

Slutrapport till Stiftelsen Lantbruksforskning

Projektets titel: Ny metod för diagnostisering av smittsamt klöveksem

Projektnummer: V1130031

Rapportens författare: Jenny Frössling, Anna Rosander, Camilla Björkman, Märit Pringle

Bakgrund

Förekomst och behandling

Smittsamt klöveksem (digital dermatit) är en klövsjukdom som drabbar nötkreatur och som ger upphov till smärtsamma sår i huden i övergången mot klövkapselns bakre del. Såren är en orsak till hälta och minskat välbefinnande, och troligen har sjukdomen även negativa effekter på fruktsamhet och mjölkproduktion. Den exakta orsaken till att eksemen uppstår har inte klarlagts men har visats vara kopplad till infektion med bakterier av släktet *Treponema*. Det är också känt att miljöfaktorer påverkar eksemens uppkomst och allvarlighetsgrad, och besättningsproblem förekommer framförallt i lösdrifter med dålig hygien i gödselgångarna (Bergsten & Pettersson, 1992; Hultgren & Bergsten, 2001). Även om smittsamt klöveksem anses kunna spontanläka, speciellt om stallgolvet renhet ökas, är det svensk praxis att behandla kor med eksem, dels av djurskyddsskäl men också för att minska ytterligare smittspridning (Sveriges Veterinärmedicinska Sällskap, 2013). Lokalbehandling med noggrann tvätt, bredspektrumantibiotikum (tetracyklin) och bandagering (t.ex. enligt Manske *et al.*, 2002) är idag en vanligt förekommande behandlingsmetod.

Smittsamt klöveksem förekommer i svenska besättningar men det saknas fortfarande kunskap om utbredningen av problemet (Hillström & Bergsten, 2005; Pringle *et al.* 2008). I många andra länder, till exempel USA och Danmark, är det dock väl känt att sjukdomen orsakar stora problem. I takt med att den svenska mjölkproduktionen nu i allt högre grad går från uppbundna stall till lösdrift finns det anledning till oro för att samma situation som i Danmark kommer att uppstå i Sverige. Dagens strukturomvandling med fler stora besättningar och expansion av besättningar, vilket kräver inköp av kor från flera andra besättningar, innebär också att djurkontakter mellan och inom besättningar ökar. Konsekvensen av det är tyvärr att risken att smittsamt klöveksem får fäste och sprids ökar väsentligt.

Traditionell diagnostisk metod

Diagnosen smittsamt klöveksem ställs idag kliniskt och kräver att kon fixeras i verkstol och att klöven rengörs ordentligt. Bedömningen av vilka förändringar som ska klassas som smittsamt klöveksem är subjektiv och kräver särskild kompetens. Fixering av kor i verkstol är tidskrävande och ett riskmoment ur arbetsmiljösynpunkt. I regel genomförs sådan fixering endast 1-3 gånger per år i samband med klövverkning. Av dessa skäl försvåras möjligheten till diagnostisering av sjukdomen och, tillsammans med brister i den subjektiva diagnostiseringsmetoden, är det en förklaring till varför förekomst, spridningshastighet, och trender vad det gäller förekomst inte har studerats i så stor utsträckning som vore önskvärt.

Utveckling av nya diagnostiska metoder

Forskningen vid SLU kring *Treponema* spp. och smittsamt klöveksem, som inleddes med ett SLF-finansierat projekt 2006-2009 (Projektnr. H0530016), har fokuserats på den *Treponema*-art som i hittills redovisade studier varit den vanligast förekommande i klöveksemen, nämligen den som har kallats *Treponema phagedenis*-like (Klitgaard *et al.* 2008; Nordhoff *et al.* 2008; Yano *et al.* 2009) men som vi nu kan kalla enbart *Treponema phagedenis* (Wilson-Welder *et al.* 2013). Den har bland annat syftat till att på molekylär nivå beskriva sjukdomsframkallande mekanismer hos bakterien och att hitta proteiner på bakteriens yta som stimulerar immunförsvaret hos nötkreatur. Immunstimulerande proteiner kan användas både för utveckling av diagnostiska test (vilket varit fokus för denna studie) och för vaccintillverkning.

Det finns ännu ingen etablerad laboratoriediagnostik för smittsamt klöveksem. I ett antal utländska studier har man dock i forskningssyfte använt antikroppstester baserade på helcellspreparationer av *Treponema* från klöveksem (Walker *et al.* 1997, Demirkan *et al.* 1999, Murray *et al.* 2002, Vink *et al.* 2009). Man har då funnit att antikroppar mot *Treponema* bildas vid smittsamt klöveksem. Resultaten har delvis varit svårtolkade, eventuellt på grund av att testerna varit baserade på ett sådant komplext material som sönderdelade celler, och därför inte varit tillräckligt specifika. Antikropsproduktion mot *Treponema phagedenis* hos mus och nötkreatur har också påvisats vid experimentella infektioner (Elliot *et al.* 2007; Zuerner *et al.* 2007).

I Sverige skulle ett diagnostiskt test baserat på antikropsbildning kunna användas för att undersöka förekomst och utbredningsgrad av smittsamt klöveksem i olika typer av besättningar och i olika delar av landet. Sådan information är nödvändig för att få en uppfattning om sjukdomsläget i ko-populationen och utvecklingen över tid, vilket utgör grunden för beslut om eventuella åtgärder och behandlingsstrategier. Statistiska samband mellan förekomst av sjukdomsfall och olika individ- eller besättningsvariabler kan också ge värdefulla ledtrådar om sjukdomens orsaker och spridningssätt. En tillförlitlig testmetod skulle även kunna utnyttjas som ett verktyg för friförklaring av besättningar och för ett bekämpningsprogram mot smittsamt klöveksem där lantbrukaren kan välja att endast köpa djur från fria besättningar. I länder där sjukdomen är mer utbredd kan samma test användas vid försäljning och import/export av djur samt inom stora besättningar för att lägga upp behandlingsstrategier. Med kor fria från smittsamt klöveksem ökar både djurvälståndet och intäkterna från mjölkproduktionen för lantbrukaren. Det är också angeläget att minska den omfattande användning av antibiotika som sjukdomen kräver.

Med hjälp av en teknik som kallas ”shotgun phage display” (Jacobsson *et al.* 2003) har vi sedan tidigare identifierat treponemaproteiner som ger upphov till antikropsbildning. En fag (bakterievirus) används för att göra ett bibliotek där alla bakteriens proteiner finns representerade. Från biblioteket kan sedan bakterieproteiner som binder till nötkreatur-antikroppar isoleras genom selektion. Ett fagbibliotek har gjorts från en svensk stam av arten *Treponema phagedenis* och selekterats mot antikroppar från en kanin immuniserad med levande bakterier av samma stam. Innan studien startades hade tre immunogena proteiner identifierats (TmpA, Ttm och PrrA; Rosander *et al.* 2011). Dessutom hade ytterligare två potentiellt immunogena proteiner identifierats genom bioinformatisk analys av DNA-sekvensen för bakteriestammens kromosom som finns tillgänglig i vår forskargrupp (VpsA och VpsB, opublicerade resultat). Dessa proteiner har uppförökats och utnyttjats som antigen i s.k. ELISA-tester, det vill säga system där serum eller mjölkprover sätts till brunnar som

preparerats med antigenet. Eventuella antikroppar i proverna binds till antigenet och kan därefter mätas. När initiala tester med serum och mjölk från kor med och utan smittsamt klöveksem hade genomförts var resultaten mycket lovande. De indikerade att antikroppstester baserade på proteinerna ger en återspeglning av djurens kliniska tillstånd.

Studiens syfte

Den genomförda studien bygger på hypotesen att tester baserade på de identifierade antigenerna med hög tillförlitlighet kan användas för att särskilja djur med och utan smittsamt klöveksem. Målet var att analysera ett större antal sera och mjölkprover från besättningar med och utan sjukdomen för att på så sätt utvärdera om testerna kan användas som ett diagnostiskt verktyg för bland annat friförklaring av besättningar och detektering av infekterade kor eller besättningar.

Material och metoder

Insamling av prover

Via kontakt med veterinärer och professionella klövvårdare (med känd kunskap om smittsamt klöveksem) identifierades och kontaktades djurägare till mjölkkobesättningar som ansågs vara fria från eller ha problem med smittsamt klöveksem. Besättningar ansågs fria från smittsamt klöveksem om de hade allmänt god klövhälsa hos sina kor och smittsamt klöveksem aldrig tidigare hade påvisats i besättningen. Totalt gav 25 djurägare godkännande till att deras besättning inkluderades i studien. Besättningarna är belägna i Hallands, Kronobergs, Kalmar, Jönköpings, Skaraborgs, Södermanlands, Uppsala, Gävleborgs och Västerbottens län.

I 15 besättningar med smittsamt klöveksem dokumenterades individuella kors klövstatus i samband med klövverkning och kor med smittsamt klöveksem identifierades. Inom 0-70 dagar samlades individuella blod- och mjölkprov från korna med eksem samt från cirka 10 kliniskt friska kor i samma besättning. I 10 besättningar där smittsamt klöveksem aldrig påvisats togs blod- och mjölkprov från cirka 10 slumpmässigt utvalda kor. Från samtliga besättningar utom en togs även ett tankmjölkprov i samband med provtagningen.

Analys av prover med ELISA testsystem

För att få ett högt utbyte av proteinerna uppförkades de i en laboriestam av *E. coli*. Rekombinanta proteiner producerades med hjälp av reningssystemet "bulk GST purification module" (GE Healthcare) enligt tillverkarens instruktioner och renades fram med hjälp av en gelmassa (glutathione-sepharose). Proteinet klövs loss från gelmassan med hjälp av ett specifikt enzym och renades ytterligare genom dialys (Slide-A-Lyzer dialysis cassettes, Pierce).

De renade proteinerna användes som antigen i ELISA var för sig vilket innebar att det egentligen var 5 olika testversioner. Optimal spädning av antigen, provmaterial och andra reagenser i ELISAn utprovades med hjälp av prover från infekterade och oinfekterade kor enligt vedertagen metodik (Perlmann & Perlmann, 1994). Vid optimeringen visade det sig att ett protein, TmpA, behövde användas i så höga koncentrationer att det inte var möjligt att använda det för analys av de insamlade proverna.

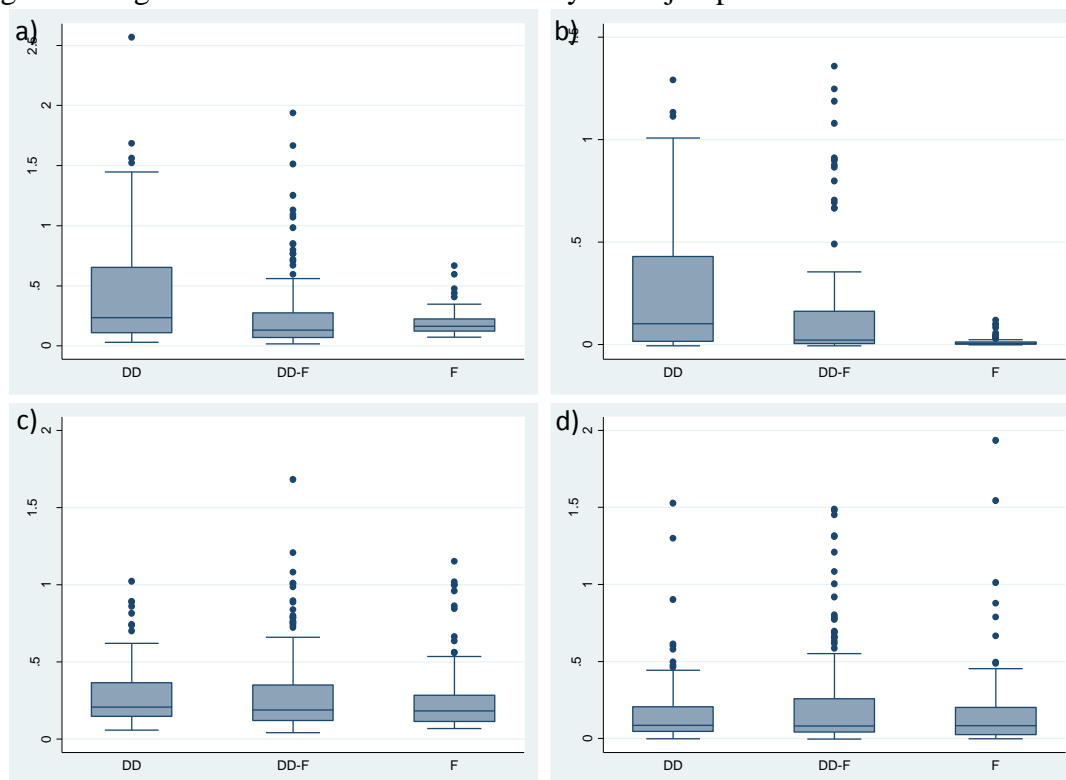
Statistisk analys av resultat

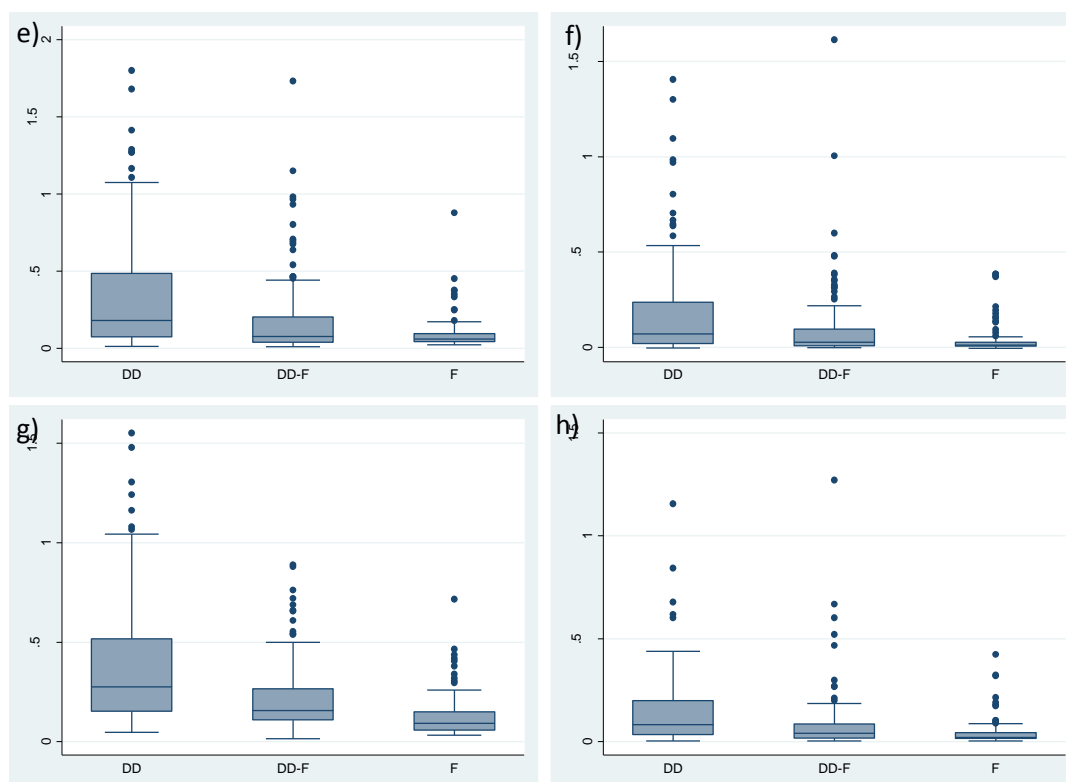
Skillnaden i antikropps nivåer mellan olika kategorier av kor testades för varje antigen (Wilcoxon rank-sum test). Testens relativa sensitivitet och specificitet jämfört med dokumenterad klövstatus beräknades (Greiner et al., 1995) och dessutom jämfördes resultaten från analys av blodprov respektive mjölkprov från samma ko. Klinisk klövstatus och individuella provresultat summerades på besättningsnivå och överensstämmelsen gentemot testresultat baserat på tankmjölksanalys beräknades. I studiens slutliga publikation kommer provresultaten även att ställas i relation till kornas ålder och ras samt besättningens klövhälsohistorik genom användning av föregående års klövhälsoregistreringar i besättningarna (Svensk Mjölks klövhälsorapport).

Resultat

Fördelning av resultat från analys med ELISA baserat på olika antigen ges i Fig. 1a-h. Kategorierna av kor som anges är kor med kliniska symptom på smittsamt klöveksem (DD), kontrollkor fria från tecken på smittsamt klöveksem från problembesättningar (DD-F), samt kor utan tecken på smittsamt klöveksem från fria besättningar där smittsamt klöveksem aldrig påvisats (F).

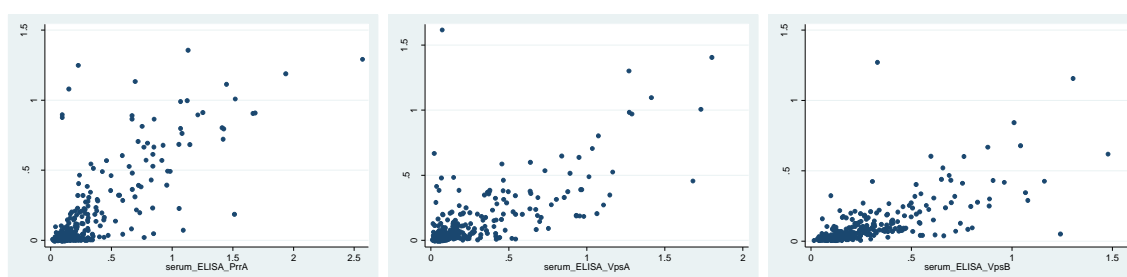
Fig. 1a-h. Testresultat från provanalys med ELISA-system baserade på fyra olika *Treponema phagidenis* antigen; a-b) PrrA, c-d) Ttm, e-f) VpsA och g-h) VpsB. Graferna visar testresultatens fördelning (y-axel) för kor med klinisk digital dermatit (DD), friska kor från besättningar med klinisk digital dermatit (DD-F) och friska kor från besättningar där digital dermatit aldrig påvisats (F). Grafer i vänstra kolumnen är resultat från analys av serum och grafer i högra kolumnen är resultat från analys av mjölkprov.





Skillnaden i antikropps nivåer mellan de tre kategorierna av kor var inte signifikant för antigenet Ttm. Därför exkluderades testresultat från ELISA baserat på Ttm från ytterligare analys. Korrelationen mellan resultat från analys av serum jämfört med resultat baserat på mjölk var 0.78 för PrrA, 0.73 för VpsA och 0.71 för VpsB ($P < 0.001$). Sambandet mellan varje individs resultat baserat på serum och mjölk visas i Fig. 2 nedan.

Fig. 2 a-c. Jämförelse av testresultat från analys av parade serumprov och mjölkprov från 365 svenska mjölkkor med och utan digital dermatit. Graferna visar resultat från versioner av ELISA-testen med a) PrrA, b) VpsA och c) VpsB som antigen.



Testernas relativa sensitivitet och specificitet var olika beroende på vilket antigen som testen baserades på och om det var serum eller mjölk som testades. Det var inte möjligt att nå både hög diagnostisk sensitivitet och hög diagnostisk specificitet i någon testversion. Den skattade relativa sensitiviteten och specificiteten för respektive testversion vid olika gränsvärden redovisas i tabell 1 och tabell 2. I tabell 1 är kategorierna i referenstesten (med andra ord klinisk status) klinisk sjuk ko (DD) och frisk ko i frisk besättning (F). I tabell 2 däremot är kategorierna i referenstesten samtliga kor från sjuka besättningar (DD och DDF) och kor från friska besättningar (F). Generellt krävdes lägre gränsvärden när testresultatet baserades på

analys av mjölk istället för serum. Huruvida serum eller mjölk gav högst testprestanda varierade mellan antigen och vilken referensgrupp som användes.

Tabell 1. Relativ sensitivitet (Se) och specificitet (Sp) för ELISA-system baserade på olika *Treponema phagidenis* antigen för analys av serum och mjölkprov från kor med och utan smittsamt klöveksem. Beräkningarna avser förmåga att diagnostisera kor med klinisk digital dermatit som sjuka (positivt testresultat) och friska kor i fria besättningar som friska (negativt testresultat).

Antigen	Sample type	Performance limit	Cut-off	Se	Sp
PrrA	Serum	Se >95%	0.046	95.2	0.0
		Se≈Sp	0.174	60.0	60.3
		Sp >95%	0.427	32.4	96.0
	Milk	Se >95%	-0.002	97.0	0.0
		Se≈Sp	0.013	77.9	76.5
		Sp >95%	0.057	56.5	95.9
VpsA	Serum	Se >95%	0.023	95.2	1.0
		Se≈Sp	0.087	71.0	71.7
		Sp >95%	0.358	33.8	96.0
	Milk	Se >95%	0.002	95.4	10.2
		Se≈Sp	0.022	71.8	71.4
		Sp >95%	0.219	26.7	95.9
VpsB	Serum	Se >95%	0.079	95.2	41.4
		Se≈Sp	0.151	75.9	75.8
		Sp >95%	0.408	33.1	96.0
	Milk	Se >95%	0.010	95.4	5.1
		Se≈Sp	0.040	72.5	72.5
		Sp >95%	0.193	26.7	95.9

Tabell 2. Relativ sensitivitet (Se) och specificitet (Sp) för ELISA-system baserade på olika *Treponema phagidenis*-like antigen för analys av serum och mjölkprov från kor med och utan digital dermatit. Beräkningarna avser förmåga att diagnostisera kor från besättningar med klinisk dermatit som sjuka (positivt testresultat) och kor från fria besättningar som friska (negativt testresultat).

Antigen	Sample type	Performance limit	Cut-off	Se	Sp
PrrA	Serum	Se >95%	0.039	95.2	0.0
		Se≈Sp	0.165	51.6	51.5
		Sp >95%	0.407	23.4	95.0
	Milk	Se >95%	-0.002	95.9	0.0
		Se≈Sp	0.011	72.3	72.3
		Sp >95%	0.057	48.7	95.9
VpsA	Serum	Se >95%	0.020	95.2	0.0
		Se≈Sp	0.078	61.5	61.6
		Sp >95%	0.352	25.1	95.0
	Milk	Se >95%	0.002	95.9	10.2
		Se≈Sp	0.018	65.5	65.3
		Sp >95%	0.218	19.5	95.9
VpsB	Serum	Se >95%	0.061	95.2	28.3

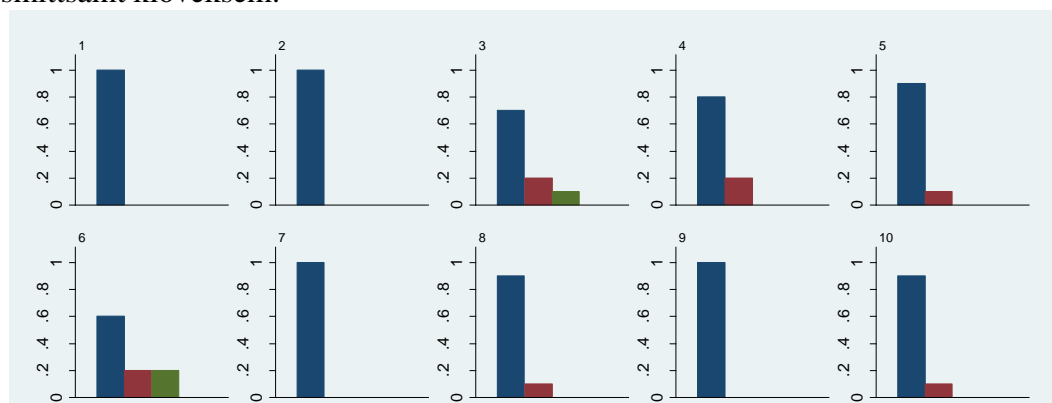
	Se≈Sp	0.143	66.7	66.7
	Sp >95%	0.382	25.1	95.0
Milk	Se >95%	0.008	95.1	2.0
	Se≈Sp	0.034	66.3	66.3
	Sp >95%	0.193	16.9	95.9

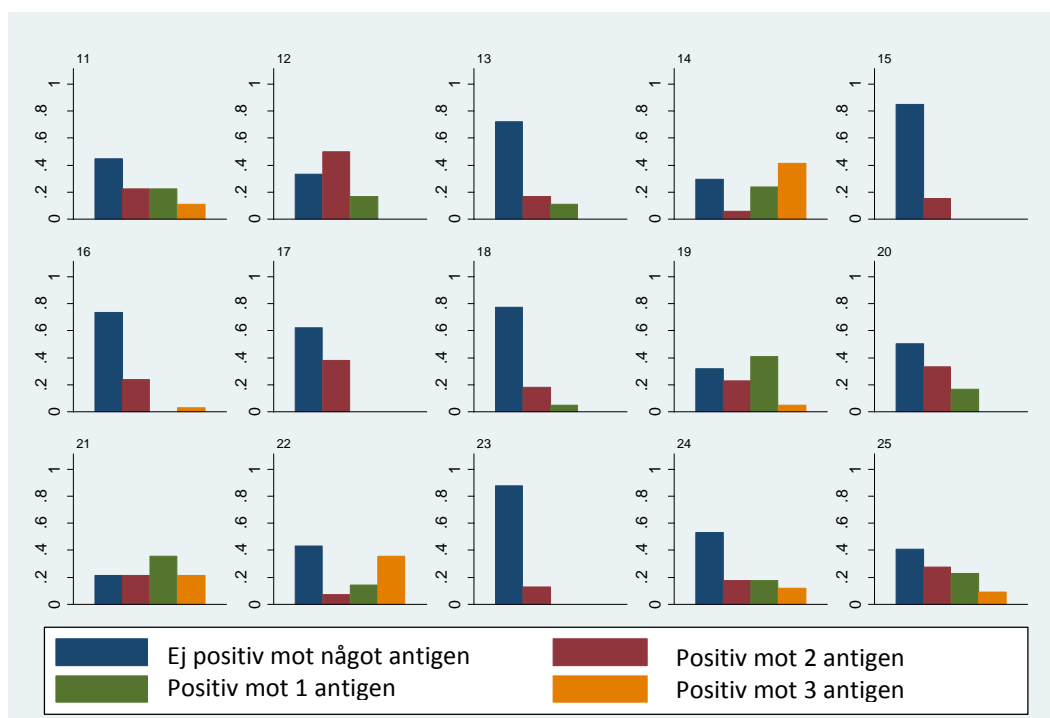
Kombinationer av testresultaten från testversionerna baserade på PrrA, VpsA och VpsB, med ett gränsvärde som säkerställer 95% specificitet, summeras i tabell 3 och Fig. 3 nedan.

Tabell 3. Antal kor som testade negativt eller positivt i ELISA-test baserade på tre olika *Treponema phagidenis* antigen (PrrA, VpsA, VpsB). Antalet kor för varje möjlig kombination presenteras separat för varje kategori av klinisk klövstatus (baserad på kons och besättnings kliniska status).

Test result PrrA/VpsA/VpsB	DD		DD-F		F	
	#	%	#	%	#	%
+ / + / +	17	11.7	6	4.1	0	0.0
+ / + / -	6	4.1	4	2.7	1	1.0
+ / - / +	9	6.2	4	2.7	0	0.0
- / + / +	14	9.7	4	2.7	2	2.0
+ / - / -	17	11.7	7	4.8	4	4.0
- / + / -	12	8.3	10	6.8	2	2.0
- / - / +	13	9.0	6	4.1	3	3.0
- / - / -	57	39.3	105	71.9	87	87.9
Total	145		146		99	

Fig 3. Besättningsvis summering av andelen kor som testat positivt mot 0, 1, 2 eller 3 antigen, när ett cut-off som säkerställer 95% specificitet har tillämpats i samtliga testversioner. Besättningar 1-10 (besättningsnummer anges överst till vänster i varje graf) är besättningar där smittsamt klöveksem aldrig påvisats, medan besättningar 11-25 är besättningar med smittsamt klöveksem.





Tankmjölksprover från 24 av 25 besättningar fanns tillgängliga för analys. Samtliga fria besättningar hade ELISA-resultat <0.100 i samtliga testversioner (PrrA, VpsA, och VpsB). Bland besättningarna med kliniskt påvisad digital dermatit fanns tre besättningar (besättningsnummer 15, 18 och 23 i Fig. 3 ovan) som hade så låga tankmjölksvärden. Resterande 12 fallbesättningar hade tankmjölksresultat >0.100 i minst en testversion. På besättningsnivå, baserat på det begränsade antalet besättningar som ingick i studien, så motsvarar tankmjölkstestens prestanda med andra ord en kombinerad sensitivitet på 80% och en specificitet på 100%.

Diskussion

Resultaten visar att kor med smittsamt klöveksem kan utveckla mätbara antikroppar mot tre av de proteiner som prövats som antigen i det ELISA-system som vi satt upp. Det finns dock vissa kor som inte har mätbara nivåer av sådana antikroppar och det finns även ett mindre antal kor i besättningar där smittsamt klöveksem aldrig påvisats som testar positivt för en eller flera antigen. På individnivå kan testerna därför inte användas på ett sådant sätt att både diagnostisk sensitivitet och specificitet förblir hög. De största bristerna ligger i testernas sensitivitet (med andra ord testens förmåga att detektera de sjuka djuren). Testerna bör istället tillämpas med höga gränsvärden så att hög specificitet erhålls (med andra ord låg andel falskt positiva djur). Resultat baserade på analys av mjölkprover visade relativt god överensstämmelse med resultat baserade på analys av serumprover. Resultaten visar dock att olika gränsvärden bör tillämpas för serum och mjölk.

När testresultat från individuella kor summeras för varje besättning ses ett mönster av relativt hög andel kor som inte testar positivt mot något antigen i besättningar där smittsamt klöveksem aldrig påvisats. I besättningar som har kliniska problem med smittsamt klöveksem är andelen kor som testar helt negativt lägre och i regel finns flera kor som testar positivt mot 1, 2 eller till och med 3 antigen. Av de besättningar som ingick i studien så hade tre låga antikropps nivåer i tankmjölken och dessa besättningar hade även en hög andel helt

testnegativa kor. Resultaten från tankmjölkstesten och den besättningsvisa summeringen av individuella prover visade en relativt god överensstämmelse.

En konklusion av dessa resultat är att nuvarande testversioner kan användas på individuell nivå när antalet falskt positiva bör minimeras men ett större antal falskt negativa testresultat kan accepteras. Testerna är mer effektiva på besättningsnivå där svar från testversioner från de olika antigenen kombineras och resultaten summeras för hela besättningen/gruppen. På besättningsnivå finns också möjlighet att dra slutsatser baserat på analys av tankmjölksprov.

I kommande forskning bör tankmjölkstestens prestanda undersökas ytterligare genom analys av prover från ett större antal besättningar. Vi ser också ett behov av att utreda hur antikroppssvaret hos infekterade djur förändras över tid – hur snabbt antikropps nivåerna stiger efter klinisk sjukdom, hur länge antikropparna kvarstår och i vilken grad förekomst av höga antikropps nivåer kan skydda mot återfall i sjukdomen.

Publikationer

Det finns ännu inga publikationer från projektet men vi förväntar oss att ett manuskript för vetenskaplig publicering kommer att accepteras (förhoppningsvis av tidskriften *Veterinary Journal*) innan årets slut. Publikationens titel kommer att vara ”Diagnosis based on detection of antibodies in serum and bulk milk from cows with and without clinical digital dermatitis”, av författarna Frössling, Rosander, Björkman, Näslund och Pringle. Postrar med delar av resultaten har presenterats vid två konferenser: Society of Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine i Madrid 2013 och The 6TH International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans i Surrey, Storbritannien 2013.

Slutsatser (gällande nytta med råd till näringen)

Baserat på studiens resultat vet vi nu mer om möjligheten att inkludera smittsamt klöveksem i systematiska testningsprogram (t.ex. ”Säker livdjurshandel”). Forskningen har gett en god grund till att utveckla och förfinas de testsystem som tagits fram. Redan i nuläget kan tankmjölkstesten provas för screening av ett större antal prover och analys av förhöjd förekomst i vissa typer av besättningar eller delar av landet. Genom tillämpning på besättningsnivå finns även möjlighet att undersöka och uppskatta negativa effekter av smittsamt klöveksem genom jämförande av djurhälsodata från testpositiva och testnegativa besättningar.

Resultatförmedling till näringen

Preliminära resultat och posterkopior har förmedlats till referensgruppen som inkluderar representanter för Växa, Klövvårdsföreningen. Studien har presenterats i tidskriften *Husdjur* och slutresultat kommer att förmedlas till denna tidskrift under 2014.

Referenser

- Bergsten, C., Pettersson, B., 1992, The cleanliness of cows tied in stalls and the health of their hooves as influenced by the use of electric trainers. *Prev. Vet. Med.* 13, 229-238.
- Demirkan, I., Walker, R.L., Murray, R.D., Blowey, R.W., Carter, S.D., 1999, Serological evidence of spirochaetal infections associated with digital dermatitis in dairy cattle. *Vet. J.* 157, 69-77.

- Elliott, M.K., Alt, D.P., Zuerner, R.L., 2007, Lesion formation and antibody response induced by papillomatous digital dermatitis-associated spirochetes in a murine abscess model. *Infect. Immun.* 75, 4400-4408.
- Greiner, M., Sohr, D., Gobel, P., 1995, A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol. Methods* 185, 123-132.
- Hillström A., Bergsten C., 2005, Digital dermatitis - a new infectious foot disease in Swedish dairy cattle, *Svensk Vet. Tidn.* 57, 15-20.
- Hultgren, J., Bergsten, C., 2001, Effects of a rubber-slatted flooring system on cleanliness and foot health in tied dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 52, 75-89.
- Jacobsson, K., Rosander, A., Bjerketorp, J., Frykberg, L., 2003, Shotgun phage display - selection for bacterial receptors or other exported proteins. *Biol. Proced. Online.* 5, 123-135.
- Klitgaard, K., Boye, M., Cation, N., Jensen, T.K., 2008. Evidence of multiple *Treponema* phylotypes involved in bovine digital dermatitis as shown by 16S rRNA gene analysis and fluorescence in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3012-3020.
- Manske T., Hultgren J., Bergsten C. 2002. Topical treatment of digital dermatitis associated with severe heel-horn erosion in a Swedish dairy herd. *Prev Vet Med.* 53:215-231.
- Murray, R.D., Downham, D.Y., Demirkan, I., Carter, S.D., 2002, Some relationships between spirochaete infections and digital dermatitis in four UK dairy herds. *Res. Vet. Sci.* 73, 223.
- Nordhoff, M., Moter, A., Schrank, K., Wieler, L.H., 2008. High prevalence of treponemes in bovine digital dermatitis-a molecular epidemiology. *Vet. Microbiol.* 131, 293-300.
- Perlmann, H., Perlmann, P. (1994). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. San Diego, CA, Academic Press, Inc., 322-328.
- Pringle, M., Bergsten, C., Fernström, L.-L., Höök, H., Johansson, K.-E., 2008, Isolation and characterization of *Treponema phagedenis*-like spirochetes from digital dermatitis lesions in Swedish dairy cattle. *Acta Vet. Scand.* 50:40.
- Rosander, A., Guss, B., Frykberg, L., Björkman, C., Näslund, K., Pringle, M., 2011, Identification of immunogenic proteins in *Treponema phagedenis*-like strain V1 from digital dermatitis lesions by phage display. *Vet Microbiol.* 153:315-322.
- Vink, W.D., Jones, G., Johnson, W.O., Brown, J., Demirkan, I., Carter, S.D., French, N.P., 2009, Diagnostic assessment without cut-offs: application of serology for the modelling of bovine digital dermatitis infection. *Prev. Vet. Med.* 92, 235-248.
- Walker, R.L., Read, D.H., Loretz, K.J., Hird, D.W., Berry, S.L., 1997, Humoral response of dairy cattle to spirochetes isolated from papillomatous digital dermatitis lesions. *Am. J. Vet. Res.* 58, 744-748.
- Wilson-Welder, J.H., Elliott, M.K., Zuerner, R.L., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stanton, T.B., 2013, Biochemical and molecular characterization of *Treponema phagedenis*-like spirochetes isolated from a bovine digital dermatitis lesion. *BMC Microbiol.* 13:280. doi: 10.1186/1471-2180-13-280.
- Yano, T., Moe, K.K., Yamazaki, K., Ooka, T., Hayashi, T., Misawa, N., 2009. Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. *Vet Microbiol.* 143, 352-62.
- Zuerner, R.L., Heidari, M., Elliott, M.K., Alt, D.P., Neill, J.D., 2007, Papillomatous digital dermatitis spirochetes suppress the bovine macrophage innate immune response. *Vet. Microbiol.* 125, 256-264.