine Antibiotikagabe notwendig ist, müssen erkannt werden. Hierzu zählen beispielsweise Parvovirose und die Translokation intestinaler Bakterien mit folgender Sepsis. Alternative Behandlungsmethoden beim AD sind diätetische Veränderungen, Gabe von Pro- und Präbiotika und Kottransplantation.

Interessenkonflikt: Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Robbins SN, Goggs R, Lhermie G et al. Antimicrobial Prescribing Practices in Small Animal Emergency and Critical Care. *Front Vet Sci* 2020; 7: 110. doi:10.3389/fvets.2020.00110
2. Lutz B, Lehner C, Schmitt K et al. Antimicrobial prescriptions and adherence to prudent use guidelines for selected canine diseases in Switzerland in 2016. *Vet Rec Open* 2020; 7: e000370. doi:10.1136/vetreco-2019-000370
3. Hur BA, Hardefeldt LY, Verspoor KM et al. Describing the antimicrobial usage patterns of companion animal veterinary practices; free text analysis of more than 4.4 million consultation records. *PLoS One* 2020; 15: e0230049. doi:10.1371/journal.pone.0230049
4. Hopman NEM, Portengen L, Heederik DJJ et al. Time trends, seasonal differences and determinants of systemic antimicrobial use in companion animal clinics (2012-2015). *Vet Microbiol* 2019; 235: 289-294. doi:10.1016/j.vetmic.2019.07.016
5. Guardabassi L, Prescott JF. Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2015; 45: 361-376, vii. doi:10.1016/j.cvsm.2014.11.005
6. Kahn LH. Antimicrobial resistance: a One Health perspective. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2017; 111: 255-260. doi:10.1093/trstmh/trx050
7. Smith HW. Antibiotic-resistant bacteria in animals: the dangers to human health. *British Vet J* 1974; 130: 110-119
8. Beckmann K, Favrot C, Fischer NM et al. Strategie Antibiotikaresistenzen. Umsichtiger Einsatz von Antibiotika bei Hunden und Katzen. Therapieleitfaden für Tierärztinnen und Tierärzte. 2019. Bern. <https://www.blv.admin.ch/blv/de/home/tiere/tierarzneimittel/antibiotika/nationale-strategie-antibiotikaresistenzen--star--/sachgemaesser-antibiotikaeinsatz.html>. 25.12.2020
9. Weese JS, Giguère S, Guardabassi L et al. ACVIM consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and

- antimicrobial resistance. *J Vet Intern Med* 2015; 29: 487-498. doi:10.1111/jvim.12562
10. Jessen L, Damborg P, Spohr A et al. Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice (2 nd edition) ISBN 978-87-870703-0-0; 2018. <https://www.alimentisalute.it/sites/default/files/animali%20da%20compagnia%20Antibiotic%20Guidelines%20Danimarca.pdf>. 25.12.2020
 11. Singleton DA, Noble PJM, Sánchez-Vizcaíno F et al. Pharmaceutical Prescription in Canine Acute Diarrhoea: A Longitudinal Electronic Health Record Analysis of First Opinion Veterinary Practices. *Front Vet Sci* 2019; 6: 218. doi:10.3389/fvets.2019.00218
 12. Singleton DA, Arsevska E, Smyth S et al. Small animal disease surveillance: gastrointestinal disease, antibacterial prescription and *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Record* 2019; 184: 211-216
 13. De Briyne N, Atkinson J, Pokludova L et al. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet Rec* 2014; 175: 325. doi:10.1136/vr.102462
 14. German AJ, Halladay LJ, Noble PJ. First-choice therapy for dogs presenting with diarrhoea in clinical practice. *Vet Rec* 2010; 167: 810-814. doi:10.1136/vr.c4090
 15. Adams HR. Acute adverse effects of antibiotics. *J Am Vet Med Assoc* 1975; 166: 983-987
 16. Kunkle GA, Sundlof S, Keisling K. Adverse side effects of oral antibacterial therapy in dogs and cats: an epidemiologic study of pet owners' observations. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995; 31: 46-55. doi:10.5326/15473317-31-1-46
 17. McFarland LV. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment. *Future Microbiol* 2008 Oct;3(5):563-78. doi: 10.2217/17460913.3.5.563.
 18. Owens Jr RC, Donskey CJ, Gaynes RP et al. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46: S19-S31
 19. Torres-Henderson C, Summers S, Suchodolski J et al. Effect of *Enterococcus Faecium* Strain SF68 on Gastrointestinal Signs and Fecal Microbiome in Cats Administered Amoxicillin-Clavulanate. *Top*

- Companion Anim Med 2017; 32: 104-108. doi:10.1053/j.tcam.2017.11.002
20. Whittemore JC, Moyers TD, Price JM. Randomized, controlled, crossover trial of prevention of antibiotic-induced gastrointestinal signs using a synbiotic mixture in healthy research dogs. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 1619-1626. doi:10.1111/jvim.15553
 21. Stokes JE, Price JM, Whittemore JC. Randomized, Controlled, Crossover trial of Prevention of Clindamycin-Induced Gastrointestinal Signs Using a Synbiotic in Healthy Research Cats. *J Vet Intern Med* 2017; 31: 1406-1413. doi:10.1111/jvim.14795
 22. Noli C, Koeman JP, Willemsse T. A retrospective evaluation of adverse reactions to trimethoprim-sulphonamide combinations in dogs and cats. *Vet Q* 1995; 17: 123-128. doi:10.1080/01652176.1995.9694550
 23. Whittemore JC, Stokes JE, Laia NL et al. Short and long-term effects of a synbiotic on clinical signs, the fecal microbiome, and metabolomic profiles in healthy research cats receiving clindamycin: a randomized, controlled trial. *PeerJ* 2018; 6: e5130. doi:10.7717/peerj.5130
 24. Schulz BS, Hupfauer S, Ammer H et al. Suspected side effects of doxycycline use in dogs – a retrospective study of 386 cases. *Vet Rec* 2011; 169: 229. doi:10.1136/vr.d4344
 25. Pilla R, Gaschen FP, Barr JW et al. Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2020; 34: 1853-1866
 26. Werner M, Suchodolski JS, Straubinger RK et al. Effect of amoxicillin-clavulanic acid on clinical scores, intestinal microbiome, and amoxicillin-resistant *Escherichia coli* in dogs with uncomplicated acute diarrhea. *J Vet Intern Med* 2020; 34: 1166-1176. doi:10.1111/jvim.15775
 27. Langlois DK, Koenigshof AM, Mani R. Metronidazole treatment of acute diarrhea in dogs: A randomized double blinded placebo-controlled clinical trial. *J Vet Intern Med* 2020; 34: 98-104. doi:10.1111/jvim.15664

28. Shmalberg J, Montalbano C, Morelli G et al. A Randomized Double Blinded Placebo-Controlled Clinical Trial of a Probiotic or Metronidazole for Acute Canine Diarrhea. *Front Vet Sci* 2019; 6: 163. doi:10.3389/fvets.2019.00163
29. Manchester AC, Webb CB, Blake AB et al. Long-term impact of tylosin on fecal microbiota and fecal bile acids of healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 2605-2617. doi:10.1111/jvim.15635
30. Lawrence M, Kukanich K, Kukanich B et al. Effect of cefovecin on the fecal flora of healthy dogs. *Vet J* 2013; 198: 259-266. doi:10.1016/j.tvjl.2013.04.010
31. Grønvold AM, L'Abée-Lund TM, Sørum H et al. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. *FEMS Microbiol Ecol* 2010; 71: 313-326. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00808.x
32. McFarland L. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea. *Digestive Diseases* 1998; 16: 292-307
33. Damrongmanee A, Ukarapol N. Incidence of antibiotic-associated diarrhea in a pediatric ambulatory care setting. *J Med Assoc Thailand* 2007; 90: 513
34. Blot E, Escande MC, Besson D et al. Outbreak of *Clostridium difficile*-related diarrhoea in an adult oncology unit: risk factors and microbiological characteristics. *J Hosp Inf* 2003; 53: 187-192. doi:10.1053/jhin.2002.1356
35. McFarland LV. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 2008; 5: 40-48
36. Wren SM, Ahmed N, Jamal A et al. Preoperative oral antibiotics in colorectal surgery increase the rate of *Clostridium difficile* colitis. *Archives of surgery* 2005; 140: 752-756
37. Turck D, Bernet J-P, Marx J et al. Incidence and risk factors of oral antibiotic-associated diarrhea in an outpatient pediatric population. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2003; 37: 22-26
38. Hoban DJ. Antibiotics and collateral damage. *Clin Cornerstone* 2003; Suppl 3: S12-20. doi:10.1016/s1098-3597(03)90025-1

39. Tamma PD, Avdic E, Li DX et al. Association of Adverse Events With Antibiotic Use in Hospitalized Patients. *JAMA Intern Med* 2017; 177: 1308-1315. doi:10.1001/jamainternmed.2017.1938
40. Mullish BH, Williams HR. Clostridium difficile infection and antibiotic-associated diarrhoea. *Clin Med (Lond)* 2018; 18: 237-241. doi:10.7861/clinmedicine.18-3-237
41. Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis. *Am J of Gastroenterol (Springer Nature)* 1997; 92
42. Levy DG, Stergachis A, McFarland LV et al. Antibiotics and Clostridium difficile diarrhea in the ambulatory care setting. *Clinical therapeutics* 2000; 22: 91-102
43. Monaghan T, Boswell T, Mahida YR. Recent advances in Clostridium difficile-associated disease. *Postgrad Med J* 2009; 85: 152-162
44. Archibald LK, Banerjee SN, Jarvis WR. Secular trends in hospital-acquired Clostridium difficile disease in the United States, 1987–2001. *J Infect Dis* 2004; 189: 1585-1589
45. Surawicz C, McFarland L. Pseudomembranous colitis: causes and cures. *Digestion* 1999; 60: 91-100
46. Willard MD, Berridge B, Braniecki A et al. Possible antibiotic-associated colitis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 1775-1779, 1753-1774
47. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11: 227-238. doi: 10.1038/nrmicro2974.
48. Behr C, Slopianka M, Haake V et al. Analysis of metabolome changes in the bile acid pool in feces and plasma of antibiotic-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019; 363: 79-87. doi:10.1016/j.taap.2018.11.012
49. Ianiro G, Tilg H, Gasbarrini A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut* 2016; 65: 1906-1915. doi:10.1136/gutjnl-2016-312297
50. Neuman H, Forsythe P, Uzan A et al. Antibiotics in early life: dysbiosis and the damage done. *FEMS Microbiol Rev* 2018; 42: 489-499. doi:10.1093/femsre/fuy018

51. Willmann M, Vehreschild M, Biehl LM et al. Distinct impact of antibiotics on the gut microbiome and resistome: a longitudinal multicenter cohort study. *BMC Biol* 2019; 17: 76. doi:10.1186/s12915-019-0692-y
52. Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev* 2017; 279: 90-105. doi:10.1111/imr.12563
53. Pilla R, Suchodolski JS. The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Front Vet Sci* 2019; 6: 498. doi:10.3389/fvets.2019.00498
54. Haak BW, Prescott HC, Wiersinga WJ. Therapeutic Potential of the Gut Microbiota in the Prevention and Treatment of Sepsis. *Front Immunol* 2018; 9: 2042. doi:10.3389/fimmu.2018.02042
55. Khodamoradi Y, Kessel J, Vehreschild JJ et al. The Role of Microbiota in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections. *Dtsch Arztebl Int* 2019; 116: 670-676. doi:10.3238/arztebl.2019.0670
56. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C et al. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010; 156: 3216-3223
57. Igarashi H, Maeda S, Ohno K et al. Effect of oral administration of metronidazole or prednisolone on fecal microbiota in dogs. *PLoS One* 2014; 9: e107909. doi:10.1371/journal.pone.0107909
58. Espinosa-Gongora C, Jessen LR, Kieler IN et al. Impact of oral amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid treatment on bacterial diversity and β -lactam resistance in the canine faecal microbiota. *J Antimicrob Chemother* 2020; 75: 351-361. doi:10.1093/jac/dkz458
59. Paul A, Stayt J. The intestinal microbiome in dogs and cats with diarrhoea as detected by a faecal polymerase chain reaction-based panel in Perth, Western Australia. *Aust Vet J* 2019; 97: 418-421. doi:10.1111/avj.12867
60. Honneffer JB, Minamoto Y, Suchodolski JS. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 16489-16497. doi:10.3748/wjg.v20.i44.16489

61. Connelly S, Fanelli B, Hasan NA et al. Oral Beta-Lactamase Protects the Canine Gut Microbiome from Oral Amoxicillin-Mediated Damage. *Microorganisms* 2019; 7. doi:10.3390/microorganisms7050150
62. Redfern A, Suchodolski J, Jergens A. Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease. *Vet Rec* 2017; 181: 370. doi:10.1136/vr.103826
63. Fjalstad JW, Esaiassen E, Juvet LK et al. Antibiotic therapy in neonates and impact on gut microbiota and antibiotic resistance development: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 569-580. doi:10.1093/jac/dkx426
64. Suchodolski JS, Dowd SE, Westermarck E et al. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC microbiology* 2009; 9: 210
65. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; 126: 1620-1633
66. Rahimi R, Nikfar S, Rezaie A et al. A meta-analysis of antibiotic therapy for active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2920-2925. doi: 10.1007/s10620-007-9760-1
67. Khan KJ, Ullman TA, Ford AC et al. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 661-673. doi: 10.1038/ajg.2011.72.
68. Rashid M-U, Zaura E, Buijs MJ et al. Determining the long-term effect of antibiotic administration on the human normal intestinal microbiota using culture and pyrosequencing methods. *Clin Infect Dis* 2015; 60: S77-S84. doi: 10.1093/cid/civ137.
69. Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF et al. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PloS one* 2010; 5: e9836
70. Zimmermann P, Curtis N. Effect of intrapartum antibiotics on the intestinal microbiota of infants: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2020; 105: 201-208. doi:10.1136/archdischild-2018-316659

71. AlShawaqfeh MK, Wajid B, Minamoto Y et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiology Ecology* 2017; 93: fix136-fix136. doi:10.1093/femsec/fix136
72. Chaitman J, Ziese AL, Pilla R et al. Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole. *Front Vet Sci* 2020; 7: 192. doi:10.3389/fvets.2020.00192
73. Giaretta PR, Rech RR, Guard BC et al. Comparison of intestinal expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter between dogs with and without chronic inflammatory enteropathy. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 1918-1926. doi: 10.1111/jvim.15332
74. Wang S, Martins R, Sullivan MC et al. Diet-induced remission in chronic enteropathy is associated with altered microbial community structure and synthesis of secondary bile acids. *Microbiome* 2019; 7: 126
75. Krums LM, Gubina AV, Parfenov AI et al. (The role of bile acids in the pathogenesis of chronic diarrhea). *Eksp Klin Gastroenterol* 2012. 35-39
76. Lembcke B. (Causes and clinical diagnosis of chologenic diarrhea). *Z Gastroenterol* 1989; 27: 279-284
77. Appleby RN, Walters JR. The role of bile acids in functional GI disorders. *Neurogastroenterol Motil* 2014; 26: 1057-1069. doi:10.1111/nmo.12370
78. Frey H-H, Löscher W. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin* Stuttgart: Enke; 2002
79. Löfmark S, Jernberg C, Jansson JK et al. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58: 1160-1167. doi: 10.1093/jac/dkl420
80. Allegretti JR, Kao D, Phelps E et al. Risk of *Clostridium difficile* Infection with Systemic Antimicrobial Therapy Following Successful Fecal Microbiota Transplant: Should We Recommend Anti-*Clostridium difficile* Antibiotic Prophylaxis? *Dig Dis Sci* 2019; 64: 1668-1671. doi:10.1007/s10620-018-5450-4

81. Le Bastard Q, Ward T, Sidiropoulos D et al. Fecal microbiota transplantation reverses antibiotic and chemotherapy-induced gut dysbiosis in mice. *Sci Rep* 2018; 8: 6219. doi:10.1038/s41598-018-24342-x
82. Cammarota G, Gallo A, Bibbò S. Fecal microbiota transplant for *C. difficile* infection: Just say yes. *Anaerobe* 2019; 60: 102109. doi:10.1016/j.anaerobe.2019.102109
83. Espinosa-Gongora C, Shah SQA, Jessen LR et al. Quantitative assessment of faecal shedding of β -lactam-resistant *Escherichia coli* and enterococci in dogs. *Vet Microbiol* 2015; 181: 298-302
84. Schmidt VM, Pinchbeck GL, Nuttall T et al. Antimicrobial resistance risk factors and characterisation of faecal *E. coli* isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. *Prev Vet Med* 2015; 119: 31-40. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.01.013
85. De Graef E, Decostere A, Devriese L et al. Antibiotic resistance among fecal indicator bacteria from healthy individually owned and kennel dogs. *Microb Drug Resist* 2004; 10: 65-69 doi: 10.1089/107662904323047826.
86. Sørum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res* 2001; 32: 227-24. doi: 10.1051/vetres:2001121.
87. Cusini A, Herren D, Bütikofer L et al. Intra-hospital differences in antibiotic use correlate with antimicrobial resistance rate in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a retrospective observational study. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018; 7: 89. doi:10.1186/s13756-018-0387-0
88. Kataoka Y, Umino Y, Ochi H et al. Antimicrobial susceptibility of enterococcal species isolated from antibiotic-treated dogs and cats. *J Vet Med Sci* 2014; 76: 1399-1402. doi:10.1292/jvms.13-0576
89. Schmidt VM, Pinchbeck G, McIntyre KM et al. Routine antibiotic therapy in dogs increases the detection of antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 3305-3316. doi:10.1093/jac/dky352
90. Damborg P, Gaustad IB, Olsen JE et al. Selection of CMY-2 producing *Escherichia coli* in the faecal flora of dogs treated with cephalexin. *Vet Microbiol* 2011; 151: 404-408

91. Vollaard EJ, Clasener HA. Colonization resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 409-414
92. Alexander T, Reuter T, Sharma R et al. Longitudinal characterization of resistant *Escherichia coli* in fecal deposits from cattle fed subtherapeutic levels of antimicrobials. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 7125-7134. doi: 10.1128/AEM.00944-09
93. Harmoinen J, Mentula S, Heikkilä M et al. Orally Administered Targeted Recombinant Beta-Lactamase Prevents Ampicillin-Induced Selective Pressure on the Gut Microbiota: a Novel Approach to Reducing Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 75-79. doi:10.1128/aac.48.1.75-79.2004
94. Summers AO. Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clin Infect Dis* 2002; 34: S85-S92. doi: 10.1086/340245.
95. Monroe S, Polk R. Antimicrobial use and bacterial resistance. *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 496-50. doi: 10.1016/s1369-5274(00)00129-6.
96. Guardabassi L, Kruse H. Overlooked aspects concerning development and spread of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003 ;1(3):359-62. doi: 10.1586/14787210.1.3.359
97. Bywater R. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *Zoonoses and Public Health. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004;51(8-9):361-3. doi: 10.1111/j.1439-0450.2004.00791.x.
98. Bywater R, Deluyker H, Deroover E et al. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *Journal of Antimicrob Chem* 2004; 54: 744-754
99. Damborg P, Top J, Hendrickx AP et al. Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 2360-2365. doi: 10.1128/AEM.02035-08
100. Bassitta R. Untersuchungen zur Selektion von Resistenzgenen in bayerischen Schweinehaltungsbetrieben und zur Übertragung

- antibiotikaresistenter *E. coli* zwischen Tier und Mensch; Diss. Imu, 2016
101. Kummeling I, Stelma FF, Dagnelie PC et al. Early life exposure to antibiotics and the subsequent development of eczema, wheeze, and allergic sensitization in the first 2 years of life: the KOALA Birth Cohort Study. *Ped* 2007; 119: e225-231. doi:10.1542/peds.2006-0896
 102. Metsälä J, Lundqvist A, Virta L et al. Prenatal and post-natal exposure to antibiotics and risk of asthma in childhood. *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 137-145
 103. Klem F, Wadhwa A, Prokop LJ et al. Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroentrol* 2017; 152: 1042-1054.e1041. doi:10.1053/j.gastro.2016.12.039
 104. Umamaheswari B, Biswal N, Adhisivam B et al. Persistent diarrhea: risk factors and outcome. *Indian J Pediatr* 2010; 77: 885-888. doi:10.1007/s12098-010-0125-y
 105. Ungaro R, Bernstein CN, Geary R et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014; 109: 1728-1738. doi: 10.1038/ajg.2014.246.
 106. Batool T, Reece P, Schulze K et al. Prenatal and early-life predictors of atopy and allergic disease in Canadian children: results of the Family Atherosclerosis Monitoring In earLY life (FAMILY) Study. *J Dev Orig Health Dis* 2016; 7(6):665-671. doi: 10.1017/S2040174416000386.
 107. Hirsch AG, Pollak J, Glass TA et al. Early-life antibiotic use and subsequent diagnosis of food allergy and allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2017;47(2):236-244. doi: 10.1111/cea.12807.
 108. Mitre E, Susi A, Kropp LE et al. Association between use of acid-suppressive medications and antibiotics during infancy and allergic diseases in early childhood. *JAMA pediatrics* 2018; 172: e180315-e180315
 109. Jedrychowski W, Perera F, Maugeri U et al. Wheezing and asthma may be enhanced by broad spectrum antibiotics used in early

- childhood. Concept and results of a pharmacoepidemiology study. *Journal of physiology and pharmacology. J Physiol Pharmacol* 2011; 62: 189
110. Metsälä J, Lundqvist A, Virta L et al. Prenatal and post-natal exposure to antibiotics and risk of asthma in childhood. *Clin Exp Allergy* 2015 ;45(1):137-45. doi: 10.1111/cea.12356.
111. Yassour M, Vatanen T, Siljander H et al. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Sci Transl Med.* 2016 ;8(343):343ra81. doi: 10.1126/scitranslmed.aad0917.
112. Gibson MK, Crofts TS, Dantas G. Antibiotics and the developing infant gut microbiota and resistome. *Curr Opin Microbiol* 2015; 27: 51-56. doi: 10.1016/j.mib.2015.07.007.
113. Kilian E, Suchodolski JS, Hartmann K et al. Long-term effects of canine parvovirus infection in dogs. *PLoS One* 2018; 13: e0192198. doi:10.1371/journal.pone.0192198
114. Kaufmann E, Busch K, Suchodolski J et al. Langzeitkonsequenzen nach Akutem-Hämorrhagischem-Durchfall-Syndrom (AHDS) beim Hund; 2020. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2020; 48(01): 67. doi:10.1055/s-0039-3402404
115. Schwartz S, Newman B. Vomiting and diarrhoea in dogs. *Vet Rec* 2013; 172: 136. doi:10.1136/vr.f625
116. Berset-Istratescu CM, Glardon OJ, Magouras I et al. Follow-up of 100 dogs with acute diarrhoea in a primary care practice. *Vet J* 2014; 199: 188-190. doi:10.1016/j.tvjl.2013.10.014
117. Hubbard K, Skelly BJ, McKelvie J et al. Risk of vomiting and diarrhoea in dogs. *Vet Rec* 2007; 161: 755-757
118. Stavisky J, Radford AD, Gaskell R et al. A case-control study of pathogen and lifestyle risk factors for diarrhoea in dogs. *Prev Vet Med* 2011; 99: 185-192. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.02.009
119. Pugh CA, Bronsvort BMC, Handel IG et al. Incidence rates and risk factor analyses for owner reported vomiting and diarrhoea in Labrador Retrievers - findings from the Dogslife Cohort. *Prev Vet Med* 2017; 140: 19-29. doi:10.1016/j.prevetmed.2017.02.014

120. Saevik BK, Skancke EM, Trangerud C. A longitudinal study on diarrhoea and vomiting in young dogs of four large breeds. *Acta Vet Scand* 2012; 54: 8. doi:10.1186/1751-0147-54-8
121. Marks SL, Kather EJ. Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33: 1029-1060
122. Cave NJ, Marks SL, Kass PH et al. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 221: 52-59. doi:10.2460/javma.2002.221.52
123. Anholt RM, Berezowski J, Robertson C et al. Spatial-temporal clustering of companion animal enteric syndrome: detection and investigation through the use of electronic medical records from participating private practices. *Epidemiol Infect* 2015; 143: 2547-2558. doi:10.1017/s0950268814003574
124. Ettinger SJ, Feldman EC, Cote E, Hall EJ, Day MJ. Diseases of the Small Intestine In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Amsterdam: Elsevier; 2017: 1516-1564
125. Goldstein MR, Kruth SA, Bersenas AM et al. Detection and characterization of *Clostridium perfringens* in the feces of healthy and diarrheic dogs. *Can J Vet Res* 2012; 76: 161-165
126. Leipzig-Rudolph M, Busch K, Prescott JF et al. Intestinal lesions in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome associated with netF-positive *Clostridium perfringens* type A. *J Vet Diagn Invest* 2018; 30: 495-503. doi:10.1177/1040638718766983
127. Diniz AN, Coura FM, Rupnik M et al. The incidence of *Clostridioides difficile* and *Clostridium perfringens* netF-positive strains in diarrheic dogs. *Anaerobe* 2018; 49: 58-62. doi:10.1016/j.anaerobe.2017.12.003
128. Ortiz V, Klein L, Channell S et al. Evaluating the effect of metronidazole plus amoxicillin-clavulanate versus amoxicillin-clavulanate alone in canine haemorrhagic diarrhoea: a randomised controlled trial in primary care practice. *J Small Anim Pract* 2018; 59: 398-403. doi:10.1111/jsap.12862
129. Unterer S, Strohmeyer K, Kruse BD et al. Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a

- prospective blinded study. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 973-979. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.00765.x
130. F.S. Moberg CRB, C. Lorentzen, N.M. Zyskind, L.R. Jessen, N. Dupont. Dogs with acute haemorrhagic diarrhoea syndrome not receiving antibiotics have a good prognosis despite initial high AHDS-score and systemic inflammation. In: *Research Communications of the 29th ECVIM-CA Congress. J Vet Intern Med*, 34: 339-445. <https://doi.org/10.1111/jvim.15658>
131. Robiloti E, Holubar M, Seo SK et al. Feasibility and applicability of antimicrobial stewardship in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis* 2017; 30(4):346-353. doi: 10.1097/QCO.0000000000000380.
132. Hathom JW. Critical appraisal of antimicrobials for prevention of infections in immunocompromised hosts. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993; 7: 1051-1099
133. Berent A, Weisse C. Portosystemic shunts and portal venous hypoplasia. *Stand Care Emerg Critic Care Medicine* 2007; 9: 1-11
134. Tobias K, Besser T. Evaluation of leukocytosis, bacteremia, and portal vein partial oxygen tension in clinically normal dogs and dogs with portosystemic shunts. *JAVMA* 1997; 211: 715-718
135. Watson P, Herrtage M. Medical management of congenital portosystemic shunts in 27 dogs—a retrospective study. *J Small Anim Pract* 1998; 39: 62-68
136. Winkler JT, Bohling MW, Tillson DM et al. Portosystemic shunts: diagnosis, prognosis, and treatment of 64 cases (1993–2001). *J Am Anim Hosp Assoc* 2003; 39: 169-185. doi: 10.5326/0390169.
137. Purvis D, Kirby R. Systemic inflammatory response syndrome: septic shock. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1994 ;24(6):1225-47. doi: 10.1016/s0195-5616(94)50136-0.
138. Hauptman J, Walshaw R, Olivier N. Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Vet Surg.* 1997; 26: 393-397
139. Okano S, Yoshida M, Fukushima U et al. Usefulness of systemic inflammatory response syndrome criteria as an index for prognosis judgement. *Vet Rec.* 150. 245-6. doi:10.1136/vr.150.8.245.

140. Goddard A, Leisewitz AL. Canine parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40: 1041-1053. doi:10.1016/j.cvsm.2010.07.007
141. Castro TX, Cubel Garcia Rde C, Gonçalves LP et al. Clinical, hematological, and biochemical findings in puppies with coronavirus and parvovirus enteritis. *Can Vet J* 2013; 54: 885-888
142. Sullivan LA. Parvoviral Enteritis: What's New? *Adv Small Anim Med Surg* 2019; 32: 1-3. doi:10.1016/j.asams.2019.11.001
143. Krentz T, Allen S. Bacterial translocation in critical illness. *J Small Anim Pract* 2017; 58: 191-198
144. Mylonakis ME, Kalli I, Rallis TS. Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Vet Med (Auckl)* 2016; 7: 91-100. doi:10.2147/vmrr.S80971
145. Yilmaz Z, Senturk S. Characterisation of lipid profiles in dogs with parvoviral enteritis. *J Small Anim Pract* 2007; 48: 643-650
146. Iris K, Leontides LS, Mylonakis ME et al. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Res Vet Sci* 2010; 89: 174-178. doi:10.1016/j.rvsc.2010.02.013
147. Alves F, Prata S, Nunes T et al. Canine parvovirus: a predicting canine model for sepsis. *BMC Vet Res* 2020; 16: 199. doi:10.1186/s12917-020-02417-0
148. Horecka K, Porter S, Amirian ES et al. A Decade of Treatment of Canine Parvovirus in an Animal Shelter: A Retrospective Study. *Animals (Basel)* 2020; 10. doi:10.3390/ani10060939
149. Venn EC, Preisner K, Boscan PL et al. Evaluation of an outpatient protocol in the treatment of canine parvoviral enteritis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2017; 27: 52-65. doi:10.1111/vec.12561
150. Martin V, Najbar W, Gueguen S et al. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. *Vet Microbiol* 2002; 89: 115-127. doi:10.1016/s0378-1135(02)00173-6
151. Andersen LA, Levy JK, McManus CM et al. Prevalence of enteropathogens in cats with and without diarrhea in four different

- management models for unowned cats in the southeast United States. *Vet J* 2018; 236: 49-55. doi:10.1016/j.tvjl.2018.04.008
152. Marks SL, Rankin SC, Byrne BA et al. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 1195-1208. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.00821.x
153. Weese JS. Bacterial enteritis in dogs and cats: diagnosis, therapy, and zoonotic potential. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011; 41: 287-309. doi:10.1016/j.cvsm.2010.12.005
154. Kiflu B, Alemayehu H, Abdurahaman M et al. Salmonella serotypes and their antimicrobial susceptibility in apparently healthy dogs in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Vet Res* 2017; 13: 134. doi:10.1186/s12917-017-1055-y
155. Black DM, Rankin SC, King LG. Antimicrobial therapy and aerobic bacteriologic culture patterns in canine intensive care unit patients: 74 dogs (January-June 2006). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009; 19: 489-495. doi:10.1111/j.1476-4431.2009.00463.x
156. Oeschger T, McCloskey D, Koppaarth V et al. Point of care technologies for sepsis diagnosis and treatment. *Lab Chip* 2019; 19: 728-737. doi: 10.1039/c8lc01102h.
157. Stewart SD, Allen S. Antibiotic use in critical illness. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2019; 29: 227-238. doi:10.1111/vec.12842
158. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Med* 2017; 43: 304-377. doi: 10.1007/s00134-017-4683-6
159. Bone R, Balk R, Cerra F et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992 Jun;101(6):1644-55. doi: 10.1378/chest.101.6.1644.
160. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Jama* 2016; 315: 801-810

161. Pipan M. Diarrhea In: Drobatz KJ, Hopper K, Rozanski E, Silverstein D, eds. Textbook of Small Animal Emergency Medicine. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2018: 485-489
162. Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. Clin Infect Dis 2008; 46: S58-S61
163. Dobson A, Cotter PD, Ross RP et al. Bacteriocin production: a probiotic trait? Appl Environ Microbiol 2012 ;78(1):1-6. doi: 10.1128/AEM.05576-11.
164. Asahara T, Shimizu K, Nomoto K et al. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing Escherichia coli O157: H7. Infect Immunit 2004; 72: 2240-2247
165. Nagpal R, Wang S, Ahmadi S et al. Human-origin probiotic cocktail increases short-chain fatty acid production via modulation of mice and human gut microbiome. Sci Rep 2018; 8: 1-15
166. Quigley EMM. Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. Clin Gastroenterol Hepatol 2019; 17: 333-344. doi:10.1016/j.cgh.2018.09.028
167. Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. Gut Microbes 2017; 8: 172-184. doi:10.1080/19490976.2017.1290756
168. Bybee SN, Scorza AV, Lappin MR. Effect of the probiotic Enterococcus faecium SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. J Vet Intern Med 2011; 25: 856-860. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.0738.x
169. Fusi E, Rizzi R, Polli M et al. Effects of Lactobacillus acidophilus D2/CSL (CECT 4529) supplementation on healthy cat performance. Vet Rec Open 2019; 6: e000368. doi:10.1136/vetreco-2019-000368
170. Gagné JW, Wakshlag JJ, Simpson KW et al. Effects of a synbiotic on fecal quality, short-chain fatty acid concentrations, and the microbiome of healthy sled dogs. BMC Vet Res 2013; 9: 246. doi:10.1186/1746-6148-9-246
171. Gómez-Gallego C, Junnila J, Männikkö S et al. A canine-specific probiotic product in treating acute or intermittent diarrhea in dogs: A double-blind placebo-controlled efficacy study. Vet Microbiol 2016; 197: 122-128. doi:10.1016/j.vetmic.2016.11.015

172. Herstad HK, Nesheim BB, L'Abée-Lund T et al. Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis--a controlled clinical trial. *J Small Anim Pract* 2010; 51: 34-38. doi:10.1111/j.1748-5827.2009.00853.x
173. Marelli SP, Fusi E, Giardini A et al. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL (CECT 4529) on the nutritional and health status of boxer dogs. *Vet Rec* 2020. doi:10.1136/vr.105434. doi:10.1136/vr.105434
174. Marshall-Jones ZV, Baillon ML, Croft JM et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* DSM13241 as a probiotic in healthy adult cats. *Am J Vet Res* 2006; 67: 1005-1012. doi:10.2460/ajvr.67.6.1005
175. Nixon SL, Rose L, Muller AT. Efficacy of an orally administered anti-diarrheal probiotic paste (Pro-Kolin Advanced) in dogs with acute diarrhea: A randomized, placebo-controlled, double-blinded clinical study. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 1286-1294. doi:10.1111/jvim.15481
176. Rose L, Rose J, Gosling S et al. Efficacy of a Probiotic-Prebiotic Supplement on Incidence of Diarrhea in a Dog Shelter: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Vet Intern Med* 2017; 31: 377-382. doi:10.1111/jvim.14666
177. Arslan H, Aksu DS, Terzi G et al. Therapeutic effects of probiotic bacteria in parvoviral enteritis in dogs. *Rev Med Vet-Toulouse* 2012; 2: 55-59
178. Niederwerder MC. Fecal microbiota transplantation as a tool to treat and reduce susceptibility to disease in animals. *Vet Immunol Immunopathol* 2018; 206: 65-72. doi:10.1016/j.vetimm.2018.11.002
179. Niina A, Kibe R, Suzuki R et al. Improvement in Clinical Symptoms and Fecal Microbiome After Fecal Microbiota Transplantation in a Dog with Inflammatory Bowel Disease. *Vet Med (Auckl)* 2019; 10: 197-201. doi:10.2147/vmrr.S230862
180. Pereira GQ, Gomes LA, Santos IS et al. Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 707-711. doi:10.1111/jvim.15072
181. Weese J, Costa M, Webb J. Preliminary clinical and microbiome assessment of stool transplantation in the dog and cat. In: 2013

- ACVIM Forum Research Abstracts Program. *J Vet Intern Med*, 27: 604-756. <https://doi.org/10.1111/jvim.12100>
182. Murphy T, Chaitman J, Han E. Use of fecal transplant in eight dogs with refractory *Clostridium perfringens* associated diarrhea. In: 2014 ACVIM Forum Research Abstracts Program. *J Vet Intern Med*, 28: 976-1134. <https://doi.org/10.1111/jvim.12361>
183. Fenimore A, Martin L, Lappin MR. Evaluation of Metronidazole With and Without *Enterococcus Faecium* SF68 in Shelter Dogs With Diarrhea. *Top Companion Anim Med* 2017; 32: 100-103. doi:10.1053/j.tcam.2017.11.001
184. Aktaş M, Borku M, Ozkanlar Y. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in dogs with lincomycin induced diarrhoea. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy* 2007; 51: 365-369
185. de Gunzburg J, Ghoulane A, Ducher A et al. Protection of the Human Gut Microbiome From Antibiotics. *J Infect Dis* 2018; 217: 628-636. doi:10.1093/infdis/jix604
186. Friedman G. The role of probiotics in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* colitis. *Gastroenterology Clinics of North America* 2012; 41: 763-779. doi:10.1016/j.gtc.2012.08.002
187. Goldenberg JZ, Lytvyn L, Steurich J et al. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2015. doi:10.1002/14651858.CD004827.
188. Bulow C, Langdon A, Hink T et al. Impact of Amoxicillin-Clavulanate followed by Autologous Fecal Microbiota Transplantation on Fecal Microbiome Structure and Metabolic Potential. *mSphere* 2018; 3. doi:10.1128/mSphereDirect.00588-18

III. PUBLIKATION 2: ORIGINAL-PUBLIKATION ZUR STUDIE 1

Diagnostic value of fecal cultures in dogs with chronic diarrhea

Melanie Werner

Clinic of Small Animal Internal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine,
LMU, Munich, Germany

Jan S. Suchodolski

Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences,
College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University,
College Station, Texas

Jonathan A. Lidbury

Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences,
College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University,
College Station, Texas

Jörg M. Steiner

Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences,
College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University,
College Station, Texas

Katrin Hartmann

Clinic of Small Animal Internal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine,
LMU, Munich, Germany

Stefan Unterer

Clinic of Small Animal Internal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine,
LMU, Munich, Germany

Journal of Veterinary Internal Medicine: veröffentlicht

J Vet Intern Med. 2021;35:199–208.; DOI: 10.1111/jvim.15982






Received: 14 September 2020 | Accepted: 20 November 2020

DOI: 10.1111/jvim.15982

STANDARD ARTICLE

Journal of Veterinary Internal Medicine  American College of Veterinary Internal Medicine
Open Access

Diagnostic value of fecal cultures in dogs with chronic diarrhea

Melanie Werner¹  | Jan S. Suchodolski²  | Jonathan A. Lidbury²  |
Jörg M. Steiner²  | Katrin Hartmann¹ | Stefan Unterer¹¹Clinic of Small Animal Internal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, LMU, Munich, Germany²Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, Texas

Correspondence

Melanie Werner, Clinic of Small Animal Internal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, LMU, Veterinärstr. 13, Munich, Germany.
Email: m.werner@medizinische-kleintierklinik.de

Abstract

Background: Culture-based assessment of the fecal microbiome using fecal culture profiles frequently is performed in dogs with chronic diarrhea, but the diagnostic value of this approach has not been determined.**Objectives:** To compare the reported results of fecal culture profiles and the polymerase chain reaction-based dysbiosis index (DI) between dogs with chronic diarrhea and healthy dogs; to assess interlaboratory variability in bacterial and fungal cultures among 3 veterinary diagnostic laboratories (diagnostic laboratory 1 [L1], diagnostic laboratory 2 [L2], diagnostic laboratory 3 [L3]); and to compare the reported interpretation of culture profiles (normobiosis versus dysbiosis) with those of the DI.**Animals:** Eighteen dogs with chronic diarrhea (CDG) and 18 healthy control dogs (HG).**Methods:** In this prospective, case-control study, fecal samples were submitted to 3 commercial laboratories for fecal culture. The microbiota was assessed using PCR assays. Dogs receiving antimicrobials were excluded.**Results:** Dysbiosis index was significantly increased in CDG (mean, 0.9; SD, 3.8; 95% confidence interval [CI], -1.0; 2.8) compared to HG (mean, -3.0; SD, 2.8; CI, -4.3; -1.6; $P = .0002$), whereas cultures from all laboratories failed to detect significant differences ($P = .66$, $.18$, and $.66$, respectively). Hemolytic *Escherichia coli* was the only potential enteropathogen on culture, but no significant difference was found between CDG and HG. For diagnosis of dysbiosis, culture showed no agreement with DI (L1, $\kappa = -0.21$; CI, -0.44; -0.02; L2, $\kappa = -0.33$; CI, -0.58; -0.08; L3, $\kappa = -0.25$; CI, -0.39; -0.11). Furthermore, variability among the 3 laboratories was high (L1/L2, $\kappa = 0.15$; CI, -0.05; 0.35; L1/L3, $\kappa = -0.08$; CI, -0.01; -0.16; L2/L3, $\kappa = -0.06$; CI, -0.33; -0.20).**Conclusions and clinical importance:** Fecal cultures failed to distinguish between diseased and healthy dogs, and a high level of interlaboratory variation for culture was found.

KEYWORDS

antibiotic, canine, chronic enteropathy, *Escherichia coli*, interlaboratory**Abbreviations:** CDG, chronic diarrhea group; DI, dysbiosis index; HG, healthy group; L1, diagnostic laboratory 1; L2, diagnostic laboratory 2; L3, diagnostic laboratory 3.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2020 The Authors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* published by Wiley Periodicals LLC, on behalf of the American College of Veterinary Internal Medicine.

1 | INTRODUCTION

Culture-based assessment of feces is a diagnostic tool that should be used to identify specific or opportunistic enteropathogenic bacteria (eg, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, specific enteropathogenic *Escherichia coli* strains, *Yersinia* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*) and fungi in animals showing clinical signs associated with infectious acute or chronic diarrhea.¹⁻³ Several commercial veterinary diagnostic laboratories offer fecal culture as a tool to assess microbial composition (ie, growth of gram-negative and gram-positive flora) and, furthermore, to provide treatment recommendations based on their own interpretation of normobiosis and dysbiosis. Doing so is problematic, because aerobic culture-based methods do not adequately represent the mostly anaerobic intestinal microbiota. Several limitations are associated using fecal culture to diagnose the cause of diarrhea, such as lack of standardization with regard to sampling technique (eg, amount of feces), shipping (eg, chilled vs. room temperature), and methodology (eg, culture media, subsampling, dilution error, method used to count colonies) among different laboratories. However, it should be implicit that submission of a fecal sample to a diagnostic laboratory is a request to confirm the diagnosis of an infectious disease. Fecal cultures should not be submitted to infer what constitutes normal versus abnormal feces, especially in dogs with chronic diarrhea. In addition, the diagnostic value of fecal cultures in dogs with chronic diarrhea without signs of systemic inflammation is questionable,⁴ especially because putative bacterial enteropathogens frequently are isolated from healthy dogs.⁴⁻⁷ Thus, the clinical utility of this method for identifying potentially enteropathogenic bacteria in dogs with chronic diarrhea is unclear.

Novel molecular genetic-based tests have been developed to assess the microbiota and have identified complex bacterial communities in the intestine of dogs. Compositional changes in the microbiota have been documented in dogs with chronic enteropathies and may play a role in the pathogenesis of the disease.^{8,9} Some of these molecular genetic-based tests for dysbiosis are rapid PCR-based methods and represent promising tools for assessment of dysbiosis in dogs with chronic diarrhea.^{10,11}

Chronic diarrhea in dogs has been defined as having a duration of ≥ 3 weeks.¹² The first stage of the diagnostic evaluation usually aims to rule out extraintestinal diseases and parasites.^{12,13} Although imaging and histopathological evaluations frequently are restricted to patients with severe clinical signs, gastrointestinal protein loss, or suspicion of neoplastic infiltration or invasive infectious agents, fecal cultures sometimes are included in the first routine evaluation of these cases. More specifically, clinicians frequently submit fecal samples for cost-intensive "fecal culture profiles", although studies evaluating the diagnostic utility of fecal cultures in dogs with chronic diarrhea are lacking.^{4,14}

We hypothesize that the diagnostic value of fecal culture profiles in dogs with chronic diarrhea is questionable. Thus, we aimed to (1) compare the results of fecal cultures and the interpretations provided by 3 diagnostic laboratories in dogs with chronic diarrhea and healthy control dogs; (2) compare these results to the interpretation of the PCR-based dysbiosis index (DI) to verify dysbiosis; and (3) to

assess interlaboratory variability in bacterial and fungal cultures among 3 commercial laboratories (diagnostic laboratory 1 [L1], diagnostic laboratory 2 [L2], diagnostic laboratory 3 [L3]).

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Animals

Our study was designed as a prospective, case-control (1:1) trial and was approved by the animal care and use committee (Ethikkommission) of the Centre for Clinical Veterinary Medicine LMU, Munich (reference 156-07-02-2019). Two groups of 18 dogs each were included in the study, 1 consisted of dogs with chronic diarrhea (CDG) and 1 of dogs without clinical signs serving as controls (HG). All dogs were recruited between February and November 2019 by the same clinician (MW). Dogs of either sex, neuter status, body weight, and at least 1 year of age were included. The HG included dogs presented for vaccination or annual health checkups and these dogs had no clinically relevant history or findings on physical examination. Exclusion criteria for HG were gastrointestinal signs or administration of antimicrobials or probiotics during the last 4 weeks before presentation. Only dogs with diarrhea of a minimum duration of 3 weeks were enrolled into the CDG. Exclusion criteria for CDG were administration of antimicrobials or probiotics during the 4 weeks before to presentation, clinical, or laboratory findings suggesting the necessity of antimicrobial treatment (rectal temperature $> 39.0^{\circ}\text{C}$ [102.2°F], white blood cell count $< 5 \times 10^9/\text{L}$ or $> 20 \times 10^9/\text{L}$, and band neutrophils $> 1.5 \times 10^9/\text{L}$), suspicion or documentation of neoplastic infiltration of the intestine, and moderate to severe hypoalbuminemia (< 2.3 g/dL). The clinical history of all dogs (HG and CDG) was recorded by using a standardized protocol with specific questions regarding the onset of diarrhea (CDG), fecal quality, number of defecations per day, vomiting, appetite, current treatment and previous treatment, other concurrent diseases, diet, and current dietary changes. The diagnostic evaluation in the CDG consisted of a CBC (in all dogs), serum biochemistry profile (ie, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, creatinine, urea nitrogen, total protein, albumin, glucose, sodium, potassium, chloride, phosphate, total calcium; all dogs), serum cobalamin and folate concentrations (14/18 dogs), basal serum cortisol concentration or adrenocorticotropic hormone stimulation test (14/18 dogs), fecal flotation (17/18 dogs), *Giardia* spp. ELISA (16/18 dogs), and abdominal ultrasound examination (16/18 dogs).

2.2 | Sample collection

Naturally passed feces from each dog were collected by the owner on the day of presentation. Fecal samples were mixed and immediately divided into 4 equally sized aliquots for fecal culture at 3 different commercial reference laboratories as well as microbiota analysis by quantitative PCR (qPCR), respectively. Fecal samples for culture were submitted to the 3 laboratories according to their instructions:

samples were sent on the same day to L1 and L2 by courier, and to L3 by regular mail. The aliquots for molecular genetics-based microbiota analysis were frozen at -80°C and were sent as a batch on dry ice to the Gastrointestinal Laboratory at Texas A&M University at the end of the study period. No information about the dogs' history was provided to any of the laboratories at the time of submission.

2.3 | Fecal culture

Each laboratory offered its unique test panel. Thus, the included tests and microbiological methods varied among the laboratories and were not standardized. The following diagnostic tests were offered at all 3 laboratories as part of their routinely offered "fecal culture profile": bacteriology (aerobically incubated), mycology, and specific testing for obligate and facultative pathogenic bacteria (*Salmonella*, *Campylobacter* spp., and *Yersinia* spp.). Laboratory 1 additionally performed a clostridial culture as part of its fecal profile. All 3 laboratories provided their own interpretation of test results (eg, "presence of abnormal flora" or "detection of pathogenic isolates" or both). Laboratory 1 and L2 subdivided the interpretation of the results into gram + and gram - spectrum of bacteria based on general microbiological nomenclature. Table S2 summarizes all results of tests performed for each individual dog.

2.4 | Microbiota analysis

2.4.1 | DNA extraction

The DNA was extracted from an aliquot of 100 mg of each fecal sample using a MoBio Power soil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, California) according to the manufacturer's instructions. The bead-beating step was performed on a homogenizer (FastPrep-24; MP Biomedicals, Santa Ana, California) at a speed of 4 m/s for 60 seconds. Fecal DNA was frozen at -80°C until further analysis.

2.4.2 | Quantitative PCR

The abundances of total bacteria and 7 bacterial taxa (ie, *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Blautia* spp., *Fusobacterium* spp., and *Clostridium hiranonis*), which had been identified as being altered in dogs with gastrointestinal disease in previous studies, were quantified by specific qPCR assays. The results were used to calculate the previously described DI using a mathematical algorithm.¹⁰ The technique, containing the oligonucleotide sequence of the primers and the annealing temperatures, has already been described in detail elsewhere.¹⁰ A DI < 0 indicates normobiosis, whereas a DI ≥ 2 indicates dysbiosis, and values between 0 and 2 are considered equivocal. The abundances of *C. perfringens* 16S rRNA and *C. perfringens* enterotoxin genes in feces were quantified by qPCR assays using previously reported oligonucleotide primers and assay conditions.¹⁵ The PCR conditions were 95°C for

20 seconds, 40 cycles at 95°C for 5 seconds, and 10 seconds at the optimized annealing temperature. For probe-based assays, the master mix consisted of 10 μL of TaqMan reaction mixtures, consisting of 5 μL of TaqMan Fast Universal PCR master mix (2 \times), No AmpErase UNG (Applied Biosystems, Foster City, California), 0.4 μL of each primer (concentration, 400 nM), 0.2 μL of the probe (concentration, 200 nM), 1 μL of 1% bovine serum albumin (BSA; concentration, 0.1%), 1 μL of water, and 2 μL of DNA (1:10 or 1:100 dilution). For *N,N'*-dimethyl-*N*-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-*N*-propylpropane-1,3-diamine-based (SYBR) assays, PCR procedures ran at 95°C for 2 minutes, 40 cycles at 95°C for 5 seconds, and 10 seconds at the optimized annealing temperature with 10 μL of SYBR-based reaction mixtures consisting of 5 μL of SsoFast EvaGreen supermix (Biorad Laboratories, Hercules, California), 0.4 μL of each primer (concentration, 400 nM), 1 μL of 1% BSA (concentration, 0.1%), 1.6 μL of water, and 2 μL of DNA (1:10 or 1:100 dilution). The oligonucleotide sequences of the primers, probes, and the annealing temperatures are presented in Table S1.

2.5 | Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Prism c7.0, GraphPad Software, San Diego, California) and a web-based program for calculating Cohen's kappa and weighted kappa values (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>). The distribution of data was tested using the D'Agonisto-Pearson omnibus normality test. The association of categorical variables (ie, sex, gram-positive or gram-negative bacteria, or hemolytic or mucoid growing *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter johnsonii*, alpha-hemolytic *Streptococcus* spp., aerobic spore-forming bacteria, *Enterococcus* spp., fungal, or *Clostridia* spp. between CDG and HG) and group (CDG or HG) were assessed using Fisher's exact test. Differences in continuous variables (ie, age, weight, DI, abundances of *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Blautia* spp., *Fusobacterium* spp., *C. hiranonis*, total bacteria, *C. perfringens*, and *C. perfringens* enterotoxin gene) between CDG and HG were evaluated using an unpaired *t* test or the Mann-Whitney *U* test depending on their distribution.

The agreement in classifying the fecal microbiota as normobiotic and equivocal or dysbiotic by the DI and the 3 laboratories each (ie, abnormal vs normal microbiota, presence of growing gram-negative/gram-positive microbiota, hemolytic *E. coli*) was evaluated using Cohen's kappa (κ) coefficient.¹⁶ For culture results with >2 categories (eg, mycology) a weighted kappa was calculated. The interpretation of Cohen's kappa coefficient can be found in the legend of Table 2.

3 | RESULTS

3.1 | Study population

Thirty-six dogs (CDG, $n = 18$; HG, $n = 18$) were included in the study. Frequency of breed, sex, body weight, and age did not differ between

TABLE 1 Demographics of dogs with chronic diarrhea and healthy control dogs

	CDG (n = 18)		HG (n = 18)		P value
Sex	10 male, 8 females		6 male, 12 females		.31
Neutered/intact	5/13		9/9		.31
Breeds	Mixed breed (4), Australian Shepard dog (1), Bracke (1), Cavalier King Charles Spaniel (1), Chow-Chow (1), Dalmatian (1), German Shepard dog (1), Magyar Vizsla (1), Maltese (1), Miniature Pinscher (1), Pug (1), Small Muensterlaender (1), Standard Poodle (1), Standard Schnauzer (1), Whippet (1)		Mixed breed (4), Labrador Retriever (3), Border Collie (2), Dachshund (2), Dobermann Pinscher (2), Beagle (1), Bearded Collie (1), Chihuahua (1), German Shepard Dog (1), Goldendoodle (1)		
	Median	Range	Median	Range	
Body weight (kg)	14.5	2.7-30	20.6	3.5-33.3	.27
Age (years)	5.0	1.0-12.0	3.0	1.0-10.0	.16

Abbreviations: CDG, chronic diarrhea group; HG, healthy group; n, number of dogs.

Laboratory	Laboratory	Level of agreement	CI	Level of agreement
DI	L1	$\kappa = -0.21$	-0.44; -0.02	Disagreement
DI	L2	$\kappa = -0.33$	-0.58; -0.08	Disagreement
DI	L3	$\kappa = -0.25$	-0.39; -0.11	Disagreement
L1	L2	$\kappa = 0.15$	-0.05; 0.35	Poor agreement
L2	L3	$\kappa = -0.06$	-0.33; 0.20	Disagreement
L1	L3	$\kappa = 0.08$	-0.01; 0.16	Poor agreement

Note: Interpretation of Cohen's kappa (κ) value: $\kappa < 0$: disagreement; $0 \leq \kappa \leq 0.4$: poor agreement; $0.4 < \kappa < 0.75$: fair to good agreement; $\kappa \geq 0.75$: strong agreement.

Abbreviations: CI, confidence interval; DI, dysbiosis index; L1, diagnostic laboratory 1; L2, diagnostic laboratory 2; L3, diagnostic laboratory 3.

TABLE 2 Comparison of agreement of microbiota analysis and fecal cultures between individual laboratories

CDG and HG (Table 1). In CDG, the median duration of diarrhea was 13.5 (range, 1-96) months. Owners described soft stool quality in 9/18 (50%), watery diarrhea in 9/18 (50%), and intermittent hematochezia in 6/18 (33%) dogs. The number of defecations per day was increased (>3 times per day) in 11/18 (61%) dogs. Seven of 18 (39%) dogs had additional chronic vomiting and 4/18 (22%) had decreased appetite. Six of 18 (33%) dogs received a commercial diet, 5/18 (28%) a hydrolyzed protein diet, 4/18 (22%) a commercial single protein/single carbohydrate diet, and 3/18 (17%) a home-cooked diet. Six of 18 dogs (33%) received medication at the date of presentation (levothyroxine PO [n = 2], pancreatic enzymes PO [n = 1], pantoprazole PO [n = 1], prednisolone PO [n = 1], oclacitinib PO [n = 1], omeprazole PO [n = 1], metamizole PO [n = 1], cobalamin supplement PO [n = 1]). Drugs and dietary supplements (excluding antimicrobials) that the patients received in the 2 years before presentation included: fenbendazole PO, toltrazuril PO, probiotic PO, metamizole PO, omeprazole PO, maropitant PO, prednisolone PO, pantoprazole PO, tramadol PO, meloxicam PO, and cyclosporin PO. Antimicrobials that were administered to the dogs at least 2 months before presentation were: metronidazole PO (9/18 in total: 1/18, 2 months; 2/18, 3 months; 3/18, 4 months; 1/18, 7 months; 1/18, 12 months; and 1/18 24 months before sample collection), amoxicillin-clavulanic acid PO (2/18; 2 and 10 months previously), and trimethoprim-sulfonamide

PO (1/18; 3 months previously). Concurrent diseases in CDG included dermatological disorders (2/18), hypothyroidism (2/18), and orthopedic problems (1/18).

3.2 | Comparison of microbiota analysis by qPCR between CDG and HG

The DI was significantly higher ($P = .0002$) in CDG (mean, 0.9; SD, 3.8; 95% CI, -1.0; 2.8) in comparison to HG (mean, -3.0; SD, 2.8; CI, -4.3; -1.6; Figure 1). An increased DI (> 2) was found in 44% (8/18) of the dogs of the CDG and in 6% (1/18) of the HG. The abundance of *Faecalibacterium* ($P = .01$) and *Fusobacterium* ($P = .03$) was significantly decreased in the CDG in comparison to the HG (Figure 1), whereas abundances of *Turicibacter*, *Streptococcus*, *E. coli*, *Blautia*, and *C. hiranonis* were not significantly different between CDG and HG. All dogs with a decreased abundance of *C. hiranonis* in both groups had a DI > 2. Only 1 of the CDG dogs with DI > 2 had a normal abundance of *C. hiranonis*, but in this dog *Streptococcus* was increased (Figure 1). Polymerase chain reaction was performed for *C. perfringens* and *C. perfringens* enterotoxins genes, but no difference between CDG and HG could be identified. *Clostridium perfringens* was found in 16/18 (89%) dogs of CDG and in all dogs (100%) of the HG.

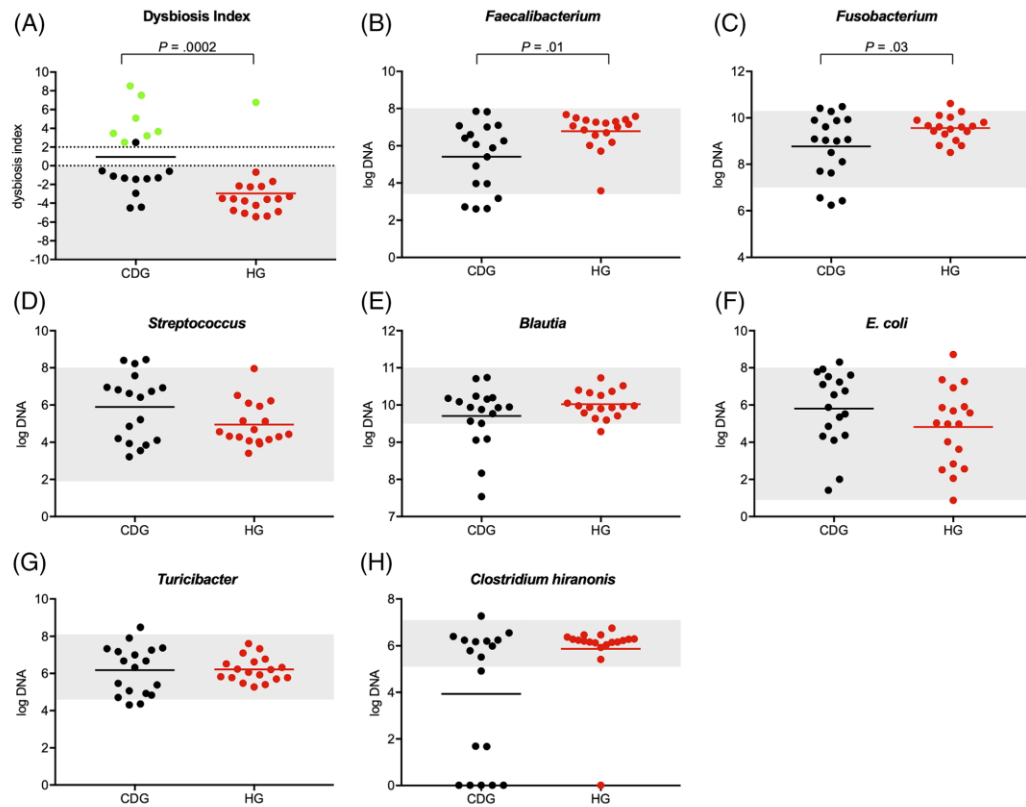


FIGURE 1 Dysbiosis index. This figure shows the dysbiosis index, A, and the abundances of *Faecalibacterium*, B, *Fusobacterium*, C, *Streptococcus*, D, *Blautia*, E, *Escherichia coli*, F, *Turicibacter*, G, and *Clostridium hiranonis*, H, in dogs with chronic diarrhea (CDG) and healthy control dogs (HG). Dots show individual dogs, bars show the means for each group. The reference intervals are shaded in grey. In A, green dots represent dogs with a decreased abundance of *Clostridium hiranonis*. A dysbiosis index <0 indicates normobiosis. A dysbiosis index above 2 indicates dysbiosis. The interval between 0 and 2 is defined as equivocal

3.3 | Comparison of fecal cultures between CDG and HG

Fecal culture results from all 3 laboratories were not significantly different between CDG and HG. The tests offered, the results, and their interpretation differed among the 3 laboratories and, therefore, main findings are presented for each laboratory separately. The term “normal or abnormal microbiota” was used as interpretation by the laboratories themselves when the results of cultures were reported.

Laboratory 1 (L1) reported “abnormal microbiota” in 14/18 dogs of CDG and in 16/18 dogs of HG ($P = .66$; Figure 2). Gram-negative bacteria were not found in 2 dogs of each group. Gram-positive bacteria could not be cultured in 3 dogs from each group. The only identified bacteria considered as potential enteropathogen by the laboratory was hemolytic *E. coli* in 4/18 CDG and 8/18 HG dogs ($P = .29$; Figure 3). Only L1 tested for anaerobic bacterial growth.

Clostridium spp. (>1 million colony forming units/g) was found in 8/18 of CDG and in 10/18 of HG. All reported bacterial groups are summarized in Table 3. Unrequested susceptibility testing for antimicrobials was routinely provided for 6 different bacterial isolates (ie, *Acinetobacter* spp., *Buttiauxella ferrugutiae*, hemolytic *E. coli* [not in cases with a low growth rate], mucoid growing *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, and *Klebsiella variicola*).

Laboratory 2 (L2) interpreted the bacterial microbiota as “abnormal” in 5/18 dogs of CDG and 10/18 dogs of HG ($P = .18$; Figure 2). Gram-negative bacteria were present in 16/18 dogs of each group. Gram-positive bacteria were cultured in 17/18 dogs of CDG and 12/18 dogs of HG. Hemolytic growing *E. coli* were documented in 2/18 dogs of CDG and 4/18 dogs of HG ($P = .66$; Figure 3). No other potential enteropathogens were isolated from any of the samples.

Laboratory 3 (L3) reported “abnormal microbiota” in 4/18 dogs of CDG and 2/18 dogs of HG (Figure 2; $P = .66$). Hemolytic *E. coli* were

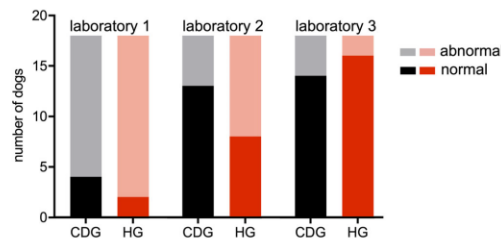


FIGURE 2 Fecal culture interpretation. Interpretations of the fecal culture results for dysbiosis given by the 3 commercial laboratories in dogs with chronic diarrhea (CDG) and healthy control dogs (HG). There was no significant association between the interpretation provided by each laboratory and group (CDG or HG)

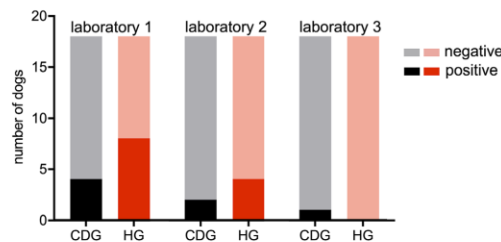


FIGURE 3 Growth of hemolytic *Escherichia coli*. Comparison of growth of fecal hemolytic *E. coli* reported by 3 different commercial laboratories in dogs with chronic diarrhea (CDG) and healthy control dogs (HG). There was no significant association between the growth of hemolytic *E. coli* as reported by each laboratory and group (CDG or HG)

TABLE 3 Bacterial isolates reported by laboratory 1 in dogs with chronic diarrhea and healthy control dogs

n (CDG)	n (HG)	Bacterial isolate	P value
0	2	<i>Acinetobacter</i> spp.	.49
5	6	Aerobic, spore-forming bacteria	>.99
6	7	Alpha-hemolytic <i>Streptococcus</i> spp.	>.99
1	0	<i>Bacillus cereus</i>	>.99
1	0	<i>Buttiauxella ferruguti</i>	>.99
8	10	<i>Clostridium</i> spp.	.74
1	0	<i>Enterobacter cloacae</i>	>.99
8	7	<i>Enterococcus</i> spp.	>.99
16	16	<i>Escherichia coli</i>	>.99
4	8	Hemolytic <i>E. coli</i>	.29
1	1	Mucoid growing <i>E. coli</i>	>.99
1	1	<i>Klebsiella</i> spp.	>.99
2	1	<i>Proteus mirabilis</i>	>.99
1	0	<i>Pseudomonas</i> spp.	>.99
0	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>.99

Abbreviations: CDG, chronic diarrhea group; HG, healthy group.

found in none of the HG and only in 1 dog of CDG ($P > .99$) and for this strain a sensitivity testing for antimicrobials was provided (Figure 3). As was the case for L2, no other enteropathogens were found by L3.

Fungal culture showed no significant difference in any variable between HG and CDG for any of the 3 laboratories. Fungal organisms were cultured in 4/18 (CDG) and 1/18 (HG) by L1 ($P = .34$), none of the samples by L2 ($P > .99$), and 3/18 (CDG) and 1/18 (HG) by L3 ($P = .60$; Table 4).

3.4 | Comparison of interpretation of microbiota analysis and fecal cultures among individual laboratories

For the following evaluation, all dogs in both groups were analyzed collectively. The overall assessment of “abnormal intestinal microbiota” for any of the 3 laboratories did not agree with the DI. Overall levels of agreement between each laboratory and the DI are shown in Table 2.

Agreement between L1 and L2 for the growth of gram-negative bacteria was fair to good ($\kappa = 0.44$; CI, -0.02 ; 0.89), but there was a disagreement on the growth of gram-positive bacteria ($\kappa = -0.22$; CI, -0.34 ; -0.10). Laboratory 3 provided no results on the growth of gram-positive or gram-negative bacteria.

Agreement on growth of hemolytic *E. coli* results was fair to good between L1 and L2 ($\kappa = 0.57$; CI, 0.29 ; 0.85), poor between L1 and L3 ($\kappa = 0.11$; CI, -0.09 ; 0.31), and there was overall disagreement between L2 and L3 ($\kappa = -0.05$; CI, -0.14 ; -0.04).

Assessment of fungal cultures showed disagreement or poor agreement among the 3 laboratories (L1 and L2: $\kappa = 0.00$; CI, 0.00 ; 0.00 ; L1 and L3: $\kappa = 0.28$; CI, -0.07 ; 0.63 ; L2 and L3: $\kappa = 0.00$; CI, 0.00 ; 0.00), and there was also poor agreement for the presence of *Candida* spp. (L1 and L2: weighted $\kappa = 0.00$; L1 and L3: weighted $\kappa = 0.33$; L2 and L3: weighted $\kappa = 0.00$).

4 | DISCUSSION

The objective of our prospective clinical trial was to compare the results of fecal cultures with the DI in dogs with chronic diarrhea. An important aspect is that the DI assesses the composition of the microbiota, whereas culture as performed and interpreted by the 3 laboratories attempted to both assess the microbiota as well as document the presence of enteropathogenic bacteria. Assessing microbiota composition based on culture should, however, not be the diagnostic method of choice to assess dysbiosis because of the limitations stated in the introduction. Nevertheless, offering fecal culture for this purpose is still common practice in several veterinary diagnostic laboratories. Our study did not detect any significant differences in commercial fecal culture results in dogs with chronic diarrhea compared to healthy dogs. Furthermore, agreement on the interpretation of normobiosis vs dysbiosis was found to be poor among the 3 laboratories. No putative

TABLE 4 Results of fungal cultures of dogs with chronic diarrhea and healthy control dogs

Isolate	Laboratory 1		Laboratory 2		Laboratory 3	
	n (CDG)	n (HG)	n (CDG)	n (HG)	n (CDG)	n (HG)
No growth	14	17	18	18	15	17
<i>Candida</i> spp. (mild)	2	1	-	-	-	-
<i>Candida</i> spp. (moderate)	1	-	-	-	1	1
<i>Candida</i> spp. (severe)	1	-	-	-	1	-
<i>Geotrichophyllum</i> sp.	-	-	-	-	1	-

Abbreviations: CDG, chronic diarrhea group; HG, healthy group; n, number of dogs.

bacterial pathogens could be detected in any dog except hemolytic *E. coli* and the clinical relevance of this finding must be questioned because of the similar and often higher isolation rates in dogs of the HG. These findings raise the question as to whether routine fecal culture testing is of any use in dogs with chronic diarrhea.

The DI is a qPCR-based tool and has been used to assess fecal dysbiosis in dogs with chronic enteropathy,^{10,17} dogs with acute diarrhea,^{18,19} and healthy dogs after antimicrobial administration.^{10,20,21} As shown in previous studies, a significant difference in the occurrence of dysbiosis was found between dogs in the CDG and the HG, with 8/18 dogs in the CDG having a DI > 2.

The etiology of chronic diarrhea in dogs is poorly understood but is presumed to be multifactorial. Several studies suggest a critical role of the intestinal microbiota,^{8,22} and dysbiosis has been described in human and canine patients with chronic enteropathies (CE).^{23,24} Documentation of changes in the intestinal microbiota is important, because dysbiosis is considered a factor in the pathogenesis of CE.²⁵ Alterations in the intestinal microbiota can lead to functional changes, such as a decrease in short-chain fatty acids¹⁷ and abnormal bile acid metabolism.^{18,20,26} For example, secondary bile acids have local and systemic anti-inflammatory properties and are an important driver of a healthy gut metabolism.²⁷ In the colon, primary bile acids are converted to secondary bile acids. The main converter of bile acids in dogs is *C. hiranonis*.^{18,20,26} Decreased abundance of *C. hiranonis* leads to lack of conversion of primary to secondary bile acids, which is associated with an increased DI.^{10,18,20,26} Decreased numbers of *C. hiranonis* also were associated with a lower fecal concentration of secondary bile acids and with an increased abundance of *E. coli*.²⁷ In our study, all dogs with decreased abundance of *C. hiranonis* had a DI > 2, including 8/18 in CDG and 1/18 in the HG. The latter dog had no signs of gastrointestinal disease and no medication history before sample collection. This finding suggests that a small subset of clinically healthy dogs can have subclinical dysbiosis. Interestingly, after 1 year this dog developed chronic diarrhea. Therefore, long-term studies are warranted to evaluate the effect of dysbiosis on developing chronic gastrointestinal signs and the potential role of DI as an early marker for chronic gastrointestinal disease.

Abundances of *Faecalibacterium* and *Fusobacterium* were decreased in some of the dogs of CDG. Decreased *Faecalibacterium* is a consistent finding in dogs and people with CE and gained attention because of their ability to secrete anti-inflammatory peptides in *in vitro* studies.^{28,29} Although, most of the time, the causal

relationship between dysbiosis and disease remains unclear, it seems important to recognize intestinal dysbiosis so as to incorporate this information into individual treatment strategies. Besides treatment of the underlying disease process in dogs with CE (eg, food-responsive disease, immune-mediated inflammation), restoration of the normal microbiota might be useful as an adjunctive treatment.

The culture results of all 3 laboratories failed to detect any difference between CDG and HG. The definition of an “abnormal microbiota” varied broadly among the laboratories and none of the laboratories provided information about their diagnostic criteria, thus emphasizing that a clear consensus is lacking when using fecal culture. Laboratory 1 routinely gave unrequested detailed information about the isolates identified and suggested a dysbiotic state in all but 2 of the HG dogs and in all but 4 of the CDG dogs. In comparison, L2 and L3 concluded dysbiosis less frequently in both groups of dogs. Surprisingly, more dogs with an interpretation of “abnormal microbiota” were reported in the HG compared to the CDG by both L1 and L2. This finding is in contrast to the results of the DI and to observations from studies showing that changes in the microbiota are associated with CE but usually not present in healthy individuals. Hemolytic *E. coli* were the only identified bacteria considered as facultative pathogens. Historical data suggest that the ability of *E. coli* to hemolyze erythrocytes is linked to different virulence factors, and these isolates can be the causative agent in extraintestinal diseases (eg, urinary tract infections, wound infections).^{30,31} However, hemolytic *E. coli* are part of the normal intestinal microbiota of healthy individuals and the pathogenic role of hemolytic *E. coli* strains in CE is not clear.³² Moreover, none of the laboratories provided information on what specific hemolytic *E. coli* strain was present and whether it was a pathogenic isolate or not. Other classic enteropathogens, such as *Salmonella* spp., thermophilic *Campylobacter* spp., and *Yersinia enterocolica* were not found in any of the samples, which support the idea that enteropathogens do not play a major role in dogs with CE.

Laboratory 1 and L3 provided unrequested antimicrobial susceptibility testing for hemolytic *E. coli* as part of the fecal panel. Sensitivity testing was based only on selected isolates found on the agar plates. Thus, it does not reflect the resistance pattern of all (hemolytic) *E. coli* in the intestines. Unjustified antibiotic usage can lead to a higher proportion of resistant *E. coli* isolates in canine feces.¹⁹ By providing sensitivity testing of facultative enteropathogens in dogs with chronic diarrhea, veterinarians might get the impression that antibiotics are indicated in these cases. However, antibiotic treatment should not be

based on fecal culture findings. Specialists in veterinary gastroenterology strongly suggested in a recent proposal for rational antibacterial use in dogs with chronic diarrhea that antibiotics should be reserved for those dogs with evidence of true infection (ie, signs of systemic inflammatory response syndrome or evidence of adherent-invasive bacteria in intestinal biopsy samples).³³ Untargeted use of antibiotics based on fecal culture results likely contributes to the spreading of resistant bacteria and stands in contrast to principles of responsible antibiotic stewardship.^{34,35}

Laboratory 1 and L2 separated between gram-positive and gram-negative bacteria based on general microbiological nomenclature in their results. Interestingly, both laboratories found no gram-negative bacteria in 8 dogs, but were in agreement only in 2 of these dogs. Laboratory 1 failed to detect any gram-positive bacteria in 7 dogs, and L2 in 6 dogs. Both laboratories only agreed for 1 dog. Two dogs in L2 and 1 dog in L1 had neither a gram-positive nor a gram-negative cultivable microbiota (all belonged to the HG). Primarily aerobically growing bacteria (eg, *Enterococcus* as part of the gram-positive microbiota and Enterobacteriaceae, such as *E. coli*, as part of the gram-negative microbiota) are cultivated in routine fecal cultures.³⁶⁻³⁸ However because of sequencing techniques, it is known that strictly anaerobic bacteria predominate in the intestinal microbiota. Thus, failing to culture anaerobic bacteria from fecal cultures leads to an inadequate representation of the overall composition of the intestinal microbiota.³⁹⁻⁴¹ Our results emphasize that the absence or presence of cultivable microbiota impedes assessment of the composition of the intestinal microbiota.

Laboratory 1 identified increased growth of *Clostridium* spp. in 50% of the samples, which was defined as "abnormal" by the laboratory itself. According to literature, this percentage is considered low, because with appropriate sample handling and culture techniques *C. perfringens* can be identified in feces of 80% healthy dogs.^{42,43} *Clostridium* spp. are characterized by anaerobic growth.⁴³ Under aerobic conditions, which are usually present during transportation and shipping of fecal samples, certain clostridial strains can form spores within minutes, which can require specialized culture methods to induce germination. Thus, the presence of *Clostridia* spp. might be underestimated by culture.^{44,45} There was no difference in *Clostridium*-positive samples between CDG and HG. The relevance of clostridial growth in dogs with intestinal disease is questionable, because it is not the presence of clostridial species, but the presence of certain enterotoxins that likely plays a pathogenic role (eg, in acute hemorrhagic diarrhea syndrome), and is associated with clinical signs.⁴⁶⁻⁴⁸

In comparison, PCR detected the *C. perfringens* 16S rRNA gene in all except 2 samples. Samples from dogs of the CDG did not have a higher abundance of the gene compared to HG. Thus, our findings further support the notion that clostridial strains, in general, and *C. perfringens*, in particular, are considered unlikely to have played a role in the pathogenesis of chronic diarrhea in the present study population.

Aerobic fungi were only isolated from a few samples, with the majority consisting of *Candida* spp, and no difference was found between CDG and HG. This finding is consistent with recent molecular genetic-based investigations that documented a similar abundance

of *Candida* spp. in fecal samples from dogs with acute diarrhea and healthy dogs.⁴⁹ Studies in humans showed that the fungal microbiota might play a role in CE⁵⁰ and thus the inability of fungal culture to discern a difference between groups in our study is concerning.

Significant disagreement was found among laboratories in the interpretation of abnormal microbiota. Factors that explain differences could include random errors, a systematic bias of the analytical procedure, application errors within the laboratories, interpretation errors, and preanalytical (including transport) errors.^{51,52} Transportation of samples differed and was based on the instructions provided by the individual laboratories. Moreover, bias could be caused by different subsampling methods, which can either take place in the clinic by dividing samples or in the laboratory.⁵³ Furthermore, differences in culture methods among laboratories potentially could have a substantial impact on culture results.

Establishing guidelines for adequate sample handling and shipping conditions would be essential for reproducible results. However, even if these procedures were to be standardized, definition of dysbiosis based on culture methods is not defined and primarily based on individual subjective interpretation. Consequently systematic bias could occur among different microbiologists.

Agreement between fecal culture results and DI generally was poor. The DI was significantly different between healthy and diseased individuals, whereas in contrast, fecal cultures did not show such a difference.

Our study had some important limitations. First, it was not possible to assess the laboratories' agreement on the assessment of the presence of enteropathogenic bacteria other than hemolytic *E. coli*, because these organisms were not found in any of the samples. However, the results do support that classic enteropathogens do not play an important role in dogs with CE. Second, information about the microbiological methods of the 3 commercial laboratories was not available. It can be assumed that methodological differences among the laboratories existed, which limits the direct comparability of results. However, an aim of the study was to assess the agreement of culture results among different laboratories from a clinical perspective, independent of their methods. Our findings show that clinicians might receive different results depending on the laboratory they choose. Third, it is difficult to define a gold standard for the evaluation of dysbiosis. However, recent studies have indicated that the results of the DI agreed well with more comprehensive sequencing methods.^{18,20} Moreover, our results suggest that the DI is a relevant tool to assess dysbiosis in dogs with CE and healthy dogs, comparable to findings of previous studies.

Our results indicate that fecal cultures are not useful for identifying dysbiosis of dogs with CE. In fact, interpretation of culture results and routinely provided sensitivity testing for antibiotics can even be misleading and result in unnecessary antibiotic treatment. Fecal culture should be reserved for detecting enteropathogens without giving any recommendations on their treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

No funding was received for this study. Preliminary results were presented at the 2020 ACVIM Forum on Demand and at the virtual 2020

ECVIM congress. Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST

Drs Suchodolski, Lidbury, and Steiner are employees of the Gastrointestinal Laboratory, which performs diagnostic testing, including the dysbiosis index, on a fee-for-service basis.

OFF-LABEL ANTIMICROBIAL DECLARATION

Authors declare no off-label use of antimicrobials.

INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC) OR OTHER APPROVAL DECLARATION

Prospective collection and analysis of canine fecal samples was approved by the Ethics Committee of the Centre of Veterinary Medicine, LMU, Germany (reference 156-07-02-2019).

HUMAN ETHICS APPROVAL DECLARATION

Authors declare human ethics approval was not needed for this study.

ORCID

Melanie Werner  <https://orcid.org/0000-0003-1284-2048>

Jan S. Suchodolski  <https://orcid.org/0000-0002-2176-6932>

Jonathan A. Lidbury  <https://orcid.org/0000-0001-5107-4577>

Jörg M. Steiner  <https://orcid.org/0000-0003-3336-2086>

REFERENCES

- Batt RM, Rutgers HC, Sancak AA. Enteric bacteria: friend or foe? *J Small Anim Pract.* 1996;37:261-267.
- McDonough PL, Simpson KW. Diagnosing emerging bacterial infections: salmonellosis, campylobacteriosis, clostridial toxicosis, and helicobacteriosis. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 1996;11:187-197.
- Marks SL, Rankin SC, Byrne BA, Weese JS. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *J Vet Intern Med.* 2011;25:1195-1208.
- Marks SL, Kather EJ. Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003;33:1029-1060.
- Burnens AP, Angéloz-Wick B, Nicolet J. Comparison of Campylobacter carriage rates in diarrheic and healthy pet animals. *Zoonoses Public Health.* 1992;39:175-180.
- Rossi M, Hanninen ML, Revez J, et al. Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. and *Anaerobiospirillum* spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Vet Microbiol.* 2008;129:304-314.
- Tupler T, Levy JK, Sabshin SJ, Tucker SJ, Greiner EC, Leutenegger CM. Enteropathogens identified in dogs entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* 2012;241:338-343.
- Suchodolski JS, Markel ME, Garcia-Mazcorro JF, et al. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2012;7:e51907.
- Xenoulis PG, Palculict B, Allenspach K, Steiner JM, van House AM, Suchodolski JS. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;66:579-589.
- Alshawaqfeh MK, Wajid B, Minamoto Y, et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiol Ecol.* 2017;93:136.
- Heilmann RM, Steiner JM. Clinical utility of currently available biomarkers in inflammatory enteropathies of dogs. *J Vet Intern Med.* 2018;32:1495-1508.
- Marks SL. Diarrhea. In: Washabau RJ, Day MJ, eds. *Canine and Feline Gastroenterology.* St. Louis, MO: Elsevier Health Sciences; 2012:99-108.
- Hall EJ, Day MJ. Chronic small intestinal disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Cote E, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 8th ed. St. Louis, MO: Elsevier Health Sciences; 2017:1516-1564.
- Jergens AE. Dyschezia and tenesmus. In: Washabau RJ, Day MJ, eds. *Canine and Feline Gastroenterology.* St. Louis, MO: Elsevier Health Sciences; 2012:109-113.
- Minamoto Y, Dhanani N, Markel ME, Steiner JM, Suchodolski JS. Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Vet Microbiol.* 2014;174:463-473.
- Flleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions.* 2nd ed. New York, NY: John Wiley & Sons; 1981:217-225.
- Minamoto Y, Minamoto T, Isaiha A, et al. Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. *J Vet Intern Med.* 2019;33:1608-1618.
- Chaitman J, Ziese A-L, Pilla R, et al. Fecal microbial and metabolic profiles in dogs with acute diarrhea receiving either fecal microbiota transplantation or oral metronidazole. *Front Vet Sci.* 2020;7:192-192.
- Werner M, Suchodolski JS, Straubinger RK, et al. Effect of amoxicillin-clavulanic acid on clinical scores, intestinal microbiome, and amoxicillin-resistant *Escherichia coli* in dogs with uncomplicated acute diarrhea. *J Vet Intern Med.* 2020;34(3):1166-1176.
- Pilla R, Gaschen F, Barr JW, et al. Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. *J Vet Intern Med.* 2020;34(5):1853-1866. online print ahead.
- Manchester AC, Webb CB, Blake AB, et al. Long-term impact of tylosin on fecal microbiota and fecal bile acids of healthy dogs. *J Vet Intern Med.* 2019;33:2605-2617.
- Minamoto Y, Otoni CC, Steelman SM, et al. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes.* 2015;6:33-47.
- Duboc H, Rajca S, Rainteau D, et al. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut.* 2013;62:531-539.
- Honneffer J, Minamoto Y, Suchodolski J. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World J Gastroenterol.* 2014;20:16489-16497.
- Dandrieux JRS, Mansfield CS. Chronic enteropathy in canines: prevalence, impact and management strategies. *Vet Med (Auckl).* 2019;10:203-214.
- Giaretta PR, Rech RR, Guard BC, et al. Comparison of intestinal expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter between dogs with and without chronic inflammatory enteropathy. *J Vet Intern Med.* 2018;32:1918-1926.
- Wang S, Martins R, Sullivan MC, et al. Diet-induced remission in chronic enteropathy is associated with altered microbial community structure and synthesis of secondary bile acids. *Microbiome.* 2019;7:126.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:16731-16736.
- Rossi G, Pengo G, Caldin M, et al. Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and

- metronidazole or probiotic VSL# 3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2014;9:e94699.
30. Hacker J, Schroter G, Schrettenbrunner A, et al. Hemolytic *Escherichia coli* strains in the human fecal flora as potential urinary pathogens. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1983;254:370-378.
 31. Beutin L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol*. 1991;180:167-182.
 32. Beutin L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res*. 1999;30(2-3):285-298.
 33. Cerquetella M, Rossi G, Suchodolski JS, et al. Proposal for rational antibacterial use in the diagnosis and treatment of dogs with chronic diarrhoea. *J Small Anim Pract*. 2020;61:211-215.
 34. Borg MA, Zarb P, Scicluna EA, et al. Antibiotic consumption as a driver for resistance in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* within a developing region. *Am J Infect Control*. 2010;38:212-216.
 35. Sørum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res*. 2001;32:227-241.
 36. Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P, Wieler LH, Ewer C, Selbitz HJ. Enterobacteriaceae. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 2015.
 37. Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P. Grampositive Kokken. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 2015.
 38. Mentula S, Harmoinen J, Heikkilä M, et al. Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in beagle dogs. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:4169-4175.
 39. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol*. 2002;46:535-548.
 40. Greetham HL, Giffard C, Hutson RA, Collins MD, Gibson GR. Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach. *J Appl Microbiol*. 2002;93:640-646.
 41. Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62:1242-1247.
 42. Marks SL, Kather EJ, Kass PH, Melli AC. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med*. 2002;16:533-540.
 43. Marks SL, Melli A, Kass PH, Jang SS, Barkhoodarian A, Hirsh DC. Evaluation of methods to diagnose *Clostridium perfringens*-associated diarrhea in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1999;214:357-360.
 44. Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol*. 2014;22:406-416.
 45. Jump RL, Pultz MJ, Donskey CJ. Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. difficile*-associated diarrhea? *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:2883-2887.
 46. Mehdizadeh Gohari I, Unterer S, Whitehead AE, Prescott JF. NetF-producing *Clostridium perfringens* and its associated diseases in dogs and foals. *J Vet Diagn Invest*. 2020;32:230-238.
 47. Sindern N, Suchodolski JS, Leutenegger CM, et al. Prevalence of *Clostridium perfringens* netE and netF toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *J Vet Intern Med*. 2019;33:100-105.
 48. Ziese AL, Suchodolski JS, Hartmann K, et al. Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. *PLoS One*. 2018;13:e0204691.
 49. Foster ML, Dowd SE, Stephenson C, et al. Characterization of the fungal microbiome (mycobiome) in fecal samples from dogs. *Vet Med Int*. 2013;2013:658373.
 50. Ott SJ, Kühbacher T, Musfeldt M, et al. Fungi and inflammatory bowel diseases: alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43:831-841.
 51. Corry JE, Jarvis B, Passmore S, et al. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms. *Food Microbiol*. 2007;24:230-253.
 52. Niemi RM, Niemelä SI. Measurement uncertainty in microbiological cultivation methods. *Accred Qual Assur*. 2001;6:372-375.
 53. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Werner M, Suchodolski JS, Lidbury JA, Steiner JM, Hartmann K, Unterer S. Diagnostic value of fecal cultures in dogs with chronic diarrhea. *J Vet Intern Med*. 2021;35:199–208. <https://doi.org/10.1111/jvim.15982>

IV. PUBLIKATION 3: ORIGINAL-PUBLIKATION ZUR STUDIE 2

Effect of amoxicillin-clavulanic acid on clinical scores, intestinal microbiome, and amoxicillin-resistant *Escherichia coli* in dogs with uncomplicated acute diarrhea

Melanie Werner

Clinic of Small Animal Internal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, LMU, Munich, Germany

Jan S. Suchodolski

Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, Texas

Reinhard K. Straubinger

Department of Veterinary Sciences, Institute of Infectious Diseases and Zoonoses, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

Georg Wolf

Department of Veterinary Sciences, Institute of Infectious Diseases and Zoonoses, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

Jörg M. Steiner

Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, Texas

Jonathan A. Lidbury

Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences,
College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University,
College Station, Texas

Felix Neuerer

Clinic of Small Animal Medicine Ismaning, Ismaning, Germany

Katrin Hartmann

Clinic of Small Animal Internal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine,
LMU, Munich, Germany

Stefan Unterer

Clinic of Small Animal Internal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine,
LMU, Munich, Germany

Journal of Veterinary Internal Medicine: veröffentlicht

J Vet Intern Med. 2020;34:1166–1176.; DOI: 10.1111/jvim.15775



Received: 29 July 2019 | Accepted: 23 March 2020

DOI: 10.1111/jvim.15775

STANDARD ARTICLE

Journal of Veterinary Internal Medicine **ACVIM**
Open Access American College of
Veterinary Internal Medicine

Effect of amoxicillin-clavulanic acid on clinical scores, intestinal microbiome, and amoxicillin-resistant *Escherichia coli* in dogs with uncomplicated acute diarrhea

Melanie Werner¹ | Jan S. Suchodolski² | Reinhard K. Straubinger³ |
Georg Wolf³ | Jörg M. Steiner² | Jonathan A. Lidbury² | Felix Neuerer⁴ |
Katrin Hartmann¹ | Stefan Unterer¹

¹Clinic of Small Animal Internal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

²Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

³Department of Veterinary Sciences, Institute of Infectious Diseases and Zoonoses, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

⁴Clinic of Small Animal Medicine Ismaning, Ismaning, Germany

Correspondence

Melanie Werner, Clinic of Small Animal Internal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Veterinärstr. 13, Munich, Germany. Email: m.werner@medizinische-kleintierklinik.de

Abstract

Background: Despite limited evidence of efficacy, antibiotic treatment is still frequently prescribed in dogs with uncomplicated acute diarrhea (AD).

Objective: To assess whether amoxicillin-clavulanic acid has a clinical benefit, an effect on the fecal microbiome, and the proportion of amoxicillin-resistant *Escherichia coli* in dogs with AD.

Animals: Sixteen dogs with AD of <3 days duration.

Methods: Prospective, placebo-controlled, double-blinded study. Clinical scores were compared between client-owned dogs randomly assigned to an antibiotic (AG) or a placebo (PG) group. The intestinal microbiome was analyzed using quantitative PCR assays. Amoxicillin-resistant fecal *E. coli* were assessed semiquantitatively with microbiological methods.

Results: There was no difference in clinical recovery between treated dogs or controls (CADS index day 10: AG group median: 2 (range: 1-3; CI [1.4; 2.6]); PG group median: 1.6 (range: 1-3; CI [1.1; 2.4]); $P > .99$). All dogs gained normal clinical scores (CADS index ≤ 3) after 1 to 6 days (median 2 days) after presentation. There was no significant difference in the fecal dysbiosis index (during treatment: AG mean -2.6 (SD 3.0; CI $[-5.1; 0.0]$); PG mean -0.8 (SD 4.0; CI $[-4.2; 2.5]$); $P > .99$) or its bacterial taxa. The proportion of resistant fecal *E. coli* increased (to median: 100%; range: 35%-100%) during treatment with amoxicillin-clavulanic acid and was still increased (median: 10%; range 2%-67%) 3 weeks after treatment, both of which were

Abbreviations: AG, antibiotic group; AHDS, acute hemorrhagic diarrhea syndrome; CADS-Index, Canine Acute Diarrhea Severity Index; PG, placebo group.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American College of Veterinary Internal Medicine.

significantly higher proportions than in the placebo group for both time points (during treatment AG median 100% versus PG median 0.2% ($P < .001$); after treatment AG median 10% versus PG median 0.0% ($P = .002$)).

Conclusions and Clinical Importance: Our study suggests that treatment with amoxicillin-clavulanic acid confers no clinical benefit to dogs with AD, but predisposes the development of amoxicillin-resistant *E. coli*, which persist for as long as 3 weeks after treatment. These findings support international guideline recommendations that dogs with diarrhea should not be treated with antimicrobials unless there are signs of sepsis.

KEYWORDS

antibiotic, antimicrobial, canine, diarrhea, resistance, sensitivity

1 | INTRODUCTION

Diarrhea is a common reason for dogs being presented for veterinary care with approximately 7% of the dogs presented in small animal practice showing diarrhea.¹ Uncomplicated acute diarrhea (AD) in dogs is most frequently associated with dietary indiscretion, adverse reactions to food, endoparasites, or transient uncomplicated bacterial/viral infections.²⁻⁶ In many cases the etiology cannot be identified. This is usually not a problem, because clinical signs typically resolve spontaneously and usually do not recur.^{2,4,7-9} International guidelines recommend that in dogs with diarrhea, antimicrobials should only be administered to dogs manifesting systemic signs of illness.¹⁰⁻¹⁴ Despite these recommendations, it is common that dogs with AD receive an untargeted, short-term antibiotic course as first-line medication. Two surveys including 11 060 and 371 dogs performed in Europe showed that between 63% and 71% of dogs with AD were treated with antimicrobials, respectively.^{15,16} Our study group previously evaluated the effect of amoxicillin-clavulanic acid in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome (AHRD) without signs of sepsis, and were unable to show a clinical benefit of antibiotic therapy.^{17,18} A second study in dogs with AHDS revealed that the additional application of metronidazole to amoxicillin-clavulanic acid did not improve the clinical outcome.¹⁸

Antibiotic treatment can lead to various negative short-term effects, such as vomiting, diarrhea, and anorexia.^{19,20} Data from human medicine suggest that dysbiosis induced by antimicrobials is associated with an increased risk for developing asthma, post-infectious irritable bowel syndrome and chronic enteropathies such as Crohn's disease.²¹⁻²⁵ Antibiotics cause prolonged intestinal dysbiosis and lead to changes in the microbial metabolism pathways in healthy dogs and humans.²⁶⁻²⁹ Disruption of the intestinal microbiota as a consequence of antibiotic use can lead to life-threatening *Clostridioides difficile* infections in humans.³⁰ Furthermore, antibiotic treatment leads to advantages in growth for resistant bacteria and provokes the development of new resistance mechanisms.³¹⁻³⁵

Although antibiotics have been routinely used in dogs with uncomplicated AD over decades, evidence-based studies documenting any clinical benefit of antibiotic treatment in dogs are sparse³⁶ and do not exist

for potentiated penicillins, which are frequently used as first-line antibiotic treatment. Thus, the aims of this study were to evaluate the clinical benefit of amoxicillin-clavulanic acid, to evaluate the effect of the amoxicillin-clavulanic acid on the intestinal microbiome, and the proportions of resistant fecal *Escherichia coli* in dogs with uncomplicated AD.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

This study was designed as a prospective, double-blinded, randomized, placebo-controlled, trial. The study design was approved by the ethical committee of the Centre for Clinical Veterinary Medicine Ludwig-Maximilians-University, Munich (reference 68-19-05-2016). An informed client consent form was signed by all owners. The dogs were recruited between July 2016 and January 2018 by the same veterinarian (MW) across 4 small animal clinics in Munich, Germany. The randomization list was formed before start of the study through a third person using a research randomizer available on the following website: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/randomize1.cfm>. Dogs of either sex with acute nonhemorrhagic diarrhea between 5 and 40 kg bodyweight, and of at least 9 months of age were enrolled into this study. Only dogs with a fecal consistency score of at least 2 on the CADS-Index (Table 1) and a duration of gastrointestinal symptoms of <3 days were enrolled. Exclusion criteria were the following: treatment with an antimicrobial within 30 days or treatment with an anti-inflammatory drug within 7 days before presentation, blood in feces, any signs of systemic inflammation (eg, rectal temperature > 39.0°C [102.2 °F]), severe illness (eg, lethargic mental status, moderate to severe abdominal pain), or significant dehydration prompting hospitalization. These exclusion criteria were chosen to define the disease as "uncomplicated," thus only dogs that could be treated as outpatients, were included.

The histories of all dogs were recorded in a standardized method with specific questions regarding stress-related factors, diet, dietary changes, feeding of treats, chronic illnesses, other diseases in the last

Activity	0: Normal	1: Mild	2: Moderate	3: Severely decreased
Appetite	0: Normal	1: Mild	2: Moderate	3: Severely decreased
Vomiting	0: normal	1: 1x/d	2: 2-3x/d	3: > 3x/d
Fecal consistency	0: Normal	1: Moist, shaped	2: Pasty	3: Watery diarrhea
Frequency of defecation	0: Normal	1: 2-3x/d	2: 4-5x/d	3: > 5x/d

TABLE 1 Scoring system of the Canine Acute Diarrhea Severity Index

months before presentation, drug administration and timing of any past diarrheic episode.

Diagnostic work-up in all dogs before inclusion consisted of a blood count, serum chemistry profile (urea nitrogen, creatinine, SDMA, sodium, chloride, potassium, phosphate, total bilirubin, ALT, ALP, gamma-GT, AST, GLDH, total protein, albumin, globulin, glucose, alpha-amylase, lipase, cholesterol, fructosamine, creatine kinase, LDH, calcium, magnesium, triglycerides), and a fecal flotation.

2.2 | Treatment

All dogs were randomly assigned to the antibiotic (AG) or the placebo group (PG) by means of a computer-generated schedule. Dogs allocated to AG group received capsules filled with amoxicillin-clavulanic acid per os at 12.5 to 25 mg/kg q12h and dogs allocated to PG group received capsules filled only with the carrier substance lactose (300 mg per capsule) per os q12h. Duration of treatment was 7 days in either group. For blinding purposes, the capsules were indistinguishable between the 2 groups. Every dog received a certain number of capsules according to the predefined weight group. To ensure standardization, all dogs were treated with the same symptomatic treatment: maropitant (Cerenia, Zoetis GmbH, Berlin, Germany) as an antiemetic (1 mg/kg given once subcutaneously) and metamizole (Novaminsulfon, Ratiopharm, Ulm, Germany) as an analgesic (30 mg/kg per os q8h for 2 days). All dogs were fed with the same gastrointestinal diet (Royal Canin Gastrointestinal wet or dry) for 7 days.

2.3 | Evaluation of treatment efficacy

Particular attention was paid to the clinical improvement over time. At the day of presentation and inclusion into the study, defined as day 0, all dogs were evaluated with the canine acute diarrhea severity (CADS) index (Table 1). Every following day, from day 1 to day 10, the score was reassessed by the owner and documented in a diary. If dogs defecated more than once per day, the fecal consistency score was calculated as the average of all defecations of that day. To evaluate the difference between groups, the CADS-Index of each day was compared between AG and PG. Moreover, the time to normalization of fecal consistency (score 0 or 1) was documented in every individual dog.

2.4 | Sample collection

Naturally passed fecal samples from each dog were collected by the clinician on day 0 before starting the treatment, and by the owner on

day 6 and day 30. Samples for fecal flotation (performed on days 0 and 6) and bacterial culture (performed on days 0, 6, and 30) were processed within a few hours after collection (ie, <6 hours), whereas aliquots for microbiome analysis (days 0, 6, and 30) were frozen at -80°C . These samples were sent for microbiome analysis on dry ice to the Gastrointestinal Laboratory at Texas A&M University.

2.5 | Microbiome analysis

2.5.1 | DNA extraction

DNA was extracted from an aliquot of 100 mg of each fecal sample using a MoBio Power soil DNA isolation kit (MoBio Laboratories) according to manufacturer's instructions. The bead-beating step was performed on a homogenizer (FastPrep-24; MP Biomedicals, Santa Ana, California) for 60 seconds at a speed of 4 m/s. Fecal DNA was stored at -80°C until further evaluation.

2.6 | Quantitative PCR (qPCR)

For chosen bacterial taxa (ie, *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Blautia* spp., *Fusobacterium* spp., and *Clostridium hiranonis*) and total bacteria, which are known to be altered in dogs with gastrointestinal disease, individual qPCR assays were performed and results used to calculate the recently described dysbiosis index (DI).³⁷ The method, including the oligonucleotide sequence of the primers and the annealing temperatures were described elsewhere previously.³⁷ A DI <0 reflects normobiosis, whereas a DI ≥ 2 dysbiosis, and values between 0 and 2 are considered to be equivocal. The abundances of *Clostridium perfringens* 16S rRNA gene, *C. perfringens* enterotoxin gene, *C. perfringens* NetF gene, *C. difficile* 16S rRNA gene, and *C. jejuni* gene in feces were analyzed by qPCR assays using the published oligonucleotide primers and assays.³⁸⁻⁴¹ PCR conditions were 95°C for 20 seconds, 40 cycles at 95°C for 5 seconds, and 10 seconds at the optimized annealing temperature. For probe-based assays, the mastermix contained 10 μL of TaqMan reaction mixtures consisting of 5 μL of TaqMan Fast Universal PCR master mix (2x), No AmpErase UNG (Applied Biosystems), 0.4 μL of each primer (concentration: 400 nM), 0.2 μL of the probe (concentration: 200 nM), 1 μL of 1% bovine serum albumin (BSA, concentration: 0.1%), 1 μL of water, and 2 μL of DNA (1:10 or 1:100 dilution). For SYBR-based assays, PCR procedures were performed at 95°C for 2 minutes, 40 cycles at 95°C for 5 seconds, and 10 seconds at the optimized annealing temperature with 10 μL of SYBR-based reaction mixtures consisted of 5 μL of SsoFast EvaGreen supermix (Biorad

Laboratories), 0.4 µL of each primer (concentration: 400 nM), 1 µL of 1% BSA (concentration: 0.1%), 1.6 µL of water, and 2 µL of DNA (1:10 or 1:100 dilution). The oligonucleotide sequences of the primers and probes, and the annealing temperatures can be found in Table S1.

2.7 | Evaluation of the proportion of resistant fecal *E. coli*

One gram of feces was placed into a test tube and mixed with 9 mL of phosphate buffered saline (PBS; pH = 7.0). The mixture was homogenized for 5 minutes. The material was used in a 1:10 dilution series with PBS. Each 100-µl aliquot of the dilutions was plated onto MacConkey-Agar (MAC) plates containing no antibiotic and onto MAC plates mixed with ampicillin at a concentration of 32 µg/mL (MAC + AMP). This concentration was used based on the guidelines of the Clinical & Laboratory Standards Institute. Isolates that grew on MAC + AMP were considered to be cross-resistant to ampicillin and amoxicillin. Plates were incubated for 20 to 24 hours at 37°C, and *E. coli* isolates from both plates were identified by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (Bruker Microflex LT). The percentage of ampicillin-resistant *E. coli* was calculated as follows: (number of isolates on MAC + AMP/ number of isolates on MAC) × 100. The detection limit was set to 100 cfu/g. Resistant bacteria growing on the MAC + AMP were purified, and resistance of the isolates was confirmed by ampicillin (which is cross-resistant to amoxicillin) disk diffusion susceptibility testing.

2.8 | Statistical analyses

Power analysis determined that in order to detect a clinically relevant difference of 2 points in the CADS-Index at day 3 between the AG and the PG, at least 8 dogs per group had to be included (with an estimated SD of 1.5, power of 80% and *P* < .05).

Statistical analyses were conducted with GraphPad Prism (GraphPad Prism c7.0, GraphPad Software, San Diego, California). Data were evaluated for normality by the D'Agonisto-Pearson omnibus normality test. Differences in laboratory variables between groups

were analyzed by unpaired *t* test with Welch's correction or the Mann-Whitney *U* test. To avoid inflated type I error, Bonferroni correction was used. Differences in sex and last diarrheic event were evaluated with the Mann-Whitney *U* test and the differences in the variables age, bodyweight, duration of diarrhea, diet change, and stressful event using an unpaired *t* test. The course of the CADS-Index and those of individual variables, the DI, the included taxa (*Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Blautia* spp., *Fusobacterium* spp., and *C. hiranonis*), total bacteria, *C. perfringens*, *C. perfringens* enterotoxin gene, *C. perfringens* NetF toxin, and *C. difficile* were analyzed by Kruskal-Wallis test or ordinary ANOVA-analysis (depending on normality) with Dunn's test for multiple comparison as a posttest for comparison between the 2 groups. The difference in the time to normalization of fecal consistency was evaluated with the Mann-Whitney *U* test. Percentage of resistant

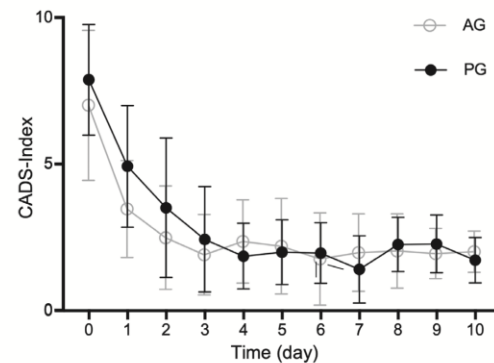


FIGURE 1 Clinical evaluation of clinical signs according to the canine acute diarrhea severity index (CADS index). The index includes the variables activity, appetite, vomiting (times/day), fecal consistency, and frequency of defecation (times/day). Each variable is scored from 0 to 3, and the sum of scores yields a total cumulative score. Dots show the mean, error bars show SD. No difference in the CADS-Index on any day of the study period could be observed between AG and PG (*P* > .99). AG, amoxicillin-clavulanic acid group; PG, placebo group

TABLE 2 Baseline variables in dogs with diarrhea

	AG (n = 8)	PG (n = 8)	P-value		
Sex	4 male, 4 female	3 male, 5 female	.88		
Neutered/entire	5/3	2/6	.62		
Breeds	Mixed breed (1), Australian Shepherd (1), Entlebucher Mountain Dog (1), German Hunting Terrier (1), Jack Russell Terrier (1), Maltese Dog (1), Miniature Poodle (1), Pug (1)	Mixed breed (3), Elo (1), Barbet (1), Labrador Retriever (1), Miniature Pinscher (1), Miniature Poodle (1)			
	Median	Range	Median	Range	
Bodyweight (kg)	9.1	5.6-25.0	14.9	7.2-29.5	.21
Age (years)	7.5	1.0-11.0	5	1.0-11.0	.30

Abbreviations: AG, amoxicillin-clavulanic acid group; PG, placebo group.

E. coli were compared between the groups by a Mann-Whitney U test and within group between different time points with the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. The adjusted significance level after Bonferroni correction for the laboratory variables was set at $\frac{0.05}{36}$ (= .0014). For all other statistical tests, the significance level was set at $P = .05$.

3 | RESULTS

3.1 | Study population

A total of 16 dogs fulfilled the inclusion criteria. Dogs were randomly assigned into the AG group (n = 8) and the PG group (n = 8). Age, sex, bodyweight, and prevalence of breeds were not different between the groups (Table 2). Median duration of diarrhea until presentation was 32 (range 4-72) hours. Eleven of 16 dogs (69%)

showed additional vomiting at least 1 time. Baseline laboratory variables of all dogs are presented in Table S2 showing no statistically significant differences between the groups after Bonferroni correction. Five of 16 owners (31%) described a stressful event for the dog in the last few days before presentation. One of 16 dogs (6%) was fed with a raw-meat diet. Six of 16 dogs (37%) received table scraps as a treat and a dietary change had been made in 5 of 16 dogs (31%) before the diarrheic event. Other acute diseases in the last 30 days were documented in 5 of 16 dogs (31%) and chronic diseases in 6 of 16 dogs (37%). One of 16 dogs received levothyroxine as long-term medication. Eleven of 16 dogs (69%) had a history of acute diarrheic events previously; however, the median interval to the last event was 2 (range 0.5-10.0) months. No significant differences in variables from the dogs' histories between groups were observed.

3.2 | Treatment efficacy

No statistically significant difference in the CADS-Index ($P > .99$), and more specifically in fecal consistency ($P > .99$) on any day of the study period could be observed between the AG and the PG (Figure 1). On day 0, the day of inclusion, dogs were presented with a median CADS-Index of 7 (range 4-11; CI [4.9; 9.1]) in the AG group and 6 (range 5-11; CI [6.3; 9.5]) in the PG group. There was no significant difference in the CADS-Index between groups on day 0 ($P > .99$). On the last day of the study period (day 10) there was no significant difference of the CADS-Index between the AG group (median: 2 (range: 1-3; CI [1.4; 2.6])) and the PG group (median: 1.6 (range: 1-3; CI [1.1; 2.4])) ($P > .99$); 2 dogs of the AG group and 1 dog of the PG group still had pasty feces upon conclusion of the study. All dogs in both groups reached normal clinical scores (CADS-Index ≤ 3) 1 to 6 days (median 2 days) after presentation.

Regarding presence and frequency of vomiting, fecal frequency, activity, and appetite there was no significant difference between groups on all days of the study period.

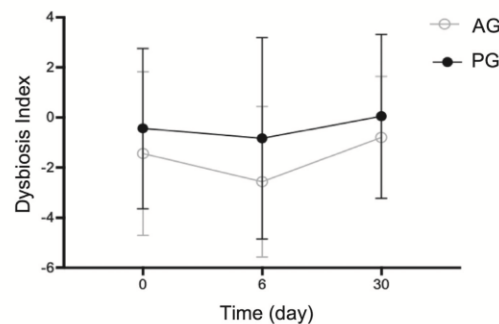


FIGURE 2 The dysbiosis index (DI) in dogs with diarrhea over time. A DI < 0 indicates normobiosis, whereas a DI ≥ 2 indicates dysbiosis. Dots show the mean, error bars show SD. There was no difference of the DI between the groups at any time point ($P > .99$). AG = amoxicillin-clavulanic acid group. PG = placebo group

TABLE 3 Dysbiosis index and the investigated phyla in dogs with diarrhea

	AG			PG		
	Day 0	Day 6	Day 30	Day 0	Day 6	Day 30
Dysbiosis index	-1.4 (3.3)	-2.6 (3.0)	-0.8 (2.4)	-0.4 (3.2)	-0.8 (4.0)	0.1 (3.3)
Total bacteria	10.8 (0.3)	10.8 (0.3)	10.8 (0.2)	10.8 (0.2)	10.7 (0.2)	10.5 (0.3)
<i>Faecalibacterium</i> spp.	5.1 (1.0)	5.2 (1.3)	6.0 (1.4)	4.7 (1.3)	4.6 (1.5)	5.1 (1.2)
<i>Turicibacter</i> spp.	6.1 (1.3)	5.7 (1.2)	5.6 (1.0)	5.8 (1.1)	5.8 (1.4)	6.4 (1.1)
<i>Streptococcus</i> spp.	4.4 (1.8)	3.8 (1.3)	5.2 (2.0)	4.6 (1.9)	4.5 (1.5)	5.5 (1.9)
<i>Escherichia coli</i>	6.7 (1.8)	5.9 (1.8)	6.0 (2.1)	7.1 (1.6)	6.4 (2.2)	6.7 (1.0)
<i>Blautia</i> spp.	10.1 (0.8)	10.4 (0.5)	10.4 (0.5)	10.0 (0.9)	9.9 (1.1)	9.9 (1.0)
<i>Fusobacterium</i> spp.	9.5 (1.1)	9.7 (0.5)	8.7 (1.5)	8.9 (0.8)	8.8 (1.1)	7.7 (1.1)
<i>Clostridium hiranonis</i>	4.9 (3.0)	5.0 (2.8)	5.0 (3.1)	4.8 (3.0)	5.1 (2.4)	5.2 (2.5)

Note: Values represent mean (SD) log DNA/g feces.

Abbreviations: AG, amoxicillin-clavulanic acid group; PG, placebo group.

The median time to normalization of fecal consistency was not statistically different between the AG (median: 1 day, range: 1-6 days; CI [0.3; 2.3]) and PG (median: 2 days, range 1-3 days; CI [1.2; 2.6]).

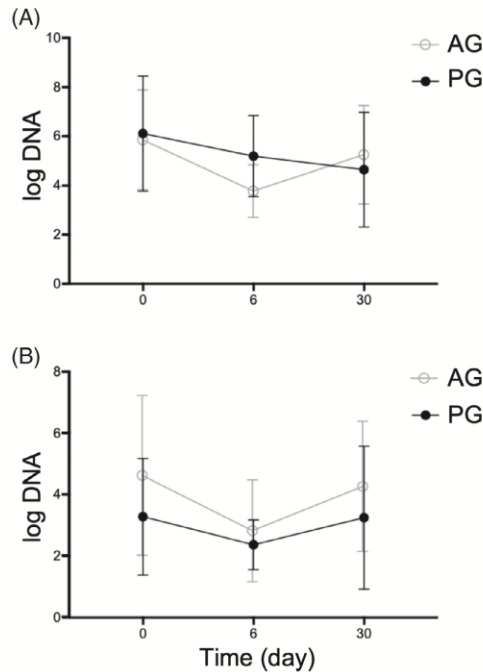


FIGURE 3 Abundance of *C. perfringens* (A) and *C. perfringens* enterotoxin gene (B). Dots show the mean, error bars show the SD. No difference in the fecal profiles for *C. perfringens* could be observed between the groups at any time point. AG, amoxicillin-clavulanic acid group; PG, placebo group

3.3 | Microbiome analysis

There was no statistically significant difference of the DI (day 0 AG mean -1.4 (SD 3.3; CI $[-4.2; 1.3]$); PG mean -0.4 (SD 3.2; CI $[-3.1; 2.2]$); $P > .99$; day 6 AG mean -2.6 (SD 3.0; CI $[-5.1; 0.0]$); PG mean -0.8 (SD 4.0; CI $[-4.2; 2.5]$); $P > .99$; day 30 AG mean -0.8 (SD 2.4; CI $[-2.8; 1.2]$); PG mean 0.1 (SD 3.3; CI $[-2.7; 2.8]$); $P > .99$) and investigated taxa between the groups at any time point (Figure 2, Table 3). An increased DI (> 2) was found in 7 dogs (AG: 3/8; PG: 4/8) for at least at 1 time point. Bacterial species considered as potentially enteropathogenic were evaluated in both groups. However, there was no significant difference in the fecal profiles for *C. perfringens*. *C. perfringens* enterotoxin gene was decreased on day 6 compared to day 0 with a rebound on day 30 in the AG without reaching significance (Figure 3). The *C. perfringens* NetF gene was found in feces of 2 dogs (1 dog on day 0 and 1 dog on day 30). In 3/8 dogs in the AG group on day 6 and in 1/8 dogs of the PG group on day 0 and 6, *C. difficile* strains could be detected, but there was no significant difference between groups at either time point. *Campylobacter jejuni* was not found in any sample.

3.4 | Evaluation of percentage of resistant fecal *E. coli*

E. coli colonies were found in 44 of total 48 samples (92%). Forty of these 44 samples had at least 100 cfu/g resistant colonies. In 4 samples, resistant *E. coli* isolates were not detected. One of this 4 samples were cultured from a dog of the AG and 3 from dogs of the PG on day 30. On day 0, before the antibiotic treatment was started, the median percentage of ampicillin-resistant *E. coli* was 0.2% (range 0%-4%) in the AG group and 0.1% (range 0%-9%) in the PG group with no significant difference between groups ($P = .94$). On day 6, the percentage of ampicillin-resistant colonies was significantly higher in the AG than in the PG group. The median percentage of ampicillin-resistant

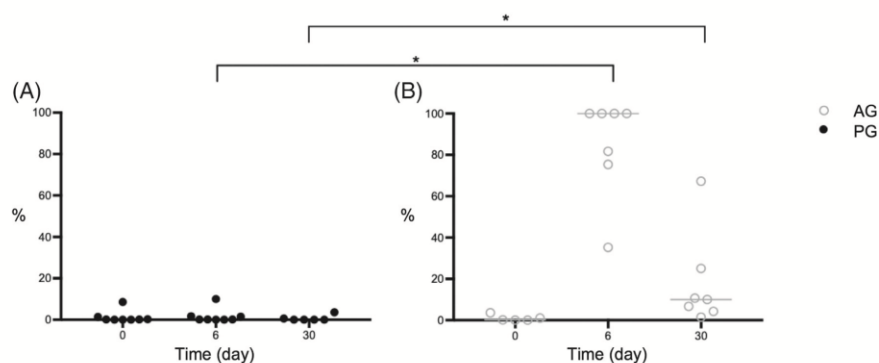


FIGURE 4 Percentages of amoxicillin-resistant *E. coli* in diarrheic dogs treated with amoxicillin-clavulanic acid (A) or placebo (B). Circles and filled in circles represent individual values for dogs of AG and PG, respectively. Bars show the median. * $P < .05$. A higher percentage of resistant *E. coli* could be observed in the AG group compared to the PG on day 6 ($P < .001$) during and on day 30 ($P = .002$) 3 weeks after antibiotic treatment. AG, amoxicillin-clavulanic acid group; PG, placebo group

colonies rose to 100% in the AG group (range 35%-100%), in the PG group the median was 0.2% (range 0%-10%, $P < .001$). On day 30, 3 weeks after discontinuing antibiotic treatment, there was still a significant higher percentage of resistant *E. coli* in the AG group (median 10%; range 2%-67%) than in the PG group (median 0%; range 0%-4%; $P = .002$; Figure 4).

4 | DISCUSSION

In this prospective, double-blinded, placebo-controlled study, clinical improvement of dogs with acute uncomplicated diarrhea was compared between dogs only treated with symptomatic treatment and those also treated with amoxicillin-clavulanic acid. There was no statistically significant difference in the clinical course between groups at any time point. Oral treatment with amoxicillin-clavulanic acid led to a significant increase of resistant *E. coli* isolates, but based on the DI, did not result in a significantly more prolonged dysbiosis compared with the PG.

The absence of a beneficial clinical effect of amoxicillin-clavulanic acid treatment in dogs with uncomplicated AD is an important finding for clinicians, who routinely manage these cases on a daily basis. Amoxicillin-clavulanic acid was chosen because beta-lactam antibiotics are the most frequently used antimicrobials in gastrointestinal disease in dogs and cats.^{1,16}

It is estimated that currently more than half of dogs with AD are treated with antimicrobials, although a clinical benefit has not been proven so far.^{1,16} This treatment approach is primarily based on the subjective impression of a more rapid clinical improvement with antibiotics. Furthermore, for several reasons there is a low threshold for using antibiotics in veterinary practice including diagnostic uncertainty, fear of clinical deterioration, time pressure, client expectations, and the general tradition to use antibiotics in dogs with diarrhea.⁴² This study should serve as a basis documenting that routine antibiotic treatment is not advantageous for dogs with uncomplicated AD. It underlines the recommendation in the ACVIM Consensus Statement of 2011 to administer antimicrobials only to dogs and cats with diarrhea that manifest systemic signs of illness (ACVIM consensus enteropathogenic bacteria).^{10,43}

No obvious negative short-term clinical adverse effects of amoxicillin-clavulanic acid treatment could be observed in this study, although it has been shown that administration of various antibiotics to healthy dogs and cats can cause diarrhea, which rapidly resolves after discontinuation of the antimicrobials. A current meta-analysis in humans showed that about 10% of individuals with acute infectious enteritis develop chronic intestinal problems later in life, and treatment with antibiotics during the acute phase increases this risk.⁴⁴ Further investigations are needed to evaluate the long-term effects of antibiotics in dogs with AD on general health and more specifically on gut health.

The present study revealed that the most significant clinical improvement was observed within the first 2 days after the onset of clinical signs. This corresponds with findings of previous studies in which the duration of diarrhea was reported to be as 1 to 3 days,⁸ or

less than 2 days.⁹ Dogs stayed clinically stable until the endpoint of the study (day 10). Three of 16 dogs still had pasty feces on day 10. This is in contradiction with a study describing a complete resolution of diarrhea in all dogs within a few days.^{4,9} The different study design (retrospective versus prospective) might represent 1 explanation for a different assessment of the dog's status by the owner. In this context, the cause for the clinical changes are of interest. Around one third of the dogs had a stressful event, received table scraps, or underwent a diet change before presentation. These findings correspond with findings of previous studies, in which diet change and receiving treats were described as risk factors for acute gastrointestinal symptoms.^{2,9}

Based on the CADS-Index, dogs in both groups were defined as moderately diseased. No clinically relevant changes on CBC or serum biochemistry profile could be observed in any dog. These facts can be explained by the exclusion of dogs with severe disease activity. This dog population was selected, because it was specifically aimed to assess if the typical case with uncomplicated diarrhea, which is seen by practitioners on a daily basis, benefits from antibiotic treatment.

A DI, based on the 7 bacterial taxa *Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *Streptococcus*, *E. coli*, *Blautia*, *Fusobacterium*, and *C. hiranonis* and total bacteria, was determined in all dogs based on fecal samples collected on days 0, 6, and 30. This index was developed to quantify intestinal dysbiosis in dogs. Several studies revealed intestinal dysbiosis in dogs with AD and chronic enteropathies. In the present study, the median dysbiosis index for each treatment group was not significantly increased on day 0 in comparison with the reference range of the DI in either group. This means that in the present study population of dogs with uncomplicated AD, a significant dysbiosis could not be documented based on the DI. This finding suggests that in mild forms of AD the intestinal microbiome is not profoundly altered, which is in contrast to the significant dysbiosis documented in dogs with chronic enteropathies.⁴⁵

Moreover, in the present study the treatment with amoxicillin-clavulanic acid did not result in significant alterations in the DI or its included taxa during as well as 3 weeks after the treatment. In contrast, another study described a significant alteration in the intestinal microbiome in healthy dogs receiving amoxicillin.²⁶⁻²⁸ This discrepancy could partially be explained because the cited study was performed in healthy dogs, no control group for comparison of intestinal microbiota changes was used, and a huge interpatient variability was seen.

Recent investigations showed a profound effect of metronidazole and tylosin on the microbiota. Tylosin significantly increased the DI during treatment, and the abundance of *Faecalibacterium* was significantly decreased after treatment.⁴⁶ Also, treatment with metronidazole in dogs leads to significant alterations in the intestinal microbiome with decreased abundances of the taxa *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Turicibacteraceae*, and *Veillonellaceae* and increased abundances of *Bifidobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, and *Streptococcaceae*.²⁷

Based on the discrepancy of the microbiome alterations between different antimicrobials, further investigations comparing the effect of several antimicrobials on a defined population of dogs in 1 study

would be desirable. One possible explanation for the lack of detectable dysbiosis in the AG is that the diarrheal process itself could have reduced exposure of the gut microbiome to amoxicillin-clavulanic acid; however, given the significant effect of antibiotic treatment on amoxicillin resistance in *E. coli*, this possibility can be eliminated. In contrast, in a study of healthy cats treated with amoxicillin-clavulanic acid, the cats showed significant changes of the intestinal microbiome,¹⁹ consequently species-dependent differences might be possible.

C. perfringens can be found as a normal component of the intestinal tract in healthy dogs. However, clostridial overgrowth plays an important role in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome (AHDS).⁴⁷ Applying a quantitative PCR protocol, no significant differences in the abundance of *C. perfringens* in dogs of both treatment groups on day 0 were detected. A decrease in both *C. perfringens* and its enterotoxin-encoding strains on day 6 and a rebound on day 30 was observed in the AG group; however, without reaching significance in comparison with the PG. Similar findings were shown in a cat population also treated with amoxicillin-clavulanic acid.¹⁹ Thus, amoxicillin-clavulanic acid appears to be effective in reducing the number of clostridial strains. However, this effect is only short-lived, because the abundance of *C. perfringens* has been reported to return to baseline values a few weeks after discontinuing antimicrobial treatment.⁴⁸ A correlation of clinical signs with the abundance of *C. perfringens* strains was not observed in the present study. The *C. perfringens* *NetF* toxin gene was found in 2 dogs (corresponding to 4% of the fecal samples) and therefore we conclude it is unlikely to have played a substantial role in causing diarrhea in the present study population. In previous studies, a higher abundance of *C. perfringens*, encoding for *NetF* toxin gene was detected in dogs AHDS,^{49,50} but *C. perfringens* encoding for *NetF* toxin gene decreased within a few days even without the use of antibiotics.⁵¹ A recent paper showed a prevalence of 48.1% in dogs with acute hemorrhagic diarrhea whereas only 12.1% of the healthy dogs carried the *NetF* gene.⁵²

C. difficile is known to induce pseudomembranous colitis and is associated with significant morbidity and mortality in humans.⁵³ Several studies showed that antibiotic use and more specifically the application of penicillin, is a major risk factor for the development of *C. difficile* infections.^{54,55} The role of *C. difficile* in the etiology of canine diarrhea is still unclear. However, some studies showed a slightly higher prevalence of *C. difficile* in dogs with diarrhea compared to healthy dogs.^{47,56} In the present study, no dog of the AG group was positive for *C. difficile* by qPCR on day 0, whereas on day 6, 38% of the dogs tested positive. Although, the results did not reach significance, this finding suggests that destruction of the protective intestinal microbiota by amoxicillin-clavulanic acid may promote the growth of potentially pathogenic bacteria in the intestinal tract. Further studies are needed to evaluate the role of antibiotics in the emergence of larger numbers of *C. difficile* in dogs and cats.

The third goal of the study was to evaluate the impact of amoxicillin-clavulanic acid on the amount of amoxicillin-resistant fecal *E. coli*. This bacterial strain was chosen as a marker species because 98% to 99% of dogs harbor *E. coli* in their intestines.^{57,58} Although

E. coli are normal commensal bacteria in the canine intestinal tract and most strains are nonpathogenic, *E. coli* is frequently found in urinary tract infections and has the ability to cause wound infections.⁵⁹ Every dog in our study treated with amoxicillin-clavulanic acid for 6 days developed significant populations of amoxicillin-resistant *E. coli*. In most dogs even 100% of their *E. coli* had developed resistance. This is in line with recent investigations showing that amoxicillin-resistant *E. coli* can be detected in 20.2% to 78.0% of individuals treated with this potentiated penicillin derivatives.^{60,61} Antibiotics can have a marked effect on the development of antimicrobial-resistant isolates.^{62,63} Most bacterial clones are killed or the growth stops under antimicrobial therapy; however, there are invariably nonsusceptible subpopulations that survive the antimicrobial challenge, because of intrinsic and acquired antimicrobial resistance or both.⁶⁴ These resistant isolates then flourish, because of reduced competition from susceptible strains. Antimicrobial-resistant bacterial strains can not only complicate infections in individuals harboring these bacteria, they can also be transmitted, directly or indirectly, to other animals and humans. Antimicrobial resistance genes—sometimes several at once—can also be transferred to other bacterial species via plasmids, transposable elements or phages.⁶⁵ Resistant bacterial strains can complicate infections in individuals harboring these bacteria (eg, ascending *E. coli* cystitis during antibiotic treatment) and can spread into the environment and affect other otherwise healthy individuals. In this context, *E. coli* is only a marker species and it must be assumed that many other bacterial groups respond to the selection pressure of antimicrobial treatment in a similar way. Veterinarians must be aware of their effect on the global emergence of drug-resistant infections by prescribing broad-spectrum antibiotics in dogs with uncomplicated disease, especially when indication for antibiotic treatment is lacking.

Moreover, amoxicillin-resistant *E. coli* could still be isolated from dogs treated with antibiotics 21 days after treatment. This emphasizes that the intestinal tract acts as a reservoir for resistant bacteria long after treatment has been stopped. Different studies suggest that high levels of resistance genes can still be found up to 4 years after antibiotic exposure.^{66,67} This emphasizes once more the importance of prudent antimicrobial usage in order to prevent spread of antibiotic resistance.

There are limitations of the study. First of all, owners gave the treatments at home. Although owners were trained in administering the capsules according to the schedule and to report if capsule administration was not possible, it cannot be completely ruled out that on some occasions, treatments were not administered. Moreover, clinical disease activity of dogs was scored by the owner themselves. Although some variables included in scores that can be objectively assessed (eg, defecation frequency, fecal consistency based on fecal scoring system), some variables (eg, activity) are relatively subjective. Clinical impression also depends on the time spent with the dog, which differs between owners. Moreover, all enrolled dogs are from the same geographical region, which makes generalization impossible. Furthermore, complete fecal microbiota sequencing was not performed. Therefore, for the purpose of the microbiome analysis it cannot be ruled out that a different method would have been able to

detect changes in the composition of the intestinal microbiome between dogs treated with and without amoxicillin-clavulanic acid. No specific mechanism of resistance was investigated in this study. The main limitation of this study is the small number of dogs in both treatment groups. Sample-size calculation was based on clinician's opinion, because comparable studies were lacking at the time when the study-protocol was designed. It is impossible to make clear recommendations based on the present study alone. Together with other published data, the present study should make a contribution toward setting up guidelines on the usage of antimicrobials in AD. However, the difference in development of bacterial resistance to amoxicillin was very clear and statistically significant and all dogs improved clinically within the study period. Thus, it seems unlikely that the results would have changed significantly with a larger group.

ACKNOWLEDGMENTS

Preliminary results were presented at the 28th ECVIM-CA Congress in Rotterdam, the 27th Annual Conference of Internal Medicine and Clinical Pathology, and the 2019 ACVIM-Forum, Phoenix, Arizona, USA. The diet (Royal Canin Gastrointestinal wet or dry) was provided free of charge by Royal Canin. The CBC and serum chemistry were performed by IDEXX Laboratories, Inc. free of charge. We sincerely thank our colleagues of the clinics of small animal medicine Germering, Ismaning, and Oberhaching for helping with patient recruitment.

CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

Authors declare no conflict of interest.

OFF-LABEL ANTIMICROBIAL DECLARATION

Authors declare no off-label use of antimicrobials.

INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC) OR OTHER APPROVAL DECLARATION

Prospective collection and analysis of canine fecal samples was approved by the Ethics Committee of the Centre of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany (reference 68-19-05-2016).

HUMAN ETHICS APPROVAL DECLARATION

Authors declare human ethics approval was not needed for this study.

ORCID

Melanie Werner  <https://orcid.org/0000-0003-1284-2048>

Jörg M. Steiner  <https://orcid.org/0000-0003-3336-2086>

Jonathan A. Lidbury  <https://orcid.org/0000-0001-5107-4577>

REFERENCES

- Jones PH, Dawson S, Gaskell RM, et al. Surveillance of diarrhoea in small animal practice through the small animal veterinary surveillance network (SAVSNET). *Vet J*. 2014;201(3):412-418.
- Stavisky J, Radford AD, Gaskell R, et al. A case-control study of pathogen and lifestyle risk factors for diarrhoea in dogs. *Prev Vet Med*. 2011;99(2-4):185-192.
- Gizzi AB, Oliveira ST, Leutenegger CM, et al. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Vet Res*. 2014;10:23.
- Pugh CA, Bronsvort BMC, Handel IG, et al. Incidence rates and risk factor analyses for owner reported vomiting and diarrhoea in Labrador retrievers - findings from the Dogslife cohort. *Prev Vet Med*. 2017;140:19-29.
- McNulty MS, Curran WL, McFerran JB, Collins DS. Viruses and diarrhoea in dogs. *Vet Rec*. 1980;106(15):350-351.
- Cave NJ, Marks SL, Kass PH, Melli AC, Brophy MA. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*. 2002;221(1):52-59.
- Berset-Istratescu CM, Glardon OJ, Magouras I, Frey CF, Gobeli S, Burgener IA. Follow-up of 100 dogs with acute diarrhoea in a primary care practice. *Vet J*. 2014;199(1):188-190.
- Saevik BK, Skancke EM, Trangerud C. A longitudinal study on diarrhoea and vomiting in young dogs of four large breeds. *Acta Vet Scand*. 2012;54:8.
- Hubbard K, Skelly BJ, McKelvie J, Wood JL. Risk of vomiting and diarrhoea in dogs. *Vet Rec*. 2007;161(22):755-757.
- Marks SL, Rankin SC, Byrne BA, Weese JS. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *J Vet Intern Med*. 2011;25(6):1195-1208.
- Marks SL, Kather EJ. Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2003;33(5):1029-1060.
- Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: update 2014. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;59(1):132-152.
- Thabane M, Kottachchi DT, Marshall JK. Systematic review and meta-analysis: the incidence and prognosis of post-infectious irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(4):535-544.
- Schwille-Kiuntke J, Frick JS, Zanger P, Enck P. Post-infectious irritable bowel syndrome—a review of the literature. *Z Gastroenterol*. 2011;49(8):997-1003.
- De Briyne N, Atkinson J, Pokludova L, Borriello SP. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet Rec*. 2014;175(13):325.
- German AJ, Halladay LJ, Noble PJ. First-choice therapy for dogs presenting with diarrhoea in clinical practice. *Vet Rec*. 2010;167(21):810-814.
- Unterer S, Strohmeier K, Kruse BD, Sauter-Louis C, Hartmann K. Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. *J Vet Intern Med*. 2011;25(5):973-979.
- Ortiz V, Klein L, Channell S, et al. Evaluating the effect of metronidazole plus amoxicillin-clavulanate versus amoxicillin-clavulanate alone in canine haemorrhagic diarrhoea: a randomised controlled trial in primary care practice. *J Small Anim Pract*. 2018;59(7):398-403.
- Torres-Henderson C, Summers S, Suchodolski J, Lappin MR. Effect of *Enterococcus faecium* strain SF68 on gastrointestinal signs and fecal microbiome in cats administered amoxicillin-Clavulanate. *Top Companion Anim Med*. 2017;32(3):104-108.
- Olson E, Honneffer J, Waddle M, et al. Evaluation of the effects of a 2-week treatment with metronidazole on the fecal microbiome of healthy dogs [abstract]. *J Vet Intern Med*. 2015;29(4):1184-1185.
- Kummeling I, Stelma FF, Dagnelie PC, et al. Early life exposure to antibiotics and the subsequent development of eczema, wheeze, and allergic sensitization in the first 2 years of life: the KOALA birth cohort study. *Pediatrics*. 2007;119(1):225-231.
- Metsälä J, Lundqvist A, Virta L, et al. Prenatal and post-natal exposure to antibiotics and risk of asthma in childhood. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(1):137-145.

23. Klem F, Wadhwa A, Prokop LJ, et al. Prevalence, risk factors, and outcomes of irritable bowel syndrome after infectious enteritis: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2017;152(5):1042-1054.
24. Umamaheswari B, Biswal N, Adhisivam B, Parija SC, Srinivasan S. Persistent diarrhea: risk factors and outcome. *Indian J Pediatr*. 2010;77(8):885-888.
25. Ungaro R, Bernstein CN, Geary R, et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(11):1728-1738.
26. Gronvold AM, L'Abée-Lund TM, Sorum H, et al. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. *FEMS Microbiol Ecol*. 2010;71(2):313-326.
27. Igarashi H, Maeda S, Ohno K, Horigome A, Odamaki T, Tsujimoto H. Effect of oral administration of metronidazole or prednisolone on fecal microbiota in dogs. *PLoS One*. 2014;9(9):e107909.
28. Suchodolski JS, Dowd SE, Westermarck E, et al. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiol*. 2009;9:210.
29. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J*. 2007;1(1):56-66.
30. Ho M, Yang D, Wyle FA, Mulligan ME. Increased incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea following decreased restriction of antibiotic use. *Clin Infect Dis*. 1996;23(Supplement 1):S102-S106.
31. Leite-Martins L, Mahu MI, Costa AL, et al. Prevalence of antimicrobial resistance in faecal enterococci from vet-visiting pets and assessment of risk factors. *Vet Rec*. 2015;176(26):674.
32. Sørum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res*. 2001;32(3-4):227-241.
33. Alexander T, Reuter T, Sharma R, et al. Longitudinal characterization of resistant *Escherichia coli* in fecal deposits from cattle fed sub-therapeutic levels of antimicrobials. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(22):7125-7134.
34. Bibbal D, Dupouy V, Ferre JP, et al. Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in Enterobacteriaceae and excretion of blaTEM genes in swine feces. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(15):4785-4790.
35. Damborg P, Gaustad IB, Olsen JE, Guardabassi L. Selection of CMY-2 producing *Escherichia coli* in the faecal flora of dogs treated with cephalexin. *Vet Microbiol*. 2011;151(3):404-408.
36. Shmalberg JW, Montalbano C, Morelli G, Buckley GJ. A randomized double blinded placebo-controlled clinical trial of a probiotic or metronidazole for acute canine diarrhea. *Front Vet Sci*. 2019;6:163.
37. AlShawaqfeh MK, Wajid B, Minamoto Y, et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiol Ecol*. 2017;93(11):136-136.
38. Minamoto Y, Dhanani N, Markel ME, Steiner JM, Suchodolski JS. Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Vet Microbiol*. 2014;174(3-4):463-473.
39. Gohari IM, Parreira VR, Nowell VJ, Nicholson VM, Oliphant K, Prescott JF. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122684.
40. Garcia-Mazcorro JF, Suchodolski JS, Jones KR, et al. Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012;80(3):624-636.
41. Cummings K, Rodriguez-Rivera L, McNeely I, et al. Fecal shedding of campylobacter jejuni and campylobacter coli among feral pigs in Texas. *Zoonoses Public Health*. 2018;65(1):215-217.
42. King C, Smith M, Currie K, et al. Exploring the behavioural drivers of veterinary surgeon antibiotic prescribing: a qualitative study of companion animal veterinary surgeons in the UK. *BMC Vet Res*. 2018;14(1):332.
43. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis*. 2001;32(3):331-351.
44. Dai C, Jiang M. The incidence and risk factors of post-infectious irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Hepatogastroenterology*. 2012;59(113):67-72.
45. Suchodolski JS, Markel ME, Garcia-Mazcorro JF, et al. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2012;7(12):e51907.
46. Manchester AC, Webb C, Blake AB, et al. Long-term impact of tylosin on fecal microbiota and fecal bile acids of healthy dogs. *J Vet Intern Med*. 2019;33(6):2605-2617.
47. Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF, Kruth SA, Greenwood SJ, Weese HE. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med*. 2001;15(4):374-378.
48. Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 2015.
49. Diniz AN, Coura FM, Rupnik M, et al. The incidence of Clostridioides difficile and *Clostridium perfringens* netF-positive strains in diarrheic dogs. *Anaerobe*. 2018;49:58-62.
50. Leipzig-Rudolph M, Busch K, Prescott JF, et al. Intestinal lesions in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome associated with netF-positive *Clostridium perfringens* type a. *J Vet Diagn Invest*. 2018;30(4):495-503.
51. Ziese AL, Suchodolski JS, Hartmann K, et al. Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. *PLoS One*. 2018;13(9):e0204691.
52. Sindern N, Suchodolski JS, Leutenegger CM, et al. Prevalence of *Clostridium perfringens* netE and netF toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *J Vet Intern Med*. 2019;33(1):100-105.
53. Crowther GS, Wilcox MH. Antibiotic therapy and *Clostridium difficile* infection - primum non nocere - first do no harm. *Infect Drug Resist*. 2015;8:333-337.
54. Mitchell DK, Van R, Mason EH, et al. Prospective study of toxigenic *Clostridium difficile* in children given amoxicillin/clavulanate for otitis media. *Pediatr Infect Dis J*. 1996;15(6):514-519.
55. Chilton CH, Freeman J, Crowther GS, Todhunter SL, Nicholson S, Wilcox MH. Co-amoxiclav induces proliferation and cytotoxin production of *Clostridium difficile* ribotype 027 in a human gut model. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(4):951-954.
56. Wetterwik KJ, Trowald-Wigh G, Fernstrom LL, Krovacek K. *Clostridium difficile* in faeces from healthy dogs and dogs with diarrhea. *Acta Vet Scand*. 2013;55:23.
57. Espinosa-Gongora C, Shah SQA, Jessen LR, et al. Quantitative assessment of faecal shedding of β -lactam-resistant *Escherichia coli* and enterococci in dogs. *Vet Microbiol*. 2015;181(3):298-302.
58. Schmidt VM, Pinchbeck GL, Nuttall T, McEwan N, Dawson S, Williams NJ. Antimicrobial resistance risk factors and characterisation of faecal *E. coli* isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. *Prev Vet Med*. 2015;119(1-2):31-40.
59. Marques C, Belas A, Franco A, Aboim C, Gama LT, Pomba C. Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(2):377-384.
60. Gulay Z, Bicmen M, Amys S, Yulu N. Beta-lactamase patterns and beta-lactam/clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* isolated from fecal samples from healthy volunteers. *J Chemother*. 2000;12(3):208-215.

61. Melo DB, Menezes AP, Reis JN, Guimaraes AG. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from humans and foods. *Braz J Microbiol*. 2015;46(4):1165-1170.
62. Borg MA, Zarb P, Scicluna EA, et al. Antibiotic consumption as a driver for resistance in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* within a developing region. *Am J Infect Control*. 2010;38(3):212-216.
63. Harmoinen J, Mentula S, Heikkilä M, et al. Orally administered targeted recombinant Beta-lactamase prevents ampicillin-induced selective pressure on the gut microbiota: a novel approach to reducing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):75-79.
64. Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic Resistome. *Science*. 2006;311(5759):374-377.
65. Sykes R. The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(9):1842-1852.
66. Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, et al. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One*. 2010;5(3):e9836.
67. Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*. 2010;156(Pt 11):3216-3223.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Werner M, Suchodolski JS, Straubinger RK, et al. Effect of amoxicillin-clavulanic acid on clinical scores, intestinal microbiome, and amoxicillin-resistant *Escherichia coli* in dogs with uncomplicated acute diarrhea. *J Vet Intern Med*. 2020;34:1166-1176. <https://doi.org/10.1111/jvim.15775>

V. DISKUSSION

Ziel der Studie 1 war es, die Ergebnisse verschiedener mikrobieller diagnostischer Methoden bei Hunden mit chronischem Durchfall mit den Ergebnissen einer gesunden Kontrollgruppe zu vergleichen. Ein zweites Ziel war, die Übereinstimmung zwischen der Interpretation des PCR-basierten DI und der bakteriologischen Kotkulturen zu evaluieren. Außerdem wurde die Variabilität der Ergebnisse der bakteriologischen und mykologischen Kotkultur zwischen drei verschiedenen deutschen kommerziellen Laboren verglichen. Ziele der Studie 2 waren, den DI bei Hunden mit akutem unkompliziertem Durchfall mit und ohne Gabe von Amoxicillin-Clavulansäure vor, während und nach der Therapie zu evaluieren. Zusätzlich wurde der Anteil der resistenten fäkalen *E. coli* vor, während und nach der Therapie in beiden Gruppen bestimmt. Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit die antibiotische Therapie zu einer schnelleren klinischen Verbesserung der Hunde mit akutem unkompliziertem Durchfall führte.

In beiden Studien erfolgte die Evaluierung des fäkalen Mikrobioms mit Hilfe des DI. Hierbei handelt es sich um ein quantitative-PCR-basiertes Verfahren. Der DI wird dabei als numerische Zahl aus sieben bakteriellen Gruppen (*Turicibacter*, *Streptococcus*, *E. coli*, *Blautia*, *Fusobacterium*, *C. hiranonis* und Gesamtbakterienanzahl) kalkuliert (ALSHAWAQFEH et al., 2017; HEILMANN und STEINER, 2018; PILLA und SUCHODOLSKI, 2019). Auf Basis vorangegangener Ergebnisse von quantitativen Echtzeit-PCRs (qPCRs) und 16S-ribosomale-Ribonukleinsäure (16S-rRNA)-Gen-Sequenzierungen wurde gezeigt, dass diese sieben bakteriellen Gruppen gemeinsam betrachtet am besten zwischen Hunden mit einer intestinalen Dysbiose und einer Normobiose diskriminierten (ALSHAWAQFEH et al., 2017). Ursprünglich wurde er an Hunden mit chronischem Durchfall validiert und zeigte hier eine Sensitivität von 74 % und eine Spezifität von 95 %. Der DI ist mittlerweile ein wissenschaftlich anerkanntes diagnostisches Mittel bei chronischen sowie akuten Enteropathien; seine Ermittlung wird in Zukunft auch kommerziell im deutschsprachigen Raum zur Verfügung stehen (ALSHAWAQFEH et al., 2017; CHAITMAN et al., 2020). Vorteile sind seine kostengünstigere und schnellere Durchführung im Vergleich zu aufwendigeren Sequenzierungsmethoden.

Eine Dysbiose kann bei Hunden durch verschiedene Erkrankungen (wie akuter oder chronischer Durchfall), durch die Gabe von Medikamenten (wie z. B. Antibiotika und Protonenpumpenhemmer) oder durch die Fütterung unterschiedlicher Diäten hervorgerufen werden (SUCHODOLSKI et al., 2012; HONNEFFER et al., 2014; IANIRO et al., 2016; MANCHESTER et al., 2019; PILLA und SUCHODOLSKI, 2019; WANG et al., 2019; ESPINOSA-GONGORA et al., 2020; PILLA et al., 2020).

In den vorliegenden Studien wurden der DI von gesunden Kontrollhunden (Studie 1), Hunden mit chronischem Durchfall (Studie 1), Hunden mit akutem Durchfall (Studie 2) und Hunden mit akutem Durchfall, welche Amoxicillin-Clavulansäure erhalten hatten, (Studie 2) untersucht.

Hunde der Studiengruppe mit chronischem Durchfall zeigten einen signifikant höheren Index hinweisend für eine Dysbiose im Vergleich zur Placebogruppe. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien (ALSHAWAQFEH et al., 2017; MINAMOTO et al., 2019). Bei separater Betrachtung der einzelnen Individuen, konnte allerdings nur bei 44 % der Hunde mit chronischem Durchfall der Studie 1 eine eindeutige Dysbiose mit einem $DI > 2$ dokumentiert werden. Dies zeigt, dass nicht alle Hunde mit einer chronischen Enteropathie per se eine mit dieser Methode messbare Dysbiose aufweisen. Eine routinemäßige Bestimmung des DI zusammen mit anderen Biomarkern kann zur Verbesserung der Diagnostik bei Hunden mit chronischen Enteropathien beitragen. Die Bestimmung des DI kann helfen, zwischen dysbiotischen und normobiotischen Individuen zu diskriminieren. Im Falle einer Dysbiose kann diese zielgerichtet behandelt werden. Durch die Bestimmung des DI sind zudem Verlaufskontrollen beim erkrankten Hund möglich.

Die Ursachen von chronischen Enteropathien bei Hunden sind multifaktoriell (DUBOC et al., 2012; SUCHODOLSKI et al., 2012; DANDRIEUX und MANSFIELD, 2019). Der Einfluss einer gestörten Mikrobiota auf eine chronische Darmerkrankung wurde in verschiedenen Studien beleuchtet. Eine Dysbiose kann zur Krankheitsentstehung und zur Verschlechterung von Symptomen beitragen (HONNEFFER et al., 2014; ALSHAWAQFEH et al., 2017; HEILMANN und STEINER, 2018; MINAMOTO et al., 2019). So zeigten einige Arbeiten, dass eine funktionierende Mikrobiota wichtig ist, um intestinale metabolische Prozesse zu garantieren, z. B. die Bildung von kurzkettigen Fett- oder sekundären Gallensäuren

(GAGNÉ et al., 2013; GIARETTA et al., 2018; BEHR et al., 2019; MANCHESTER et al., 2019; MINAMOTO et al., 2019).

Letztere haben im Körper antientzündliche Eigenschaften, sowohl auf lokaler als auch auf systemischer Ebene (RAMÍREZ-PÉREZ et al., 2017; SINHA et al., 2020; WINSTON und THERIOT, 2020). Sekundäre Gallensäuren werden im Dickdarm aus primären Gallensäuren gebildet. Eine durch die Mikrobiota bereitgestellte 7-Alpha-Hydroxylase ist für die Konversion notwendig. Beim Hund ist *C. hiranonis* das wichtigste Bakterium zur Gallensäurekonversion (KITAHARA et al., 2001). In verschiedenen Studien konnte eine gute Korrelation zwischen der Anzahl von *C. hiranonis* und der Menge an sekundären Gallensäuren im Kot dargestellt werden (DUBOC et al., 2012; PILLA et al., 2020). Bei der vorliegenden Studie 1 zeigten alle Hunde mit einer Dysbiose eine reduzierte Menge an *C. hiranonis* im Kot. Somit könnte auch bei diesen Hunden eine reduzierte Menge an sekundären Gallensäuren vorhanden sein, was zu einer Verstärkung der intestinalen Entzündung beitragen könnte. In die Kontrollgruppe der Studie 1 wurden nur Hunde eingeschlossen, die keine chronischen oder akuten gastrointestinalen Symptome aufwiesen, keine Medikamente erhielten, die die intestinale Mikrobiota beeinflussen können, und die gesund waren. Interessanterweise zeigte auch einer der Hunde der Kontrollgruppe eine Dysbiose und eine verminderte Anzahl an *C. hiranonis*. Dieser Hund wurde im Rahmen der Gesundheitsvorsorge an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München weiterverfolgt. Nach einem Jahr berichteten die Besitzer, dass der Hund nun seit zwei Monaten chronischen Durchfall zeige. Es wurde vermutet, dass dieser Hund trotz fehlender Symptome eine gestörte intestinale Mikrobiota und eventuell eine chronische Darmerkrankung hatte, welche nach einer langen subklinischen Phase zu Symptomen führte. In der Zukunft könnten weitere Studien helfen herauszufinden, inwieweit es sich beim DI um einen Frühmarker für eine chronische gastrointestinale Erkrankung handelt.

Zusätzlich zu *C. hiranonis* waren bei den Hunden mit chronischem Durchfall andere Bakteriengruppen, welche im Rahmen des DI evaluiert werden, auffällig verändert. So waren in einigen Fällen die Mengen an *Faecalibacterium* und *Fusobacterium* im Kot reduziert, was ebenso in anderen Studien bei Hunden mit chronischen Enteropathien beobachtet wurde (SOKOL et al., 2008; ALSHAWAQFEH et al., 2017). *Faecalibacterium* war sowohl in humanmedizinischen als auch tiermedizinischen Studien bei Individuen mit

chronischen Enteropathien vermindert. In *in-vitro*-Studien zeigte *Faecalibacterium* das Potenzial, antientzündliche Peptide zu sezernieren, weshalb eine normale Konzentration an *Faecalibacterium* als bedeutend für die Darmgesundheit erscheint (SOKOL et al., 2008; MIQUEL et al., 2013; LOPEZ-SILES et al., 2017). Das Mikrobiom spielt bei manchen Hunden mit chronischen Enteropathien somit eine entscheidende Rolle bei der Erkrankung. Es erscheint wichtig, neben anderen therapeutischen Maßnahmen auch eine Dysbiose therapeutisch auszugleichen. Hierfür können die Behandlung der Grunderkrankung, die Gabe von Probiotika und eine fäkale Mikrobiota-Transplantation (FMT) hilfreich sein (ROSSI et al., 2014; JENSEN und BJØRNVAD, 2019; NIINA et al., 2019).

Im Gegensatz zu den Hunden mit chronischem Durchfall der Studie 1 zeigten Hunde mit akutem unkompliziertem Durchfall der Studie 2 keine Dysbiose. Der DI war im Vergleich zum Referenzintervall nicht signifikant erhöht. Akuter unkomplizierter Durchfall ist bei Hunden eine häufig vorkommende Erkrankung in der Kleintierpraxis (HUBBARD et al., 2007; STAVISKY et al., 2011; SAEVIK et al., 2012; BERSET-ISTRATESCU et al., 2014). Ursächlich können diätetische Modifikationen, parasitäre, virale Erkrankungen oder selten bakterielle Infektionen sein (MARKS und KATHER, 2003; HUBBARD et al., 2007; SAEVIK et al., 2012). Meist ist die Ätiologie der Erkrankung nicht nachzuvollziehen. Maßgeblich ist jedoch, dass es sich um einen akuten milden Insult handelt und somit das Mikrobiom bei den Hunden der Studie 2 nicht verändert war. Deswegen erscheint es noch wichtiger, dieses gesunde Mikrobiom zu erhalten und nicht durch die Gabe verschiedener Medikamente eine chronische Dysbiose hervorzurufen. Zwar konnte eine andere Studie mit detaillierteren 16S-rRNA-Gen-Sequenzierungs-basierten Methoden Veränderungen des Mikrobioms bei Hunden mit akutem Durchfall detektieren, jedoch scheinen die Veränderungen mild zu sein und auch von dem Schweregrad der Erkrankung abzuhängen (HONNEFFER et al., 2014).

Neben Erkrankungen können auch Medikamente zu einer Modulation des der intestinalen Mikrobiota führen. Im Speziellen soll hier auf die Antibiotika eingegangen werden. Generell können alle oral verabreichten, biliär ausgeschiedenen oder enterohepatisch zirkulierenden Medikamente zu einer Beeinflussung der intestinalen Mikrobiota führen. Es ergeben sich jedoch zwischen den verschiedenen Antibiotikaklassen erhebliche Unterschiede. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Gabe von Metronidazol und Tylosin zu einer

hochgradigen Veränderung des DI und zu einer reduzierten Anzahl an *C. hiranonis* bei gesunden Hunden führt (MANCHESTER et al., 2019; PILLA et al., 2020). Die Veränderungen bestanden noch Wochen nach der antibiotischen Therapie (MANCHESTER et al., 2019; PILLA et al., 2020). Bei Amoxicillin-Clavulansäure handelt es sich um ein Antibiotikum, das ebenso häufig wie Metronidazol ohne eindeutige Indikation und basierend auf anekdotischem Wissen beim akuten Durchfall eingesetzt wird (GERMAN et al., 2010; JONES et al., 2014; SINGLETON et al., 2019). Daher war es ein Ziel der Studie 2 zu beschreiben, wie die Gabe von Amoxicillin-Clavulansäure das Mikrobiom beim akuten unkomplizierten Durchfall verändert. Die Ergebnisse zeigten, dass die starke Dysbiose, hervorgerufen durch Tylosin und Metronidazol, unter der Gabe von Amoxicillin-Clavulansäure nicht vorhanden war. Letztendlich konnte keine signifikante Veränderung des DI während der Antibiotikagabe an Tag 6 im Vergleich zur Placebogruppe detektiert werden. Die Begründung hierfür könnte die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota liefern. Metronidazol und Tylosin wirken stark auf das anaerobe Keimspektrum, welches im Darmtrakt vorherrscht (FREY und LÖSCHER, 2002). Amoxicillin-Clavulansäure besitzt dagegen weniger Wirkung gegen anaerobe Bakterien. In der Theorie wäre als Erklärung auch ein reduzierter Kontakt zwischen Mikrobiota und Antibiotikum beim akuten Durchfall und schnellerer Passagezeit denkbar. Eine verminderte Wirkung auf die Darm-Mikroben erscheint als Erklärung jedoch unzureichend, da in der vorliegenden Studie hochgradige Veränderungen des Anteils an resistenten fäkalen *E. coli* gesehen werden konnten. Somit musste ein ausreichender Kontakt zwischen dem Antibiotikum und der Mikrobiota bestanden haben.

In verschiedenen Arbeiten zeigte sich eine gute Korrelation zwischen dem Goldstandard 16S-rRNA-Gen-Sequenzierung zur Bestimmung des Mikrobioms und dem DI (CHAITMAN et al., 2020; PILLA et al., 2020). Aufgrund der bisher leichteren kommerziellen Zugänglichkeit wurden im deutschsprachigen Raum häufig jedoch bakterielle Kotkulturen zur Evaluation der fäkalen Mikrobiota verwendet. Hierbei wird von mikrobiobiologischen Laboren auf das Vorhandensein von klassischen Enteropathogenen (in der Regel *Salmonella* spp., *Campylobacter* (*C.*) *jejuni*, spezifische enteropathogene *E. coli*, *Yersinia* spp., *Clostridium* (*C.*) *perfringens*) getestet. Zudem wird oft eine Interpretation der Zusammensetzung der Gram positiven und Gram negativen Bakterien an den einsendenden Tierarzt

weitergegeben. Ein Ziel der Studie 1 war es, das Ergebnis dieser fäkalen Kotkultur von Hunden mit chronischem Durchfall mit der von gesunden Hunden zu vergleichen. In einer Studie bei Hunden mit akutem Durchfall konnte bereits gezeigt werden, dass enteropathogene Bakterien nicht häufiger bei diesem Krankheitsbild gefunden werden im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (CAVE et al., 2002). Studien zur Wertigkeit der bakteriologischen Kotkultur beim chronischen Durchfall des Hundes existierten bisher nicht. Die Studie 1 zeigte keinen signifikanten Unterschied im Ergebnis der Kulturen der beiden Gruppen. Bei den Hunden mit chronischem Durchfall konnten keine klassischen Enteropathogene außer hämolysierenden *E. coli* isoliert werden. Die klinische Relevanz dieser Bakterienspezies bei Hunden mit chronischem Durchfall erscheint jedoch fraglich, weil diese Spezies sogar bei einer höheren Anzahl der gesunden Kontrollhunde isoliert werden konnte. Historisch gesehen konnte in verschiedenen Studien ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Virulenzfaktoren und der Eigenschaft von *E. coli*, Erythrozyten zu hämolysieren, gesehen werden (HACKER et al., 1983). Jedoch zeigten auch frühere Arbeiten, dass hämolysierende *E. coli* ebenso ein Keim der normalen caninen intestinalen Mikrobiota sein können (BEUTIN, 1999). Andere Enteropathogene wie *Yersinia enterocolica*, *C. jejuni* oder *Salmonella* spp. konnten in keiner der Proben gefunden werden. Klassische enteropathogene Bakterien scheinen also zusammenfassend bei der Ätiologie des chronischen Durchfalls, ebenso wie beim akuten Durchfall, eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die bakteriologische Kotkultur ist als Diagnostikum bei Hunden mit chronischem Durchfall ohne Hinweise auf eine systemische Entzündungsreaktion zur Diagnose einer bakteriellen Darminfektion nur von fraglichem Nutzen. Ebenso existieren wenig Informationen über die Variabilität der Ergebnisse bakteriologischer Kotuntersuchungen zwischen verschiedenen Laboratorien. Die Variabilität der Ergebnisse der Kotkulturen der drei eingeschlossenen deutschen kommerziellen veterinärmedizinischen Labore war erheblich. Die Definition einer „abnormalen Darmflora“ war nicht einheitlich nachvollziehbar. Labor 1 wies eine „abnormale Darmflora“ in allen außer zwei Hunden der gesunden Kontrollgruppe und in allen außer vier Hunden mit chronischem Durchfall aus. Labor 2 und 3 dokumentierten diesen Befund weniger oft, wobei in Labor 1 und in Labor 2 mehr gesunde Hunde eine „abnormale Flora“ zeigten als Hunde mit chronischem Durchfall. Dieses Ergebnis ist konträr zum oben angeführten DI, welcher eine signifikante Dysbiose bei den Hunden mit

chronischem Durchfall im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigte. Ebenso ergab sich eine schlechte Übereinstimmung zwischen dem DI und den Ergebnissen der bakteriologischen Kotkulturen der drei Labore mit Hilfe des Cohens-Kappa-Tests.

Labor 1 und Labor 2 machten zusätzlich zur generellen Interpretation der Flora als „abnormal“ oder „normal“ Angaben über das Vorhandensein einer Gram positiven und Gram negativen Flora. Gram negative Bakterien konnten in beiden Laboren bei acht Hunden gefunden haben, jedoch waren nur zwei dieser acht Hunde übereinstimmend. Eine Gram positive Flora konnte von Labor 1 bei sieben und von Labor 2 bei acht Hunden nicht isoliert werden. Bei zwei Hunden konnte Labor 2 und bei einem Hund Labor 1 gar keine kultivierbaren Bakterien nachweisen. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Hunde der gesunden Kontrollgruppe. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte unter rein aeroben Bedingungen. Die Sequenzierung der intestinalen Mikrobiota in verschiedenen Studien konnte jedoch darlegen, dass es sich zum größten Teil um anaerob wachsende Bakterien handelte (HANDL et al., 2011). Somit ist die gängige Praxis der eingeschlossenen Labore, eine Interpretation der Darmflora basierend auf klassischer Mikrobiologie zu dokumentieren, kritisch zu sehen.

Labor 1 identifizierte ein erhöhtes Wachstum an *Clostridium* spp. in der Hälfte der Proben der Hunde mit chronischem Durchfall und der gesunden Kontrolltiere. Dieser Befund wurde von Labor 1 als „abnormal“ interpretiert.

Basierend auf der vorliegenden Literatur ist dieser Anteil an *Clostridium* spp. tragenden Hunden jedoch gering. Bei geeigneter Probenhandhabung und geeigneten Kultivierungsmethoden kann *C. perfringens* bei ca. 80 % der gesunden Hunde im Kot identifiziert werden (MARKS et al., 1999; MARKS et al., 2002). *Clostridium* spp. sind durch ein anaerobes Wachstum gekennzeichnet (MARKS et al., 1999). Beim Transport unter aeroben Bedingungen, wie es generelle Praxis in der Tiermedizin ist, können Clostridien innerhalb von Minuten sporulieren (PAREDES-SABJA et al., 2014). Es wären spezielle Kultivierungsmethoden notwendig, um versportete Clostridien wieder anzuzüchten. Leider wurden von Labor 1 jedoch keine Informationen zur verwendeten Methodik gegeben. Zudem war der Anteil der Hunde mit kultivierbaren Clostridien nicht signifikant verändert im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Ebenso wie bei den hämolysierenden *E. coli*, ist auch die Relevanz des Vorhandenseins von Clostridien bei Hunden mit Enteropathien fraglich. Es sind eher bestimmte, durch *C. perfringens* produzierte

Enterotoxine (z. B. NetF-Enterotoxin), die Erkrankungen auslösen können (DINIZ et al., 2018; LEIPIG-RUDOLPH et al., 2018). Hierbei handelt es sich aber um akute Erkrankungen wie z. B. das akute hämorrhagische Durchfallsyndrom (AHDS) (SINDERN et al., 2019; MEHDIZADEH GOHARI et al., 2020).

Im Vergleich dazu wies die PCR-Untersuchung das *C.-perfringens*-16S rRNA-Gen in allen außer zwei Proben nach. Ein Unterschied zwischen Hunden mit chronischem Durchfall und gesunden Kontrolltieren ergab sich nicht. Somit erscheinen *Clostridien* und *C. perfringens* im Besonderen keine größere Rolle bei der chronischen Enteropathie zu spielen.

Die mykologische Kotkultur der drei Labore ergab keinen Unterschied zwischen den Hunden mit chronischem Durchfall und den gesunden Kontrolltieren. Meist wurde *Candida* spp. isoliert ohne Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit zwischen den Gruppen. Dieselben Ergebnisse konnten auch andere molekulargenetische Untersuchungen des Mycobioms bei Hunden zeigen (FOSTER et al., 2013).

Eine wichtige Erkenntnis der Studie 1 war, dass die Ergebnisse der bakteriologischen Kotkulturen der drei eingeschlossenen Labore erheblich variierten und keine bis nur eine schwache Übereinstimmung mit Hilfe des Cohens-Kappa-Test zu finden war. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein und konnten im Rahmen der Möglichkeiten der Studie nicht evaluiert werden. Da es sich um eine geblindete Studie handelte und die veterinärmedizinischen Labore nicht Durchführer der Studie waren, fehlen jegliche Informationen zu den in den Laboren angewendeten mikrobiologischen Methoden. Beispiele für Ursachen für die schlechte Übereinstimmung der Ergebnisse sind die Benutzung einer disparaten Methodik der Labore, Analysefehler, Falschinterpretationen, aber auch präanalytische Fehler (O'TOOLE et al., 2000; NIEMI und NIEMELÄ, 2001; CORRY et al., 2007). Die Proben wurden beispielsweise unterschiedlich transportiert, jedoch erfolgte der Transport immer basierend auf den Empfehlungen der Labore. Außerdem kann eine Beprobung unterschiedlicher Anteile einer Kotprobe (mit unterschiedlichen Subpopulationen an Bakterien) zu einer Diskrepanz der Ergebnisse führen. Die Festlegung von Richtlinien für adäquate Probenhandhabung und Versandbedingungen wäre für reproduzierbare Ergebnisse unerlässlich. Doch selbst wenn diese Verfahren standardisiert werden, ist die Definition von Dysbiose auf der Basis von Kulturmethoden nicht definiert und basiert primär auf individueller subjektiver Interpretation. Folglich könnten

systematische Diskrepanzen zwischen den Laboren auftreten. Vom einsendenden praktischen Tierarzt muss also das Ergebnis einer bakteriologischen Kotkultur kritisch überdacht werden und Kulturen sollten nur bei eindeutiger Indikation angefertigt werden.

Labor 1 und Labor 3 stellten unaufgefordert ein Antibiogramm der gefundenen hämolysierenden *E. coli* zur Verfügung. Dies kann dem einsendenden Veterinär suggerieren, dass eine antibiotische Therapie bei dieser Population an Hunden mit chronischem Durchfall indiziert wäre. Eine Antibiotikabehandlung sollte jedoch nicht auf Basis der Ergebnisse einer Kotkultur initiiert werden. Der Consensus zwischen veterinärmedizinischen Spezialisten der Gastroenterologie ist außerdem, dass eine antimikrobielle Therapie nur bei Hunden mit chronischem Durchfall und Hinweisen für eine echte Infektion (d. h. mit Anzeichen einer systemischen Entzündungsreaktion oder Nachweis von invasiven Bakterien in Darmbiopsieproben) indiziert ist (CERQUETELLA et al., 2020).

Ein ungezielter Einsatz von Antibiotika kann zur Vermehrung von Antibiotikaresistenzen führen, welche auf den Menschen übertragen werden können (GUARDABASSI und KRUSE, 2003; BYWATER, 2004). Ein Ziel der Studie 2 war es zu evaluieren, inwieweit die Gabe von Amoxicillin-Clavulansäure zu einer Vermehrung des Anteils von amoxicillinresistenten *E. coli* führt. *E. coli* erschien geeignet als Markerspezies, da dieses Bakterium in verschiedenen Studien Teil der normalen intestinalen Flora bei 98 % bis 99 % der Hunde ist und somit häufig zu kultivieren ist (ESPINOSA-GONGORA et al., 2015; SCHMIDT et al., 2018). Am Tag 0, vor der antibiotischen Therapie, war der Anteil der amoxicillinresistenten *E. coli* bei unter 1 % bei Hunden mit akutem unkompliziertem Durchfall. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus einer Studie bei gesunden Hunden aus Privathaushalten und Zwingerhaltung ohne antibiotische Vorbehandlung, bei der der Anteil der amoxicillinresistenten fäkalen *E. coli* ca. 2,5 % betrug (diese geschätzte Zahl wurde einer Grafik entnommen, die genaue Zahl wurde in der Publikation nicht genannt) (DE GRAEF et al., 2004). In Studie 2 entwickelte jeder Hund der Antibiotikagruppe einen erhöhten Anteil an amoxicillinresistenten *E. coli*, nachdem er sechs Tage Amoxicillin-Clavulansäure oral erhalten hatte. Bei den meisten Hunden lag der Anteil an amoxicillinresistenten *E. coli* nach der antibiotischen Therapie bei 100 %. Dagegen war der Anteil in der Placebogruppe gleichbleibend gering. Andere Studien dokumentierten niedrigere

Anteile an resistenten *E. coli*. Allerdings sind diese in ihrer Aussagekraft im Gegensatz zur vorliegenden Studie 2 eingeschränkt, da in der Regel nur an einem Zeitpunkt das Resistenzmuster einzelner Bakterienisolate bestimmt wurde (GULAY et al., 2000; MELO et al., 2015) und nicht der Anteil der resistenten Bakterien an der Gesamtzahl der kultivierbaren Bakterien derselben Spezies. Somit wurde also nur die Resistenz einzelner fäkaler *E. coli* gemessen, was jedoch nicht die Gesamtheit der fäkalen *E. coli* widerspiegelt. Die in Studie 2 angewandte Methodik erscheint somit passender und zielführender, um den Verlauf der Resistenzen über die Zeit zu evaluieren. Die Anwendung dieser Methode zur Bestimmung der zeitlichen Entwicklung einer Resistenz wurde bisher nur bei Großtieren in wenigen Arbeiten angewendet (BIBBAL et al., 2007; ALEXANDER et al., 2009). Erklärt werden kann der erhöhte Anteil der resistenten *E. coli* unter Therapie unter anderem durch die Überwucherung resistenter Bakterien, welche vor der Antibiose schon in geringer Keimanzahl vorhanden waren. Zudem könnte der Anteil der resistenten *E. coli* ansteigen, wenn es zur Entwicklung neuer Resistenzen kommt. Beide Erklärungen sind denkbar und konnten mit der klassischen Mikrobiologie der vorliegenden Studie nicht voneinander unterschieden werden. Ein erhöhter Anteil antibiotikaresistenter *E. coli* im Kot und Darmtrakt ist generell problematisch, da hierdurch vermehrt resistente Bakterien an andere Individuen und die Umwelt übertragen bzw. abgegeben werden können. Kommt es zu einer Infektion mit solchen resistenten *E. coli* außerhalb des Gastrointestinaltraktes (z. B. Wundinfektionen oder aufsteigende Harnwegsinfektionen), dann sind diese schwieriger zu behandeln, und es muss häufiger auf Reserveantibiotika zurückgegriffen werden. In diesem Zusammenhang ist *E. coli* nur als Markerspezies zu sehen, und es muss davon ausgegangen werden, dass viele andere Bakteriengruppen auf den Selektionsdruck einer antimikrobiellen Behandlung in ähnlicher Weise reagieren. Tierärzte sollten sich ihres Einflusses auf die weltweite Entstehung von arzneimittelresistenten Infektionen bewusst sein, wenn sie Breitspektrum-Antibiotika bei Hunden mit unkomplizierten Erkrankungen einsetzen, insbesondere wenn die Indikation für eine antibiotische Behandlung nicht gegeben ist. Noch bemerkenswerter ist der Verlauf des Anteils der resistenten *E. coli*. Drei Wochen nachdem das Antibiotikum abgesetzt wurde, zeigte sich der Anteil der resistenten *E. coli* immer noch signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass der Darmtrakt noch lange nach Beendigung der Behandlung als Reservoir für resistente Bakterien

fungieren kann. Wie lange es dauert, bis der Anteil der resistenten Bakterien wieder dem Ausgangswert entspricht, könnte Gegenstand weiterer Studien sein. Verschiedene humanmedizinische Studien legen nahe, dass resistente Bakterien noch bis zu vier Jahre nach der Antibiotikaexposition gefunden werden können (LÖFMARK et al., 2006; JERNBERG et al., 2007; JAKOBSSON et al., 2010; JERNBERG et al., 2010). Dies unterstreicht einmal mehr die Bedeutung im Sinne des One-Health-Konzepts eines umsichtigen antimikrobiellen Einsatzes, um die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen zu verhindern.

In der tierärztlichen Praxis werden Antibiotika immer noch bei mehr als der Hälfte der Hunde mit akutem unkompliziertem Durchfall eingesetzt, was jedoch oft auf subjektivem Empfinden und anekdotischem Wissen basiert (GERMAN et al., 2010; JONES et al., 2014). Bei AHDS wurde bereits gezeigt, dass eine antibiotische Therapie mit Amoxicillin-Clavulansäure mit oder ohne Metronidazol nicht zu einer schnelleren klinischen Verbesserung der Hunde führte (UNTERER et al., 2011; ORTIZ et al., 2018). Ein weiteres Ziel der Studie 2 war es zu evaluieren, ob die Gabe von Amoxicillin-Clavulansäure zu einer schnelleren klinischen Verbesserung von Hunden mit akutem unkompliziertem Durchfall führt. Das eingeschlossene Patientengut repräsentierte hierbei den gängigen Hundepatienten in der Kleintierpraxis mit akutem Durchfall, der nicht stationär zur intravenösen Therapie aufgenommen werden muss und zu Hause mit symptomatischer Therapie betreut wird. Meist ist die Erkrankung selbstlimitierend. Amoxicillin-Clavulansäure wurde ausgewählt, weil Beta-Lactam-Antibiotika die am häufigsten verwendeten antimikrobiellen Mittel bei gastrointestinalen Magen-Darm-Erkrankungen bei Hunden und Katzen sind (GERMAN et al., 2010).

Die Studie ergab zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied im klinischen Verlauf der Hunde, die mit Amoxicillin-Clavulansäure behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Fehlen eines positiven klinischen Effekts ist eine wichtige Erkenntnis für praktische Tierärzte, die diese Fälle routinemäßig und täglich behandeln.

Es konnten keine offensichtlichen klinischen Kurzzeit-Nebenwirkungen von Amoxicillin-Clavulansäure beobachtet werden, obwohl gezeigt wurde, dass die Verabreichung verschiedener Antibiotika (u. a. Amoxicillin-Clavulansäure, Clindamycin, Enrofloxacin, Metronidazol) bei gesunden Hunden und Katzen Durchfall verursachen kann (TORRES-HENDERSON et al., 2017;

WHITTEMORE et al., 2018; PILLA und SUCHODOLSKI, 2019). Die Nebenwirkungen scheinen vom Alter des Patienten und der Art des eingesetzten Antibiotikums abzuhängen (MCFARLAND, 1998). Außerdem könnte die Applikationsroute und das individuelle Ansprechen der Tiere eine Rolle spielen (MCFARLAND, 1998). Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor könnte die Tierart sein, weswegen die fehlenden negativen Effekte in der Studie 2 nicht auf andere Tierarten wie z. B. die Katze übertragen werden können. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die langfristigen Auswirkungen von Antibiotika bei Hunden mit akutem Durchfall auf die allgemeine Gesundheitslage und speziell auf die Darmgesundheit zu evaluieren. Beim Menschen gilt eine Antibiotikagabe vor allen Dingen im jungen Lebensalter als Trigger für chronische immunologische Erkrankungen wie Asthma oder Morbus Crohn (KUMMELING et al., 2007; UMAMAHESWARI et al., 2010; METSÄLÄ et al., 2015; KLEM et al., 2017).

Die vorliegende Studie zeigt, dass die signifikanteste klinische Verbesserung innerhalb der ersten zwei Tage erfolgt. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Studien, in denen die Dauer des Durchfalls mit einem bis drei Tage angegeben wurde (HUBBARD et al., 2007; SAEVIK et al., 2012). Da die Regeneration von Enterozyten bis zu sechs Tage dauern kann, können auch Verläufe mit bis zu einwöchiger veränderter Kotkonsistenz im Rahmen sein (LIPKIN, 1985). Gerade weil akuter unkomplizierter Durchfall einige Tage bestehen bleibt, können Tierärzte eher im Zugzwang sein, therapeutisch auf den Krankheitsverlauf einzuwirken und zum Beispiel Antibiotika einzusetzen.

Basierend auf dem CADS-Index (canine acute diarrhea severity index) wurden die Hunde in beiden Gruppen als mäßig erkrankt eingestuft. Es konnten keine klinisch relevanten Veränderungen in der Hämatologie und im serumbiochemischen Profil beobachtet werden. Diese Tatsachen lassen sich durch den Ausschluss von Hunden mit einer schweren Form der gastrointestinalen Erkrankung erklären. Diese Hundepopulation wurde ausgewählt, weil es speziell darum ging, ob der typische Fall mit unkompliziertem Durchfall, der von Tierärzten täglich gesehen wird, von einer antibiotischen Behandlung profitiert. Die Ergebnisse dürfen jedoch nicht auf stärker betroffene Hunde oder Hunde aus anderen Subpopulationen, wie Welpen, übertragen werden.

Mit der vorliegenden Studie 2 konnte also gezeigt werden, dass Hunde mit unkompliziertem akutem Durchfall, keinen klinischen Vorteil durch die Gabe von

Amoxicillin-Clavulansäure erfuhren. Hierbei handelt es sich um ein wichtiges Ergebnis für die praktischen Tierärzte. Die Erkenntnisse aus Studie 2 werden begleitet von Ergebnissen anderer Studien, die den Einfluss von Metronidazol auf den klinischen Verlauf bei Hunden mit akutem unkompliziertem Durchfall untersuchten. In zwei bisher veröffentlichten placebokontrollierten Studien wurden konträre Schlussfolgerungen durch die Autoren gezogen. In einer Studie zeigte sich keine signifikant schnellere klinische Verbesserung durch die Gabe von Metronidazol, wohingegen eine zweite Studie eine signifikant schnellere Verbesserung von 1,5 Tagen im Vergleich zur Placebogruppe dokumentierte (SHMALBERG et al., 2019; LANGLOIS et al., 2020). Zu beachten ist in diesem Zusammenhang jedoch der Unterschied zwischen signifikanten und klinisch relevanten Ergebnissen. Es ist kritisch zu betrachten, ob diese Verbesserung der Zeit bis zur Symptombefreiung um 1,5 Tage bei einer nicht lebensgefährlichen Erkrankung wie dem akuten unkomplizierten Durchfall die Gabe von Antibiotika rechtfertigt. Zusätzlich wurden keine Langzeiteffekte durch die Gabe von Antibiotika untersucht. Die Patientengruppe der zitierten Studien und der Studie 2 bildeten Hunde mit unkomplizierten Krankheitsverläufen. Die Tiere waren nicht klinisch relevant dehydriert, mussten nicht hospitalisiert werden und zeigten keine systemische Entzündungsreaktion. Aus diesem Grund kann man vermuten, dass diese Patientengruppe nicht von einer antibiotischen Therapie profitiert. Essentiell wäre es, in weiteren Studien herauszuarbeiten, welche klinischen und labordiagnostischen Parameter letztendlich zwischen Hunden mit unkompliziertem Durchfall und Hunden, die eine komplizierte Erkrankung zeigen und antibiotisch behandelt werden müssen, diskriminieren.

Bei beiden Studien sind relevante Limitationen zu nennen. Bei Studie 1 ist wichtig hervorzuheben, dass keine Informationen über die von den 3 Laboren verwendeten mikrobiologischen Verfahrensweisen vorlagen. Folglich war es nicht möglich, eine exakte Evaluierung der Übereinstimmung derselben Methode zwischen den Laboren herauszuarbeiten. Dennoch erscheint die Information über die hochgradige Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Labore für die tierärztliche Praxis wichtig und sollte auch aus der Sicht des praktizierenden Tierarztes gesehen werden. Die Ergebnisse unterstreichen, dass das Ergebnis einer bakteriologischen und mykologischen Kotuntersuchung variieren kann, je nachdem an welches Labor die Probe eingesandt wird.

Eine weitere Limitation ist die Schwierigkeit, einen Goldstandard für die Mikrobiomanalyse zu bestimmen. In Studie 1 war die Kontrolle, mit der die bakteriologischen Kotuntersuchungen verglichen wurde, der DI. Hierbei handelt es sich eher um eine neuere Methode zur Evaluierung des intestinalen Mikrobioms. Dennoch wurde in andern Studien gezeigt, dass die Ergebnisse des DI gut mit der klassischen und detaillierten Sequenzierungs-Methode übereinstimmen (PILLA und SUCHODOLSKI, 2019; CHAITMAN et al., 2020). Diese Sequenzierungsmethoden werden derzeit als Goldstandarduntersuchung in der Mikrobiomanalyse angesehen.

In der Studie 2 ist als Limitation zu nennen, dass der Besitzer die Therapie (Amoxicillin-Clavulansäure oder Placebo) dem Tier selbst verabreichte. Daher kann eine nicht korrekte Applikation nicht ausgeschlossen werden. Somit könnte der Einfluss des Antibiotikums auf die Ergebnisse der Mikrobiomanalyse, des klinischen Verlaufs und der Antibiotikaresistenz unterschätzt werden. Dies erscheint generell wegen der bestechend starken Ergebnisse der Resistenzuntersuchung nicht sehr wahrscheinlich.

Des Weiteren war der Hundebesitzer auch dafür verantwortlich, die Krankheitsaktivität seines Hundes zu evaluieren. Somit könnten sich hier, je nachdem wie eng der Tier-Besitzer-Kontakt war, Unterschiede in der Einschätzung durch den Besitzer ergeben.

Außerdem besteht eine Limitation beider Studie in der kleinen Patientenzahl. Die Patientenzahl wurde vor Studienbeginn mittels Power-Analyse bestimmt. In Studie 1 fallen statistisch vor allen Dingen die breiten Konfidenzintervalle auf, die sich aber in der Antibiotika- und Placebogruppe gleichermaßen verhalten, weswegen trotz des breiten Konfidenzintervalls eine Aussage über die Gleichheit der Gruppen getätigt werden konnte. Die Konfidenzintervalle der Cohens-Kappa-Tests der Studie 2 waren generell schmal, und grundlegend andere Aussagen bei Wiederholung der Studie erscheinen unwahrscheinlich. Dennoch ist es wünschenswert, weitere, größer angelegte Studien in den Themengebieten der mikrobiologischen Diagnostik und Therapie von akuten und chronischen Enteropathien des Hundes durchzuführen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Akute und chronische Enteropathien sind häufige Erkrankungen in der Hundepopulation. Zwischen beiden Formen gibt es grundlegende Unterschiede hinsichtlich der mikrobiellen intestinalen Veränderungen, wie auch in der Therapie. In dieser Arbeit wurden unter anderem die Sinnhaftigkeit verschiedener mikrobieller diagnostischer Methoden bei chronischen Enteropathien und der Wert einer antibiotischen Therapie bei Hunden mit akutem unkompliziertem Durchfall untersucht. In beiden Originalartikeln wurde ein Fokus auf die Evaluation der fäkalen Mikrobiota gelegt.

Ziel der geblindeten und kontrollierten Studie 1 war es, verschiedene mikrobielle diagnostische Methoden untereinander zu vergleichen und die Ergebnisse von Hunden mit chronischem Durchfall im Vergleich zu gesunden Kontrollhunden zu bewerten. Dabei wurde der DI als Referenzmethode gewählt. Hierbei handelt es sich um ein PCR-basiertes Verfahren zur Bestimmung einer intestinalen Dys- oder Normobiose. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass der DI gut mit dem Goldstandard (detaillierten Sequenzierungsmethoden) korrelierte. Es konnte gezeigt werden, dass bei 44 % der Hunde mit chronischem Durchfall, jedoch nur bei 6 % der gesunden Kontrollhunde, eine Dysbiose vorhanden war. Weiterhin wurden bakterielle Kotkulturen der Hunde mit Durchfall und der Kontrollgruppe von drei verschiedenen kommerziellen veterinärmedizinischen Laboren (geblindet) angefertigt. Hierbei zeigte sich, dass hämolysierende *E. coli* als einzige klassische Enteropathogene gefunden wurden. Allerdings wurden sie häufiger in der gesunden Kontrollgruppe isoliert. Klassische enteropathogene Bakterien scheinen also eine untergeordnete Rolle bei der häufig vorhandenen Dysbiose bei chronischen Enteropathien zu spielen. Zudem interpretierten die beteiligten veterinärmedizinischen Labore standardmäßig die Darmflora basierend auf dem aeroben Wachstum der Gram positiven und Gram negativen Flora. Diese Interpretation stimmte jedoch bei keinem der drei Labore mit dem DI überein, weswegen die Sinnhaftigkeit eines solchen Vorgehens hinterfragt werden muss. Darüber hinaus gab es zwischen den bakteriellen Kotkulturen aus derselben Probe nur eine ungenügende bis schlechte Übereinstimmung der Ergebnisse.

Ziel der verblindeten, placebokontrollierten Studie 2 war es, den Effekt von Amoxicillin-Clavulansäure auf die intestinale Mikrobiota, den Anteil resistenter

E. coli und den klinischen Verlauf von Hunden mit akutem unkompliziertem Durchfall zu untersuchen. Amoxicillin-Clavulansäure wurde gewählt, da Umfragen unter Tierärzten gezeigt haben, dass dieses Antibiotikum am häufigsten bei Hunden mit akutem Durchfall, oft ohne eindeutige Indikation eingesetzt wird. Es wurde in der vorliegenden Studie für 7 Tage oral in der zugelassenen Dosierung eingesetzt. Hierbei zeigten die Hunde am Tag des Studieneinschlusses vor der Medikation im Vergleich zum chronischen Durchfall keine Dysbiose. Auch durch Amoxicillin-Clavulansäure wurde keine signifikante Dysbiose im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgelöst. Dieses Ergebnis steht konträr zu Studien zu anderen häufig eingesetzten Antibiotika (Tylosin und Metronidazol).

Der Einfluss von Amoxicillin-Clavulansäure auf das Mikrobiom scheint eher mild zu sein. Jedoch zeigte Studie 2 einen deutlichen Einfluss auf den Anteil der amoxicillinresistenten fäkalen *E. coli*. Vor der antibiotischen Therapie konnte sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe in weniger als 1 % der isolierbaren *E. coli* eine Resistenz detektiert werden. Unter der Antibiotikagabe stieg dieser Anteil im Median auf 100 % im Gegensatz zum gleichbleibend niedrigen Anteil in der Placebogruppe. Noch interessanter erscheint, dass der Anteil der resistenten *E. coli* auch drei Wochen nach Absetzen des Antibiotikums noch signifikant erhöht war im Vergleich zur Placebogruppe. Dieses Ergebnis unterstreicht den langfristigen Effekt einer antibiotischen Therapie auf die Resistenzlage der fäkalen Mikrobiota. Bei *E. coli* handelt es sich hierbei nur um einen Markerkeim. Ein ähnliches Verhalten bei anderen Bakteriengruppen erscheint wahrscheinlich. Den dritten Pfeiler der Studie 2 bildete die klinische Evaluation der Patienten. Hierfür wurden die klinischen Symptome der Hunde mittels eines Tagebuchs, basierend auf dem CADS-Krankheitsaktivitätsindex, vom Besitzer über eine Woche täglich erfragt. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied im Krankheitsverlauf zwischen Antibiotika- und Placebogruppe. Amoxicillin-Clavulansäure führte in der vorliegenden Studienpopulation an Hunden mit akutem unkompliziertem Durchfall nicht zu einer schnelleren klinischen Verbesserung. Die Ergebnisse der Resistenzuntersuchungen und der klinischen Evaluation der Hunde sollten als Grundlage für die Erstellung von Richtlinien zum rationalen Antibiotikaeinsatz herangezogen werden.

Die richtige Beurteilung einer mikrobiologischen Diagnostik erscheint als Grundlage für den sinnvollen Einsatz von Antibiotika wichtig. Kotkulturen von

Patienten mit Enteropathien ohne andere klinische und labordiagnostische Anzeichen einer bakteriellen Infektion scheinen hierbei keinen Nutzen zu bringen und den praktischen Tierarzt eher in Richtung einer nicht notwendigen antibiotischen Therapie fehlzuleiten. Zur Beurteilung der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota und des Vorliegens einer Dysbiose eignen sich Kotkulturen dementsprechend nicht. Stattdessen sollten neuere Verfahren wie der DI herangezogen werden. Dieses PCR-basierte Kotuntersuchungsverfahren wurde validiert und steht nun auch in Deutschland zur Routinediagnostik bei Durchfallpatienten zur Verfügung. Die verschiedenen Einsatzbereiche der neuen Verfahren zur Beurteilung der intestinalen Mikrobiota sollten in weiteren Studien evaluiert werden.

Außerdem müssen Krankheitsbilder wie der akute unkomplizierte Durchfall unter Tierärzten erkannt werden als Erkrankungen, bei denen eine antibiotische Therapie nicht von Nutzen ist und diese eher zur Vermehrung des Anteils an resistenten Bakterien führt.

VII. SUMMARY

Acute and chronic enteropathies are common diseases in the canine population. However, there are fundamental differences in both the microbial intestinal composition and the therapy of these conditions. In this work, the value of different microbial diagnostic methods in chronic enteropathies and the value of an antibiotic treatment on dogs with acute uncomplicated diarrhea were investigated. In both original publications, a focus was placed on the evaluation of the fecal microbiome.

The blinded and controlled study 1 aimed to compare different microbial diagnostic methods and to evaluate the results of dogs with chronic diarrhea compared to healthy control dogs. The dysbiosis index was chosen as the baseline test. It is a PCR-based technique for the determination of intestinal dys- or normobiosis. Previous studies have shown that the index correlates well with the gold standard (detailed sequencing methods). Study 1 showed that dysbiosis was present in 44% of dogs with chronic diarrhea, but only in 6% of healthy control dogs.

Furthermore, bacterial fecal cultures were obtained from three different commercial veterinary laboratories (blinded). Hemolytic *E. coli* were the only classical enteropathogens that were found. However, they were isolated more frequently in the healthy control group. Thus, classical enteropathogenic bacteria appear to play a minor role in the dysbiosis frequently present in chronic enteropathies. Moreover, by default, the veterinary laboratories interpreted the intestinal flora based on aerobic growth of Gram-positive and Gram-negative flora as part of their standardized reports. However, this interpretation did not agree with the dysbiosis index in any of the three laboratories, and therefore the usefulness of such an approach must be questioned. Furthermore, there was only an insufficient to poor agreement of the results between the bacterial fecal cultures of the three laboratories.

The blinded, placebo-controlled study 2 aimed to investigate the effect of amoxicillin-clavulanic acid on the intestinal microbiota, the proportion of resistant *E. coli*, and the clinical course of dogs with acute uncomplicated diarrhea. Amoxicillin-clavulanic acid was chosen because surveys have shown that this antibiotic is most commonly used in dogs with acute diarrhea, often without a clear indication. In the present study, it was used orally for seven days at the usual dosage.

Here, the dogs showed no dysbiosis on the day of study inclusion compared to dogs with chronic diarrhea. Amoxicillin-clavulanic acid also did not induce significant dysbiosis compared to the control group. This result is contrary to studies on other commonly used antibiotics (tylosin and metronidazole).

The effect of amoxicillin-clavulanic acid on the microbiome appears to be relatively mild. However, study 2 showed a marked effect on the proportion of amoxicillin-resistant fecal *E. coli*. Before antibiotic therapy, resistance was detected in less than 1% of isolatable *E. coli* in both the verum and placebo groups. Under antibiotic administration, this proportion increased to a median of 100 % compared to a consistently low proportion in the placebo group. Interestingly, the proportion of resistant *E. coli* was still significantly increased three weeks after discontinuation of the antibiotic compared to the placebo group. This result underlines the long-term effect of an antimicrobial therapy on the resistance status of the fecal microbiota. *E. coli* is only one marker organism. Similar behavior of other bacterial groups seems likely. The third goal of study 2 was the clinical evaluation of the patients. For this purpose, the dogs' clinical improvement was surveyed daily by the owner for one week with the help of a diary based on the CADS disease activity index. The results showed no significant difference in disease progression between antibiotic and placebo groups. Amoxicillin-clavulanic acid did not result in more rapid clinical improvement in the present study population of dogs with acute uncomplicated diarrhea. The results of the resistance studies and the dogs' clinical evaluation may contribute to rational antibiotic use in veterinary medicine.

In order to judicious use of antimicrobials in small animal medicine, a correct microbial diagnosis is advantageous as a first step. Fecal cultures from patients with enteropathies without other clinical and laboratory diagnostic signs of bacterial infection seem to be of no use in this regard and tend to misguide the practical veterinarian towards antibiotic therapy. Moreover, fecal cultures are not useful to assess the composition of the intestinal microbiota and to document a dysbiosis. Newer methods like the dysbiosis index are of greater value and should replace fecal cultures in regard to evaluation of the microbiota. These PCR-based tests have been validated and are available as routine diagnostic tool in dogs with diarrhea. Future studies are necessary one the one hand to define indications for the assessment of the intestinal microbiota. On the other hand, it is also necessary to recognize more clinical pictures, such as acute uncomplicated diarrhea, in which

antibiotic therapy is of no benefit and instead leads to an increase in the proportion of resistant bacteria.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Alexander T, Reuter T, Sharma R, Yanke L, Topp E, McAllister T. Longitudinal characterization of resistant *Escherichia coli* in fecal deposits from cattle fed subtherapeutic levels of antimicrobials. *Applied and environmental microbiology* 2009; 75: 7125-34.

Allenspach K, Culverwell C, Chan D. Long-term outcome in dogs with chronic enteropathies: 203 cases. *Vet Rec* 2016; 178: 368.

AlShawaqfeh MK, Wajid B, Minamoto Y, Markel M, Lidbury JA, Steiner JM, Serpedin E, Suchodolski JS. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS microbiology ecology* 2017; 93: fix136

Andersen LA, Levy JK, McManus CM, McGorray SP, Leutenegger CM, Piccione J, Blackwelder LK, Tucker SJ. Prevalence of enteropathogens in cats with and without diarrhea in four different management models for unowned cats in the southeast United States. *Vet J* 2018; 236: 49-55.

Appleby RN, Walters JR. The role of bile acids in functional GI disorders. *Neurogastroenterol Motil* 2014; 26: 1057-69.

Bauer TM, Lalvani A, Fehrenbach J, Steffen I, Aponte JJ, Segovia R, Vila J, Philipczik G, Steinbruckner B, Frei R, Bowler I, Kist M. Derivation and validation of guidelines for stool cultures for enteropathogenic bacteria other than *Clostridium difficile* in hospitalized adults. *JAMA* 2001; 285: 313-9.

Behr C, Slopianka M, Haake V, Strauss V, Sperber S, Kamp H, Walk T, Beekmann K, Rietjens I, van Ravenzwaay B. Analysis of metabolome changes in the bile acid pool in feces and plasma of antibiotic-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019; 363: 79-87.

Berset-Istratescu CM, Glardon OJ, Magouras I, Frey CF, Gobeli S, Burgener IA. Follow-up of 100 dogs with acute diarrhoea in a primary care practice. *Vet J* 2014; 199: 188-90.

Beutin L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res.* 1999 Mar-Jun;30(2-3):285-98. PMID: 10367359.

Bibbal D, Dupouy V, Ferre JP, Toutain PL, Fayet O, Prere MF, Bousquet-Melou A. Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in Enterobacteriaceae and excretion of blaTEM genes in swine feces. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 4785-90.

Bywater R. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *Zoonoses and Public Health* 2004; 51: 361-3.

Cave NJ, Marks SL, Kass PH, Melli AC, Brophy MA. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2002; 221: 52-9.

Cerquetella M, Rossi G, Suchodolski JS, Schmitz SS, Allenspach K, Rodríguez-Franco F, Furlanello T, Gavazza A, Marchegiani A, Unterer S, Burgener IA, Pengo G, Jergens AE. Proposal for rational antibacterial use in the diagnosis and treatment of dogs with chronic diarrhoea. *J Small Anim Pract* 2020; 61: 211-5.

Chaitman J, Ziese AL, Pilla R, Minamoto Y, Blake AB, Guard BC, Isaiah A, Lidbury JA, Steiner JM, Unterer S, Suchodolski JS. Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole. *Front Vet Sci* 2020; 7: 192.

Corry JE, Jarvis B, Passmore S, Hedges A. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. *Food microbiology* 2007; 24: 230-53.

Dandrieux JRS, Mansfield CS. Chronic Enteropathy In Canines: Prevalence, Impact And Management Strategies. *Vet Med (Auckl)* 2019; 10: 203-14.

De Graef E, Decostere A, Devriese L, Haesebrouck F. Antibiotic resistance among fecal indicator bacteria from healthy individually owned and kennel dogs. *Microbial Drug Resistance* 2004; 10: 65-9.

Diniz AN, Coura FM, Rupnik M, Adams V, Stent TL, Rood JI, de Oliveira CA, Jr., Lobato FCF, Silva ROS. The incidence of *Clostridioides difficile* and *Clostridium perfringens* netF-positive strains in diarrheic dogs. *Anaerobe* 2018; 49: 58-62.

Duboc H, Rajca S, Rainteau D, Benarous D, Maubert M-A, Quervain E, Thomas G, Barbu V, Humbert L, Despras G, Bridonneau C, Dumetz F, Jean-Pierre G, Masliah J, Beaugerie L, Cosnes J, Chazouilleres O, Poupon R, Wolf C, Seksik P. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and Gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2013 Apr;62(4):531-9.

Edwards D, Henley W, Ely E, Wood J. Vaccination and ill-health in dogs: a lack of temporal association and evidence of equivalence. *Vaccine* 2004; 22: 3270-3.

Espinosa-Gongora C, Shah SQA, Jessen LR, Bortolaia V, Langebæk R, Bjørnvad CR, Guardabassi L. Quantitative assessment of faecal shedding of β -lactam-resistant *Escherichia coli* and enterococci in dogs. *Veterinary microbiology* 2015; 181: 298-302.

Espinosa-Gongora C, Jessen LR, Kieler IN, Damborg P, Bjørnvad CR, Gudeta DD, Pires Dos Santos T, Sablier-Gallis F, Sayah-Jeanne S, Corbel T, Nevière A, Hugon P, Saint-Lu N, de Gunzburg J, Guardabassi L. Impact of oral amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid treatment on bacterial diversity and β -lactam resistance in the canine faecal microbiota. *J Antimicrob Chemother* 2020; 75: 351-61.

Fjalstad JW, Esaiassen E, Juvet LK, van den Anker JN, Klingenberg C. Antibiotic therapy in neonates and impact on gut microbiota and antibiotic resistance development: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 569-80.

Foster ML, Dowd SE, Stephenson C, Steiner JM, Suchodolski JS. Characterization of the Fungal Microbiome (Mycobiome) in Fecal Samples from Dogs. *Veterinary Medicine International* 2013; 2013: 658373.

Frey HH, Löscher W. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 3. Aufl. Stuttgart: Enke

Gagné JW, Wakshlag JJ, Simpson KW, Dowd SE, Latchman S, Brown DA, Brown K, Swanson KS, Fahey GC, Jr. Effects of a synbiotic on fecal quality, short-chain fatty acid concentrations, and the microbiome of healthy sled dogs. *BMC Vet Res* 2013; 9: 246.

German AJ, Halladay LJ, Noble PJ. First-choice therapy for dogs presenting with diarrhoea in clinical practice. *Vet Rec* 2010; 167: 810-4.

Giaretta PR, Rech RR, Guard BC, Blake AB, Blick AK, Steiner JM, Lidbury JA, Cook AK, Hanifeh M, Spillmann T. Comparison of intestinal expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter between dogs with and without chronic inflammatory enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2018; 32: 1918-26.

Gronvold AM, L'Abee-Lund TM, Sorum H, Skancke E, Yannarell AC, Mackie RI. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. *FEMS Microbiol Ecol* 2010; 71: 313-26.

Guardabassi L, Kruse. Overlooked aspects concerning development and spread of antimicrobial resistance. *Expert review of anti-infective therapy* 1.3 2003: 359-362.

Gulay Z, Bicmen M, Amyes S, Yulu N. Beta-lactamase patterns and beta-lactam/clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* isolated from fecal samples from healthy volunteers. *Journal of chemotherapy* 2000; 12: 208-15.

Hacker J, Schroter G, Schrettenbrunner A, Hughes C, Goebel W. Hemolytic *Escherichia coli* strains in the human fecal flora as potential urinary pathogens. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 1983; 254: 370-8.

Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS microbiology ecology* 2011; 76: 301-10.

Heilmann RM, Steiner JM. Clinical utility of currently available biomarkers in inflammatory enteropathies of dogs. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 1495-508.

Honneffer J, Minamoto Y, Suchodolski J. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 16489-97.

Hubbard K, Skelly BJ, McKelvie J, Wood JL. Risk of vomiting and diarrhoea in dogs. *Vet Rec* 2007; 161: 755-7.

Ianiro G, Tilg H, Gasbarrini A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut* 2016; 65: 1906-15.

Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjolund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One* 2010; 5: e9836.

Jensen AP, Bjørnvad CR. Clinical effect of probiotics in prevention or treatment of gastrointestinal disease in dogs: A systematic review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2019; 33: 1849-64.

Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME journal* 2007; 1: 56-66.

Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010; 156: 3216-23.

Jones PH, Dawson S, Gaskell RM, Coyne KP, Tierney A, Setzkorn C, Radford AD, Noble PJ. Surveillance of diarrhoea in small animal practice through the Small Animal Veterinary Surveillance Network (SAVSNET). *Vet J* 2014; 201: 412-8.

Kawano K, Shimakura H, Nagata N, Masashi Y, Suto A, Suto Y, Uto S, Ueno H, Hasegawa T, Ushigusa T, Nagai T, Arawatari Y, Miyaji K, Ohmori K, Mizuno T. Prevalence of food-responsive enteropathy among dogs with chronic enteropathy in Japan. *J Vet Med Sci* 2016; 78: 1377-80.

Kilpinen S, Spillmann T, Syrja P, Skrzypczak T, Louhelainen M, Westermarck E. Effect of tylosin on dogs with suspected tylosin-responsive diarrhea: a placebo-controlled, randomized, double-blinded, prospective clinical trial. *Acta Vet Scand* 2011; 53: 26.

Kilpinen S, Rantala M, Spillmann T, Bjorkroth J, Westermarck E. Oral tylosin administration is associated with an increase of faecal enterococci and lactic acid bacteria in dogs with tylosin-responsive diarrhoea. *Vet J* 2015; 205: 369-74.

Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev* 2017; 279: 90-105.

Kitahara M, Takamine F, Imamura T, Benno Y. *Clostridium hiranonis* sp. nov., a human intestinal bacterium with bile acid 7 α -dehydroxylating activity. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2001; 51: 39-44.

Klem F, Wadhwa A, Prokop LJ, Sundt WJ, Farrugia G, Camilleri M, Singh S, Grover M. Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 2017; 152: 1042-54.e1.

Kummeling I, Stelma FF, Dagnelie PC, Snijders BE, Penders J, Huber M, van Ree R, van den Brandt PA, Thijs C. Early life exposure to antibiotics and the subsequent development of eczema, wheeze, and allergic sensitization in the first 2 years of life: the KOALA Birth Cohort Study. *Pediatrics* 2007; 119: e225-31.

Kunkle GA, Sundlof S, Keisling K. Adverse side effects of oral antibacterial therapy in dogs and cats: an epidemiologic study of pet owners' observations. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995; 31: 46-55.

Langlois DK, Koenigshof AM, Mani R. Metronidazole treatment of acute diarrhea in dogs: A randomized double blinded placebo-controlled clinical trial. *J Vet Intern Med* 2020; 34: 98-104.

Leipig-Rudolph M, Busch K, Prescott JF, Mehdizadeh Gohari I, Leutenegger CM, Hermanns W, Wolf G, Hartmann K, Verspohl J, Unterer S. Intestinal lesions in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome associated with netF-positive *Clostridium perfringens* type A. *J Vet Diagn Invest* 2018; 30: 495-503.

Lipkin M. Growth and development of gastrointestinal cells. *Annual review of physiology* 1985; 47: 175-97.

Löfmark S, Jernberg C, Jansson JK, Edlund C. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 58: 1160-7.

Lopez-Siles M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Medina M. *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J* 2017; 11: 841-52.

Lutz B, Lehner C, Schmitt K, Willi B, Schüpbach G, Mevissen M, Peter R, Müntener C, Naegeli H, Schuller S. Antimicrobial prescriptions and adherence to prudent use guidelines for selected canine diseases in Switzerland in 2016. *Vet Rec Open* 2020; 7: e000370.

Manchester AC, Webb CB, Blake AB, Sarwar F, Lidbury JA, Steiner JM, Suchodolski JS. Long-term impact of tylosin on fecal microbiota and fecal bile acids of healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 2605-17.

Marks SL, Melli A, Kass PH, Jang SS, Barkhoodarian A, Hirsh DC. Evaluation of methods to diagnose *Clostridium perfringens*-associated diarrhea in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1999; 214: 357-60.

Marks SL, Kather EJ, Kass PH, Melli AC. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002; 16: 533-40.

Marks SL, Kather EJ. Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33: 1029-60.

McFarland L. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea. *Digestive Diseases* 1998; 16: 292-307.

Mehdizadeh Gohari I, Unterer S, Whitehead AE, Prescott JF. NetF-producing *Clostridium perfringens* and its associated diseases in dogs and foals. *J Vet Diagn Invest* 2020; 32: 230-8.

Melo DB, Menezes AP, Reis JN, Guimaraes AG. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from humans and foods. *Braz J Microbiol* 2015; 46: 1165-70.

Metsälä J, Lundqvist A, Virta L, Kaila M, Gissler M, Virtanen S. Prenatal and post-natal exposure to antibiotics and risk of asthma in childhood. *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 137-45.

Minamoto Y, Otoni CC, Steelman SM, Büyükleblebici O, Steiner JM, Jergens AE, Suchodolski JS. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 2015; 6: 33-47.

Minamoto Y, Minamoto T, Isaiah A, Sattasathuchana P, Buono A, Rangachari VR, McNeely IH, Lidbury J, Steiner JM, Suchodolski JS. Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2019; 33: 1608-18.

Miquel S, Martín R, Rossi O, Bermúdez-Humarán LG, Chatel JM, Sokol H, Thomas M, Wells JM, Langella P. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16: 255-61.

Niemi RM, Niemelä SI. Measurement uncertainty in microbiological cultivation methods. *Accreditation and quality assurance* 2001; 6: 372-5.

Niina A, Kibe R, Suzuki R, Yuchi Y, Teshima T, Matsumoto H, Kataoka Y, Koyama H. Improvement in Clinical Symptoms and Fecal Microbiome After Fecal Microbiota Transplantation in a Dog with Inflammatory Bowel Disease. *Vet Med (Auckl)* 2019; 10: 197-201.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology* 2000; 54: 49-79.

Ortiz V, Klein L, Channell S, Simpson B, Wright B, Edwards C, Gilbert R, Day R, Caddy SL. Evaluating the effect of metronidazole plus amoxicillin-clavulanate versus amoxicillin-clavulanate alone in canine haemorrhagic diarrhoea: a randomised controlled trial in primary care practice. *J Small Anim Pract* 2018; 59: 398-403.

- Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. Clostridium difficile spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. Trends Microbiol 2014; 22: 406-16.
- Pilla R, Suchodolski JS. The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. Front Vet Sci 2019; 6: 498.
- Pilla R, Gaschen F, Barr JW, Olson E, Honneffer J, Guard BC, Blake AB, Villanueva D, Khattab MR, AlShawaqfeh MK, Lidbury JA, Steiner JM, Suchodolski J. Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. J Vet Intern Med 2020; 34(5): 1853-1866.
- Ramírez-Pérez O, Cruz-Ramón V, Chinchilla-López P, Méndez-Sánchez N. The Role of the Gut Microbiota in Bile Acid Metabolism. Ann Hepatol 2017; 16: 15-20.
- Rossi G, Pengo G, Caldin M, Piccionello AP, Steiner JM, Cohen ND, Jergens AE, Suchodolski JS. Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL# 3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. PLoS One 2014; 9
- Sabshin SJ, Levy JK, Tupler T, Tucker SJ, Greiner EC, Leutenegger CM. Enteropathogens identified in cats entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. Journal of the American Veterinary Medical Association 2012; 241: 331-7.
- Saevik BK, Skancke EM, Trangerud C. A longitudinal study on diarrhoea and vomiting in young dogs of four large breeds. Acta Vet Scand 2012; 54: 8.
- Schmidt VM, Pinchbeck G, McIntyre KM, Nuttall T, McEwan N, Dawson S, Williams NJ. Routine antibiotic therapy in dogs increases the detection of antimicrobial-resistant faecal Escherichia coli. J Antimicrob Chemother 2018; 73: 3305-16.

Schulz BS, Hupfauer S, Ammer H, Sauter-Louis C, Hartmann K. Suspected side effects of doxycycline use in dogs – a retrospective study of 386 cases. *Veterinary Record* 2011; 169: 229.

Shmalberg J, Montalbano C, Morelli G, Buckley GJ. A Randomized Double Blinded Placebo-Controlled Clinical Trial of a Probiotic or Metronidazole for Acute Canine Diarrhea. *Front Vet Sci* 2019; 6: 163.

Sindern N, Suchodolski JS, Leutenegger CM, Mehdizadeh Gohari I, Prescott JF, Proksch AL, Mueller RS, Busch K, Unterer S. Prevalence of *Clostridium perfringens* netE and netF toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 100-5.

Singleton DA, Noble PJM, Sánchez-Vizcaíno F, Dawson S, Pinchbeck GL, Williams NJ, Radford AD, Jones PH. Pharmaceutical Prescription in Canine Acute Diarrhoea: A Longitudinal Electronic Health Record Analysis of First Opinion Veterinary Practices. *Front Vet Sci* 2019; 6: 218.

Sinha SR, Haileselassie Y, Nguyen LP, Tropini C, Wang M, Becker LS, Sim D, Jarr K, Spear ET, Singh G, Namkoong H, Bittinger K, Fischbach MA, Sonnenburg JL, Habtezion A. Dysbiosis-Induced Secondary Bile Acid Deficiency Promotes Intestinal Inflammation. *Cell Host Microbe* 2020; 27: 659-70.e5.

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, Blugeon S, Bridonneau C, Furet J-P, Corthier G. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105: 16731-6.

Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature reviews microbiology* 2013; 11: 227-38.

Stavisky J, Radford AD, Gaskell R, Dawson S, German A, Parsons B, Clegg S, Newman J, Pinchbeck G. A case-control study of pathogen and lifestyle risk factors for diarrhoea in dogs. *Prev Vet Med* 2011; 99: 185-92.

Suchodolski JS, Markel ME, Garcia-Mazcorro JF, Unterer S, Heilmann RM, Dowd SE, Kachroo P, Ivanov I, Minamoto Y, Dillman EM, Steiner JM, Cook AK, Toresson L. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2012; 7: e51907.

Tørnqvist-Johnsen C, Campbell S, Gow A, Bommer NX, Salavati S, Mellanby RJ. Investigation of the efficacy of a dietetic food in the management of chronic enteropathies in dogs. *Vet Rec* 2020; 186: 26.

Torres-Henderson C, Summers S, Suchodolski J, Lappin MR. Effect of *Enterococcus Faecium* Strain SF68 on Gastrointestinal Signs and Fecal Microbiome in Cats Administered Amoxicillin-Clavulanate. *Top Companion Anim Med* 2017; 32: 104-8.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449: 804-10.

Umamaheswari B, Biswal N, Adhisivam B, Parija SC, Srinivasan S. Persistent diarrhea: risk factors and outcome. *Indian J Pediatr* 2010; 77: 885-8.

Unterer S, Strohmeyer K, Kruse BD, Sauter-Louis C, Hartmann K. Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 973-9.

Volkman M, Steiner JM, Fosgate GT, Zentek J, Hartmann S, Kohn B. Chronic Diarrhea in Dogs – Retrospective Study in 136 Cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2017; 31: 1043-55.

Wang S, Martins R, Sullivan MC, Friedman ES, Mistic AM, El-Fahmawi A, De Martinis ECP, O'Brien K, Chen Y, Bradley C. Diet-induced remission in chronic enteropathy is associated with altered microbial community structure and synthesis of secondary bile acids. *Microbiome* 2019; 7: 126.

Whittemore JC, Stokes JE, Laia NL, Price JM, Suchodolski JS. Short and long-term effects of a synbiotic on clinical signs, the fecal microbiome, and metabolomic profiles in healthy research cats receiving clindamycin: a randomized, controlled trial. *PeerJ* 2018; 6: e5130.

Whittemore JC, Moyers TD, Price JM. Randomized, controlled, crossover trial of prevention of antibiotic-induced gastrointestinal signs using a synbiotic mixture in healthy research dogs. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 1619-26.

Willard MD, Berridge B, Braniecki A, Bouley D. Possible antibiotic-associated colitis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1998; 213: 1775-9, 53-4.

Winston JA, Theriot CM. Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota. *Gut Microbes* 2020; 11: 158-71.

IX. DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt Herrn Dr. Stefan Unterer für die Bereitstellung des Themas und die unermüdliche Unterstützung in allen Abschnitten der Doktorarbeit. Ich danke dir, Stefan, dafür dass du schon frühzeitig mich in meinem beruflichen Weg, weit über die Doktorarbeit hinaus, unterstützt und gefördert hast. Dank dir, durfte ich bereits früh lernen, den Blick auf viele Bereiche der Tiermedizin zu öffnen. Ich hätte mir keinen besseren Doktorvater wünschen können!

Ebenso möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann bedanken für die Unterstützung bei den inkludierten Studien und Publikationen und bei der Bereitstellung einer Umgebung, die die Anfertigung dieser Dissertation überhaupt möglich machte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jan Suchodolski, der maßgeblich am Erfolg dieser Doktorarbeit beteiligt war. Lieber Jan, du warst wirklich jederzeit für alle Fragen und Sorgen zur Verfügung. Danke, dass ich immer von deinem Wissensschatz profitieren durfte!

Ganz besonders möchte ich mich auch Herrn Prof. Reinhard Straubinger und Herrn Dr. Georg Wolf bedanken. Die Möglichkeit der eigenständigen mikrobiologischen Arbeit im Zuge der Doktorarbeit stellte für mich persönlich ein sehr großes Geschenk dar und hat mir besonders viel Spaß gemacht. Außerdem möchte ich den Mitarbeitern der bakteriellen Diagnostik für die Hilfe bei der Laborarbeit danken.

Ebenso möchte ich den Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik, und den Tierkliniken Germering, Ismaning und Oberhaching für die Hilfe bei der Patientenrekrutierung für Studie 2 danken.

Außerdem danke ich all meinen Freunden für ihre Geduld. Manchmal schüttelt ihr sicher den Kopf über mich, aber ich bin froh, dass ihr mich trotzdem mögt. Ganz besonders möchte ich mich bei dir, Michi, bedanken, dass du mich schon so lange in meinem Leben begleitest. Unsere Verbindung ist wirklich eine ganz besondere.

Mein herzlichster und innigster Dank geht an meine Eltern. Bereits von Anfang an haben Sie meinen Wissensdurst immer in voller Weiße unterstützt und mir bereits ganz früh die Liebe zu den Tieren vermittelt. Ohne Sie wäre kein einziger Schritt meiner Ausbildung und Weiterbildung möglich gewesen. Ich danke euch von ganzem Herzen, ihr seid die Besten und Wichtigsten!