

Fotröta hos får – karaktärisering av svenska bakteriestammar och identifiering av virulensmarkörer (H1050142)

Bakgrund

Fotröta är en smittsam klövsjukdom som drabbar får och som orsakas av bakterien *Dichelobacter nodosus* (Beveridge, 1941). Sjukdomen förekommer i de flesta lammproducerande länder och ger upphov till stora ekonomiska förluster och inte minst ett stort djurlidande. Fotröta är en komplex sjukdom och dess svårighetsgrad anses till stor del bero på den infekterande *D. nodosus*-stammens virulens (Bennett and Hickford, 2011) men även av andra faktorer såsom fårras, klimatförhållanden, skötselfaktorer och närvaro av andra bakterier som t.ex. *Fusobacterium necrophorum* (Emery *et al.*, 1984; Graham and Egerton, 1968; Roberts and Egerton, 1969). En annan bakterie som också associeras med klövsjukdomar är *Treponema* men vars roll vid fotröta fortfarande är oklar.

Fotröta kan uppträda med varierande svårighetsgrad från benign (mild) fotröta, där nekrotiserande inflammation av klövspalthuden föreligger, till virulent (allvarlig) fotröta där sulhornet är involverat. I extrema fall kan även inflammationen gått så långt att klövkapseln separerats från underliggande vävnad. I Sverige används ett 0-5 graderingssystem från Australien (Stewart and Claxton, 1993) för bedömning av klövar. I Sverige definieras grad ≥ 2 som fotröta. Grad 0 används för helt friska klövar och grad 1 för klövar med lindrig inflammation i klövspalthuden som t.ex. kan uppstå på grund av fukt eller kontakt med gödsel. På besättningsnivå i Australien anses klinisk virulent fotröta karaktäriseras av en hög andel djur med grad 3-4 förändringar och virulent fotröta har i New South Wales bekämpats med stor framgång.

På bakterienivå är virulens mer svårdefinierbart. Ett samband mellan klinisk virulent fotröta och bakteriens förmåga att bryta ner elastin finns dock beskrivet där *D. nodosus*-isolat med god förmåga klassas som virulenta medan de som inte bryter ner detta ämne lika snabbt klassas som benigna. Ett laboratorietest (gelatin-gel-test) som bygger på detta samband har tagits fram i Australien (Palmer, 1993).

I Sverige uppmärksammades sjukdomen för första gången år 2004 (Olofsson *et al.*, 2005) och sedan dess har Svenska Djurhälsovården arbetat intensivt med att kartlägga och utarbeta strategier för att bekämpa sjukdomen. Ett urval av svenska *D. nodosus*-bakterieisolat har karaktäriserats med hjälp av gelatin-gel-testning samt med realtids-PCR för *intA*-genen som anses vara en virulensmarkör (Cheetham *et al.*, 2006) men trots att ett större antal besättningar uppvisat allvarlig klinik har endast ett fåtal av *D. nodosus*-isolaten klassats som virulenta enligt den australiska definitionen.

Syftet med det aktuella projektet var att undersöka varför allvarlig sjukdomsbild av fotröta uppstår i svenska fårbesättningar trots att svenska isolat av *D. nodosus* ofta inte uppfyller de internationellt vedertagna kriterierna för virulens. Detta skulle uppnås dels genom att karaktärisera svenska *D. nodosus*-isolat från besättningar med olika klinisk bild för att om möjligt identifiera nya virulensmarkörer dels genom att undersöka om det mer virulenta sjukdomsförloppet skulle kunna bero på en samverkan mellan *D. nodosus* och andra bakterier.

Material och metoder

Delstudie 1. Karaktärisering av D. nodosus samt andra relevanta bakterier i prover från gårdar i saneringsstudien

I delstudie 1 analyserades sparade prover från 17 av 19 besättningar från en saneringsstudie (König and Björk Averpil, 2010) för förekomst av *Treponema* spp. samt för *D. nodosus* serogrupp med modifierade metoder från Stamm *et al.* (2002) resp. Dhungyel *et al.* (2002). Dessa prover hade sedan tidigare analyserats för förekomst av *intA*-genen med realtids-PCR metod av Frosth *et al.* (manuskript) samt för förekomst av *F. necrophorum* subsp. *necrophorum* respektive subsp. *funduliforme* med metod som modifierats från Jensen *et al.* (2007). Åtta respektive nio av dessa 17 besättningar hade bedömts ha låg (≤ 29 % grad 2-5) respektive hög (≥ 40 % grad 2-5) initial prevalens av fotröta i saneringsstudien. Förutom skillnad i prevalens av fotröta mellan dessa två grupper fanns även en stor skillnad i förekomst av allvarligare skador (grad ≥ 3) med betydligt färre i gruppen med låg prevalens och fler i gruppen med hög prevalens. I denna delstudie användes beteckningarna mildare respektive allvarligare klinik för dessa två olika grupper av besättningar.

Delstudie 2 & 3. Koppling av olika svenska stammar av D. nodosus till klinisk bild i besättningar & behandlingssvikt i fårbesättningar som sanerats mot fotröta

I delstudie 2 samt 3 besöktes totalt 23 fårbesättningar under hösten 2011 respektive hösten 2012. Samtliga får i besättningarna undersöktes kliniskt och klövarna graderades enligt det australiska graderingssystemet beskrivet ovan (Stewart and Claxton, 1993) med undantag för att en extra gradbenämning (1,5) användes i ett mindre antal fall där varken grad 1 eller grad 2 ansågs stämma till fullo. Provtagning utfördes i samband med de kliniska undersökningarna. Besättningarna hade olika klinisk bild enligt kategorierna 1-4 vilket kan ses i tabell 1. Besättningar som fått återfall av fotröta efter sanering har fått kategoritillhörighet 5 i samma tabell. Besättningar i kategori 1 och 2 bedömdes som kliniskt friska medan 3, 4 och 5 bedömdes som kliniskt sjuka med avseende på fotröta.

Tabell 1. Definition av besättningskategorierna 1-5.

1. Endast djur med grad 0 eller ett fåtal djur med grad 1	2. Många djur med grad 1
3. Fåtal djur med grad 2-5	4. Många djur med grad 2-5
5. Besättningar som fått återfall av fotröta efter sanering (saneringssvikt)	

Målet var att provta fem besättningar från respektive kategori och att 50 djur per besättning skulle provtas men det kunde inte alltid uppfyllas av olika skäl. Om det fanns djur med klövförändringar i besättningarna så skulle dessa provtas och i besättningar utan förändringar togs prover slumpvis. Fem besättningar provtogs både under 2011 och 2012. I en av besättningarna ingick 10 prover från get och i tre av besättningarna togs förutom de 50 ordinarie proverna från får dessutom 10 prover från nöt. Totalt togs 1413 prover med e-svabb och dessa analyserades för *D. nodosus* både med odling och med realtids-PCR (Frosth *et al.*, 2012). Proverna analyserades dessutom för *D. nodosus intA*-genen samt för förekomst av *F. necrophorum* och *Treponema* spp. med realtids-PCR metoder som tidigare angetts. Sekvensering utfördes för ett antal genus *Treponema* positiva prover ($n=50$) för artbestämning. Erhållna sekvenser jämfördes med sekvenser i GenBank med hjälp av BLAST och ett fylogenetiskt träd konstruerades med hjälp av CLC Main Workbench.

Alla isolat ($n=163$) verifierades med realtids-PCR för *D. nodosus* och analyserades för *intA*-genen samt serogrupeerades med metoder enligt ovan. Ett antal isolat ($n=18$) gelatin-gel-testades av Veterinærinstituttet i Oslo, Norge varav 13 st dessutom helgenomsekvenserades tillsammans med 7 st gelatin-gel-testade *D. nodosus*-isolat från SVA: s stamkollektion. Isolaten var från besättningar från samtliga kategorier förutom från kategori 1 samt från nöt och get. Helgenomsekvenseringen utfördes på en Illumina MiSeq vid SVA. Även ett av de isolat som visade sig inte vara *D. nodosus* helgenomsekvenserades. Erhållna sekvenser

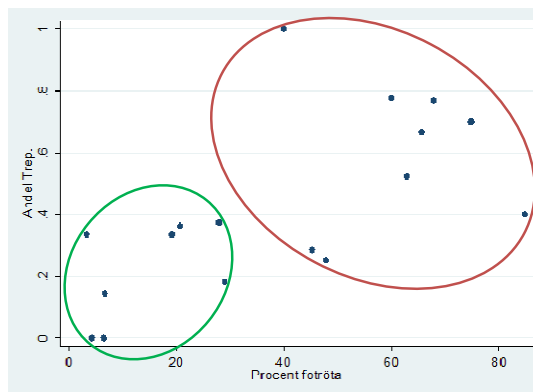
analyserades och jämfördes med varandra med hjälp av mjukvaran Gegenees (Ågren *et al.*, 2012). För samtliga delstudier gäller att materialet analyserades med hjälp av deskriptiv statistik, chi2-test, Fisher's exact test, logistisk regressionsanalys samt logistisk blandad regressionsanalys där hänsyn har tagits till upprepade mätningar inom besättning.

Resultat

Delstudie 1. Karaktärisering av *D. nodosus* samt andra relevanta bakterier i prover från gårdar i saneringsstudien

Arton prover av 157 från saneringsstudien var positiva för *D. nodosus* *intA*-genen. De positiva proverna kunde återfinnas i en besättning med mildare klinik (3,3 % grad 2-5) och i tre med allvarligare klinik (≥ 40 % grad 2-5), men ingen statistisk signifikant skillnad kunde ses mellan besättningar med mildare eller allvarligare klinik och *intA* i detta material. Det fanns heller ingen statistiskt signifikant skillnad vad gäller fynd av *F. necrophorum* och mildare eller allvarligare klinik oavsett om man tittade på totalfynd av *F. necrophorum* eller på underartsnivå (*F. n. necrophorum* resp. *F. n. funduliforme*). Totalt var 16 av 17 besättningar positiva för *F. necrophorum*. Sju av åtta besättningar med mildare klinik (< 40 % grad 2-5) hade fynd av *F. n. funduliforme* jämfört med fem av nio med allvarligare klinik (≥ 40 %). När det gäller *F. n. necrophorum* påvisades den underarten endast hos en besättning med mildare klinik (< 40 % grad 2-5) medan den hittades hos fem av nio besättningar med allvarligare klinik (≥ 40 %) men skillnaden var inte signifikant.

Sextioåtta prover var positiva för *Treponema* och de återfanns i sex besättningar med mildare klinik och i nio besättningar med allvarligare klinik. Det fanns en tendens att besättningar med allvarligare klinik hade högre andel får med *Treponema* jämfört med besättningar med mildare klinik ($p=0,057$) vilket kan ses i figur 1.



Figur 1. *Treponema* tenderade att oftare hittas i besättningar med allvarlig klinik av fotröta (inringade med rött) än i besättningar med mild klinik (inringade med grönt) ($p=0,057$).

Endast 29 prover fungerade att serogruppera och det låga antalet kan ha berott på att metoden inte utvärderats för svabbprover utan för isolat. I ett svabbprov kan det finnas DNA från flera olika *D. nodosus* serogrupper och dessutom andra ämnen som skulle kunna störa analysen. En annan möjlig förklaring skulle kunna vara sekvensskillnader mellan våra isolat och de Australiska isolat som metoden utvecklats med hjälp av. Totalt påvisades sex olika *D. nodosus* serogrupper (A, B, C, D, G samt H) i detta material och hur de fördelade sig mellan besättningar med mildare respektive allvarligare klinik av fotröta kan ses i tabell 2. Fyra serogrupper (E, F, I samt M) påvisades inte i någon besättning men det var som sagt få prover som fungerat att serogruppera och inget tydligt svar på om serogrupp har betydelse för mildare eller allvarligare klinik kan ges baserat på detta material.

Tabell 2. *D. nodosus* serogrupper som påvisats i besättningar med mildare respektive allvarligare klinik av fotröta.

<i>D. nodosus</i> serogrupper	A	B	C	D	G	H
Antal besättningar med mildare klinik (≤ 29 % grad 2-5)	3	1	0	1	1	1
Antal besättningar med allvarligare klinik (≥ 40 % grad 2-5)	5	1	1	2	1	0

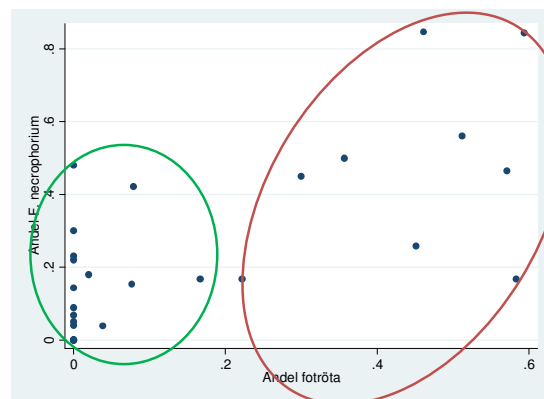
Delstudie 2 & 3. Koppling av olika svenska stammar av D. nodosus till klinisk bild i besättningar & behandlingssvikt i fårbesättningar som sanerats mot fotröta

I hälften av besättningarna som bedömts som kliniskt friska (endast djur med <grad 2) påvisades *D. nodosus*, men dessa besättningar hade en signifikant lägre andel djur med *D. nodosus* än besättningar som bedömts som kliniskt sjuka (varierande antal djur med grad 2-5). Om man ser till kategorierna så var det endast en kategori 1 besättning som hade fynd av *D. nodosus* (<10%), däremot hade hälften av kategori 2 besättningarna fynd. Samtliga besättningar i kategori 3-5 var positiva för *D. nodosus* (>40% av djuren, i de allra flesta >60% av djuren). Skillnaden avseende förekomst av *D. nodosus* mellan kategorierna 1-2 (kliniskt friska) och 3-5 (kliniskt sjuka) var signifikant med högre förekomst av *D. nodosus* i kategori 3-5. På individnivå fanns en signifikant skillnad i förekomst av *D. nodosus* mellan olika grader. Nästan 100 % av alla får med fotröta (grad 2-5) hade förekomst av *D. nodosus*, medan endast 48 % av de med grad 0-1,5 hade fynd. Sannolikheten att påvisa *D. nodosus* hos ett får med grad 2-5 var 9 ggr så hög jämfört med ett får med grad 0-1,5 ($p<0,001$).

Dichelobacter nodosus *intA*-genen återfanns hos totalt fyra besättningar, två från vardera av kategorierna 3 respektive 4. En av dessa besättningar (kategori 4) provtogs både 2011 och 2012 och *intA*-genen påvisades vid båda provtagningsomgångarna. Vid provtagningsstillfället 2012 klassificerades denna besättning som kategori 5 (saneringssvikt) då den efter provtagningen 2011 behandlat sina djur men fortfarande hade djur med fotröta grad 2-5 2012 och tom av allvarligare art (40 % grad 2-5 jmf mot 24 % grad 2-5 och dessutom med betydligt högre andel grad 4 än tidigare). På besättningsnivå kunde ingen statistisk signifikant skillnad påvisas vad gäller *intA*. På individnivå kan man se att *D. nodosus*-positiva får med grad 3-5 har signifikant högre förekomst av *intA* jämfört med *D. nodosus* positiva får med grad 0-1,5 respektive grad 2, men när man tar hänsyn till upprepade mätningar inom besättning försvinner denna signifikans.

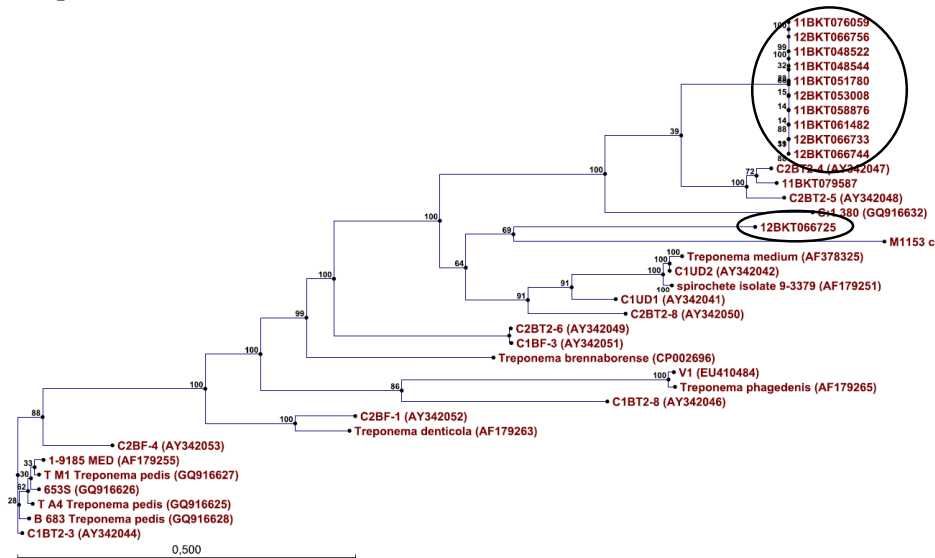
Besättningar där inga får bedömts ha fotröta hade signifikant färre fynd av *F. necrophorum* jämfört med besättningar där får bedömts ha fotröta (grad 2-5) se figur 2. Endast besättningar i kategorierna 2-5 hade fynd av *F. n. necrophorum* medan *F. n. funduliforme* även kunde påvisas i en kategori 1 besättning (dock endast hos 5 % av de provtagna djuren). Det var signifikant fler besättningar i kategorierna 4-5 som hade en högre andel *F. necrophorum* fynd jämfört med besättningar i kategorierna 1-3. På individnivå var förekomsten av *F. n. necrophorum* resp. *F. n. funduliforme* signifikant högre hos får med allvarligare klinik (grad 2-3 resp. grad 2-5) än hos får med mildare klinik (grad 0-1,5). Inga får med grad 4-5 i detta material hade fynd av *F. n. necrophorum*.

När det gäller förekomst av *Treponema* sågs varken på besättningsnivå eller på individnivå någon signifikant skillnad mellan förekomst av *Treponema* och mildare respektive allvarligare klinik av fotröta. Endast 11 av 50 *Treponema* PCR positiva prover fungerade att direktsekvenserna. Det låga antalet kan ha berott på att fler än en art fanns närvarande i proverna och för att komma runt det skulle man behöva klon PCR-produkterna innan sekvensering vilket är tidskrävande.



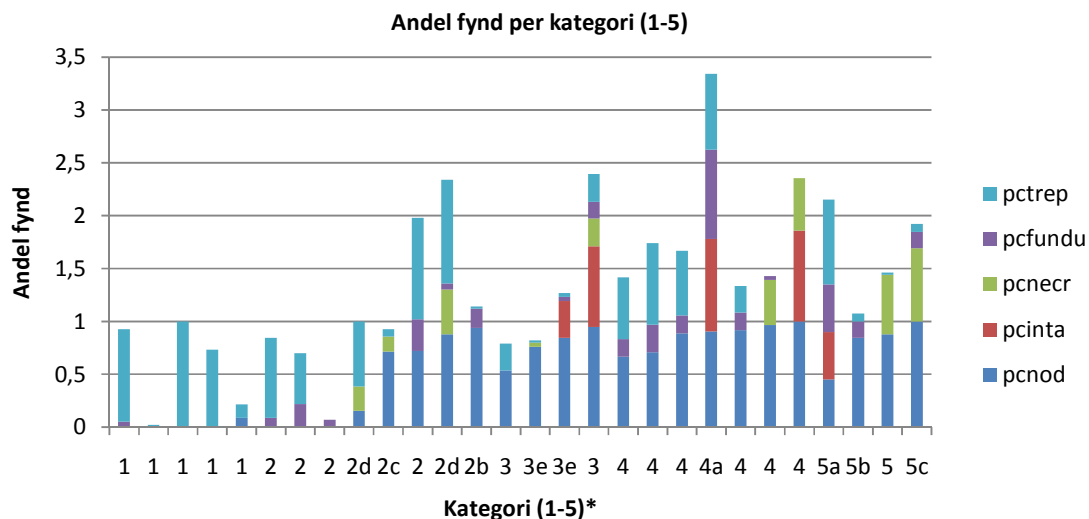
Figur 2. *Fusobacterium necrophorum* hittades mer sällan i fotrötefria besättningar (inringade med grönt) än i besättningar med fotröta (grad 2-5) (inringade med rött).

Sekvenserna som erhöills visade sig vara av två olika typer varav den ena hittades i 10 prover (från 6 olika besättningar och från 3 olika kategorier 2-4) och den andra i endast ett prov (från besättningen som klassats som kategori 4 år 2011 och sedan som kategori 5 året efter). Ingen av de två sekvensvarianterna matchade några av de sekvenser som finns deponerade i GenBank fullt ut vilket kan ses i dendrogrammet på nästa sida (fig. 3) och även om det inte går att säga vilken *Treponema* art dessa sekvenser representerar så kan man ändå säga att de inte representerar *T. phagedenis*-like, *T. pedis*, *T. parvum* eller *T. medium* som är patogener hos svin och nöt. Det rör sig förmodligen om någon annan *Treponema* art och kanske någon som är specifik för får.



Figur 3. Dendrogram över *Treponema* ISRII sekvenser. Inringat är de 11 som hittades hos får i detta projekt.

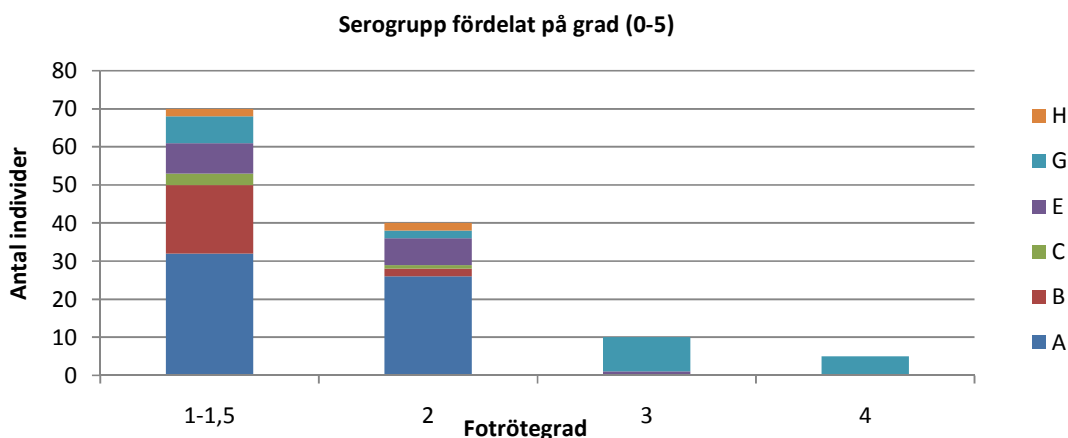
Sammanfattningsvis kan om detta material sägas att *D. nodosus* framför allt finns hos besättningar i de högre kategorierna, även om andelen kan vara väldigt olika inom de olika kategorierna. *IntA*-genen har bara påvisats i besättningar med allvarligare klinik, men eftersom inte alla djur provtagits i alla besättningar är det svårt att uttala sig om något mönster. *Fusobacterium necrophorum* finns ganska utspridd, men är något mer vanligt förekommande i de högre kategorierna. *Treponema* verkar finns överallt och ofta hos en ganska stor andel av djuren. Fynden uppdelat på kategori kan ses i diagrammet nedan.



*Fem besättningar förekommer på två ställen i diagrammet pga. att de provtagits vid två tillfällen (2011 & 2012) vilket markerats med a-e. Pc står för procent och det är andel som avses.

Odlingen resulterade i 163 isolat från totalt 14 besättningar från samtliga kategorier förutom kategori 1. Samtliga isolat hade karakteristiskt utseende för *D. nodosus* både på odlingsplatta och i mikroskop varav 143 bekräftades vara *D. nodosus* med realtids-PCR. Sangersekvensering av 16S rRNA-genen för hälften av de 20 isolaten som inte bekräftades vara *D. nodosus* visade att det skulle kunna röra sig om en ny art och helgenomsekvensering av ett isolat stärkte den teorin ytterligare. Fler studier krävs dock för att kunna dra några slutsatser av dess relevans i dessa prover.

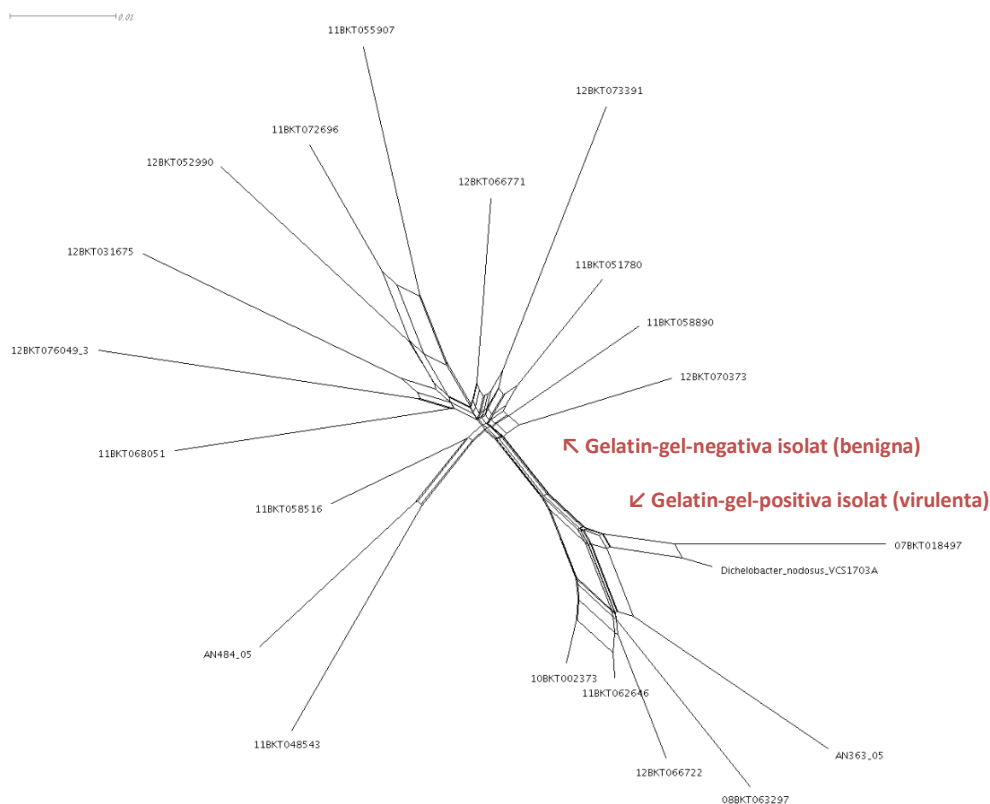
Totalt fungerade 133 st *D. nodosus*-isolat att serogruppera och i de flesta besättningar förekom endast en serogrupp, men i tre besättningar fanns mer än tre olika serogrupper (BGH, ACH, ACBH). Serogrupp A hittades i 7 besättningar, B i 4 besättningar, C i 3 besättningar, E i en besättning, G i 3 besättningar och H i 3 besättningar. Ingen signifikant skillnad mellan serogrupp och kategori kunde påvisas. Hos får med grad 3 eller 4 hittades i stort sett endast serogrupp G (ett djur hade serogrupp E) medan får med grad 1-2 uppvisade alla funna serogrupper vilket kan ses i diagrammet nedan. När det gäller samband mellan serogrupp och *intA* finns en signifikant skillnad då *intA* endast påvisats hos serogrupp G och H men då 17 av 18 *intA*-positiva fynd kommer från en och samma besättning går det inte att skilja på om det är en besättningseffekt eller en serogruppeffekt.



Sexton av arton gelatin-gel-testade isolat från denna studie var negativa medan två isolat var positiva. De två gelatin-gel-positiva isolaten var från samma *intA*-positiva besättning som nämnts tidigare och som hade den mest allvarliga kliniken om man ser till andel grad 4 i besättningen.

RAPD-analys inför helgenomsekvensering vilket angivits i ansökan utfördes ej då det visade sig att det var mycket svårt att odla upp isolaten igen efter att de frysts ner och sparats i -70 °C utan urvalet fick ske efter vilka isolat som gick att odla upp igen. Totalt erhöles sekvenser från 20 st *D. nodosus*-isolat, både från *D. nodosus* som isolerats i detta projekt (13 st) och från *D. nodosus*-isolat från SVA: s stamkollektion (7 st som tidigare gelatin-gel-testats) och dessa kan ses tillsammans med *D. nodosus*-stammen som finns deponerad i Genbank (VCS1703A) i dendrogrammet på nästa sida (fig. 4). Generellt kunde stor sekvenslikhet ses mellan isolaten. En tydlig skillnad föreligger dock mellan gelatin-gel-positiva och gelatin-gel-negativa isolat vilket följer samma mönster som man också ser i Australien och Norge (Kennan *et al. manuskript*). Om man tittar på gennivå vad som skiljer svenska *D. nodosus*-isolat som bestämts som virulenta respektive benigna enligt gelatin-gel-test hittades skillnader i förekomst av integras *A1* & *A2* (*intA*) och *Vap E1* & *E3* generna. Däremot kunde inga unika genetiska skillnader påvisas mellan isolat från kliniskt sjuka besättningar (kategori 3-5) och

kliniskt friska besättningar (kategori 2). Inga unika skillnader kunde heller påvisas om man jämförde respektive kategori mot övriga kategorier.



Figur 4. Stor sekvenslikhet kunde ses inom gruppen av de helgenomsekvenserade *D. nodosus*-isolaten trots att de kommer från olika djurslag och tillhör 7 olika serogrupper. Man kan även se att gelatin-gel-positiva respektive negativa isolat skiljer sig åt.

Diskussion

Några samband mellan egenskaper hos *D. nodosus* som undersökts i detta projekt och mildare respektive allvarligare klinik kunde inte påvisas på besättningsnivå, men numeriskt är det ändå vanligare med förekomst av *intA* i besättningar med allvarligare klinik. På individnivå (från delstudie 2 & 3) ser vi att det är vanligare att får med allvarligare klinik (grad 3-5) har förekomst av *intA* jämfört med får med mildare klinik (grad 0-2), men skillnaden är inte signifikant då de *intA* positiva fåren kommer från endast fyra besättningar. En viss koppling finns mellan klinisk bild och fynd av *intA*, men detta måste undersökas vidare i andra studier. När det gäller fynd av andra bakterier än *D. nodosus* och koppling till mildare respektive allvarligare klinik påvisades att fynd av *F. necrophorum* är signifikant vanligare hos får med allvarligare klinik på individnivå (delstudie 2 & 3). På besättningsnivå, baserat på resultat från delstudie 1, kan vi säga att det är vanligt med fynd av *F. necrophorum* oavsett klinisk bild och att andelen fynd inte skiljer sig åt mellan besättningar med olika klinik. Men baserat på det större materialet i delstudie 2 & 3 kan vi säga att det är signifikant fler besättningar med allvarlig klinik (kategori 4-5 eller hög andel får med fotröta grad 2-5) jämfört med mild klinik (kategori 1-3 eller låg andel får med fotröta) som har en hög andel *F. necrophorum* fynd. När det gäller fynd av *Treponema* kan man från delstudie 1 säga att besättningar med allvarligare klinik tenderade att ha högre förekomst av *Treponema*, men det kan inte bekräftas av resultaten i delstudie 2.

Förekomst av *D. nodosus* i besättningar med endast grad 0 eller med något enstaka djur med grad 1 (kategori 1) var ovanligt, däremot påvisades *D. nodosus* i hälften av besättningarna med många djur med grad 1 (kategori 2). Andelen djur med *D. nodosus* i dessa kliniskt friska besättningar (<grad 2) var dock signifikant lägre än andelen djur med *D. nodosus* i besättningar som bedömts som kliniskt sjuka (grad 2-5).

Inga unika genetiska skillnader mellan *D. nodosus*-isolat kunde påvisas från besättningar med olika klinisk bild (kategori 2-5) i detta material. När det gäller kategori 5 (saneringssvikt) påvisades *intA*-genen inte oftare i dessa besättningar än i de andra besättningarna i vårt material. Inga andra genetiska markörer påvisades heller som skulle kunna användas för att identifiera *D. nodosus*-stammar kopplade till saneringssvikt, dock sekvenserades endast två isolat från denna kategori. Däremot kunde genetiska skillnader ses mellan svenska *D. nodosus*-isolat som funnits vara gelatin-gel-positiva respektive gelatin-gel-negativa. De skillnader som påvisats för dessa isolat skulle kunna användas för att identifiera de *D. nodosus* stammar som kan ge de mest allvarliga fotröteskadorna. I vissa besättningar kan dock nästan lika allvarliga skador ses eller att lindrigare skador förekommer fast hos större andel djur och dessa fall kan vi inte förklara med hjälp av genetiska skillnader hos *D. nodosus*. Vi kan heller inte förklara dessa fall genom skillnader i förekomst av *Treponema*. Däremot skulle förekomst av *F. necrophorum* kunna vara en möjlig orsak till den allvarligare kliniska bilden som ibland ses hos svenska fårbesättningar. Ett statistiskt signifikant samband mellan förekomst av *F. necrophorum* och allvarlig klinik av fotröta kunde påvisas i denna studie och det är dessutom sedan tidigare känt att *F. necrophorum* kan producera toxiner och orsaka vävnadsdöd. Förekomst av *F. necrophorum* skulle kunna vara en förklaring till varför vi ser allvarlig klinik hos våra svenska fårbesättningar trots att isolerade *D. nodosus*-stammar ofta är gelatin-gel-negativa (benigna) i virulens test, men det kan även finnas andra faktorer av betydelse som inte undersökts i denna studie och som skulle behöva undersökas vidare.

Förutom resultaten ovan har projektet lett till ett ökat samarbete vad gäller fotröta både inom Norden och internationellt. PCR-metodik för detektion av *D. nodosus* har harmoniserats mellan Sverige, Norge och Danmark vilket har resulterat i en gemensam publikation (Frosth et al., 2012). *Dichelobacter nodosus*-isolat som helgenomsekvenserats inom detta projekt jämförs i skrivande stund med *D. nodosus*-isolat från Australien, Norge, Bhutan, Nepal, Indien, Danmark och Storbritannien (Kennan et al. manuskript) vilket kommer att leda till ökad kunskap om sjukdomen.

Framtida studier skulle kunna innefatta framtagande av en molekylärbiologisk metod för att snabbt och säkert identifiera de mest virulenta *D. nodosus*-stammarna (gelatin-gel-positiva) som skulle kunna användas i kontrollprogrammet mot fotröta. Risken att vi i Sverige också ska få in virulenta *D. nodosus*-stammar i landet utifrån som kan orsaka stora problem har ökat på senare år i och med EU-regler för frihandel med djur. I Norge har detta redan skett (Gilhuus et al., 2013).

Publikationer

Internationella vetenskapligt granskade publikationer

- Frosth S., Slettemeås JS., Jørgensen HJ., Angen Ø., and Aspán A. Development and comparison of a real-time PCR assay for detection of *Dichelobacter nodosus* with culturing and conventional PCR: harmonisation between three laboratories. Acta Vet Scand. 2012 Jan 31; 54 (1):6 <http://www.actavetscand.com/content/54/1/6>
- Kennan RM., Gilhuus M., Frosth S., Seemann T., Dhungyel O., Whittington R., Boyce JD., Aspán A., Jørgensen HJ., Bulach DM., and Rood JJ. Genomic evidence for a globally

distributed, bimodal population in the ovine footrot pathogen *Dichelobacter nodosus*.
Manuskript.

- Frosth *et al.* "Characterisation of *Dichelobacter nodosus* isolates and detection of *Fusobacterium necrophorum* and *Treponema* spp. in Swedish lambs with different clinical manifestations of footrot". *Manuskript*.

Nationella granskade publikationer

- Angen Ø., Akkad NB., Worm R., Nyman A., Frosth S., Aspán A., Slettemeås JS., Jørgensen H., Klaas IC. Detektion af *Dichelobacter nodosus* og sanering for ondartet klovsyge i tre danske fårebesætninger. DVT 8/2011 sidor 28-34.

Konferens abstracts, granskade

- Frosth S., König U., and Aspán A. The presence of *Fusobacterium necrophorum* in Swedish lambs with footrot. FEBS-kurs Pathogen-host-interactions of major animal infectious diseases and zoonoses, 9-15 september 2012, Spetses, Grekland.
- Frosth S., König U., Holmström G., Zuerner R., and Aspán A. Correlation between clinical manifestations of footrot in Swedish sheep flocks and *Dichelobacter nodosus* strains. 2nd Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals, 9-12 okt 2012, Prato, Italien.
- Frosth S., Bagge E., Ekström K., Ericsson Unnerstad H., and Pringle M. Antimicrobial susceptibility testing of *Dichelobacter nodosus*. 17th International Symposium and 9th International Conference on Lameness in Ruminants, 11-14 aug 2013, Bristol, England.
- Kennan RM., Gilhuus M., Frosth S., Seemann T., Boyce JD., Aspán A., Jørgensen HJ., Bulach DM., and Rood JI. Whole genome sequence analysis of *Dichelobacter nodosus* indicates that virulent and benign isolates belong to two separate lineages. Bacpath 12: Molecular Analysis of Bacterial Pathogens, 29 september till 2 oktober 2013, Moreton Island, Australien.

Övrig resultatförmedling till näringen

- Information om projektet på SVA:s hemsida
(<http://www.sva.se/sv/Forskning-och-produkter/Aktuella-forskningsprojekt/Fotrota-hos-far---karakterisering-av-svenska-bakteristammar-och-identifiering-av-virulensmarkorer/>)
- Information om projektet på Svenska Djurhälsovårdens hemsida
(http://www.svdhv.org/upload/documents/Far/projekt/110315_far_nytt_fotroteprojekt_dic_h_nod.pdf)
- Informerade om projektet vid SVA: s monter på Veterinärmötet 8-9 november 2012.
- Projektet presenterades på ett fotrötemöte i Stavanger, Norge den 1 nov 2012 där veterinärer, doktorander och forskare från både Sverige, Norge och Danmark medverkade.

Referenser

- Bennett, G.N., Hickford, J.G., 2011. Ovine footrot: new approaches to an old disease. *Vet Microbiol* 148, 1-7.
- Beveridge, W.I.B., 1941. Foot-rot in sheep: a transmissible disease due to infection with *Fusiformis nodosus* (n.sp.), In: *Studies on its Cause, Epidemiology and Control*. Council for Scientific and Industrial Research, Melbourne (Bulletin No. 140), pp. 1-56.
- Cheetham, B.F., Tanjung, L.R., Sutherland, M., Druitt, J., Green, G., McFarlane, J., Bailey, G.D., Seaman, J.T., Katz, M.E., 2006. Improved diagnosis of virulent ovine footrot using the *intA* gene. *Vet Microbiol* 116, 166-174.
- Dhungyel, O.P., Whittington, R.J., Egerton, J.R., 2002. Serogroup specific single and multiplex PCR with pre-enrichment culture and immuno-magnetic bead capture for identifying strains of *D. nodosus* in sheep with footrot prior to vaccination. *Mol Cell Probes* 16, 285-296.

- Emery, D.L., Stewart, D.J., Clark, B.L., 1984. The structural integrity of pili from *Bacteroides nodosus* is required to elicit protective immunity against foot-rot in sheep. Aust Vet J 61, 237-238.
- Frosth, S., Slettemeås, J.S., Jørgensen, H.J., Angen, Ø., Aspan, A., 2012. Development and comparison of a real-time PCR assay for detection of *Dichelobacter nodosus* with culturing and conventional PCR: harmonisation between three laboratories. Acta Vet Scand 54, 6.
- Gilhuus, M., Vatn, S., Dhungyel, O.P., Tesfamichael, B., L'Abée-Lund, T.M., Jørgensen, H.J., 2013. Characterisation of *Dichelobacter nodosus* isolates from Norway. Vet Microbiol 163, 142-148.
- Graham, N.P., Egerton, J.R., 1968. Pathogenesis of ovine foot-rot: the role of some environmental factors. Aust Vet J 44, 235-240.
- Jensen, A., Hagelskjær Kristensen, L., Prag, J., 2007. Detection of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* in tonsillitis in young adults by real-time PCR. Clin Microbiol Infect 13, 695-701.
- König, U., Björk Averpil, H., 2010. Sanering av fotröta i svenska fårbesättningar. Svensk Vet Tidn 10, 11-17.
- Olofsson, A., Bergsten, C., Björk Averpil, H., 2005. Smittsam klövsjukdom hos får diagnostiserad för första gången i Sverige (Infectious claw disease diagnosed for the first time in Sweden). Svensk veterinärtidning 11, 11-14. The reference is in Swedish, there is an English summary in the article.
- Palmer, M.A., 1993. A gelatin test to detect activity and stability of proteases produced by *Dichelobacter (Bacteroides) nodosus*. Vet Microbiol 36, 113-122.
- Roberts, D.S., Egerton, J.R., 1969. The aetiology and pathogenesis of ovine foot-rot. II. The pathogenic association of *Fusiformis nodosus* and *F. necrophorus*. J Comp Pathol 79, 217-227.
- Stamm, L.V., Bergen, H.L., 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.
- Stewart, D.J., Claxton, P.D., 1993. Ovine foot rot: Clinical diagnosis and bacteriology, In: Corner LA, Bagust TJ (Eds.) Australian standard diagnostic techniques for animal diseases. CSIRO, East Melbourne, pp. 1-27.
- Ågren, J., Sundström, A., Håfström, T., Segerman, B., 2012. Gegenees: fragmented alignment of multiple genomes for determining phylogenomic distances and genetic signatures unique for specified target groups. PLoS One 7, e39107.