



Slutrapport

Nya behandlingsmetoder för att minska tillväxthämning hos grisar med spiroketal diarré

Projektnummer: O-15-20-532

Projektperiod: 160701-190630 med förlängning till 201231

Huvudsökande:

Anna Rosander, Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), anna.rosander@slu.se

Medsökande:

Annette Backhans, Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) (tidigare SLU)

Lena Eliasson-Selling, Gård- och djurhälsan

Bengt Guss, SLU

Stefan Roos, SLU

Therese Råsbäck, anställd på en veterinärklinik i Storbritannien (tidigare SVA)

Del 1: Utförlig sammanfattning

The aim and goal of the project was to gain new knowledge about spirochetal diarrhea in pigs, a disease caused by the spirochete bacterium *Brachyspira pilosicoli*, that may be used to develop preventive treatments such as probiotics and vaccines. The disease is currently treated with antibiotics but, unfortunately, today we see an increased incidence of resistance in the bacterium, multi-resistant strains have been found in Sweden and the disease may be difficult to treat in the near future. Therefore, the need for new ways to prevent the disease arises. Pathogenesis mechanisms in *B. pilosicoli* are unknown but on histological sections and scanning electron microscope images the bacteria can be seen attached with one end to intestinal cells.

In this study, phage display, in combination with a new deep sequencing method and a custom-made Python script, was used to identify proteins of *B. pilosicoli* that the bacterium uses to attach to the intestinal mucosa. Knowledge on this process may be used to find ways to block the binding and thereby prevent the onset of symptoms. Sixty-one strains of *Lactobacillus* isolated from pigs were characterized with regard to antibiotic resistance, ability to bind mucus, and stress tolerance to low pH and bile, in order to select a smaller number of strains that are suitable to investigate as potential

Projekt har fått finansiering genom:



probiotics. These strains could then be tested in an intestinal epithelial cell line model for their potential effect on *B. pilosicoli* binding to the epithelial cells. A cell culture model was set up where we could measure how *Brachyspira* bacteria affect the permeability of a confluent and differentiated (fully developed) cell layer of either Caco-2 or IPEC-J2 (both intestinal epithelial cell lines, the former of human origin and the latter isolated from pig).

A number of phage display experiments and bioinformatics studies were performed, as well as the production and testing of potentially interesting *B. pilosicoli* protein candidates, unfortunately without being able to detect any specific binding between bacterial proteins and host proteins. Control experiments using other bacteria showed that the methods used worked, but either *B. pilosicoli* doesn't bind to host proteins on intestinal cells, or the conditions in the laboratory setting were unfavorable for binding to occur. Other methods which may open up increased opportunities to move forward in this area in future studies include large-scale sequencing techniques and bioinformatics analysis, both under constant development.

Sixty-one *Lactobacillus* strains isolated from pig feces were characterized for antibiotic susceptibility, low pH and bile/bile salts tolerance, and mucus binding to evaluate their use as potential probiotics. Eight strains showed characteristics that make them interesting as potential probiotics for the use in pigs. These strains were sensitive to all antibiotics tested, seven strains showed tolerance to both low pH and bile/bile salts but did not bind mucus, and one strain showed tolerance to low pH and binding to mucus but did not tolerate bile salts well. These strains were selected for further experiments with *B. pilosicoli*, and other *Brachyspira* species in the cell culture model, where the ability of lactobacilli to counteract any adverse effects by *Brachyspira* on the intestinal epithelium can be evaluated, but are also of general interest for further studies on probiotics in pigs.

A cell culture model was set up in which intestinal permeability changes was measured by transepithelial electric resistance (TEER). Due to the technical challenges with maintaining the cell culture through several days of measurements and the specific difficulties in using the anaerobic slow-growing *B. pilosicoli*, we were not able to evaluate the lactobacilli strains within the time frame of this project. Evaluation of another model was initiated where binding of *Brachyspira* bacteria to epithelial cell lines grown in Lab-Tek II chambers (glass slides with attached culture chambers that can easily be removed, after which host cells and bacteria attached to the slide can be studied under a microscope). This model may present an alternative way to test interactions between intestinal epithelial cells, *B. pilosicoli* and lactobacilli in future projects.

In conclusion, various methods were used to find protein bindings between *B. pilosicoli* and intestinal cells, none of which showed to be successful. The result from the study may indicate that binding does not occur, but other methods should be used to investigate this further. Eight lactobacilli strains from pigs were found to have characteristics that make them suitable candidates for use as probiotics in pigs.

Del 2: Rapporten (max 10 sidor)

Inledning

Bakgrund och syfte.

Projektets syfte och mål var att utveckla kunskaper om spiroketal diarré hos tillväxtgrisar som i framtiden kan användas för att utveckla förebyggande behandlingar såsom probiotika och vacciner. Spiroketal diarré har låg mortalitet men orsakar stora ekonomiska avbräck för lantbrukaren på grund av hög smittsamhet och negativ påverkan på tillväxten (Jacobson et al., 2003; Wallgren et al., 2013). Sjukdomen orsakas av bakterien *Brachyspira pilosicoli*, som hör till gruppen spiroketer, och behandlas idag med antibiotika. Tyvärr ser vi idag en ökad förekomst av resistens hos bakterien (12% av alla fältisolat är resistenta mot tiamulin och 61% mot tylosin, de mest använda antibiotika mot spiroketal diarré; SWEDRES-SVARM, 2012), multiresistenta stammar har hittats i Sverige och sjukdomen kan i en nära framtid bli svårbehandlad. Därför krävs nya angreppssätt för att förhindra att sjukdomen uppkommer. Kunskaperna om hur *B. pilosicoli* orsakar sjukdom är ofullständiga. Man vet att bakterien är rörlig och tar sig igenom slemlagret som täcker epitelet i tarmen. Där fäster de till tarmcellerna, vilket leder till skador och sönderfall av tarmepitelet. Hur och var på cellen infästningen sker är okänt.

I det här projektet ville vi försöka identifiera proteiner hos *B. pilosicoli* som bakterien använder för att fästa till tarmslemhinnan (adhesionsproteiner). Kunskap om den processen skulle underlätta för att hitta sätt att blockera bindningen och därmed sannolikt förhindra uppkomst av symptom. För detta ändamål skulle en fagdisplayteknik (Jacobsson et al., 2003) användas, som vi med framgång använt för att hitta proteiner hos bakterier av släktet *Treponema*, en annan spiroket (Rosander et al., 2011). Vidare ville vi karaktärisera ett stort antal lactobaciller isolerade från gris med avseende på resistensmönster, effekt på pH, stabilitet etc. för att utvärdera om de är lämpliga kandidater för probiotikautveckling. Dessa skulle användas i en vävnadsmodell för att undersöka om de har någon effekt på adhesionen av *B. pilosicoli* till tarmepitelet. I projektet ingick alltså också att utveckla en tarmvävnadsmodell dels för att studera bindningen av *B. pilosicoli* till tarmslemhinna, dels för att testa effekten av probiotiska bakterier på bindningen. Under projektets gång visade det sig att med den hudvävnadsmodell som gjorts i ett annat projekt rörande bakterier av släktet *Treponema*, och som var tänkt att modifieras för att användas som tarmepitelmodell i det här projektet, var bakteriernas påverkan på vävnaden svår att kvantifiera och det fanns tekniska svårigheter som gjorde att modellen blev osäker att använda. Som alternativ till vävnadsmodellen valde vi att sätta upp en cellodlingsmodell där vi skulle kunna mäta hur *Brachyspira*-bakterier påverkar permeabiliteten hos ett konfluent och differentierat (fullt utvecklat) cellager av antingen Caco-2 eller IPEC-J2 (båda tarmepitelcellinjer, den förra av humant ursprung och den senare isolerad från gris). Modellen har använts tidigare för utvärdering av användning av *Lactobacillus*-stammar som probiotika (Liu et al., 2015).

Material och metoder

Identifiering av adhesionsproteiner

För att identifiera adhesionsproteiner hos *B. pilosicoli* användes en metod som heter fagdisplay. Metoden går ut på att skapa ett bibliotek av bakteriofager som bär olika bakterieproteiner på ytan och där sammantaget samtliga en bakteries proteiner finns representerade. Ur detta bibliotek kan proteiner som binder specifikt (receptor) till exempelvis ett protein hos den värd som bakterien infekterar (ligand), ”fiskas fram” i ett så kallat panningsexperiment (affinitetsselektion). På så sätt kan specifika protein-proteininteraktioner mellan bakterie och värd identifieras. Ett *B. pilosicoli*-fagbibliotek baserat på typstammen P43/6/78 användes i flera panningsexperiment, med olika ligander, för att selektera fram *B. pilosicoli*-proteiner som binder till framför allt tarmepitelet men även till andra proteiner hos värden (gris). Biblioteket pannades mot rena tarmepitelcellinjer (Caco-2 och IPEC-J2), tarmvävnad från olika grisar, rena muciner (glycoproteiner i tarmens slemlager, tillhandahållna från en forskargrupp i Göteborg), kaninserum eller renade kaninantikroppar från kaninserum riktade mot hela *B. pilosicoli*-bakterier, röda blodkroppar från gris och kyckling samt mot renade *B. pilosicoli*-proteiner. Även kontrollpanningar med andra fagbibliotek utfördes, exempelvis bibliotek av *Brachyspira hyodysenteriae* och *Staphylococcus hyicus* pannades mot antikroppar respektive tarmepitelcellinjer. Modifieringar i protokollen för panningsexperimenten gjordes i försök att minska bakgrund i experimenten, så som användningen av bakterielysat från *Escherichia coli* genomgående i panningen för att blockera ospecifik bindning.

I flera av de panningsexperiment som utfördes användes komplexa material som antikroppar, celler och vävnader. I sådana experiment kan bakgrunden bli väldigt hög och det blir svårt att hitta korrekta, relevanta resultat. Därför utvecklades en storskalig sekvenseringsmetod för att få en högre andel data från panningsexperimenten och för att kunna se om korrekta resultat fanns i bakgrunden. En relativt ny sekvenseringsmetod, Nanopore-sekvensering (Deamer et al., 2016), användes och ett egenutvecklat program skrivet i Python för behandling av data. Även bioinformatiska studier av *B. pilosicoli*-genomet (tillgängligt i databaser på internet, exempelvis National Center for Biotechnology Information - NCBI) gjordes för att identifiera proteiner potentiellt viktiga för *B. pilosicoli* i infektionsprocessen (virulensfaktorer). Särskilt analyserades proteiner med avseende på om de innehöll ostrukturerade regioner då dessa visat sig kunna ha en nyckelroll i interaktionen mellan patogen och värd (Blanco et al., 2018).

Rening och karaktärisering av potentiella adhesionsproteiner/virulensfaktorer

Fem *B. pilosicoli*-proteiner identifierades som potentiella adhesionsproteiner/virulensfaktorer och framställdes i stor skala genom att överuttrycka generna för proteinerna i ett *E. coli*-system med rekombinant DNA-teknik. De renade proteinerna användes sedan i experiment för att identifiera bindning till IPEC-J2 celler, till serumkomponenter, till rena värdproteiner som fibronectin och fibrinogen samt genom ytterligare panningsexperiment bindning till bakterien själv, *B. pilosicoli*.

Karaktärisering av Lactobacillus-stammar

Lactobacillus-stammar (61 stycken) som tidigare isolerats från gris och som fanns tillgängliga vid SLU odlades upp från frys och artbestämdes med hjälp av masspektrometri (MALDI-TOF). Dessa stammar karaktäriserades sedan på olika sätt för att identifiera ett mindre antal stammar som potentiellt bra kandidater för användning som probiotika. Dessa stammar skulle ingå i försök i cellodlingsmodellen beskriven nedan. Som ett led i att bestämma vilka stammar som skulle gå vidare i karaktäriserings-processen gjordes en subtypning av 15 stammar, också med hjälp av MALDI-TOF. Om flera stammar av samma art är mycket lika eller identiska skulle det räcka att gå vidare med bara en eller några av varje art. Stammarna karaktäriserades vidare i experiment för att mäta känslighet mot olika antibiotika, tolerans mot lågt pH och gallsalter samt förmåga att binda till mucus. Dessa karaktäristika är avgörande för om stammen har potential för användning som probiotika

Permeabilitet i cellodlingsmodell

Ett cellodlingssystem där genomsläppligheten, permeabiliteten, över cellagret kan mätas sattes upp. Cellinjerna Caco-2 odlades i så kallade transwell-brunnar. I sådana brunnar odlas cellerna på ett membran, de får näring från den basala sidan - ”insidan” - och tillsatser av bakterier eller olika substanser kan ske från den apikala sidan - ”utsidan”. Permeabiliteten av cellagret bestämdes genom att mäta den elektriska resistensen över cellagret (TransEpithelial Electrical Resistance, TEER). TEER kan ändras om cellagret påverkas negativt exempelvis genom tillsats av skadliga bakterier eller substanser, och i det här projektet mättes TEER efter tillsats av olika arter av *Brachyspira*, både patogena (bland andra *B. pilosicoli*) och icke-patogena arter.

Resultat och diskussion

Identifiering av adhesionsproteiner

Ett stort antal panningsexperiment med *B. pilosicoli*-biblioteket samt kontrollpanningar med bibliotek av *B. hyodysenteriae* och *S. hyicus* har genomförts dock utan att hitta några riktigt lovande proteinkandidater för att förklara adhesion av *B. pilosicoli* till tarmepitelet. Framför allt förekom problem med bakgrund i experimenten vilket gjorde det svårt att få fram specifika, äkta proteininteraktioner. I försök att komma till rätta med den höga bakgrunden användes bakterielysat av *E. coli* i panningsexperimenten för att blockera ospecifik bindning men utan positivt resultat. En ny sekvenseringsmetod användes för att få fram större datamängder från panningsexperimenten vilka sedan analyserades med hjälp av ett egenutvecklat Python-script. Detta gjordes för att kunna se om proteiner som medför äkta bindning till celler gömdes bland den ospecifika bakgrunden. Med hjälp av denna metod kunde en proteinkandidat, OppA, identifieras, även om vissa frågetecken kvarstod om det verkligen var en äkta bindning till tarmepitelet. Från kontrollexperimenten med *S. hyicus*-biblioteket kunde vi med denna sekvenseringsmetod identifiera proteiner i *S. hyicus* med redan kända bindningar till cellkomponenter som fibronektin, vilket visade att metoden var användbar för vårt syfte.

Rening och karaktärisering av potentiella adhesionsproteiner/virulensfaktorer

Opp A är ett protein som är en del av ett proteintransportkomplex i *B. pilosicoli* som känner igen och binder korta proteiner, peptider. Homologa proteiner till OppA i *B. pilosicoli* har använts som vaccinkandidater (Movahedi and Hampson, 2010) och i en annan spiroket, *Treponema denticola*, har en homolog visat sig ha fibronektin-bindande egenskaper (Fenno et al., 2000). Samtidigt finns andra rapporter som visar att OppA-homologer i andra bakterier har väldigt lite eller ingen specificitet vad gäller aminosyrasekvensen hos de peptider som proteinet kan binda (Stanfield and Wilson, 1995), vilket innebär att OppA-bärande fager i fagbiblioteket av *B. pilosicoli* skulle kunna binda till väldigt många olika proteiner vid ett panningsexperiment med cellinjer (som innehåller många värdproteiner) och även om bindningen är äkta skulle den ändå vara ospecifik. För att undersöka om OppA i *B. pilosicoli* verkligen binder specifikt till något värdprotein framställdes OppA i större mängd och användes i olika experiment med antingen rena värdproteiner eller mer komplexa material som serum och tarmepitelceller från gris. Dessa experiment kunde inte påvisa någon specifik bindning mellan OppA och strukturer hos värdorganismen.

Då panningsexperimenten inte givit några lovande resultat för att förklara bindningen av *B. pilosicoli* till tarmepitelceller gjordes ett försök att angripa problemet på ett annat sätt, genom bioinformatik. Många olika dataprogram är utvecklade och finns tillgängliga på internet för att analysera de många genomsekvenser som också finns tillgängliga i databaser på internet, även den för *B. pilosicoli*. Denna gång valde vi att leta efter ytproteiner hos *B. pilosicoli* som också innehöll ostrukturerade regioner. Ostrukturerade regioner i proteiner är sådana som saknar en stabil struktur och som kan anta olika strukturer vilket ger flexibilitet och underlättar interaktion med andra molekyler. Om sådana proteiner sitter på ytan finns möjligheten att de binder strukturer hos värdorganismen. Fyra kandidater valdes ut och framställdes i större mängd och genomgick samma undersökningar som OppA men utan framgång.

Varför vi har mött så stora svårigheter i våra försök att identifiera de proteiner hos *B. pilosicoli* som skulle kunna vara involverade i bindningen till grisens tarmepitelceller har vi inget bra svar på i nuläget. Det är möjligt att *B. pilosicoli* har relativt få adhesionsproteiner/virulensfaktorer och att de som finns kräver andra betingelser eller ytterligare faktorer, vilka inte har tillgodosetts, eller inte kan tillgodoses, i panningsexperimenten och de övriga bindningsexperimenten, så att interaktion med proteiner eller andra strukturer kan ske. Det kan också vara så att vi inte har använt rätt material, rätt ligand, i våra experiment för att försöka identifiera bindning. *B. pilosicoli* är en heterogen art där virulensen troligen är olika mellan olika stammar, och det är möjligt att vi hade fått andra resultat med ett fagbibliotek baserat på en annan stam av *B. pilosicoli*.

Karaktärisering av Lactobacillus-stammar

Ett 60-tal *Lactobacillus*-stammar undersöktes med olika metoder för att ta fram ett litet antal kandidater som har lämpliga egenskaper för användning som probiotika. Dessa kandidater skulle sedan undersökas vidare i cellodlingsmodellen för att se om de kan motverka eventuella negativa effekter av *B. pilosicoli* på tarmepitelcellerna. Ur ett

antibiotikaresistens-perspektiv vill man inte att probiotiska bakterier ska bära på resistensgener som kan överföras till andra bakterier. Det är också fördelaktigt om de har en viss tolerans mot lågt pH och galla eller gallsalter då denna typ av bakterier behöver överleva passage genom magsäck och tarm för att kunna etablera sig där. En annan önskvärd egenskap hos probiotiska bakterier är bindning till mucus då detta anses viktigt för att bakterierna ska kunna hålla sig kvar tillräckligt länge i tarmen för att utöva någon verkan där.

Ett urval av de *Lactobacillus*-stammar som odlats upp och som artbestämts med MALDI-TOF subtypades också med MALDI-TOF för att eventuellt kunna utesluta en del stammar från vidare karaktärisering på grund av att de är mycket lika eller identiska. Subtypningen visade dock att alla testade stammar var olika och därför inkluderades samtliga stammar i följande karaktärisering. Först karaktäriserades stammarna med avseende på antibiotikaresistens med hjälp av antibiotikapaneler med 9 olika antibiotika med relevans för laktobaciller. Av 61 stammar växte 5 stammar för dåligt för att kunna ingå i antibiotikaresistens-testerna. Av övriga 56 stammar var 30 tillräckligt känsliga för de olika antibiotika för att gå vidare till nästa steg i karaktäriserings-processen med stresstolerans-test avseende pH och galla/gallsalter. I dessa test var det ytterligare 5 stammar som växte för dåligt för att kunna ingå i testen och av 25 testade stammar bedömdes 7 stycken vara stresståliga för både lågt pH och galla/gallsalter. Fyra av dessa var av arten *Lactobacillus reuteri* och övriga 3 av arten *Lactobacillus amylovorus*. I test för mucusbindning visade samtliga kvarvarande 7 stammar ingen bindning till mucus. Problem med växt av bakterierna gjorde att endast 31 av övriga 53 stammar kunde testas för mucusbindning och endast 5 stycken visade stark bindning till mucus. Av dessa var 4 stammar resistent mot 2 eller fler av de testade antibiotika, 1 stam var känslig för alla testade antibiotika men hade något låg tolerans mot gallsalter. Ingen stam uppvisade alltså önskvärda egenskaper i alla karaktäriserings-steg men 7 stycken visade bra egenskaper i allt utom mucusbindning och 1 visade bra egenskaper i allt utom tolerans av gallsalter.

Permeabilitet i cellodlingsmodell

En cellodlingsmodell för att mäta permeabilitet över ett cellager av tarmepitelceller sattes upp och undersökningar av hur olika stammar av *B. pilosicoli* samt olika arter av *Brachyspira* med olika patogenicitet påverkade permeabiliteten av cellagret utfördes. Utvärdering av modellen visade att det var svårigheter att stabilt mäta TEER över tid vilket gjorde det svårt att tolka resultaten. Svårtolkade resultat erhöles också då infektionsförsök med *Brachyspira* i cellodlingsmodellen gjordes och kontrollbrunnen i experimentet inte betedde sig som förväntat. Då det inte fungerade tillfredsställande att mäta permeabilitet i cellodlingsmodellen kunde inte heller de karaktäriserade *Lactobacillus*-kandidaterna (se ovan) testas i modellen.

Slutsatser

En mängd panningsexperiment och bioinformatiska studier har utförts för att identifiera *B. pilosicoli*-proteiner som kan interagera med proteiner hos gris, liksom framställning och testning av potentiellt intressanta *B. pilosicoli*-proteinkandidater. Med användning

av dessa metoder har specifika bindningar mellan bakterieproteiner och värdproteiner ej påvisats. Kontrollexperiment visar att de metoder som använts fungerar men förmodligen är betingelserna inte de rätta för att påvisa bindning av *B. pilosicoli*-proteiner eller att *B. pilosicoli* inte binder till proteiner på cellytan. Storskalig sekvensering av fler stammar av *B. pilosicoli* och bioinformatiska analyser skulle vara ett sätt att undersöka detta vidare.

Ett stort antal *Lactobacillus*-stammar har karakteriserats med avseende på antibiotikaresistens, tolerans mot lågt pH och galla/gallsalter samt mucusbindning för att utvärdera deras användning som potentiella probiotika. På grund av tekniska svårigheter att sätta upp både en vävnadsmodell och en cellodlingsmodell har 8 *Lactobacillus*-kandidatstammar inte kunnat testas i system med *B. pilosicoli* för att utvärdera stammarnas förmåga att motverka eventuella negativa effekter av *B. pilosicoli* på tarmepitelet. Dessa stammar är dock av generellt intresse att använda i framtida projekt på probiotika till gris.

Nytta för näringen och rekommendationer

Det här projektets läge i kunskapskedjan faller under "tillämpad forskning" och syftade till att utveckla kunskaper om spiroketal diarré hos tillväxtgrisar, som i förlängningen skulle öka möjligheterna att utveckla förebyggande behandlingar såsom probiotika och vacciner i nya projekt i samarbete med näringslivet. Trots kraftfulla försök att identifiera bindning av *B. pilosicoli* inte bara till tarmepitelceller utan även till andra strukturer hos gris har inga tydliga resultat framkommit som direkt kan vidareutvecklas i nästa nivå, konceptutveckling. I uppföljande projekt skulle man förmodligen använda andra metoder för att uppnå de resultat vi önskade, särskilt öppnar ökade möjligheter till prisvärd, storskalig sekvensering och bioinformatiska analyser, under ständig utveckling, för att det skulle vara en väg framåt inom det här området.

Ett gediget arbete med att utvärdera *Lactobacillus*-arter som probiotika-kandidater har utförts i det här projektet och 8 stammar har identifierats som potentiellt intressanta att studera vidare i försök tillsammans med *B. pilosicoli*, och andra *Brachyspira*-arter, i cell- eller vävnadsmodeller där laktobacillernas förmåga att motverka eventuella negativa effekter på tarmepitelet kan utvärderas. Inom ramen för det här projektet har de modeller som skulle användas varit förenade med en mängd tekniska svårigheter. Utvärdering av ytterligare en modell påbörjades där bindning av *Brachyspira*-bakterier till epitelcellinjer odlade i Lab-Tek II-kammare (odlingskammare som sitter fast på objektsglas men som enkelt kan tas bort och värdceller och bakterier som sitter fästa till objektsglas kan studeras i mikroskop). Denna modell finns beskriven för *B. hyodysenteriae* (Gömmel et al., 2013) där man studerat specifika antikroppars förmåga att blockera bindningen av bakterierna till epitelceller, och är en möjlig kandidat för att testa interaktioner mellan tarmepitelceller, *B. pilosicoli* och laktobaciller i framtida projekt.

Referenser

- Blanco L, Payne B, Feyertag F, Alvarez-Ponce D: Proteins of generalist and specialist pathogens differ in their amino acid composition. *Life Science Alliance* 2018, 1:e201800017.
- Deamer D, Akeson M, Branton: Three decades of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 2016, 34:518-524.
- Fenno J, Tamura M, Hannam P, Wong, G, Chan, R, McBride, B: Identification of a *Treponema denticola* OppA homologue that binds host proteins present in the subgingival environment. *Infection and Immunity* 2000, 68:1884-1892.
- Gömmel M, Barth S, Heydel C, Baljer G, Herbst, W: Adherence of *Brachyspira hyodysenteriae* to porcine intestinal epithelial cells is inhibited by antibodies against outer membrane proteins. *Current Microbiology* 2013, 66:286-292.
- Jacobson M, af Segerstad CH, Gunnarsson A, Fellstrom C, Klingenberg KD, Wallgren P, Jensen-Waern M: Diarrhoea in the growing pig - a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. *Research in Veterinary Science* 2003, 74:163-169.
- Jacobsson K, Rosander A, Bjerketorp J, Frykberg L: Shotgun phage display - selection for bacterial receptors or other exported proteins. *Biological Procedures Online* 2003, 5:123-135.
- Liu H, Roos S, Jonsson H, Ahl S, Dicksved J, Lindberg J-E, Lundh T: Effects of *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus reuteri* on gut barrier function and heat shock proteins in intestinal porcine epithelial cells. *Physiological Reports* 2015, 3:e12355.
- Movahedi A and Hampson D: Evaluation of recombinant *Brachyspira pilosicoli* oligopeptide-binding proteins as vaccine candidates in a mouse model of intestinal spirochaetosis. *Journal of Medical Microbiology* 2010, 59:353-359.
- Rosander A, Guss B, Frykberg L, Björkman C, Näslund K, Pringle M: Identification of immunogenic proteins in *Treponema phagedenis*-like strain V1 from digital dermatitis lesions by phage display. *Veterinary Microbiology* 2011, 153:315-322.
- Stanfield R and Wilson I: Protein-peptide interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 1995, 5:103-113.
- SWEDRES-SVARM: Use of antimicrobials and occurrence of antimicrobial resistance in Sweden. In Book Use of antimicrobials and occurrence of antimicrobial resistance in Sweden. City; 2012.
- Wallgren P, de Verdier K, Sjölund M, Zoric M, Hultén C, Ernholm L, Persson Waller K: Hur mycket kostar sjukdomar för lantbrukets djur? Rapport: Anslagspost 2 från SJV anslag 1:7. 2013.

Del 3: Resultatförmedling

Ange resultatförmedling av projektet, inklusive titel, referens, datum, författare/talare, och länk till presentation eller publikation om tillämpligt. Planerade publiceringar (med preliminära titlar) ska ingå i tabellen. Ytterligare rader kan läggas till i tabellen.

Vetenskapliga publiceringar	Planerad publicering (manuscript): Investigating the antibiotic susceptibility and specific stress tolerance of putatively probiotic porcine <i>Lactobacillus</i> isolates
Övriga publiceringar	Posterpresentation vid den vetenskapliga konferensen "MedVetPATHOGENS 2018 - 5th Prato Conference on Animal Bacterial Pathogens", Prato, Italien, 8-11 oktober: Identification of <i>Brachyspira pilosicoli</i> intestinal cell line-binding proteins by phage display and deep sequencing
Muntlig kommunikation	Presentation av projektet vid institutionsdag på SLU, 26 april 2018
Studentarbete	
Övrigt	