

Marianna Mähönen

MALDI-TOF MS -menetelmän soveltuvuus *Brachyspira*-diagnostiikkaan ja *Brachyspira*- PCR-testien käyttöönoton validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

1.12.2015

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Marianna Mähönen MALDI-TOF MS -menetelmän soveltuvuus <i>Brachyspira</i> -diag- nostiikkaan ja <i>Brachyspira</i> -PCR-testien käyttöönoton validointi 32 sivua + 2 liitettä 1.12.2015
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Erikoistutkija Jaana Seppänen Tutkintovastaava Jarmo Palm
<p>Opinnäytetyöhön liittyvä <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> -bakteeri aiheuttaa sioille sikadysente- riaa, joka on tärkeä sikojen sairaus. Muista <i>Brachyspira</i>-lajeista myös <i>B. pilosicoli</i> ja mah- dollisesti myös eräät <i>B. intermedia</i> -kannat voivat aiheuttaa sioilla eriaistaisia suolistotuleh- duksia. Kaikkia näitä kolmea <i>Brachyspira</i>-lajia diagnosoidaan eintarviketurvallisuusvirasto Eviran eläintautibakteriologian tutkimusyksikössä.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran eläintautibakteriologian tutki- musyksikön Helsingin laboratoriojaostossa. Työssä selvitettiin MALDI-TOF MS (Matrii- siavusteinen laserdesorptio/ionisaatio-lentoaika-massaspektrometria) -menetelmän sovel- tuvuuutta osaksi Eviran <i>Brachyspira</i>-diagnostiikkaa. Työ tehtiin käyttäen kaikkia kolmea <i>Brachyspira</i>-diagnostiikassa tutkittavaa <i>Brachyspira</i>-lajia. Käytettävät kannat oli varmistettu PCR (polymeraasiketjureaktio) -testeillä. Lisäksi validoitiin <i>Brachyspira</i>-menetelmään liitty- vien PCR-testien pystyttäminen Eviran Helsingin eläintautibakteriologian laboratorioon. Va- lidointi tapahtui vertaamalla Helsingissä tehtyjen <i>Brachyspira</i>-PCR-testien tuloksia Seinäjo- ella saatuihin tuloksiin.</p> <p>Käytössä olevaan <i>Brachyspira</i>-menetelmään liittyvien PCR-testien pystyttäminen onnistui erinomaisesti, sillä Helsingin laboratoriojaostossa saadut tulokset olivat kaikki yhteneviä Sei- näjoen laboratoriojaoston tulosten kanssa. Työssä kävi ilmi, että MALDI-TOF MS -menetel- mää ei voida vielä käyttää <i>Brachyspira</i>-diagnostiikan osana, sillä saadut <i>Brachyspira</i>-bak- teerien lajitunnistukset eivät olleet riittävän luotettavia. <i>B. pilosicoli</i> tunnistui tutkittavista <i>Brachyspira</i>-lajeista parhaiten. <i>B. intermedia</i> -kannat sekoittuvat muiden <i>Brachyspira</i>-lajien kanssa, eikä luotettavaa tunnistustulosta saatu. Tulevaisuudessa MALDI-TOF MS -mene- telmän soveltumista <i>Brachyspira</i>-lajien tunnistamiseen voidaan mahdollisesti parantaa li- säämällä laitteen kirjastoon löydettyjä uusia <i>Brachyspira</i>-lajeja ja potilasnäytteistä eristettyjä paikallisia <i>Brachyspira</i>-kantoja.</p>	
Avainsanat	<i>Brachyspira</i> , Sikadysenteria, PCR, MALDI-TOF MS

Author(s) Title	Marianna Mähönen The suitability of the MALDI-TOF MS-method in <i>Brachyspira</i> diagnostics and validation of the <i>Brachyspira</i> -PCR-test deployment.
Number of Pages Date	32 pages + 2 appendices 1 December 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Jaana Seppänen, Senior Researcher Jarmo Palm, Supervisor
<p>The <i>Brachyspira</i> bacteria that is partly covered in this thesis is a cause for intestinal inflammation and illnesses in swines. The <i>B. hyodysenteriae</i> species is a cause of Swine dysentery. Other species such as the <i>B. pilosicoli</i> and the <i>B. inetermedia</i> cause different levels of intestinal inflammation. All three of these <i>Brachyspira</i> species are diagnosed in the veterinary bacteriology department of the Finnish Food Safety Authority Evira.</p> <p>The thesis was done in the Evira veterinary bacteriology department based in Helsinki. The main task was to examine the suitability of the MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry) method as part of Evira's <i>Brachyspira</i> diagnostics. All three <i>Brachyspira</i> species used in the <i>Brachyspira</i> diagnostics were used in the thesis project. The <i>Brachyspira</i> species were verified using PCR (The polymerase chain reaction) tests. The project also included the erection of PCR tests in the Evira veterinary bacteriology department laboratory. Validation was done by comparing the results gotten from the <i>Brachyspira</i> tests made in Helsinki with the results gotten from the Evira Veterinary bacteriology Department based in Seinäjoki.</p> <p>The erection of the PCR testing used for <i>Brachyspira</i> was a great success because the results in the Helsinki department were a match when compared with the results from the Seinäjoki department. While working on the thesis, it became apparent that the MALDI-TOF-MS method could not yet be used as part of <i>Brachyspira</i> diagnostics because the results in recognizing different species of the <i>Brachyspira</i> bacteria were not reliable enough. <i>B. pilosicoli</i> had the highest recognition rate while <i>B. intermedia</i> was recognized as other <i>Brachyspira</i> species; thus, there was no reliable results in recognizing the bacteria. The use of the MALDI-TOF-MS method in <i>Brachyspira</i> recognition may give better results by adding more <i>Brachyspira</i> species and <i>Brachyspira</i> strains isolated from patient samples to the library used.</p>	
Keywords	<i>Brachyspira</i> , swine dysentery, PCR, MALDI-TOF MS

Sisällys
Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
2.1	Yleistä	2
2.2	Sikadysenteria	2
2.3	Muita <i>Brachyspira</i> -bakteerin aiheuttamia tauteja sioilla	3
2.4	<i>Brachyspira</i> taudinaiheuttajana muille eläimille	4
2.5	<i>Brachyspira</i> -bakteeri	5
2.6	<i>Brachyspira</i> -diagnostiikka	7
2.7	MALDI-TOF MS	9
2.8	MALDI-TOF MS -menetelmä	12
3	Kokeellinen osuus	13
3.1	PCR-testien validoinnissa käytetyt materiaalit	13
3.2	<i>Brachyspira</i> -menetelmän suoritus	15
3.3	Materiaalit MALDI-TOF MS -menetelmään	19
3.4	MALDI-TOF MS -menetelmän suoritus	21
4	Tulokset	24
4.1	<i>Brachyspira</i> -PCR-testien pystytys	24
4.2	MALDI-TOF MS -menetelmän tulokset	24
5	Tulosten tarkastelu ja päätelmät	27
6	Yhteenveto	29
	Lähteet	31
	Liitteet	
	Liite 1. <i>Brachyspira</i> -diagnostiikassa käytetyt reagenssit ja laitteet	
	Liite 2. MALDI-TOF MS-menetelmän mittaustulokset	
	Liite 3. Kaikkien tutkittujen <i>Brachyspira</i> -kantojen 10 parasta tunnistustulosta	

Lyhenteet

tlyA	Hemolyysiiniä koodaava geeni.
<i>nox</i>	NADH-oksidaasia koodaava geeni.
BA-3	Voimakkaasti selektoiva malja, joka sisältää kolistiinia, vankomysiiniä ja spektinomysiiniä sekä Na-ribonukleinaattia.
FAA	Runsasravinteinen anaerobimalja (Fastidious Anaerobe Agar).
PCR	Polymeraasiketjureaktio.
AGE	Agaroosigeelielektroforeesi.
MALDI	Matriisiavusteinen laserdesorptio/ionisaatio (Matrix-assisted laser desorption/ionization).
TOF	Lentoaika (Time Of Flight).
MS	Massaspektrometri (Mass spectrometry).
HCCA	α -syaani-4-hydroksikanelihappoa (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid).

1 Johdanto

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää MALDI -TOF MS -menetelmän soveltuvuus osaksi Eviran *Brachyspira*-diagnoosiikkaa. Lisäksi validoitiin *Brachyspira*-menetelmään liittyvien PCR-testien pystyttäminen Eviran Helsingin eläintautibakteriologian laboratorioon.

Työ tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran eläintautibakteriologian tutkimusyksikön Helsingin laboratoriojaostossa, jonka tehtävänä on muun muassa eläinten eri bakteeritautien ja -zoonosien diagnoosiikka ja seuranta. Yksi eläintautibakteriologian yksikössä diagnosoitavista bakteereista on *Brachyspira*-bakteeri. *B. hyodysenteriae* -laji aiheuttaa sioille sikojen dysenteriaksi kutsutun paksusuolentulehduksen. Sikadysenterian aiheuttamia tappioita syntyy eläinten kuolleisuudesta, kasvun hidastumisesta, rehun käyttökyvyn heikkenemisestä ja lääkityksestä. Myös *B. pilosicoli* ja mahdollisesti myös jotkut *B. intermedia* -kannat voivat aiheuttaa eriasteisia suolistotulehduksia.

MALDI-TOF MS -menetelmän on todettu soveltuvan monen muun eläintauteja aiheuttavien bakteerien identifikaatioon, joten sen käytettävyyttä *Brachyspira*-bakteerien tunnistamiseen haluttiin selvittää. MALDI-TOF MS -menetelmän lisäys *Brachyspira*-diagnoosiikkaan nopeuttaisi ja helpottaisi tulosten saamista huomattavasti.

Opinnäytetyön teoriaosuudessa käsitellään ensin *Brachyspira*-bakteerien patogeenisyyttä ja bakteerin ominaisuuksia. Tämä jälkeen työssä perehdytään nykyisen *Brachyspira*-diagnoosiikkaan ja MALDI-TOF MS -menetelmän periaatteisiin. Työn lopussa selvitetään *Brachyspira*-PCR-testien pystyttämistä ja MALDI-TOF MS:n soveltumista *Brachyspira*-bakteerien identifikaatiossa.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Yleistä

Brachyspira-bakteerit ovat anaerobeja, gram-negatiivisia spirokeettoja, joita on eristetty nisäkkäiden ja lintujen ruoansulatuskanavasta. Virallisesti *Brachyspira*-sukuun on nimetty seitsemän eri lajia: *B. aalborgi*, *B. alvinipulli*, *B. hyodysenteriae*, *B. innocens*, *B. intermedia*, *B. murdochii* ja *B. pilosicoli*. *Brachyspira*-suvussa on myös useita ehdotettuja lajeja, joita ei ole vielä virallisesti nimetty. Eläinlääketieteellisesti merkittävämpiä patogeenisia *Brachyspira*-lajeja ovat *B. hyodysenteria*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia* sekä *B. alvinipulli*. [1, s. 245; 2, s.232.]

Brachyspira-bakteerin patogeeniset lajit aiheuttavat eriasteisia suolistotulehduksia eri eläinlajeille. Toisille eläimille tulehdukset voivat olla hyvinkin vakavia ja toisille lieviä, itsestään parantuvia.

2.2 Sikadysenteria

Sikadysenteria on sioilla esiintyvä paksusuolentulehdus, jonka aiheuttajana on *B. hyodysenteriae*. Kyseinen bakteerilaji vaikuttaa sikojen kuolleisuuteen, aiheuttaa painon laskua, kasvun hitautta ja rehunkäyttökyvyn heikkenemistä. Sikadysenterialla on suuri vaikutus sikatalouteen, ja se on melko yleinen tauti sikatalousmaissa. Sitä myös on havaittu laajalti eri puolilla maapalloa. [4.] Sikadysenterian esiintyvyys Suomessa on melko harvinainen, mutta yksittäistapauksia tulee ilmi ja vuosien välillä on jonkin verran eroja taudin esiintyvyydessä [5].

Sikadysenteriaa esiintyy yleensä 15 - 70 kg:n painoisilla vieroitetuilla porsailla ja lihasioilla, mutta riskiryhmään kuuluvat myös ulkona pidettävät emakot. Tauti aiheuttaa verisen tai kuolioisen paksusuolen tulehduksen. Oireina on lievä tai voimakas limaripuli. Ripuli voi olla tappava tai edetä krooniseksi, joka aiheuttaa sian kuivumista ja kuihtumista, mutta kroonisessa muodossa tauti voi olla myös oireeton. Sikadysenteria voi levitä 90 %:iin vieroitetuista porsaista, ja kuolleisuus voi nousta jopa 30 %:iin. [4.]

B. hyodysenteriae -bakteerilla on erilaisia virulenssitekijöitä. Bakteeri pystyy liikkumaan flagellojen avulla, ja sen tuottamat hemolysiinit vahingoittavat suolen limakalvoja. Tärkeitä virulenssitekijöitä ovat myös NADH-oksidaasin tuotto, joka auttaa kestäämään josain määrin happea, ja *Brachyspira*-bakteerin soluseinän lipo-oligosakkaridit, jotka saavat aikaan endotoksiinivaikutuksen. [3, s. 389.] *B. hyodysenteriae* säilyy melko pitkään ulosteessa, lietelannassa jopa 60 vuorokautta +5 °C:ssa, joten se voi tarttua seuraavaan sikaan feko-oraalisesti. Likaiset työvaatteet ja -kengät voivat kuljettaa *B. hyodysenteriae* -bakteeria sikatiloille. *B. hyodysenteriae* -infektio voi mahdollisesti tarttua myös villijyrsijöiden, lintujen, koirien tai hyönteisten kautta. [4.] Myös emakko voi mahdollisena kantajana tartuttaa pahnueensa *B. hyodysenteriae* -bakteerilla. [2, s. 233.]

Kun *B. hyodysenteriae* on kolonisoitunut sian suolistossa, se vaurioittaa limakalvon soluja ja aiheuttaa ruoan ja veden imeytymishäiriöitä [6, s. 1928]. Ensioireina sikadysenteriaassa on yleensä harmahtava tai kellertävä löysä uloste ja jopa muutaman tunnin kuluttua ensimmäisten oireiden huomaamisesta ulosteen seasta voi löytyä limaa sekä verta. [7, s. 684.] Taudin edetessä eläin kuivuu voimakkaasti ja kroonisessa tapauksessa eläin laihtuu selvästi. Jos alle vieroituskäinen porsas on sairastunut sikadysenteriaan, on oireina limaripulia, mutta ripulissa ei yleensä esiinny verisyyttä. [4.]

Sikadysenteriaa voidaan hoitaa antibiooteilla yksittäisinä tapauksina injeksiolla ja suuremmissa ryhmissä ruoan tai veden seassa. Yleisimmin käytetty antibiootti on tiamuliini. Myös tylosiinia tai linkomysiiniä voidaan käyttää antibioottina herkkyyismäärityksen perusteella. [4.] Suurin osa sioista parantuu taudista muutamassa viikossa. Antibioottihoidot tehoavat hyvin sikadysenteriaan, mutta jos sialla esiintyy jostain syystä ruokahaluttomuutta, jolloin se ei saa antibioottia, voi sian tila huonontua, ja se voi jopa menehtyä tautiin. [7, s. 687.] Sika voi kantaa *B. hyodysenteriae* -bakteeria oireettomana tai sairastumisen jälkeen vähintään 70 vuorokautta. [4.]

2.3 Muita *Brachyspira*-bakteerin aiheuttamia tauteja sioilla

B. hyodysenteriae -bakteerin lisäksi on myös muita *Brachyspira*-lajeja, jotka ovat patogeeneja sioille. Ne aiheuttavat sioille eriasteisia suolistotulehduksia, joiden seurauksena tuottajille aiheutuu taloudellisia tappioita.

B. pilosicoli aiheuttaa sioilla spiroketaaliripulin. Spiroketaaliripulia esiintyy lähinnä kasvatusvaiheen sioilla ruokavalion muutoksen tai vieroituksen jälkeen. Myös *B. pilosicoli* tarttuu siasta toiseen feko-oraalisesti. Alkuvaiheessa oireina on sikojen kyljissä kuopat ja ulosteen vetistyminen, sillä suurimmat vauriot tapahtuvat umpi- ja paksusuolen seinämissä. Myöhemmässä vaiheessa tapahtuu epiteelisolujen eroosiota, jolloin veden ja ravinteiden imeytyminen heikentyy, joten uloste on vetisempää ja mukana voi olla limaa ja vähän verta. Ripuli kestää yleensä 2-14 päivää, ja se loppuu itsekseen, mutta joillakin se voi uusiutua. [7, s. 690 – 691.]

Myös *B. intermedia* -bakteerin jotkin kannat voivat aiheuttavaa kasvavilla sioilla suolistotulehdusta [7, s. 694]. Sioista on eristetty myös *B. murdochii* -bakteeria, jonka jotkut kannat voivat aiheuttaa ripulia [8, s. 338; 6, s. 694]. Myös *B. innocens* -bakteeria on eristetty sioista, mutta sitä ei pidetä patogeenisenä sioille [3, s. 388].

2.4 *Brachyspira* taudinaiheuttajana muille eläimille

B. pilosicoli, *B. intermedia* sekä *B. alvinipulli* aiheuttavat munivilla sekä lihaa tuottavilla kanoilla taudin nimeltä AIS (avian intestinal spirochaetosis). Sitä on todettu Euroopassa, Pohjois-Amerikassa ja Australiassa ja sen uskotaan levinneen ympäri maailmaa. AIS-taudin oireita ovat munantuotannon heikkeneminen ja viivästyminen, kasvun hidastuminen sekä ripuli, joka värjää munan kuoria. Myös eläintarha- ja riistalinnuilla *B. pilosicoli* ja *B. intermedia* aiheuttavat spiroketaaliripulia. *B. innocens* -bakteerin on todettu aiheuttavan munantuotannon heikkenemistä vapaasti liikkuvilla linnuilla. Nanduista on eristetty *B. hyodysenteriae* -bakteeria, joka aiheuttaa niille umpisuolentulehdusta. [1, s. 250 – 252.]

Eri *Brachyspira*-bakteereja on eristetty munintakanoilta, broilereilta, kalkkunoilta, nanduilta, korpeilta, flamingoilta, joutsenilta, metsäkanoilta, hanhilta, vesilinnuilta ja fasaaneilta. On epäselvää, kuinka hyvin eri lintujen *Brachyspira*-kannat tarttuvat eri lajin lintuihin. [1, s. 252.]

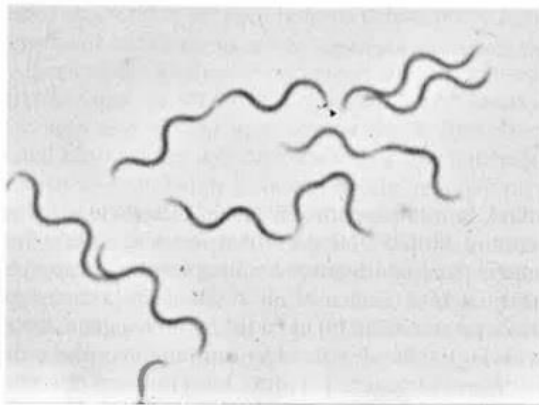
Alle vuoden ikäisistä koirista on eristetty *B. pilosicoli* -bakteeria, joka on aiheuttanut niille kroonista limaripulia. Terveistä ja oireettomista koirista on eristetty *B. murdochii* - ja *B. innocens* -bakteeria. [2, s. 236.] Myös hevosesta on eristetty *B. pilosicoli* -bakteeria tut-

kittaessa mahdollista ripulin aiheuttajaa, mutta lajin ei voida sanoa varmaksi olevan patogeeninen hevosille [10, s. 661]. Apinoista on eristetty *B. aalborgi* - ja *B. pilosicoli*-bakteereja, mutta ne eivät ole aiheuttaneet vakavia tulehduksia eläimelle [2, s. 235 - 236].

Ihmisellä spirokeettakoliittia aiheuttavat *B. pilosicoli* ja *B. aalborgi*. *B. pilosicoli*-bakteeria esiintyy kehitysmaissa paikoissa, jossa on paljon ihmisiä ja huono hygieniataso [1, s. 251.]

2.5 *Brachyspira*-bakteeri

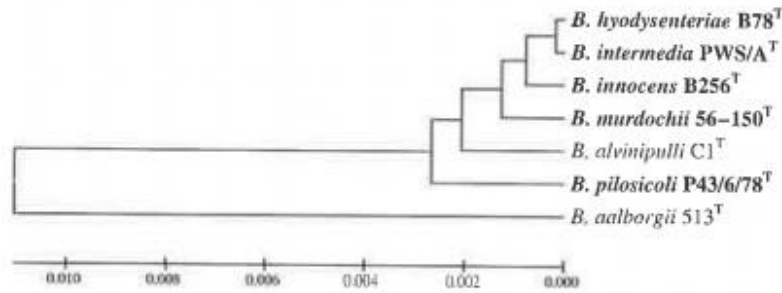
Brachyspira-suvun bakteerit ovat ohuita, melko pitkiä ja löyhästi spiraalin tai S-kirjaimen muotoisia. *B. pilosicoli* on ohuempi ja lyhyempi kuin muut tunnetut *Brachyspirat*, mitä tarvittaessa käytetään hyväksi lajidiagnostiikassa. Kuvassa 1 näkyy *B. hyodysenteriae*-bakteerin spiraalimainen rakenne.



Kuva 1. *B. hyodysenteriae*-bakteerin tarkastelu faasikontrastilla [6, s. 681].

Muiden spirokeettojen tapaan *Brachyspiroilla* on luonnollinen resistenssi rifampisiinia vastaan. *Brachyspira*-bakteerit pystyvät vaivattomasti liikkumaan kiemurtelevalla spiraaliliikkeellä flagellojen avulla, joiden lukumäärä solua kohden vaihtelee eri lajin mukaan 8 ja 30 välillä [1, s. 246].

Suurimmalla osalla *Brachyspira*-bakteereista on myös samankaltaisuutta 16 S rRNA -geenin sekvenssissä, josta voidaan päätellä niiden erottautuneen toisistaan hiljattain [7, s. 680]. Kuvassa 2 näkyy eri *Brachyspira*-lajien jakautuminen 16 S rRNA -geenisekvenssin mukaan.



Kuva 2. Seitsemän virallisesti nimetyn *Brachyspira*-bakteerin sukulaisuus perustuen 16 S rRNA -geenisekvenssiin [6, s. 681].

Eri *Brachyspira*-lajeja erottavat biokemialliset ominaisuudet ovat bakteerin indolintuotto, hippuraatin hydrolyysi, α -galaktosidaasin ja β - sekä α -glukosidaasin aktiivisuus [1, s. 248]. Biokemiallisten testien tulokset kuuden eri *Brachyspira*-bakteerin osalta näkyy taulukossa 1.

Taulukko 1. Kuuden eri *Brachyspira*-lajin biokemiallisten testien tulokset [Muokattu lähteestä 1, s. 248].

Laji	Hemolyysi	Indolin tuotto	Hippuraatin hydrolyysi	α -galaktosidaasi	α -glukosidaasi	β -glukosidaasi
<i>B. hyodysenteriae</i>	Vahva	±	-	-	±	+
<i>B. intermedia</i>	Heikko	+	-	-	+	+
<i>B. murdochii</i>	Heikko	-	-	-	-	+
<i>B. innocens</i>	Heikko	-	-	±	±	+
<i>B. pilosicoli</i>	Heikko	-	+	±	±	-
<i>B. alvinipulli</i>	Heikko	-	+	-	-	+

Anaerobisuudesta huolimatta *Brachyspira*-bakteerit ovat aerotoleranteja, joten niitä voidaan diagnostiikassa tutkia hapellisissa olosuhteissa noin tunnin ajan. Kasvatusmaljalla *Brachyspira*-bakteerit kasvavat himmeänä ja litteänä kasvustona. Ne ovat hitaita kasvaamaan ja tulevat näkyviin maljalla yleensä vasta 2-5 päivän inkuboinnin jälkeen. Verimaljalla *Brachyspira*-bakteerit eivät yleensä aiheuta voimakasta β -hemolyysiä lukuunottamatta *B. hyodysenteriae* -bakteeria, joka on erittäin voimakkaasti β -hemolyyttinen.

Molekyyli tekniset tunnistustavat ovat syrjäyttäneet biokemialliset testit, jotka ovat hitaita ja joiden tulkinta on osittain hankalaa. Yleisesti *Brachyspira*-diagnostiikka perustuu polymeerasiketjureaktioon (PCR), jossa tunnistetaan bakteerin NADH-oksidaasia (*nox*

geeni), 16S rRNA:ta, 23S rRNA:ta tai hemolysiiniä (tlyA-geeni) koodaavaa geeniä. [1, s. 254; 3, s. 391.]

2.6 *Brachyspira*-diagnostiikka

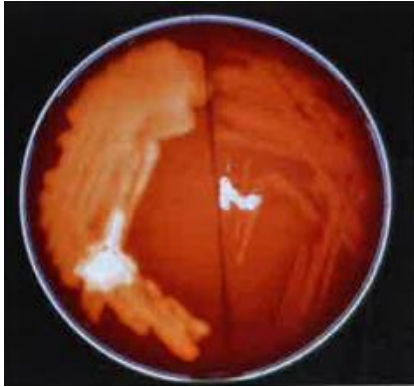
Brachyspira-diagnostiikassa on tärkeää muistaa bakteerin anaerobisuus, jolloin tulee käyttää viljelyssä esipelkistettyjä maljoja ja työskentely bakteerin kanssa ei saisi kestää tuntia kauempaa, jos halutaan jatkoviljellä bakteeria.

Brachyspira-tutkimusta varten näyte otetaan suoraan peräsuolesta suolen limakalvoa pyyhkäisten tai obduktionäytteessä suolen seinämää hangaten. Näytteet tulisi toimittaa viljelyyn viimeistään 48 tunnin kuluttua näytteen ottamisesta anaeroobeille tarkoitetuissa näytteenkuljetuselatusaineessa. Kuljetuslämpötilan tulisi olla mielellään alle 4 °C:ta, mutta näytteitä ei saa pakastaa.

Primääriviljely tehdään viillellylle BA-3-maljalle, joka on voimakkaasti selektoiva, sillä se sisältää kolistiinia, vankomysiiniä ja spektinomysiiniä. BA-3-maljalle on lisätty myös Naribonukleinaattia, hemolyysin edistämistä varten. Primääriviljelyssä käytetään hyväksi *Brachyspira*-bakteerin nopeaa liikkumista agarissa olevissa viilloissa, jolloin se erottuu hyvin hitaammin liikkuvista bakteereista. Kaikki *Brachyspira*-bakteerit tuottavat jonkin verran hemolyysiä lampaan-, naudan-, tai hevosenveriagarilla, mutta erityisen voimakasta se on *B. hyodysenteriae* -lajilla. Yleisesti *Brachyspira*-bakteerit kasvavat maljan päällä tasaisena mattona, mutta *B. hyodysenteriae* -lajilla on taipumusta liikkua viiltojen sisällä ja nousta viiltojen loppupäässä pintaan.

Brachyspira-bakteerit ovat hidaskasvuisia, joten viljelmiä tarkastellaan 2-3 päivän välein. Viljelmää tarkastellaan valoa vasten, jotta mahdollisen hemolyysin erottaa selvästi. Koska *Brachyspira* liikkuu agarissa olevaa viiltoa pitkin, näkyy kasvu ohuena kalvona viillon reunalla aiheuttaen vaihtelevan asteista kirkastumaa viiltoalueella. Hemolyysin aiheuttaneesta pesäkkeestä voidaan katsoa gram-värjäyksen tai faasikontrastin avulla, onko bakteeri spirokeetta ja mahdollinen gram-negatiivinen *Brachyspira*. Kielteisen *Brachyspira*-tuloksen voi antaa vasta kun primäärimaljaa on inkuboitu 12 päivää ja siltä ei ole löydetty *Brachyspira*-bakteereja. Maljoja suositellaan inkuboitavan 40 - 43 °C:n lämpötilassa, mutta voidaan inkuboida myös 37- 38 °C:n lämpötilassa, jolloin niiden kasvu on hitaampaa ja kokonaisinkubointiaika on tällöin 21 vuorokautta. Kontaminantit

voivat tehostaa muiden *Brachyspira*-bakteerien hemolyysiä, joten epäpuhtaalta maljalta ei voi tehdä alustavaa diagnoosia. Epäpuhtaus voi ilmentyä myös tummanharmaina ei-hemolysoivina pyöreinä pesäkkeinä. Bakteerikasvuston puhtauden voi tarkastaa gram-värjäyksellä tai faasikontrastilla. Kuvassa 3 näkyy *B. hyodysenteriae*-bakteerin aiheuttama hemolyysi.



Kuva 3. Vasemmalla *B. hyodysenteriae*-bakteerin aiheuttama hemolyysi ja oikealla *B. innocens*-bakteerin aiheuttama hemolyysi [3, s. 391].

Primäärimaljalta saatu *Brachyspira* viljellään tarvittaessa puhtaaksi, siirrostamalla se tarvittavan monesti uudelleen selektiiviselle maljalle. *Brachyspira*-jatkoviljelyt tehdään runsaasti ravinteita sisältävälle anaerobimaljalle (Fastidious Anaerobes Agar, FAA), jotta saadaan mahdollisimman paljon bakteerimassaa jatkotutkimuksia varten. Jatkosiirrostus tehdään aina mahdollisimman etäältä primääriviljelykohtaa ja samalla tehdään bakteerin puhtauden tarkastus. *Brachyspira*-bakteerin puhtaus tarkastetaan joko gram-värjäyksellä tai faasikontrastilla.

Brachyspira-diagnoosissa lajintunnistus perustuu pääosin lajispesifiseen PCR:ään ja osittain bakteerin hemolyysin vahvuuteen. Evirassa on käytössä *B. hyodysenteriae* -, *B. intermedia* - ja *B. pilosicoli* -bakteerille omat PCR-menetelmät. *B. hyodysenteriae* -, *B. pilosicoli* - ja *B. intermedia* -bakteerien PCR perustuu Evirassa 23S-geenin tunnistamiseen, mutta *B. hyodysenteria* -bakteeria voidaan tunnistaa myös tlyA-geenin kautta. *B. hyodysenteriae* -bakteeriepäilylle tehdään ensin tlyA-PCR, jos näyte antaa positiivisen tuloksen näytteen positiivisuus varmistetaan *B. hyodysenteriae* -bakteerille tarkoitetulla 23S-PCR:llä. PCR-templaattit tehdään primäärimaljalta heti, kun kasvua on tarpeeksi diagnoosin nopeuttamisen vuoksi, sillä PCR:ssä ei bakteerikasvuston tarvitse olla täysin puhdasta. Ennen templaatteja tehdään mahdolliset jatkoviljelyt. *B. hyodysenteriae* - ja

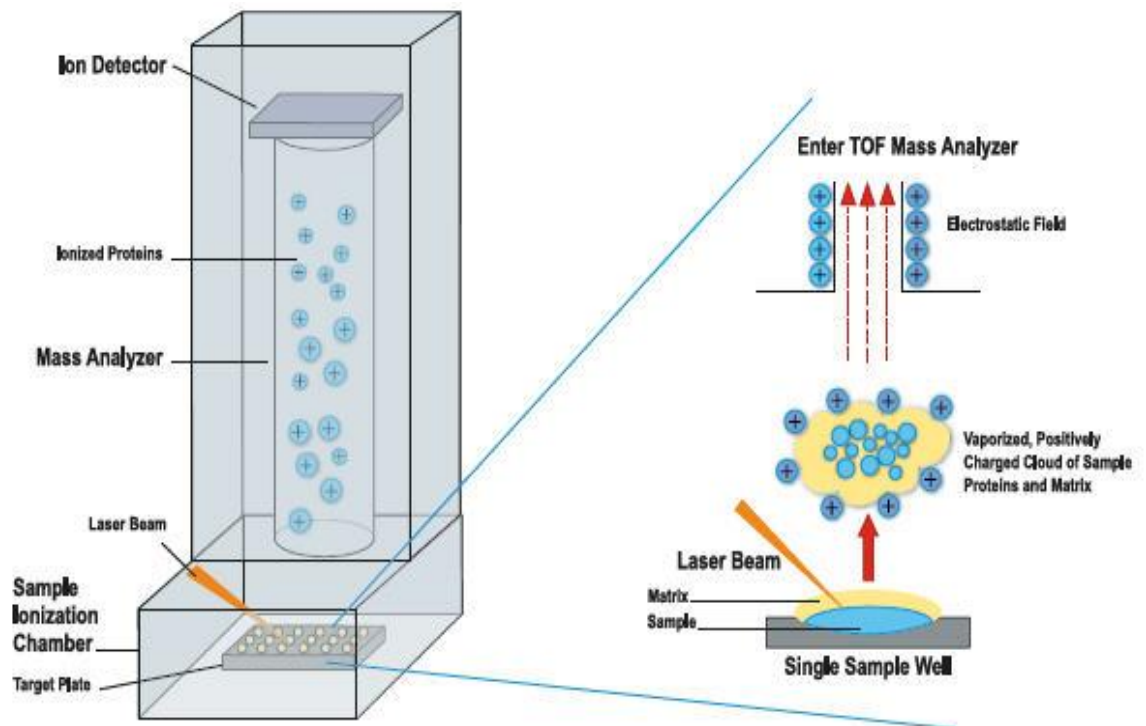
B.pilosicoli -bakteerille voidaan tehdä myös antibioottiherkkyyshmääritykset puhdaskasvustoista.

Virhelähteinä diagnostiikassa voi olla näytteen saapuminen ilman kuljetuselatusainetta, tai kuljetusaika on ollut liian pitkä, jolloin jo mahdollinen *Brachyspira* on kuollut matkalla. Jos tutkittu eläin on jo lääkitty, mahdollinen patogeeni voi jäädä löytymättä. Jos näyte on otettu virheellisesti ohutsuolesta, ei *Brachyspira*-bakteeria löydy. Jotkut kannat ovat herempiä hapelle kuin toiset ja tuntikin aerobioloissa voi olla liikaa.

2.7 MALDI-TOF MS

Bakteerikantojen tunnistuksessa yleistymässä oleva menetelmä on MALDI-TOF MS (matriisiavusteinen laserdesorptio/ionisaatio-lentoaika-massaspektrometria), joka perustuu bakteerin hyvin runsaan ja konservoituneen lähinnä ribosomaalisen proteiini koostumuksen mittaamiseen. Erikokoisten proteiinimolekyylien massoja ja määriä mitataan alueella 2000 - 20000 m/z, sillä siinä ei ole juurikaan muita häiritseviä metabolitteja. MALDI-TOF MS muodostaa tunnistettavan bakteerikannan eripainoisten proteiinimolekyylien määristä massaspektrin, jota verrataan laitteen bakteerikirjastoon ja jonka avulla tutkittava bakteeri mahdollisesti tunnistetaan. Menetelmä on biokemiallisiin ja biomolekulaarisiin testeihin verrattuna yksinkertaisempi, nopeampi ja edullisempi [11, s. 635].

MALDI-TOF MS -menetelmässä tärkeässä osassa on matriisi, joka on yleensä heikkoa orgaanista happoa. Matriisia pipetoidaan näytelevyllä olevan ohuen näytematon päälle, jolloin se kuivuessaan kiteyttää näytteen itseensä. Matriisissa oleva happo uutaa bakteerista proteiinit. [12, s. 15 - 16.] Kiteytyneeseen matriisinäyteteseokseen osoitetaan UV-laserilla, jolloin matriisi absorboi suurimman osan energiasta ja ionisoi näytteen proteiinimolekyylit. Ionisoituneet molekyylit sekä osa matriisista höyrystyvät ja ne kiihdytetään ensin elektrostaattisen kentän läpi TOF MS -putkeen (Time Of Flight-Mass Spectrometry) eli lentoaika-analysointilaiteeseen. Ionisoitumisen ansiosta proteiinimolekyylit sisältävät saman energiamäärän, jolloin ne kulkevat lentoaika-analysointilaiteessa vain molekyylimassansa perusteella kohti detektoria [kuva 4]. [13.] Kevyemmät molekyylit kulkevat painavampia nopeammin. Laite laskee detektorille saapuneiden proteiinimolekyylien lentoaikojen perusteella niiden painon ja eripainoisten molekyylien määrän, joiden perusteella se muodostaa näytteen massaspektrin. Mitä enemmän näytteessä on tietynpainoisia molekyylejä, sen korkeampi piikki muodostuu massaspektriin. [12, s. 16.]



Kuva 4. MALDI-TOF MS -laitteen toimintaperiaate [13].

Bakteerin proteiineista tullut massaspektri on hyvin spesifinen ja melkein yhtä tarkka kuin genomien sekvenssit. Laite laskee ja pisteyttää spektrin heti mittauksen jälkeen sen mukaan, kuinka samanlainen se on ollut kirjaston spektreihin verrattuna. Saatujen pisteiden perusteella voidaan määrittää bakteerin tunnistustarkkuus. Tunnistuspisteytys näkyy alla olevassa taulukossa 2.

Taulukko 2. MALDI-TOF MS -laitteen pisteytys tunnistustasoon nähden.

Tunnistustarkkuus	Pistemäärä
Hyvin todennäköinen lajitunnistus	2.300 - 3.000
Varma sukutunnistus ja todennäköinen lajitunnistus	2.000 - 2.299
Todennäköinen sukutunnistus	1.700 - 1.999
Epävarma tunnistus	0 - 1.699

Käytännössä todennäköisesti luotettavaksi lajitunnistuksen pistemääräksi luetaan pistemäärä, joka on ≥ 2 [15, s. 275].

MALDI-TOF MS -laitteiden kirjastot on alun perin suunnattu ihmispatogeenien tunnistamiseen, joten kirjastosta puuttuu useita eläinlääketieteellisesti merkittäviä bakteerisukuja ja -lajeja. Myös Evirassa käytössä oleva MALDI-TOF MS -laite (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics) on suunnattu parhaiten ihmispatogeenien tunnistukseen, mutta kirjastoa on vähitellen itse laajennettu merkittäväällä riittävän varmasti karakterisoitujen eläinpatogeenien bakteereiden spektreillä. Taulukossa 3 näkyy Eviran MALDI-TOF MS -laitteen kirjastossa valmiina olevat ja sinne aiemmin Evirassa lisätyt *Brachyspira*-kannat.

Taulukko 3. Eviran MALDI-TOF MS -laitteessa olevat *Brachyspira*-kannat.

	<i>Brachyspira</i>-laji	Tunniste
Laitteen omassa kirjastossa olevat kannat	<i>B. innocens</i>	AN3706 90 AHVLA
	<i>B. innocens</i>	C190 AHVLA
	<i>B. intermedia</i>	AN1707 96 AHVLA
	<i>B. intermedia</i>	AN519 97AHVLA
	<i>B. intermedia</i>	AN621 97 AHVLA
	<i>B. intermedia</i>	AN885 94 AHVLA
	<i>B. murdochii</i>	DSM 12563T DSM
	<i>B. pilosicoli</i>	AN652 02 AHVLA
	<i>B. pilosicoli</i>	C162 AHVLA
	<i>B. pilosicoli</i>	GD82 GDD
	<i>B. pilosicoli</i>	GD83 GDD
Evirassa aiemmin lisätyt kannat	<i>B. alvinipulli</i>	ATCC 51933
	<i>B. hyodysenteriae</i>	ATCC 27164
	<i>B. hyodysenteriae</i>	ATCC 31212
	<i>B. hyodysenteriae</i>	ATCC 49526
	<i>B. hyodysenteriae</i>	ATCC 49887
	<i>B. innocens</i>	ATCC 29796
	<i>B. intermedia</i>	ATCC 51140
	<i>B. murdochii</i>	ATCC 00173
	<i>B. pilosicoli</i>	ATCC 51139

Brachyspira-bakteereja on aiemmissa tutkimuksissa tunnistettu MALDI-TOF MS:n perusteella, mutta niissä on ensin laitteen kirjaston puutteellisuuden takia laajennettu ensin kirjastoa useilla *Brachyspira*-lajeilla [11, s. 637; 14, s. 293; 15, s. 275].

2.8 MALDI-TOF MS -menetelmä

MALDI-TOF MS -menetelmässä on tärkeää, että bakteerikasvusto on puhdasta, jotta laite voi tunnistaa bakteerin. Joten ennen bakteerimassan siirrostusta näytelevylle, täytyy varmistua bakteerikasvuston puhtaudesta esimerkiksi faasikontrastin tai gram-värijäyksen avulla. Näyte otetaan yksittäisestä pesäkkeestä, jos bakteerin kasvutapa on muodostaa pesäkkeitä. Bakteereilla, joiden kasvutapa on leviävä, on kasvuston puhtaus vaikeampi varmistaa, koska ei saada yksittäisestä pesäkkeestä tehtävää puhtasviljelmää tai MALDI-TOF MS -mittausta. Bakteerista täytyy olla myös mahdollisimman tuore viljelmä, sillä mitä tuoreempi bakteerikasvusto sen parempi tunnistustulos.

MALDI-TOF MS -menetelmässä bakteerikannan tunnistus tapahtuu yleensä suoralla menetelmällä, jossa maljalta otettua puhdasta bakteerimassaa levitetään ohuena kerroksena näytelevyn päälle kahteen näytepisteeseen. Tämän jälkeen näytekerron päälle pipetoidaan näytematriisia, jonka kuivuttua näyte on valmis mitattavaksi.

Menetelmässä voidaan myös bakteerin suoran mittauksen lisäksi uuttaa tai pikauuttaa bakteeri, joka lisää sen tunnistustarkkuutta. Se tehdäänkin yleensä, jos suoralla mittauksella ei saada riittävää tulosta. Uttomenetelmät tehostavat bakteerisolujen hajoamista ja siten mahdollistavat paremmin haluttujen proteiinien irrottamista, joka parantaa näytteen tunnistustulosta. Pikauutossa bakteerimassasta uutetaan proteiini näytelevyllä pipetoimalla 70 prosentista muurahaishappoa suoraan ohuen näytekerron päälle ja pipetoidaan matriisia lopuksi näytteen päälle muurahaishapon kuivuttua. Uutossa veteen sekoitettua bakteerimassaa käsitellään etanolilla ja itse uutto tapahtuu muurahaishapon ja asetonitriilin avulla. Muurahaishappo-asetonitriiliseokseen liuennutta bakteerin proteiinia pipetoidaan näytelevylle ja sen kuivuttua päälle pipetoidaan matriisiliuosta. Bakteerin uutossa kestää ajallisesti kauemmin kuin pikauutossa, mutta se lisää bakteerin tunnistustarkkuutta.

Virhelähteinä menetelmässä voi olla bakteerin sekakasvusto tai näytteen liian paksu leivitys näytelevylle. Myös bakteerin ikä vaikuttaa tunnistuksen tarkkuuteen. Vanhasta bakteeriviljelmästä otettu näyte tunnistuu huonommin kuin tuoreesta viljelmästä otettu.

3 Kokeellinen osuus

MALDI-TOF MS on nostanut suosiotaan bakteerien tunnistamisessa menetelmän nopeuden, tarkkuuden ja edullisuuden ansiosta. MALDI-TOF MS helpottaisi *Brachyspira*-diagnoosiikkaa, ja kustannukset olisivat pienemmät PCR-testeihin verrattuna. Yhtenä osana työssä oli selvittää, kuinka hyvin MALDI-TOF MS soveltuu tällä hetkellä *Brachyspira*-bakteerien lajitason tunnistamiseen.

Eviran Seinäjoen toimipaikasta siirtyi töiden uudelleenjärjestelyn takia sikojen ripulitutkimukset Helsinkiin. *Brachyspira*-tutkimus kuuluu osana ripulitutkimuspakettiin. Evirassa tehdään lajitason diagnoosiikkaa kolmelle eri *Brachyspira*-bakteerille; *B. hyodysenteriae* -, *B. intermedia* - ja *B. pilosicoli* -bakteerille, sillä ne ovat mahdollisia taudinaiheuttajia. *B. hyodysenteriae* -bakteeria on näistä kolmesta tärkein taudinaiheuttaja, sen aiheuttaman taudin vakavuuden ja taloudellisen merkityksen takia. Opinnäytetyön toisena tavoitteena on validoida *Brachyspira*-diagnoosiikkaan kuuluvien PCR:ien pystyttämismvaiheet Eviran Helsingin laboratoriojaostoon.

3.1 PCR-testien validoinnissa käytetyt materiaalit

Brachyspira-PCR-testien validointi tapahtui vertaamalla keväällä 2015 tulleiden näytteiden PCR-tuloksia Eviran Seinäjoen ja Helsingin yksiköiden välillä.

Brachyspira-tutkimuksiin tuli keväällä 2015 näytteitä sikadysenterian varalta, jolloin näytteestä tutkittiin vain *B. hyodysenteriae*. Lisäksi laboratorioon tuli asiakkaiden lähettämiä ulostenäytteitä ripulia sairastavista sioista tai Evirassa tehdyistä raadonavauksista suolinäytteitä, joista tutkittiin kaikki kolme *Brachyspira*-lajia. Näytteiden mukana tuli lähetteen, joissa kerrottiin, mitä tutkimuksia eläimistä halutaan ja kuinka monta näytettä samalta tilalta tuli. Evirassa tehdyistä raadonavauksista näytteet tulivat yleensä eliminä ja muualta tulleet näytteet tulivat anaerobeille tarkoitetuissa kuljetuselatusaineputkissa.

Näytteitä tuli yhteensä 285 kappaletta, josta 212 kantaa tutkittiin PCR-testillä. Taulukossa 4 näkyy, kuinka monta lähetettä tuli minkäkin tutkimussyyn takia ja montako näytettä oli lähetteen mukana.

Taulukko 4. PCR-tulosten vertailuajalla tulleet lähetteen ja näytteet.

Lähetteen syy	Lähetteen määrä, kpl	Näytteitä per lähete, kpl	PCR-testillä tutkittujen näytteiden määrä, kpl
Sikadysenterian varalta	6	30	107
Sairauden syyn selvitys	3	2	6
	3	3	9
	2	4	8
	5	5	25
	2	6	12
	3	9	27
Eviran raadonavauksista tulleet näytteet	4	1	4
	1	2	2
	1	3	3
	1	9	9

Brachyspira-bakteerien viljelemisessä ja tunnistamisessa tarvittiin mikrobiologista perusvälineistöä sekä anaerobikolveja ja -kehittämiä. Primääriviljelyä varten tarvittiin manuaalinen viiltolaite ja faasikontrolleja varten hioksettomia objektilaseja. *Brachyspira*-menetelmän eri vaiheissa käytetyt reagenssit ja laitteet on lueteltu liitteessä 1.

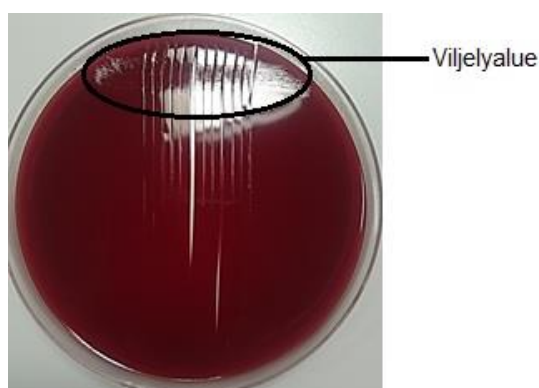
Kaikkien kolmen tutkittujen *Brachyspira*-bakteerien alukkeet näkyvät taulukossa 5.

Taulukko 5. *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* ja *B. intermedia* PCR-alkukeet.

<i>Brachyspira</i>	Geeni	Sekvenssi
<i>B. hyodysenteriae</i>	tlyAf	5`-GCA GAT CTA AAG CAC AGG AT-3`
	tlyAr	5`-GCC TTT TGA AAC ATC ACC TC-3`
<i>B. pilosicoli</i>	23 S S-IVf	5`-AGG TGA TGG TTA TCC TC-3`
	23 S S-IVr	5`-AAC CTT AGG AAT TAT TTC TAA-3`
<i>B. intermedia</i>	23 S S-IIf	5`-CCG TTG AAG GTT TAC CGT G-3`
	23 S S-IIr	5`-CGC CTG ACA ATG TCC GG-3`
<i>B. hyodysenteriae</i>	23 S S-I	5`-CGG TAA GTG ATG TAC TTG-3`
	23 S S-Ir	5`-AGC CTC AAC CTT AAA GA-3

3.2 *Brachyspira*-menetelmän suoritus

Primääriviljely aloitettiin viiltämällä BA-3-maljalle yhdensuuntaisia viiltoja viiltolaitteella tai käsin tehtynä noin 0,5 cm:n välein. Viillellylle BA-3-maljalle viljeltiin näyte sivelemällä näytetikkoa viiltojen toiseen päähän kohtisuoraan viiltoihin nähden. Obduktionäytteestä siirrostettiin viljelysilmukalla bakteerimassaa viivan muotoon maljalle. Maljat laitettiin anaerobikolviin inkuboitumaan 42 °C:een. Esimerkkiviljely viillellylle BA-3-maljalle näkyy kuvassa 5.



Kuva 5. *Brachyspira*-näytteen primääriviljely viillellylle BA-3-maljalle.

Maljoja luku tapahtui aikaisintaan 2 – 3 vuorokauden inkuboitumisen jälkeen. Jos mahdolliset *Brachyspira*-bakteerit olivat kasvaneet, voitiin ottaa mahdolliset jatkoviljelyt ja

templaatit PCR:ää varten. Jos bakteerikasvustoa ei ollut muodostunut, jatkettiin inkubointia. Hemolyysin aiheuttaneista bakteeripesäkkeistä katsottiin faasikontrastin tai gram-värijäyksen avulla *Brachyspira*-bakteerin mahdollisuus primääri viljelyssä. Faasikontrastissa laitettiin tippa vettä objektilasin päälle, johon siirrostettiin bakteerimassaa ja sen päälle laitettiin peitinlasi, jonka jälkeen sitä tarkasteltiin faasikontrastimikroskoopilla ja etsittiin mahdollista spirokeettaa ja arvioitiin bakteeriviljelmän puhtautta. Ennen PCR-templaatin tekoa tehtiin mahdolliset jatkoviljelyt hajoitusviljelynä FAA-maljalle. Jos haluttiin saada puhdas bakteerikasvusto, voitiin viljellä uudelleen FAA-maljalta seuraavalle, kunnes kasvusto todettiin puhtaaksi faasikontrastilla tai gram-värijäyksellä. Jatkoviljelyt inkuboitiin myös 42 °C:ssa anaerobiolosuhteissa.

PCR-templaatit tehtiin yleensä primäärimaljoista. Templaatteja varten tehtiin 0,5 McFarlandin vahvuinen suspensio siirrostamalla pumpulipuikolla näytemaljalta bakteerimassaa 2 ml:aan steriiliä vettä. Jos tehtiin *B. hyodysenteriae* -PCR:ään templaatteja, kaiveltiin viiltojen sisältä bakteerimassaa, sillä se liikkuu usein agarin sisällä. Muiden *Brachyspira*-bakteerien PCR-templaatteihin voitiin ottaa bakteerimassa agarin päältä. Bakteerisuspensiosta pipetoitiin kannesta rei'itettyyn 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen 0,5 ml, joka siirrettiin 100 °C:een lämpöblokkiin 10 minuutiksi. Negatiivista kontrollia varten tehtiin myös yksi templaatti, joka sisälsi vain vettä. Positiivisten kontrollien templaatit olivat valmiiksi pakastettuna, joten niitä ei tarvinnut tehdä joka kerta erikseen.

PCR:n mastermix tehtiin jokaiselle kolmelle tutkittavalle *Brachyspira*-bakteerille erikseen. Templaatti lisättiin mastermixiin eri tilassa kuin missä mastermix oli tehty. Eri mastermixien ja templaatin lisäyksen pipetointiohjeet yhdelle reaktiolle näkyvät taulukossa 6.

Taulukko 6. Mastermixit eri *Brachyspira*-bakteereille, taulukossa Primer = aluke.

Brachyspira	Reagenssi	Konsent- raatio	1 x 25 µl reaktiutilavuus	
			Loppukon- sentraatio	Tilavuus (µl/reaktio)
23 S <i>B. pilosicoli</i> , 23 S <i>B. interme- dia</i> ja 23 S <i>B. hyodysen- teriae</i>	Steriili vesi	-	-	15,55 µl
	Buffer for DyNAzyme II	10 x	1 x	2,5 µl
	dNTP mix	10 µM	0,2 µM	0,5 µl
	primer F (<i>B. pilosicoli</i> 23S S-IVf/ <i>B. intermedia</i> 23S S-IIf)	10 µM	0,25 µM	0,625 µl
	primer R (<i>B. pilosicoli</i> 23S S-IVr/ <i>B. intermedia</i> 23S S-IIr)	10 µM	0,25 µM	0,625 µl
	DyNAzyme II DNA polymerase	2 U/µl	0,04 U	0,2 µl
	Templaatti	-	-	5 µl
tlyA <i>B. hyodysen- teriae</i>	steriili vesi	-	-	15,1 µl
	Buffer for DyNAzyme II	10 x	1 x	2,5 µl
	dNTP mix	10 µM	0,2 µM	0,5 µl
	primer F (<i>B. hyodysen- teriae</i> tlyAf)	10 µM	0,28 µM	0,7 µl
	primer R (<i>B. hyodysen- teriae</i> tlyAr)	10 µM	0,28 µM	0,7 µl
	DyNAzyme II DNA polymerase	2 U/µl	0,04 U	0,5 µl
	Templaatti			5 µl

Jokaisessa PCR:ssä oli mukana positiivisia ja negatiivisia kontrolleja sekä 0-näyte. Evi-rassa käytetyt positiiviset kontrollit olivat *B. hyodysenteriae* -bakteerille ATCC 49887-kanta, *B. pilosicolille* -bakteerille ATCC 51139T-kanta ja *B. intermedialle* -bakteerille ATCC 51140-kanta. Negatiivisena kontrollina käytettiin kahden muun *Brachyspira*-bakteerin positiivista kontrollia ja 0-näytteenä näytteiden kanssa samasta vedestä valmistetua pelkkää vettä sisältävää näytettä.

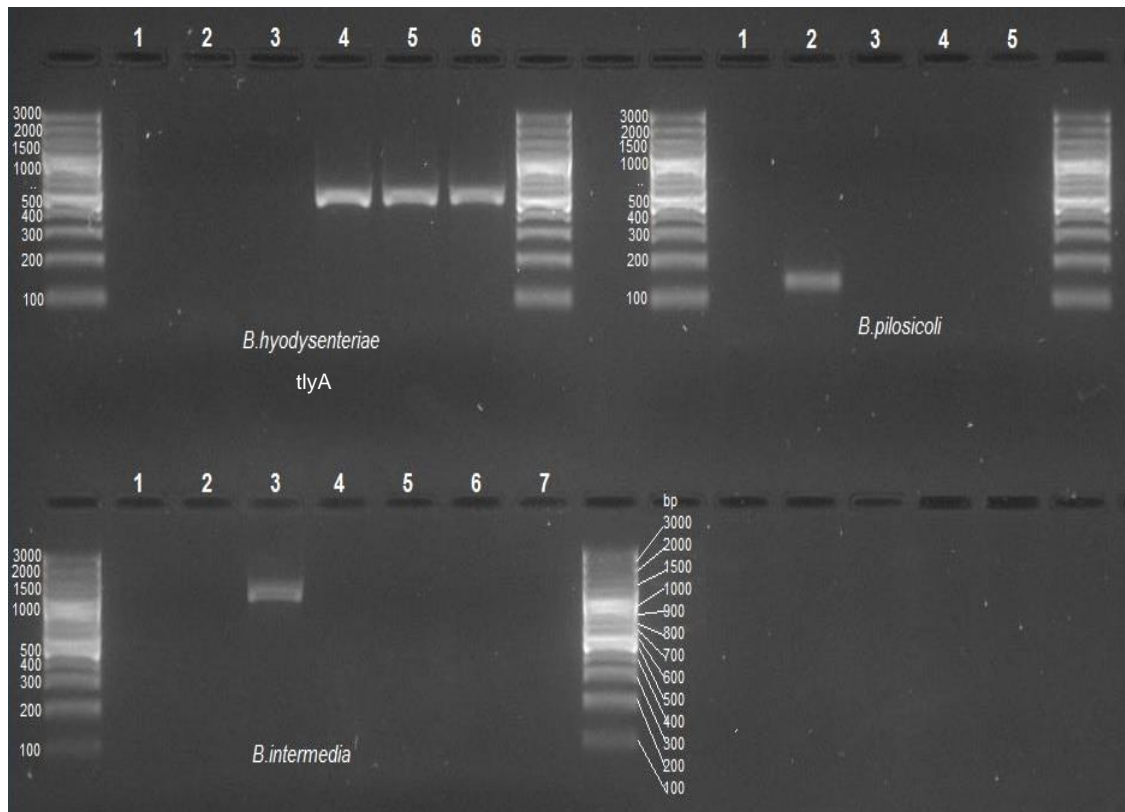
B. hyodysenteriae, *B. intermedia* ja *B. pilosicoli* ajettiin kaikki omilla PCR-ohjelmilla. Eri PCR-ohjelmat kullekin tutkittavalle *Brachyspira*-bakteerille näkyvät taulukossa 7.

Taulukko 7. *B.hyodysenteriae* -, *B.pilosicoli* - ja *B.intermedia* -bakteerin PCR-ohjelmat.

tlyA B. hyodysente- riae	Vaihe	1	2	3	4	5	6
	Lämpö- tila	95 ° C	95 ° C	58 ° C	72 ° C	72 ° C	10 ° C
	Aika	5 min	30 s	30 s	30 s	7 min	∞
			30 sykliä				
23 S B. pilosicoli	Vaihe	1	2	3	4	5	6
	Lämpö- tila	94 ° C	92 ° C	45 ° C	75 ° C	75 ° C	10 ° C
	Aika	1 min	40 s	40 s	1 min	5 min	∞
			34 sykliä				
23 S B. intermedia	Vaihe	1	2	3	4	5	6
	Lämpö- tila	94 ° C	92 ° C	60 ° C	75 ° C	75 ° C	10 ° C
	Aika	1 min	40 s	40 s	1 min	5 min	∞
			36 sykliä				
23 S B. hyodysente- riae	Vaihe	1	2	3	4	5	6
	Lämpö- tila	94 ° C	92 ° C	45 ° C	75 ° C	75 ° C	10 ° C
	Aika	1 min	40 s	40 s	1 min	5 min	∞
			31 sykliä				

B. pilosicoli -23 S- ja *B. hyodysenteriae* tlyA-PCR ajettiin 2 %:lla agarosigeelielektrofooresilla (AGE), joka oli tehty 1x TBA-puskuriin ja johon oli lisätty SYBRSafe-reagenssia 10 µl 100 ml:n agarია. *B. intermedia* -23 S- ja *B. hyodysenteriae* -23 S-PCR ajettiin 1 %:lla AGE:lla. Näytteisiin lisättiin 6 µl DNA-latauspuskuria ja kutakin näytettä pipetoitiin 20 µl omaan kuoppaansa geelillä. Molekyylikokostandardia lisättiin kunkin rivin ensimmäiseen ja viimeiseen kuoppaan 10 µl ja sen jälkeen AGE:a ajettiin 100 V:lla 45 minuuttia.

Brachyspira-diagnoosissa PCR-tulos oli hyväksyttävä, jos AGE-geelillä näkyivät positiiviset kontrollit (*B. hyodysenteriae* tlyA 526 bp, *B. pilosicoli* 23 S 143 bp, *B. intermedia* 23 S 1027 bp ja *B. hyodysenteriae* 23 S 1301 bp) positiivisena. Hyväksytyyn tulokseen vaadittiin myös, että negatiiviset kontrollit olivat negatiivisia. Positiivisesta kontrollista ja varsinaisesta näytteestä tulee monistua PCR-reaktiossa vain yksi spesifinen tuote. Esi-merkki hyväksytyistä PCR-tuloksista AGE-geelillä näkyy kuvassa 6.



Kuva 6. AGE-geeli. Ylhäällä vasemmalla *B. hyodysenteriae* -tlyA-PCR, Ylhäällä oikealla *B. pilosicoli* -23 S-PCR ja alhaalla vasemmalla *B. intermedia* -23 S-PCR. Kaivoista 1=0-näyte, 2=*B. pilosicoli* -kontrolli, 3=*B. intermedia* -kontrolli, 4=*B. hyodysenteriae* -kontrolli, 5-7=näytteitä.

3.3 Materiaalit MALDI-TOF MS -menetelmään

Työssä tutkittiin *B. hyodysenteriae*-, *B. intermedia*- ja *B. pilosicoli* -lajien tunnistumista MALDI-TOF MS -menetelmällä. Käytetyt kannat oli eristetty Evirassa sikojen näytteistä ja kantojen lajimääritys oli tehty PCR-menetelmällä. Työssä käytetyt eri *Brachyspira*-lajien kannat näkyvät taulukossa 8.

Taulukko 8. MALDI-TOF MS -menetelmässä käytetyt *Brachyspira*-lajit ja -kannat.

Laji	<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. intermedia</i>	<i>B. pilosicoli</i>
Kanta	BRA 3292	BRA 3220	BRA 3490
	BRA 3301	BRA 3223	BRA 3491
	BRA 3303	BRA 3230	BRA 3492
	BRA 3304	BRA 3233	BRA 3493
	BRA 3305	BRA 3238	BRA 3495
	BRA 3313	BRA 3244	BRA 3496
	BRA 3330	BRA 3245	BRA 3497
	BRA 3347	BRA 3263	BRA 3499
	BRA 3348	BRA 3265	BRA 3500
	BRA 3349	HBAK 2995	BRA 3502
		HBAK 3001	HBAK 3171
		HBAK 3486	HBAK 3073
		HBAK 3191	HBAK 3081
		HBAK 3195	HBAK 3184
		HPBA 503	HBAK 3189
		HPBA 504	HBAK 3094
		HPBA 505	HPBA 512
		HPBA 506	HPBA 513
			HPBA 516
			HPBA 517

Taulukossa 9 näkyy suorassa- ja uuttomenetelmässä käytettyjen reagenssien tiedot ja valmistajat.

Taulukko 9. MALDI-TOF MS suora- ja uuttomenetelmissä käytetyt reagenssit.

Menetelmä	Reagenssi
Suora (Matriisin valmistus)	HCCA, portioned (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid), Lot.0000224342, Burker Daltonik GmbH
	ultrapuhdas vesi
	TFA (trifluoro Acid), Cas. 75-05-1, Lot. STBD6929V, Sigma Aldrich
Uutto	Matriisi sama kuin suorassa
	FA (Formic acid), Cas. 64-18-6, Lot. SZBD0590V), Sigma Aldrich
	Asetonitrili, Cas. 75-05-8, Lot. SZBD23AV, Sigma Aldrich
	Etax 99,5 paino- %, Altia

3.4 MALDI-TOF MS -menetelmän suoritus

Mittausta varten viljeltiin *B. hyodysenteriae*-, *B.intermedia*- ja *B. pilosicoli* -kannat esipelkistetyille FAA-maljoille. Bakteerit olivat kaikki inkuboituneet kaksi päivää mittausta tehdessä. Materiaaleina bakteerinäytteiden käsittelyssä tarvittiin bakteerimassan levitykseen näytelevylle hammastikkuja.

Matriisin valmistusta varten tehtiin ensin Standart Solvent-liuos (SS-liuos), joka sisälsi 25 μ l trifluorihappoa (TFA) ja 500 μ l asetonitriliä. HCCA- eli α -syaani-4-hydroksikanelihappo-matriisiputkeen lisättiin 250 μ l tehtyä SS-liuosta ja seosta sekoitettiin Vortexin avulla niin kauan, kunnes siinä ei ollut näkyviä kiteitä. Kirkas liuos oli valmis matriisi.

Menetelmän suorituksessa tehtiin kaikille näytteille aina rinnakkaismääritykset. Suorassa mittauksessa puhdasta bakteerimassaa siirrettiin hammastikulla pieni määrä näytelevyllä olevien rinnakkaisten mittauskohtien päälle tasaiseksi ja ohueksi kerrokseksi. Bakteerimassan päälle pipetoitiin 1 μ l matriisiliuosta. Matriisin kuivuttua näyte oli mittausvalmis. Kuvassa 7 näkyy näytelevyllä mittausvalmiita kuivuneita bakteerimassa-matriisi-seoksia.



Kuva 7. MALDI-TOF MS:n näytelevyllä olevia mittausvalmiita näytepisteitä.

MALDI-TOF MS -mittaukset suoritettiin ensin kaikille *Brachyspira*-kannoille suoralla mittauksella. Jos ensimmäisellä mittauksella ei tullut tunnistuksia, tehtiin bakteerille uusi suora mittaus. Jos tunnistusta ei saatu tulemaan suoralla mittauksella, tehtiin bakteerille uutto.

Bakteerin uutossa pipetoitiin 300 µl ultrapuhdasta vettä Eppendorf-putkeen, johon siirrostettiin noin 1 µl siirrostussilmukan verran puhdasta bakteerimassaa. Vesibakteeriseokseen lisättiin 900 µl etanolia ja seosta sekoitettiin Vortexissa 1 minuutin ajan. Seos sentrifugoitiin 2 minuutin ajan 13 000 rpm:ssä. Tämän jälkeen seoksesta poistettiin supernatantti ja sentrifugoitiin uudestaan 2 minuuttia 13 000 rpm:ssä. Toisen sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin pipetillä ja näyteputken annettiin seistä kansi auki laminaarikaapissa 2 minuuttia, jolloin loputkin etanolit haihtuivat ja putkeen jäi vain sentrifugissa syntynyt pelletti. Näytepelletin koosta riippuen lisättiin 70 % muurahaishappoa (FA) 10–30 µl:a ja inkuboitiin näytettä huoneen lämmössä kansi kiinni 2-3 minuuttia. Tämän jälkeen lisättiin muurahaishappoa vastaava määrä asetonitriliä ja sekoitettiin seosta Vortexilla tai pipetillä tasaiseksi suspensioksi. Näytettä sentrifugoitiin vielä 2 minuuttia 13 000 rpm:ssä, jonka jälkeen supernatanttia pipetoitiin 1 µl näytelevyn mittauskohdan päälle. Supernatantin annettiin kuivua ja päälle lisättiin 1 µl matriisia. Matriisin kuivuttua oli näyte mittausvalmis.

Valmiit kuivat näytelevyt voitiin mitata MALDI-TOF MS -laitteella laittamalla näytelevy koneen sisään ja kirjaamalla ajo-ohjelmaan näytepisteiden tiedot ja aloittamalla mittaus. MALDI-TOF MS -laitteena oli Bruker Daltonicsin Microflex, joka näkyy kuvassa 8.



Kuva 8. Evirassa käytössä oleva MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics Microflex

4 Tulokset

4.1 *Brachyspira*-PCR-testien pystytys

Brachyspira-menetelmään sisältyvien PCR-testien pystyttämisen onnistumista arvioitiin vertaamalla Helsingin laboratoriojaoston saamia tuloksia Seinäjoen toimipaikan saamiin tuloksiin. Taulukossa 10 näkyvät Helsingin ja Seinäjoen yksikön rinnakkaiset *Brachyspira*-PCR-tulokset.

Taulukko 10. Helsingin ja Seinäjoen yksikön rinnakkaiset *Brachyspira*-PCR-tulokset.

Tulos	Seinäjoki, kpl	Helsinki, kpl
<i>B. hyodysenteriae</i> -bakteeria ei todettu	107	107
<i>Brachyspira</i> sp.	34	34
<i>B. intermedia</i>	18	18
<i>B. pilosicoli</i>	12	12
<i>Brachyspira</i> -bakteeria ei todettu	41	41
yht.	212	212

4.2 MALDI-TOF MS -menetelmän tulokset

Työssä tutkittiin MALDI-TOF MS -menetelmällä yhteensä 48 eri *Brachyspira*-kanta, joista 10 oli *B. hyodysenteriae* -lajia, 20 oli *B. pilosicoli* -lajia ja 18 oli *B. intermedia* -lajia. Kaikille kannoille tehtiin suora mittaus. Uuttokäsittely ennen mittausta tehtiin niille kannoille, joilla ei suoralla tullut tunnistustulosta tai tulos oli huono. Uuttokäsittelyt tehtiin kaikille *B. intermedia* -kannoille ja kolmelle eri *B. hyodysenteriae* -kannalle. *B. hyodysenteriae* -kannoista uutettiin kannat Bra 3303, Bra 3313 ja Bra 3347. Mittaustulokset suoralla ja uuttomenetelmällä jokaiselle kannalle erikseen näkyvät liitteessä 2. MALDI-TOF MS:n antamia mittaustuloksia tarkasteltiin myös laitteen antaman 10 parhaan tunnistustuloslistojen kautta. Liitteessä 3 näkyy kunkin kannan parhaan mittauksen mukaan tullut 10 parhaan tunnistustuloksen lista.

Taulukkoon 11 on koottu mittaustulokset sen osalta, milloin MALDI-TOF MS on tunnistanut oikean *Brachyspira*-lajin, pistemäärän ollessa yli 2. Taulukossa 12 näkyy oikeat lajitunnistukset suoralla menetelmällä ja uuttaen sekä oikeiden *Brachyspira*-lajitunnistustulosten yhteenlaskettu määrä suoran sekä uuttomittauksen lajitunnistukset huomioonottaen.

Taulukko 11. MALDI-TOF MS -tulokset oikeiden *Brachyspira*-tunnistusten osalta.

Laji	Tutkittujen kantojen kokonaismäärä / uutettujen kantojen määrä	Suora	Uutto	Lajitunnistusten yhteismäärä
<i>B. hyodysenteriae</i>	10 / 3	7	3	10
<i>B. intermedia</i>	18 / 18	5	3	5
<i>B. pilosicoli</i>	20 / -	20	-	20

Kaikki *B. pilosicoli* -kannat tunnistuivat niin hyvin suoralla mittauksella, että niille ei tehty uuttoja. Kaikista kymmenestä *B. hyodysenteria* -kannasta seitsemän tunnistui suoralla mittauksella hyvin ja kolmelle kannalle tehtiin suoran mittauksen lisäksi uuttomittaus. Uutto tehtiin, jos mitattavalle kannalle ei tullut suoralla mittauksella lajitunnistuksen rajan ylittävää tunnistustulosta. Uutetut *B. hyodysenteriae* -kannat olivat Bra 3303, Bra 3313 ja Bra 3347, ja ne tunnistuivat hyvin uuttomittauksella *B. hyodysenteriae* -lajiksi. *B. intermedia* -kannoista kaikki kannat mitattiin suoralla ja uuttomittauksella, koska suoran mittauksen tulokset antoivat kolmentoista eri kannan kohdalla väärän tai alle lajitunnistuksen rajan olevan *Brachyspira*-lajin tunnistustuloksen. *B. intermedia* -kannoista tunnistui viisi suoralla mittauksella ja kolme uuttomittauksella *B. intermedia* -lajiksi. Tunnistuneet *B. intermedia* -kannat suoralla mittauksella olivat Bra 3220, Bra 3263, HBAK 3001, Bra 3486 ja Bra 3265. Uuttomittauksella tunnistuneet *B. intermedia* -kannat olivat Bra 3220, Bra 3263 ja Bra 3486. Suoralla mittauksella *B. intermedia* -lajiksi tunnistunut Bra 3265-kanta tunnistui uuttomittauksella *B. hyodysenteriae* -lajiksi. Bra 3265-kannalla uuttomittauksella tulokseksi tullut *B. hyodysenteriae*-laji sai tunnistuspistemääräksi korkeamman tuloksen kuin suoralla mittauksella tullut *B. intermedia* -laji, mutta se laskettiin mukaan *B. intermedia* -lajitunnistukseen. Myös suoralla mittauksella *B. intermedia* -lajiksi tunnistunut HBAK 3001-kanta tunnistui uuttomittauksella *B. innocens* -lajiksi, mutta sen tunnistuspistemäärä oli korkeampi suoralla mittauksella kuin uuttomittauksella.

B. intermedia -lajin kohdalla tuli suoralla ja uuttomittauksella parhaimmaksi tunnistustulokseksi myös *B. hyodysenteriae*- ja *B. innocens* -lajeja. Taulukossa 12 näkyy muut ensimmäiseksi parhaalla pistemäärällä tulleet lajitunnistukset, pistemäärän ollessa yli 2, suoran ja uuton osalta sekä tunnistusten yhteenlaskettu määrä molempien menetelmien tunnistuspistemäärät huomioonottaen.

Taulukko 12. *B.intermedia* -bakteerille MALDI-TOF MS:n ehdottamat virheelliset *Brachyspira*-lajit.

Ehdotettu virheellinen laji	Tutkittujen kantojen määrä	Suora	Uutto	Virheellisten lajitunnistusten yhteismäärä
<i>B. hyodysenteriae</i>	13	1	5	5
<i>B. innocens</i>	13	8	8	8

Tutkittavien virheellisten lajitunnistuksen saaneiden *B. intermedia* -kantojen määrä oli 13, kun *B. intermedia* -kantojen kokonaismäärästä (18) vähennettiin oikean tuloksen saaneet kannat (5). Viheellisesti tunnistautuneista *B. intermedia* -kannoista viisi kantaa (Bra 3223, Bra 3230, bra 3238, HPBA 503 ja HPBA 506) tunnistautui sekä suoralla että uuttomittauksella *B. innocens* -lajiksi. Kolme virheellisesti tunnistautuneesta *B. intermedia* -kannasta (Bra 3233, Bra 3244 ja HPBA 504) tunnistautui suoralla mittauksella *B. innocens* -lajiksi ja samat kannat tunnistui uuttomittauksella *B. hyodysenteriae* -lajiksi. Neljä *B. intermedia* -kantaa ei tunnistunut suoralla mittauksella yli todennäköisen lajitunnistuksen rajan, mutta uutolla niistä kaksi (Bra 3245 ja HBAK 3191) tunnistautui *B. hyodysenteriae* -lajiksi ja toiset kaksi (HBAK 2995 ja HBAK 3195) *B. innocens* -lajiksi. Yksi virheellisesti tunnistautuneista *B. intermedia* -kannoista (HPBA 505) tunnistui suoralla mittauksella *B. hyodysenteriae* -lajiksi ja uuttomittauksella *B. innocens* -lajiksi.

B. intermedia -bakteerin kahdella kannalla (HBAK 2995 ja Bra 3244) tunnistustulokseksi tuli *B. hyodysenteriae*- ja *B. innocens* -lajin lisäksi *B. murdochii* -laji. Kumpikaan *B. murdochii* -lajin tunnistuksista ei ollut kuitenkaa mitatun kannan parhaimpia tunnistustuloksia.

5 Tulosten tarkastelu ja päätelmät

Brachyspira-PCR -testien pystytys Eviran eläintautibakteriologian tutkimusyksikön Helsingin laboratoriojaostossa onnistui hyvin. Kaikki saadut PCR-tulokset olivat yhteneviä Seinäjoen toimipaikan tulosten kanssa.

MALDI-TOF MS:n tuloksia tarkasteltiin saatujen tunnistuspistemäärien suhteen ja lisäksi kunkin *Brachyspira*-kannan kohdalla katsottiin 10 parhaimman tunnistuksen listaa, joista nähtiin, mitä kirjastoissa olevia *Brachyspira*-kantoja MALDI-TOF MS tarjoaa kullekin tutkittavalle bakteerille. Mitä enemmän peräkkäisiä samoja bakteereja tarjotaan hyvällä pistemäärällä, sen parempi tunnistus.

Työn alussa osasta *Brachyspira*-kannoista tehtiin MALDI-TOF MS -ajo kahden ja kolmen päivän inkuboimisen jälkeen, mutta huomattiin, että kaksi päivää inkuboitujen bakteerien tulokset olivat huomattavasti parempia, joten päädyttiin käyttämään kahden päivän kasvustoa.

Kaikki tutkitut *B. pilosicoli* -kannat saivat suoralla mittauksella lajitunnistuksen pistemäärän, joka oli selvästi yli 2.000. Kaikilla näillä oli myös 10 parhaan tunnistuksen listassa *B. pilosicoli* -kanta viitenä parhaana tunnistuksena. Tunnistuksista ensimmäisenä oli Evirassa aiemmin lisätty ATCC-kanta yhdeksällätoista kahdestakymmenestä mitatusta *B. pilosicoli* -kannasta. Evirassa lisätty kanta antoi pistemääräksi hyvin todennäköisen lajitunnistuksen pisteet eli yli 2.300. Laitteen kirjastossa olevat valmiit *B. pilosicoli* -kannat antavat tunnistuspistemääräksi yli 2.000, mutta pienemmän pistemäärän kuin itse lisätty ATCC-kanta. Muilla työssä käytetyillä *Brachyspira*-lajien kannoilla ei esiintynyt *B. pilosicoli* -kantoja 10 parhaan tunnistuksen listalla, joten vaikuttaa siltä, ettei *B. hyodysenteriae*- tai *B. intermedia* -laji tunnistu virheellisesti *B. pilosicoli* -lajiksi.

B. hyodysenteriae -kantoja oli kirjastossa vain aiemmin Evirassa lisätyt neljä ATCC-kantaa. Kaikissa mittauksissa neljä parasta pistemäärää oli *B. hyodysenteriae*. Koska *B. hyodysenteriae* -kantoja oli vain aiemmin Evirassa lisättyinä, tarjosi MALDI-TOF MS neljän *B. hyodysenterian* jälkeen aina *B. intermedia* -kantoja laitteen omasta kirjastosta tunnistukseksi. Seitsemän kymmenestä mitatusta *B. hyodysenteriae* -kannasta tunnistui hyvin suoralla menetelmällä, mutta kolme kannoista vaati uuton ennen kuin tulos ylitti lajitunnistuksen pistemäärän. Kaikille kymmenelle *B. hyodysenteriae* -kannalle saatiin piste-

määrä yli lajitunnistuksen rajan, mutta koska *B. intermedia* -kantoja tutkittaessa huomattiin osan niistä tunnistuvan virheellisesti *B. hyodysenteriae* -lajiksi, ei voida sanoa *B. hyodysenteriae* -lajin tunnistuvan varmasti MALDI-TOF MS:llä. Tosin kaikki *B. hyodysenteriae* -bakteerin tunnistukset olivat yli 2.300 ja *B. intermedia* -bakteerin kohdalla tarjottu *B. hyodysenteriae* ei ylittänyt 2.300 pisteen rajaa.

B. intermedia -kannat tunnistuivat huonosti MALDI-TOF MS -menetelmällä. Suoralla menetelmällä tunnistui kahdeksan kahdeksastatoista *B. intermedia* -kannasta *B. innocens* -bakteeriksi. Uuton kautta kahdeksastatoista mitattavasta *B. intermedia* -kannasta tunnistui viisi *B. hyodysenteriae*- ja kahdeksan *B. innocens* -bakteeriksi. Jos tunnistuksena oli ensimmäisenä *B. innocens*, oli se myös kaks seuraavaksi parasta tulosta. Jos ensimmäisenä tunnistuslistalla oli *B. hyodysenteriae*, oli sen jälkeen *B. innocens*- ja *B. murdochii* -kantoja ja kaikki neljä MALDI-TOF MS:n omassa kirjastossa olevaa *B. intermedia* -kanta. Kun nämä tutkimuskantojenkantojen spektrit ajettiin vain MALDI-TOF MS:ssä olevan valmiin kirjaston kantoja vastaan, oli tuloksena neljä parasta osumaa kirjastossa oleviin *B. intermedia* -kantoihin huonolla alle 2.000 pistemäärällä. Kaiken kaikkiaan *B. intermedia* -lajin tunnistus oli melko huonoa, mutta jos ensimmäisenä 10 parhaassa tunnistuksessa oli *B. intermedia*, oli pistemäärä melkein aina yli 2.300.

B. intermedia -kantojen huono tunnistuminen ja sekoittuminen MALDI-TOF MS:ssä muiden *Brachyspira*-lajien kanssa voi osittain selittyä lajien lähisukulaisuudella, varsinkin *B. hyodysenteriae* - ja *B. intermedia* -lajit ovat lähellä toisiaan, mutta toisaalta *B. hyodysenteriae* -kannat eivät kuitenkaan sekoittuneet niin helposti *B. intermedia* -kannoiksi. *B. innocens* -laji on hieman kauempana niistä, mutta lähempänä kuin muut viralliset *Brachyspira*-lajit. Myös se että *B. pilosicoli* ei sekoittunut *B. intermedia*-lajiin, voi selittyä sen suuremmalla etäisyydellä *B. intermedia* -lajiin [kuva 2]. Eri *Brachyspira*-lajien osittain huonoon erottumiseen voi vaikuttaa myös se, että *Brachyspira*-bakteerien luokittelu ei ole vielä lopullinen. *Brachyspira*-sukuun on esitetty uusia lajeja, joita ei ole vielä lisätty MALDI-TOF MS -kirjastoon.

Evirassa oleva MALDI-TOF MS tarjoaa ensimmäisenä *B. pilosicoli*- ja *B. intermedia* -kannoille parhaimmalla pistemäärällä yleensä aiemmin Evirassa lisättyä kyseisen *Brachyspira*-lajin ATCC-kantaa. Kirjaston omat kannat jäävät pistemäärältään yleensä 2.000 pintaan, joten ATCC-kantojen lisääminen kirjastoon näyttää parantavaneen ky-

seisten lajien tunnistusta. Kirjastoon ei ole toistaiseksi lisätty Evirassa eristettyjä paikallisia eri *Brachyspira*-lajien kantoja. Omien paikallisten kantojen lisääminen voisi parantaa *Brachyspira*-bakteerien lajitunnistusta.

6 Yhteenveto

Opinnäytetyössä selvitettiin MALDI-TOF MS -menetelmän soveltuvuus osaksi Eviran *Brachyspira*-diagnostiikkaa sekä validoitiin *Brachyspira*-menetelmään liittyvien PCR-testien pystyttäminen Eviran Helsingin eläintautibakteriologian laboratorioon.

MALDI-TOF MS -menetelmässä mitattiin *Brachyspira*-diagnostiikassa tutkittavia *B. hyodysenteriae*-, *B. intermedia*- ja *B. pilosicoli* -lajeja. Mittauksissa käytetyt *Brachyspira*-kannat oli varmistettu PCR-testeillä ja ne mitattiin MALDI-TOF MS-laitteella kahden päivän inkuboinnin jälkeen, joko suoralla mittauksella tai uuttamalla bakteeri ennen mitausta. MALDI-TOF MS -menetelmällä saatuja tuloksia tulkittiin mittauksissa saatujen tunnistuspistemäärien sekä kullekin mittaukselle tulleen 10 parhaan tunnistustuloslistan kautta. *Brachyspira*-menetelmään liittyvien PCR-testien validointi tehtiin vertaamalla Helsingissä tehtyjen *Brachyspira*-PCR-testien tuloksia Seinäjoella saatuihin tuloksiin.

Työssä todettiin, että *Brachyspira*-PCR-testien pystytys Eviran Helsingin laboratoriojao-ostossa onnistui hyvin, ja kaikki vertailutulokset olivat yhteneväisiä Seinäjoen toimipaikan tulosten kanssa.

MALDI-TOF MS -mittaustulokset osoittavat että *Brachyspira*-diagnostiikassa ei voida vielä MALDI-TOF MS -menetelmällä korvata PCR-testejä, sillä tunnistustulokset eri *Brachyspira*-lajien osalta eivät ole luotettavia. *B. pilosicoli* -lajin tunnistaminen MALDI-TOF MS:n avulla vaikuttaa lupaavalta, mutta vaatii *B. hyodysenteriae*- ja *B. intermedia* -lajien lisäksi muiden *Brachyspira*-lajien testaamista MALDI-TOF MS -menetelmällä. *B. pilosicoli* -laji tunnistui hyvin pelkällä suoralla mittauksella eikä se myöskään tullut tunnistustulokseksi *B. intermedia*- ja *B. hyodysenteriae* -lajeja mitattaessa. *B. hyodysenteriae* -laji tunnistui suurimmalta osalta hyvin suoralla mittauksella, mutta osa kannoista tunnistui vasta uuttokäsittelyn jälkeen. *B. hyodysenteriae* -tunnistusta MALDI-TOF MS -laitteella ei voida pitää varmana tuloksena, koska *B. intermedia* -kannoista osa tunnistui

myös *B. hyodysenteriae* -lajiksi. *B. intermedia* -laji tunnistui MALDI-TOF MS-menetelmällä huonosti, sillä suurin osa *B. intermedia* -kannoista tunnistui virheellisesti *B. hyodysenteriae*- ja *B. innocens* -lajeiksi.

MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon Evirassa aiemmin lisätyt *Brachyspira*-kannat näyttivät parantavan eri *Brachyspira*-lajien tunnistustarkkuutta verrattuna laitteen oman kirjaston *Brachyspira*-kantojen pistemääriin. Lisätyt ATCC-kannat myös toivat kirjastoon uusia *Brachyspira*-lajeja, joita ei laitteen omassa kirjastossa ollut.

Koska laitteen kirjastoon on Evirassa lisätty *Brachyspira*-bakteereista vain ATCC-kantoja, voisi Suomessa esiintyvien *Brachyspira*-bakteerien osalta MALDI-TOF MS-tunnistusta parantaa lisäämällä omien paikallisten, potilasnäytteistä eristettyjen, *Brachyspira*-kantojen massaspektrejä kirjastoon. *B. hyodysenteriae*- ja *B. intermedia* -lajin huonoon tunnistamiseen voi vaikuttaa kyseisten lajien läheinen sukulaisuus. *Brachyspira*-suvun luokittelu ei ole myöskään vielä täysin lopullinen ja sukuun on ehdotettu uusia lajeja, joita ei ole MALDI-TOF MS -kirjastossa.

Lähteet

- [1] Mappley, L.J., La Ragione, R.M. & Woodward, M.J. 2013. *Brachyspira* and its role in avian intestinal spirochaetosis. *Veterinary Microbiology* 168 (2014), s. 245–260.
- [2] Songer, J.G. & Post, K.W. 2005. *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. Elsevier Saunders, s. 232 - 239.
- [3] Markey, M., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A & Maguire, D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*, second edition. MOSBY, s. 388 – 391.
- [4] Sikadysenteria. Verkkodokumentti. Eläinten terveyst ETT Ry. <http://www.ett.fi/tarttuvat_taudit/sikojen_tarttuvat_taudit/sikadysenteria>. Luettu 19.10.2015.
- [5] Dysenteria. 2010. Verkkodokumentti. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. <<http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten+terveys+ja+elaintaudit/elaintaudit/siat/dysenteria/>>. Luettu 26.10.2015.
- [6] Alvarez-Ordóñez, A., Martínez-Lobo, F.J., Arguelo, H., Carvajal, A. & Rubio, P. 2013. Swine Dysentery: Aetology, Pathogenecity, Dterminants of Transmission and the Fight against the Disease. *Interntional Journal of Environmental Recearch and Puplic Health* ISSN 1660 – 4901, s. 1927 -1947.
- [7] Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J. & Stevenson, G.W. 2012. *Diseases of Swine*, 10th Edition. Wiley-Blackwell, s. 680 – 695.
- [8] Jensen, T. K., Christensen, A.S. & Boye, M. 2010. *Brachyspira murdochii* Colotis in Pigs. *Veterinary Pathology* 47 (2), s. 334-338.
- [9] Backhans, A., Jansson, D.S., As`pan, A. & Fellström, C. 2011. Typing of *Brachyspira spp.* From rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Veterinary Microbiology* 153 (2011), s. 156-162.
- [10] Hampson, D.J., Lester, G.D., Phillips, N.D. & La, T. 2006. Isolation of *Brachyspira pilosicoli* from weanling horses with chronic diarrhea. *Veterinary Record* (2006) 158, s. 661-662.

- [11] Warneke, H.I., Kinyon, J.M., Bower, L.P., Burrough, E.R. & Frana, T.S. 2014. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of *Brachyspira* species isolated from swine, including the newly described "*Brachyspira hampsonii*". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2014, Vol. 26(5), s. 635 – 639.
- [12] Bruker Daltonics. user manual. 2014.
- [13] Theel, Eliza, S. 2013. Verkkodokumentti. Mayo Medical Laboratories. <<http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2013/01-maldi-tof-mass-spectrometry/>>. Luettu 8.10.2015.
- [14] Prohaska, S., Pflüger, V., Ziegler, D., Scherrer, S., Frei, D., Lehmann, A., Wittenbrink, M.M. & Huber, H. 2013. MALDI-TOF MS for identification of porcine *Brachyspira* species. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266 – 8254, s. 292 – 298.
- [15] Calderaro, A., Piccolo, G., Montecchini, S., Buttrini, M., Gorrini, C., Rossi, S., Archangeletti, M., De Conto, F., Medici, M.C. & Chezzi, C. 2012. MALDI-TOF MS analysis of human and animal *Brachyspira* species and benefits of database extension. *Journal of Proteomics* 78 (2013), s. 273 – 280.

Brachyspira-diagnostiikassa käytetyt reagenssit ja laitteet

Taulukko 13. Menetelmässä käytetyt reagenssit.

Menetelmän vaihe	Reagenssi
Primääriviljely	BA-3-maljoja
Jatkoviljely	FAA-maljoja
<i>Brachyspira</i> -PCR	steriiliä vettä
	Dynazyme buffer F-511, Lot. 00188666, Thermo Scientific
	dNTP Mix #R0192, Lot.00166700, Thermo Scientific
	Dynazyme II DNA Polymerase F-501L, Lot. 00188344, Thermo Scientific
Geelielektroforeesiajo	Sigma Agarose A9539-250G
	1x TBA-puskuriliuos
	SYBR-Safe DNA Gel Stain, Lot. 1621176, Invitrogen
	6x Orange DNA Loading dye #R0631, Lot. 00184078, thermo Scientific
	O'Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder # SM1153, Lot. 0181789, thermo Scientific.

Taulukko 14. Menetelmässä käytetyt laitteet.

Menetelmän vaihe	Laite
Primääri- ja jatkoviljely	42 °C:n lämpökaappi
	Mikroskooppi
<i>Brachyspira</i> -PCR	100 °C:n lämpöblokki
	C1000 Touch™ Thermal Cycler, BioRad
Geelielektroforeesiajo ja -kuvaus	Power Source 250V, VWR
	Alphamager-geelinkuvauslaite

MALDI-TOF MS-menetelmän mittaustulokset

Lajitunnistus		≥ 2.000							
Todennäköinen sukutunnistus		2.000 – 1.700							
Epävarma tunnistus		1.699 - 0							
Väärä lajitunnistus		≥ 2.000							
		suora				uutto			
Laji	Kanta	1		2		1		2	
<i>B.pilosicoli</i>	BRA 3490	<i>B. pilosicoli</i>	2.349	<i>B. pilosicoli</i>	2.076	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.334	<i>B. pilosicoli</i>	1.913	-	-	-	-
	BRA 3491	<i>B. pilosicoli</i>	2.212	<i>B. pilosicoli</i>	1.949	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.207	<i>B. pilosicoli</i>	1.873	-	-	-	-
	BRA 3492	<i>B. pilosicoli</i>	2.275	<i>B. pilosicoli</i>	1.930	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	1.729	not reliable	1.430	-	-	-	-
	BRA 3493	<i>B. pilosicoli</i>	2.464	<i>B. pilosicoli</i>	2.094	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.443	<i>B. pilosicoli</i>	2.038	-	-	-	-
	BRA 3495	<i>B. pilosicoli</i>	2.505	<i>B. pilosicoli</i>	2.001	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.368	<i>B. pilosicoli</i>	2.040	-	-	-	-
	BRA 3496	<i>B. pilosicoli</i>	2.369	<i>B. pilosicoli</i>	2.109	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.456	<i>B. pilosicoli</i>	2.104	-	-	-	-
	BRA 3497	<i>B. pilosicoli</i>	2.355	<i>B. pilosicoli</i>	2.109	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.296	<i>B. pilosicoli</i>	2.085	-	-	-	-
	BRA 3499	<i>B. pilosicoli</i>	2.482	<i>B. pilosicoli</i>	2.060	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.475	<i>B. pilosicoli</i>	2.111	-	-	-	-
	BRA 3500	<i>B. pilosicoli</i>	2.465	<i>B. pilosicoli</i>	2.018	-	-	-	-
	"	no peaks found	< 0	no peaks found	< 0	-	-	-	-
	BRA 3502	<i>B. pilosicoli</i>	2.528	<i>B. pilosicoli</i>	2.230	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.449	<i>B. pilosicoli</i>	2.252	-	-	-	-
	HBAK 3171	<i>B. pilosicoli</i>	2.334	<i>B. pilosicoli</i>	1.919	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.211	<i>B. pilosicoli</i>	1.882	-	-	-	-
	HBAK 3073	<i>B. pilosicoli</i>	2.432	<i>B. pilosicoli</i>	2.061	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.423	<i>B. pilosicoli</i>	1.996	-	-	-	-
	HBAK 3081	<i>B. pilosicoli</i>	2.506	<i>B. pilosicoli</i>	2.024	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.338	<i>B. pilosicoli</i>	2.006	-	-	-	-
	HBAK 3184	<i>B. pilosicoli</i>	2.332	<i>B. pilosicoli</i>	1.983	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.392	<i>B. pilosicoli</i>	1.874	-	-	-	-
	HBAK 3189	<i>B. pilosicoli</i>	2.242	<i>B. pilosicoli</i>	1.892	-	-	-	-
	"	<i>B. pilosicoli</i>	2.396	<i>B. pilosicoli</i>	1.863	-	-	-	-
HBAK 3094	<i>B. pilosicoli</i>	2.490	<i>B. pilosicoli</i>	2.130	-	-	-	-	
"	<i>B. pilosicoli</i>	2.043	<i>B. pilosicoli</i>	2.015	-	-	-	-	
HPBA 512	<i>B. pilosicoli</i>	2.433	<i>B. pilosicoli</i>	2.143	-	-	-	-	
"	<i>B. pilosicoli</i>	2.120	<i>B. pilosicoli</i>	2.093	-	-	-	-	
HPBA 513	<i>B. pilosicoli</i>	2.378	<i>B. pilosicoli</i>	2.195	-	-	-	-	
"	<i>B. pilosicoli</i>	2.389	<i>B. pilosicoli</i>	2.163	-	-	-	-	
HPBA 516	<i>B. pilosicoli</i>	2.446	<i>B. pilosicoli</i>	2.175	-	-	-	-	
"	<i>B. pilosicoli</i>	2.426	<i>B. pilosicoli</i>	2.009	-	-	-	-	
HPBA 517	<i>B. pilosicoli</i>	2.189	<i>B. pilosicoli</i>	2.009	-	-	-	-	
"	<i>B. pilosicoli</i>	2.247	<i>B. pilosicoli</i>	1.953	-	-	-	-	
<i>B.hyodysenteriae</i>	BRA 3292	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.322	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.302	-	-	-	-
	"	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.382	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.336	-	-	-	-
	BRA 3301	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.381	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.290	-	-	-	-
	"	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.354	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.340	-	-	-	-
	BRA 3303	not reliable	1.130	not reliable	1.041	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.531	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.452
"	not reliable	1.130	not reliable	1.107	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.480	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.418	

	BRA 3304	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.378	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.304	-	-	-	-
	"	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.357	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.311	-	-	-	-
	BRA 3305	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.449	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.414	-	-	-	-
	"	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.481	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.392	-	-	-	-
	BRA 3313	not reliable	1.380	not reliable	1.369	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.468	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.369
	"	not reliable	1.253	not reliable	1.227	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.545	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.520
	BRA 3330	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.178	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.148	-	-	-	-
	"	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.251	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.226	-	-	-	-
	BRA 3347	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.927	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.924	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.443	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.415
	"	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.979	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.926	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.342	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.315
	BRA 3348	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.336	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.284	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.404	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.315
	"	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.391	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.295	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.391	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.295
	BRA 3349	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.319	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.292	-	-	-	-
	"	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.339	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.332	-	-	-	-
<i>B.intermedia</i>	BRA 3220	<i>B. intermedia</i>	2.379	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.184	<i>B. intermedia</i>	2.413	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.314
	"	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.863	<i>B. intermedia</i>	1.797	<i>B. intermedia</i>	2.463	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.363
	BRA 3223	<i>B. innocens</i>	2.186	<i>B. innocens</i>	2.045	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.026	<i>B. innocens</i>	2.009
	"	<i>B. innocens</i>	2.152	<i>B. innocens</i>	1.955	<i>B. innocens</i>	2.268	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.037
	BRA 3230	<i>B. innocens</i>	2.245	<i>B. innocens</i>	2.207	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.165	<i>B. innocens</i>	2.030
	"	<i>B. innocens</i>	2.065	<i>B. innocens</i>	1.956	<i>B. innocens</i>	2.297	<i>B. innocens</i>	2.209
	BRA 3233	<i>B. innocens</i>	2.222	<i>B. innocens</i>	2.114	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.155	<i>B. murdochii</i>	2.050
	"	<i>B. innocens</i>	2.157	<i>B. innocens</i>	2.057	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.275	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.186
	BRA 3238	not reliable	1.186	not reliable	1.135	<i>B. innocens</i>	2.501	<i>B. innocens</i>	2.201
	"	<i>B. innocens</i>	2.005	<i>B. innocens</i>	1.874	<i>B. innocens</i>	2.526	<i>B. innocens</i>	2.171
	BRA 3244	<i>B. innocens</i>	2.141	<i>B. innocens</i>	2.102	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.276	<i>B. innocens</i>	2.095
	"	no peaks found	< 0	no peaks found	< 0	<i>B. murdochii</i>	2.170	<i>B. innocens</i>	2.133
	BRA 3245	not reliable	1.157	not reliable	1.121	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.071	<i>B. innocens</i>	1.852
	"	not reliable	1.206	not reliable	1.131	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.299	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.232
	BRA 3263	<i>B. intermedia</i>	2.488	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.315	<i>B. intermedia</i>	2.413	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.202
	"	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.215	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.064	<i>B. intermedia</i>	2.513	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.297
	BRA 3265	no peaks found	< 0	no peaks found	< 0	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.162	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.961
	"	<i>B. intermedia</i>	2.049	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.018	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.190	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.917
	HBAK 2995	<i>B. innocens</i>	1.850	<i>B. innocens</i>	1.832	<i>B. murdochii</i>	2.053	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.964
	"	<i>B. innocens</i>	1.783	<i>B. innocens</i>	1.776	<i>B. innocens</i>	2.095	<i>B. murdochii</i>	2.088
	HBAK 3001	<i>B. intermedia</i>	2.337	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.134	<i>B. innocens</i>	2.076	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.918
	"	<i>B.intermedia</i>	2.390	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.092	<i>B. innocens</i>	1.993	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.965
	HBAK 3486	<i>B.intermedia</i>	2.125	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.031	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.252	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.194
"	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.770	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.735	<i>B. intermedia</i>	2.445	<i>B. intermedia</i>	2.002	
HBAK 3191	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.877	<i>B. intermedia</i>	1.792	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.212	<i>B. intermedia</i>	2.064	
"	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.766	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.757	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.122	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.053	
HBAK 3195	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.905	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.896	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.104	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.074	
"	<i>B. intermedia</i>	1.934	<i>not reliable</i>	1.700	<i>B. innocens</i>	2.166	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.001	
HPBA 503	<i>B. innocens</i>	2.183	<i>B. innocens</i>	2.155	<i>B. innocens</i>	2.519	<i>B. innocens</i>	2.297	
"	<i>B. innocens</i>	2.269	<i>B. innocens</i>	2.142	<i>B. innocens</i>	2.512	<i>B. innocens</i>	2.325	
HPBA 504	<i>B. innocens</i>	2.198	<i>B. innocens</i>	1.911	no peaks found	< 0	no peaks found	< 0	
"	<i>B. innocens</i>	2.057	<i>B. innocens</i>	1.921	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.268	<i>B. intermedia</i>	2.122	
HPBA 505	<i>B. hyodesenteriae</i>	2.141	<i>B. innocens</i>	2.131	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.250	<i>B. innocens</i>	2.116	
"	<i>B. innocens</i>	2.120	<i>B. hyodesenteriae</i>	2.103	<i>B. innocens</i>	2.295	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.143	
HPBA 506	<i>B. innocens</i>	2.164	<i>B. innocens</i>	2.062	<i>B. innocens</i>	2.262	<i>B. murdochii</i>	2.258	
"	<i>B. innocens</i>	1.811	<i>B. innocens</i>	1.775	<i>B. innocens</i>	2.571	<i>B. innocens</i>	2.289	

Kaikkien tutkittujen *Brachyspira*-kantojen 10 parasta tunnistustulosta

		Kanta											
		BRA 3490	BRA 3491	BRA 3492	BRA 3493	BRA 3495	BRA 3496	BRA 3497	BRA 3499				
<i>B. pilosicoli</i>	1	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira 2.349	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira 2.212	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira 2.275	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira 2.464	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira 2.505	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira 2.456	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira 2.355	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira 2.482				
	2	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD 2.076	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD 1.949	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD 1.930	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD 2.094	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD 2.001	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD 2.104	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD 2.109	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD 2.060				
	3	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD 1.998	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD 1.906	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA 1.823	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD 2.069	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD 1.983	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD 2.102	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD 2.070	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD 2.019				
	4	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA 1.960	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA 1.808	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD 1.813	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA 1.987	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA 1.853	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA 1.989	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA 1.840	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA 1.964				
	5	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA 1.870	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA 1.749	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA 1.740	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA 1.833	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA 1.743	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA 1.859	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA 1.600	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA 1.895				
	6	Lactobacillus agilis DSM 20509T DSM 1.256	Meyerozyma guilliermondii CBS 566 CBS 1.365	Clostridium bifementans 2274_CCUG 35556 A BOG 1.345	Streptomyces albus B262 UFL 1.329	Lactobacillus agilis DSM 20509T DSM 1.353	Clostridium sordellii 1070_ATCC 9714T BOG 1.273	Streptomyces albus B262 UFL 1.383	Pseudomonas veronii B559 UFL 1.263				
	7	Clostridium sordellii 1070_ATCC 9714T BOG 1.252	Brachyspira alvinipulli ATCC51933 Evira 1.245	Clostridium difficile MB_4499_05 THL 1.304	Lactobacillus gastricus DSM 16045T DSM 1.327	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira 1.343	Pseudomonas veronii B561 UFL 1.233	Lactobacillus agilis DSM 20509T DSM 1.234	Pseudomonas veronii B561 UFL 1.202				
	8	Lactobacillus gastricus DSM 16045T DSM 1.216	Streptomyces albus B262 UFL 1.226	Lactobacillus gastricus DSM 16046 DSM 1.275	Lactobacillus gastricus DSM 16046 DSM 1.305	Lactobacillus sakei ssp carnosus DSM 15740 DSM 1.229	Brachyspira alvinipulli ATCC51933 Evira 1.216	Pseudomonas sp 057_Galv13 NFI 1.227	Castellaniella defragrans DSM 12141T HAM 1.200				
	9	Meyerozyma guilliermondii CBS 566 CBS 1.181	Colletotrichum gloeosporioides CBS 100471 CBS 1.219	Rhizobium radiobacter B177 UFL 1.253	Pseudomonas veronii B559 UFL 1.260	Clostridium fallax DSM 2631T DSM 1.207	Lactobacillus sakei DSM 6333 DSM 1.209	Streptomyces hirsutus B267 UFL 1.223	Streptomyces albus B262 UFL 1.168				
	10	Lactobacillus gastricus DSM 16046 DSM 1.179	Pseudomonas veronii B561 UFL 1.212	Aureobasidium pullulans MY_RV5_2008 ERL 1.186	Streptomyces hirsutus B267 UFL 1.259	Rhizobium radiobacter B336 UFL 1.196	Lactobacillus gastricus DSM 16045T DSM 1.208	Candida membranifaciens MY913_09 ERL 1.218	Starkeya novella B351 UFL 1.142				

		Kanta															
		BRA 3500		BRA 3502		HBAK 3171		HBAK 3073		HBAK 3081		HBAK 3184		HBAK 3189		HBAK 3094	
B. pilosicoli	1	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	2.465	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	2.528	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	2.334	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	2.432	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	2.506	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	2.392	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	2.396	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	2.043
	2	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	2.018	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	2.230	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	1.919	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	2.061	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	2.024	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	1.874	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	1.863	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	2.015
	3	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	1.929	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	2.182	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	1.909	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	2.057	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	1.964	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	1.821	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AH-VLA	1.819	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	1.866
	4	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AH-VLA	1.845	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AH-VLA	2.026	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AH-VLA	1.505	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.958	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA	1.904	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA	1.729	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	1.743	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AH-VLA	1.475
	5	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.737	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.958	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.407	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA	1.954	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.432	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.583	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.711	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.398
	6	Pseudomonas veronii B561 UFL	1.266	Clostridium sordellii 1070_ATCC 9714T BOG	1.366	Lactobacillus gastricus DSM 16046 DSM	1.302	Brachyspira alvinipulli ATCC51933 Evira	1.337	Nocardia sp MB_9090_05 THL	1.258	Pseudomonas mandelii CIP 105273T HAM	1.356	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.410	Staphylococcus hominis Mb18788_1 CHB	1.213
	7	Pseudomonas veronii B559 UFL	1.196	Rhizobium radiobacter B167 UFL	1.233	Bacillus humi DSM 16318T DSM	1.280	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.331	Clostridium acetobutylicum DSM 1731 DSM	1.210	Clostridium sordellii 1070_ATCC 9714T BOG	1.296	Streptomyces chartreusis HKI 249 HKJ	1.368	Pseudomonas veronii B561 UFL	1.194
	8	Microbacterium saperdae B245 UFL	1.178	Streptomyces chartreusis HKI 249 HKJ	1.211	Lactobacillus gastricus DSM 16045T DSM	1.269	Gluconobacter oxydans ssp oxydans B540 UFL	1.222	Lactobacillus perolens DSM 12744T DSM	1.203	Streptomyces chartreusis HKI 249 HKJ	1.279	Clostridium sordellii 1070_ATCC 9714T BOG	1.325	Lactobacillus gastricus DSM 16046 DSM	1.189
	9	Pseudomonas sp 057_Galv13 NFI	1.172	Mycobacterium kansasii DSM 43497 DSM b	1.193	Colletotrichum gloeosporioides CBS 100471 CBS	1.232	Streptococcus pyogenes ATCC 19615 THL	1.207	Pseudomonas sp 057_Galv13 NFI	1.175	Streptomyces albus B262 UFL	1.255	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.306	Colletotrichum gloeosporioides CBS 100471 CBS	1.175
	10	Lactobacillus gastricus DSM 16046 DSM	1.162	Clostridium malenominatum DSM 1127T DSM	1.180	Enterococcus avium 96 PIM	1.224	Eggerthella lenta 9 RLT	1.198	Rhodococcus rhodochrous DSM 46023 DSM	1.172	Arthrobacter ramosus IMET 10685T HKJ	1.239	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.296	Lactobacillus gastricus DSM 16045T DSM	1.162

		Kanta							
		HPBA 512		HPBA 513		HPBA 516		HPBA 517	
B. pilosicoli	1	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	2.433	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	2.389	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	2.446	Brachyspira pilosicoli ATCC51139 Evira	2.247
	2	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	2.143	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	2.163	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	2.175	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	1.953
	3	Brachyspira pilosicoli GD83 GDD	2.102	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	2.111	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	2.153	Brachyspira pilosicoli GD82 GDD	1.923
	4	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA	2.047	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA	1.937	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA	1.954	Brachyspira pilosicoli AN652_02 AHVLA	1.837
	5	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.937	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.767	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.804	Brachyspira pilosicoli C162 AHVLA	1.628
	6	Streptomyces albus B262 UFL	1.285	Pseudomonas veronii B559 UFL	1.267	Streptomyces albus B262 UFL	1.296	Lactobacillus gastricus DSM 16045T DSM	1.340
	7	Clostridium acetobutylicum DSM 1738 DSM	1.272	Clostridium acetobutylicum DSM 1731 DSM	1.259	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.292	Rhizobium radiobacter B177 UFL	1.245
	8	Pseudomonas sp 057_Galv13 NFI	1.231	Lactobacillus gastricus DSM 16046 DSM	1.243	Clostridium sordellii 1070_ATCC 9714T BOG	1.269	Clostridium malenominatum DSM 1127T DSM	1.168
	9	Pseudomonas veronii B561 UFL	1.221	Arthrobacter histidinovorans DSM 20115T DSM	1.221	Pseudomonas veronii B561 UFL	1.269	Acinetobacter lwoffii B101 UFL	1.165
	10	Bacillus siralis DSM 13140T DSM	1.178	Lactobacillus gastricus DSM 16045T DSM	1.196	Lactobacillus gastricus DSM 16045T DSM	1.234	Lactobacillus gastricus DSM 16046 DSM	1.155

		Kanta											
		BRA 3292	BRA 3301	BRA 3303	BRA 3304	BRA 3305	BRA 3313	BRA 3330	BRA 3347				
B. hyodysente- riae	1	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira 2.382	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira 2.381	Pseudomonas veronii B561 UFL 1.130	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira 2.378	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira 2.481	Mycoplasma alkalescens 22B10 VLW 1.380	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira 2.251	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira 1.979				
	2	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira 2.336	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira 2.290	Dichelobacter nodosus 4736 NVU 1.107	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira 2.304	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira 2.392	Clostridium bifermentans 2274_CCUG 35556 A BOG 1.369	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira 2.226	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira 1.926				
	3	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira 2.269	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira 2.279	Rhizobium radiobacter B178 UFL 1.044	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira 2.270	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira 2.351	Lactobacillus fermentum DSM 20391 DSM 1.366	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira 2.188	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira 1.900				
	4	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira 2.101	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira 2.020	Staphylococcus vitulinus DSM 9931 DSM 1.038	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira 2.263	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira 2.301	Rhizobium radiobacter B177 UFL 1.350	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira 2.116	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira 1.808				
	5	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA 1.947	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira 2.002	Acinetobacter calcoaceticus B388 UFL 1.035	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira 2.048	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira 2.225	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira 1.332	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira 1.975	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira 1.478				
	6	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira 1.852	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA 1.829	Trueperella bernardiae DSM 9152T DSM 1.026	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA 1.826	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA 1.875	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira 1.305	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA 1.804	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA 1.432				
	7	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA 1.842	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA 1.732	Streptomyces albus B262 UFL 1.023	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA 1.783	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA 1.813	Corynebacterium kroppenstedtii CCUG 49276 CCUG 1.289	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira 1.774	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA 1.404				
	8	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA 1.812	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA 1.665	Candida dubliniensis 41_5 ZZMK 0.998	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA 1.751	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA 1.806	Rhizobium radiobacter B167 UFL 1.242	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA 1.767	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA 1.399				
	9	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA 1.633	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA 1.535	Rhizobium radiobacter B336 UFL 0.984	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira 1.528	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA 1.572	Sphingomonas sp B605 UFL 1.235	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA 1.685	Dichelobacter nodosus 4736 NVU 1.212				
	10	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira 1.566	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira 1.515	Clostridium novyi 1082_ATCC 17861T BOG 0.98	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA 1.528	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira 1.568	Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 THL 1.204	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA 1.626	Aureobasidium pullulans MY_RV5_2008 ERL 1.207				

		Kanta			
		BRA 3348		BRA 3349	
<i>B. hyodysenteriae</i>	1	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	2.391	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	2.339
	2	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	2.295	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	2.332
	3	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.290	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.279
	4	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.041	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.115
	5	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.010	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.001
	6	Brachyspira intermedia AN1707_96 AH-VLA	1.888	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.838
	7	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.811	Brachyspira intermedia AN621_97 AH-VLA	1.809
	8	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.802	Brachyspira intermedia AN885_94 AH-VLA	1.780
	9	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.758	Brachyspira intermedia AN519_97 AH-VLA	1.702
	10	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	1.720	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	1.494

		Kanta							
		BRA 3303		BRA 3313		BRA 3347		BRA 3348	
<i>B. hyodysenteriae</i> UUTTO	1	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.531	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.545	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.443	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.404
	2	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	2.452	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.520	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.415	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.315
	3	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.380	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.360	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.212	Brachyspira intermedia AN621_97 AH-VLA	2.052
	4	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	2.370	Brachyspira intermedia AN621_97 AH-VLA	1.898	Brachyspira intermedia ATCC49887 Evira	2.165	Brachyspira intermedia AN885_94 AH-VLA	1.989
	5	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.925	Brachyspira intermedia AN885_94 AH-VLA	1.893	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	2.044	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.986
	6	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.919	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.891	Brachyspira intermedia AN885_94 AH-VLA	1.961	Brachyspira intermedia AN519_97 AH-VLA	1.980
	7	Brachyspira intermedia AN621_97 AH-VLA	1.806	Brachyspira intermedia AN519_97 AH-VLA	1.751	Brachyspira intermedia AN519_97 AH-VLA	1.900	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.745
	8	Brachyspira intermedia AN519_97 AH-VLA	1.779	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.721	Brachyspira intermedia AN621_97 AH-VLA	1.896	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.593
	9	Brachyspira intermedia AN885_94 AH-VLA	1.757	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.620	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.887	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.481
	10	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.661	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.480	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.457	Lactobacillus graminis DSM 20719T DSM	1.323

		Kanta													
		BRA 3220		BRA 3223		BRA 3230		BRA 3233		BRA 3238		BRA 3244		BRA 3245	
B. <i>intermedia</i>	1	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.379	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.186	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.245	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.222	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.005	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.141	Microbacterium saperdae B245 UFL	1.157
	2	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.184	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.045	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.207	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.114	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.874	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.102	Streptococcus mitis V17_201159 MUZ	1.121
	3	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.161	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.920	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	2.087	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.968	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.797	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	2.059	Sphingomonas sp B605 UFL	1.100
	4	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.988	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.643	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.725	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.936	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.483	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.858	Arcobacter halophilus DSM 18005T DSM	1.093
	5	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.955	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.616	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.612	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.797	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.356	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.834	Mycoplasma bovis NCTC 10131T VLW	1.077
	6	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.879	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.611	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.463	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.747	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.312	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.700	Plesiomonas shigelloides CCM 1991 CCM	1.058
	7	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.821	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.564	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.438	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.594	Aromatoleum toluolicum T MPB	1.281	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.613	Aureobasidium pullulans MY_RV5_2008 ERL	1.057
	8	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.793	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.470	Rhizobium radiobacter B336 UFL	1.424	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.480	Blastomonas natatoria DSM 3183T HAM	1.281	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.612	Rhizobium radiobacter B178 UFL	1.054
	9	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.787	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.433	Bacillus nealsonii DSM 15077T DSM	1.386	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.442	Rhizobium radiobacter B167 UFL	1.277	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.495	Dichelobacter nodosus 4736 NVU	1.047
	10	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.778	Rhizobium radiobacter B167 UFL	1.411	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.362	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.439	Clostridium novyi 1082_ATCC 17861T BOG	1.276	Mycoplasma bovirhinis 25B10 VLW	1.416	Actinomyces car-diffensis DSM 15803T DSM	1.020

		Kanta													
		BRA 3263		BRA 3265		HBAK 2995		HBAK 3001		HBAK 3486		HBAK 3191		HBAK 3195	
B. <i>intermedia</i>	1	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.488	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.049	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	1.850	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.390	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.125	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.877	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.934
	2	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.315	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.018	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.832	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.092	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.031	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.792	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.700
	3	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.267	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.945	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.747	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.033	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.948	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.653	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.634
	4	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.971	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.849	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.447	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.894	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.895	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.616	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.607
	5	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.931	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.764	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.434	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.879	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.862	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.574	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.518
	6	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.854	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.755	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.381	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.853	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.711	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.560	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.435
	7	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.763	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.750	Corynebacterium pseudodiphtheriticum ATCC 10701 THL	1.202	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.837	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.641	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.543	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.413
	8	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.747	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.748	Dichelobacter nodosus 4736 NVU	1.178	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.830	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.616	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.529	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.390
	9	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.715	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.639	Corynebacterium propinquum 168 RLT	1.169	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.805	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.572	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.475	Mycoplasma bovis NCTC 10131T VLVW	1.381
	10	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.711	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.635	Rhizobium radiobacter B336 UFL	1.147	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	1.794	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	1.551	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.449	Rhizobium radiobacter B177 UFL	1.390

		Kanta							
		HPBA 503		HPBA 504		HPBA 505		HPBA 506	
B. <i>intermedia</i>	1	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.269	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.198	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.141	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.164
	2	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.142	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.911	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.131	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	2.062
	3	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	2.099	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.784	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	2.042	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.058
	4	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.643	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.759	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	2.026	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.898
	5	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.629	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.561	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.956	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.707
	6	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.528	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.490	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.881	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.595
	7	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.502	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.364	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.750	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.563
	8	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.451	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.363	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	1.741	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.542
	9	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	14246	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.345	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.710	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.415
	10	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.382	Bacillus nealsonii DSM 15077T DSM	1.240	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.634	Rhizobium radiobacter B167 UFL	1.393

		Kanta													
		BRA 3220		BRA 3223		BRA 3230		BRA 3233		BRA 3238		BRA 3244		BRA 3245	
B. intermedia JUTTO	1	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.463	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.268	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.297	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.275	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.526	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.276	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.299
	2	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.363	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.037	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.209	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.186	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.171	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.095	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.232
	3	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.259	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.999	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	2.103	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	2.109	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	2.075	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	2.064	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	2.133
	4	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.784	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.978	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.928	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.012	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.992	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	2.034	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	2.072
	5	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.751	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.910	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.737	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.918	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.944	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	2.010	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.003
	6	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.727	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.861	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.585	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.863	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.925	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	1.979	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.924
	7	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.709	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.612	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.530	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.811	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.680	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.868	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.912
	8	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.678	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.537	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.473	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.678	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.668	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.762	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.857
	9	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.664	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.468	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.438	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	1.546	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.516	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.736	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.813
	10	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.471	Brachyspira alvinipulli ATCC51933 Evira	1.409	Campylobacter lari 165_98 NVU	1.344	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.392	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.486	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.513	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.804

		Kanta													
		BRA 3263		BRA 3265		HBAK 2995		HBAK 3001		HBAK 3486		HBAK 3191		HBAK 3195	
B. intermedia UUTTO	1	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.513	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	2.190	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.095	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.076	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.445	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.212	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.166
	2	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.297	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.917	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	2.088	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.918	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	2.002	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	2.064	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	2.001
	3	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	2.108	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.814	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.978	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.915	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.927	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	2.028	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.996
	4	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.914	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.791	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.920	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.901	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.880	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.974	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.994
	5	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.832	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.758	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.906	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.892	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.879	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.869	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.993
	6	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.779	Brachyspira hyodysenteriae ATCC27164 Evira	1.729	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.733	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.841	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.838	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.686	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.972
	7	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.698	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.585	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.717	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.754	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.745	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.622	Brachyspira hyodysenteriae ATCC31212 Evira	1.855
	8	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.598	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.554	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.514	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.701	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.521	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.622	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	1.838
	9	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.509	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	1.478	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49526 Evira	1.394	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.553	Brachyspira innocens C109 AHVLA	1.465	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.543	Brachyspira intermedia AN1707_96 AHVLA	1.747
	10	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.509	Brachyspira hyodysenteriae ATCC49887 Evira	1.472	Brachyspira intermedia AN885_94 AHVLA	1.369	Brachyspira intermedia AN519_97 AHVLA	1.530	Lactobacillus graminis DSM 20719T DSM	1.333	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.485	Brachyspira intermedia AN621_97 AHVLA	1.684

		Kanta							
		HPBA 503		HPBA 504		HPBA 505		HPBA 506	
B. intermedia UUTTO	1	Brachyspira innocens ATCC29796 Evira	2.519	Brachyspira hy- odysenteriae ATCC27164 Evira	2.268	Brachyspira inno- cens ATCC29796 Evira	2.295	Brachyspira inno- cens ATCC29796 Evira	2.571
	2	Brachyspira innocens C109 AHVLA	2.297	Brachyspira inter- media ATCC51140 Evira	2.122	Brachyspira inno- cens C109 AHVLA	2.143	Brachyspira inno- cens C109 AH- VLA	2.289
	3	Brachyspira innocens AN3706_90 AHVLA	2.223	Brachyspira inno- cens C109 AHVLA	2.064	Brachyspira inno- cens AN3706_90 AHVLA	1.962	Brachyspira inno- cens AN3706_90 AHVLA	2.220
	4	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.987	Brachyspira inno- cens AN3706_90 AHVLA	1.886	Brachyspira hy- odysenteriae ATCC31212 Evira	1.768	Brachyspira hy- odysenteriae ATCC49526 Evira	1.961
	5	Brachyspira hyodysente- riae ATCC27164 Evira	1.934	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.711	Brachyspira inter- media ATCC51140 Evira	1.751	Brachyspira hy- odysenteriae ATCC49887 Evira	1.951
	6	Brachyspira hyodysente- riae ATCC49887 Evira	1.925	Brachyspira hy- odysenteriae ATCC31212 Evira	1.557	Brachyspira hy- odysenteriae ATCC27164 Evira	1.728	Brachyspira hy- odysenteriae ATCC27164 Evira	1.876
	7	Brachyspira hyodysente- riae ATCC31212 Evira	1.915	Brachyspira inter- media AN1707_96 AHVLA	1.342	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.666	Brachyspira inter- media ATCC51140 Evira	1.799
	8	Brachyspira hyodysente- riae ATCC49526 Evira	1.903	Arthrobacter woluwensis DSM 10495T DSM	1.230	Brachyspira mur- dochii DSM 12563T DSM	1.567	Brachyspira mur- dochii DSM 12563T DSM	1.776
	9	Brachyspira intermedia ATCC51140 Evira	1.825	Clostridium tertium 1048_NCTC 541 BOG	1.209	Brachyspira hy- odysenteriae ATCC49526 Evira	1.565	Brachyspira murdochii ATCC700173 Evira	1.766
	10	Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	1.701	Clostridium sordellii 1070_ATCC 9714T BOG	1.207	Brachyspira inter- media AN1707_96 AHVLA	1.434	Brachyspira hy- odysenteriae ATCC31212 Evira	1.671