

Slutrapport Projnr H0530016

Digital dermatit hos nötkreatur - identifiering av orsakande agens och utveckling av molekylärbiologisk diagnostik

Förtydligande avseende projektets omfattning

Vår projektansökan omfattade även infektionsförsök och epidemiologiska studier men medel beviljades enbart för odling och molekylärbiologiska undersökningar. Det ursprungliga projektnamnet (ovan) har ej använts utan projektets webbsida har till exempel namnet ”Karaktärisering av *Treponema*-isolat”.

Bakgrund

Den första rapporten om digital dermatit (DD) på nötkreatur kom från Italien 1974 (Cheli & Mortellaro, 1974) och idag är sjukdomen spridd i besättningar med mjölkproduktion i stora delar av världen. Sjukdomen är smittsam och ger smärtsamma såriga eksem i huden intill klövhornskapseln och klövspalten. Korna blir halta och de ekonomiska förlusterna på grund av försämrad fruktsamhet, minskad mjölkproduktion och behandlingkostnader är avsevärda (Kossaibati & Esslemont, 1997) Det finns ett starkt samband mellan utveckling av DD, klövröta och en för klövarna dålig miljö med fukt, värme, urin och gödsel (Bergsten & Pettersson, 1992; Rodriguez-Lainz m.fl., 1999; Hultgren & Bergsten, 2001). I Danmark har spridning av DD i samband med övergång till lösdriftssystem varit anmärkningsvärd. I Sverige upptäcktes i slutet av 90-talet skador, som påminde om DD, men i en mildare form än vad som beskrivits internationellt. En mer aggressiv form av DD, kliniskt identisk med den i andra länder, påträffades i en västsvensk besättning 2005 och oron är stor att sjukdomen kommer att sprida sig, som den gjort i Danmark (Hillström & Bergsten, 2005).

Ännu har ingen lyckats infektera nötkreatur med bakterier i renkultur så att DD utvecklats. Att det är just bakterier som är orsaken är dock oomtvistat då skadorna snabbt läker vid lokalbehandling med antibiotika (Manske m.fl., 2002). Det finns flera bakteriearter som har förknippats med sjukdomen. När ansökan till projektet skrevs fanns flera studier som tyder på att spiroketer av genus *Treponema* spelar en betydande roll för utvecklandet av DD och flera intressanta studier har publicerats sedan dess. Bland annat har en dansk och en tysk grupp parallellt kommit fram till att många olika fylo typer (arter/underarter) förekommer i eksemen och att det vanligen går att detektera tre-fyra fylo typer och ibland så många som tio, hos samma ko (Nordhoff m.fl., 2008, Klitgaard m.fl., 2008).

Treponema spp. är svårodlade strikt anaeroba spiroketer och endast ett fåtal studier finns rapporterade där man lyckats isolera dem i renkultur från kor med DD (Demirkan m.fl., 1999, Schrank m.fl., 1999, Walker m.fl., 1995, Trott m.fl., 2003, Evans m.fl., 2008). I sammanhanget kan nämnas att *T. pallidum*, som orsakar syfilis, fortfarande inte kan odlas in vitro utan måste uppföras i levande kaniner. I de rapporter som finns om *Treponema*-isolat från DD används ofta medier utvecklade för att odla orala *Treponema* spp. från människor. Medierna är komplexa och för isolering från klövmaterial krävs tillsats av flera antibiotika för att få bort den övriga floran som kommer från omgivningen.

Material och metoder

Odling av bakterier och test av odlingsmedier

Under projektets gång har flera förbättringar gjorts genom att testa beskrivna odlingsmetoder från andra studier och böcker. Idag använder vi en komplex buljong med tillsats av fetalt

kalvserum, B-vitamin och flyktiga fettsyror samt rifampicin och enrofloxacin för primärisolering. Om det trots antibiotikatillsatsen finns kontaminerande flora appliceras en droppe kultur på ett 0,22 µm filter placerat på en agarplatta. Spiroketerna tar sig aktivt igenom filtret medan de större och ofta orörliga kontaminanterna blir kvar ovanpå filtret. Filtret lyfts bort och kvar på agarn blir spiroketerna. All odling sker i anaerob miljö.

Sekvensering av genen för 16S rRNA

Artbestämning har gjorts genom analys av gensekvensen för 16S rRNA, en gen som ofta används för typning av bakterier. Inom klövprojektet har primers speciellt anpassade för *Treponema* spp. designats.

PFGE och RAPD

För att kunna bestämma ett närmare släktskap till exempel för smittspårning av ett utbrott har vi testat två olika så kallade ”fingerprinting-metoder”, PFGE och RAPD. Pulsfältselektrofores (PFGE) bygger på att hela bakteriens kromosom klipps i stora fragment som sedan separeras i en gel med växlande strömriktning. När sedan fragmenten färgas ger olika kloner olika bandmönster. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ger också olika bandmönster men dessa kommer från slumpmässigt amplifierade korta fragment som varierar mellan kloner beroende på om primrarna som används passar eller inte.

ISR2-PCR

Vi har satt upp ett PCR-system som utvecklats i USA och som har specifika primers för *Treponema* spp. och därmed även kan köras direkt på vävnadsprover (Stamm et al., 2002). Systemet är baserat på regionen mellan generna för 16S rRNA och 23S rRNA, intergenic spacer region (ISR). Produkten kan sedan DNA-sekvenseras och i bästa fall användas för artbestämning av *Treponema* i prover där odling inte lyckats.

Kloning av ISR2-fragment från vävnadsprover

Från en besättning i Uppland kunde spiroketer, som var rörliga vid mikroskopering av proverna, inte isoleras trots upprepade provtagningar. Istället preparerades DNA fram direkt från vävnadsprover. I de prov där mängden spiroketer var tillräcklig gick det att få produkter med ISR-PCR. Sekvensering av dessa produkter fungerade inte eftersom det fanns mer än en fylotyp i proverna. För att få fram rena sekvenser klonades fragmenten och sekvenserades därefter. Även PCR-produkter från vävnadsprover från besättning A (tabell 1) klonades och sekvenserades.

Antibiotikaresistens

Det har varit mycket svårt att standardisera metoden för resistenstester av *Treponema*-isolaten. Samma antibiotikapaneler som utvecklats för *Brachyspira* spp. (VetMIC™ Brachy, SVA, Uppsala) har använts och metoden har modifierats för att passa *Treponema*. Inokulatets täthet går inte att kontrollera med hjälp av bakterieräkningar eftersom växten på agarplattor är för svag. Istället har fullt utväxta kulturer som okulärt bedömts ha haft samma täthet använts för inokulering. Hur många dagars växt som behövts före avläsning har också varierat (tabell 2 och 3). Trots detta har resultaten varit förvånansvärt reproducerbara.

API-ZYM

Enzymproduktion används för att typa *Treponema* spp. Vi har testat sju isolat med api® ZYM (bioMérieux).

Resultat

Odling av bakterier

Från alla besättningar där sjukdomen har identifierats kliniskt och prover skickats till projektet har spiroketer observerats i mikroskop. Odlingen har inte alltid lyckats och vi har idag åtta isolat av en ej namngiven *Treponema*-art från kor med DD (tabell 1).

Tabell 1. Ursprung och isolering av *Treponema* sp. i den här studien

| Isolat | Besättning | Länkod | Isolerat år | Kommentar |
|--------|------------------|--------|-------------|-----------------------------------|
| V1 | A | O | 2005 | |
| V2 | A | O | 2007 | |
| T 413 | B | C | 2006 | |
| T 551 | infektionsförsök | O | 2006 | isolerat 25 dagar efter infektion |
| T 551B | Infektionsförsök | O | 2006 | isolerat 41 dagar efter infektion |
| T 603 | C | C | 2006 | |
| T 657 | C | C | 2006 | |
| T 2378 | D | O | 2005 | |

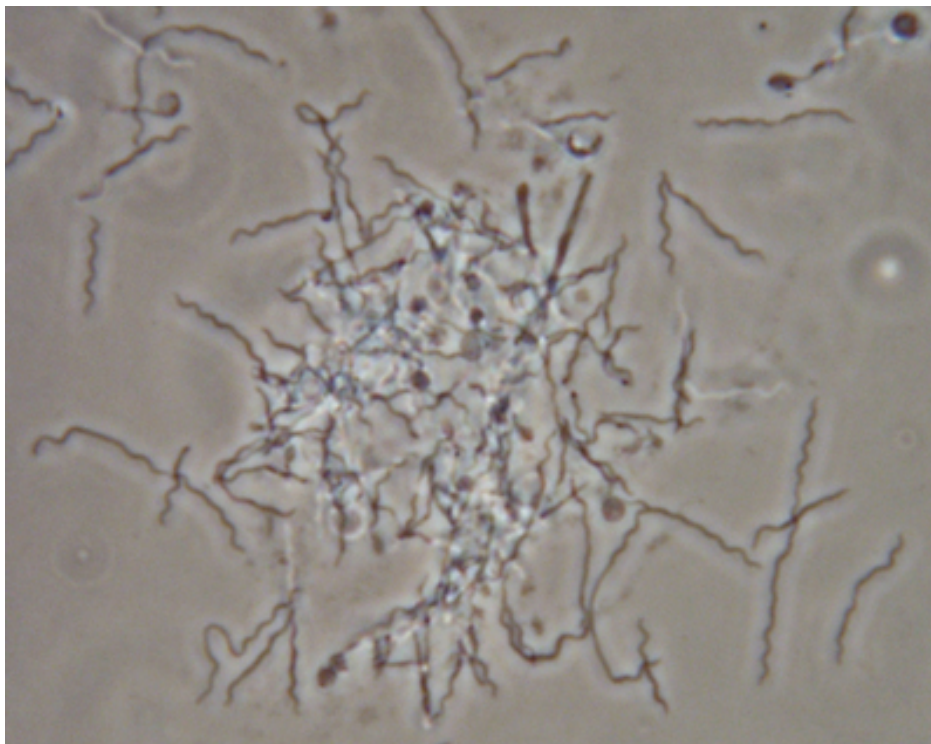
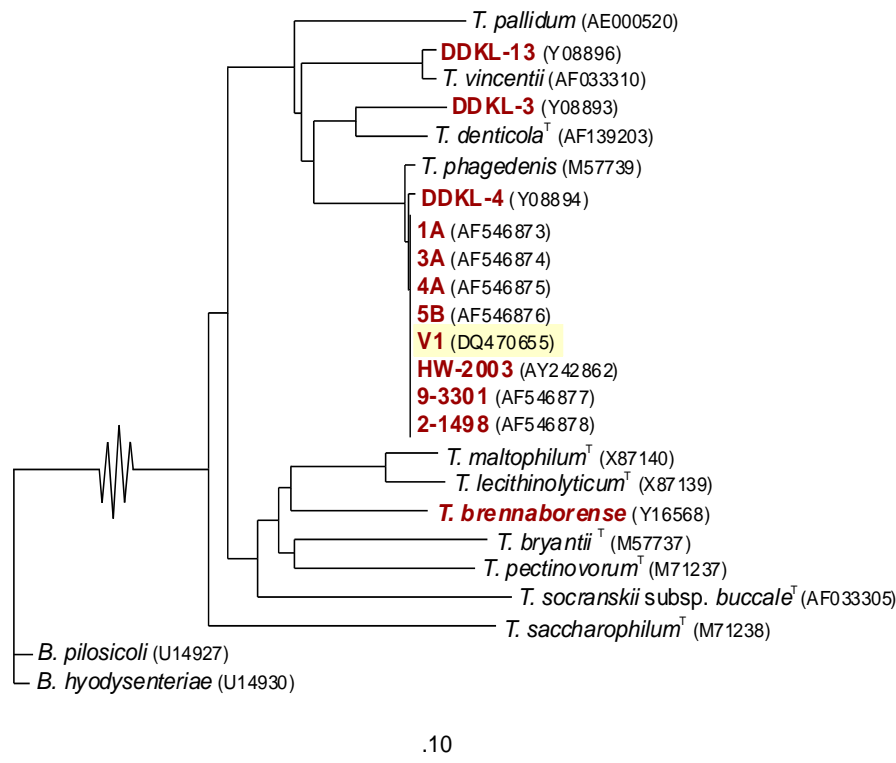


Bild 1. Buljongkultur av *Treponema*-isolat V1 i faskontrastmikroskop

Sekvensering av genen för 16S rRNA

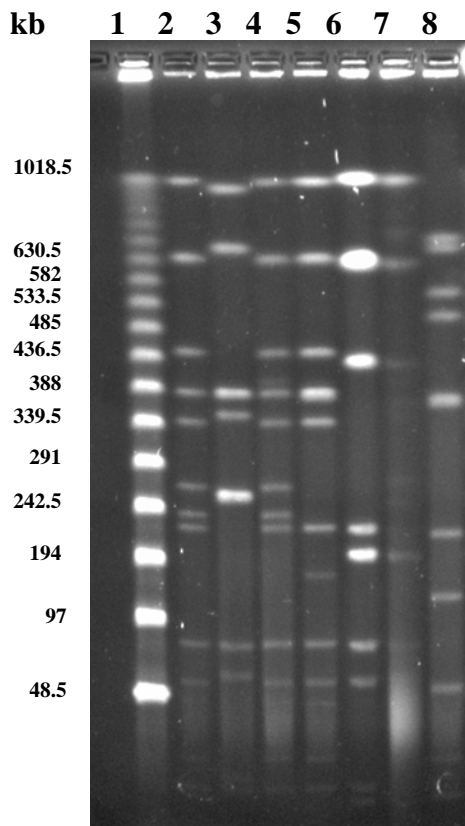
Vi har sekvenserat ett fragment som nästan motsvarar hela genen för 16S rRNA för sju av de åtta isolaten. Alla isolaten hade identisk 16S rDNA-sekvens förutom att två isolat (T 603 och T657 från besättning C) hade tre likadana polymorfismer (133_Y, 794_R och 1138_Y). Sekvensen var också identisk med sekvenser från isolat från Kalifornien (9-3301, 2-1498), Iowa (1A, 3A, 4A, 5B) och Storbritannien (HW-2003) (se fylogenetiskt träd, från poster presenterad i Italien 2006, nedan). Vi har deponerat sekvenserna i GenBank (Accessionsnummer DQ470655-56, EF057411, EU375741-44). Den närmast besläktade arten var *T. phagedenis*.



Fylogenetiskt träd baserat på distansmatrisanalys av 1239 positioner från 16S rDNA-sekvenser. Sekvenser för *Brachyspira hyodysenteriae* och *Brachyspira pilosicoli* har använts som utgrupp. Skalstreckat motsvarar 10 substitutioner per 100 nukleotidpositioner. Röd text markerar isolat från nötkreatur.

PFGE

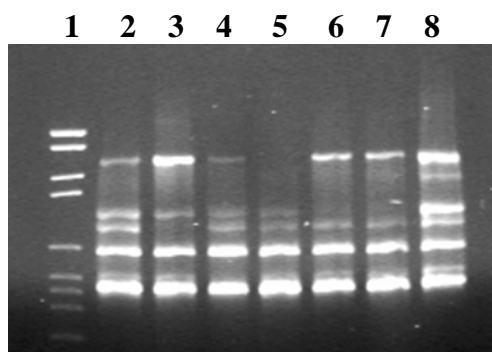
Det fanns inget protokoll för *Treponema* från DD utan ett PFGE-protokoll utvecklat för *Campylobacter* spp. modifierades. Flera parametrar fick ändras och testas innan banden blev synliga. Resultatet blev enligt figur 1, där tydliga band i lagom antal för jämförelse av kloner gick att få fram för sex av sju isolat. Ett ”bifynd” är att protokollet senare har visat sig fungera väl även för *Brachyspira hyodysenteriae* som tidigare varit svår att analysera med PFGE. Bandmönstret för V1 och T 551 var identiskt medan de andra varierade i olika grad.



Figur 1. PFGE-mönster för sju *Treponema* sp. isolat kluvna med *Xba*I. Prov 1, Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs); prov 2, V1; prov 3, T 413; prov 4, T 551; prov 5, T551B; prov 6, T 603; prov 7, T 657; prov 8, T 2378.

RAPD

I Ready-To-Go™ RAPD kitet (GE Healthcare) finns sex olika primers som alla testades. Endast primer 4 gav tydliga skillnader mellan isolaten (figur 2). Liksom för PFGE fick V1 och T 551 identiskt bandmönster. Även mönstren för T 603 och T 657 var lika varandra.



Figur 2. RAPD-bandmönster för sju *Treponema*-isolat amplifierade med Primer 4, Ready-To-Go™ RAPD kit (GE Healthcare). Prov 1, DNA Molecular Weight Marker VI (Roche Applied Science); prov 2, V1; prov 3, T 413; prov 4, T 551; prov 5, T551B; prov 6, T 603; prov 7, T 657; prov 8, T 2378.

ISR2-PCR

För sju körda isolat var resultatet ett enda band motsvarande en storlek av ca 300 baspar. Fragmentet för isolat V1 sekvenserades, var identiskt med sekvenser från andra *T. phagedenis*-besläktade isolat och deponerades i GenBank (Accessionsnummer EU410484).

Kloning av ISR2-fragment från vävnadsprover

Sekvenserna från de klonade fragmenten visade att det fanns minst 2 fylotyper i besättning A varav den ena är identisk med den typen som vi har isolerat. Provet från den uppländska besättningen som vi inte kunnat isolera spiroketer från innehöll minst två fylotyper och dessa har inte rapporterats som möjliga att odla hittills.

Antibiotikaresistens

Upprepade test av ett isolat visade att metoden var stabil trots att inkuberingstiden varierade på grund av att tillväxten av bakterierna varierade (tabell 2). Antibiotikaresistenstesterna visade att de svenska isolaten inte var resistenta mot relevanta antibiotika (tabell 3).

Tabell 2. MIC för sex antibiotika för ett *Treponema* sp. isolat (V1) från nio separata antibiotikaresistenstest.

| Inkubering (antal dagar) | MIC (µg/ml) | | | | | |
|-----------------------------|-------------|------------|---------|----------|------------|------------|
| | Tiamulin | Valnemulin | Tylosin | Aivlosin | Lincomycin | Doxycyclin |
| 8 | 0.5 | 0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.063 |
| 6* | 0.5 | 0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.031 |
| 9* | 1 | 0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.063 |
| 7 | 0.5 | 0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.063 |
| 10 | 0.5 | 0.063 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.063 |
| 4* | 0.5 | 0.063 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.063 |
| 7* | 0.5 | 0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.063 |
| 7 | 0.5 | 0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.031 |
| 11 | 0.5 | 0.063 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.063 |
| 5 | 0.5 | 0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.063 |
| 9 | 0.5 | 0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.063 |

* Samma test lästes av två gånger med tre dagars intervall

Tabell 3. MIC för sex antibiotika för sju isolat av *Treponema*.

| Isolat | antal test | MIC (µg/ml) | | | | | |
|--------|------------|-------------|-------------|---------|----------|------------|-------------|
| | | Tiamulin | Valnemulin | Tylosin | Aivlosin | Lincomycin | Doxycyklin |
| V1 | 9 | 0.5-1 | 0.063-0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.031-0.063 |
| T 413 | 5 | 0.5-1 | 0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | 4->4 | 0.063 |
| T 551 | 4 | 0.25-0.5 | 0.063-0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.031-0.125 |
| T 551B | 3 | 0.5 | 0.125-0.25 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.063 |
| T 603 | 2 | 0.5-1 | 0.125-0.25 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.125 |
| T 657 | 3 | 0.5 | 0.063-0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.125-0.25 |
| T 2378 | 5 | 0.25-0.5 | 0.125 | ≤0.5 | ≤0.25 | >4 | 0.031-0.063 |

API-ZYM

Enzymprofilen (tabell 4) för isolaten i den här studien stämde i huvudsak överens med andra studier där *T. phagedenis*-besläktade spiroketer testats (Walker m.fl., 1995, Evans m.fl., 2008).

Tabell 4. Enzymatisk profil (api® ZYM) för sju *Treponema*-isolat (S strong, W weak, - negativ).

| Isolat | Enzymaktivitet | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| V1 | S | W | W | - | - | - | - | - | - | S | S | - | S | W | - | - | S | - | - |
| T 413 | S | W | W | - | - | - | - | - | - | S | S | - | S | S | - | - | S | - | - |
| T 551 | S | W | W | - | - | - | - | - | - | S | S | - | S | W | - | - | S | - | - |
| T 551B | S | W | W | - | W | - | - | - | - | S | W | - | S | W | - | - | S | - | - |
| T 603 | S | W | W | - | - | - | - | - | - | S | W | - | S | W | - | - | S | - | - |
| T 657 | S | W | W | - | - | - | - | - | - | S | W | - | S | W | - | - | S | - | - |
| T 2378 | S | W | W | - | - | - | - | - | - | S | W | - | S | W | - | - | S | - | - |

1 alkaliskt fosfat; 2 C₄ esteras; 3 C₈ esteraslipas; 4 C₁₄ lipas; 5 leucinarylamidas; 6 valinarylamidas; 7 cystinarylamidas; 8 typsin; 9 α -chymotrypsin; 10 surt fosfat; 11 naftolfosfohydrolas; 12 α -galaktosidas; 13 β -galaktosidas; 14 β -glukuronidas; 15 α -glukosidas; 16 β -glukosidas; 17 N-acetyl- β -glukosaminidas; 18 α -mannosidas; 19 α -fukosidas.

Infektionsförsök (pilotstudie)

Under våren 2006 utförde vi ett infektionsförsök som till största delen finansierades med andra medel (delvis via fotbadsprojekt vid inst. för husdjuren miljö och hälsa och delvis från inst. för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap) förutom provtagning (serum, biopsier och svabbar) odlingar och MPs resor mellan Uppsala och Skara som finansierades via det aktuella SLF-anslaget. Inga typiska DD-lesioner utvecklades.

Diskussion

För att kunna behandla och förebygga DD och för att förhindra spridning av sjukdomen behöver de orsakande bakterierna identifieras. Vi har idag åtta isolat av *Treponema* från svenska nötkreatur med DD. Med hjälp av 16S rRNA sekvenser kan vi konstatera att alla isolaten är av samma art/fylotyp. Det är också denna fylotyp som är mest vanligt förekommande i DD-lesioner. Två andra fylotyper har odlats från kor i USA och Storbritannien och ett drygt tiotal har identifierats genom molekylärbiologiska metoder. De rapporterade fylotyperna är även om de tillhör samma genus av distinkt skilda arter. Det vill säga att förutom att det är extremt svårödlade bakterier kompliceras bilden ytterligare av den DD-associerade spiroketfloras diversitet.

Av olika orsaker har inte spiroketer kunnat isoleras från alla prov t ex för lång tid mellan provtagning och odling, provet har bara innehållit arter som inte växer till i de medier vi testat och stor andel andra bakterier i provet. *Treponema* spp. växer långsamt och konkurreras lätt ut av den övriga floran.

Två så kallade fingerprinting-metoder (PFGE och RAPD) har i projektet anpassats för *Treponema* och givit lovande resultat och är potentiellt användbara för molekylärbiologisk typning vid till exempel smittspårning. Isolat T 603 och T 657 kommer från samma besättning men från olika kor. Både PFGE och RAPD-resultaten tyder på att de är av samma klon. Isolat V1 som användes vid infektionsförsöket och ett isolat från en försöksko 25 dagar efter infektion (T 551) har identiska PFGE och RAPD-mönster vilket tyder på att denna klon åtminstone lyckades kolonisera huden. Tyvärr visade det sig att denna ko redan hade med sig ”egna treponemor” vid försökets start så det gick inte att bedöma eventuella symtom.

Det finns flera tänkbara orsaker till varför inte infektionsförsöket gav anslag. För det första är det svårt att lyckas med konstgjorda infektioner även med kända sjukdomsframkallande bakterier som inte är så känsliga som *Treponema*. Det som kanske ändå är troligast, bedömt utifrån den nya kunskap vi har idag om att det förekommer flera fylotyper av *Treponema* i eksemen, är att det krävs mer än en fylotyp för att få symtom. Med den odlingsmetod som använts i projektet har bara en art isolerats så vi har inte haft möjligheten att infektera med flera fylotyper.

Resultaten av ISR2-PCR körningarna och API-ZYM testen styrkte att våra isolat är av en och samma art. Kloning av ISR2-fragment från vävnadsprover kunde också visa att det finns andra fylotyper av *Treponema* hos svenska kor som vi inte kunnat isolera.

I länder där man har stora problem med klöveksem används fotbad med antibiotika för nötkreaturen, vilka fungerar som ”odlingar” för resistenta bakterier (från jord och gödsel). I Sverige används tetracyklin (licenspreparat) som lokalbehandling för svåra fall och fotbad med kopparsulfat på besättningsnivå vilket inte heller är optimalt för miljön. Vi har modifierat och utvärderat en antibiotikaresistensbestämningsmetod som tidigare utvecklats för *Brachyspira* spp. Trots långa inkuberingstider och att det inte är möjligt att räkna hur många levande bakterier som använts i inokulatet var resultaten stabila. De inkluderade antibiotikasubstansernas stabilitet i det rika odlingsmediet testades med kontrollstammar och visade sig vara tillfredsällande för den inkubationstiden som användes. Inget av isolaten var resistenta mot de testade substanserna. Den minst aktiva substansen var lincomycin för vilken MIC (minimal inhibitory concentration) oftast var utanför det testade intervallet. Växten avtog dock i de högsta koncentrationerna och MIC var 4 µg/ml vid ett test indikerande ett MIC av 4-8 µg/ml för alla isolaten. Lincomycin finns idag inte registrerat för användning i Sverige men används mycket utomlands framförallt i Nordamerika.

Sammanfattningsvis har vi genom projektet för första gången isolerat *Treponema* från svenska kor med DD. Vi har fastställt att isolaten är av en och samma fylotyp närmast besläktad med *T. phagedenis* som också isolerats i andra länder och är den mest vanligt förekommande. Vi har också visat att även andra fylotyper förekommer i lesionerna. Två potentiellt användbara molekylärbiologiska metoder för smittspårning har anpassats för isolaten och känslighetstester visade ingen resistens mot antibiotika som kan tänkas användas för behandling av DD.

Publikationer

Märit Pringle, Christer Bergsten, Lise-Lotte Fernström, Helena Höök and Karl-Erik Johansson. Isolation and characterization of *Treponema phagedenis*-like spirochetes from digital dermatitis lesions in Swedish dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica* (2008) 50:40.

Open access: <http://www.actavetscand.com/content/50/1/40>

Treponema phagedenis-like spirochetes isolated from digital dermatitis lesions in Swedish cattle. Proceedings, 14th International Symposium on Lameness in Ruminants, Colonia del Sacramento, Uruguay, Nov 8-11 2006. Märit Pringle, Christer Bergsten, Lise-Lotte Fernström and Karl-Erik Johansson. p. 197.

Övrig resultatförmedling till näringen

Märit Pringle deltog på SLFs Forskartorg på Elmia Djur- och inomgårdsmässa 18-21 oktober 2006. En populärvetenskaplig broschyr om sjukdomen och forskningsprojektet gjordes till mässan.

En hemsida om projektet och om ett parallellt Formas-finansierat projekt om virulensfaktorer hos *Treponema* finns på SLUs webbplats (<http://lb.bvf.slu.se/treponema>).

Referenser

Bergsten, C. & Pettersson, B. 1992. The cleanliness of cows tied in stalls and the health of their hooves as influenced by the use of electric trainers. *Prev Vet Med* 13, 229-238.

Cheli, R. and Mortellaro, C.M. 1974. La dermatite digitale bovino. p. 208-213, *In* P. Gallarati (ed.). Proceedings of the 8th International Meeting on Diseases of Cattle. Piacenza, Milan, Italy.

Demirkan, I., Carter, S.D., Hart, C.A. and Woodward, M.J. 1999. Isolation and cultivation of a spirochaete from bovine digital dermatitis. *Vet Rec* 145, 497-498.

Evans, N.J., Brown, J.M., Demirkan, I., Murray, R.D., Vink, W.D., Blowey, R.W., Hart, C.A. and Carter, S.D. 2008. Three unique groups of spirochetes isolated from digital dermatitis lesions in UK cattle. *Vet Microbiol* 130, 141-150.

Hillström, A. and Bergsten, C. 2005. Digital dermatit - en tickande bomb i svenska lösdrifter. *Svensk Vet Tidn* 57, 15-20.

Hultgren, J. & Bergsten, C. 2001. Effects of a rubber-slatted flooring system on cleanliness and foot health in tied dairy cows. *Prev Vet Med* 52, 75-89.

Klitgaard, K., Boye, M., Capion, N. and Jensen, T.K. 2008. Evidence of multiple *treponema* phylotypes involved in bovine digital dermatitis as shown by 16S rRNA gene analysis and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 46, 3012-3020.

Kossaibati, M.A. and Esslemont, R.J. 1997. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet J* 154, 41-51.

- Manske, T., Hultgren, J. and Bergsten, C. 2002. Topical treatment of digital dermatitis associated with severe heel-horn erosion in a Swedish dairy herd. *Prev Vet Med* 53, 215-231.
- Nordhoff, M., Moter, A., Schrank, K. and Wieler, L.H. 2008, High prevalence of treponemes in bovine digital dermatitis-a molecular epidemiology. *Vet Microbiol* 131, 293-300.
- Rodriguez-Lainz, A., Melendez-Retamal, P., Hird, D.W., Read, D.H. and Walker, R.L. 1999. Farm- and host-level risk factors for papillomatous digital dermatitis in Chilean dairy cattle. *Prev Vet Med* 42, 87-97.
- Schrank, K., Choi, B-K., Grund, S., Moter, A., Heuner, K., Nattermann, H. and Göbel, U.B. 1999. *Treponema brennaborense* sp. nov., a novel spirochaete isolated from a dairy cow suffering from digital dermatitis. *Int J Syst Bacteriol* 49, 43-50.
- Stamm, L.V., Bergen, H.L. and Walker, R.L. 2002. Molecular typing of Papillomatous Digital Dermatitis-associated *Treponema* isolates based on analysis of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3463-3469.
- Trott, D.J., Moeller, M.R., Zuerner, R.L., Goff, J.P., Waters, W.R., Alt, D.P., Walker, R.L. and Wannemuehler, M.J. 2003. Characterization of *Treponema phagedenis*-like spirochetes isolated from papillomatous digital dermatitis lesions in dairy cattle. *J Clin Microbiol* 41, 2522-2529.
- Walker, R.L., Read, D.H., Loretz, K.J. and Nordhausen, R.W. 1995. Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. *Vet Microbiol* 47, 343-355.