

## Brachyspira-serie, del 5

# Brachyspirors evolutionära historia – eller varför byter man namn på dem så ofta?

De idag kända spiroketerna utgör en liten huvudutvecklingslinje av bakterier. Bland spiroketer hittar man dock många veterinär- och humanmedicinskt viktiga bakterier. Majoriteten av dessa patogena spiroketer tillhör släktena *Borrelia*, *Brachyspira*, *Leptospira* och *Treponema*. Brachyspiror är viktiga inom veterinärmedicinen och om vilka vi kan förvänta oss en snabb kunskapsökning, eftersom helgenomsekvenser snart kommer att vara tillgängliga.

Tidigare artiklar i brachyspiraserien har varit publicerade i Svensk Veterinärtidning nr 2/07, nr 10/06, nr 13/05 och nr 8–9/05 samt i sex artiklar under åren 2000–2001.



## granskad artikel

### INLEDNING

Bakterier av släktet (genus) *Brachyspira* är tunna, spiralformade och anaeroba organismer, som inte bildar distinkta kolonier på fasta odlingsmedia (Figur 1). Brachyspiror svärmar alltid på agarplattor eftersom de har flageller och är rörliga. Vissa brachyspiror är viktiga tarmpatogener (2, 6), men det har tidigare varit osäkert hur de ska klassificeras. Denna artikel handlar om släktskap

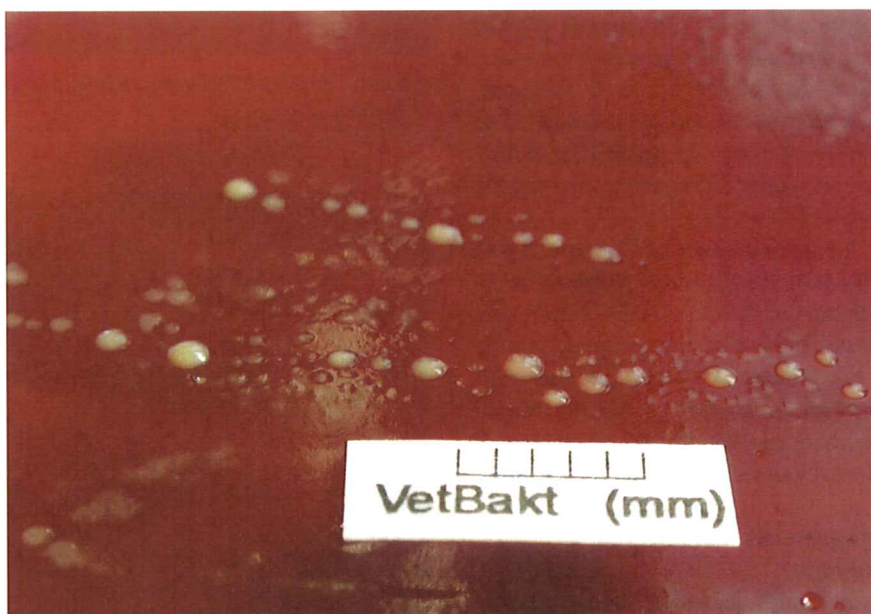


FOTO: KARL-ERIK JOHANSSON OCH THERESE RÅSBÄCK

FIGUR 1. Odling av *Brachyspira hyodysenteriae* på en agarplatta. Runt de större "kolonierna", kan man ana att brachyspirorna också svärmar. Det är därför omöjligt att plocka en koloni som kommer från en enda ursprungscell. Skalstrecket är totalt 5 mm. Källa: [www.vetbakt.se](http://www.vetbakt.se).

inom genus *Brachyspira* samt släktskapet till andra grupper av bakterier.

Eftersom man tidigt insåg att brachyspiror är spiroketer och i viss mån liknar bakterier av genus *Treponema*, placerades de först in under detta släkte (8). Med hjälp av 16S rRNA-sekvensering (15) kunde man dock visa att brachyspirorna bildar en egen grupp av bakterier, som signifikant skiljer sig från släktet *Treponema* (24). Därför fick de det nya släktnamnet *Serpula*, vilket syftade på deras ormlika utseende. Olyckligtvis visade det sig att detta släktnamn redan

användes för brunrötesvampen (hus-svamp), som heter *Serpula lacrymans*, och därför ändrade man släktnamnet till *Serpulina* (22), vilket betyder liten orm. Genom 16S rRNA-sekvensering kunde man också se att dessa bakterier liknade en tidigare beskriven bakterie, som hade isolerats från människa och fått namnet *Brachyspira aalborgi* (11). Till följd av regler för namngivning av bakterier (prioritetsskäl), var man då tvungen att placera in "serpulinorna" under *Brachyspira*, dvs det först föreslagna genusnamnet (18). *Brachyspira* betyder kort spiral ►

- och även detta namn syftar på deras mikromorfologi.

## KLASSIFICERING OCH SUBTYPNING

### Fenotypisk klassificering av brachyspiror

För klassificering och identifiering av brachyspiror använder man ofta ett schema, som är baserat på fem olika fenotypiska egenskaper (5). En egenskap man undersöker är om brachyspiror ger stark eller svag hemolys på blodagar. Den andra egenskapen är förmågan att bryta ner aminosyran tryptofan. Detta undersöks med indoltestet (indol bildas vid nedbrytning av tryptofan). Den tredje egenskapen är förmågan att hydrolysera hippurat (hippursyra). Denna egenskap undersöks med hippurattestet där ninhydrin, som bildar ett blått komplex i närvaro av aminosyror, ingår. Den fjärde och femte egenskapen är förmågan att producera  $\alpha$ -galaktosidas respektive  $\beta$ -glukosidas.

När man undersöker fenotypiska profiler från många olika stammar av en och samma brachyspiraart, hittar man ibland isolat som har oväntade fenotypiska profiler (3). Dessutom kan olika arter ha samma fenotyp. Detta innebär att man inte kan förlita sig enbart på fenotypiska profiler vid artbestämning.

### Fylogenetisk klassificering av bakterier

Fylogenetisk klassificering innebär att man namnger organismer efter deras evolutionära släktskap. Detta kan göras genom att man bestämmer nukleotidsekvensen för en gen, som finns i alla organismer man vill studera (t ex 16S rRNA-genen). Sedan jämför man sekvenserna och beräknar så kallade fylogenetiska (eller evolutionära) träd (15). På grund av att de olika brachyspiraarterna är så nära släkt med varandra kan man inte heller enbart använda sig av 16S rRNA-sekvensering för artbestämning, men man kan dela in dem i fylogenetiska grupper, som är relativt väldefinierade. I kombination med andra metoder kan de sedan artbestämmas.

### Subtypning av bakterier

Traditionellt har serologi använts mycket för subtypning av bakterier och används

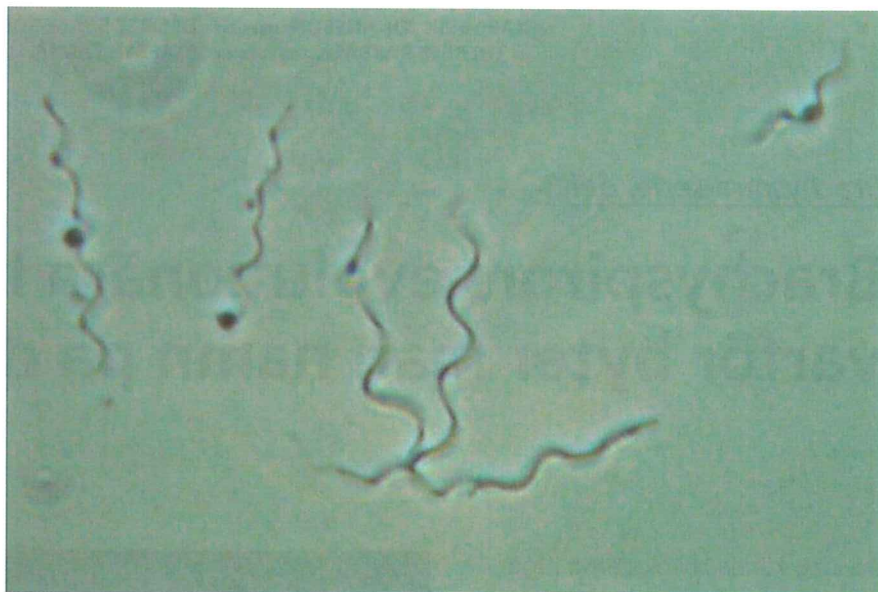


FOTO: KARL-ERIK JOHANSSON

FIGUR 2. Levande *Brachyspira alvinipulli* under faskontrastmikroskopet. Källa: [www.vetbakt.se](http://www.vetbakt.se).

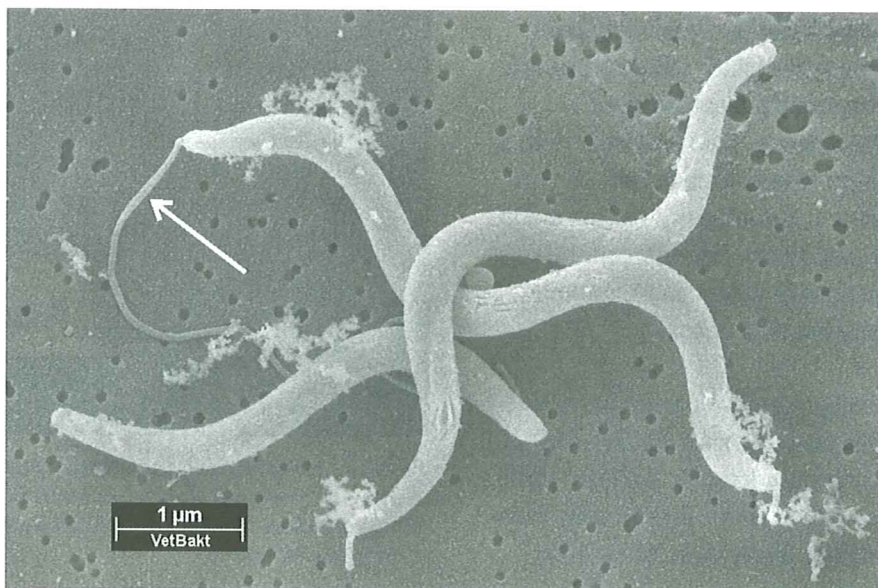


FOTO: TAPPO NIKKILA OCH LEIF LJUNG

FIGUR 3. Svepelektronmikroskopering av *Brachyspira intermedia*. Notera att en av flagellerna (vid pilen) ligger utanför bakteriecellen. Preparationsförfarandet vid elektronmikroskopi kan göra att cellerna går sönder och flageller kan släppas ut. Källa: [www.vetbakt.se](http://www.vetbakt.se).

fortfarande för subtypning av t ex *Salmonella enterica subsp enterica* och *Leptospira* spp i olika serogrupper eller serovarer. Metoder baserade på molekylärbiologiska tekniker har också med stor framgång tillämpats. Man kan indela dessa i sådana som är baserade på restriktionsanalys och på PCR-teknik och dessutom kan man kombinera dessa

metoder. Serologi används inte för subtypning av brachyspiror på grund av korsreaktioner inom släktet, utan det är framför allt följande metoder baserade på DNA-teknologi som används idag: restriktionsenzymanalys (REA) inklusive pulsfältsgelelektrofores (PFGE) (7), "Randomly Amplified Polymorphic DNA" (RAPD) (7), som är baserad på

PCR-teknik och "Multi Locus Sequence Typing" (MLST) (21), som bygger på sekvensanalys av flera olika gener och konstruktion av fylogenetiska träd från de konkatenerade (sammankopplade) gensekvenserna.

## SLÄKTSKAP INOM OCH UTOM GENUS BRACHYSPIRA

### Släktskap till andra bakterier

Spiroketer skiljer sig från andra bakterier i många avseenden och därför har man valt att placera dem inom ett eget fylum (*Spirochaetes*). De har karaktäristiska 16S rRNA-sekvenser, de är tunna, maskliknande och har spiralvriden morfologi (Figur 2 och 3), vilket dock en del andra grupper av bakterier också har. Dessutom har spiroketer interna (periplasmatiska) flageller (så kallade axialfilament), som ger dem rörelseförmåga. Många av dem är svårödlade eller kan inte alls odlas. Man har beskrivit ca 100 olika arter inom detta fylum och mest välkända är de, som är av human- eller veterinärmedicinskt intresse. Exempel på sådana spiroketer är *Borrelia burgdorferi* (ger borrelios, en zoonos), *Leptospira interrogans* (ger leptospiros, också en zoonos) och medlemmar av genus *Brachyspira*, som koloniserar tarmen hos djur och människor (2, 6). Ytterligare exempel är *Treponema pallidum* subsp *pallidum* (ger syfilis) och *Treponema denticola*, som ger infektioner i tandfickor. Närbesläktade organismer, som ännu inte har fått egna artnamn, *Treponema* spp, har föreslagits orsaka digital dermatit hos nötkreatur (10, 19). Spiroketerna består av en enda klass, som i sin tur består av en ordning, som har delats upp i tre familjer (se Tabell 1). Familjerna *Brachyspiraceae* (tidigare *Serpulinaceae*), *Leptospiraceae* och *Spirochaetaceae* består av ett, två respektive nio olika släkten.

Spiroketers släktskap med andra bakterier framgår av det evolutionära trädet i Figur 4, vilket visar att spiroketer inte är nära besläktade med andra spiralformade bakterier som till exempel *Helicobacter* spp och *Spiroplasma* spp. Dessa bakterier hör till fylumen *Proteobacteria* respektive *Firmicutes*. I detta träd är spiroketerna mest närbesläktade med medlemmar av fylum

*Actinobacteria*. Grenordningen i trädet kan förändras om man lägger till fler arter och ju fler arter man har med, desto större sannolikhet är det att trädet återspeglar arternas verkliga släktskap. Sekvenslikheten i 16S rRNA-genen mellan genus *Brachyspira* och andra genus inom fylum *Spirochaetes* varierar mellan 75 och 78 procent. Sekvenslikheten till arter inom andra fyla är lägre och varierar mellan 72 och 77 procent. Man brukar säga att bakterier som har en sekvenslikhet överstigande 97 procent i 16S rRNA-genen troligen tillhör samma bakterieart. Detta stämmer inte alltid och ibland vill man sätta gränsen vid 99 procent (eller ännu högre) och väga in även andra kriterier (exempelvis sjukdomsframkallande förmåga) för att definiera en art. Spiroketerna representerar ett relativt litet fylum med sina cirka 100 arter, vilket kan jämföras med till exempel *Proteobacteria*, som består av cirka 2 000 arter. Det kan bero på att spiroketer är svårödlade och att man troligen bara har kunnat odla en bråkdel av de spiroketer som finns i naturen.

### Nya arter inom genus *Brachyspira*

Artbegreppet för bakterier skiljer sig väsentligt från artbegreppet för högre organismer (15). Rent generellt kan man säga att ju fler stammar man isolerar och karaktäriserar inom närbesläktade bakteriearter, desto svårare blir det att definiera gränslinjen mellan de närbesläktade arterna. Då kan man ibland utnyttja möjligheten att definiera underarter, vilket dock ännu inte har gjorts inom genus *Brachyspira*. Det finns

egentligen inga skarpa gränser i naturen utan övergångar till nya arter är (eller har varit) kontinuerliga. Detta faktum är speciellt tydligt för bakterier, eftersom de har korta generationstider och dessutom är haploida.

Det händer att man hittar *Brachyspira*-stammar som avviker från det biokemiska typnings-schemat, och de brukar analyseras genom bland annat 16S rRNA-sekvensering. Ibland erhålls då resultat som visar att dessa stammar representerar nya arter inom genus *Brachyspira*. Vi har vid flera tillfällen hittat fenotypiskt och fylogenetiskt avvikande isolat från kråkfåglar (14). Ett av dem finns med i trädet i Figur 4 och är där markerat med fet röd stil. Trädet visar att denna stam är avvikande och sekvenslikheten i 16S rRNA till övriga brachyspiror endast är cirka 94 till 97 procent, dvs denna stam representerar med stor sannolikhet en ny art. Den kliniska betydelsen av detta fynd är hittills okänd, men det är intressant att konstatera att speciellt vissa ordningar av fåglar tycks härbärgera en rik flora av brachyspiror i sin tarm och att de kan utgöra en reservoar för brachyspiror och eventuellt vara deras naturliga värd. Man har visat att gräsänder, kråkfåglar och värphöns har många olika genetiska varianter av brachyspiror i tarmfloran och det kan ibland vara mycket arbetskrävande att isolera rena stammar av dessa långsamväxande, kräsna och svärmande bakterier (12–14).

### Brachyspirornas inbördes släktskap

Alla medlemmar av genus *Brachyspira* ►

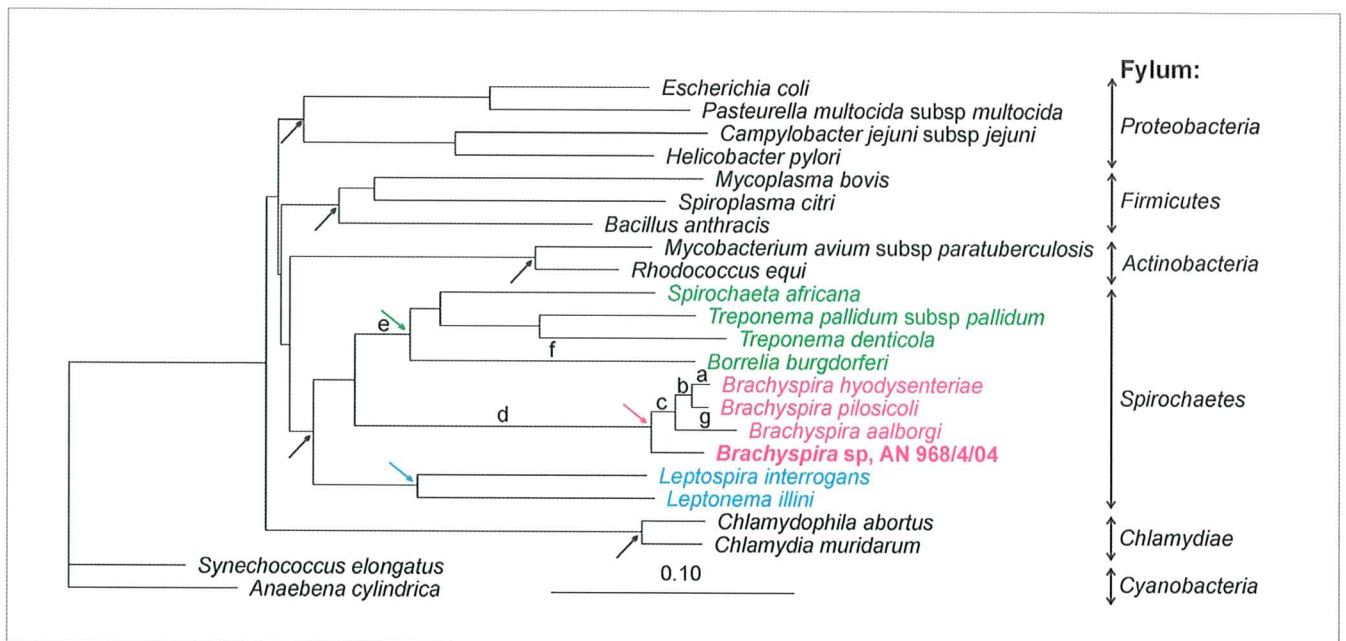
Tabell 1. KLASSIFICERING AV BRACHYSPIROR MED *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* SOM EXEMPEL.

Kategori	Category (Eng)	Taxon	Antal arter <sup>1</sup>
Domän	Domain	Bacteria	cirka 7000
Fylum	Phylum	Spirochaetes	cirka 100
Klass	Class	Spirochaetes	cirka 100
Ordning	Order	Spirochaetales	cirka 100
Familj	Family	Brachyspiraceae <sup>2</sup>	7
Släkte (eller genus)	Genus	Brachyspira	7
Art	Species	B hyodysenteriae	1
Underart	Subspecies	Ej definerad <sup>3</sup>	-

<sup>1</sup> Arter och underarter med officiellt vedertagna namn.

<sup>2</sup> Denna familj hette tidigare Serpulinaceae.

<sup>3</sup> Underarter finns inte definierade för någon art inom genus *Brachyspira*.



FIGUR 4. Evolutionärt träd baserat på sekvensanalys av 16S rRNA-genen, som visar fylogenetiska relationer mellan spiroketer och andra bakterier. Bakterier representerande viktiga fyla (dubbelpilar) inom veterinärmedicinen är inkluderade. *Anaebena cylindrica* (en cyanobakterie) har använts som utgrupp. Alla fyla som inte ingår i utgruppen är monofyletiska, dvs har en gemensam stamfader som inte delas med någon representant för andra fyla. Dessa stamfäder representeras i trädet av interna noder och är markerade med pilar. De tre olika familjerna inom spiroketerna [Brachyspiraceae (rödmarkerade), Leptospiraceae (blåmarkerade) och Spirochaetaceae (grönmarkerade)] bildar också monofyletiska grupper. Motsvarande noder är markerade med färgade pilar i trädet. Citationstecken används för artnamn som inte är officiellt erkända. Skaltrecktet representerar 100 nukleotids substitutioner per 1 000 positioner (90 % sekvenslikhet). Man kan alltså se att sekvenslikheten mellan *B. hyodysenteriae* och *B. aalborgi* är cirka 96 procent (motsvarar a + b + g i trädet) medan den är endast cirka 70 procent (motsvarar a + b + c + d + e + f i trädet) mellan *B. hyodysenteriae* och *Borrelia burgdorferi*. För mer information om fylogenetiska träd, se (15).

► liknar varandra mycket och några av arterna är så lika att de med vissa kriterier (t ex 16S rRNA-sekvenser), skulle kunna betraktas som samma art. De stammar som är mest avvikande när det gäller 16S rRNA-sekvensen är de som kommer från kråkfåglar. Likheten är ändå tillräckligt hög för att man med dagens kunskap ska kunna säga att de tillhör genus *Brachyspira*.

Inom genus *Brachyspira* har man beskrivit sju arter som har fått officiellt vedertagna namn, men ytterligare fyra arter har rapporterats i litteraturen eller i GenBank (se Tabell 2). Vi har också isolerat sådana kandidater, varav kråkfågelsolaten utgör en. Sekvenslikheterna mellan typstammarna inom genus *Brachyspira* varierar mellan 96,0 och 99,5 procent, men om man utesluter *B. aalborgi*, så varierar sekvenslikheterna mellan 98,2 och 99,5 procent. Det vill säga enligt 16S rRNA-kriteriet skulle återstående taxa egentligen inte räknas

som egna arter. Figur 5 visar fylogenetiska relationer inom genus *Brachyspira* och man kan konstatera att arterna *B. aalborgi*, *B. alvinipulli*, "*B. canis*", *B. pilosicoli*, "*B. pulli*" och kråkfågelsolaten bildar monofyletiska kluster (aalbo, alvi, canis, pilo, pulli respektive corvi), som är markerade med svarta dubbelpilar i Figur 5. Det betyder att de har varsin gemensam stamfader som inte delas med några andra arter (enkelpilar i Figur 5). Grenarna i detta träd är dock korta och topologin är därför inte helt stabil. Det är alltid önskvärt att ett taxon (art, genus, familj och så vidare) representeras av ett monofyletiskt kluster. *B. innocens* och *B. murdochii* bildar tillsammans ett monofyletiskt kluster (inno), men det är omöjligt att skilja på de båda arterna genom 16S rRNA-sevensering, eftersom ingen av dem bildar ett eget monofyletiskt kluster trots relativt långa grenar. Sekvenslikheterna inom klustret inno ligger mellan 99,2 och 99,7 pro-

cent. Sekvenslikheterna inom det monofyletiska klustret hyo (*B. hyodysenteriae*, *B. intermedia* och "*B. suanatina*") är också mycket höga (99,2 – 100 %), se även Figur 6. Alla stammar av "*B. suanatina*" har dock två gemensamma och unika nukleotidpositioner, som skiljer denna föreslagna art från stammar av *B. hyodysenteriae* och *B. intermedia*.

Två av brachyspiraisolaten från kråkfåglar (corvi-klustret) finns med i trädet i Figur 5 (markerade med fet stil) och här syns tydligt att dessa brachyspiror är de mest avvikande inom släktet *Brachyspira*. Vi har visat att dessa kråkfågelsolat har samma region av sex tymidin i rad i början av 16S rRNA-genen (se Figur 3A i referens 15) som även alla hittills sekvenserade stammar av *B. pilosicoli* har. Trots det är inte sekvenslikheten med *B. pilosicoli* större än ca 97 procent (14). Detta har dock praktisk betydelse eftersom ett diagnostiskt PCR-system för *B. pilosicoli* är base-

Tabell 2. GODKÄNDA OCH FÖRESLAGNA ARTER INOM GENUS BRACHYSPIRA.

Art	Fylogenetiskt kluster	Typ- eller referensstam	Huvudsakligt värdjur	Sjukdom	Referens
<i>B aalborgi</i>	aalbo	513A <sup>T</sup>	Människa	Intestinal spiroketos	(11)
<i>B alvinipulli</i>	alvini	C1 <sup>T</sup>	Tamhöns	Tarmsjukdom, produktionsstörning	(25)
" <i>B canis</i> " <sup>1</sup>	canis	A2 <sup>R</sup>	Hund	Ej rapporterat	(1)
<i>B hyodysenteriae</i>	hyo	B78 <sup>T</sup>	Gris	Svindysenteri	(8)
(" <i>B ibaraki</i> ") <sup>2</sup>	aalbo	HIS24/11/99 <sup>R</sup>	Människa	Ej rapporterat	AB079583 <sup>3</sup>
<i>B innocens</i>	inno	B256 <sup>T</sup>	Gris	Ej rapporterat	(16)
<i>B intermedia</i>	hyo	PWS/A <sup>T</sup>	Gris	Tarmsjukdom, produktionsstörning (tamhöns)	(23)
<i>B murdochii</i>	inno	56-150 <sup>T</sup>	Gris	Ej rapporterat	(23)
<i>B pilosicoli</i>	pilo	P43/6/78 <sup>T</sup>	Gris	Spiroketal diarré (gris), tarmsjukdom, produktionsstörning (tamhöns)	(26)
" <i>B pulli</i> " <sup>1</sup>	pulli	Ej definierad	Tamhöns	Eventuell produktionsstörning	(17)
" <i>B suanatina</i> " <sup>1</sup>	hyo	AN4859/03 <sup>R</sup>	Gris, gräsand	Tarmsjukdom hos gris	(20)

<sup>1</sup> "*B canis*", "*B pulli*" och "*B suanatina*" har ännu inte godkänts som namn av den internationella kommittén för bakteriers klassificering och skrivs därför inom citationstecken.

<sup>2</sup> "*Brachyspira ibaraki*" kommer troligen inte att godkännas eftersom man inte på ett godtagbart sätt har visat att den verkligen representerar en ny art.

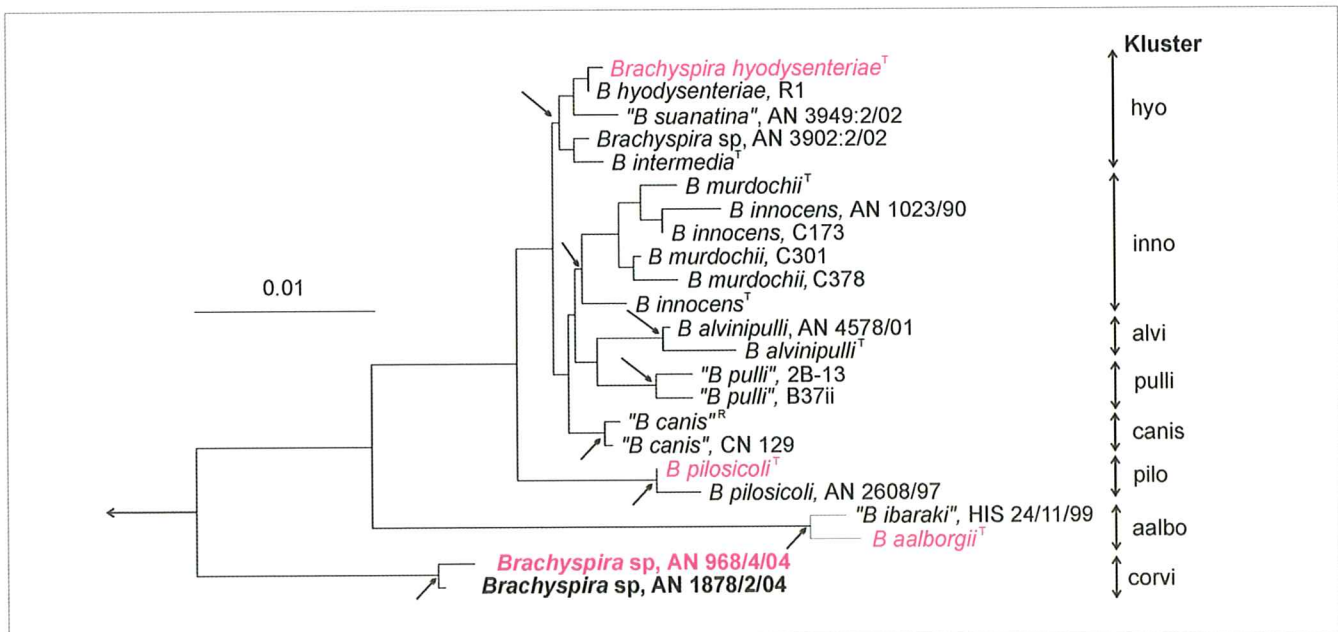
<sup>3</sup> Accessionsnummer till en 16S rRNA-sekvens, som finns rapporterad i GenBank.

rat på 16S rRNA-genen och en av de primers som används är komplementär till denna region (4). Det finns alltså risk för falskt positiva PCR-resultat med dessa kråkfågelstammar och det är därför viktigt att kartlägga deras förekomst.

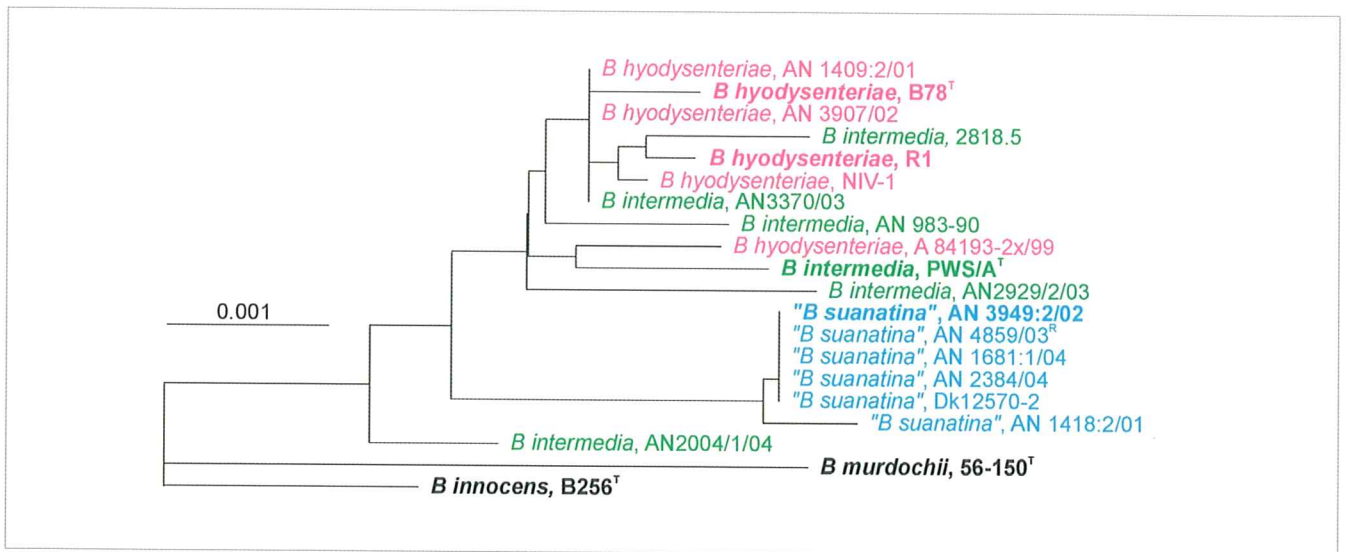
### NADH-oxidasgenen hos brachyspiror

Brachyspiror är anaeroba men syretoleranta tack vare att de har enzymet NADH-oxidas. Genen för NADH-oxidas (den så kallade nox-genen) har

använts mycket inom brachyspiraforskning. Man har dels konstruerat PCR-system baserade på denna gen och den har också använts för fylogenetiska studier. Man har dock inte kunnat konstruera primers som kan användas för



FIGUR 5. Evolutionärt träd baserat på sekvensanalys av 16S rRNA-genen, som visar fylogenetiska relationer inom genus *Brachyspira*. De arter som också finns med i Figur 4 är markerade i rött. Man kan urskilja ett antal mer eller mindre distinkta kluster, som markeras med vertikala dubbelpilar. Klustren *pilo*, *aalbo* och *corvi* är speciellt distinkta och separeras från övriga brachyspiror med långa grenar. Resten av klustren är mindre distinkta och därmed blir topologin i dessa delar av trädet mer instabil. Det betyder att om man lägger till nya arter i trädet eller byter utgrupp, kan grenordningen förändras. *Hyo*-klustret är expanderat i Figur 6. *Brachyspira*-stammar från kråkfåglar, som troligen representerar en ny art är markerade med fet stil (klustret *corvi*). *Borrelia burgdorferi* har använts som utgrupp, men utgruppen har inte inkluderats i trädet. Skalstrecket representerar tio nukleotidsubstitutioner per 1000 positioner (99% sekvenslikhet).



FIGUR 6. Dendrogram som illustrerar nukleotidskillnader i 16S rRNA inom hyo-klustret, som består av arterna *B hyodysenteriae* (rödmarkerade), *B intermedia* (grönmarkerade) och "*B suanatina*" (blåmarkerade) (Tabell 3). Dendrogrammet är konstruerat på samma sätt som ett fylogenetiskt träd (15), men det innehåller alltför få nukleotidskillnader för att man ska kunna säga att det återspeglar fylogenetiska relationer. De stammar som också finns med i Figur 5 är markerade i fet stil. Notera att stammarna av "*B suanatina*" bildar ett monofyletiskt subkluster inom hyo-klustret, medan *B hyodysenteriae*- och *B intermedia*-stammarna inte bildar sådana kluster. *Brachyspira innocens* och *B murdochii* har använts som utgrupp. Skaltreckat representerar en nukleotidsubstitution per 1 000 positioner (99,9% sekvenslikhet).

- amplifiering av denna gen från alla brachyspiror, dvs man kan inte använda den för konstruktion av ett universellt träd. De fylogenetiska träd som konstrueras från de arter och stammar som man kan generera PCR-produkter ifrån, tycks dock mycket väl återspegla dessa arters taxonomi (7).

#### Släktskap mellan stammar inom samma art

För epidemiologiska studier är det nödvändigt att kunna skilja på olika varianter av en och samma bakterieart, dvs att kunna subtypa bakterien för att göra smittspårning. Sekvensanalys av 16S rRNA är i allmänhet inte lämpligt för sådana studier eftersom den genomsnittliga variabiliteten i 16S rRNA-genen inte är tillräckligt stor. Det finns dock undantag. Man har t ex visat att det går att subtypa *Mycoplasma capricolum* subsp *capripneumoniae*, som orsakar elakartad lungsjuka hos get, genom 16S rRNA-sekvensering, därför att variabiliteten i 16S rRNA-genen är ovanligt stor hos denna art (9). Figur 6 visar att variabilitet också förekommer i 16S rRNA-genen inom en art av genus *Brachyspira*. Metoden kan därför användas för sub-

typning av *Brachyspira*-arter till en viss nivå även om den taxonomiska upplösningens förmågan inte alls är så stor som för t ex RAPD, RFLP, AFLP (amplified fragment length polymorphism) och MLST.

#### DATABASER

##### Stamdatabas för *Brachyspira*-stammar

För att underlätta för forskare som är intresserade av biodiversitet hos medlemmar av genus *Brachyspira*, arbetar vi med utveckling av en databas för detta genus. Denna databas innehåller information om brachyspirastammar som har karakteriserats genom sekvensanalys av 16S rRNA och eventuella andra gener. Informationen omfattar bland annat relevanta litteraturreferenser, accessionsnummer för sekvenser deponerade i GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), fylogenetisk tillhörighet och fenotypisk profil. Databasen blev allmänt tillgänglig under år 2006 och kan nås från webb-platsen [www.brachyspira.se](http://www.brachyspira.se) för "Swedish *Brachyspira* Working Group" (SBWG) under länken "Strain Database". Mer allmän information om spiroketer kan man hitta i databasen VetBakt

([www.vetbakt.se](http://www.vetbakt.se)) där man också kan hitta bilder på andra brachyspiror än de som visas i Figur 1, 2 och 3.

##### Helgenomsekvensering av brachyspiror

När föregående artikel i *Brachyspira*-serien skrevs (15), fanns inga helgenomsekvenser officiellt rapporterade ([www.genomesonline.org](http://www.genomesonline.org)) för brachyspiror. Nu har man rapporterat *B murdochii* som pågående projekt och det finns ytterligare några sådana *Brachyspira*-genomprojekt. Teknikutvecklingen inom området har varit mycket snabb och därför kan vi räkna med att ha flera arter och stammar av brachyspiror sekvenserade inom några få år. När vi får tillgång till dessa helgenomsekvenser kommer kunskapen om brachyspiror att öka snabbt eftersom vi då får helt nya verktyg för att leta efter exempelvis patogenicitetsmekanismer (15).

Orsaken till alla namnändringar på brachyspirorna är att man inte har haft tillräcklig kunskap om deras evolutionära historia. Det finns risk för fler namnändringar inom detta genus, när tillräckligt många genomsekvenser blir kända, vilket även gäller för andra bak-

Tabell 3. BRACHYSPIRA-STAMMAR SOM HAR ANVÄNTS I DENDROGRAMMET I FIGUR 6.

Art	Stam	Acc Nr <sup>1</sup>	Värdjur	Land
<i>B. hyodysenteriae</i>	B78 <sup>T</sup>	U14930	Gris	USA
<i>B. hyodysenteriae</i>	A 84193-2x/99	DQ922564	Gris	Tyskland
<i>B. hyodysenteriae</i>	AN 1409:2/01	AY352281	Gräsand	Sverige
<i>B. hyodysenteriae</i>	AN 3907/02	AY352287	Gräsand	Sverige
<i>B. hyodysenteriae</i>	R1	U23035	Nandu	USA
<i>B. hyodysenteriae</i>	NIV-1	U23036	Nandu	USA
<i>B. intermedia</i>	PWS/A <sup>T</sup>	EF488166	Gris	Storbritannien
<i>B. intermedia</i>	2818.5	U23029	Gris	Australien
<i>B. intermedia</i>	AN 983-90	U14933	Gris	Sverige
<i>B. intermedia</i>	AN 3370/03	EF164965	Höna	Sverige
<i>B. intermedia</i>	AN 2929/2/03	EF164964	Höna	Sverige
<i>B. intermedia</i>	AN 2004/1/04	EF164970	Höna	Sverige
" <i>B. suanatina</i> "	AN 4859/03 <sup>R</sup>	DQ473575	Gris	Sverige
" <i>B. suanatina</i> "	AN 1681:1/04	DQ473576	Gris	Sverige
" <i>B. suanatina</i> "	AN 2384/04	DQ473577	Gris	Sverige
" <i>B. suanatina</i> "	Dk12570-2	DQ473578	Gris	Danmark
" <i>B. suanatina</i> "	AN 3949:2/02	AY352290	Gräsand	Sverige
" <i>B. suanatina</i> "	AN1418:2/01	AY352282	Gräsand	Sverige
<i>B. murdochii</i>	56-150 <sup>T</sup>	AY312492	Gris	Kanada
<i>B. innocens</i>	B256 <sup>T</sup>	U14920	Gris	USA

<sup>1</sup> Accessionsnummer till 16S rRNA-sekvensen i GenBank (www.nlm.nih.gov).

terier. Med dagens snabba kunskapsutveckling har taxonomin blivit en dynamisk och flexibel vetenskap. Det kan vara till visst besvär för dagens kliniker, men det kommer att vara till hjälp för dem som är verksamma i framtiden.

#### TACK

Ett varmt tack till Marianne Persson för sekvensanalyser och till Ulla Zimmerman för odlingar och biokemiska tester. Forskningsprojekt rörande betydelsen av biodiversitet inom genus *Brachyspira* för diagnostik, epidemiologi och patogenicitet har ekonomiskt stöd från Formas och Stiftelsen Lantbruksforskning.

#### SUMMARY

The evolutionary history of brachyspiras – or why are their names changed so often?

Today, classification (taxonomy) of bacteria is primarily based on their phylogeny (evolutionary history), which can be determined by sequence analysis of the 16S rRNA gene. This approach has revolutionized bacterial taxonomy and many species have been reclassified and their names have been changed. Members of the genus *Brachyspira*,

which were originally affiliated to the genus *Treponema*, have been reclassified and renamed several times. Seven species have now been described with officially approved species names and four other species names have been suggested.

For this review article, we have used 16S rRNA sequence data published by us or by other authors to construct evolutionary trees to illustrate phylogeny and biodiversity within the brachyspiras. Bacterial strains are usually regarded as different species if the sequence difference in the 16S rRNA genes exceeds 3%. Among the approved and suggested species within genus *Brachyspira*, it is only *B. aalborgi* which fulfills that criterion. However, some of the brachyspiras (for instance *B. canis* and *B. pilosicoli*) still form distinct monophyletic clusters in evolutionary trees and phylogenetic analysis can therefore be used for identification of some of the species. Some orders of birds harbour many different brachyspiras in their intestinal tract and may represent a natural host for these bacteria. Brachyspiras, which most probably represent new species, have recently been isolated.

#### Referenser

- Duhamel GE, Trott DJ, Muniappa N, Mathiesen MR, Tarasiuk K, Lee JI & Hampson DJ. Canine intestinal spirochetes consist of *Serpulina pilosicoli* and a newly identified group provisionally designated "*Serpulina canis*" sp nov. *J Clin Microbiol*, 1998, 36, 2264–2270.
- Fellström C. Intestinala spiroketal infektioner hos människor och djur. Del I. *Svensk VetTidn*, 2000, 52, 817–820.
- Fellström C, Karlsson M, Pettersson B, Zimmerman U, Gunnarsson A & Aspán A. Emended descriptions of indole negative and indole positive isolates of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Vet Microbiol*, 1999, 70, 225–238.
- Fellström C, Pettersson B, Thomson J, Gunnarsson A, Persson M & Johansson K-E. Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *J Clin Microbiol*, 1997, 35, 462–467.
- Fellström C, Pettersson B, Uhlén M, Gunnarsson A & Johansson K-E. Phylogeny of *Serpulina* based on sequence analyses of the 16S rRNA gene and comparison with a scheme involving biochemical classification. *Res Vet Sci*, 1995, 59, 5–9.
- Fellström C, Råsbäck T, & Gerth Löfstedt M. Svindysenteri i Sverige – historik, bekämpning och framtidsutsikter. Del 1. *Svensk VetTidn*, 2005, 57, 8–9, 19–24.
- Fellström C, Råsbäck T, Johansson K-E, Olofsson T & Aspán A. Identification and genetic fingerprinting of *Brachyspira* species. *J Microbiol Methods*, 2008, 72, 133–140.
- Harris DL, Glock RD, Christensen CR & Kinyon JM. Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease. *Vet Med Small Anim Clin*, 1972, 67, 61–64.
- Heldtander M, Wesonga H, Bölske G, Pettersson B & Johansson K-E. Genetic diversity and evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp *capripneumoniae* strains from eastern Africa assessed by 16S rDNA sequence analysis. *Vet Microbiol*, 2001, 78, 13–28.
- Hillström A & Bergsten C. Digital dermatit – en tickande bomb i svenska lösdrifter. *Svensk VetTidn*, 2005, 57, 15–20.
- Hovind-Hougen K, Birch-Andersen A, Henrik-Nielsen R, Orholm M, Pedersen JO, Teglbjaerg PS & Thaysen EH. Intestinal spirochetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi* gen nov, sp nov. *J Clin Microbiol*, 1982, 16, 1127–1136.
- Jansson DS, Fellström C, Råsbäck T, Vågsholm I, Gunnarsson A, Ingermaa F, & Johansson K-E. Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp isolated from laying

- hens in different housing systems. *Vet Microbiol*, 2008, in press.
13. Jansson DS, Johansson K-E, Olofsson T, Råsbäck T, Vågsholm I, Pettersson B, Gunnarsson A, & Fellström C. *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly beta-haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). *J Med Microbiol*, 2004, 53, 293–300.
  14. Jansson DS, Johansson K-E, Zimmerman U, Gunnarsson A & Fellström C. Intestinal spirochaetes isolated from jackdaws, hooded crows and rooks (Genus *Corvus*). In: Proceedings of the Third International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Parma, Italy, 2005, abstract no. 11.
  15. Johansson K-E, Pringle M, Jansson DS, Tamm S, Råsbäck T & Fellström C. Bakteriers taxonomi och fylogeni – eller varför byta namn på bakterier? *Svensk VetTidn*, 2007, 59, 2, 11–19.
  16. Kinyon JM & Harris DL. *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae*. *Int J Syst Bacteriol*, 1979, 29, 102–109.
  17. McLaren AJ, Trott DJ, Swayne DE, Oxberry SL & Hampson DJ. Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chickens and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. *J Clin Microbiol*, 1997, 35, 412–417.
  18. Ochiai S, Adachi Y & Mori K. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* comb nov, *Brachyspira innocens* comb. nov. and *Brachyspira pilosicoli* comb. nov. *Microbiol Immunol*, 1997, 41, 445–452.
  19. Read DH, Walker RL & Castro AE. An invasive spirochaete associated with interdigital papillomatosis of dairy cattle. *Vet Rec*, 1992, 130, 59–60.
  20. Råsbäck T, Jansson DS, Johansson K-E & Fellström C. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp nov. *Environ Microbiol*, 2007, 9, 983–991.
  21. Råsbäck T, Johansson K-E, Jansson DS, Fellström C, Alikhani MY, La T, Dunn DS, & Hampson DJ. Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes within the genus *Brachyspira*. *Microbiology*, 2007, 153, 4074–4087.
  22. Stanton TB. Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen nov containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb nov and *Serpulina innocens* comb nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1992, 42, 189–190.
  23. Stanton TB, Fournie-Amazouz E, Postic D, Trott DJ, Grimont PA, Baranton G, Hampson DJ & Saint Girons I. Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp nov and *Serpulina murdochii* sp nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47, 1007–1012.
  24. Stanton TB, Jensen NS, Casey TA, Tordoff LA, Dewhirst FE & Paster BJ. Reclassification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a new genus, *Serpula* gen nov, as *Serpula hyodysenteriae* comb nov and *Serpula innocens* comb nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41, 50–58.
  25. Stanton TB, Postic D & Jensen NS. *Serpulina alvinipulli* sp nov, a new *Serpulina* species that is enteropathogenic for chickens. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, 48, 669–676.
  26. Trott DJ, Stanton TB, Jensen NS, Duhamel GE, Johnson JL & Hampson DJ. *Serpulina pilosicoli* sp nov, the agent of porcine intestinal spirochetosis. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46, 206–215.

---

**\*KARL-ERIK JOHANSSON**, professor, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, Sveriges Lantbruksuniversitet, Box 7009, 750 07 Uppsala och Enheten för bakteriologi, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 751 89 Uppsala.

**DÉSIRÉE JANSSON**, leg veterinär, Enheten för djurhälsa och antibiotikafrågor, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 751 89 Uppsala.

**MÄRIT PRINGLE**, leg veterinär, VMD, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, Sveriges Lantbruksuniversitet, Box 7009, 750 07 Uppsala.

**THERESE RÅSBÄCK**, leg veterinär, VMD, Enheten för bakteriologi, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 751 89 Uppsala.

**STAFFAN TAMM**, fil dr, Staben för vetenskap och kvalitet, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 751 89 Uppsala.

**CLAES FELLSTRÖM**, leg veterinär, professor, Institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges Lantbruksuniversitet, Box 7054, 750 07 Uppsala.