

Ny metod för virulensbestämning av fotrötebakterier hos får (H1350161)

Bakgrund

Fotröta är en smittsam klövsjukdom hos får som orsakas av den långsamväxande fotrötebakterien *Dichelobacter nodosus* (Beveridge, 1941). Fotröta förekommer i de flesta lammproducerande länder och ger upphov till både djurlidande och ekonomiska förluster i form av produktionsbortfall (Bennett and Hickford, 2011). I Sverige diagnosticerades fotröta för första gången år 2004 och fem år senare infördes ett frivilligt kontroll- och saneringsprogram (Klövkontrollen) av Gård & Djurhälsan med syfte att sanera drabbade besättningar samt möjliggöra en säkrare livdjurshandel med fotrötecertifierade djur. Klövkontrollen finansieras delvis av Jordbruksverket och baseras i dagsläget på klinisk diagnostik då bra laboratediagnostik saknats vilket har gjort det både kostsamt och resurskrävande.

Fotröta kan uppträda med varierande svårighetsgrad från benign (mild) fotröta där inflammation av den interdigitala klövspalthuden (huden mellan klövarna) föreligger till virulent (allvarlig) fotröta där inflammationen gått så långt att klövkapseln separerats från den underliggande vävnaden. Sjukdomens svårighetsgrad beror till största del på den infekterande *D. nodosus*-stammens virulens (Bennett and Hickford, 2011) men även av andra faktorer såsom fårras och klimatförhållanden (Emery et al., 1984; Graham and Egerton, 1968; Wassink et al., 2003). Den ekologiska djurhållningens större krav på utevistelse, speciellt vintertid, kan leda till att fåren blir extra mottagliga för fotröta. Den känsliga huden mellan klövarna försvagas lätt av ett upptrampat och lerigt underlag. Om en besättning drabbas av sjukdomen och behöver saneras (vanlig behandling är fotbadning med zinksulfat och ev. antibiotika behandling) kräver ekologisk produktion dessutom längre karenstider än konventionell produktion. Andelen får i ekologisk produktion ökar i Sverige och till och med år 2011 hade drygt 109 000 får ställts om från konventionell djurhållning till ekologisk vilket motsvarar 37 % av det totala antalet får (källa: Jordbruksverket). Det är av särskild vikt att förhindra spridning av fotröta för ekologisk produktion.

En snabb och enkel diagnostik som visar om en besättning bär på *D. nodosus* och som dessutom ger en klassificering av bakteriens virulens vore mycket värdefullt. Med en sådan diagnostik skulle besättningar som bär på virulenta (aggressiva) *D. nodosus* men som för tillfället inte uppvisar tydliga kliniska symptom kunna skiljas från besättningar som endast bär på benigna (godartade) *D. nodosus*. En tidig upptäckt av besättningar med virulent fotröta kan innebära att åtgärder kan sättas in tidigt så att djurhälsan inte behöver påverkas och att smittspridning till andra besättningar som kan löpa större risk att utveckla allvarligare sjukdom kan förhindras.

Det finns en snabb och säker metod för detektion av *D. nodosus* tillgänglig på Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) i form av en real-tids PCR (Polymerase Chain Reaction) som utvärderats tillsammans med andra veterinärinstitut i Norden tack vare ett tidigare projekt (fotröta hos får H1050142) finansierat av Stiftelsen Lantbruksforskning (SLF) men den ger tyvärr ingen information om bakteriens virulens (Frosth et al., 2012). En metod för virulensbestämning av *D. nodosus* som redan finns och som har använts i Australien, England och Norge är gelatin gel test (Palmer, 1993). Gelatin gel test kräver dock att man först odlar fram bakterien vilket kan vara både dyrt och arbetskrävande. Dessutom kan testet vara svårt att läsa av. En genotypisk metod (PCR) som inte kräver odling skulle vara ett bättre alternativ för virulensbestämning. En kandidatgen för ett sådant test skulle kunna vara *aprV2/B2* som

kodar för ett extracellulärt proteas (enzym som kan bryta ner proteiner i vävnader) hos *D. nodosus* och som man har visat är associerat med virulens (Kennan et al., 2010).

Syftet med projektet var att ta fram ett test som snabbt och kostnadseffektivt kan identifiera eventuella besättningar som bär på virulenta stammar av *D. nodosus* och som kan användas som ett diagnostiskt redskap i det pågående kontrollprogrammet mot fotröta. Testet skulle bli speciellt värdefullt för att säkerställa att det inte rör sig om virulent fotröta i besättningar där kliniken är osäker. Projektet har utgjort en del i Sara Frosth:s doktorandprojekt vars målsättning är att öka kunskaperna om fotröta i svenska fårbesättningar och att förbättra diagnostiken.

Material och metoder

Delstudie 1: Utveckling och utvärdering av test för virulensbestämning av D. nodosus

En real-tids PCR för *D. nodosus aprV2/B2* genen designades med hjälp av mjukvaran Primer Express och testades initialt på typstammen för *D. nodosus* CCUG (Culture Collection, University of Göteborg) 27824T. Ytterligare två referensstammar köptes in från en annan referenskollektion (ATCC) 31545 resp. 27521 för att användas i utprovningen. Reagenser (mastermixar) från olika tillverkare testades för att optimera PCR: en. Detektionsgräns och amplifieringseffektivitet bestämdes för *aprV2* respektive *aprB2* genom seriespädningar av CCUG 27824T resp. AN484/05 (SVA: s stamkollektion).

Specificiteten utvärderades genom att sparade *D. nodosus* isolat samt *D. nodosus* positiva svabbprover (100 st) från tidigare studier och diagnostiken analyserades med den utvecklade PCR: en samt sekvenserades för verifiering (inkludativitet). Ett flertal olika sekvenseringsprimrar fick tas fram för ändamålet och samma mjukvara som ovan användes. Ytterligare etthundra prover bestående av isolat från andra bakteriearter/svampar och *D. nodosus* negativa svabbprover analyserades med *aprV2/B2*-PCR: en för att se att den inte korsreagerade med andra bakteriearter eller någon komponent av svabbprovet (exklusivitet).

Den framtagna PCR: en provades även ut på 474 sparade kliniska prover (e-svabbar) där *D. nodosus* påvisats med PCR sedan tidigare (Frosth et al., 2015). Dessutom analyserades 277 kliniska prover (241 biopsier resp. 36 e-svabbar) från engelska får som provtagits och bedömts kliniskt i samband med slakt (här ingick både friska djur som djur med olika grad av fotröta).

En jämförelse mellan *aprV2/B2* PCR metoden som utvecklats i detta projekt och en snarlik metod som publicerats under projektets gång (Stäuble et al., 2014a) genomfördes med avseende på specificitet (teoretisk), detektionsgräns, amplifieringseffektivitet samt tidsåtgång i utförandet.

Delstudie 2: Utvärdering poolning av prover kontra individuella prover

Ett pilotförsök genomfördes först för att utvärdera om man kunde använda en och samma svabb för både poolningen samt den individuella analysen i stället för två olika från samma djur som först tänkts. Vid upprepade svabbningar på samma ställe kan mängden bakterier vara betydligt färre i den andra omgången och att använda samma svabb för båda analyserna skulle därmed kunna ge ett mer jämförbart resultat. Det visade sig att det gick bra att använda en och samma svabb (en så kallas e-svabb) till båda analyserna och efter att svabben skakats i fem minuter togs hälften av vätskan (400 µl) till den individuella analysen och resterande hälften till den poolade analysen med fem prover. En fördel med att bara ta hälften av svabbvätskan är att man har material kvar att gå tillbaka till om man vill kunna dela upp poolen igen.

Efter pilotförsöket provtogs totalt 250 djur från 19 fårbesättningar av Gård & Djurhälsan i samband med Klövkontrollens besättningsgenomgångar hösten 2014. Proverna togs med e-svabb i klövspalten. Urvalet baserade sig på kliniska fynd – det var önskvärt att merparten av besättningarna inte skulle ha kliniska symptom på fotröta och endast att en handfull skulle ha kliniska symptom. Detta på grund av att vi ville att varje pool skulle innehålla prover från fem djur varav fyra skulle vara negativa för *D. nodosus* och bara ett positivt för *D. nodosus*. Samtliga 250 prover analyserades först individuellt med *D. nodosus* 16S real-tids PCR: en som finns beskriven av Frosth et al. (2015) samt *aprV2/B2* real-tids PCR: en som tagits fram detta projekt (delstudie 1) och som också finns beskriven i samma publikation. Baserat på resultaten från dessa två analyser poolades proverna sedan fem och fem så att varje pool utgjordes av fyra *D. nodosus* negativa prover samt ett *D. nodosus* positivt prov och sedan analyserades proverna på samma sätt igen och resultaten jämfördes. Totalt analyserades 41 pooler enligt ovanstående upplägg samt 3 pooler där samtliga fem ingående prover var positiva för *D. nodosus* i den individuella analysen.

Resultat

Delstudie 1: Utveckling och utvärdering av test för virulensbestämning av D. nodosus

Den utvecklade *aprV2/B2* PCR: en visade på 100 % specificitet. Samtliga 100 st *D. nodosus* isolat och *D. nodosus* positiva svabbar (84 benigna resp. 16 virulenta) detekterades och identifierades korrekt vid jämförelse med sekvenseringsresultatet. Inga falskt positiva prover kunde påvisas vid exklusivitetstestningen. Detektionsgränsen bestämdes till 4 fg DNA vilket motsvaras av ungefär 3 bakterier per PCR reaktion. Amplifieringseffektiviteten dvs. hur effektivt målgenen kopieras i varje steg i PCR: en var mycket god (94 %). Vid jämförelse med metoden av Stäuble et al. (2014a) sågs ingen skillnad i detektionsnivå och skillnaden i effektivitet var mycket liten (94 % jämfört med deras knappt 90 %). Däremot finns det *D. nodosus* isolat med en nukleotidskillnad rapporterat jämfört med deras design av ena primern vilket skulle kunna innebära specificitetsproblem (Kennan et al., 2014). När det gäller själva utförandet tog deras PCR metod dubbelt så lång att utföra jämfört med vår (2 h istället för 1 h).

Av de 474 *D. nodosus* positiva kliniska proverna (svabbar) fungerade 98,7 % (468 st) att analyseras med *aprV2/B2* PCR: en (421 benigna resp. 47 virulenta). Endast för 6 prover (1,3 %) erhölls inget resultat och dessa prover innehöll samtliga väldigt liten mängd *D. nodosus* bakterier enligt det tidigare 16S PCR resultatet. Av de 277 englandsproverna var 70 % positiva för *D. nodosus aprV2/B2* generna och av dessa var 83,6 % virulenta, 4,6 % benigna och 11,8 % innehöll både virulenta och benigna *D. nodosus*.

Delstudie 2: Utvärdering poolning av prover kontra individuella prover

Av totalt 19 provtagna besättningar bedömdes 6 ha kliniska symptom på fotröta (grad 2 eller mer enligt graderingssystemet beskrivet av Stewart and Claxton (1993)). För en besättningar saknades uppgift om klinik och övriga 12 besättningar bedömdes inte ha kliniska symptom på fotröta (grad <2). *D. nodosus* påvisades i totalt 9 besättningar (samtliga 6 med klinik, den utan uppgift om klinik samt i 2 besättningar utan klinik). Samtliga prover som var positiva för *D. nodosus* med 16S PCR: en var också positiva i *aprV2/B2* PCR: en och samtliga var av benign variant.

Samtliga 41 pooler där endast ett *D. nodosus* positivt prov av varierande nivå (hög, medel resp. låg mängd *D. nodosus* bakterier) ingick var positiva för båda PCR: erna. Vid jämförelse med de individuella resultaten kunde endast en försumbar skillnad i känslighet påvisas. Hur dessa pooler fördelade sig på dessa tre olika nivåer kan ses i tabellen nedan:

<i>D. nodosus</i> mängd baserat på individuellt PCR resultat	Antal pooler
Hög	10
Medel	21
Låg	10
Totalt:	41

Samtliga tre pooler som innehöll fem *D. nodosus* positiva prover vardera gav också positivt resultat för båda PCR: erna. Även här var det ingen större skillnad i känslighet att köra individuellt eller poolat.

Diskussion

En real-tids PCR för virulensbestämning av *D. nodosus* har utvecklats och utvärderats inom detta projekt. Den framtagna PCR metoden är känslig, specifik och snabb att genomföra och kräver dessutom inte odling innan analys. PCR metoden baseras på ett av tre extracellulära proteaser hos *D. nodosus* som identifierats som viktiga för virulens. Att vi valde att inte utveckla PCR metoder för de andra två som föreslogs i ansökan beror på att ny forskning visat på att detta proteas (AprV2/B2) är den mest tillförlitliga indikatorn för virulens (Kennan et al., 2014; Stäuble et al., 2014b). En extra satsning gjordes i stället för att få tag på fler virulenta *D. nodosus* att utvärdera PCR: en på då det visade sig att de flesta kliniska prover och *D. nodosus* isolat som vi har sparade är benigna. Inga av våra kliniska prover visade sig heller vara dubbelinfekterade (både virulent och benign variant av *D. nodosus* i samma prov) vilket har rapporterats från andra länder och detta är också något som skulle vara önskvärt att testa på PCR: en. Tack vare detta projekt fick vi möjlighet att knyta kontakt med forskare vid Nottinghams Universitet och vi fick därigenom tillgång till ett större antal kliniska prover med virulenta *D. nodosus* samt även dubbelinfekterade prover. Vi fick även möjlighet att utvärdera vår PCR på en annan typ av kliniskt material (biopsier) än vad vi tidigare gjort vilket har varit mycket värdefullt. Inom detta samarbete håller vi även på att jämföra förekomst av *D. nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* och *Treponema* spp. mellan svabbar och biopsier samt undersöker om det finns något samband mellan förekomst av dessa bakterier och immunsvaret hos värden vilket kan ses som en fortsättning på SLF-projektet fotröta hos får (H1050142).

När en snarlik PCR metod publicerades under projektets gång (Stäuble et al., 2014a) valde vi att jämföra den metoden med den som vi precis tagit fram men då det visade sig att deras design av själva testet skulle kunna innebära specificitetsproblem valde vi att gå vidare med vår. Deras metod tog dessutom dubbelt så lång tid att utföra. I övrigt uppvisade båda metoderna samma detektionsnivå och likartad amplifieringseffektivitet och det är en styrka att fler valt samma gen att basera sin virulensbestämningsmetod på. Poolning av svabbprover, fem och fem, innan analys visade sig fungera väldigt bra och till försumbar skillnad i känslighet jämfört med om man körde proverna individuellt.

Publikationer

Internasjonella vetenskapligt granskade publikationer

- Kennan RM., Gilhuus M., Frosth S., Seemann T., Dhungyel O., Whittington R., Boyce JD., Aspán A., Jørgensen HJ., Bulach DM., and Rood JI. 2014. Genomic evidence for a globally distributed, bimodal population in the ovine footrot pathogen *Dichelobacter nodosus*. mBio 5(5):e01821-14, <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01821-14>
- Frosth, S., König, U., Nyman, A-K., Pringle, M., and Aspán A. Characterisation of *Dichelobacter nodosus* and detection of *Fusobacterium necrophorum* and *Treponema* spp. in sheep with different clinical manifestations of footrot. Vet. Microbiol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.034>

Konferens abstracts, granskade

- Kennan RM., Gilhuus M., Frosth S., Seemann T., Dhungyel O., Whittington R., Boyce JD., Powell DR., Aspán A., Jørgensen HJ., Bulach DM., and Rood JI. Genomic sequencing of the ovine footrot pathogen *Dichelobacter nodosus* provides evidence that it exists globally as a bimodal population. The Australian Society for Microbiology, Annual Scientific Meeting, Melbourne, Australien, 6-9 juli 2014
- Kennan RM., Gilhuus M., Frosth S., Seemann T., Dhungyel O., Whittington R., Boyce JD., Powell DR., Aspán A., Jørgensen HJ., Bulach DM., and Rood JI. Genomic sequencing of the ovine footrot pathogen *Dichelobacter nodosus* provides evidence that it exists globally as a bimodal population. The 3rd Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals, Prato, Italien, 7-10 oktober 2014
<http://vetpath-2014-prato.p.asnevents.com.au/days/2014-10-08/abstract/19661>
- Frosth, S., König, U., Nyman, A-K., and Aspán A. Characterization of *Dichelobacter nodosus* isolates and detection of *Fusobacterium necrophorum* and *Treponema* spp. in sheep with different clinical manifestations of footrot in Sweden. The 3rd Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals, Prato, Italien, 7-10 oktober 2014
<http://vetpath-2014-prato.p.asnevents.com.au/days/2014-10-08/abstract/18778>
- Maboni, G., Frosth S., Stewart C., Aspán, A., and Töttemeyer, S. Defining *Dichelobacter nodosus* load and virulence in ovine footrot. Society for General Microbiology Annual conference, Birmingham, Storbritannien, 30 mars-2 april 2015

Deltagande i konferenser/seminarier

- "The 3rd Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals", Prato, Italien, 7-10 oktober 2014
- "Avslutningsseminar prosjekt Friske føtter og forskningsprosjektet Fotråde hos sau og relaterte infeksjose klauv lidelser hos storfe i Norge", Sandnes, Norge, 20 oktober 2014

Slutsatser (gällande nytta med råd till näringen)

En känslig, specifik och snabb metod för virulensbestämning av *D. nodosus* har tagits fram inom detta projekt vilket tidigare saknats. Testet kan påvisa samt skilja mellan benigna (godartade) respektive virulenta (aggressiva) stammar av *D. nodosus* och kräver inte att bakterien odlas fram innan analys utan kan användas direkt på kliniska prover. Det är även möjligt att analysera prover från fem olika djur tillsammans på en och samma gång (poolning) med fortsatt god känslighet vilket kan minska framtida analyskostnader. Med detta nya test kan tidiga fall av virulent fotröta effektivt upptäckas och djurlidande förhindras. Testet kan användas som ett diagnostiskt redskap i det pågående kontrollprogrammet mot fotröta (Klövkontrollen) och bli speciellt värdefullt i besättningar med osäker klinik.

Resultatförmedling till näringen

- Information om projektet på SVA:s webbsida bland aktuella forskningsprojekt:
<http://www.sva.se/forskning-och-utveckling/aktuella-forskningsprojekt/ny-metod-for-virulensbestamning-av-fotrotebakterier-hos-far>
- Information om projektet i Svenska Djurhälsovårdens (numera Gård & Djurhälsan) medlemstidning Djurhälsonytt nr. 2 2014 med titel "Aktuell forskning om fotröta".

En sammanfattning av resultaten planeras att publiceras i tidningen Fårskötsel under hösten 2015 dessutom så kommer SVA:s webbsida att uppdateras med de nya resultaten.

Sammanfattning

Fotröta är en smittsam klövsjukdom hos får som orsakas av bakterien *D. nodosus*. Sjukdomen kan uppträda med varierande svårighetsgrad som till stor del beror på virulensegenskaper hos den infekterande bakteriestammen. En metod för virulensbestämning av *D. nodosus* har inte tidigare funnits tillgänglig i Sverige. Syftet med projektet var att utveckla ett test som kan identifiera eventuella besättningar som bär på virulenta stammar av *D. nodosus* och som kan användas som ett diagnostiskt redskap i det pågående kontrollprogrammet mot fotröta. En real-tids PCR baserad på en känd virulensgen hos *D. nodosus* utvecklades som var känslig, specifik och gick snabbt att utföra. Metoden krävde dessutom inte att bakterien odlades fram innan analys. Ett annat mål var att utvärdera om flera prover kunde analyseras tillsammans på en och samma gång dvs. poolas för att minska framtida analyskostnader. Denna studie visade att prover kunde poolas fem och fem innan analys med bibehållen känslighet.

Summary

Footrot is a contagious disease of sheep which is caused by the bacterium *D. nodosus*. The disease can occur with varying severity which largely depends on the virulence of the infecting bacterial strain. A method for virulence determination of *D. nodosus* has not previously been available in Sweden. The aim of the project was to develop a test that can identify potential flocks carrying virulent strains of *D. nodosus* and which can be used as a diagnostic tool in the ongoing control program against footrot. A real-time PCR based on a known virulence gene of *D. nodosus* was developed which was sensitive, specific, and went quickly to perform. The method did not require culturing of the bacterium prior to analysis which is a big advantage. Another objective was to evaluate if multiple samples could be analyzed together at the same time i.e. pooled to reduce future analysis costs. This study showed that samples could be pooled five and five prior to analysis with maintained sensitivity.

Populärvetenskaplig redovisning

Ny metod för virulensbestämning av fotrötebakterier hos får (H1350161)

Bakgrund och syfte

Fotröta är en smittsam klövsjukdom hos får som orsakas av bakterien *Dichelobacter nodosus*. Sjukdomen förekommer i de flesta lammproducerande länder och ger upphov till både djurlidande och ekonomiska förluster. Fotröta kan uppträda med varierande svårighetsgrad som till stor del beror på virulensegenskaper hos den infekterande bakteriestammen. En snabb och säker metod för virulensbestämning av *D. nodosus* har inte tidigare funnits tillgänglig i Sverige. Målet med projektet var att ta fram ett test som snabbt och kostnadseffektivt kan identifiera eventuella besättningar som bär på virulenta stammar av *D. nodosus* och som kan användas som ett diagnostiskt redskap i det pågående kontrollprogrammet mot fotröta (Klövkontrollen).

Resultat

Ett test för virulensbestämning av *D. nodosus* som kunde påvisa samt skilja mellan benigna (godartade) respektive virulenta (aggressiva) stammar utvecklades i detta projekt. Testet krävde inte att bakterien odlades fram innan analys utan kunde användas direkt på kliniska prover såsom svabbar och biopsier. Det framtagna testet hade hög specificitet, känslighet och gick snabbt att utföra. Det var även möjligt att analysera prover från fem olika djur tillsammans på en och samma gång (poolning) med fortsatt god känslighet. Testet hade god känslighet vid jämförelse med ett liknande test och gick något snabbare att utföra.

Metod

Ett test för virulensbestämning av *D. nodosus* i form av en real-tids PCR (Polymerase Chain Reaction) designades med hjälp av en mjukvara avsedd för ändamålet (Primer Express). För att utvärdera det framtagna testet användes både referensstammar från olika bakteriearter inklusive *D. nodosus* såväl som kliniska prover. För att undersöka om flera prover kunde analyseras tillsammans på en och samma gång dvs. poolas togs 250 nya prover från 19 fårbesättningar som dels analyserades individuellt och dels poolades fem och fem. Det ny framtagna testet jämfördes även med ett liknande test som publicerats under projektets gång med avseende på bland annat känslighet och snabbhet.

Ekonomisk redovisning, Se bilaga 1.

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.
- Emery, D.L., Stewart, D.J., Clark, B.L., 1984. The comparative susceptibility of five breeds of sheep to foot-rot. *Aust. Vet. J.* 61, 85-88.
- Frosth, S., König, U., Nyman, A.K., Pringle, M., Aspán, A., 2015. Characterisation of *Dichelobacter nodosus* and detection of *Fusobacterium necrophorum* and *Treponema* spp. in sheep with different clinical manifestations of footrot. *Vet Microbiol.*
- 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.
- Graham, N.P., Egerton, J.R., 1968. Pathogenesis of ovine foot-rot: the role of some environmental factors. *Aust Vet J* 44, 235-240.
- Kennan, R.M., Gilhuus, M., Frosth, S., Seemann, T., Dhungyel, O.P., Whittington, R.J., Boyce, J.D., Powell, D.R., Aspan, A., Jorgensen, H.J., Bulach, D.M., Rood, J.I., 2014. Genomic evidence for a globally distributed, bimodal population in the ovine footrot pathogen *Dichelobacter nodosus*. *mBio* 5.
- Kennan, R.M., Wong, W., Dhungyel, O.P., Han, X., Wong, D., Parker, D., Rosado, C.J., Law, R.H., McGowan, S., Reeve, S.B., Levina, V., Powers, G.A., Pike, R.N., Bottomley, S.P., Smith, A.I., Marsh, I., Whittington, R.J., Whisstock, J.C., Porter, C.J., Rood, J.I., 2010. The subtilisin-like protease AprV2 is required for virulence and uses a novel disulphide-tethered exosite to bind substrates. *PLoS Pathog* 6, e1001210.
- Palmer, M.A., 1993. A gelatin test to detect activity and stability of proteases produced by *Dichelobacter (Bacteroides) nodosus*. *Vet. Microbiol.* 36, 113-122.
- 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.
- Stäuble, A., Steiner, A., Frey, J., Kuhnert, P., 2014a. Simultaneous detection and discrimination of virulent and benign *Dichelobacter nodosus* in sheep of flocks affected by foot rot and in clinically healthy flocks by competitive real-time PCR. *J Clin Microbiol* 52, 1228-1231.
- Stäuble, A., Steiner, A., Normand, L., Kuhnert, P., Frey, J., 2014b. Molecular genetic analysis of *Dichelobacter nodosus* proteases AprV2/B2, AprV5/B5 and BprV/B in clinical material from European sheep flocks. *Vet. Microbiol.* 168, 177-184.
- Wassink, G.J., Grogono-Thomas, R., Moore, L.J., Green, L.E., 2003. Risk factors associated with the prevalence of footrot in sheep from 1999 to 2000. *Vet Rec* 152, 351-358.