



Förekomst av *Treponema spp.* i mjölkbesättningar som orsak till smittsamt klöveksem

SLU Partnerskap Alnarps projekt nr: 1303/Anim/2020

Projekttitel på svenska enligt projektansökan: Förekomst av *Treponema spp.* i mjölkbesättningar som orsak till smittsamt klöveksem – komplettering av SLF-projektet 'Gödselfiber som strö'

Projekttitel på engelska enligt projektansökan: Presence of *Treponema spp.* in dairy herds – supplement of the SLF project 'Recycled manure solids as bedding'

Projektledare: Knut-Håkan Jeppsson

Författare till rapporten: Knut-Håkan Jeppsson (SLU), Madeleine Magnusson (SLU), Sara Bergström Nilsson (HS i Halland), Lisa Ekman (Växa Sverige), Louise Winblad von Walter (Växa Sverige), Håkan Landin (Konsult) och Christer Bergsten (Konsult)

Fakultet: Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap (LTV)

Institution: Biosystem och teknologi (BT)

Projektid: 2021-01-01 – 2023-06-30

Projektpartner: Hushållningssällskapet i Halland

Projektsammanfattning

Orsaker och smittvägar till allvarligt smittsamt klöveksem (DD = digital dermatit) är inte helt klarlagda men klövarnas hygien är av största betydelse för smittspridning och sjukdomsutveckling. Det betyder att faktorer i stallmiljön som golvsystem, utgödsling samt utformning och skötsel av liggbås påverkar hur mycket korna står och går i gödsel och därmed förekomst och spridning av akut, klinisk DD. Användning av fiberströ där gödseln separeras och gödsel fibrerna återcirkuleras som strömedel kan eventuellt bidra till ökad risk för DD genom anrikning och ökat bakterietryck. Å andra sidan kan ökad mängd fiberströ innebära ökad liggbåskomfort och därmed minska den tid korna står och exponeras för gödsel på gångarna.

Förekomsten av akut klinisk DD har undersökts via klövhälsoregistreringar i samband med rutinmässig klövverknig hos 34 gårdar anslutna till Kokontrollen®. Av dessa använde 17 gårdar fiberströ och 17 gårdar hade såg-/kutterspån som strömedel. Prover togs av oanvänt fiberströ, fiberströ respektive såg-/kutterspån från liggbåsen samt gödsel från gödselgångarna och analyserades med PCR för tre arter av *Treponema*. Minst en registrering av akut klinisk DD förekom på samtliga fiberströgårdar och hos 88 % av såg-/kutterspån gårdarna under den 8 månader långa observationsperioden. Det var ingen statistisk skillnad i incidensen av DD mellan gårdar med fiberströ kontra sågspån-/kutterspån men det var signifikant lägre incidens av lindrigt klöveksem med fiberströ. Även för andelen totala anmärkningar och andelen klövsulesår var det signifikant lägre incidens i besättningarna som använde fiberströ vilket tyder på en ökad liggkomfort med fiberströ än med såg-/kutterspån. Från PCR-analyserna av oanvänt fiberströ och använt fiberströ från liggbåsen och gödselproverna från gödselgångarna kunde ingen förekomst av de tre bakterierna (*Treponema phagedenis*, *Treponema pedis*, *Treponema medium*) påvisas förutom i ett prov från en kontrollbesättning. Ytterligare undersökningar med förfinad metodik behövs och att fler arter av *Treponema spp.* analyseras för att bekräfta föreliggande resultat och för att utesluta RMS som möjlig smittväg av DD.

Abstract

The causes and routes of transmission of contagious dermatitis (DD = Digital dermatitis) in cattle are not fully understood but poor claw hygiene is of crucial importance for the development and spread of the disease. Thus factors in the environment such as flooring system, manure handling as well as design and management of the free stalls, affect how much cows are standing and walking in manure and subsequently the presence and spreading of acute, clinical DD. The use of recycled manure solids (RMS) where the manure is separated and the fibers are recirculated as a source of bedding material may possibly contribute to an increased risk of DD by increased bacterial pressure. On the other hand, with increased cow comfort with RMS, standing time and exposure of the feet to manure and bacteria can be reduced.

The occurrence of acute clinical DD were retrieved from Claw health records at routine claw trimming from 34 Swedish dairy farms enrolled in the Swedish official milk recording scheme. Of these 17 farms used RMS and 17 farms used sawdust/wood shavings as bedding material. Samples were taken of fresh RMS, used RMS and wood shavings/sawdust from the free stalls and manure from the alleys and were analysed using PCR for three species of *Treponema*. Acute clinical DD occurred at all farms using RMS and at 88% of the farms using wood shavings/sawdust. There were no significant differences in DD incidence regarding the use of RMS versus wood shavings/sawdust but the incidence of mild dermatitis was significantly lower. Furthermore, the incidence of total remarks and sole ulcers were significantly lower in the RMS herds. From the PCR-analysis of fresh RMS, used RMS from the stalls and manure samples from the alleys no presence of the three bacteria (*Treponema phagedenis*, *Treponema pedis*, *Treponema medium*) was found except for one herd. Further investigations with more advanced techniques and including more *Treponema spp.* are needed to confirm present results and to exclude the risk of DD accumulation when using RMS.

Bakgrund

Genom att separera gödsel får man gödsel fiber (fiberströ) som kan användas som strömedel i liggbås för mjölkkor. Användningen av fiberströ till mjölkkor har ökat i Sverige de senaste åren på grund av osäkerhet i tillgång och ökat pris på andra vanliga strömaterial. Antalet somrar med torka och minskad skörd på grund av klimatförändringen kommer sannolikt att öka och orsaka framtida brist på halm. Tillgången och pris på kutterspån/sågspån, som vanligtvis används i liggbås för mjölkkor, konkurrerar med efterfrågan på träavfall som används för energiproduktion i värmekraftverk. Genom att använda fiberströ har lantbrukaren större kontroll över tillgång och pris på strömedel. En av riskerna med att använda fiberströ som strömedel till djuren, kan vara en anrikning av och ökad spridning av sjukdomsframkallande bakterier inom besättningen, som exempelvis kan orsaka större förekomst av smittsamma klövsjukdomar som det allvarliga klöveksemet digital dermatit (DD).

Digital dermatit är en bakteriell hudsjukdom som karaktäriseras av ett allvarligt, sårigt och smärtsamt eksem (Figur 1) i karled, kronrand och klövspalt hos nötkreatur (Hillström & Bergsten, 2005). Sjukdomen kan ge hälta och orsakar försämrade djurvälstånd samt ekonomiska förluster för mjölkproducenten (Palmer & O'Connell, 2015). Ett liknande eksem (Contagious ovine digital dermatitis, CODD) har identifierats hos får i Sverige (Bernhard et al., 2021). DD har sedan det först beskrevs 1974 i Italien blivit ett växande problem över hela världen där intensiv mjölkproduktion bedrivs (Corlevic & Beggs, 2022). I Danmark var 95 % av mjölkbesättningarna smittade år 2017 (Capion et al., 2021). I Sverige ses en ökande förekomst i mjölkbesättningar där förekomsten av DD är större i lösdrift än hos uppbundna och ju större besättningen är (Växa, 2023). Enligt en ny sammanställning av klövhälso rapporter hade cirka 55 procent av svenska besättningar haft något fall av DD (Växa, 2021). Skåne ligger med 68 % smittade besättningar 2019 bland de mest drabbade länen, även om den genomsnittliga besättningsförekomsten ligger under medel (Växa, 2023). DD är vanligast i lösdrifter med dålig hygien i gödselgångar eller där korna uppehåller sig (Laven, 2000; Ahlen, 2022). Sjukdomen ses mer sällan i köttjursbesättningar och hos ungdjur och säsongsvariationen med lägre förekomst under betesperioden har förändrats med större andel lösdriftsbesättningar (Bergsten et al., 2015).



Figur 1. Smittsamt klöveksem (Digital dermatit, DD). (Foto: Christer Bergsten)

De bakterier som oftast är associerade med DD är *spiroketer* av släktet *Treponema* (Rasmussen et al., 2012). Hittills har minst 20 olika genskvenser identifierats från DD-biopsiprover; bland dessa är skvenser motsvarande *Treponema phagedenis*, *Treponema vincentii*, *Treponema denticola* och *Treponema pedis* starkt förknippade med utvecklingen av sjukdomen (Evans et al., 2009; Klitgaard et al., 2013; Nordhoff et al., 2008). Treponemabakterier har även påträffats i vommen och i gödsel (Zinicola et al. 2015b). Risken för spridning och tillväxt av DD i mjölkbesättningar underlättas av ohygieniska gångtytor täckta med gödsel (Laven, 2001). *Treponema*-skvenser har identifierats i stallmiljön (färsk avföring, gödselytor, på redskap och på klövar; Sullivan, 2014) men överföringsvägen och tillväxtförhållandena för dessa bakterier är fortfarande oklara. Faktorer som kan påverka förekomsten är bland annat utformningen av liggbås och golvtyp samt utgödsling och hygien (Weber et al. 2023; Vermeersch & Opsomer 2019). Det är dock konstaterat att det i besättningar med DD också kan spåras bakterie-DNA i gödseln, vilket det inte kan göras i DD fria besättningar (Klitgaard et al., 2017). Följaktligen saknas kunskap om spridningen av denna sjukdom bland kor inom besättning såväl som mellan besättningar (Laven, 2001).

Treponema spp. är mycket svåra att odla och analysera bl.a. för att de är anaeroba. Därför finns det ganska få studier gjorda kring dessa bakterier i gårdsmiljön (Pringle et al., 2008). PCR-baserade metoder kringgår svårigheterna som är förknippade med odling av de anaeroba *Treponema*-bakterierna (Klitgaard et al., 2014). Vid institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (SLU), har en PCR-teknik utvecklats för analys av de vanligaste förekommande *Treponema spp.* hos får och nötkreatur för att identifiera spridningen av sjukdomen. Detta projekt har jämfört förekomsten av *Treponema*-bakterier i mjölkbesättningar som använder fiberströ med besättningar som använder såg-/kutterspån. Projektet har utförts parallellt med SLF-projektet ”Gödsel-fiber som strö” (projekt nr. O-19-20-312).

Syfte

Användningen av fiberströ där gödsel-fiber återcirkuleras som strömedel skulle kunna innebära en risk för ökad förekomst av smittsamt klöveksem (DD) i mjölkbesättningar. Syftet var att undersöka om användningen av fiberströ till mjölkkor ökar förekomsten av DD i besättningarna samt om *Treponema*-bakterier kan påvisas i färsk (nyseparerat) fiberströ, använd fiberströ från liggbåsen och i gödsel från gödselgångarna.

Metod

En förstudie genomfördes för att testa analysmetoden. Från två mjölkgårdar med hög förekomst av DD togs dels ett gödselprov från en klöv med DD, dels ett samlingsprov från gödselgångarna. Proven analyserades enligt metod beskriven nedan.

I projektet användes uppgifter, registreringar och analysresultat från 34 lösdriftsbesättningar från Skåne till Norrland som var anslutna till Kokontrollen®. Hälften av gårdarna använde fiberströ och de jämfördes med andra hälften av gårdarna som använde såg-/kutterspån (kontrollgårdar) som strömedel. Fiberströgårdarna hade i genomsnitt 434 (75-1308) och kontrollgårdarna hade 265 (74-611) mjölkkor. Gårdarna besöktes vid två tillfällen, dels under vintern (dec 2020 – jan 2021) och dels under våren (mars – maj 2021). Vid första besöket intervjuades

lantbrukaren om tillverkning, hantering och användning av strömedlet samt om utgödslingsrutiner. Under andra besöket bedömdes djurvälzfärden via undersökningen ”Fråga kon” och liggbåsens utformning dokumenterades. Djurhälsan i besättningarna baserades på veterinärrapporterad djursjukdata för stallperioden 2020-10-01 – 2021-03-31. Klövhälsan baserades på rapporterade klövsjukdomar gjorda vid rutinmässig klövvård. För att få ett större underlag på klövhälsodata valdes perioden 2020-10-01 – 2021-05-31.

Vid det andra besöket togs prover på samtliga gårdar för att studera förekomsten av *Treponema*-bakterier som kan orsaka smittsamt klöveksem (DD). Proverna togs från färsk fiberströ, använd fiberströ respektive såg-/kutterspån från liggbåsen samt gödselprover från gödselgångarna. Proverna på färsk fiberströ togs direkt efter gödselseparatorn eller från ett lager utanför stallet. Ett samlingsprov (ca 3 L) från fem delprover blandades och placerades i en fryspåse av plast. Proverna på använd strömaterial samlades in i liggbåsen så sent som möjligt mellan två ströningstillfällen, dvs innan färskt strömaterial delades ut. Använt strö togs i den bakre tredjedelen av bålet och inblandning med gödsel undveks. Ett samlingsprov (ca 3 L) från 10 olika liggbås jämnt fördelade i stallet lades i en plastpåse. Vidare togs ett samlingsprov av gödsel (ca 0,5 L) från gödselgången längs foderbordet och i tvärgångar med vattentråg. Ingen färsk gödsel samlades in, bara gödsel som korna hade trampat i. Proverna placerades direkt i en plastpåse och frystes in ($\leq -18^{\circ}\text{C}$) så snart som möjligt. De frysta proverna transporterades i kylväskor till analysföretaget Eurofins (Jönköping, Sverige). Proverna preparerades med RNAlater (1 ml prov + 5 ml RNAlater) och förvarades sedan i en frys vid -20°C . Därefter skickades proverna i kylboxar till SLU (institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BF); Uppsala, Sverige) där de förvarades vid -20°C tills DNA-extraktion utfördes. Det DNA som extraherades från strömaterial användes för multipel kvantitativ PCR-analys för närvaro av tre arter av *Treponema*-bakterier; *Treponema phagedenis*, *Treponema pedis* och *Treponema medium* (Frosth, Eriksson och Rosander, 2023). Den använda detektionsgränsen för positiva prover var kopietal ≥ 10 .

Resultat

Bedömningen av djurvälzfärden enligt ”Fråga kon” visade inte på några signifikanta skillnader mellan fiberströgårdarna och kontrollgårdarna. Det var inga skillnader i förekomsten av halta kor, kor med asymmetriska klövar eller långa klövar. Det var inte heller någon signifikant skillnad i djurhälsa mellan de två grupperna av gårdar i förekomsten av totala antalet veterinärbehandlade sjukdomar eller av utslagna kor på grund av klövar och ben. Emellertid var incidensen av klövsjukdomar totalt, klöveksem och för klövsulesår signifikant och upp till 50 % bättre på fiberströgårdarna.

Det var ingen statistisk skillnad i incidensen av DD mellan gårdar med fiberströ kontra sågspån-/kutterspån. Minst ett fall av DD fanns rapporterade vid rutinmässig klövvård för alla fiberströgårdar och från 15 av kontrollgårdarna. Under perioden på 8 månader var medianen för kor med DD 3,3 % av rapporterade klövverkningar på fiberströgårdarna och 5,4 % på kontrollgårdarna. Dubbelt så många, sex av kontrollgårdarna och tre av fiberströgårdarna hade över 10 % rapporterade DD (Figur 2).

Från förstudien med prov från två mjölkfogårdar med hög förekomst av DD var gödselanalyserna från klövarna positiva för *Treponema phagedenis*. Proverna från gödselgångarna var däremot negativa.

phagedenis från använt strö i en av kontrollbesättningarna. Liknande resultat erhöles av Li et al. (2021) som hittade låga halter av *Treponema spp.* i återvunnen sand och kompostströ (inklusive sågspån, rishalm och organisk gödsel).

Förstudien visade att gödselprover från klövar med DD gav positiva resultat i analyserna vilket indikerar att analysmetoden fungerade. Men inte heller i förstudien kunde *Treponema* detekteras i gödseln vilket dock Klitgaard (2017) lyckades med tack vare en nyutvecklad teknik. Endast tre arter av *Treponema spp.* testades i vår studie. Olika *Treponema*-bakterier har påvisats i olika studier (Krull et al., 2014; Zinicola et al., 2015a) och andelen olika *Treponema*-bakterier kan förändras i takt med att eksemen utvecklas (Zinicola et al., 2015b).

Studien visade inte ökad risk för DD vid användning av fiberströ. Men ytterligare undersökningar behövs med fler *Treponema*-arter för att bekräfta slutsatsen. Dessutom utvecklas metodiken för att upptäcka bakterier i låg koncentration och 'next-generation sequencing technology' kan användas i kommande studier.

Författarnas tack

Ett stort tack till alla mjölkproducenter som deltog i studien. Vi tackar också rådgivarna på Växa Sverige som genomförde det andra besöket på gårdarna, AgrD Anna Rosander (SLU) som utförde PCR-analyserna av *Treponema* samt referensgruppen för vägledning och diskussioner under projektets gång. Detta projekt har fått stöd från Partnerskap Alnarp, bidragsavtal 1303/Anim/2020 och genomförts tillsammans med projektet 'Gödsel-fiber som strö – effekt på hygien, djurhälsa, mjölk-kvalitet, ekonomi och miljö' med stöd från Stiftelsen lantbruksforskning, bidragsavtal O-19-20-312, och från SLU.

Referenser

- Ahlén, L., Holmøy, I. H., Nødtvedt, A., Sogstad, Å. M., & Fjeldaas, T. (2022). A case-control study regarding factors associated with digital dermatitis in Norwegian dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 64(1), 19.
<https://doi.org/10.1186/s13028-022-00635-0>
- Telezhenko, E. and M. Ventorp. 2015. Influence of soft or hard floors before and after first calving on dairy heifer locomotion, claw and leg health. *Animals*, 5:662-686. <https://www.mdpi.com/2076-2615/5/3/378#>
- Bernhard, M., Frosth, S., & U. König. 2021. First report on outbreaks of contagious ovine digital dermatitis in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63(1), 1-9.
<https://doi.org/10.1186/s13028-021-00595-x>
- Capion, N., Raundal, P., Foldager, L. and P. T. Thomsen. 2021. Status of claw recordings and claw health in Danish dairy cattle from 2013 to 2017. *The Veterinary Journal*, 277, 105749. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105749>
- Corlevic, A. T., & Beggs, D. S. (2022). Host Factors Impacting the Development and Transmission of Bovine Digital Dermatitis. *Ruminants*, 2(1), 90-100.
<https://doi.org/10.3390/ruminants2010005>
- De Jong, E., Frankena, K. and K. Orsel. 2021. Risk factors for digital dermatitis in free-stall-housed, Canadian dairy cattle. *Vet. Rec.* 8;e19.
<https://doi.org/10.1002/vro2.19>

- Evans, N. J., Brown, J. M., Demirkan, I., Murray, R. D., Birtles, R. J., Hart, C. A. and S. D. Carter. 2009. *Treponema pedis* sp nov., a spirochaete isolated from bovine digital dermatitis lesions. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:987-991. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.002287-0>
- Frosth, S., Eriksson, H. K., & Rosander, A. (2023). Development of a multiplex quantitative PCR assay for simultaneous detection of *Treponema phagedenis*, *Treponema pedis*, *Treponema medium*, and '*Treponema vincentii*' and evaluation on bovine digital dermatitis biopsies. *Veterinary Research Communications*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10147-5>
- Hillström, A. och Bergsten, C. 2005. Digital dermatit – en tickande bomb i svenska lösdrifter. *Svensk Veterinärtidning*, 11:15-20
- Klitgaard, K., M. L. Strube, A. Isbrand, T. K. Jensen, and M. W. Nielsen. 2017. Microbiota Analysis of an Environmental Slurry and Its Potential Role as a Reservoir of Bovine Digital Dermatitis Pathogens. *Appl Environ Microbiol* 83(11). <https://doi.org/10.1128/AEM.00244-17>
- Klitgaard, K., Nielsen, M., Ingerslev, H-C., Boye, M., Jensen TK. 2014. Discovery of Bovine Digital Dermatitis-Associated *Treponema* spp. in the Dairy Herd Environment by a Targeted Deep-Sequencing Approach. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Jul; 80(14): 4427–4432. <https://doi.org/10.1128/AEM.00873-14>
- Klitgaard, K., Foix Bretó, A., Boye, M., & Jensen, T. K. (2013). Targeting the treponemal microbiome of digital dermatitis infections by high-resolution phylogenetic analyses and comparison with fluorescent in situ hybridization. *Journal of clinical microbiology*, 51(7), 2212-2219. <https://doi.org/10.1128/jcm.00320-13>
- Krull, A. C., Shearer, J. K., Gorden, P. J., Cooper, V. L., Phillips, G. J. and P. J. Plummer. 2014. Deep sequencing analysis reveals temporal microbiota changes associated with development of bovine digital dermatitis. *Infect. Immun.* 82:3359-3373. <https://doi.org/10.1128/iai.02077-14>
- Laven, R. 2000. Determination of the factors affecting the cause, prevalence and severity of digital dermatitis as a major cause of lameness in dairy cows. Milk Development Council Study 95/R1/11. Milk Development Council: Cirencester, UK, 2000; pp. 1–45.
- Laven RA. 2001. Control of digital dermatitis in cattle. *In Practice* 23:336–341. <https://doi.org/10.1136/inpract.23.6.336>
- Li, H., Wang, X., Wu, Y., Zhang, D., Xu, H., Xu, H., Xing, X. and Z. Qi. 2021. Relationships among bedding materials, bedding bacterial composition and lameness in dairy cows. *Anim. Biosci.* 34:1559-1568. <https://doi.org/10.5713%2Fajas.20.0565>
- Nordhoff M, Moter A, Schrank K, Wieler LH. 2008. High prevalence of treponemes in bovine digital dermatitis—a molecular epidemiology. *Vet. Microbiol.* 131:293–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.019>
- Palmer, M. A., & O'Connell, N. E. (2015). Digital dermatitis in dairy cows: A review of risk factors and potential sources of between-animal variation in susceptibility. *Animals*, 5(3), 512-535. <https://doi.org/10.3390/ani5030369>
- Pringle, M., Bergsten, C., Fernström, L. L., Höök, H. and K. E. Johansson. 2008. Isolation and characterization of *Treponema phagedenis*-like spirochetes from

digital dermatitis lesions in Swedish dairy cattle. *Acta Vet Scand*, 2008. 50:1-8.
<https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-40>

Rasmussen N, Capion N, Klitgaard K, Rogdo T, Fjeldaas T, Boye M, Jensen TK. 2012. Bovine digital dermatitis: possible pathogenic consortium consisting of *Dichelobacter nodosus* and multiple *Treponema* species. *Vet. Microbiol.* 160:151–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.018>

Sullivan, L. E., Blowey, R. W., Carter, S. D., Duncan, J. S., Grove-White, D. H., Page, P., Iveson, T., Angell, J.W & Evans, N. J. (2014). Presence of digital dermatitis treponemes on cattle and sheep hoof trimming equipment. *Veterinary Record*, 175(8), 201-201. <https://doi.org/10.1136/vr.102269>

Vermeersch, A. and G. Opsomer. 2019. Digital dermatitis in cattle Part I: factors contributing to the development of digital dermatitis. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdsch.* 88:247-257. <https://biblio.ugent.be/publication/8635589>

Växa. 2023. Djurhälsostatistik 2021-2022. Tillgänglig:
<https://vxa.qbank.se/mb/?h=3fb6d74d47ca02f4f86b10e5bc2e1465&p=dccda36951e6721097a93eae5c593859&display=feature&s=name&d=desc>

Växa. 2021. Djurhälsostatistik 2020-2021. Tillgänglig:
<https://vxa.qbank.se/mb/?h=3fb6d74d47ca02f4f86b10e5bc2e1465&p=dccda36951e6721097a93eae5c593859&display=feature&s=name&d=desc>

Weber, J., Becker, J., Syring, C., Ruiters, M. W., Locher, I., Bayer, M., Schüpbach-Regula, G. and A. Steiner. 2023. Farm-level risk factors for digital dermatitis in dairy cows in mountainous regions. *J. Dairy Sci.* 106:1341-1350.
<https://doi.org/10.3168/jds.2022-22243>

Zinicola, M., Higgins, H., Lima, S., Machado, V., Guard, C. and R. Bicalho. 2015a. Shotgun metagenomic sequencing reveals functional genes and microbiome associated with bovine digital dermatitis. *PLoS One*, 10:e0133674.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133674>

Zinicola, M., Lima, F., Lima, S., Machado, V., Gomez, M., Dopfer, D., Guard, C. and R. Bicalho. 2015b. Altered Microbiomes in Bovine Digital Dermatitis Lesions, and the Gut as a Pathogen Reservoir. *Plos One*, 10:e0120504.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120504>