

Infektion med *Treponema* spp. som etiologin bakom smittsamt klöveksem hos nötkreatur

Gustav Averhed



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp
Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010: 46
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Uppsala 2010



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Infektion med *Treponema* spp. som etiologin bakom smittsamt klöveksem hos nötkreatur

Infection with *Treponema* spp. as the aetiology of digital dermatitis in cattle

Gustav Averhed

Handledare:

Märit Pringle, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Désirée S. Jansson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: VM0068

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2010

Omslagsbild: Christer Bergsten

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010: 46
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Smittsamt klöveksem, digital dermatit, *Treponema* spp., *Treponema phagedenis*, klövsjukdomar hos nötkreatur, *spiroketer*

Key words: Digital dermatit, *Treponema* spp., *Treponema phagedenis*, Claw disease in cattle, *spirochaetes*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt	4
Smittsamt klöveksem	4
Svårigheter med att odla <i>Treponema</i> spp.	5
Enzymer och virulensfaktorer	6
Immunologiskt svar mot <i>Treponema</i> spp.	6
Differentialdiagnoser	7
Behandling	7
Diskussion	7
Litteraturförteckning	9

SAMMANFATTNING

Smittsamt klöveksem eller bovin digital dermatit som sjukdomen också kallas är en klövsjukdom som finns runt om i hela världen och som framför allt drabbar nötkreatur i mjölkproducerande besättningar. Sjukdomen är smärtsam och resulterar ofta i hälta hos de drabbade djuren. Etiologin till smittsamt klöveksem är inte klarlagd, men mycket tyder på att den är av multibakteriell karaktär med *Treponema* spp. som troliga orsakande agens. I olika studier från Storbritannien, USA, Japan och Sverige har *Treponema* spp. isolerats från smittsamt klöveksem. I en undersökning av biopsier från djur med smittsamt klöveksem kunde man hitta en art närbesläktad med *Treponema phagedenis* i 100 % av proverna men bakterien kunde inte hittas hos djur som inte hade tecken på sjukdomen. Man har sett att både det cellulära och humorala immunsvaret aktiveras hos djur som lider av smittsamt klöveksem. Det finns profylaktisk behandling av smittsamt klöveksem, då man låter djuren vada genom fotbad med kopparsulfatlösning. Ett akut klöveksem behandlas lokalt med antibiotika som sprayas på lesionen. Att hålla en god hygienisk miljö på gården är viktigt för att minska smittrycket. En av anledningarna till att man inte vet så mycket om *Treponema* spp. och att forskningen går sakta framåt är att dessa bakterier är mycket svårödlade.

SUMMARY

Bovine digital dermatitis is a severe contagious disease that is wide-spread all over the world and causes welfare and economical problems mainly in dairy cattle farms. The disease is painful and can result in lameness in affected animals. The lesions are often circular and ulcerative located between the bulbs of the claw. The etiology of digital dermatitis is not clear, but there are indications that it is of multi-bacterial nature, and with *Treponema* spp. as key agents. In various studies from the UK, U.S.A, Japan and Sweden *Treponema* spp. have been isolated from digital dermatitis lesions. In a study of biopsies from infected animals a species closely related to *Treponema phagedenis* was found in 100 % of the samples but not in animals that had no signs of digital dermatitis. Both cellular and humoral immune responses are induced in animals suffering from digital dermatitis. Footbaths containing copper sulfate solutions have a positive effect as prophylactic treatment of digital dermatitis. Active lesions are treated with local antibiotics. To maintain a good hygienic environment in the farm is important for reduction of the infection pressure. One of the reasons that we do not know much about *Treponema* spp. and why the research goes slowly forward is that these bacteria are very difficult to culture.

INLEDNING

Bovin digital dermatit är en smittsam klövsjukdom som framförallt drabbar nötkreatur i mjölkproducerande besättningar världen över (Greenough., 2007). Ett annat namn för digital dermatit är papillomatös digital dermatit. Här i Sverige kallas sjukdomen ofta för smittsamt klöveksem. Gårdar med kor drabbade av smittsamt klöveksem lider ekonomiska förluster på grund av minskad mjölkproduktion och kostnad för behandling av sjukdomen.

Patogenesen för smittsamt klöveksem är inte klarlagd, men mycket talar för att det är bakterier från familjen *Spirochaetaceae* som är de orsakande organismerna (Greenough, 2007). Det finns flera olika grupper av bakterier inom familjen *Spirochaetaceae*, intressant för digital dermatit är släktet *Treponema*. Smittsamt klöveksem är en hudsjukdom som kan vara akut eller kronisk och utmärker sig genom cirkulära sår. Lesionerna är mycket smärtsamma och kan ge hälta. Såren är lokaliserade mellan ballarna på klövarna, i anslutning till klövkapseln, de såriga eksemen brukar ha en vit kant runt sig med hårtillväxt (Fig. 1).

Är det *Treponema* spp. som är de orsakande organismerna vid smittsamt klöveksem? Vad finns det för bevis som säger att det är *Treponema* spp.? Finns det beskrivna virulensfaktorer? Jag kommer att presentera olika fakta som tyder på att det är *Treponema* spp. som är den grundläggande orsaken till smittsamt klöveksem.

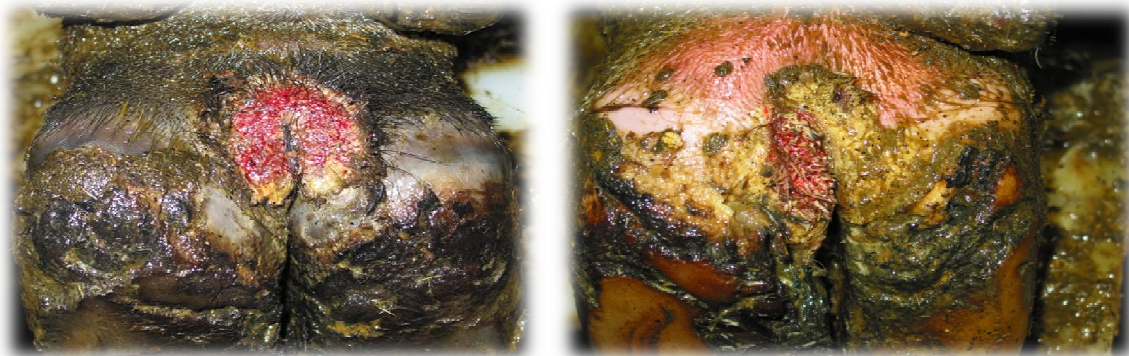


Fig. 1 tv och 2 th.

Fig.1. Tydligt cirkulärt sår med tydlig kant lokaliserat mellan ballarna.

Fig.2. Eksemet här är mer utbredd och mer diffust.

Foto: Christer Bergsten

MATERIAL OCH METODER

Sökning efter vetenskapliga artiklar som handlar om smittsamt klöveksem var inte direkt svårt, men äldre artiklar sållades bort och fokus lades på artiklar från Storbritannien, USA och Europa (en från Japan). Databaser som användes i artikelsökningen var Pubmed, ISI Web of Knowledge, Science Direct och Google Scholar. Det svåra med mina sökningar var att finna artiklar som tog upp patogenesen för smittsamt klöveksem.

Sökorden som gav träffar var: cow, cows, cattle, digital dermatitis, bovine digital dermatitis, treponema, spirochete, pathogenesis. Det svenska namnet smittsamt klöveksem användes ej som sökord då de flesta artiklar inte är skrivna på svenska.

LITTERATURÖVERSIKT

Smittsamt klöveksem

I en studie från Storbritannien tog man biopsier från 29 djur med smittsamt klöveksem och med hjälp av PCR kunde man hitta 3 olika grupper av *Treponema* spp. : grupp 1 (*Treponema medium*/*Treponema vincentii*-liknande), grupp 2 (*Treponema phagedenis*-liknande), grupp 3 (*Treponema putidum*/*Treponema denticola*-liknande). Intressant var att man kunde hitta den *Treponema phagedenis*-liknande arten i 100 % av alla dessa biopsier, grupp 2 såg man i 72,4 % och i 96,6 % av de 29 biopsierna hittade man grupp 1 (Evans *et al.*, 2009). Detta skulle kunna tyda på att det krävs mer än en art av *Treponema* spp. för att orsaka smittsam klöveksem, dvs. att det rör sig om en multibakteriell sjukdom. I samma studie från Storbritannien av Evans *et al.* (2009) så gjordes också tester på friska unga tjurar, djur som inte hade visat några tecken på att utveckla smittsamt klöveksem. Här blev resultatet att alla dessa djur var negativa för de olika *Treponema* grupperna (grupp 1, 2 och 3).

Nordhoff *et al.* (2008) kunde i sin studie visa att kombinationer av flera olika grupper av *Treponema* spp. skulle kunna vara grunden till smittsamt klöveksem genom att 71 % av alla prover som kontrollerades innehöll kombinationer av *Treponema* spp. En viss kombination av olika *Treponema* spp. skulle kunna vara mer patogen än andra och orsaka mer skada. En annan teori som styrker detta är att man vid periodonitit hos människa som också är associerad till infektion med *Treponema* spp. inte har kunnat uppfylla Kochs postulat vid infektionsförsök med enbart en art, vilket Edwards *et al.*, (2003) anser skulle kunna förklaras av att det är flera olika arter av orala *Treponema* spp. som är inblandade i sjukdomsförloppet.

Problem med smittsamt klöveksem finns även i Sverige. I en svensk studie gjord av Pringle *et al.* (2008) så kunde man odla sju olika *Treponema*-isolat från smittsamt klöveksem. Proven visade sig alla innehålla *Treponema phagedenis*-likande spiroketer. I en tidigare studie av *Treponema* gjord av Nordhoff *et al.* (2008) så hittades den *Treponema phagedenis*-likande arten i 56 (n=56) biopsier från mjölkdjur d.v.s. hos 100 % av djuren som led av smittsamt klöveksem.

Även undersökningar från USA har visat att det finns spiroketer i smittsamt klöveksem. Av 10 biopsier innehöll alla spiroketer, men man hittade också andra bakterier både stavar och kocker av olika slag (Trott *et al.*, 2003).

Med hjälp av Flourescent In Situ Hybridization (FISH) och dot blot kunde man i en studie av Nordhoff *et al.* (2008) dra slutsatsen att en av de troligaste patogena *Treponema* spp. var *Treponema phagedenis*-liknande. Inte nog med att de fanns i flest antal utan det var också dessa som fanns djupast i såren, till skillnad från *Treponema denticola*-liknande arter som detekterades i de yttre av klövens hudlager (Moter *et al.*, 1998). Samma slutsats drogs av Klitgaard *et al.* (2008) där man djupt i stratum spinosum och i de bildade papillerna med keratinolys som uppkommit av smittsamt klöveksem kunde hitta *Treponema* spp. där den *Treponema phagedenis*-liknande arten var en av arterna som fanns i högst antal med störst utbredning. Man kunde här hitta *Treponema* spp. extra- och intra-cellulärt. I den här studien kunde man med FISH identifiera *Treponema* spp. i 40 biopsier av 41 från djur med smittsamt klöveksem. Av alla bakterier som hittades var 90 % *Treponema* spp. Resultatet från de här studierna pekar åt att det faktiskt är *Treponema* spp. som är den primära orsaken bakom smittsamt klöveksem.

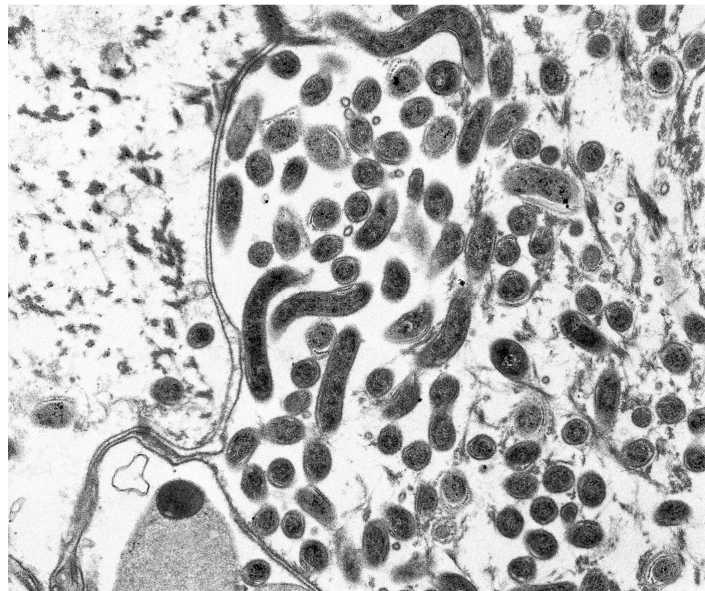
Med hjälp av 16S rRNA-genanalys har man hittat spiroketer med nästan samma 16S rRNA sekvenser hos djur drabbade av smittsamt klöveksem över hela världen, detta styrker att det är *Treponema* spp. som är etiologiskt agens (Demirkan *et al.*, 2006).

När man undersökte klövarna från friska djur utan symtom på smittsamt klöveksem, med hjälp av immunohistokemi, så hittade man inga *Treponema*-arter. Men vid immunohistokemiundersökning av djur med smittsamt klöveksem så fann man *Treponema* spp., speciellt djupt in i såren, hårfolliklarna och talgkörtlarna (Evans *et al.*, 2009). Även i Japan kunde man hitta flera arter av spiroketer i smittsamt klöveksem hos mjölkdjur, där *Treponema phagedenis*-likande arter visade sig finnas i alla klöveksem som undersöktes, men också *Treponema denticola*-liknande arter detekterades i de flesta som examinerades (Yano *et al.*, 2009).

Elliot *et al.* (2007) gjorde en studie då de ympade möss med olika stammar av den *Treponema phagedenis*-liknande arten som har hittas i smittsamt klöveksem för att se om de gav upphov till abscesser, och vilka av stammarna som verkade vara mest patogena. Det visade sig att alla stammar gav upphov till abscesser hos alla mössen, och man kunde också se ett dosförhållande, ju högre dos desto allvarligare abscess. Alla stammar orsakade abscesser men av olika allvarlighet.

Svårigheter med att odla *Treponema* spp.

På agarplattor bildar den *T. phagedenis*-liknande arten efter ungefär 12 dagar anaerobt i 37 °C små runda konvexa kolonier som är något vaxartade. I elektronmikroskop kan man se 6-8 µm långa stavar med 7-8 flageller och 3-5 spiralformade svängar (se Fig. 3) (Demirkan *et al.*, 2006).



*Fig. 3. Transmissionselektronmikroskopbild av Treponema spp. från smittsamt klöveksem.
Foto: Märit Pringle.*

Spiroketer har visat sig vara mycket besvärliga att odla och isolera, detta beror mycket på att de är anaeroba. De är också mycket kräsna på vad det är för näringsämnen i buljongen, och andra bakterier som växer snabbare än vad spiroketerna gör tar över och konkurrerar ut

spiroketerna. I smittsamt klöveksem finns en mängd andra bakterier, vilket gör att det blir mycket svårare att isolera *Treponema* spp. *Treponema phagedenis* behöver djurserum för att tillväxa och förutom serum behöver de också energi i form av glukos och de skall odlas anaerobt (Smibert *et al.*, 1991). Det finns två generella metoder att odla och isolera *Treponema* spp. Antingen används ett filter med 22 µm porer som spiroketerna kan ta sig igenom ner till substratet eller så används selektiva medier som innehåller antibiotika (Smibert *et al.*, 1991).

Enzymer och virulensfaktorer

I en svensk studie av sju *Treponema*-isolat undersökte man den enzymatiska aktiviteten med hjälp av API-test. Några enzymer som blev positiva för alla isolaten var bland annat, alkalint fosfatas, C4 esteras, C8 esteraslipas och 14 β-glukuronidas (Pringle *et al.*, 2008). Samma enzymuppsättning såg också Demirkan *et al.* (2006) när de använde API-test. Även Evans *et al.* (2008) visade att det fanns en hel del enzymaktivitet hos olika *Treponema* spp., bl.a. C4 esteras, C8 esteraslipas och alkalint fosfatas. Enzymer som *Treponema denticola* har är intressanta, till exempel chymotrypsin-liknande proteas som bryter ner matrixkomponenter och gör att bakterien kan röra sig framåt genom membran (Grenier *et al.*, 1990). Fosfolipas C är ett annat enzym som *Treponema denticola* har som bryter ner fosfolipider i cellmembranet (Siboo *et al.*, 1989).

Viktigt för bakterien är att binda in till målcellen och sen hålla sig kvar så att den kan kolonisera och sen upprätthålla sig hos värden. Mycket finns beskrivet hos orala *Treponema* spp. hos människa men nästan ingenting finns beskrivet vid animala *Treponema*-infektioner om hur bakterierna interagerar med värdcellen. På ytan av *Treponema denticola* finns Msp (major surface protein) som interagerar med närliggande celler och binder in till laminin och fibronektin (Fenno *et al.*, 1996).

Immunologiskt svar mot *Treponema* spp.

Man kan också söka indirekt efter infektion med *Treponema* spp. genom att studera immunsvaret som dessa spiroketer triggat igång. Med hjälp av Western blot kunde man visa att djur med smittsamt klöveksem hade ett humoralt immunsvaret mot *Treponema phagedenis*-stammar (Trott *et al.*, 2003). Samma studie visade att serum från djur som inte hade uppvisat några tecken på smittsamt klöveksem inte reagerade mot *Treponema phagedenis*-liknade arter. Vid smittsamt klöveksem kan man se i mikroskop att keratinocyterna är förstörda och man ser också proliferering och hyperplasi av epitelceller i huden. Man kan även se ett tydligt immunsvaret med monocyter, neutrofiler och lymfocyter som har reagerat på agens (Edwards *et al.*, 2003).

I en studie av Zuerner *et al.* (2007) föreslog man att *Treponema phagedenis*-liknande arter som fanns djupt inne i klövsåren hade en immunosupprimerande effekt på bovina makrofager och att det hade en hämmande effekt på sårhäkning. Blowey *et al.* (1994) kunde vid histologisk undersökning av biopsier från smittsamt klöveksem se att celler som fagocyterat spiroketer oftast var sönderfallande vilket också är ett tecken på en ineffektiv makrofagrespon.

I en studie av immunsvaret hos nötkreatur med smittsamt klöveksem jämförde man djur som var naturligt infekterade med djur som man infekterade genom ympning med bestämda

Treponema spp. Man kunde inte hitta IgM antikroppar hos något av djuren men man kunde hitta IgG antikroppar mot *Treponema* spp. hos alla djuren (Elliot *et al.*, 2009).

Resultat som Trott *et al.* (2003) kommit fram till tyder på att LPS-liknande molekyler hos *Treponema phagedenis*-liknade stammar triggar igång både cellulärt och humoralt immunsvar hos djur drabbade av smittsamt klöveksem. Immunsvarets duration tycks dock vara mycket kort vilket kan leda till ytterligare infektioner av *Treponema* spp.

Dhawi *et al.* (2004) använde sig av ELISA i ett försök att observera reaktion mot antigen från *Treponema* spp. Studien gick ut på att hitta om det finns en gemensam patogenes för smittsamt klöveksem och fårens CODD (contagious ovine digital dermatitis). De använde sig av tre olika gårdar där gård A och B hade problem med smittsamt klöveksem och gård C där inte någon smitta observerats. Resultat från gård A visade att 45 av 45 serumprover var seropositiva för *Treponema* spp. och resultat från gård B att 62 % av de testade djuren var positiva för CODD-associerade *Treponema* spp. medan endast 21 % testades positiva för *Treponema* spp. som är associerade med smittsamt klöveksem. Ingen av djuren var positiva för båda *Treponema* spp.-antigenen. På gård C med enbart kontroldjur som inte var infekterade med smittsamt klöveksem visade det sig att 24 % av djuren var seropositiva för Smittsamt klöveksem-associerade antigen och 5 % testades positiva för CODD-associerade *Treponema* spp.

Differentialdiagnoser

Klövspaltsinflammation och hälsa som uppkommit av annan klövsjukdom är differentialdiagnoser till smittsamt klöveksem. Klövspaltsinflammation eller (klövspaltsflegmon) ger ofta upphov till feber och obehandlad så kan infektionen spridas till klövleden eller till skelettet och blir mycket svårbehandlad. Till skillnad från smittsamt klöveksem så orsakas klövspaltsinflammation av *Fusobacterium necrophorum* (Manske *et al.*, 2002). Utseendet på smittsamt klöveksem är väldigt olikt andra klövsår, vilket gör att det efter att man inspekterat klöven är svårt att förväxla det med andra klövsjukdomar.

Behandling

I Sverige används fotbad innehållande kopparsulfatlösning t.ex. DigiDerm™ som kan ha god effekt och håller klövarna rena från bakterier och smuts. Korna kan i hårt drabbade besättningar gå igenom badet 2-3 gånger i veckan (Bergsten *et al.*, 2009). Antibiotika kan användas lokalt på såren i form av spray. Det antibiotikum som vanligen används till behandling av smittsamt klöveksem är tetracyklin och det är viktigt att man tvättar såret innan så det är rent (Greenough, 2007). I Sverige används samma substans i form av spray och/eller oxytetracyklinlösning som man applicerar på lesionen (Bergsten *et al.*, 2009).

DISKUSSION

I den här litteraturstudien har jag försökt reda ut vad det är som ligger bakom uppkomsten av smittsamt klöveksem. Mycket tyder på att det är infektion med *Treponema* spp. som faktiskt är den troliga etiologin. Evans *et al.*, (2009) visade detta genom att utföra en PCR-undersökning av 29 biopsier som hade tagits från smittsamt klöveksem och hittade *Treponema* spp. i alla biopsier. Ett problem är ju att lista ut om det är *Treponema* spp. som orsakar dessa ulcerativa eksem eller om de invaderar efter en primärinfektion av några helt

andra bakteriearter. Resultatet från studien som Klitgaard *et al.* (2008) gjorde pekar åt att det faktiskt är *Treponema* spp. som är den primära orsaken bakom smittsamt klöveksem. Man kunde finna *Treponema* spp. djupt inne i såren och i höga antal.

Dhawi *et al.*, (2004) fann att på gård C med enbart kontroldjur var 24 % seropositiva för smittsamt klöveksem och 5 % var positiva för CODD-associerade *Treponema* spp. Författarna föreslår att det skulle kunna förklaras med att djuren var i preklinisk fas av sjukdomen eller att det finns andra betingelser som behövs för att orsaka kliniska symtom. Det skulle också kunna vara så att testet som var baserat på helcellslysat gav falska positiva resultat.

Nordhoff *et al.*, (2008) och Evans *et al.*, (2009) tror att det rör sig om en multibakteriell sjukdom som inte bara kan förklaras av en enda art utan flera olika. När man inte kunde uppfylla Kochs postulat med orala *Treponema* spp. så styrkte detta att det rör sig om en multibakteriell infektion (Edwards *et al.*, 2003). Så var kommer då dessa bakterier ifrån? Dhawi *et al.*, (2004) tror att bakterierna finns i omgivningen på gården och sprids med gödsel, det vill säga en miljö/hygienrelaterat problem. En dålig klövhälsa med dålig hygien kan predisponera för smittsamt klöveksem, när djuren står i våt och fuktig miljö så kan klöven bli sårbar och lätt få skador som bakterier sen kan invadera (Greenough, 2007). Sjukdomen är mycket smittsam så det är viktigt att hålla en god hygien och att se till att dräneringen fungerar på ett bra sätt (Bergsten, 2009).

Andra bakterier som har hittats i smittsamt klöveksem är bland annat, *Dichelobacter nodosus*, *Bacterioides fragilis*, *Bacterioides capillosis* och *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Greenough, 2007). Det skulle kunna vara en av dessa arter som utgör primärinfektionen för att sen göra det möjligt för *Treponema* spp. att växa till. Evans *et al.* (2009) fann att friska djur hade positivt svar för *Treponema* spp. i en PCR med genus specifika primers, detta skulle kunna tyda på att det bara är vissa patogena stammar av *Treponema* spp. som är orsaken till smittsamt klöveksem.

Den *Treponema* sp. som förekom mest och som troligtvis är en av de arter som orsakar smittsamt klöveksem är enligt Nordhoff *et al.* (2008) den *Treponema phagedenis*-liknande arten. I en undersökning av Trott *et al.* (2003) kunde man med hjälp av Western blot hitta antikroppar mot *Treponema phagedenis*-liknande spiroketer i serum från djur med klassiska lesioner, men inte från djur som inte hade dessa lesioner.

Så det är mycket troligt att *Treponema* spp. spelar en viktig roll för utveckling av smittsamt klöveksem, frågan som kvarstår är hur dessa mycket smärtsamma sår uppkommer. Det behövs mycket mer forskning kring virulens hos *Treponema* spp. och hur de interagerar med cellerna. Mycket finns beskrivet om orala *Treponema*-arter som *Treponema vincentii* och *Treponema denticola*. Man skulle kunna tänka sig att närbesläktade *Treponema*-arter har liknade virulens faktorer (Edwards *et al.*, 2003). Man skulle också kunna tänka sig att de enzymer och virulens faktorer som *Treponema denticola* uppvisar finns även hos *Treponema*-arter i smittsamt klöveksem (Trott *et al.*, 2003). Mer forskning behövs för att bestämma om de olika enzymerna hör till deras metabolism och/eller om de är involverade i virulensen. Ett annat problem är att *Treponema* spp. är mycket svårödlade och kräver odlingsbuljonger med specifika näringssubstrat vilket är en av anledningarna till att forskningen går långsamt framåt.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Bergsten, C., Tufvesson, E. (2009). Så handskas du med digital dermatit. Husdjur, tidningen för mjölkföretagare, 9, 12-13.
- Blowey, R.W., Done, S.H., Cooley, W. (1994). Observation on the pathogenesis of digital dermatitis in cattle. *Veterinary Record*, 135,115-117.
- Demirkan, I., Williams, H.F., Dwai, A., Carter, S.D., Wnstanly, C., Bruce, K.D., Hart, C.A. (2006). Characterization of a *spirochaete* isolated from a case of bovine digital dermatitis. *Journal of Applied Microbiology* 101, 948-955.
- Dhawi, A., Hart, C.A., Demirkan, I., Davies, I.H., Carter, S.D. (2005). Bovine digital dermatitis and severe virulent ovine foot rot: A common spirochaetal pathogenesis. *The Veterinary Journal*, 169(2), 232-241.
- Edwards, A.M., Dymock, D., and Jenkinsson, H.F. (2003). From tooth to hoof: treponemes in tissue-destructive diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 767-780.
- Evans, N.J., Brown, J.M., Demirkan, I., Murray, R.D., Dann Vink, W., Blowey, R.W., Hart, C.A., Carter, S.D. (2008). Three unique groups of spirochetes isolated from digital dermatitis lesions in UK cattle. *Veterinary Microbiology*, 130, 141-150.
- Evans J.N., Brown, J.M., Demirkan, I., Singh, P., Getty, B., Timofte, D, Dann Vink, W., Murray, R.D, Blowey, R.W, Birtles, R.J., Hart, C.A., Carter, S.D. (2009). Association of Unique, Isolated Treponemas with Bovine Digital Dermatitis Lesions. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3), 689-696.
- Elliot, M.K., Alt, D.P. (2007). Lesion formation and antibody response induced by papillomatous digital dermatitis-associated spirochetes in a murine abscess model. *Infection and Immunity*, 75, 4400-4408.
- Elliot, M.K., Alt, D.P. (2009). Bovine immune response to papillomatous digital dermatitis (PDD) - associated spirochetes is skewed in isolate reactivity and subclass elicitation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 130, 256-261.
- Fenno, C.J., Muller, K-H., McBride, B.C. (1996). Sequence Analysis, Expression, and Binding Activity of Recombinant Major Outer Sheath Protein (Msp) of *Treponema denticola*. *Journal of Bacteriology*, 178 (9), 2489-2497.
- Grenier, D., Uitto. V.J., McBride B.C. (1990). Cellular location of a *Treponema denticola* chymotrypsinlike protease and importance of the proteas in migration through the basement membrane. *Infection and Immunity*, 58(2), 347-351.
- Greenough P.R. (2007). Bovine Laminitis and Lameness. Printed in china. Saunders.
- Klitgaard, K., Boye, M., Capion, N., Jensen, T.K. (2008). Evidence of Multiple *Treponema* Phylotypes Involved in Bovine Digital Dermatitis as Shown by 16 rRNA Gene Analysis And Fluorescence In situ Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 6(9), 3012-3020.
- Manske, T., Bergsten, C., Hultgren. (2002). *Klövård och klövhälsa hos mjölkkor*. Jönköping: jordbruksverket. ISSN 1102-8025, JO-4:02.

- Moter, A., Leist, G., Rudolph, R., Schrank, K., Choi, B.K., Wagner, M., Göbel, U.B. (1998). Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. *Microbiology*, 144, 2459-2467.
- Nordhoff, M., Moter, A., Schrank, K., Wieler, L.H. (2008). High prevalence of *treponemas* in bovine digital dermatitis- A molecular epidemiology. *Veterinary Microbiology*, 131, 293-300.
- Pringle, M., Bergsten, C., Fernström L.L., Höök, H., Johansson, K.E. (2008). Isolation and characterization of *Treponema phagedenis*-like spirochetes from digital dermatitis lesions in Swedish dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(40), doi: 10.1186/1751-0147-50-40.
- Siboo, R., Al-Joburi, W., Gornitsky, M., and Chan, E.C. (1989). Synthesis and secretion of phospholipase C by oral spirochetes. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 568-570.
- Smibert, R. M. A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy. (1991). Anaerobic spirochetes. Manual of clinical microbiology, 5th ed. *American Society for Microbiology*, 572-578.
- Trott, D.J., Moeller, M.R., Zuerner, R.L., Goff, J.P., Waters, W.R., Alt, D.P., Walker, R.L., Wannemuehler, M.J. (2003). Characterization of *Treponema phagedenis*-Like Spirochetes Isolated from Papillomatous Digital Dermatitis Lesion in Dairy Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2522-2529.
- Yano, T., Moe, K.K., Yamazaki, K., Ooka, T., Hayashi, T., Misawa, N.(2009). Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S Rna clonal analysis. *Veterinary Microbiology*, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.009
- Zuerner, R.L., Heidari, M., Elliott, M.K., Alt, D.P., Neill, J.D. (2007). Papillomatous digital dermatitis spirochetes suppress the bovine macrophage innate immune response. *Veterinary Microbiology*, 125(3-4), 256-264.