



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Fotröta hos får:
Dichelobacter nodosus överlevnad i jord

Karolina Enlund

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:54*

Fotröta hos får:
Dichelobacter nodosus överlevnad i jord

Karolina Enlund

Handledare: Märit Pringle, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Anna Aspán, Enheten för bakteriologi , SVA

Examinator: Jakob Ryd Ottosson, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Kurskod: EX0234, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: Dichelobacter nodosus, överlevnad, realtids-PCR

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:54*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	4
Summary	5
Inledning.....	6
Syfte.....	6
Litteraturoversikt.....	6
Historia	6
Patogenes och klinisk bild	6
<i>Dichelobacter nodosus</i>	8
Överlevnad i miljön	9
Diagnos	10
Behandling och kontroll	10
Behandling.....	10
Kontroll versus elimination	10
Vaccinering	11
Genetisk resistens	11
Detektion av <i>D. nodosus</i> i jord	11
Material och metoder	12
Resultat.....	14
Diskussion.....	15
Uppförelsen av <i>D. nodosus</i> i buljong	15
Preparation av spikade jordprover.....	15
EMA	16
Odling av <i>D. nodosus</i> från jordproverna	16
Förvaring vid olika temperaturer	17
Övrigt.....	17
Framtida forskning	18
Slutsats	18
Tack	18
Litteraturlista.....	18

SAMMANFATTNING

Fotröta hos får orsakar ekonomiska förluster och djurlidande i stora delar av världen. Sjukdomen orsakas av bakterien *Dichelobacter nodosus*. Fotröta har varit en känd sjukdom i hundratals år men först 1938 fann man den sjukdomsframkallande organismen.

När klövspaltens hud blir skadad eller utsätts för långvarig fukt kan den invaderas av jord- och träck-bakterien *Fusobacterium necrophorum*. Denna bakterie kan ge inflammation av klövspalten och möjliggör även för andra bakterier, inklusive *D. nodosus*, att etablera sig. De båda bakterierna fungerar synergistiskt. Även andra bakterier kan vara inblandade i patogenesen.

Symtom på fotröta är hälsa och djuren ligger ofta mer än vanligt. Vid inspektion av drabbade klövar ses först en lindrig inflammation i klövspalten, så småningom med illaluktande grått sekret. I allvarliga fall ses sedan underminering av sul- och vägghorn. Kroniska smittbärare förekommer och miljöfaktorer såsom fukt och värme påverkar kraftigt sjukdomens uttryck.

Dichelobacter nodosus är en Gramnegativ obligat anaerob bakterie, en rörlig stav med rundade ändar. Olika bakteriestammar har olika virulens. Virulensen är relaterad till fimbrier av typ IV, som i sin tur är associerade till bakteriens rörlighet, förmågan att producera proteaser samt till celladhesion. Bakterien är svårödlad och prov från fotrötelesioner odlas i första hand på hovagar. För diagnos kan man också använda sig av PCR (polymerase chain reaction)-analys för att detektera bakterie-DNA i olika sorters prover.

Behandlingen av fotröta består av fotbad, utslagning av misstänkta kroniker och i allvarliga fall allmänbehandling med antibiotika. Vaccin finns men fungerar i allmänhet dåligt. Vissa fårraser har visat sig ha större motståndskraft än andra mot sjukdomen.

Få artiklar har skrivits om *D. nodosus* överlevnad i miljön. Överlevnaden anges i olika källor från 3 till 14 dagar. Svenska Fårhälsövarlden var intresserade av en studie som skulle visa hur länge *D. nodosus* kan överleva i miljön. Syftet med detta försök var därför att i laboratoriemiljö undersöka hur länge *D. nodosus* kan överleva i jord.

Typstammen för *D. nodosus* uppodlades och tillsattes jordprover som sedan förvarades vid två olika temperaturer. Prover togs ut under 14 dagar och Realtids-PCRanalys användes för att detektera bakterie-DNA. För att säkerställa att DNA kom från levande bakterier genomfördes även odling på hovagarplattor. Prover från dessa analyserades också med hjälp av Realtids-PCR för att detektera växt av *D. nodosus*. Förutom odlingen prövades även en metod att skilja viabla från icke-viabla celler; EMA (etidium monoazid bromid) -behandling.

Resultaten visade att levande bakterier fanns kvar i jorden den sista dagen av försöket, det vill säga efter 14 dagar. Från dag 7 sågs en minskning i antal positiva prov på hovagarodlingen. Däremot var samtliga prover som togs direkt från jorden positiva, vilket betyder att EMA-behandlingen inte lyckades fullt ut. Några slutsatser angående temperaturens betydelse för bakteriens överlevnad kunde inte dras. Detta försök har således visat att bakterien kan överleva längre i jord i aerob miljö än man tidigare trott. Denna kunskap har stor praktisk betydelse vid behandling av fotröta i besättningar då man inte längre kan anta att ett utrymme, eller en hage, som varit fritt från får i två veckor är riskfritt ur smittosynpunkt.

SUMMARY

Footrot in sheep causes economic losses and animal suffering in large parts of the world. The disease is caused by the bacterium *Dichelobacter nodosus*. Footrot has been a known disease for hundreds of years and in 1938 the disease-causing organism was found.

When the interdigital skin is injured or is exposed to prolonged moisture it is invaded by the soil- and faecal bacterium *Fusobacterium necrophorum*. This bacterium can cause inflammation of the interdigital skin and allows for other bacteria, including *D. nodosus*, to establish. The two bacteria work synergistically. Other bacteria may also be involved in the pathogenesis. The main sign of footrot is lameness and animals often lie down more than usual. At first, affected hooves show only a mild degree of inflammation of the interdigital skin. Eventually a foul-smelling gray ooze is seen which is typical of the disease. In severe cases an undermining of the sole- and wallhorn is seen. Chronic carriers exist and environmental factors such as humidity and heat significantly affect the expression of the disease.

Dichelobacter nodosus is a Gram-negative obligate anaerobic bacterium, a motile rod with rounded ends. Different strains have different virulence. Virulence is related to the type IV fimbriae, which in turn is associated with bacterial motility, the ability to produce proteases and to cell adhesion. This bacterium is difficult to cultivate and samples from footrot-lesions are grown primarily on hoof-agar. Diagnosis can also be made by using a PCR (polymerase chain reaction) to detect bacterial DNA in various types of samples.

The treatment of footrot consists of foot bathing, exclusion of chronic carriers and in severe cases general treatment with antibiotics. Vaccines are available but are generally poor. Some breeds have been shown to have a greater resistance than others against the disease.

Few articles have been written about *D. nodosus* survival in the environment. The survival time is specified in various sources from 3 to 14 days. The Swedish animal health service showed interest in the performance of a study that would show how long *D. nodosus* can survive in the environment. The purpose of this investigation was, therefore, that in a laboratory environment examine how long *D. nodosus* can survive in soil.

The type strain of *D. nodosus* was cultivated and mixed with soil and samples were then stored at two different temperatures. Samples were taken during 14 days and real-time PCR analysis was used to detect bacterial DNA. To ensure that the DNA came from live bacteria samples were also inoculated onto hoof- agar. Samples from the agar were also analyzed using real-time PCR to detect the growth of *D. nodosus*. Besides the hoof agar culture a method to distinguish viable from non-viable cells was used; EMA (etidium monoazid bromide) treatment.

Results showed that live bacteria remained in the soil on the last day of the experiment, ie after 14 days. From day 7 there was a reduction in the number of positive samples from the culture on hoof agar. In contrast, all samples that were taken directly from the soil were positive, which means that the EMA treatment was not entirely successful. Any conclusions about the temperatures impact on bacterial survival could not be made. This experiment has thus shown that bacteria can survive longer in soil in an aerobic environment than previously thought. The results from this study have great practical importance in the treatment of footrot in herds since one can no longer assume that a pen or a field which has been without sheep for two weeks is safe to use.

INLEDNING

Fotröta hos får orsakar ekonomiska förluster och djurlidande i stora delar av världen. Sjukdomen orsakas av bakterien *Dichelobacter nodosus* i närvaro av bakterien *Fusobacterium necrophorum*.

I Sverige upptäcktes sjukdomen för första gången vintern 2004 (Olofsson 2005) och år 2008 hade *D. nodosus* diagnostiserats i ett hundratal svenska besättningar. Både virulenta och benigna stammar har identifierats. Hösten 2009 genomförs en prevalensstudie för att undersöka hur vanlig smittan är bland svenska lamm. Svenska Fårhälsovården har upplevt viss behandlingssvikt i besättningar där djuren gått ute länge på hösten eller där djuren haft en rastfälla där de gått hela vintern. Dessutom har man funnit *D. nodosus* även hos får utan kliniska symtom. Fårhälsovården uttryckte därför önskemål om en studie som skulle visa hur länge *D. nodosus* kan överleva i miljön (König, U. Pers. medd. nov 2009). Det finns, så vitt författaren känner till, inga överlevnadsstudier gjorda på *D. nodosus* i Sverige eller i nordiskt klimat, så kunskapen om hur bakterien/ smittan beter sig under dessa förhållanden (temperatur, jordmån, pH) är begränsad. De överlevnadsstudier som gjorts på bakterien internationellt verkar ha begränsats till *in vivo*- försök.

SYFTE

Att i laboratoriemiljö undersöka hur länge *D. nodosus* kan överleva i jord.

LITTERATURÖVERSIKT

Historia

En sammanfattning av fotrötans historia skrevs av Beveridge (1941). Fotröta var en väl etablerad sjukdom i England under 1700-talet, och under 1800-talet rapporterades om utbrott i Europa, USA och Australien. Redan 1810 insåg man att det rörde sig om en smittsam sjukdom, även om inte alla var övertygade. Vissa trodde nämligen långt in på 1900-talet att fotröta orsakades av frodiga, våta betesmarker. Man rekommenderade isolering av sjuka djur, att inte köpa in djur med fotröta och bortverkning av allt underminerat horn. Senare rekommenderades även fotbad i olika sorters lösningar (Beveridge 1941). Förutom den radikala verkningen, som det idag råder delade meningar om, har behandlingsrekommendationerna inte förändrats mycket de senaste århundradena.

Beveridge upptäckte 1938 att fotröta orsakades av en bakterie som han kallade *Organism K* (Beveridge 1938a). Tidigare hade man ansett att *Fusiformis necrophorus* orsakade sjukdomen. I detta försök mikroskopierade och odlade Beveridge olika bakterier från fotrötelesioner för att därefter infektera mottagliga får och kom på så sätt fram till att denna lilla bakterie med de rundade ändarna orsakade sjukdomen, framförallt i närvaro av en spiroket. Beveridge gav senare bakterien namnet *Fusiformis nodosus* (Beveridge 1941), som därefter ändrades först till *Bacteroides nodosus* (Mraz et al. 1963) och sedan till *Dichelobacter nodosus* (Dewhirst et al. 1990).

Patogenes och klinisk bild

Den allmänt accepterade patogenesen för fotröta är följande. När klövspaltens hud blir skadad eller är fuktig under lång tid kan den invaderas av jord- och träck-bakterien *Fusobacterium necrophorum*. Ensam kan denna bakterie ge inflammation av klövspalten, så kallad interdigital dermatit. *Fusobacterium necrophorum* producerar även toxiner som ger nekros av yttre hudlager och möjliggör för andra bakterier, inklusive *D. nodosus*, att etablera sig. *Dichelobacter nodosus* har affinitet för epidermal matrix och bakteriens proteaser bryter ner

denna vävnad och banar vidare väg för andra bakterier, till exempel *F. necrophorum*. De båda bakterierna fungerar alltså synergistiskt (Egerton et al. 1969, Roberts and Egerton 1969). Även *Arcanobacterium pyogenes* verkar spela en roll eftersom den stimulerar tillväxten av *F. necrophorum* (Quinn et al. 2002). Antagligen är patogenesen bakom sjukdomen komplex. Det kan till exempel också vara så att *F. necrophorum* är en opportunist i fotröteskadad vävnad (Bennet et al. 2009a). Andra bakterier kan också ses i fotröteslesionerna, bland andra spiroketer av släktet *Treponema* (Collighan et al. 2000). Beveridge ansåg redan 1941 närvaro av en spiroket som han kallade *Spirochaeta penortha* krävdes för att *D. nodosus* skulle orsaka fotröta (Beveridge 1941). *Dichelobacter nodosus* har även identifierats på synbart friska klövar hos får (Depiazzi et al 1998, Moore et al. 2005a).

Symtom på fotröta är hälta av varierande grad, ibland så kraftig att fåren står på framknäna och betar. Fåren kan också ligga mer än vanligt vilket leder till minskat födointag (Beveridge 1941, Egerton 2007), vilket i sin tur kan leda till minskad mjölkproduktion och sämre lammtillväxt.

Förändringar ses först i klövspalten, i början ses en lätt inflammation med rodnad som i praktiken inte går att skilja från vissa andra klövsjukdomar, till exempel interdigital dermatit. Detta utvecklas till ett tillstånd med illaluktande grått sekret i klövspalten som är typiskt för sjukdomen. Om fotrötan förvärras ses därefter en hornseparation som startar vid hälen (fig 1). Först angrips sul- och sedan vägghorn, hornet skiljs från underliggande vävnad och samma grå sekret som i klövspalten kan ses under det lösa hornet. En eller flera klövar kan vara drabbade. Inkubationstiden är normalt 10-14 dagar. Många får tillfrisknar så småningom även utan behandling men sjukdomen är plågsam och risk för kronisk infektion föreligger (Winter 2004). Hos kroniska smittbärare kan bakterien kapslas in i klövarna. Dessa djur visar inte själva symtom men kan identifieras genom att de oftast har deformerade klövar (Radostits et al. 2007, Winter 2004).

Bland annat i Australien används ett graderingssystem för fotröta. Från lindrig inflammation av klövspalten vid grad 1 till kraftig inflammation av hela sulan med underminering av allt horn inklusive klövkapselns hårda horn vid grad 5. Förenklat kan sägas att kliniska förändringar av grad 1-2 klassas som benign fotröta och grad 3-5 som virulent (Stewart and Claxton 1993).



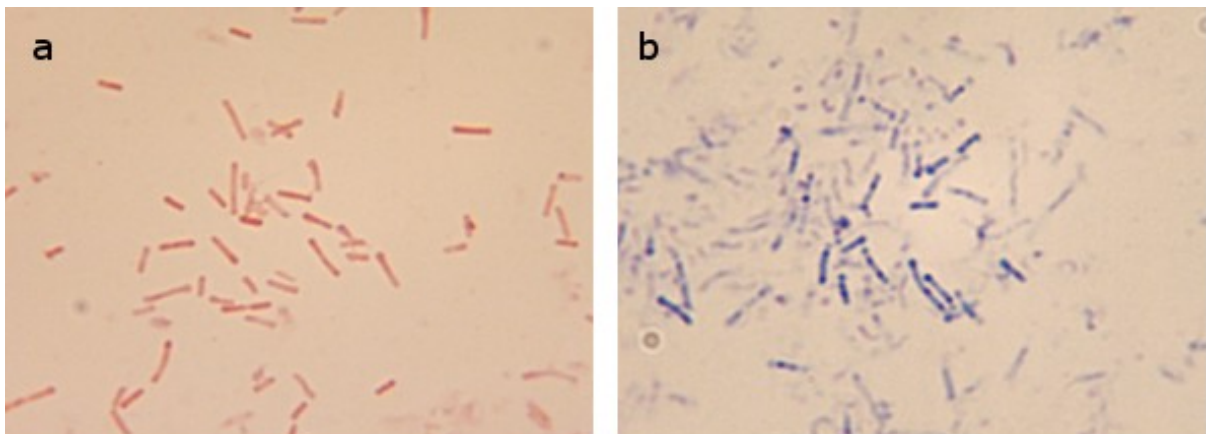
Figur 1: Delar av sulan saknas; fotröta grad 3. Foto: Ulrika König

Miljöfaktorer, det vill säga klimat och närmiljö, påverkar kraftigt sjukdomens uttryck. Det krävs en medeltemperatur över 10 °C samt fuktig miljö för att smitta ska spridas (Depiazzi et al. 1998, Graham and Egerton 1968). I Sverige sker utbrotten främst under betesperioden och då särskilt vid varm och regnig väderlek (SvDHSV 2009a).

Differentialdiagnoser kan förutom interdigital dermatit vara så kallad CODD (contagious ovine digital dermatitis), men även vitalinjen-lesioner, klövbölder, granulom och fång ger hälsa som huvudsakligt symptom. Vid CODD, som troligen orsakas av spiroketer av släktet *Treponema*, börjar lesionerna vid kronranden istället för i klövspalten (Winter 2004).

Dichelobacter nodosus

Dichelobacter nodosus är en obligat anaerob bakterie. Den är en Gramnegativ, rörlig stav (3-6 x 1,0- 1,7 µm) med rundade ändar, som framförallt kan ses om den är odlad på agar (Skerman 1989) (Figur 2a och 2b). Den växer långsamt, 3-7 dagar, med små (0,5-3,0 mm) gråvita kolonier. Tre huvudtyper av kolonier finns beskrivna: stammar med B-type ("Beaded") kolonier är de mest patogena, M-type ("Mucoid") är mindre patogena och C-type ("Circular") är ickepatogena och ses efter upprepade passager i media (Quinn et al. 1994).



Figur 2a och 2b: *Dichelobacter nodosus*: ^{a)} Gramfärgning respektive ^{b)} färgning med metylenblått. Notera särskilt de mörka granula som ses framförallt vid polerna vid MB-färgning. Foto: Karolina Enlund

Dichelobacter nodosus odlas på speciell agar eftersom fotrötelesionerna oftast är kraftigt kontaminerade med andra bakterier. Bakterierna växer gärna i fåror i agarn, varför det kan vara lämpligt att göra rispor i agarplattorna (Båverud et al. 2005). Hovagar, eugonagar eller TAS (Trypticase Arginin Serin med 5 % agar) kan användas och de odlas i 37 °C anaerobt, optimalt pH är 6,8 - 7,8. Misstänkta kolonier renodlas därefter på till exempel FAA (Fastidious Anaerobe Agar). Bakterierna odlas vanligen 4-5 dagar, därefter är de viabla i 2-3 veckor om anaerobklockorna ställs mörkt i rumstemperatur och inte öppnas. Odling av rena isolat kan också ske i buljong (eugon- eller TAS-) där växt ses efter 24-48 timmar om man använder en färsk kultur från agar för inokulering (inte äldre än 3 dagar). Även om ingen tillväxt sker i aerob miljö kan utväxta kulturer på platta lämnas på laboratoriebanken cirka 12 timmar utan att skadas nämnvärt. Tillväxt sker inte under 20 °C och bakterierna avdödas vid 50 °C under 5 minuter (Skerman 1989).

Dichelobacter nodosus kan delas in i 10 serogrupper (A-I, M) (Wani and Samantha 2005). Det kan finnas många stammar inom samma serogrupp. Olika stammar har olika virulens; vanligtvis talas det om benigna och virulenta men ibland nämns även intermediära stammar (Stewart et al. 1986, Stewart and Claxton 1993). Samma djur kan ha flera olika stammar, med olika virulens. I Sverige har Fårhälsövården funnit benigna stammar i besättningar där fåren haft kliniskt virulent fotröta och man har därför valt att behandla alla smittade besättningar på samma sätt (SvDHV 2009b). Att samma stammar kan ge olika symptom i olika miljöer visade även Depiazzi et al. 1998.

Virulensen är relaterad till *fimA*-genen som ger fimbrier av typ IV, som i sin tur är associerade till bakteriens rörlighet, så kallad twitching motility. Förekomst av typ IV-fimbrierna har även associerats till förmåga att producera proteaser samt till celladhesion (Kennan et al. 2001). Bakteriestammar som producerar värmestabila proteaser ger virulent fotröta, stammar som producerar värmelabila proteaser ger benign fotröta (Depiazzi et al. 1991). Han et al. visade 2008 att twitching motility är nödvändig för virulensen hos *D. nodosus*. Trots produktion av proteaser och möjlighet till celladhesion gav muterade varianter av *D. nodosus*, utan twitching motility, inte fotröta.

Dichelobacter nodosus har även identifierats hos andra klövdjur än får, bland annat hos nötkreatur med klövspaltdermatit (Plym Forshell och Andersson 1981) och hos getter med fotröta (Bennet 2009b). Stammar som isoleras från get kan orsaka antingen benign eller virulent fotröta medan de som hittas hos nöt alltid ger benign fotröta hos får (Egerton 2007).

Överlevnad i miljön

Det finns olika uppgifter om *D. nodosus* överlevnad i miljön. Många författare hänvisar tillbaka till samma forskare, Beveridge, som gjorde flera kliniska försök på 1930-talet. Det anges uppgifter om bakteriens överlevnad i flera artiklar och böcker utan att författarna själva har gjort studier eller lämnar tydliga referenser. Någon nyare forskning gällande bakteriens överlevnad har inte stått att finna trots eftersökningar. Nedan följer en kort sammanställning av olika överlevnadstider som nämns i litteraturen.

I en sammanfattning av Beveridge 1941 anges att det första försöket för att ta reda på *D. nodosus* överlevnadstid i miljön gjordes 1892 av Brown och att denne då kom fram till att smittan fanns kvar minst två dagar i en lerig hage. I samma text finns angivet att Marsh och Tunnicliff 1934 fann att smittan kunde finnas kvar i en "attenuerad form" i 9 månader i ett träsk. Samme författare nämner även att Gregory 1939 genomförde ett försök där får blev smittade i en lerig hage kontaminerad med fotröta som stått tom 5 dagar men inte när hagen stått tom 7 dagar (Beveridge 1941). Beveridge visade själv 1938, efter omfattande kliniska försök, att i fotröteskadad vävnad som avlägsnades, hölls fuktig eller fick lufttorka, överlevde bakterien 24 timmar men inte 4-8 dagar. Om vävnaden blandades med lera klarade bakterien sig vanligen 3 dagar, sällan 1 vecka och aldrig 3 veckor. I fårträsk var överlevnadstiden 1 vecka i ett av två test, men inte 2 veckor. *Dichelobacter nodosus* visade sig däremot kunna överleva minst 3½ år i klövar på kroniskt infekterade djur (Beveridge 1938b). Beveridge drog senare slutsatsen, efter egna och andras försök, att *D. nodosus* överlevde maximalt 2 veckor i miljön, men att redan efter en vecka var bakterien oförmögen att framkalla sjukdom under naturliga förhållanden (Beveridge 1941).

Ett nyare försök har gjorts som visade att fotröta kan spridas indirekt under naturliga förhållanden. Får med fotröta vistades en kortare tid i en fälla, därefter stod fällan tom en

timme innan friska får placerades där. Dessa får smittades, det vill säga bakterien överlevde i miljön under naturliga förhållanden åtminstone en timme (Whittington 1995).

Tabell 1: Rapporterad överlevnad av *Dichelobacter nodosus* i miljön.

Källa	Maximal överlevnadstid i miljön för <i>D. nodosus</i>
Skerman (1989)	Antagligen inte längre än 3-4 dagar.
Stewart and Claxton (1993)	Maximalt 7-14 dagar (i jord, i gödsel eller på bete).
Quinn et al. (2002)	4 dagar (i lera).
Egerton (2007)	Maximalt en vecka.
Radostits (2007)	Några få dagar, som längst 2 veckor.

Diagnos

Diagnostisering sker med hjälp av odling, immunoassays eller PCR. Odling är svårt och tar minst 2-3 veckor, dessutom kan virulensen vara svårbedömd. Immunoassays bör kunna identifiera flera serogrupper för att vara en bra hjälp vid diagnostisering, men inte heller dessa kan ge någon bedömning av virulensen. PCR är däremot ett effektivt verktyg för att diagnostisera fotröta och med specifika primers kan den även användas för virulensstestning (Liu and Yong 1997).

För virulensbestämning har diverse metoder använts: monoklonal antikroppsbasead ELISA, elastastest, test för förekomst av proteaser, zymogram-elektrofores, gelatintest och dot-blot hybridisering med gen-baserade prober (Liu and Yong 1997).

Behandling och kontroll

Behandling

Behandlingen av fotröta består av upprepade fotbad av samtliga djur i zinksulfatlösning, därefter släpps djuren på ströbädd eller bete där inga klövbärande djur vistas de senaste fjorton dagarna. Vid virulent fotröta allmänbehandlas djuren även med antibiotika i samband med första fotbadet. Djur med deformerade klövar, det vill säga misstänkta kroniker, sorteras bort och hålls isolerade fram till slakt (Winter 2004, SvDHSV 2009b).

Kontroll versus elimination

Olika länder har valt olika strategier för att hantera fotröta. I Australien som är en av världens mest betydande fårproducenter har man i New South Wales framgångsrikt valt att försöka utrota enbart virulent fotröta medan man accepterar att benign fotröta förekommer (DPI 2009). I Storbritannien där det finns fotröta i minst 90 % av besättningarna (Moore et al. 2005b) är eventuell bekämpning upp till den enskilde fårägaren, och i de flesta fall är där

kontroll snarare än elimination av smittan ett realistiskt alternativ (Defra 2010). Sverige har som tidigare nämnts valt att bekämpa all fotröta hos får.

Vaccinering

Vaccin finns men vaccinsvaret är serogrupspecifikt. Vaccin kan ibland vara ett bra hjälpmedel för att kontrollera fotröta, påskynda tillfrisknande samt minska risken för spridning i flocken under kritiska perioder. Multivalenta vaccin ger endast en kortvarig immunitet, cirka 12 veckor. Vaccin baserade på bara ett fåtal stammar är mer effektiva (Egerton 2007).

Genetisk resistens

Fem fårraser ingick i en studie där man undersökte deras känslighet för att drabbas av fotröta under naturliga respektive experimentella förhållanden. Under naturliga förhållanden visade det sig att Merino-får var mer känsliga och i högre grad utvecklade virulent fotröta än de tre brittiska raserna i studien. Däremot var det inga skillnader mellan raser under de svårare förhållandena i små paddockar (Emery et al. 1984).

Detektion av *D. nodosus* i jord

PCR (polymerase chain reaction) är en biokemisk metod för att identifiera även små mängder DNA i olika sorters prover. Specifika primers tillsätts som binder till det DNA-segment som ska amplifieras och med hjälp av enzymet DNA-polymeras amplifieras därefter segmentet genom upphettning och nedkylning upprepade gånger. Realtids-PCR innebär att man använder sig av fluorescerande prober, graden av fluorescens mäts vilket även ger en kvantifiering av DNA. Eftersom DNA-segmentet amplifieras exponentiellt kommer fluorescensen öka mycket kraftigt någon gång under reaktionen och tidpunkten när detta inträffar (CT-värdet) står i relation till mängden DNA som fanns i provet från början (Willey et al. 2009).

Det finns kommersiellt framtagna DNA-extraktionskit speciellt för jordprover. Dessa är till för att avlägsna enzymatiska inhibitorer som finns i jord och som samextraheras med DNA i jorden. Ett sådant kit är "SoilmasterTM DNA extraction kit" som användes i detta försök.

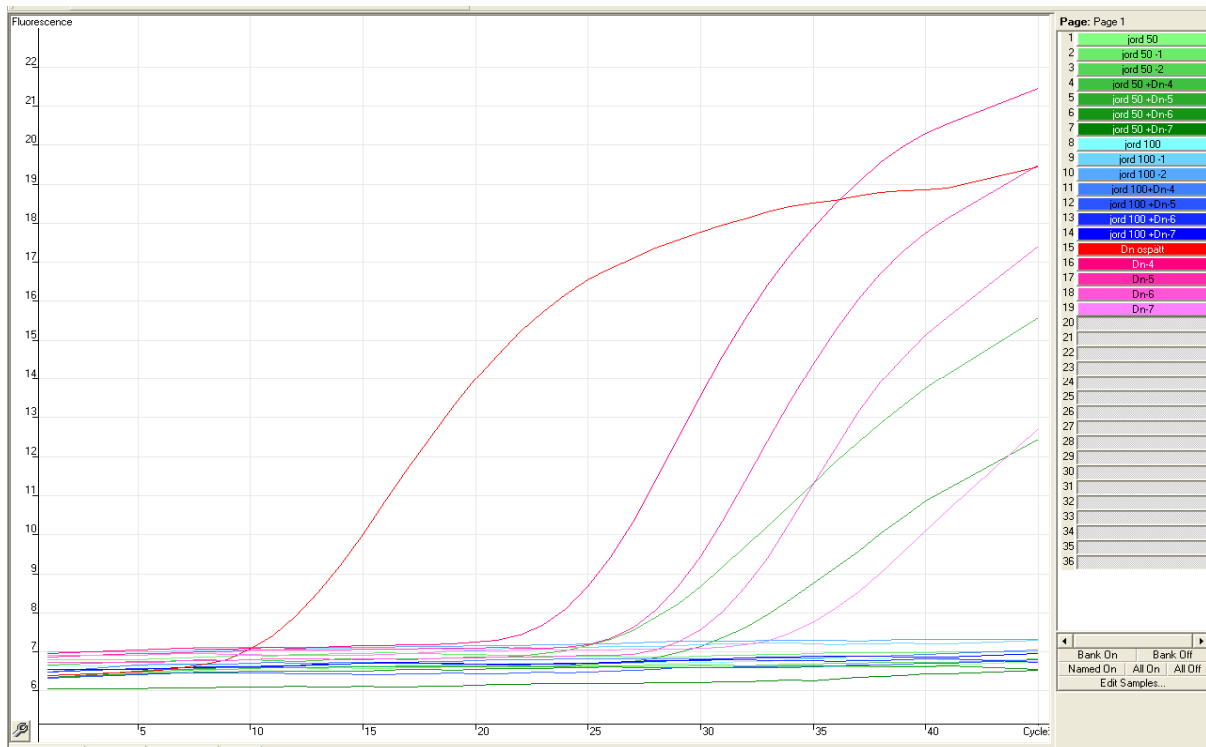
EMA (etidium monoazid bromid)-behandling är en metod för att kunna skilja på levande och döda celler i PCR-analysen. Pisz använde 2007 EMA på prover av bland annat jord som hade spikats med *Escherichia coli*. EMA visade sig där fungera effektivt i jord. EMA fungerar genom att interkalera med DNA från ickeviabla celler och förhindrar på så sätt amplifiering i PCR. EMA kan inte gå in i celler med intakt membran och alltså fäster det endast till fritt DNA eller DNA i celler med trasiga membran. Vid belysning med högintensitetsljus blir bundet EMA kovalent bundet och fritt EMA inaktiveras. Genom att analysera två prover med PCR, ett med och ett utan EMA-behandling, kan man alltså skilja på mängden viabla och ickeviabla organismer. Observera att lera är en stark katjonbytare som kan interferera med mängden EMA, som själv är en katjon, som finns tillgängligt (Pisz et al. 2007).

Odling på hovagar utfördes i detta försök parallellt med EMA-behandlingen eftersom EMA-metoden var ny för oss. Även odlingen gjordes för att bestämma om bakterierna som detekterats i jordproverna levde. Istället för renodling av misstänkta *D. nodosus*-kolonier användes realtids-PCR för att detektera *D. nodosus* från primärodlingen på hovagar.

MATERIAL OCH METODER

Typstammen för *D. nodosus* (CCUG 27824^T) odlades på FAA-plattor och uppförökades i buljong (SVA, Uppsala). Direktmikroskopering av buljongen gjordes för att bekräfta renkultur. Bakteriekoncentrationen i buljongen kontrollerades genom att DNA-koncentrationen bestämdes spektrofotometriskt. Två representativa prover innehöll 13,5 respektive 20,0 nanogram DNA per mikroliter odlingsmedium.

Lerjord insamlades från en oanvänd åker utanför Uppsala och ”SoilmasterTM DNA extraction kit” användes för att isolera DNA från 50 respektive 100 mg jord. Därefter analyserades proverna med realtids-PCR. Dels undersöktes att jordprovet inte innehöll *D. nodosus*, dels bestämdes huruvida PCR-inhibitorer samextraherats med DNA och därför fanns närvarande och kunde störa analyserna. Till det isolerade jord-DNA:t tillsattes kända halter av *D. nodosus*-DNA, i spädningar -4 till -7. Jord utan tillsats av *D. nodosus* användes som kontroll. Detta gjordes för att avgöra vilken provmängd respektive bakteriemängd som skulle användas senare i försöket. Då det visade sig att DNA extraherat från 100 mg prov inhiberade PCR-reaktionen, valdes 50 mg som lämplig jordprovsmängd (Fig. 3).



Figur 3: PCR-resultat. Bestämning av jordmängd respektive bakterie-DNA mängd. Röd kurva visar positiv kontroll, outspätt DNA från *D. nodosus*. Rosa kurvor representerar *D. nodosus* i sjunkande koncentration efter spädning. Gröna kurvor motsvarar 50 mg jord med *D. nodosus* i spädning 1:10 000 respektive 1:100 000.

Jorden analyserades avseende förekomst av *F. necrophorum* med hjälp av realtids-PCR enligt Jensen et al (2007).

Dag noll i försöket iordningställdes jordprover i 32 x 2 glasrör med plastkork enligt följande: 3 g jord blandades med 500 µl superQ-vatten samt 500 µl buljong med *D. nodosus* i renkultur. Rören som användes rymde 3,7 ml och lerblandningen fyllde cirka 4 cm av röret. Buljongen som användes kom från 2 rör med vardera 9 ml som odlats i 3 dagar samt 2 rör med vardera 9 ml som odlats i 4 dagar, buljongen blandades (= 36 ml i ett rör) innan fördelningen i smårören. Två rör iordninggjordes med enbart 500 µl bakterier i buljong, varav ett EMA-behandlades.

EMA-behandling utfördes enligt Pisz et al 2007: 2,6 µl EMA (5 mg/ml) tillsattes i röret som vortexades snabbt, inkuberades i 10 minuter i rumstemperatur på skak 300 rpm och därefter belystes med en 500 W- lampa på 20 cm avstånd i 60 sekunder.

Hälften av rören (32 stycken) ställdes sedan i ett skåp i rumstemperatur och andra hälften ställdes i kylskåp med temperatur 8–12 °C.

Triplikat-prov togs ut ur respektive provrörsgrupp (rumstemperatur respektive kylskåp) dag 1, 2, 3 och 4. Duplikat-prov togs ut dag 7, 10 och 14. Leran mättes upp i 1,5 ml plaströr (0,06–0,15 g i varje rör), två prover från varje rör varav ett EMA-behandlades enligt ovan. Innan EMA-behandlingen tillsattes 100 µl superQ-vatten i alla prover, proverna vortexades kort, därefter avlägsnades 100 µl av lervattnet. Hovagarplattor (SVA, Uppsala) ströks samma dagar (samt även dag 0), en platta delades i tre delar vid triplikat, två vid duplikat, och prov från rumstemperaturrören respektive kylrören ströks på varsin platta. Plattorna rispades i rutmönster med en trästicka och inkuberades anaerobt i 37 °C. De använda rören kasserades efter att proven tagits ut.

Alla lerproverna behandlades med ”Soilmaster™ DNA extraction kit” och det färdiga extraherade DNAt förvarades fryst tills PCR-analys utfördes. Instruktionerna för kitet följdes och på punkt tre valde vi alternativet att skaka rören istället för att vortexa dem, på punkt tio valdes den större mängden supernatant (150 µl).

Prover togs även från hovagarplattorna. Dag 4 togs prov från plattor från dag 0, 1 och 2. Dag 10 togs prover från dag 3, 4 och 7. Dag 21 togs prover från dag 7, 10 och 14. En 10-µl ögla med kolonimaterial från en platta blandades i 300 µl superQ-vatten i 1,5 ml skruvlocksror. Proverna vortexades snabbt och inkuberades i 96 °C i 15 minuter, därefter sattes de omedelbart på is i 10 minuter. Rören centrifugerades vid 13 000 g i 5 minuter och supernatanten frystes i väntan på PCR-analys.

Hovagarplattorna avlästes även manuellt dag 4 och 21, då koloniutseende bedömdes samt direktmikroskopering utfördes.

Realtids-PCR med 7500 Fast Real-Time PCR System från Applied Biosystems användes för påvisande av *D. nodosus* i de förberedda proverna. Mastermix inklusive primers och prober (opublicerade) och PCR-program enligt SVAs rutinmetod. Negativ samt positiv kontroll användes, den positiva kontrollen bestod av en tidigare förberedd DNA-extraktion av typstammen och den negativa av mastermix utan tillsatt DNA.

Spädningar 1:10 med superQ-vatten gjordes på samtliga prover och dessa analyserades också med Realtids-PCR.

RESULTAT

Resultaten i denna studie visar att *D. nodosus* kan överleva åtminstone 14 dagar i jordprover i aerob miljö.

Alla prover som togs ut från jordproverna var positiva på realtids-PCR (tabell 1). Detta gällde oavsett om jordproverna förvarats i rumstemperatur eller i kyl, om de behandlats med EMA eller inte, och om det extraherade DNAt analyserades ospätt eller spätt 1:10. Vi såg inte heller någon kvantitativ skillnad (i CT-värde) mellan dessa prover. Under de första fyra dagarna var även alla prover från odlingarna positiva vid realtids-PCRanalys. Dag 7 var ett av åtta prover positivt (ospätt prov), dag 10 två av fyra (ospädda prov) och dag 14 ett av fyra (spätt prov) (tabell 2).

Tabell 2: PCR resultat. Antal positiva prover (samtliga prover).

Dag	Jordprov		Odling	
	Rumstemperatur	8-12 grader	Rumstemperatur (poolade)	8-12 grader (poolade)
1	6 (6)	6 (6)	2 (2)	2 (2)
2	6 (6)	6 (6)	2 (2)	2 (2)
3	6 (6)	6 (6)	2 (2)	2 (2)
4	6 (6)	6 (6)	2 (2)	2 (2)
7	4 (4)	4 (4)	0 (4)	1 ^a (4)
10	4 (4)	4 (4)	1 ^a (2)	1 ^a (2)
14	4 (4)	4 (4)	0 (2)	1 ^b (2)

^a Utan spädning

^b Spädning 1:10

Hovagarplattorna inspekterades dag 4 (plattor strukna dag 0, 1 och 2) och 21 (plattor strukna dag 7, 10 och 14). Vid första avläsningen bedömdes det växa riklig blandflora på alla plattor, men vid mikroskopering av misstänkta *D. nodosus*-kolonier sågs dock enbart *D. nodosus* dag 0 och 1 medan ingen tydlig växt av *D. nodosus* kunde ses dag 2. Detta kan antas ha berott på den korta inkubationstiden. Vid avläsning av FAA-plattan från dag 0 sågs vad som bedömdes som riklig blandflora och vid mikroskopering sågs blandflora med *D. nodosus*. Vid den andra avläsningen, observera att de inspekterade plattorna då var 7-14 dagar gamla, bedömdes det växa riklig blandflora på plattorna med utstryk från rören som förvarats i rumstemperatur medan utstryken från de rör som förvarats i kylskåp visade sparsam blandflora. Inga misstänkta *D. nodosus*-kolonier kunde ses. Vid mikroskopering av plattor från dag 7, 10 och 14 som kom från rumstemperatur-rören bedömdes samtliga preparat som *D. nodosus* i blandflora, huvudsakligen bestående av andra stavar av olika storlek.

Realtids-PCRanalysen av jorden avseende förekomst av *Fusobacterium necrophorum* gav negativt resultat.

DISKUSSION

I litteraturen anges *D. nodosus* överleva i miljön maximalt 14 dagar. Detta försök har visat att bakterien kan överleva längre i jord än man tidigare trott, åtminstone 14 dagar som var så långt vår försöksperiod sträckte sig. Inga liknande försök med *D. nodosus* kunde hittas beskrivna i litteraturen och därför krävdes även metodutveckling inför upplägget av försöket.

Att det har gjorts så få försök att studera överlevnad hos *D. nodosus* beror troligen på att bakterien är svår att odla, och därför ville vi försöka med detektion med hjälp av PCR istället. Vi kunde i försöket inte se någon minskning av bakterie-DNA i jordproverna och det kan bero på att vi inte fullt ut lyckats med EMA-behandlingarna. Odlingsresultaten tyder däremot på att antalet viabla bakterier ändå har minskat under försökets gång.

Uppförelningen av *D. nodosus* i buljong

Dichelobacter nodosus är svagväxande, svårödlade bakterier som kräver näringsrika medier för att trivas vilket gör att det kan vara svårt att odla dem i renkultur i buljong.

Uppförelningen av *D. nodosus* i buljong krävde flera försök innan den lyckades. Första omgången kontaminerades kulturerna med blandflora, nästa omgång visade ingen växt alls, tredje omgången kontaminerades även den, denna gång med vad som såg ut att vara kocker. På fjärde försöket lyckades vi odla *D. nodosus* i renkultur i buljong. Anledningen till att det inte växte i en av omgångarna kan ha varit att bakterierna som användes för inokulering var för gamla, bakterierna bör tas från agarplattor som inte växt mer än 3 dagar. I så fall ses växt efter 24-48 timmar i buljongen (Skerman 1989). I samma text anges optimal växt, när flytande medium används för inokulering av nytt medium, till upp till 72 timmar (beroende på stam). Vi använde dock fast medium för att inokulera flytande, men valde ändå att ta fasta på denna tidsangivelse och använde buljong som växt 3-4 dagar när vi förberedde våra jordprover.

Koncentrationen av DNA i buljongen mättes på två andra provrör än de som sedan användes i försöket vilket innebär att mängden bakterier som faktiskt tillsattes är ungefärlig. Vi vet inte vilken bakteriekoncentration som kan förekomma i miljön naturligt i en fotröte-smittad besättning, inte heller finns uppgifter om infektionsdos. Antagligen avgörs denna av ett antal övriga faktorer såsom klimat, närmiljö, individens motståndskraft, ålder och hälsoläge samt närvaron av andra bakterier.

Eftersom bakterierna uppförelades i buljong som sedan tillsattes jorden är förhållandena i försöket inte lika naturliga som om man till exempel hade tillsatt bakterier direkt från fotrötelesioner till jorden. Buljongen är visserligen näringsrik men tillsattes i liten mängd och bakterierna hade dessutom redan växt 3-4 dygn och förbrukat näring när buljongen tillsattes jorden. Det är därför inte troligt att detta har haft någon större betydelse för utgången av försöket.

Preparation av spikade jordprover

Jordprover blandades till lämplig konsistens. En kladdig lera erhöles när vi blandade 3 g jord med 1 g vätska, det gav ungefär den konsistens som kan ses runt utfodringsplatser och vattenkar i en fårhage. Leran innehöll dock en hel del smågrus vilket gjorde uppvägningen till DNA-prepareringen svår och inexakt, därav det stora spannet på 0,06-0,15 g/ prov.

Vid prepareringen av jordproverna dag noll stod buljongen med bakterierna framme i aerob miljö under flera timmar innan jorden blandades med bakterierna i provrör. Detta kan ha påverkat bakterierna negativt.

För DNA-extrahering i jordproverna användes ”SoilmasterTM DNA extraction kit”. Detta ska avlägsna enzymatiska inhibitorer som finns i jord och som samextraheras med DNA i jorden. Provmängden bestämdes som tidigare beskrivits till 50 mg jord. Vanligtvis är 100 mg lagom men 50 mg kan vara lämpligt om jorden innehåller mycket inhibitorer enligt tillverkaren av extraktionskitet. Efter spädningen 1:4 innebar det 67 mg prov som skulle tas ut ur varje rör. Att vi tog ut upp till 150 mg är en viktig felkälla som kan innebära att vissa prover innehållit för mycket inhibitorer för att kunna ge ett positivt utslag trots förekomst av *D. nodosus*. Det var uppenbarligen inte ett problem i det här försöket då alla jordprover blev positiva. Det kan bero på att förekomsten av gruskorn i vissa jordprov gjorde att vikten ökade markant och i dessa fall bör inte mängden inhibitorer ha ökat i samma utsträckning.

När proverna skulle tas ut den första dagen i försöket visade det sig att flera av provrören spruckit. Det kan ha berott på att jordbakterier i proverna bildat gas i den gynnsamma miljön när buljong och vatten tillsattes jorden. De spruckna rören kasserades. Även följande dag fick spruckna rör kasseras, dag 3 plastades återstående rör som inte spruckit med Parafilm ”M” för att inte vätska skulle dunsta och proverna skulle torka ut. Därefter användes rör för uttagning av prover trots att vissa av dem spruckit innanför plasten.

Tiden för nedbrytning av celler i en viss miljö, det vill säga hur länge det är möjligt att detektera DNA från döda bakterier i ett prov varierar. Den beror på ett antal omständigheter såsom till exempel pH, temperatur och vilka enzymer och andra bakterier som är närvarande.

EMA

EMA-behandlingen är en metod för att kunna skilja på levande och döda celler i PCR-analysen. Om bakterierna lever eller inte är ju av avgörande betydelse i detta försök och anledningen till att också odling utfördes. Vi såg ingen skillnad i försöket på de prover som var EMA-behandlade och de som inte var det. Det kan finnas flera orsaker till att EMA-behandlade prover inte avvek från de icke-EMA-behandlade i analyserna. En kan vara att i stort sett alla bakterier faktiskt levde, i så fall fanns ju inte så mycket fritt bakterie-DNA att binda till. Odlingresultaten tyder dock på att antalet viabla bakterier har minskat under försökets gång. En annan möjlig, och kanske troligare, anledning är att lerjorden som användes i försöket störde resultatet eftersom lera kan interferera med mängden EMA som finns tillgängligt (Pisz et al 2007).

För att kunna blanda EMA i proverna var konsistensen tvungen att vara lösare, det var orsaken till att vatten tillsattes för att sedan avlägsnas igen. Vid första behandlingen vortexades inte proverna efter att EMA tillsatts och EMA-droppen lade sig då ovanpå några av proverna och kan inte antas ha haft effekt på dessa.

Odling av *D. nodosus* från jordproverna

Odling på hovagar genomfördes för att kontrollera att bakterierna som detekterades i jordproverna med hjälp av realtids-PCR faktiskt levde.

Vid avläsningen av hovagarplattorna visade det sig svårt att avgöra vilka kolonier som var mest misstänkta så direktmikroskopering och DNA-preparering gjordes på godtyckligt utvalt kolonimaterial. Detta är en möjlig felkälla då vi kan ha missat kolonier av *D. nodosus*, särskilt

om det bara var få levande bakterier kvar vid strykningen. Vi kan också ha missat att få med bakterier från jordprovet vid strykningen. Det kan självklart också ha varit så att bakterierna faktiskt hade dött i rören vid tiden för strykningen. Vid mikroskopering av material från hovagarplattorna som strukits dag 7, 10 och 14 från rör som förvarats i rumstemperatur sågs stavar liknande *D. nodosus* i blandflora. De flesta av dessa prover var dock negativa på PCR.

I litteraturen finns beskrivet att *D. nodosus*-kolonier kan se väldigt olika ut beroende på till exempel vilket medium som används, agarkoncentration, och till och med agardjup, även olika agar-batcher och olika anaeroba klockor kan spela in (Skerman 1989). Enligt samma källa är så kallat "ground glass"-utseende perifert med fimbrierad kant typiskt (på 5 % agar) och kolonier som passar in på denna beskrivning sågs längs risporna i hovagarn. Bakteriens utseende i renkultur på FAA-plattor ser mycket annorlunda ut med små gråvita välavgränsade kolonier.

Vid avläsningen dag 10 var en av anaerobklockorna aerob, det var osäkert om den varit det ända sedan dag 7 eller kortare tid, denna innehöll hovagarplattor strukna dag 7. Koklysat från dessa plattor gjordes därför dels dag 10 och sedan även dag 14 efter fyra dagars säker anaerob inkubering. Av dessa sammanlagt 4 uttagna prov dag 7 (samt spädningar av dessa prov) var endast en positiv (ett ospätt prov). Att de andra tre från dag 7 var negativa kan ha berott på den aeroba miljön bakterierna utsattes för.

Spädda prov, 1:10, analyserades jämte de ospädda proverna för att fånga upp de prover som eventuellt innehöll för mycket inhibitorer i ospätt tillstånd. Detta ledde till att vi kunde identifiera *D. nodosus* även i odling från dag 14.

Förvaring vid olika temperaturer

Proverna förvarades vid två temperaturer, rumstemperatur (ca 20 °C) respektive kylskåps-temperatur (8-12 °C). I litteraturen anges att *D. nodosus* kräver över 10 °C för att orsaka infektion (Depiazzi et al. 1998), däremot nämns inte temperaturens inverkan på bakteriens överlevnad. Om det skulle vara så att bakterien kan gå in i ett sorts vilande stadium och på så sätt öka sin överlevnad (Beveridge 1941) kan man tänka sig att kylskåpsstemperaturen skulle gynna detta. Man kan också tänka sig att kylskåpsstemperaturen är en mer ogynnsam miljö för befintliga jordbakterier vilket då skulle "ge plats" åt *D. nodosus*, medan rumstemperaturen skulle få jordbakterierna att växa till och trycka ned *D. nodosus*. Å andra sidan kanske rumstemperaturen då även är mer gynnsam för *D. nodosus*. I försöket blev endast ett fåtal prover negativa, dessa var alla från odling på hovagar som strukits dag 7, 10 och 14. Där blev tre prover positiva i kylskåpsgruppen och en i rumstemperaturgruppen men det är för få prover för att kunna dra några slutsatser om temperaturens betydelse för *D. nodosus* överlevnad.

Övrigt

Kontamination vid beredningen och hanteringen av DNA- proverna kan ge falska positiva svar, det är mindre sannolikt i detta fall då stor noggrannhet iaktogs vid hanteringen av provmaterialet.

Dichelobacter nodosus är en svåroddlad bakterie, som har sin affinitet till klövmatrix. I litteraturen har jag inte kunnat finna något som tyder på att bakterien skulle kunna föröka sig utanför klövar på smittade djur. Den går dock bevisligen att odla på medium som inte innehåller klövar så det kanske inte är helt otänkbart att den kan föröka sig under andra betingelser också?

Framtida forskning

Det skulle vara mycket intressant att göra om försöket samt låta det pågå under längre tid. Man skulle då också i många fall kunna undvika problemen jag beskrivit ovan.

Dessutom behövs försök som visar bakteriens överlevnad under mer naturliga förhållanden utomhus med de variationer i temperatur, ljus och fuktighet som förekommer normalt.

EMA-behandlingsprotokollet skulle behöva optimeras genom ytterligare försök.

Det skulle även vara av värde att ta reda på hur länge man kan förvänta sig att DNA från döda bakterier finns kvar i jorden och kan detekteras med Realtids-PCR.

Slutsats

Dichelobacter nodosus kan antagligen överleva i jord längre än man tidigare trott. Detta innebär stora konsekvenser för behandling och utrotning av smittan i praktiken. Idag anses ett bete som smittfritt efter 14 dagar utan klövbärande djur, denna praxis måste nu omvärderas.

TACK

Stort tack till mina handledare Märit Pringle och Anna Aspán för all hjälp. Tack också till Sara Frosth, SVA, för hjälpen med laboratorie-arbetet och Ulrika König, Svenska Djurhälsovården, som kom med den första idén till försöket.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Bennet, G., Hickford, J., Sedcole, R., Zhou, H. (2009a) *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* and the epidemiology of footrot. *Anaerobe* 15: 173-176.
- Bennet, G., van Loenen, A., Zhou, H., Sedcole, R. (2009b) The detection of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* from footrot lesions in New Zealand goats. *Anaerobe* 15: 177.
- Beveridge, W. I. B. (1938a) Footrot in sheep: a preliminary note on the probable causal agent. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research* 11: 1-3.
- Beveridge, W. I. B. (1938b) Investigations on the viability of the contagium of foot-rot in sheep. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research* 11: 4-13.
- Beveridge, W. I. B. (1941) Footrot in sheep: a transmissible disease due to infection with *Fusiformis nodosus*: studies on its cause, epidemiology and control. *CSIRO Australian Bulletin* 140: 1-56.
- Båverud, V., Eriksson, L., Holmström, G., Persson, M., Zimmerman, U., Johansson, K-E. (2005) Isolering och karaktärisering av *Dichelobacter nodosus* från får med fotröta. *Svensk Veterinärtidning* 11: 21-26.
- Collighan, R. J., Naylor, R. D., Martin, P. K., Cooley, B. A., Buller, N., Woodward, M. J. (2000) A spirochete isolated from a case of severe virulent ovine foot disease is closely related to a Treponeme isolated from human periodontitis and bovine digital dermatitis. *Veterinary Microbiology* 74: 249-257.
- Defra (2010) Department for Environment, Food and Rural Affairs. Hemsida. [online] Tillgänglig: <http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/welfare/documents/sheeplameness.pdf> [2010-01-15]
- Depiazzi, L. J., Richards, R. B., Henderson, J., Rood, J. I., Palmer, M., Penhale, W. J. (1991) Characterization of virulent and benign strains of *Bacteroides nodosus*. *Veterinary Microbiology* 26 (1-2): 151-160.

- Depiazzi, L. J., Roberts, W. D., Hawkins, C. D., Palmer, M. A., Pitman, D. R., McQuade, N. C., Jelinek, P. D., Devereaux, D. J., Rippon, R. J. (1998) Severity and persistence of footrot in Merino sheep experimentally infected with a protease thermostable strain of *Dichelobacter nodosus* at five sites. *Australian Veterinary Journal* 76 (1): 32-38.
- Dewhirst, F. E., Paster, B. J., LaFontaine, S. Rood, J. I. (1990) Transfer of *Kingella indologenes* (Snell and Lapage 1976) to the genus *Suttonella* gen. nov. as *Suttonella indologenes* comb. nov.; transfer of *Bacteroides nodosus* (Beveridge 1941) to the genus *Dichelobacter* gen. nov. as *Dichelobacter nodosus* comb. nov.; and assignment of the genera *Cardiobacterium*, *Dichelobacter*, and *Suttonella* to *Cardiobacteriaceae* fam. nov. in the gamma division of *Proteobacteria* based on 16S ribosomal ribonucleic acid sequence comparisons. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40: 426-433.
- DPI Department of Primary Industries. Hemsida. [online] Tillgänglig: http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0015/102381/footrot-in-sheep-and-goats.pdf [2009-12-10]
- Egerton, J. R. (2007) Diseases of the feet. In: Aitken, I. D. (Ed.) Diseases of sheep 4th edition. 273-277. Blackwell Publishing, Oxford, UK
- Egerton, J. R., Roberts, D. S. Parsonson, I. M. (1969) The aetiology and pathogenesis of ovine footrot. I. A histological study of the bacterial invasion. *Journal of Comparative Pathology* 79: 207-216.
- Emery, D. L., Stewart, D.J., Clark, B.L. (1984) The comparative susceptibility of five breeds of sheep to foot-rot. *Australian Veterinary Journal* 61 (3): 85-88.
- Graham, N. P. H. and Egerton J. R. (1968) Pathogenesis of ovine foot-rot: The role of some environmental factors. A. V. A Conference paper, Hobart, May, 1968.
- Han, X., Kennan, R. M., Davies, J. K., Reddacliff, L. A., Dhungyel, O. P., Whittington, R. J., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Rood, J. I. (2008) Twitching motility is essential for virulence in *Dichelobacter nodosus*. *Journal of Bacteriology* 190 (9): 3323-3335.
- Jensen, A., Hagelskjær Kristensen L., Prag, J. (2007) Detection of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* in tonsillitis in young adults by real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection* 13: 695-701.
- Kennan, R. M., Dhungyel, O. M. P., Whittington, R. J., Egerton, R. J., Rood, J. I. (2001) The type IV fimbrial subunit gene (fim A) of *Dichelobacter nodosus* is essential for virulence, protease secretion and natural competence. *Journal of Bacteriology* 183: 4451-4458.
- König, Ulrika. Fårhälsövården, Svenska djurhälsövården AB, Uppsala. Personligt meddelande november 2009. E-mail: ulrika.konig@svdhv.org
- Liu, D. and Yong, W. K. (1997) Improved Laboratory Diagnosis of Ovine Footrot: An Update. *The Veterinary Journal* 153: 99-105.
- Moore, L. J., Woodward, M. J., Grogono-Thomas, R. (2005a) The occurrence of treponemes in contagious ovine digital dermatitis and the characterisation of associated *Dichelobacter nodosus*. *Veterinary Microbiology* 111: 199-209.
- Moore, L. J., Wassink, G. J., Green, L. E., Grogono-Thomas, R. (2005b) The detection and characterisation of *Dichelobacter nodosus* from cases of ovine footrot in England and Wales. *Veterinary Microbiology* 108: 57-67.
- Mraz, O., Tesarcik, J., Varejka, F. (Eds.) (1963) *Nomina und Synonyma der Pathogen und Saprophytaren Microben*. VEB Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1963, 85.
- Olofsson Agneta (2005) Klövhälsa hos får - ur ett nationellt och internationellt perspektiv. Uppsala: Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Sveriges lantbruksuniversitet. Examensarbete 2005:43. ISSN 1652-8697.

- Pisz, J. M., Lawrence, J. R., Schafer, A. N., Siciliano, S. D. (2007) Differentiation of genes extracted from non-viable versus viable micro-organisms in environmental samples using ethidium monoazide bromide. *Journal of Microbiological Methods* 71: 312-318.
- Plym Forshell, L. and Andersson, L. (1981) Infektion med *Bacteroides nodosus* vid klövspaltdermatit hos ko. *Svensk Veterinärtidning* 33: 551-553.
- Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B., Carter, G. R. (1994) Non-Spore-Forming Anaerobic Bacteria. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, London, England. pp 184-190
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., Leonard, F. C. (2002) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. pp 185-188, 476-480
- Radostits, Otto M., Gay, Clive C., Hinchcliff, Kenneth W., Constable, Peter D. (2007) Infectious foot rot in sheep. In: *Veterinary Medicine* 10th edition. Saunders Elsevier, Edinburgh, UK. pp 1070-1077
- Roberts, D. S., Egerton, J. R. (1969) The aetiology and pathogenesis of ovine footrot. II. The Pathogenic Association of *Fusiformis Nodosus* and *F. Necrophorus*. *Journal of Comparative Pathology* 79: 217-227.
- Skerman, T. M. (1989) Isolation and identification of *Bacteroides nodosus*. In: Egerton J. R., Yong W. K., Riffkin G. G. (Eds) *Footrot and Foot Abscess of Ruminants*. 85-102. CRC Press Inc, Florida, USA
- Stewart, D. J. and Claxton, P. D. (1993) Ovine footrot clinical diagnosis and bacteriology. In: Corner, L. A. and Bagust, T. J. (Eds) *Australian Standard Diagnostic techniques for Animal Diseases*. CSIRO Publications, Victoria, Australia
- Stewart, D. J., Peterson, J. E., Vaughan J. A., Clark B. L., Emery D. L., Caldwell J. B., Kortt A. A. (1986) The pathogenicity and cultural characteristics of virulent, intermediate and benign strains of *Bacteroides nodosus* causing ovine foot-rot. *Australian Veterinary Journal* 63 (10): 317-326.
- SvDhv (2009a) Svenska Djurhälsovården. Hemsida. [online] Tillgänglig: http://www.svdhv.org/nyhemsida/Artiklar/070524_far_lagesrapport_fotrota.html [2009-12-10]
- SvDhv (2009b) Svenska Djurhälsovården. Hemsida. [online] Tillgänglig: http://www.svdhv.org/nyhemsida/Artiklar/090323_far_slutrapport_fotrota.pdf [2009-12-10]
- Wani S. A., Samanta I. (2005) Current understanding of the aetiology and laboratory diagnosis of footrot. *The Veterinary Journal* 171: 421-428.
- Whittington R. J. (1995) Observations on the indirect transmission of virulent ovine footrot in sheep yards and its spread in sheep on unimproved pasture. *Australian Veterinary Journal* 72 (4): 132-134.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. (2009) *Prescott's Principles of Microbiology*. McGraw-Hill, New York, USA
- Winter A. (2004) *Lameness in sheep*. The Crowood Press Ltd, Marlborough, UK