

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**DERMATITE DIGITAL BOVINA: ETIOLOGIA, RESERVATÓRIOS E  
ROTAS DE TRANSMISSÃO**

**LEANDRO SILVA DE ANDRADE**

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**DERMATITE DIGITAL BOVINA: ETIOLOGIA, RESERVATÓRIOS E  
ROTAS DE TRANSMISSÃO**

**LEANDRO SILVA DE ANDRADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Elias Jorge Facury Filho

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2017**

A553d

Andrade, Leandro Silva de, 1986-  
Dermatite digital em vacas: etiologia, reservatórios e rotas de transmissão / Leandro  
Silva de Andrade. - 2017.  
62 p. : il.

Orientador: Elias Jorge Facury Filho  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Vaca - Doenças - Teses. 2. Casco de animais - Doenças - Teses. 3. Claudicação  
em bovino - Teses. I. Facury Filho, Elias Jorge. II. Universidade Federal de Minas Gerais.  
Escola de Veterinária. III. Título.

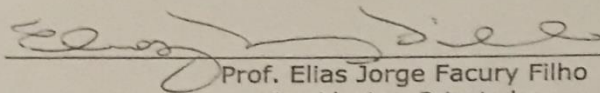
CDD - 636.208 967

## FOLHA DE APROVAÇÃO

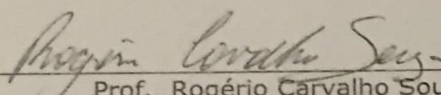
**LEANDRO SILVA DE ANDRADE**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

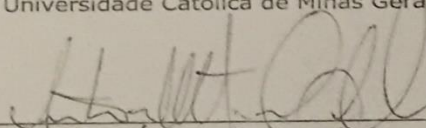
Aprovada em 06 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

  
\_\_\_\_\_

Prof. Elias Jorge Facury Filho  
Presidente - Orientador

  
\_\_\_\_\_

Prof. Rogério Carvalho Souza  
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC - Minas

  
\_\_\_\_\_

Prof. Antônio Último de Carvalho  
Escola de Veterinária - UFMG

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a presente dissertação aos meus pais, Alfredo e Glauca, a minha namorada Anamaria e a minha avó Mercedes por todo incentivo e apoio, sem vocês não seria possível chegar até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tudo que tem me proporcionado e promovido em minha vida.

Aos meus pais Alfredo e Glaucia pelo amor, carinho, dedicação e luta constante para que eu chegasse até aqui.

Aos meus orientadores Professor Elias e Professor Ultimo pela amizade, pelos muitos ensinamentos e oportunidades de aprendizado que tanto contribuíram e contribuem para minha formação. Além de serem para mim, exemplos de pessoa e profissional.

A minha namorada Anamaria por toda ajuda, dedicação, paciência, amizade e por ter me ensinado a amar e ser amado.

A minha avó Mercedes por todo carinho e orações.

Aos professores Rodrigo e Gustavo pela amizade, ensinamentos e correções.

Aos professores da PUC Minas Rogério e Rafahel pela amizade e por estarem sempre contribuindo na minha formação como profissional.

A todos os amigos da Escola de Veterinária em especial o Tiago e Guilherme por toda ajuda e colaboração. Sem vocês esse trabalho não seria realizado.

Ao Filipe por toda a ajuda na análise estatística

A todos os funcionários da fazenda de Igarapé pela ajuda.

A todos os estagiários que passaram pela escola e sempre estavam dispostos a colaborar.

---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO.....</b>	<b>14</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
3.1	DERMATITE DIGITAL.....	17
3.2	TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU ( <i>FISH</i> ) E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.....	19
3.3	ROTAS DE TRANSMISSÃO DA DERMATITE DIGITAL E MICROBIOMAS ENCONTRADOS NO AMBIENTE, FLUIDO RUMINAL E FEZES DE BOVINOS.....	20
3.4	MICROBIOMAS ENCONTRADOS NAS VÁRIAS FASES DA LESÃO DE DERMATITE DIGITAL E NA PELE SAUDÁVEL.....	22
3.5	EPIDEMIOLOGIA DERMATITE DIGITAL.....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1	LOCAL E PERÍODO DO EXPERIMENTO.....	27
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	27
4.3	MANEJO DOS ANIMAIS.....	27
4.4	MANEJO NUTRICIONAL.....	27
4.5	COLETA DE MATERIAL NAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL.....	28
4.6	COLETA DE FLUIDO RUMINAL E FEZES.....	28
4.7	AMOSTRAS DE AMBIENTE.....	29
4.8	HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU ( <i>FISH</i> ).....	29
4.9	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.....	29
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
5.1	MICROBIOMAS ENCONTRADOS EM LESÕES DE DERMATITE DIGITAL POR ANÁLISE DE <i>FISH</i> .....	37
5.2	DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS DIFERENTES BACTERIAS ENCONTRADAS NAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL PELO MÉTODO DE <i>FISH</i> .....	39
5.3	MICROBIOMA ENONTRADO NAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.....	42
5.4	MICROBIOMAS ENCONTRADOS NO RÚMEN E NAS FEZES DE VACAS LEITEIRAS PORTADORAS DE DERMATITE DIGITAL PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.....	44
5.5	MICROBIONA ENCONTRADOS NO AMBIENTE.....	45
5.6	ASSOCIAÇÃO ENTRE AS BACTÉRIAS PESQUISADAS PELO MÉTODO DE <i>FISH</i> EM LESÕES DE DERMATITE DIGITAL.....	45
5.7	CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL E MICROBIOMA ENCONTRADO NA PELE ÍNTEGRA.....	46
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
6.1	MICROBIOMAS ENCONTRADOS NAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL.....	49

6.2	MICROBIOMAS ENCONTRADOS NO RÚMEN E FEZES DE VACAS LEITEIRAS.....	50
6.3	TREPONEMAS ENCONTRADOS NO AMBIENTE.....	51
6.4	MICROBIOMAS ENCONTRADOS NAS VÁRIAS FASES DA DERMATITE DIGITAL E NA PELE ÍNTEGRA.....	51
<b>7.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>
10.1	CERTIFICADO NO PROJETO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/UFMG.....	63

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 -	Coleta de amostras de biópsias de Dermatite Digital e pele íntegra em cortes histológicos analisadas pelo método de <i>FISH</i> .....	30
Tabela 2 -	Coleta de amostras de biópsia de Dermatite Digital, fluido ruminal, fezes, ambiente e pele íntegra analisadas pela técnica de sequenciamento de nova geração probes V1 e V2 e probes V3 e V4.....	30
Tabela 3 -	Frequência bacteriana e seus escores de densidade pelo método de <i>FISH</i> em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=31), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	34
Tabela 4 -	Comparação entre frequências de identificação bacterianas pelo método de <i>FISH</i> em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital analisado pelo método exato de <i>Fisher</i> .....	34
Tabela 5 -	Comparação entre frequências de escore de densidade 3 entre bactérias pelo método de <i>FISH</i> em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital analisado pelo método exato de <i>Fisher</i> .....	35
Tabela 6 -	Frequência de filotipos de <i>Treponemas</i> e seus escores de densidade pelo método de <i>FISH</i> em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em MG, Brasil.....	36
Tabela 7 -	Comparação entre frequências de identificação de filotipos de <i>Treponema</i> pelo método de <i>FISH</i> em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital analisado pelo método exato de <i>Fisher</i> .....	37
Tabela 8 -	Comparação entre frequências de identificação de escore de densidade 3 de filotipos de <i>Treponema</i> pelo método de <i>FISH</i> em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital analisado pelo método exato de <i>Fisher</i> .....	37
Tabela 9 -	Distribuição espacial das bactérias pelo método de <i>FISH</i> , em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=31), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	38
Tabela 10 -	Distribuição espacial dos filotipos de <i>Treponema</i> pelo método de <i>FISH</i> , em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	38
Tabela 11 -	Número de leituras de sequências de DNA realizadas nas amostras de rúmen, fezes e lesão de Dermatite Digital com identificação do gênero pela técnica de sequenciamento de nova geração probes V1 e V2.....	39
Tabela 12 -	Número de leituras de sequências de DNA nas amostras de ambiente, rúmen, fezes e lesão de Dermatite Digital com identificação dos filotipos pela técnica de sequenciamento de nova geração probes V3 e V4.....	39

Tabela 13 - Bactérias encontradas em maiores proporções no microbioma de lesões de Dermatite Digital pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2 (n=35), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	40
---	----

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 -	<i>Treponemas</i> vistos em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital pelo método de <i>FISH</i> de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	32
Figura 2 -	<i>Dichelobacter nodosus</i> vistos em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital pelo método de <i>FISH</i> de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	32
Figura 3 -	<i>Fusobacterium necrophorum</i> visto em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital pelo método de <i>FISH</i> de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	33
Figura 4 -	<i>Porphyromonas levii</i> visto em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital pelo método de <i>FISH</i> de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	33
Figura 5 -	Frequência bacteriana e seus escores de densidade pelo método de <i>FISH</i> em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=31), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	34
Figura 6 -	Frequência de filotipos de <i>Treponemas</i> e seus escores de densidade pelo método de <i>FISH</i> em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em MG, Brasil.....	36
Figura 7 -	Distribuição espacial das bactérias e filotipos de <i>Treponema</i> pelo método de <i>FISH</i> , em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital, de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	39
Figura 8 -	Bactérias encontradas nas lesões de Dermatite Digital pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2 (n=35), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	40
Figura 9 -	<i>Treponemas</i> encontradas nas lesões de Dermatite Digital pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V3 e V4 (n=24), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	41
Figura 10 -	Comparação da frequência <i>Treponemas</i> , <i>D. nodosus</i> , <i>F. necrophorum</i> e <i>P. levii</i> encontradas em lesões de Dermatite Digital pelo método de <i>FISH</i> e sequenciamento de nova geração, de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	42
Figura 11 -	Bactérias encontradas no rúmen pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2 (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	42

Figura 12 - Bactérias encontradas nas fezes pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2 (n=13) de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	43
Figura 13 - <i>Treponemas</i> encontrados no rúmen pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V3 e V4 (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	43
Figura 14 - <i>Treponemas</i> encontrados nas fezes pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V3 e V4 (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	44
Figura 15 - <i>Treponemas</i> encontradas no ambiente pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V3 e V4 em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	45
Figura 16 - Microbiomas encontrados nas fases M1, M2 e M3 da Dermatite digital pela técnica de sequenciamento de nova geração probes V1 e V2 (n=35), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.....	46

## ABREVIATURAS

CEUA- Comissão de Ética de Experimentação Animal  
DD – Dermatite Digital  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
DTU - Universidade Técnica da Dinamarca  
EUA – Estados Unidos da América  
*FISH* – Hibridização Fluorescente in Situ  
FITC – Isotiocianato de fluoresceína  
Kg – Quilograma  
LPS- Lipopolissacarídeos  
ML- Mililitros  
N- Número  
NRC – *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
RNA – Ácido ribonucleico  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
US\$ - Dólar  
USDA – Sistema de Monitoramento Nacional de Saúde Animal dos Estados Unidos

## RESUMO

A Dermatite Digital (DD) é uma das principais doenças do sistema locomotor de bovinos que leva os animais a claudicação e apesar de bactérias do gênero *Treponema* serem consistentemente identificados em tecidos lesionados pela DD, a etiologia definitiva dessa doença polimicrobiana ainda não foi totalmente compreendida. Para tentar elucidar a etiologia dessa doença e suas possíveis rotas de transmissão dentro de uma propriedade leiteira, foram realizadas 37 biópsias de animais acometidos pela DD e foram coletadas 13 amostras de fluido ruminal e 13 amostras de fezes de vacas portadoras dessa lesão. Amostras ambientais de áreas específicas da propriedade também foram coletadas, como o material acumulado ao redor do bebedouro, pista de alimentação, sala de espera da ordenha, lava-pés e pedilúvio e para comparar o microbioma encontrado nas lesões com a pele sadia, foram realizadas três biópsias de pele íntegra localizadas adjacentes a lesão. Para análise dos microbiomas da DD e pele íntegra foram utilizadas as técnicas moleculares de Hibridização Fluorescente *in Situ* (FISH) e sequenciamento de nova geração e as amostras de fluido ruminal, fezes e ambiente foram analisadas pelo método de sequenciamento de nova geração. Foi encontrado pela técnica de FISH a presença bacteriana em 96,55% das lesões e as bactérias do gênero *Treponema* foram as mais frequentes, estando presentes em 93,55%. Já *Dichelobacter nodosus* estava presente em 58,06%; *Fusobacterium necrophorum* em 35,49% e *Porphyromonas levii* em 33,43%. As bactérias do gênero *Treponema* foram as que tiveram maior densidade nas amostras analisadas, seguidas por *Dichelobacter nodosus*; *Fusobacterium necrophorum* e *Porphyromonas levii*. Foram identificados sete filotipos diferentes nas amostras de DD: *T. pedis*, *T. refringes*, *T. phagedenis*, *T. medium* e alguns filotipos que não foram previamente cultivados e foram classificados nesse estudo como: PT18, PT13 e PT3, sendo *T. phagedenis* e *T. pedis* as espécies encontradas em maiores densidades nas lesões. Pela técnica de sequenciamento de nova geração os *Treponemas* estavam presentes em 68,6% das lesões, *Porphyromonas* em 91,4%, *Mycoplasma* em 85,7%, *Helcococcus* em 74,4%, *Corynebacterium* em 60%, *Fusobacterium* em 45,7%, *Dichelobacter* em 40%, e *Alloiococcus* em 17,1% e também foi encontrado filotipos que ainda não foram previamente identificados pela literatura. Nas amostras de fluido ruminal, fezes e ambiente foram encontrados *Treponemas*, mas em baixas proporções e dentre os *Treponemas* encontrados nesses locais os mais prevalentes ainda são desconhecidos pela literatura. Os dados encontrados nesse estudo apoiam o conceito de que a etiologia da DD é principalmente “multitreponemal” e polimicrobiana, onde vários agentes, podem agir sinergicamente com os *Treponemas* para causar a lesão de DD. As bactérias do gênero *Treponema* foram também encontradas no rúmen, fezes e amostras ambientais da propriedade, principalmente *Treponemas* que ainda não foram classificados pela literatura. Sugerindo que a microbiota do trato gastrointestinal e o ambiente da fazenda podem atuar como reservatórios de bactérias envolvidas na patogênese da DD. É necessária uma maior investigação sobre o real potencial da função do trato gastrointestinal como um reservatório para agentes patogênicos que levam ao desenvolvimento da lesão.

Palavras-Chave: Dermatite Digital, etiologia, microbioma.

## ABSTRACT

Digital Dermatitis (DD) is one of the major diseases of the bovine locomotor system that leads animals to claudication and although bacteria of the genus *Treponema* are consistently identified in DD-damaged tissues, the definitive etiology of this polymicrobial disease has not yet been fully understood. In order to elucidate the etiology of this disease and its possible transmission routes within a dairy farm, 37 biopsies of animals affected by DD were performed and 13 samples of rumen fluid and 13 samples of cows' feces were collected. Specific areas of the property were also collected, such as the material accumulated around the drinking fountain, feeding lane, milking waiting room, footwash and footbath and to compare the microbiome found in lesions with healthy skin, three biopsies of Skin lesions adjacent to the lesion. For the analysis of the microbiomas of DD and whole skin, the in situ Fluorescent Hybridization (FISH) molecular techniques and new generation sequencing were used, and the ruminal fluid, feces and environment samples were analyzed by the new generation sequencing method. The bacterial presence was found in the FISH technique in 96.55% of the lesions and the bacteria of the genus *Treponema* were the most prevalent, being present in 93.55%. *Dichelobacter nodosus* was present in 58.06%; *Fusobacterium necrophorum* in 35.49% and *Porphyromonas levii* in 33.43%. The bacteria of the genus *Treponema* were the ones that had higher density in the analyzed samples, followed by *Dichelobacter nodosus*; *Fusobacterium necrophorum* and *Porphyromonas levii*. There were seven different phylotypes in DD samples: *T. pedis*, *T. refringes*, *T. phagedenis*, *T. medium* and some phylo- types that were not previously cultivated and were classified in this study as: PT18, PT13 and PT3, being *T. phagedenis* and *T. pedis* species found in higher densities in the lesions. By the new generation sequencing technique *Treponemes* were present in 68.6% of the lesions, *Porphyromonas* in 91.4%, *Mycoplasma* in 85.7%, *Helicococcus* in 74.4%, *Corynebacterium* in 60%, *Fusobacterium* in 45.7% %, *Dichelobacter* in 40%, and *Alloiococcus* in 17.1%, and phylotypes were also found that were not previously identified in the literature. In the samples of ruminal fluid, feces and environment *Treponemas* were found, but in low proportions and of the *Treponemas* found in these places the most prevalent ones are still unknown in the literature. The data found in this study support the concept that the etiology of DD is mainly "multitreponemal" and polymicrobial, where several agents may act synergistically with *treponemas* to cause DD injury. Bacteria of the genus *Treponema* were also found in the rumen, feces and environmental samples of the property, mainly *Treponemas* that have not yet been classified in the literature. We suggest that the microbiota of the gastrointestinal tract and the environment of the farm can act as reservoirs of bacteria involved in the pathogenesis of DD. Further research is needed on the actual potential of gastrointestinal tract function as a reservoir for pathogens that lead to the development of the lesion.

Key words: Digital dermatitis, etiology, microbioma.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas os problemas relacionados às patologias dos pés dos bovinos adquiriram uma importância crescente na bovinocultura, sendo em muitos casos, um dos principais entraves econômicos ao seu desenvolvimento (Ferreira, 2003). Os problemas do sistema locomotor, de glândula mamária e reprodutivos são os mais prevalentes dentro dos sistemas de produção, resultando nas maiores perdas econômicas dentro da pecuária leiteira (Whay et al, 2003). Tais perdas relacionam-se a queda na produção de leite, aumento do descarte involuntário, perda de peso, diminuição da fertilidade e diminuição da longevidade dos animais no rebanho (Green, 2002). Além disso, o comportamento das vacas mancas também é afetado, uma vez que vacas claudicantes permanecem por mais tempo deitadas, comem menos e não conseguem competir por alimento no cocho (Hassal et al, 1992).

Em relação as perdas econômicas, Souza (2005) encontrou um custo total de US\$5.269,00 em um rebanho de 100 vacas em lactação decorrente das afeções locomotoras, sendo o custo por tratamento de US\$95,08 por animal. A redução média da produção foi de 9,3Kg de leite/animal/dia, além das perdas com produção observou-se um aumento no período de serviço de 65 dias e uma incidência de 31% a mais nos casos de mastite. Esses resultados são semelhantes aos observados por Ferreira (2003) que encontrou um custo de US\$ 5.005,23 para um rebanho de 117 vacas em lactação, sendo US\$ 44,68 representando o custo por animal tratado. Bruijnjs et al (2010) ao avaliarem 65 vacas claudicantes encontraram um custo total de US\$ 4.899 por ano, sendo US\$ 75 por vaca tratada com casos clínicos de manqueira. Apesar dos avanços no conhecimento das práticas de controle e tratamento das doenças podais, a sua frequência não diminuiu ao longo dos anos, pelo contrário, aparentemente vem aumentando e hoje atinge prevalências preocupantes (Leach et al, 2010; Casagrande, 2013)

As explorações leiteiras no Brasil são predominantemente dos sistemas semi-intensivo, com rendimento médio de leite de até 20 litros por vaca dia. Neste tipo de sistema, mesmo os animais passando a maior parte do dia em piquetes, a claudicação pode atingir prevalências elevadas (Molina et al, 1999; Souza, 2002;). Devido ao aumento de produção e especialização em raças leiteiras, fazendas com sistemas a pasto, muitas vezes, acabam mudando para sistemas confinados, nos quais é possível atingir maiores produções individuais. Porém, em rebanhos confinados, a incidência de claudicação é ainda superior aos sistemas a pasto e pode até mesmo tornar a atividade inviável (Ferreira, 2003; Barker et al, 2010). Vários fatores estão envolvidos na etiologia das enfermidades podais dos bovinos, como a predisposição genética, especialmente aprumos e ângulos dos dígitos, meio ambiente, higiene, umidade, conforto das instalações, composição da dieta e manejo nutricional, nível de produção dos animais e fase da lactação, estado do piso dos currais e da sala de ordenha, trilhas por onde os animais passam, pastagens, concentração de animais por área, exercícios excessivos, doenças concomitantes, estação do ano, manejo geral e agentes infecciosos (Dirksen e Stöber, 1981; Corbellini, 1994).

A dermatite digital (DD) é uma das principais doenças do sistema locomotor de bovinos que leva os animais a claudicação e apesar de mais de 35 anos de pesquisa sobre essa doença muitas dúvidas ainda permanecem a respeito da sua etiologia, transmissão e prevenção (Krull et al, 2014). Dada a importância e alta prevalência dessa patologia na bovinocultura de leite, uma melhor compreensão de quais bactérias são realmente responsáveis por iniciar e avançar o desenvolvimento da lesão precisa ser esclarecida. Precisa também ser compreendido como esses agentes conseguem ser tão bem-sucedidos e infectar vários animais em diferentes tipos de exploração leiteira, com diferentes formas de manejo e ambiência (Evans et al, 2012; Klitgaard

et al, 2013; Nielsen et al, 2016). Como a maioria das bactérias relacionadas à lesão de DD são extremamente difíceis de fazer cultura, as técnicas moleculares como a Hibridização Fluorescente *in Situ* (FISH) e o sequenciamento de nova geração são essenciais para elucidar a etiologia dessa doença (Evans et al, 2008; Wilson-Welder et al, 2015).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a etiologia, rotas de transmissão e reservatórios dos principais patógenos relacionados à DD.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as bactérias presentes nas lesões de DD.
- Identificar os principais locais do ambiente que servem como reservatórios de *Treponema* e que atuam como possíveis focos de infecção para a DD.
- Identificar se o fluido ruminal e as fezes dos bovinos atuam como reservatórios para bactérias associadas a DD.
- Relacionar as bactérias encontradas nas lesões com as bactérias identificadas no ambiente, fluido ruminal e fezes.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 DERMATITE DIGITAL

A Dermatite digital (DD) é descrita por vários autores como a principal causa de claudicação em bovinos leiteiros em todo o mundo (Rasmussen et al, 2012; Santos et al, 2012; Nielsen et al, 2016). Foi primeiramente descrita na cidade de Povalley, região norte da Itália em 1974 por Cheli e Mortellaro em vacas Friesian (Cheli e Mortellaro, 1974). Já nos Estados Unidos (EUA) foi relatada pela primeira vez por Rebhum (1980) em Nova York e rapidamente se espalhou para vários estados da América (Read e Walker, 1998). No Reino Unido a primeira descrição foi realizada por Blowey e Sharp (1988) e no Brasil apesar de ser conhecida desde o início da década 90, ocorreram poucas tentativas de se descrever os possíveis agentes patogênicos envolvidos na lesão (Borges et al, 1992; Nascimento et al, 2015). Dessa forma a DD se tornou um problema crescente em vários países do mundo, tornando-se a principal patologia dos pés dos bovinos (Klitgaard et al, 2014). É também conhecida como doença de Mortellaro, verruga do talão, papilomatose interdigital, calcanhar em amora e caracteriza-se por uma inflamação superficial contagiosa da epiderme próxima à margem coronariana no espaço interdigital, entre os talões palmar/plantar ou dorsal, podendo ser extremamente dolorosa. A sua fase de cura é caracterizada por uma crosta seca, indolor e firmemente aderida à pele saudável subjacente. A severidade das lesões pode levar o animal a claudicar por semanas e pisar nas pinças dos cascos (Fajt e Apley, 2001; Reffai et al, 2013; Palmer e O'Connell, 2015).

Segundo Souza (2005), as lesões provocadas pela DD podem ser classificadas macroscopicamente em três formas: hiperplásica (grau 1), ulcerativa e proliferativa (grau 2) ou papilomatosa (grau 3). Outras formas de classificação também são descritas na literatura, Dopfer et al. (1997) classifica a DD de M1 a M4.1, sendo M1 uma lesão ulcerativa em estágio inicial (0-

2 cm de diâmetro) que não é doloroso à palpação; M2 é a fase ulcerativa clássica com um diâmetro maior que 2 cm muitas vezes doloroso à palpação; M3 é a fase de cura com uma lesão coberta por uma crosta; M4 é a fase crônica caracterizada por hiperqueratose ou proliferação de superfície que geralmente não é dolorosa e M4.1 descreve uma lesão crônica com uma pequena área de ulceração. Refaai et al. (2015) encontraram aumentos significativos da espessura da epiderme nas fases M2, M3 e M4 e as fases M3 e M4 também foram caracterizadas por um grande aumento de queratina.

Souza (2005) realizou exames histopatológicos de 60 vacas com DD em diferentes graus, nas lesões hiperplásicas os achados predominantes foram uma intensa hiperqueratose e vacuolização centrocelular na epiderme. Nas formas ulcerativas verificou-se descontinuidade e erosão do estrato córneo com áreas de degenerações vacuolares e necrose, além de hemorragias com células inflamatórias, predominantemente neutrofílicas. Nos casos classificados como proliferativa, visualizou-se epiderme espessada, com formações papilares bastante pronunciadas, passando pelo estrato espinhoso, até o estrato córneo com permeio de células inflamatórias. Nas lesões de grau três, foi descrito na zona papilar a presença de infiltrado inflamatório e edema perivascular. Castro et al. (2008) realizaram um estudo em dez propriedades no Estado de Goiás, todas de exploração leiteira e utilizaram 40 fêmeas bovinas que foram divididas em quatro grupos, sendo dez animais em cada grupo. O grupo I era composto de animais clinicamente saudáveis, denominado grupo-controle e os grupos II, III e IV eram compostos de animais que apresentavam lesões de DD na fase inicial, erosiva e proliferativa, respectivamente. No grupo II, na avaliação histopatológica foi observado espessamento do estrato córneo, necrose tecidual, hiperplasia, acantose, espondilose e hiperqueratose. No grupo III, observou-se a presença de hiperemia, úlcera, tecido de granulação, hemorragia e, microscopicamente espessamento da camada córnea, paraqueratose e necrose multifocal. No grupo IV, lesões com aspecto verrucoso, presença de pelos, projeções papilares e ao exame histopatológico, destruição da camada córnea e da epiderme com necrose tecidual em todas as amostras do grupo.

Quanto ao curso e duração da doença, Rebhun et al. (1980) observaram um curso médio de 14 a 21 dias entre as mudanças de fase da DD em seus estudos. Já Krull et al. (2014) encontraram uma média de 135 dias para a DD mudar de fase, com lesões permanecendo no mesmo estágio por até dois anos ou mais. Somers et al. (2005) mostraram que as lesões ulcerativas (fase M2) podem persistir por longos períodos no animal, podendo chegar até meses, naqueles animais que não foram submetidos ao tratamento. Souza (2005) observou que lesões de grau 1 demoraram em média 28 dias até assumirem a forma 2, que por sua vez demandaram em média 45 dias para atingir o grau 3. Essas lesões em diferentes estágios clínicos podem coexistir em um mesmo animal (Nascimento et al, 2015). Losinger (2006) demonstrou que algumas espécies de *Treponema* podem causar imunossupressão de macrófagos e prejudicar não só a resposta imune inata, mas também a reparação da lesão, explicando em parte a progressão e persistência da doença.

A DD é uma doença polimicrobiana com predomínio de bactérias do gênero *Treponema*. Outras bactérias também foram identificadas, entre elas o *Fusobacterium necrophorum*, *Dichelobacter nodosus* e *Porphyromonas levii*. (Klitgaard et al, 2008; Rasmussen et al, 2012; Karlsson et al, 2014; Wilson-Welder et al, 2015; Nielsen et al, 2016). Porém, o papel das diferentes espécies de bactérias encontradas na etiologia da DD ainda é desconhecido (Berry et al, 2012; Nielsen et al, 2016). As evidências indicam um papel importante das espiroquetas, especialmente do gênero *Treponema* na etiologia da DD, pois representam o grupo de bactérias mais abundante, principalmente nas partes mais profundas das lesões, sugerindo que eles são patógenos invasivos

e não simplesmente colonizam o tecido infectado (Klitgaard et al, 2013; Nielsen et al, 2016). *Treponemas* são as únicas bactérias que tem uma presença consistente no envolvimento das lesões de DD e é uma doença principalmente bacteriana pela melhora ou cura clínica da lesão em resposta ao uso de antimicrobianos (Evans et al, 2008; Apley, 2015).

As tentativas de induzir a doença com culturas puras destas bactérias através da inoculação na pele sadia foram largamente mal sucedidas (Wilson-Welder et al, 2015) No entanto, Gomez et al. (2012) foi o único trabalho que conseguiu reproduzir a doença. Nesse estudo foi feito um macerado das lesões de DD e inoculado em animais sadios. Os membros posteriores também foram enfaixados, umedecidos e mantidos em um ambiente de anaerobiose. Após um período de 12 a 25 dias nessas condições extremas, foi reproduzido a lesão e detectado a presença de *Treponemas*.

Os *Treponemas* não estão associados apenas a DD bovina, eles também são responsáveis por doenças periodontais em seres humanos e animais, outro exemplo do envolvimento dessas bactérias são nas úlceras de pele suína e equina (Karlsson et al, 2014; Svartstrom et al, 2013). O Sistema de Monitoramento Nacional de Saúde Animal dos Estados Unidos (USDA) mostrou que mais de 50% dos casos de claudicação ocorridos em novilhas e vacas leiteiras tem como principal causa a DD e foi estimado um prejuízo anual de US\$ 190 milhões de dólares por essa doença. Determinando-se que o custo por caso clínico de DD é de US\$ 95 e quando as perdas de produção de leite e diminuição do desempenho reprodutivo foram incorporados ao cálculo, as perdas foram estimadas em US\$ 126 por caso clínico (USDA, 2009).

Vários trabalhos têm encontrado correlações entre a limpeza do ambiente e prevalência de DD. Relun et al. (2013) avaliaram 4678 vacas leiteiras em 52 propriedades na França e encontraram uma relação direta entre o escore de sujidade em vacas leiteiras e a presença de DD, ou seja, rebanhos que apresentaram animais com pernas e úberes mais sujos tiveram uma maior prevalência de DD. Palmer et al. (2013) utilizando o corante azul de metileno não encontrou diferenças significativas na permeabilidade da pele de vacas portadoras de DD e vacas sem a presença da lesão, porém quando os animais foram mantidos em condições de umidade a permeabilidade da pele foi aumentada, o que pode facilitar a entrada e colonização de bactérias.

### 3.2 TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (*FISH*) E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

A *FISH* (Hibridização Fluorescente *in Situ*) foi desenvolvida por Bauman et al. (1980) e representa uma técnica citogenética usada para detectar e localizar a presença ou ausência de determinadas sequências de DNA (ácido desoxirribonucleico) em cromossomos. Consiste em um método histoquímico que permite a visualização e identificação de microrganismos *in situ*, sem a necessidade de cultivos celulares, com visualização direta em microscópios ópticos epifluorescentes em cortes histológicos. Seu princípio básico é o anelamento da sonda com sua sequência alvo, as sondas são sequências de oligonucleotídeos complementares e específicos marcados com substâncias fluorescentes, os quais se anelam ao seu alvo, ou seja, o RNA ribossomal bacteriano. Também permite que sequências de ácidos nucleicos sejam examinadas no interior de células sem alterar sua morfologia ou integridade de seus compartimentos (Ploeg, 2000; Amann et al, 2001; Neves e Guedes, 2012).

A introdução da *FISH* proporcionou um aumento significativo da resolução, rapidez e segurança de diagnósticos. Contribuiu mais tarde para o desenvolvimento da detecção simultânea de

múltiplos alvos e a quantificação de microrganismos em um único procedimento, tornando-se rapidamente numa tecnologia aplicada tanto na biologia quanto na citogenética. Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), que permitem que um fragmento específico da molécula de DNA seja amplificado em milhares de vezes, facilitaram a detecção rápida e sensível de bactérias, independentemente de serem cultiváveis ou não. No entanto, esta técnica não oferece informações sobre a localização espacial dos microrganismos no tecido ou sua associação com a lesão (Neves e Guedes, 2012).

A técnica de sequenciamento de nova geração realiza a leitura de uma amostra de DNA e gera um arquivo eletrônico com símbolos que representam a sequência de bases nitrogenadas contidas na amostra. Primeiro o DNA é fragmentado por um processo químico, mecânico ou enzimático, de forma que todo o genoma seja coberto da maneira mais uniforme possível, posteriormente é feita uma amplificação desse DNA onde o objetivo dessa amplificação é aumentar a fonte de sinal luminoso para a maioria dos sequenciadores e gerar em um pequeno espaço físico entre milhares de cópias de cada fragmento de DNA, produzindo uma etapa de preparo da amostra. Por fim é feito o sequenciamento, onde uma série de reações químicas geram sinais que são detectados e determinarão a sequência de base analisada (Carvalho e Silva, 2010; Varuzza, 2013).

### 3.3 ROTAS DE TRANSMISSÃO DA DERMATITE DIGITAL E MICROBIOMAS ENCONTRADOS NO AMBIENTE, FLUIDO RUMINAL E FEZES DE BOVINOS

A transmissão da DD dentro dos rebanhos e entre rebanhos não é totalmente esclarecida, assim como sua patogênese, que é objeto de estudo desde 1974. Apesar de se considerar que a entrada de animais de rebanhos positivos em rebanhos negativos para DD possa aumentar as chances de transmitir a doença (Rodríguez-Lainz et al, 1999). Capion et al. (2013) utilizaram oito novilhas livres de DD e cinco novilhas com a presença da lesão. Os animais foram alojados juntos em um piso de cimento úmido com grande presença de matéria orgânica, durante oito semanas. Ao final do experimento nenhuma das novilhas livres desenvolveram a lesão de DD, sendo todas as amostras de pele saudável desses animais negativas para *Treponema* pelo método de *FISH*. Isso contradiz as observações que são feitas a campo e sugere que existem outros fatores responsáveis pela transmissão da doença (Wilson-Welder et al, 2015).

Outra possível fonte de infecção entre rebanhos é pelo material utilizado para o casqueamento. Um estudo realizado por Wells et al. (1999) observaram uma associação entre animais que foram submetidos ao casqueamento preventivo e um aumento significativo na incidência de DD. As reincidências da lesão também ocorreram em tempo mais curto nos animais casqueados quando comparados aos animais que não foram submetidos ao aparato funcional dos cascos. Sullivan et al. (2014) encontraram filotipos de *Treponema* relacionados a DD presentes no equipamento utilizado para o aparato dos cascos em fazendas de bovinos e ovinos. O material foi submetido ao exame de PCR e após o casqueamento, *Treponemas* foram encontrados em: 36/37 (97%) das amostras, sendo 23/24 (96%) do material utilizado por casqueadores de bovinos e 13/13 (100%) em materiais utilizados por casqueadores de ovinos. Isso foi reduzido para 13/37 (35%) das amostras após desinfecção do material, sendo 7/24 (29%) equipamento bovino e 06/13 (46%) equipamento de ovinos. *T. medium*, *T. vincentii*, *T. phagedenis*, *T. denticola* e *T. putidum* foram encontrados em grande parte das amostras.

Espécies *Treponema* como *T. socranskii* e *T. denticola* são associados a doença periodontal em seres humanos (Riviere et al, 1995). Também tem sido demonstrado que essas espécies de

*Treponema* podem aderir nos instrumentos odontológicos e esses instrumentos de metal podem agir como nichos para as bactérias patogênicas Gram-negativas (Nelson-Filho et al, 2011).

A transmissão entre animais dentro da mesma fazenda é ainda menos elucidada. Diferentes estudos tentaram identificar bactérias relacionadas à DD nas fezes, reto, rúmen e ambiente de animais com a presença da lesão e obtiveram resultados divergentes (Wilson-Welder et al, 2015). Vários *Treponemas* têm sido relatados por serem da microbiota comensal dos bovinos, vivendo em simbiose no trato gastrointestinal, como *T. bryantii* e *T. saccharophilum* que foram isolados a partir do rúmen de vacas leiteiras (Paster e Canale-Parola, 1982). Shibahara et al. (2002) encontraram a presença de *T. pallidum* no cólon de bovinos abatidos no Japão. Vários autores consideram a hipótese de que o líquido ruminal, as fezes e a cavidade oral funcionam como reservatórios para DD dentro da propriedade e que bactérias presentes nesses locais possam contaminar o ambiente, sendo este, um real veículo de transmissão da doença (Evans et al, 2012; Nascimento et al, 2015; Zinicola et al, 2015). Apesar de ambientes úmidos e com grande quantidade de matéria orgânica possam aumentar a incidência e disseminação da DD, poucos trabalhos conseguiram isolar *Treponema* de amostras ambientais (Klitgaard et al, 2014). Como a microbiota da pele íntegra dos pés dos bovinos é bem diferente da encontrada nas lesões de DD, permanece incerto se os tecidos saudáveis dos pés são o reservatório de infecção primária ou se existem outras fontes de contaminação (Evans et al, 2008).

Nascimento et al. (2015) coletaram fluido ruminal de 15 vacas leiteiras portadoras de DD em sete diferentes propriedades e utilizando a técnica de PCR encontraram em 60% das amostras de líquido ruminal, pelo menos um dos filotipos patogênicos para DD. Em 15 amostras de líquido ruminal, *T. phagedenis* foi o mais prevalente, encontrado em 40% das amostras, seguido por *T. medium*/*T. vincentii* encontrado em 33,33% das amostras e *T. denticola*/*T. putidum* encontrado em 26,67% das amostras. Em duas vacas foram identificados todos esses *Treponemas* no fluido de rúmen, porém nem todas as espécies presentes nas lesões foram identificadas no fluido ruminal. Zinicola et al. (2015) coletaram oito amostras de fluido ruminal e 14 amostras fecais de vacas leiteiras em propriedades com a presença da DD. E encontraram as mesmas espécies de *Treponema* (*T. denticola*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. putidum*, *T. phagedenis* e *T. paraluiscaeniculi*) que estavam presentes nas lesões de DD em amostras de fezes e rúmen dos animais.

Klitgaard et al. (2014) realizaram biópsias de lesões de DD e coletaram amostras de fezes e ambiente de seis rebanhos com alta prevalência da doença e um rebanho livre. No rebanho livre, não foi encontrado nenhum *Treponema* relacionado à DD nas amostras de fezes e ambiente. Nas seis propriedades com a presença da lesão foram encontrados *Treponemas* relacionados à DD nas amostras ambientais e fecais, porém a prevalência destes foi extremamente baixa, sendo inferior a 0,5%. E em várias coletas de ambiente e fezes não foi encontrado a presença de nenhum *Treponema* apontado como causador da DD. Evans et al. (2011) encontraram resultados semelhantes, nesse estudo foram coletadas amostras de diferentes locais do trato gastrointestinal (rúmen, omaso, intestino grosso e fezes) após o abate de animais. Foram isoladas sete espécies de *Treponemas*, porém nenhum foi semelhante aos encontrados na DD bovina.

Os mesmos autores Evans et al (2012) coletaram amostras ambientais de fazendas endêmicas de DD e conteúdo do trato gastrointestinal bovino. Um total de 368 amostras foram testadas utilizando ensaios de PCR para os três filotipos de *Treponema* mais encontrados nas lesões (*T. medium*, *T. phagedenis* e *T. pedis*). Todas as amostras ambientais e amostras de conteúdo do trato gastrointestinal foram negativas para DNA dos três principais filotipos encontrados nas lesões.

No entanto, identificou-se *Treponemas* relacionados à DD em duas regiões específicas dos animais, o tecido da cavidade oral (14,3% das amostras testadas) e o tecido retal (14,8% das amostras testadas), porém as bactérias foram encontradas em proporções relativamente baixas. Não havia a presença de nenhuma lesão macroscópica nesses locais durante a coleta.

Sullivan et al. (2015) pesquisaram a presença de *Treponemas* na cavidade oral, tecidos retais e fezes de bovinos e ovinos. Entre os 40 ovinos avaliados, um apresentou *Treponemas* associados à DD na cavidade oral, três apresentaram no tecido retal e 22 diferentes filotipos de *Treponemas* foram isolados a partir das fezes dos 40 ovinos avaliados, no entanto, nenhum desses *Treponemas* encontrados foi considerado patogênico. Os filotipos encontrados nos tecidos orais e retais dos ovinos foram *T. pedis* e *T. phagedenis*. Nos 40 bovinos avaliados nesse estudo não foi encontrado nenhum *Treponema* na mucosa retal e nas fezes e em quatro animais foi encontrado a presença de *Treponemas* na cavidade oral. O filotipo associado a DD presente na cavidade oral de bovinos foi *T. phagedenis*.

Embora tenha havido evidências do envolvimento do trato gastrointestinal, é necessário mais trabalhos para esclarecer as vias de transmissão definitivas. A questão de como essas bactérias encontradas com uma prevalência tão baixa no ambiente podem ser tão bem sucedidas em infectar um rebanho, ainda precisa ser melhor elucidado (Evans et al, 2012; Klitgaard et al, 2014). Clegg et al. (2015) relataram um aumento nos casos de claudicação em alces selvagens na América do Norte e realizaram sete biópsias desses animais, sendo quatro de alces clinicamente sadios (grupo controle) e três de alces com uma lesão semelhante a DD. Utilizando a técnica de PCR foi encontrado a presença de *Treponemas* nas lesões, sendo *T. vincentii*, *T. phagedenis* e *T. pedis* encontrados nas três biópsias, já na pele íntegra não foi encontrado *Treponemas*. Este foi o primeiro relato de DD associado a *Treponema* em animais selvagens e uma das hipóteses levantadas pelos autores é que as pastagens utilizadas pelos alces foram anteriormente usadas por bovinos e ovinos, sugerindo que o ambiente pode atuar como um potencial reservatório para essas bactérias.

#### 3.4 MICROBIOMAS ENCONTRADOS NAS VÁRIAS FASES DA LESÃO DE DERMATITE DIGITAL E NA PELE SAUDÁVEL

Um dos desafios encontrados para o estudo da etiologia da DD é a dificuldade para cultivar as bactérias do gênero *Treponema*. Lima (2008) foi um dos poucos trabalhos que realizou o cultivo e identificação molecular de isolados, com base na análise de sequências de genes 16S RNAr. Foram identificadas as seguintes espécies bacterianas, *T. pedis*, *Leptospira broomi*, *L. fainei*, *L. licerasiae*, *L. wolffii*, *Corynebacterium appendicis*, *Cupriavidus gilardii*, *Enterococcus casseliflavus*, *E. gallinarum*.

Devido a essa dificuldade, métodos independentes de cultivo têm sido usados para identificar os patógenos envolvidos na patogênese da DD, como o sequenciamento gênico pela comparação do gene 16S RNAr ou sequenciamento de nova geração e o método de *FISH* (Klitgaard et al, 2013; Nielsen et al, 2016). As espiroquetas do gênero *Treponema* são as bactérias mais predominantes na DD, principalmente nas partes mais profundas da lesão, porém, várias outras bactérias parecem atuar sinergicamente com os *Treponemas* para causar a DD. Essas outras bactérias que parecem ter um papel importante na patogênese da doença são encontradas de forma divergente na literatura e seu real papel na lesão de DD é ainda pouco elucidado (Rasmussen et al, 2012; Santos et al, 2012).

Zinicola et al. (2015) coletaram um total de 140 amostras feitas partir de 89 vacas leiteiras em três propriedades rurais diferentes. A classificação de pontuação das lesões de DD foi baseado e adaptado do método descrito por Dopfer et al. (1997). Foram coletadas uma amostra da lesão M1, 30 amostras da lesão M2, cinco amostras da lesão M3, 26 amostras da lesão M4, 27 amostras da lesão M4.1 e 51 amostras de pele saudável. Foi encontrado um aumento das bactérias do gênero *Treponema* como *T. denticola*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. paraluisuniculi*, *T. phagedenis* e *T. putidum* em lesões DD ativas quando comparados com a pele saudável e lesões de DD inativas. As lesões de DD inativas além de apresentarem uma menor proporção de *Treponemas* exibiram um aumento marcante das bactérias: *Porphyromonas*, *Crotonatoxidans*, *Alkaliphilus*, *Sedimentibacter hydroxybenzoicus*, e *Filifactor villosus* quando comparadas as lesões de DD ativas. Os microbiomas da pele saudável foram diversos, mas dominados por bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* e *Actinobacteria*. E a bactéria *Candidatus Aemobophilus asiaticus* foi encontrada em grande proporção em todas as fases de DD.

Os mesmos autores também em 2015 avaliaram 16 amostras de biópsias de oito vacas leiteiras e encontraram os filos *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Chordata* em grande proporção na pele saudável. Já *Spirochetas* e *Bacteroidetes* foram altamente prevalentes em amostras de DD ativa e DD inativa seguido por *Proteobacteria* e *Firmicutes*. Os filotipos mais abundantes de *Treponemas* encontradas foram: *T. phagedenis*, *T. denticola*, *T. vincentii* e *T. pallidum* (Zinicola et al, 2015)

Já Brandt et al. (2011) além de encontrarem vários filotipos de *Treponemas* como *T. pedis*, *T. medium* e *T. phagedenis* nas lesões de DD, encontraram também a presença de papiloma vírus em 22% das lesões, o vírus também foi achado em amostras de tecidos saudáveis. A presença viral na lesão de DD não foi encontrada por diversos autores (Santos et al, 2012; Klitgaard et al, 2014; Krull et al, 2014; Nielsen et al, 2016). Já Dopfer et al. (1997) utilizando o teste de imunofluorescência em lesões de DD encontrou várias espiroquetas do gênero *Treponema* e em lesões ulcerativas e dolorosas foi encontrado grande quantidade *Campylobacter faecalis*.

Evans et al. (2008) aplicaram o método de PCR para fragmentos do gene 16s rRNA e imunohistoquímica, ambos usados para identificação etiológica das lesões e da pele íntegra dos animais. *T. médium/T. Vincentinii* (classificados como grupo 1), *T. phagedenis* (classificado como grupo 2) e *T. putidum/T. denticola* (classificados como grupo 3) foram encontrados em: 96,1%, 98% e 76,5% das lesões. Com todos os três grupos aparecendo juntos em 74,5% das lesões de DD. Na pele saudável dos animais foi achada a presença de *Treponemas*, mas não eram os mesmos filotipos encontrados na DD. Moter et al. (1998) encontraram um resultado semelhante, porém o grupo 3 foi encontrado apenas na parte superficial da lesão e os grupos 1 e 2 na parte profunda da lesão. Já Nascimento et al. (2015) encontraram *T. phagedenis*, *T. medium* e *T. vicentii* juntos em 95,45% das lesões e todos os grupos de *Treponemas*, incluindo *T. denticola* e *T. putidium* foram achados juntos em 81,82% das biópsias de DD.

Klitgaard et al. (2013) utilizando o sequenciamento de nova geração e análise de *FISH*, realizaram biópsias de animais com DD provenientes de dez rebanhos localizados em regiões diferentes da Espanha, totalizando 36 biópsias de lesões avaliadas. Macroscopicamente mais de 60% das DD (s) avaliadas nesse trabalho apresentavam-se na fase ulcerativa (M2) e o restante das 40% estavam em diferentes fases da lesão. Os *Treponemas* que foram detectados nesse estudo foram: *T. phagedenis*, *T. médium*, *T. vicentii*, *T. denticola*, *T. pedis*, *T. maltophilum*, *T. refringens* e também foi encontrado 15 filotipos de *Treponema* diferentes que ainda não foram previamente

identificados. Em média nas 36 amostras de DD foram encontrados oito filotipos de *Treponemas* por lesão.

Os quatro *Treponemas* mais prevalentes encontrados no estudo de Klitgaard et al (2013) foram: *T. denticola* e *T. pedis* (45% das amostras), *T. phagedenis* (20% das amostras), *T. médium* (18% das amostras) e *T. refringes* (17% das amostras). Nas partes mais profundas e no meio das lesões, a presença de outras bactérias que não pertenciam ao gênero *Treponema* foi insignificante e apesar de outros agentes como: *D. nodosus* e *F. necrophorum* também serem citados como envolvidos na lesão (Knappe-Poindecker et al, 2014) nesse trabalho não foram identificados.

Já Rasmussen et al. (2012) realizaram 90 biópsias de lesões de DD e 24 biópsias da pele saudável de animais provenientes de um rebanho leiteiro da Noruega e seis rebanhos leiteiros da Dinamarca. Todas as lesões apresentaram em média sete filotipos de *Treponemas* e em seis delas foram encontrados mais de 12 filotipos. *D. nodosus* esteve presente em 51% das lesões e foi encontrado também em três amostras de pele aparentemente saudáveis. Em outras duas amostras de pele saudável foi visto a presença de *Treponemas* associados ao *D. nodosus*. Cation et al. (2008) realizaram 132 biópsias de DD e utilizando a técnica de *FISH* também encontraram em 29% das lesões a presença de *D. nodosus*.

O agente *D. nodosus* em conjunto com *F. necrophorum* são reconhecidos mundialmente como os agentes causadores da podridão dos cascos em ovinos e caprinos (Moore et al, 2005). *D. nodosus* produz proteases extracelulares que podem causar danos ao tecido e facilitar a penetração e colonização de bactérias do gênero *Treponema*, dessa forma esses dois agentes podem agir sinergicamente, principalmente na fase inicial da doença. (Wilson-Welder et al, 2015). Knappe-Poindecker et al. (2014) avaliaram 14 rebanhos leiteiros na Noruega e encontraram *D. nodosus* como a bactéria mais prevalente nas lesões de dermatite interdigital e erosão de talão. Esse agente também foi encontrado em todas as biópsias de DD realizadas nesse estudo. Sullivan et al. (2015) encontraram *D. nodosus* e *F. necrophorum* respectivamente, em 71% e 44% das lesões de DD avaliadas e em mais de 20% das amostras de tecidos de pés saudáveis foi encontrado também a presença desses dois agentes. Koniarova et al. (1993) avaliaram 52 biópsias de DD e encontraram a presença de *F. necrophorum* em 12% das lesões e em 25% foi encontrado a presença de *P. levii*. Yano et al. (2010) avaliaram cinco lesões de DD e encontraram *T. phagedenis* e *T. denticola* as bactérias mais prevalentes e na parte superficial da lesão *P. levii* foi a bactéria predominante.

Klitgaard et al. (2014) correlacionaram a microbiota presente no ambiente de propriedades leiteiras com a microbiota presente em lesões de DD. Em oito biópsias de DD localizada na região plantar dos membros posteriores e uma lesão de DD localizada na região do úbere, foi detectado em grande proporção bactérias do gênero *Treponema*, sendo a *T.denticola* e *T.pedis* as mais prevalentes.

Nielsen et al. (2016) avaliaram 27 animais com DD e dez animais sem a presença da lesão. As amostras foram coletadas de um matadouro localizado na Dinamarca e todas as lesões foram classificadas e adaptadas de acordo com o método descrito por Dopfer et al. (1997). Quatro casos foram caracterizados por ulcerações circunscritas e áreas de hiperqueratoses com formação de crostas, classificadas como M3. Quatorze casos mostraram lesões circunscritas dominadas por significativa hiperqueratose e proliferação da epiderme, mas sem visível ulceração (M4). Nove casos mostraram somente leve e focal hiperqueratose com proliferação da epiderme (não definível segundo o método descrito por Dopfer et al. (1997), que classificou as lesões de M1 a M4, e neste estudo, foram classificadas como M5).

Nesse mesmo trabalho Nielsen et al. (2016) observaram uma clara distinção entre a microbiota do tecido saudável e o tecido afetado por DD. *Treponema*, *Mycoplasma*, *Fusobacterium* e *Porphyromonas* foram os gêneros que melhor se diferenciaram em amostras de tecidos infectados do controle e os filos mais prevalentes encontrados na pele saudável foram: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, em nível de famílias *Moraxellaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* foram as mais abundantes em amostras do controle. Análises de *FISH* indicaram que espécies pertencentes ao gênero *Treponema* foram as bactérias dominantes na parte profunda da lesão, constituindo aproximadamente 90% da microbiota infectante, sendo encontrados 15 filotipos diferentes, sendo *T. phagedenis* e *T. refringens* os filotipos mais abundantes. *F. necrophorum* e *P. levii* foram principalmente observados nas partes superficiais da epiderme. Outra bactéria, *D. nodosus*, também suspeita de estar envolvida no desenvolvimento de DD (Rasmussen et al, 2012) foi identificado por análises de *FISH* em 12 das amostras, mas foi ausente ou abaixo do limite de detecção na sequência de dados.

Santos et al. (2012) coletaram amostras DD e pele íntegra de vacas da raça Holandês alojadas em uma fazenda comercial dos Estados Unidos. As lesões de DD foram divididas em estratos superficiais, intermediários e profundos. Este estudo mostrou que a composição microbiana em infecções de DD de vacas leiteiras diferiu entre as amostras de pele saudável e amostras de diferentes estratos do tecido infectado. *Firmicutes* e *Proteobacteria* foram os principais filos detectados na pele saudável, com o último sendo o mais freqüente e diversificado. Em contraste, *Firmicutes* foi o filo mais diverso, presente nos estratos superficiais e intermediários da lesão, enquanto espiroquetas do gênero *Treponema* foram os principais grupos encontrados no estrato profundo da DD.

Krull et al. (2014) realizaram um estudo longitudinal de três anos e coletaram 48 biópsias de DD a partir de 26 animais em lactação da raça Holstein, alojadas na fazenda da Universidade de Iowa (EUA). A fazenda possuía cerca de 400 vacas em lactação e no início do estudo a prevalência de DD no rebanho foi estimada em 50%. Não foi utilizada nenhuma medida curativa ou preventiva para controlar DD nas vacas, o que permitiu a observação do desenvolvimento da lesão na ausência de intervenção. Os autores desse estudo desenvolveram um sistema independente de classificação da DD, onde, o estágio zero representa a pele bovina normal, estágios A1 / A2 e B1 / B2 representaram variações morfológicas de desenvolvimento das lesões de DD, sendo os estágios três e quatro as formas clínicas da doença responsáveis pela claudicação e as lesões que receberam tratamento são apresentadas como estágio cinco no presente estudo.

Nesse estudo Krull et al. (2014) observaram as seguintes famílias encontradas na pele saudável: *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Corynebacteriaceae* e *Porphyromonadaceae*. Estas famílias foram gradativamente sendo substituídas por outras à medida que a lesão progrediu, as espiroquetas do gênero *Treponema* foram predominantes nos estágios três e quatro da lesão, correspondendo a 94,3% das bactérias encontradas, principalmente, *T. denticola*, *T. phagedenis*, *T. pedis*, *T. medium* e *T. PT8*. A família *Mycoplasmataceae* também foi encontrada em grande quantidade nas fases três e quatro da DD. Nas fases A1/A2 e B1/B2 foram encontrados *Treponemas* mas em menor proporção que nas fases ulcerativas da doença. E o estágio 5 (lesões que foram submetidas ao tratamento) ocorreu um rápido declínio da população de *Treponemas* e a microbiota da lesão foi semelhante a que foi encontrada na pele íntegra.

Os diversos trabalhos mostram a DD como uma doença “multitreponemal”, mas o que não está esclarecido é se os *Treponemas* sozinhos são capazes de causar a lesão, ou se existe uma relação simbiótica com outros agentes. A discussão a respeito sobre quais bactérias estão envolvidas na etiologia da DD é relatada por diversos estudos, divididos pelo tempo, fase, localização da lesão e métodos diagnósticos (Wilson-Welder et al, 2015).

### 3.5 EPIDEMIOLOGIA DERMATITE DIGITAL

Ferreira (2003) acompanhou durante um ano 117 vacas em lactação da raça Holandês confinadas em sistema de “free-stall” em Pedro Leopoldo, Minas Gerais e encontrou uma incidência para DD de 44%. Souza (2002), avaliando 323 vacas da raça Holandês e mestiças de 63 fazendas localizadas na mesma região, sendo 57 de sistema semi-intensivo e seis de sistema intensivo, encontrou uma prevalência de lesões de 89,8%, com a DD responsável por 30,3% dos casos observados. O mesmo autor em 2005 avaliou durante um ano 100 vacas em lactação da raça Holandês Preto e Branco, que estavam entre a primeira e a quinta lactação confinadas em sistema de “free-stall”, no município de Esmeraldas, Minas Gerais e encontrou uma incidência de manqueiras de 55%, sendo a DD e a úlcera de sola as causas mais presentes e relacionou essa elevada incidência de DD as condições precárias de higiene das instalações (Souza, 2005). Já Casagrande (2013) avaliando 210 animais de sete categorias etárias diferentes encontrou uma prevalência para DD de 23,8%.

Martins et al. (2002) avaliaram 481 vacas lactantes pertencentes aos rebanhos leiteiros de 12 propriedades da bacia leiteira de Campo Grande e municípios arredores do Mato Grosso do Sul, criadas em regime intensivo e semi-intensivo. Neste trabalho foi encontrado a DD como a lesão mais prevalente representado 26,4% dos casos. Souza et al. (2015) avaliaram 2.479 fêmeas bovinas, de aptidão leiteira, pertencentes a 32 propriedades localizadas no oeste do Paraná e também encontraram a DD como a lesão mais prevalente com 17,5% dos casos observados. Cruz et al. (2001) também no sul do Brasil examinou 524 animais que apresentaram um total de 883 lesões podais e a DD foi encontrada em 29,3% dos casos. Já Leão et al. (2009) encontraram uma prevalência de 3,85% de 7752 bovinos de aptidão leiteira no estado de Goiás.

Altas prevalências da lesão de DD também são encontradas em vários países no mundo (Klitgaard et al, 2013; Nielsen et al, 2016). Houlzhauer et al. (2006) avaliaram 383 rebanhos na Holanda e a DD foi encontrada com uma prevalência média de 21,2% sendo os animais mais acometidos pela doença aqueles que se encontravam dentro do pico de lactação (60 a 90 dias). Neste estudo houve rebanhos sem a presença da lesão e rebanhos apresentando 83% de animais com DD. Sullivan et al. (2015) examinou os cascos de 815 bovinos de leite e corte em matadouros dos Estados Unidos e encontrou em 29% das vacas leiteiras a presença de DD e em 4% nos bovinos de corte a presença da lesão. Capion et al. (2008) avaliaram 6240 vacas em 55 rebanhos na Dinamarca criadas em sistema free-stall e encontrou em 47 dos 55 rebanhos (85%) a presença de DD. Já Cramer et al. (2008) encontrou DD em 9,3% de vacas e 69,7% dos rebanhos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento teve seu projeto certificado pela comissão de ética em experimentação animal (CEUA), sob registro: nº. 121/2015.

#### 4.1 LOCAL E PERÍODO DE EXPERIMENTO

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, situada no município de Igarapé/MG. A fazenda está situada a 20°04'31 de latitude Sul e 44°18'06 de longitude Oeste de Greenwich, com altitude média de 786 metros. A área total da propriedade é de 246 hectares. O experimento foi realizado em junho/julho de 2015 e agosto/setembro/outubro de 2016.

#### 4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 37 animais que apresentavam a lesão DD em diferentes graus. As vacas estavam em diferentes estágios de lactação e variavam em grau de sangue de ½ Holandês x Gir a <sup>15</sup>/<sub>16</sub> Holandês. Os animais possuíam entre três a dez anos de idade e estavam entre a primeira e a sexta lactação, com uma produção média diária de 19 litros/leite por dia.

#### 4.3 MANEJO DOS ANIMAIS

As vacas secas permaneciam em um pasto afastado formado por capim braquiária (*Brachiaria brizantha*) até completarem 30 dias para a data prevista do parto. Nesta data, eram conduzidas a um pasto mais próximo ao curral (piquete maternidade), no qual permaneciam até o 1º dia pós-parto, sem separação entre vacas e novilhas. Esse piquete media aproximadamente dez hectares e era formado também por capim braquiária (*Brachiaria brizantha*), possuía boa drenagem e presença de sombra natural e artificial com sombrites.

Ao término do 1º dia pós-parto, as vacas foram transferidas para o lote um, de vacas em lactação. Onde eram ordenhadas duas vezes ao dia, sendo a primeira ordenha iniciada às seis horas e a segunda às 14 horas. A ordenha era mecanizada, em contenção tipo espinha de peixe, sendo ordenhadas quatro vacas de cada lado em sistema fechado e linha alta. As vacas em lactação eram divididas em quatro lotes de acordo com sua produção de leite e seus dias de lactação, sendo o primeiro lote composto por primíparas e vacas de alta produção, segundo lote composto por vacas de produção mediana, o terceiro lote composto por vacas de menor produção e o quarto lote composto por vacas portadoras de mastite contagiosa ou em tratamento com antimicrobiano.

Em relação à saúde dos cascos, na propriedade não era realizado o casqueamento preventivo na secagem dos animais. Utilizou-se pedilúvio em média três dias consecutivos por semana, com soluções de formol a 5%, sendo as soluções trocadas a cada 300 passadas. O pedilúvio possuía 2,5 metros de comprimento, 0,80 centímetros de largura, 20 centímetros de altura e era coberto, antes de passarem pelo pedilúvio os animais passavam por um lava-pés que apresenta as mesmas medidas do pedilúvio e a distância entre eles era em torno de 6 metros de comprimento. A passagem dos animais no pedilúvio era feita somente nos animais em lactação. Nos animais secos e pré-parto nenhum manejo preventivo em relação a saúde dos cascos era realizado. A limpeza dos currais e instalações era feita por raspagem manual e remoção dos dejetos através de uma carroça puxada por tração animal.

#### 4.4 MANEJO NUTRICIONAL

Durante o período das chuvas, nos meses de dezembro a abril, onde existiu maior disponibilidade de pastagens, os animais eram mantidos em piquetes rotacionados de capim braquiária (*Brachiaria brizantha*) e capim elefante (*Penisetum spp.*) recebendo uma suplementação com

concentrado no cocho, após a ordenha. No período seco, de maio a novembro, a dieta baseava-se em silagem de milho e concentrado, sendo fornecida com base nos dias em lactação e na produção de leite conforme os requerimentos do *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (NRC) 2001. O concentrado teve como base o farelo de soja, caroço de algodão, polpa cítrica, minerais e milho. O alimento era fornecido na forma de dieta total, duas vezes ao dia, em cochos de cimento, com área de espaçamento de cocho de 70 centímetros por animal e o sal mineral era fornecido à vontade. A mistura do concentrado e volumoso era feita manualmente pelo funcionário da fazenda.

#### 4.5 COLETA DE MATERIAL DAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL

O rebanho foi inspecionado, durante a ordenha, sendo separados para exame clínico aqueles animais que apresentaram algum tipo de lesão da pele digital próxima à margem coronariana, no espaço interdigital palmar/plantar. Após essa etapa os animais acometidos com DD, foram encaminhados para um tronco de casqueamento e submetidos a limpeza superficial do tecido córneo com rineta reta e posterior exame físico dos cascos. Os cascos foram lavados com água e sabão para posterior inspeção, palpação, movimentação articular de extensão, flexão, adução, abdução, rotação e percussão sonora com martelo plessimétrico. As lesões de DD foram classificadas em graus (M1 a M4.1) de acordo com a classificação proposta por Dopfer et al. (1997) e Zinicola et al. (2015) e posteriormente anotadas em ficha clínica.

Para a identificação dos agentes envolvidos na etiologia da DD, foram realizadas 37 biópsias profundas das lesões e também foram coletadas três amostras de pele íntegra de animais com DD, essas amostras de pele íntegra foram coletadas adjacentes à lesão. Para a realização das biópsias, o membro acometido foi devidamente contido no tronco de casqueamento, seguido por limpeza com escova, água corrente e detergente. Após os processos descritos, foi feito um garroteamento da articulação metatarsiano-metacarpiana com um manguito de borracha e o animal foi submetido a uma anestesia local pela técnica de Bier modificada, que consiste na punção da veia digital superficial dorsal plantar ou palmar e aplicação de 10 ml de cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstritor. A cirurgia foi feita retirando todo o material lesionado como descrito por Souza (2005). Após o procedimento cirúrgico foi realizada uma lavagem da área acometida com solução de iodo degermante e aplicação de iodo 10% na ferida cirúrgica. Sobre a lesão foi colocado uma pasta composta de tetraciclina em pó na concentração de 10% e gluconato de clorexidina. Em seguida feito a proteção da coroa do casco com algodão ortopédico (12cm de largura e 1 metro de comprimento) e enfaixamento do espaço interdigital com atadura elástica (15 cm largura x 1,80m comprimento). A bandagem foi coberta por uma camada de emulsão asfáltica e a cada três dias foi realizado a troca da bandagem até a cura da lesão. Todo esse procedimento teve duração média de 15 minutos por animal.

O material coletado foi colocado em uma bandeja previamente higienizada com água e sabão e seccionado, em dois cortes. Cada fragmento foi acondicionado em frascos estéreis, sendo um com formol tamponado a 10% e o outro com solução de RNA later para execução da técnica de *FISH* e sequenciamento de nova geração respectivamente.

#### 4.6 COLETA DE FLUIDO RUMINAL E FEZES

Foram coletados 100 ml de fluido ruminal e 50 gramas de fezes de 13 animais que apresentaram a lesão de DD. Para coleta de fluido ruminal foi utilizado um guia de sonda metálico e uma sonda semi-siliconada de 3 metros de comprimento e para a coleta de fezes foi usado luvas de plástico

para palpação retal. Após a coleta as amostras foram colocadas em solução de RNA later para posterior sequenciamento de nova geração.

#### 4.7 AMOSTRAS DE AMBIENTE

Os seguintes locais de coleta foram amostrados na fazenda:

- Piso da pista de alimentação;
- Piso ao redor do bebedouro;
- Sala de espera da ordenha;
- Lava-pé;
- Pedilúvio

As amostras de ambiente foram coletadas aleatoriamente em três pontos diferentes dos locais citados acima. Foi retirado um pouco de material acumulado no local com uma espátula estéril e colocado em solução de RNA later para posterior sequenciamento de nova geração. A amostra final foi constituída por uma mistura desses três pontos diferentes de cada local, o piso da pista de alimentação e ao redor do bebedouro, pedilúvio e lava-pés.

#### 4.8 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

Secções de aproximadamente 4mm foram cortados e montados em lâminas Super Frost Plus. Foram utilizadas sondas de oligonucleotídeos marcados na extremidade 5' com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou com o derivado de isotiocianato de Cy3. As sondas foram específicas para diferentes filotipos de bactérias do gênero *Treponema* e também sondas para outros tipos de bactérias como *D. nodosus*, *F. necrophorum* e *P. levii*. Das 37 amostras, 13 foram classificadas quanto a frequência, densidade e localização de filotipos de *Treponemas* pela técnica de FISH. E das 37 amostras de biópsias de DD, 31 mais três de pele íntegra coletadas adjacentes a lesão, foram classificadas quanto a frequência, densidade e localização de *Treponemas*, *D. nodosus*, *F. necrophorum* e *P. levii* pela mesma técnica, de acordo com Klitgaard et al. (2008).

A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando um microscópio de epifluorescência e a invasão bacteriana total da epiderme dentro de cada amostra de biópsia foi pontuada de 0 a 3 (0, não há bactérias invasivas; 1, baixo número de bactérias invasivas; 2, moderado número de bactérias invasivas; 3, elevado número de bactérias invasivas). Para a densidade de bactérias dentro de cada amostra também foi realizado uma classificação de 0 a 3, onde: (0, representa nenhuma hibridização, ou seja, nenhuma bactéria encontrada; 1, hibridização escassa, na amostra foi encontrada uma quantidade de até 5% do número total de bactérias; 2, hibridização moderada entre 5% e 10% do número total de bactérias; 3, hibridização forte, mais do que 10% do número total de bactérias). Essas classificações foram realizadas de acordo com Rasmussen et al. (2012) e Klitgaard et al. (2013). As análises de FISH foram encaminhadas e realizadas na Universidade Técnica da Dinamarca (DTU), graças a uma parceria entre as duas universidades (UFMG e DTU).

#### 4.9 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

Biópsias de lesões de DD (35 biópsias), 13 amostras de fluido ruminal e 13 amostras de fezes de vacas portadoras de DD junto as amostras de ambiente foram fixadas em RNA later e enviadas para o laboratório referência do Instituto Veterinário Nacional da Universidade Técnica da

Dinamarca. Nessas amostras, o DNA bacteriano foi purificado utilizando kits comerciais. Ampliação e sequenciamento gênico foram realizados utilizando iniciadores de oligonucleotídeos com alvo as regiões hipervariáveis, utilizando as probes V1 e V2 (específicas para várias bactérias) do gene de rRNA 16S-SE. As amostras que foram positivas para *Treponemas* pelas probes V1 e V2, foram também analisadas pelas probes V3 e V4 (específicas para bactérias do gênero *Treponema*). Vinte e quatro biópsias de DD, 13 amostras de fluido ruminal e fezes e todas as amostras de ambiente foram avaliadas com as probes V3 e V4 de acordo com Klitgaard et al. (2008).

As sequências obtidas foram encaminhadas para o Centro Nacional de DNA de Sequenciamento de Alto Rendimento da Universidade de Copenhague, Dinamarca, para o sequenciamento em uma plataforma *Illumina MiSeq*. Foi usado um consenso de que havia uma sequência de pelo menos 190 nucleotídeos mapeados de acordo com os códigos de barras individuais.

As leituras obtidas foram analisadas utilizando o software *BION-meta* (<http://box.com/bion>). Sequências com consenso de pelo menos 250 nucleotídeos de comprimento foram mapeadas para uma tabela, de acordo com os códigos de barras individuais, e taxonomicamente classificada contra a base de dados de *Ribosomal Database Project II* (RDP II; <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). Foi utilizado um comprimento de oito mínimos de correspondência de 90%. Para permitir a comparação da abundância relativa entre amostras, o número de leituras para cada código de barras será normalizado.

Tabela 1. Coleta de amostras de biópsias de Dermatite Digital e pele íntegra em cortes histológicos analisadas pelo método de *FISH*.

Amostras	Número de amostras
Coletadas	37
Analisadas para frequência, densidade e distribuição espacial de <i>Treponemas</i> , <i>D. nodosus</i> , <i>F. necrophorum</i> , <i>P. levii</i> .	31
Analisadas para frequência, densidade e distribuição espacial de filotipos de <i>Treponemas</i> .	13
Pele íntegra analisada para frequência e distribuição espacial de <i>Treponemas</i> , <i>D. nodosus</i> , <i>F. necrophorum</i> , <i>P. levii</i> .	3

Tabela 2. Coleta de amostras de biópsia de Dermatite Digital, fluido ruminal, fezes, ambiente e pele íntegra analisadas pela técnica de sequenciamento de nova geração probes V1 e V2 e probes V3 e V4.

Amostras	Biópsia Dermatite Digital	Fluido ruminal	Fezes	Ambiente (pista de alimentação, bebedouro, sala de espera, lava pé, pedilúvio).	Pele íntegra
Probes V1 e V2	35	13	13	-	3
Probes V3 e V4	24	13	13	5	-

#### 4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises das variáveis dicotômicas das frequências bacterianas, densidades bacterianas classificadas como escore 3, frequência de filotipos e densidade de filotipos classificadas como escore 3, foram realizadas utilizando o software estatístico BioStat V5 versão 2009 e o teste utilizado foi Exato de *Fisher*. Considerando nível de significância  $P \leq 0,05$  (Sampaio, 2010).

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 MICROBIOMAS ENCONTRADOS EM LESÕES DE DERMATITE DIGITAL POR ANÁLISE DE *FISH*

Nas 31 biópsias de DD foi encontrada a presença bacteriana em 96,55% das lesões e as bactérias do gênero *Treponema* foram as mais frequentes, estando presentes em 93,55% das lesões (Fig. 1). Já *D. nodosus* estava presente em 58,06% (Fig. 2); *F. necrophorum* em 35,49% (Fig. 3) e *P. levii* em 33,43%, (Fig. 4), Tab.3 e Fig. 5.

Para a densidade de bactérias dentro de cada amostra foi realizado uma classificação de 0 a 3, onde: (escore 0, representa nenhuma hibridização ou seja, nenhuma bactéria encontrada; escore 1, hibridização escassa, onde foi encontrado uma quantidade de até 5% do número total de bactérias na amostra; escore 2, hibridização moderada entre 5% e 10% do número total de bactérias e escore 3, hibridização forte, mais do que 10% do número total de bactérias) essas classificações foram realizadas de acordo com Rasmussen et al. (2012) e Klitgaard et al. (2013). As bactérias do gênero *Treponema* foram as que tiveram maior densidade nas amostras analisadas. Elas apresentaram escore 3 em 70,97% das amostras. Enquanto isso *D. nodosus* apresentou escore 3 em 22,57% das amostras; *F. necrophorum* apresentou escore 3 em 9,68% das amostras; e *P. levii* apresentou escore 3 em 6,67%, esses dados e os demais escores estão demonstrados na Tab. 3 e Fig 5.



Figura 1. *Treponemas* vistos em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital pelo método de *FISH* de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

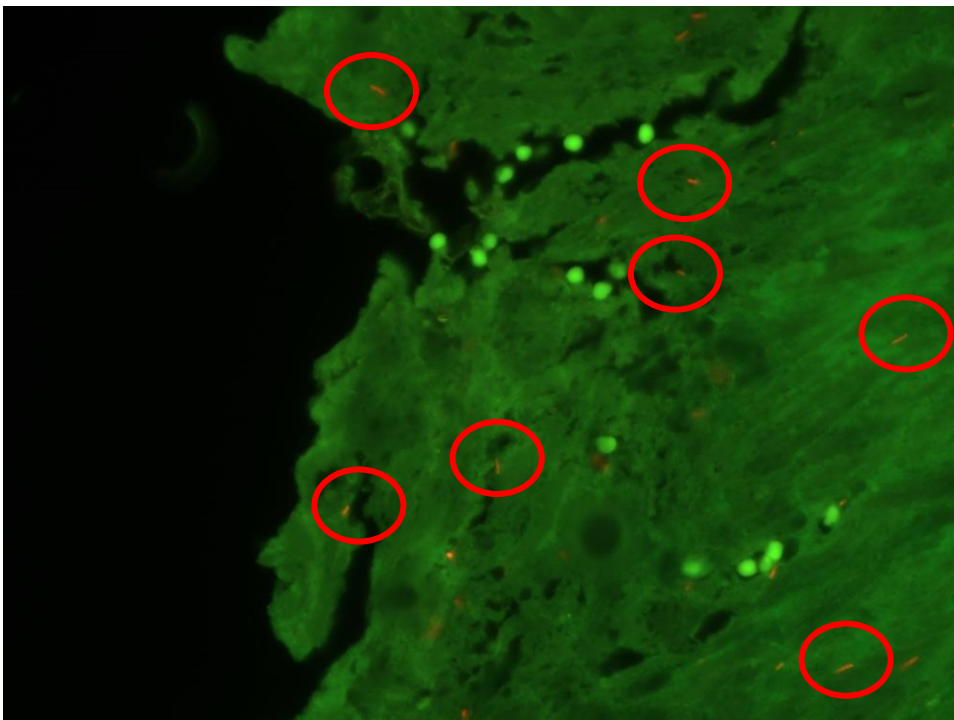


Figura 2. *Dichelobacter nodosus* vistos em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital pelo método de *FISH* de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

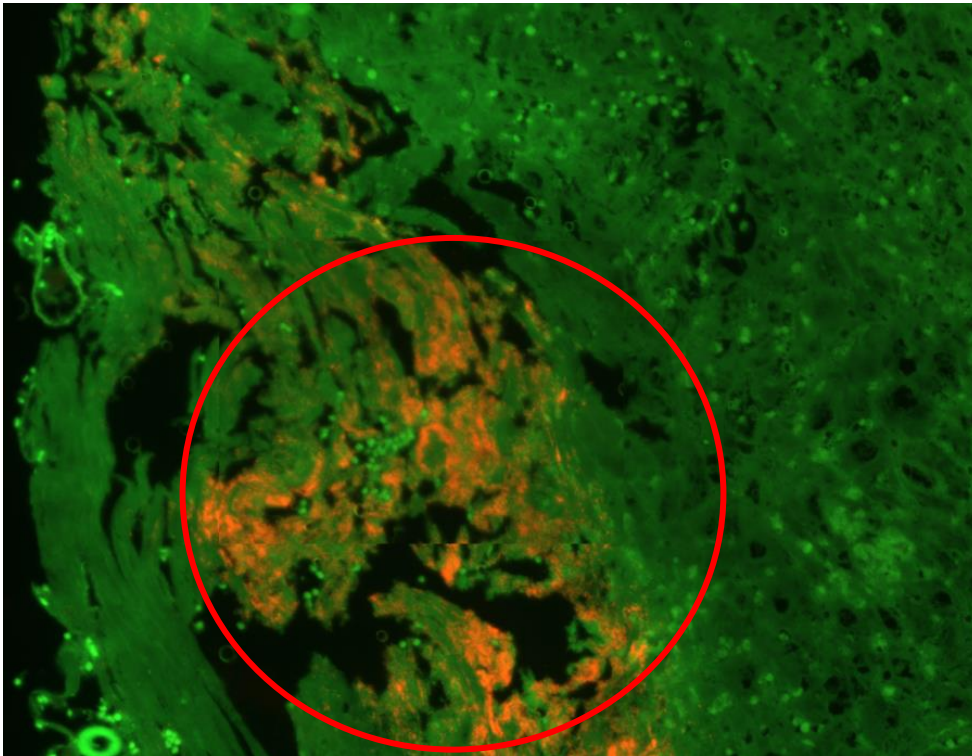


Figura 3. *Fusobacterium necrophorum* visto em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital pelo método de *FISH* de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

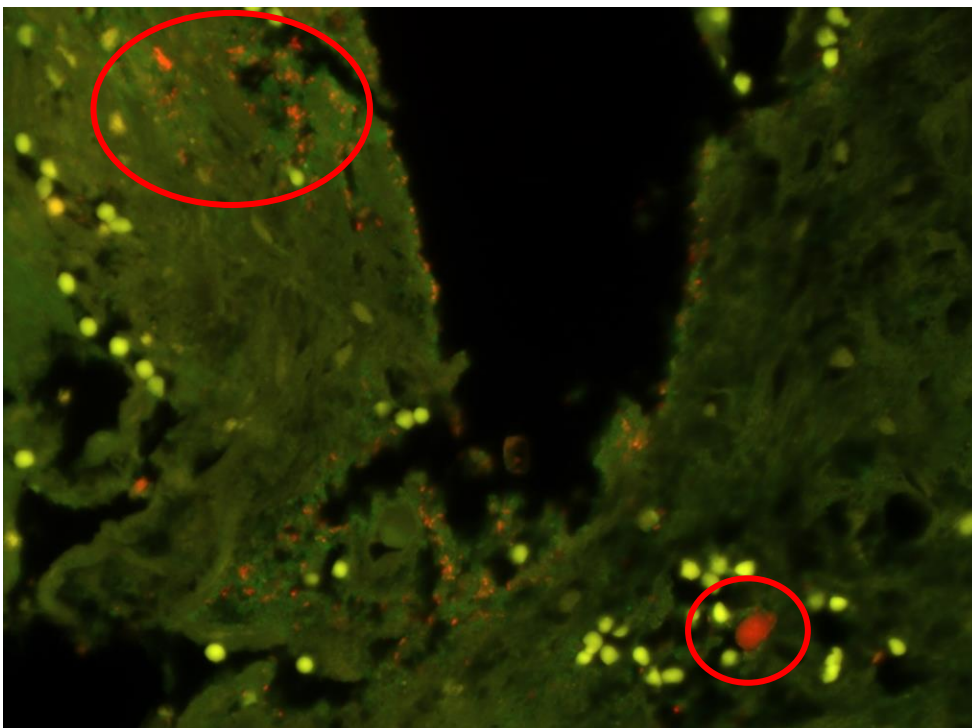


Figura 4. *Porphyromonas levii* visto em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital pelo método de *FISH* de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

Tabela 3. Frequência bacteriana e seus escores de densidade pelo método de *FISH* em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=31), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

Frequência %					
Escore	Bactéria	<i>Treponema</i>	<i>D. nodosus</i>	<i>F. necrophorum</i>	<i>P. levii</i>
1	3,45	0,00	19,35	22,58	26,67
2	41,38	22,58	16,13	3,23	0,00
3	51,72	70,97	22,58	9,68	6,67
Total	96,55	93,55	58,06	35,48	33,33

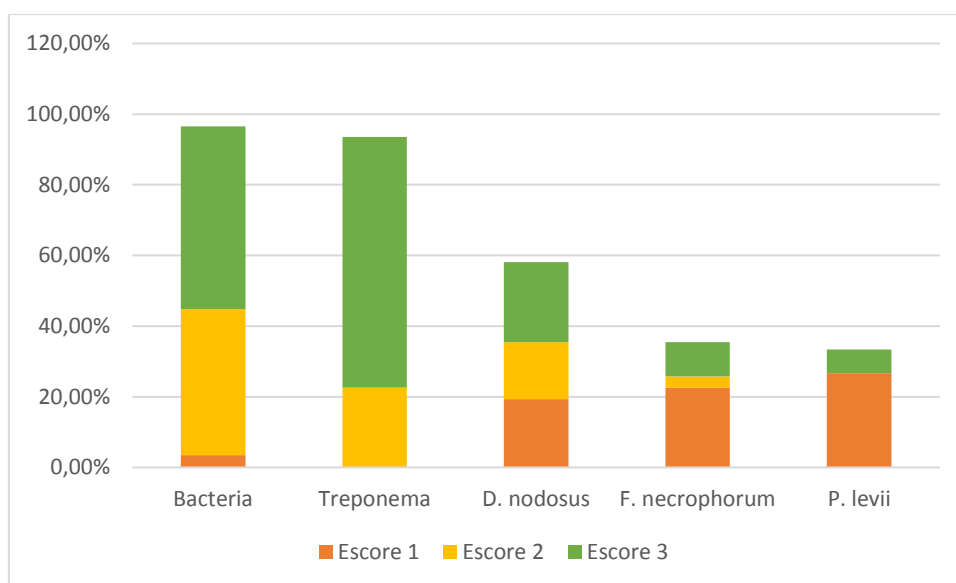


Figura 5. Frequência bacteriana e seus escores de densidade pelo método de *FISH* em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=31), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

Tabela 4: Comparação entre frequências de identificação bacteriana pelo método de *FISH* em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital analisado pelo método exato de *Fisher*.

Comparação entre frequências de identificação bacteriana		Valor de p
<i>Treponema</i> 93,55% <sup>A</sup>	<i>D. nodosus</i> 58,06% <sup>B</sup>	0,011
<i>Treponema</i> 93,55% <sup>A</sup>	<i>F. necrophorum</i> 35,48% <sup>B</sup>	0
<i>Treponema</i> 93,55% <sup>A</sup>	<i>P. levi</i> 33,33% <sup>B</sup>	0
<i>D. nodosus</i> 58,06%	<i>F. necrophorum</i> 35,48%	0,063
<i>D. nodosus</i> 58,06% <sup>A</sup>	<i>P. levi</i> 33,33% <sup>B</sup>	0,0366
<i>F. necrophorum</i> 35,48%	<i>P. levi</i> 33,33%	0,5

Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística pelo método exato de *Fisher* ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 5. Comparação entre frequências de escore de densidade 3 entre bactérias pelo método de *FISH* em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital analisado pelo método exato de *Fisher*.

Comparação entre frequências de escore de densidade 3 entre bactérias		Valor de p
<i>Treponema</i> 70,97% <sup>A</sup>	<i>D. nodosus</i> 22,58% <sup>B</sup>	0,0001
<i>Treponema</i> 70,97% <sup>A</sup>	<i>F. necrophorum</i> 9,68% <sup>B</sup>	0
<i>Treponema</i> 70,97% <sup>A</sup>	<i>P. levi</i> 6,67% <sup>B</sup>	0
<i>D. nodosus</i> 22,58%	<i>F. necrophorum</i> 9,68%	0,1499
<i>D. nodosus</i> 22,58%	<i>P. levi</i> 6,67%	0,0723
<i>F. necrophorum</i> 9,68%	<i>P. levi</i> 6,67%	0,4737

Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística pelo método exato de *Fisher* ( $p \leq 0,05$ ).

As bactérias do gênero *Treponema* foram encontradas em quase todas as amostras (93,55%) e em alta densidade a maior parte das vezes (70,97%) apresentando diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) em comparação com *D. nodosus*, *F. necrophorum* e *P. levi*, evidenciando sua importância na etiologia da DD, (Tab. 4 e Tab.5). Dessa forma, o próximo passo foi selecionar 13 amostras das 31 positivas para *Treponemas* e classificá-las quanto à presença de diferentes filotipos. Foram identificados sete filotipos diferentes nas amostras de DD, *T. pedis*, *T. refringes*, *T. phagedenis*, *T. medium* e alguns filotipos que não foram previamente cultivados e foram classificados nesse estudo como: PT18, PT13 e PT3 de acordo com Klitgaard et al. (2008). Foi utilizado também sondas específicas para a pesquisa de *T. denticola* e o filotipo classificado como PN20, porém não foram encontrados em nenhuma biópsia de DD nesse trabalho. *T. refringes* estava presente em 100% das amostras, *T. phagedenis*, em 91,66%; *T. medium* em 80% *T. pedis*, em 74,99%; PT18 em 75%; PT13, em 45,45% e PT3, presente em 41,6% das amostras (Tab. 6 e Fig. 6). Não foi identificada diferença estatística entre a frequência dos filotipos *T. refringes*, *T. phagedenis*, *T. medium* e *T. pedis*. Quando os filotipos *T. refringes* e *T. phagedenis* foram comparados aos filotipos PT3 e PT13 foi encontrado diferença estatística entre eles (Tab. 7).

Quanto aos escores de densidade bacteriana, *T. phagedenis* foi o filotipo que apresentou maior frequência de escore 3 (83,33%) em relação aos filotipos *T. medium* (30,0%) e *T. refringes* (33,33%) ( $p \leq 0,05$ ), porém foi semelhante ao *T. pedis* (58,33%). A densidade bacteriana do filotipo *T. pedis* nas lesões estudadas ficou numa posição intermediária entre o *T. phagedenis* e os outros filotipos, uma vez que ela é semelhante às frequências de escore 3 dos filotipos *T. medium* e *T. refringes* ( $p > 0,05$ ). No entanto *T. pedis* apresentou diferença estatística quando comparado aos filotipos PT13 e PT18 e *T. phagedenis* também apresentou diferença estatística quando comparado aos filotipos PT3, PT18 e PT13 (Tab. 8).

Tabela 6. Frequência de filotipos de *Treponemas* e seus escores de densidade pelo método de *FISH* em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em MG, Brasil.

Frequência %

Escore	PT18	<i>T. pedis</i>	PN20	<i>T. refringens</i>	<i>T. denticula</i>	<i>T. phagedenis</i>	<i>T. medium</i>	PT13	PT3
1	33,33	8,33	0,00	33,33	0,00	8,33	20,00	9,09	0,00
2	25,00	8,33	0,00	33,33	0,00	0,00	30,00	18,18	8,33
3	16,67	58,33	0,00	33,33	0,00	83,33	30,00	18,18	33,33
Total	75,00	75,00	0,00	100,00	0,00	91,67	80,00	45,45	41,67

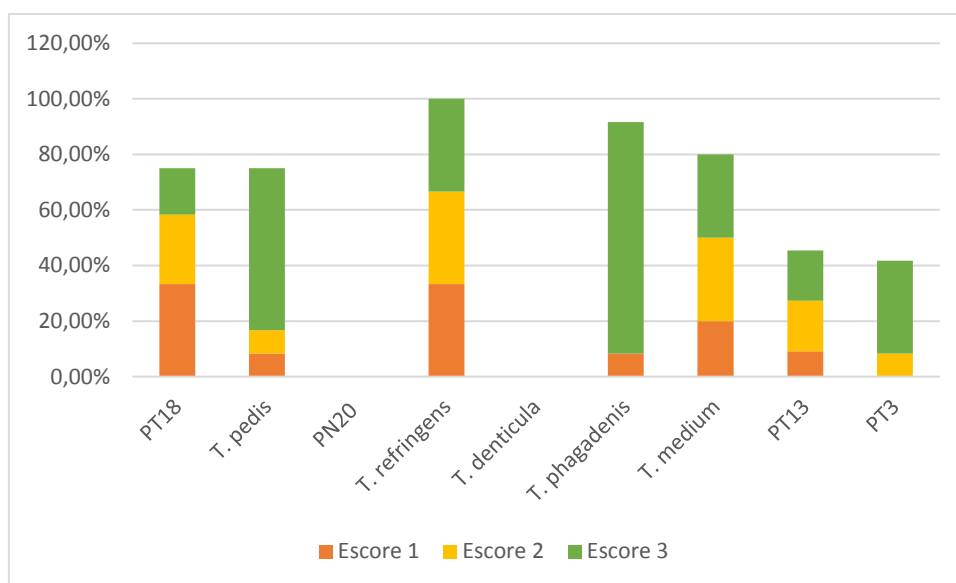


Figura 6. Frequência de filotipos de *Treponemas* e seus escores de densidade pelo método de *FISH* em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em MG, Brasil.

Tabela 7. Comparação entre frequências de identificação de filotipos de *Treponema* pelo método de *FISH* em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital analisado pelo método exato de *Fisher*.

Comparação entre frequências de identificação de filotipos de <i>Treponema</i>		Valor de p
<i>T. pedis</i> 75%	<i>T. refringens</i> 100%	0,11
<i>T. pedis</i> 75%	<i>T. phagedenis</i> 91,67%	0,2487
<i>T. pedis</i> 75%	<i>T. medium</i> 80%	0,6702
<i>T. refringens</i> 100%	<i>T. phagedenis</i> 91,67%	0,5
<i>T. refringens</i> 100%	<i>T. medium</i> 80%	0,11
<i>T. phagedenis</i> 91,67%	<i>T. medium</i> 80%	0,2487
<i>T. phagedenis</i> 91,67% <sup>A</sup>	PT13 45,45% <sup>B</sup>	0,0143
<i>T. phagedenis</i> 91,67% <sup>A</sup>	PT3 41,67% <sup>B</sup>	0,0054
<i>T. refringens</i> 100% <sup>A</sup>	PT13 45,45% <sup>B</sup>	0,0026
<i>T. refringens</i> 100% <sup>A</sup>	PT3 41,67% <sup>B</sup>	0,0008

Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística pelo método exato de *Fisher* ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 8. Comparação entre frequências de identificação de escore de densidade 3 de filotipos de *Treponema* pelo método de *FISH* em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital analisado pelo método exato de *Fisher*.

Comparação entre frequências de identificação de escore de densidade 3 de filotipos de <i>Treponema</i>		Valor de p
<i>T. pedis</i> 58,33%	<i>T. refringens</i> 33,33%	0,2141
<i>T. pedis</i> 58,33%	<i>T. phagedenis</i> 83,33%	0,1
<i>T. pedis</i> 58,33%	<i>T. medium</i> 30%	0,2141
<i>T. refringens</i> 33,33% <sup>A</sup>	<i>T. phagedenis</i> 83,33% <sup>B</sup>	0,0077
<i>T. refringens</i> 33,33%	<i>T. medium</i> 30%	0,6628
<i>T. phagedenis</i> 83,33% <sup>A</sup>	<i>T. medium</i> 30% <sup>B</sup>	0,0077
<i>T. pedis</i> 58,33% <sup>A</sup>	PT18 16,67% <sup>B</sup>	0,0482
<i>T. phagedenis</i> 83,33% <sup>A</sup>	PT18 16,67% <sup>B</sup>	0,0006
<i>T. pedis</i> 58,33% <sup>A</sup>	PT13 18,18% <sup>B</sup>	0,0482
<i>T. phagedenis</i> 83,33% <sup>A</sup>	PT13 18,18% <sup>B</sup>	0,0006
<i>T. phagedenis</i> 83,33% <sup>A</sup>	PT3 33,33% <sup>B</sup>	0,0077

Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística pelo método exato de *Fisher* ( $p \leq 0,05$ ).

## 5.2 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS DIFERENTES BACTÉRIAS ENCONTRADAS NAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL PELO MÉTODO DE *FISH*

A invasão bacteriana total dentro da epiderme em cada amostra de biópsia foi pontuada de 0 a 3, de acordo com Rasmussen et al. (2012) e Klitgaard et al. (2013). Os *Treponemas* foram as bactérias encontradas na parte mais profunda da lesão, com 81,25% classificadas como escore 3; 12,5% escore 2 e 6,25% escore 1. Dentre os vários filotipos de *Treponema* achados nesse estudo, aqueles que foram encontrados na parte mais profunda das lesões foram *T. refringens* com 83,33%

das amostras classificadas como escore 3; 8,33% escore 2 e 8,33% escore 1 e *T. phagedenis* com 81,82% das amostras classificadas como escore 3 e 18,18% escore 1. *T. pedis* com 66,67% das amostras classificadas como escore 3 e 33,33% escore 1; ambos os filotipos PT13 e PT3 tiveram 60% das amostras classificadas como escore 3 e a principal diferença foi que PT3 teve 20% das biópsias classificadas como escore 2 e PT13 não foi encontrado na parte intermediária da lesão; *T. medium* teve 37,5% das amostras classificadas como escore 3; 50% escore 2 e 12,5% escore 1; PT18 teve 33,33% das amostras classificadas como escore 3 e 66,67% escore 1. A bactéria *P. levii* foi encontrada em 100% das amostras na parte superficial da lesão (escore 1); *D. nodosus* teve 25% das amostras classificadas em escores 3 e 2 e 50% como escore 1; *F. necrophorum* teve 25% das amostras classificadas como escore 3 e 2 e 50% classificadas como escore 1 (Tab. 9 e Fig. 7).

Tabela 9. Distribuição espacial das bactérias pelo método de *FISH*, em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=31), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

<u>Frequência %</u>				
	<i>Treponema</i>	<i>D. nodosus</i>	<i>P. levii</i>	<i>F. necrophorum</i>
Escore 1	6,25	50,00	100,00	50,00
Escore 2	12,50	25,00	0,00	25,00
Escore 3	81,25	25,00	0,00	25,00

Tabela 10. Distribuição espacial dos filotipos de *Treponema* pelo método de *FISH*, em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

<u>Frequência %</u>									
	PT18	<i>T. pedis</i>	PN20	<i>T. refringens</i>	<i>T. denticula</i>	<i>T. phagedenis</i>	<i>T. medium</i>	PT13	PT3
Escore 1	66,67	33,33	0,00	8,33	0,00	18,18	12,50	40,00	20,00
Escore 2	0,00	0,00	0,00	8,33	0,00	0,00	50,00	0,00	20,00
Escore 3	33,33	66,67	0,00	83,33	0,00	81,82	37,50	60,00	60,00

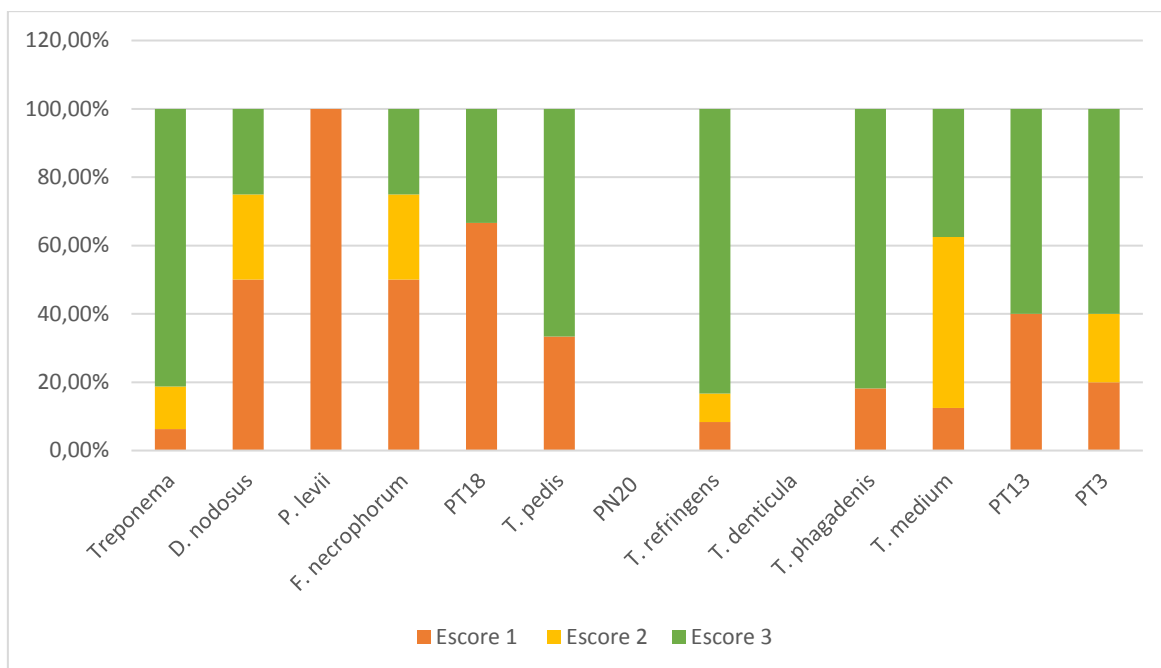


Figura 7. Distribuição espacial das bactérias e filotipos de *Treponema* pelo método de *FISH*, em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital, de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

### 5.3 MICROBIOMA ENCONTRADO NAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.

Tabela 11. Número de leituras de sequências de DNA realizadas nas amostras de rúmen, fezes e lesão de Dermatite Digital com identificação do gênero pela técnica de sequenciamento de nova geração probes V1 e V2.

Probes	V1 e V2			
	Ambiente	Rúmen	Fezes	Lesão
Total de leituras				
Realizadas	-	435.780	383.603	1.050.073
Com identificação do gênero	-	259.710	145.162	452.753

Tabela 12. Número de leituras de sequências de DNA nas amostras de ambiente, rúmen, fezes e lesão de Dermatite Digital com identificação dos filotipos pela técnica de sequenciamento de nova geração probes V3 e V4.

Probes	V3 e V4			
	Ambiente	Rúmen	Fezes	Lesão
Total de leituras				
Realizadas	48.530	205.088	153.737	897.039
Com identificação da espécie	12.651	11.430	1.480	516.746

Nas 35 amostras de lesões submetidas à técnica de sequenciamento de nova geração pelas probes V1 e V2 realizou-se 1.050.073 leituras de sequências de DNA e em 452.753 foi possível identificar o gênero. Foi encontrado um grande número de bactérias e os *Treponemas* estavam

presentes em 68,6% das lesões, *Porphyromonas* em 91,4%, *Mycoplasma* em 85,7%, *Helcococcus* em 74,4%, *Corynebacterium* em 60%, *Fusobacterium* em 45,7%, *Dichelobacter* em 40%, e *Alloiococcus* em 17,1% (Fig. 8). Quando foi avaliado a proporção de bactérias por amostra, verificou-se que os *Treponemas* apresentaram maior número de amostras com alta densidade. Quase metade, 48,6% das lesões era composta por mais de 20% de *Treponemas*; 34,3% das lesões eram compostas por mais de 50% de *Treponemas* e 20% das lesões eram compostas por mais de 80% de *Treponemas*; 48,6% das lesões eram compostas por mais de 20% de *Porphyromonas*; 14,3% das lesões eram compostas por mais de 20% de *Mycoplasma*; 8,6% das lesões eram compostas por mais de 20% de *Fusobacterium* e 2,9% das lesões eram compostas por mais de 20% de *Alloiococcus*, *Helcococcus* e *Corynebacterium* (Tab. 13).

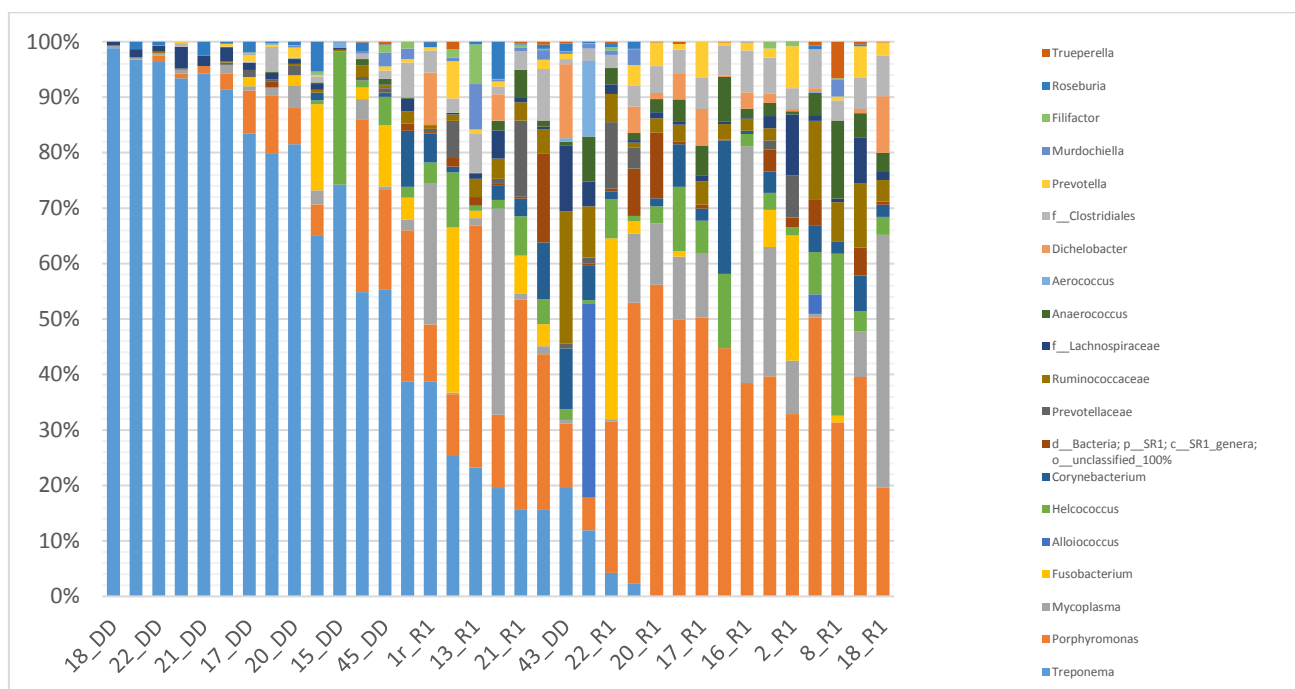


Figura 8. Bactérias encontradas nas lesões de Dermatite Digital pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2 (n=35), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

Tabela 13. Bactérias encontradas em maiores proporções no microbioma de lesões de Dermatite Digital pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2 (n=35), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

Proporção bacteriana DD	>20%	>50%	>80%
Treponema	48,6%	34,3%	20,0%
Porphyromonas	48,6%	0,0%	0,0%
Mycoplasma	14,3%	0,0%	0,0%
Fusobacterium	8,6%	0,0%	0,0%
Alloiococcus	2,9%	0,0%	0,0%
Helcococcus	2,9%	0,0%	0,0%
Corynebacterium	2,9%	0,0%	0,0%

Foram utilizadas as probes V3 e V4 (específicas para bactérias do gênero *Treponema*) nas amostras positivas para essas bactérias nas probes V1 e V2 (n=24) e realizou-se 897.039 leituras de seqüências de DNA e em 516.746 foi possível identificar a espécie. Foi encontrado em grande

parte das amostras *Treponemas* ainda não cultivados e não classificados pela literatura. Os filotipos descritos e encontrados com maior frequência nas lesões foram: *T. phagedenis*, *T. pedis*, *T. refringes* e *T. medium*, como demonstrado na Fig. 9.

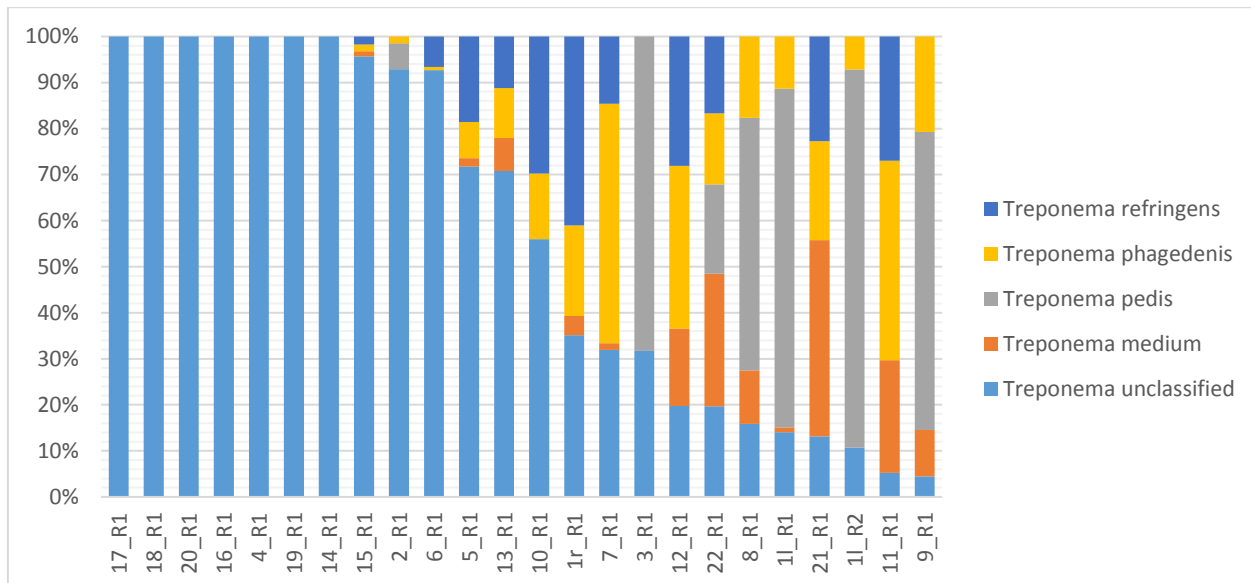


Figura 9. *Treponemas* encontradas nas lesões de Dermatite Digital pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V3 e V4 (n=24), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

Na comparação de frequências das duas técnicas, *FISH* e sequenciamento os resultados de *Treponema*, *Dichelobacter* e *Fusobacterium* foram semelhantes, porém *Porphyromonas* na técnica de *FISH* foi encontrada em 33,33% das amostras e na técnica de sequenciamento em 91,43%. A diferença dos dois métodos é que *FISH* procura especificamente a espécie, já o sequenciamento o gênero (Fig. 10).

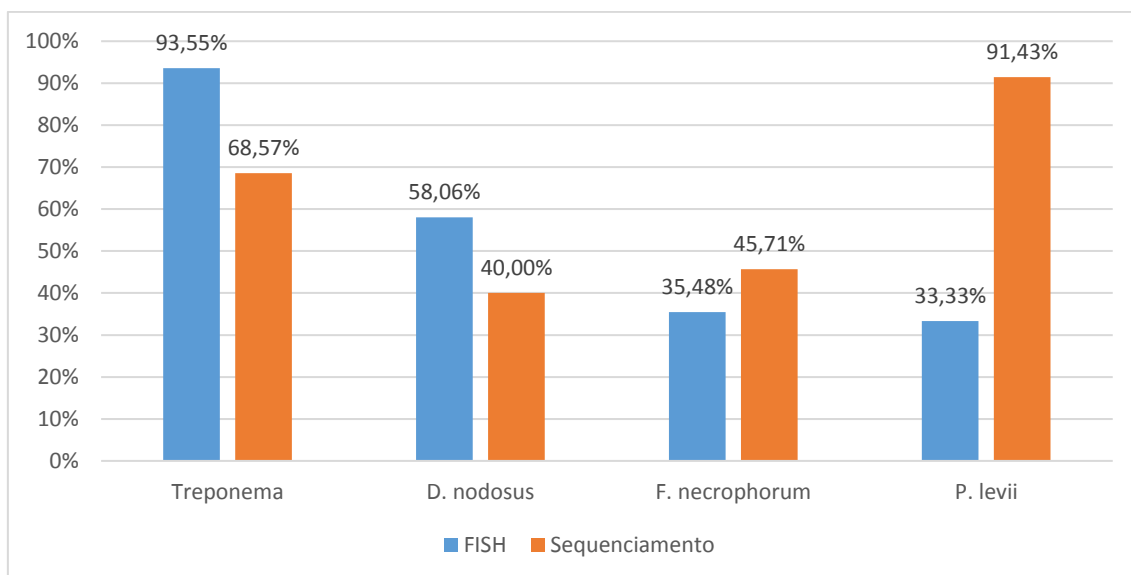


Figura 10. Comparação da frequência *Treponemas*, *D. nodosus*, *F. necrophorum* e *P. levii* encontradas em lesões de Dermatite Digital pelo método de *FISH* e sequenciamento de nova geração, de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

#### 5.4 MICROBIOMAS ENCONTRADOS NO RÚMEN E NAS FEZES DE VACAS LEITEIRAS PORTADORAS DE DERMATITE DIGITAL PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

Utilizando as probes V1 e V2 realizou-se 435.780 leituras de seqüências de DNA e em 259.710 foi possível identificar o gênero. Foi encontrado no fluido ruminal diversas espécies bacterianas, incluindo bactérias do gênero *Treponema*, como demonstrado na Fig. 11, porém a proporção média de *Treponemas* no fluido ruminal foi baixa, essas bactérias foram encontradas na proporção média de 0,87%. Nas amostras fecais também utilizando as probes V1 e V2 realizou-se 383.603 leituras de seqüências de DNA e em 145.162 foi possível identificar o gênero. Foram encontradas diferentes espécies bacterianas, incluindo os *Treponemas*, como demonstrado na Fig. 12. As proporções médias dos *Treponemas* nas amostras fecais também foram baixas, 1,36%. As mesmas amostras (rúmen e fezes) foram testadas com as probes V3 e V4 e no fluido ruminal foi encontrado em grande frequência, *Treponemas* ainda não cultivados e não identificados na literatura. Os filotipos *T. zioleckii*, *T. bryantii*, *T. berlinense* e *Sphaerochaeta globosa* também foram encontrados no rúmen, mas em baixas proporções como demonstrado na Fig. 13. As amostras fecais também foram dominadas por *Treponemas* ainda não identificados na literatura e os filotipos *T. zioleckii*, *T. bryantii*, *T. berlinense* também foram encontrados em baixas proporções nas fezes como demonstrado na Fig. 14. Nenhum desses filotipos identificados no ambiente ruminal e nas fezes foram encontrados nas lesões de DD nesse estudo.

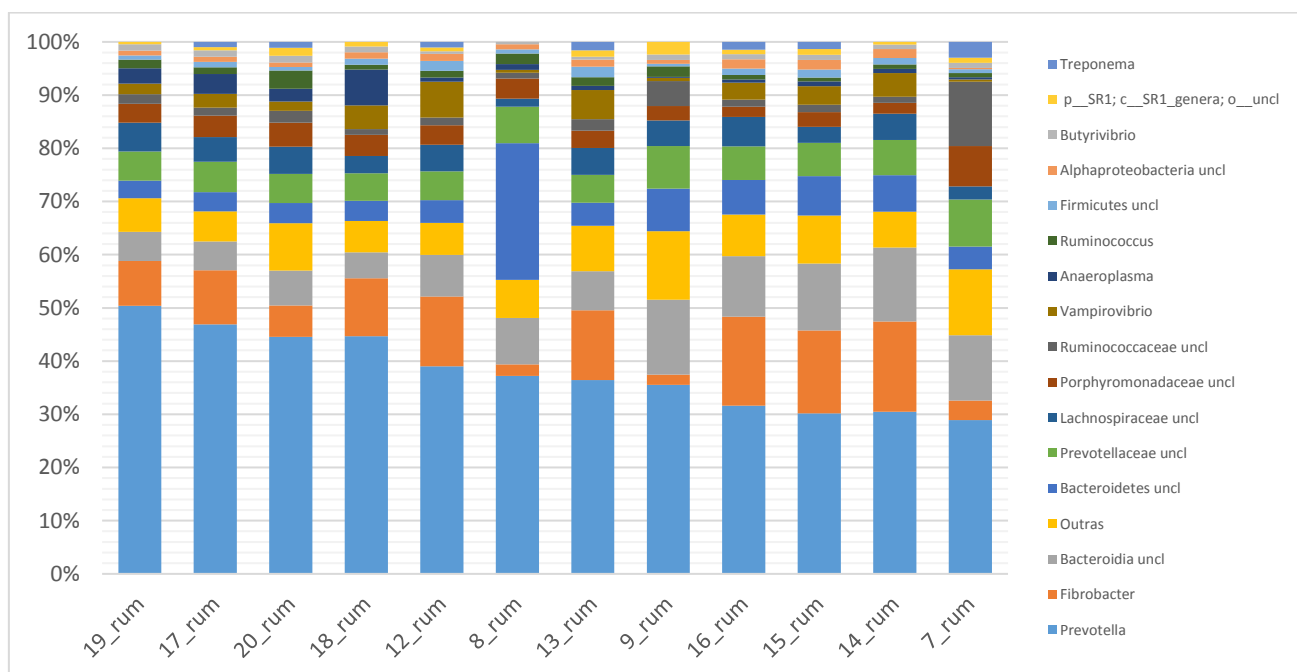


Figura 11. Bactérias encontradas no rúmen pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2 (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

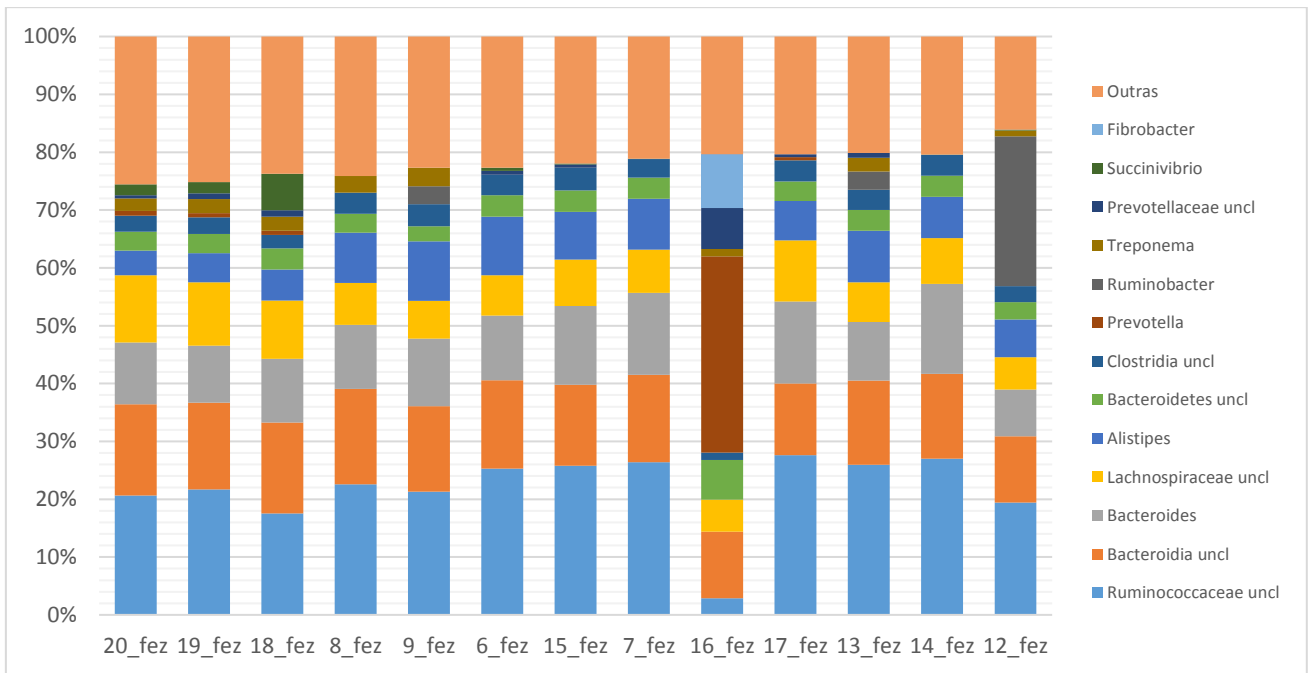


Figura 12. Bactérias encontradas nas fezes pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2 (n=13) de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

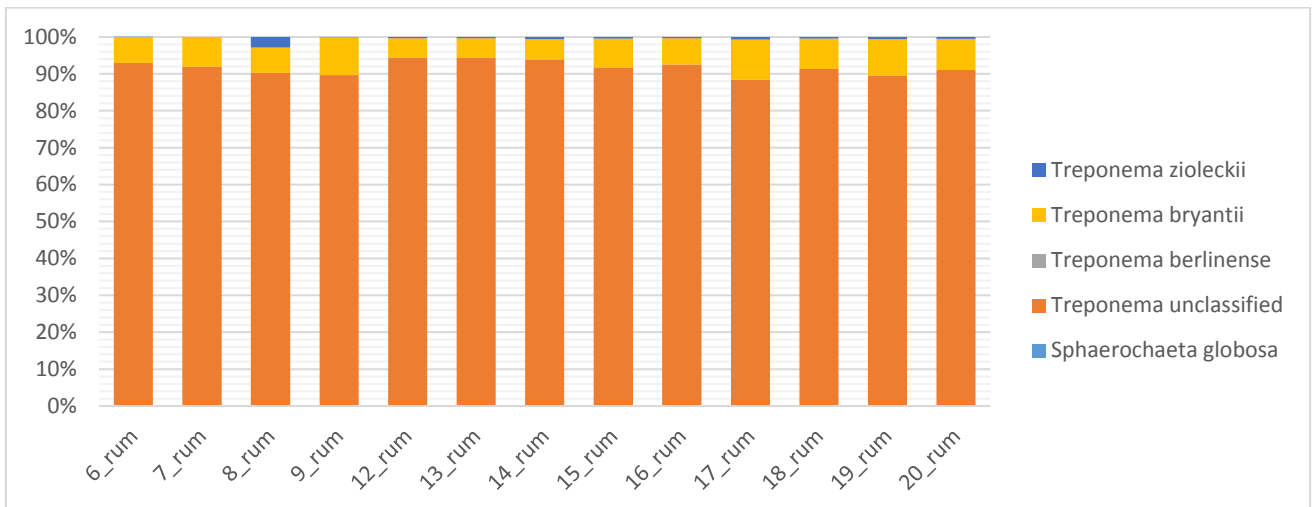


Figura 13. *Treponemas* encontrados no rúmen pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V3 e V4 (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

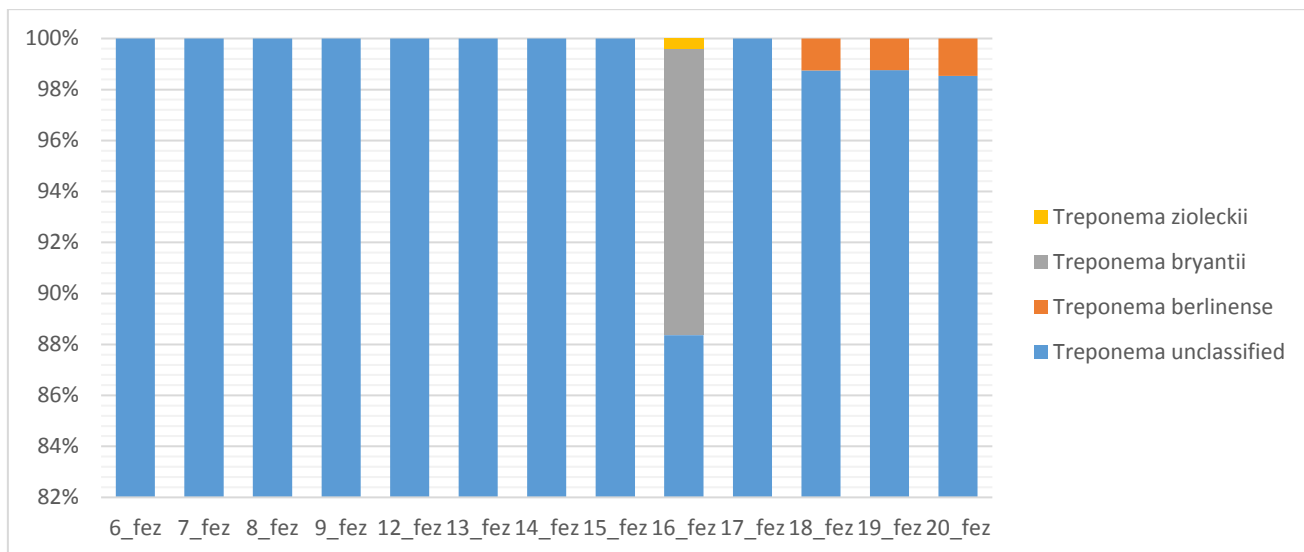


Figura 14. *Treponemas* encontrados nas fezes pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V3 e V4 (n=13), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

### 5.5 TREPONEMAS ENCONTRADOS NO AMBIENTE

Nas amostras ambientais com as probes V3 e V4 foram realizadas 48.530 leituras de seqüências de DNA e em 12.651 foi possível identificar a espécie. No bebedouro foi encontrado a presença de *Treponemas* e 100% dos *Treponemas* encontrados não foram previamente cultivados e identificados na literatura. No lava-pé foi encontrado 26% de *Treponemas* ainda não identificados e 74% do filotipo *T. zuelzeræ*. Na sala de espera da ordenha foi encontrado 18,2% de *Treponemas* ainda não identificados e 81.8% do filotipo *T. zuelzeræ*; na pista de alimentação 100% dos *Treponemas* encontrados não foram ainda classificados pela literatura e no pedilúvio 100% dos *Treponemas* encontrados eram do filotipo *T. medium*. Esses dados estão demonstrados na Fig. 15. *T. zuelzeræ* não foi identificado em nenhuma lesão de DD nesse trabalho, já *T. medium* foi encontrado com alta frequência e altas proporções nas lesões de DD.

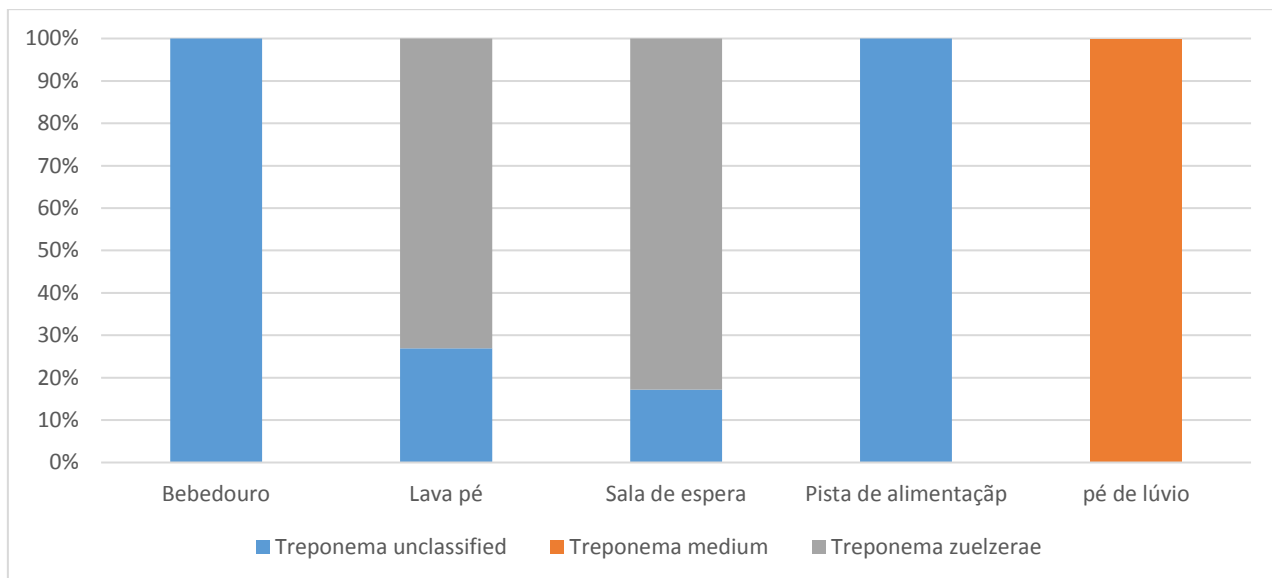


Figura 15. *Treponemas* encontradas no ambiente pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V3 e V4 em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

#### 5.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS BACTÉRIAS PESQUISADAS PELO MÉTODO DE *FISH* EM LESÕES DE DERMATITE DIGITAL

*Treponemas* e *D. nodosus* foram encontrados juntos em 58,06%; *Treponemas* e *F. necrophorum* em 32,26%; *Treponemas* e *P. levii* em 25,81%. *D. nodosus* e *F. necrophorum* 25,81%; *D. nodosus* e *P. levii* 19,35%. *F. necrophorum* e *P. levii* 19,35%. Os quatro agentes juntos foram encontrados em 9,68% das lesões.

#### 5.7 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL E MICROBIOMA ENCONTRADO NA PELE ÍNTEGRA

As lesões de DD foram classificadas de M1 a M4.1 de acordo com a classificação proposta por Dopfer et al. (1997) e Zinicola et al. (2015) e foram encontradas: quatro lesões na fase M1; 26 lesões na fase M2 e sete lesões na fase M3, as fases M4 e M4.1 não foram avaliadas nesse estudo. As fases M1 e M2 foram dominadas principalmente por bactérias do gênero *Treponema*, já a fase M3 foi dominada pelas bactérias do gênero *Porphyromonas* (Fig. 16).

As três amostras de pele íntegra foram coletadas adjacentes à lesão de DD e foram nomeadas como: PI1, PI2 e PI3. Pela técnica de sequenciamento de nova geração probes V1 e V2 os filos predominantes encontrados na amostra PI1 foram: *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e as bactérias mais frequentes foram: *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Anaerococcus* e *Peptoniphilus*. Na amostra PI2 foram encontrados os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e as bactérias mais frequentes foram: *Corynebacterium*, *Peptoniphilus* e *Murdochiella*. Na amostra PI3 foram também encontrados os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e as bactérias mais frequentes foram: *Porphyromonas*, *Corynebacterium*, *Murdochiella*, *Anaerococcus* e *Peptoniphilus*. Pela técnica de *FISH* foi encontrado a presença de *Treponemas* na amostra PI1, na amostra PI2 foi encontrado a presença de *D. nodosus*, ambos na parte superficial da lesão e na amostra PI3 nenhuma das duas bactérias pesquisadas foi encontrada.

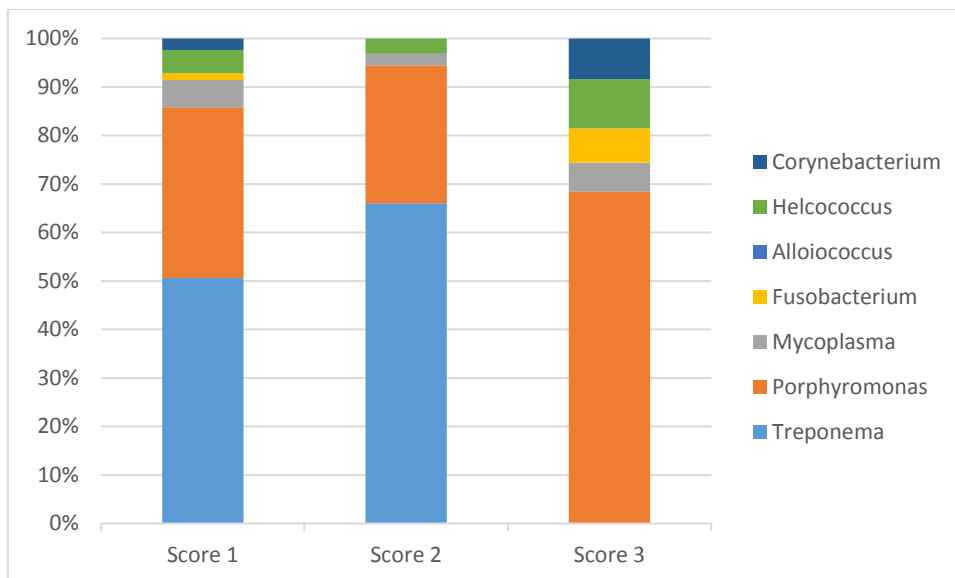


Figura 16. Microbiomas encontrados nas fases M1, M2 e M3 da Dermatite digital pela técnica de sequenciamento de nova geração probes V1 e V2 (n=35), de vacas em uma propriedade localizada em Minas Gerais, Brasil.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 MICROBIOMAS ENCONTRADOS NAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL

Os resultados encontrados nesse estudo pela técnica de *FISH* e sequenciamento de nova geração reforçam o conceito de que bactérias do gênero *Treponema* são os agentes mais importantes envolvidos na patogênese da DD, sugerindo uma etiologia “multitreponemal” para essa doença. Esses resultados corroboram como os achados de diversos estudos, que também encontraram *Treponemas* como o agente predominante nas lesões (Krull et al, 2014; Zinicola et al, 2015; Nielsen et al, 2016). No presente trabalho os *Treponemas* foram encontrados em 93,55% das lesões e mais de 70% delas classificadas como escore de densidade 3, ou seja, os *Treponemas* estavam compondo mais de 10% do número total de bactérias encontradas, como demonstrado na Fig. 5 e Tab. 3. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Evans et al. (2008) que também encontraram filotipos de *Treponema* em mais de 90% das lesões de DD. Além disso, Klitgaard et al. (2013) verificaram que mais de 90% das lesões avaliadas foram também classificadas como escore de densidade 3 para *Treponemas*. Pela técnica de sequenciamento de nova geração, as bactérias do gênero *Treponema* também foram as que tiveram maiores proporções dentro das lesões de DD, com mais de 30% delas compostas por 50% ou mais de *Treponemas* e 20% compostas por mais de 80% de *Treponemas*, como demonstrados na Tab. 13. Esta etiologia “multitreponemal” parece ser uma característica fundamental para o desenvolvimento da doença. Essa teoria é apoiada por Gomez et al. (2012) que conseguiram reproduzir a doença a partir da inoculação de um macerado de lesões de DD na pele de animais saudáveis. Faz-se necessário destacar que essa infecção se estabeleceu após as extremidades dos membros posteriores destes animais terem sido enfaixadas, umedecidas e mantidas em um ambiente de anaerobiose por um período de 12 a 25 dias. Nesta situação extrema, foi reproduzida a lesão de DD e detectada a presença de *Treponemas* pela técnica de *FISH*.

As bactérias do gênero *Treponema* foram os agentes mais frequentes encontrados nas partes

profundas da lesão, com mais de 80% delas classificadas como escore 3, ou seja, elevado número de bactérias invasivas, (Tab. 9 e Tab. 10). Lux et al. (2001) avaliando doenças periodontais em seres humanos causados por *Treponemas*, principalmente por *T. denticola*, mostraram que a capacidade de penetrar nos tecidos é um importante fator de virulência de espiroquetas patogênicas e que sua motilidade permite que elas invadam o tecido e migrem para locais favoráveis à sua proliferação. Embora seja evidente que *Treponemas* patogênicos migrem para o interior dos tecidos, é ainda pouco esclarecido se esses movimentos são aleatórios ou dirigidos por um sistema de quimiotaxia. Uma teoria sugerida por esses autores é que moléculas liberadas pelas células danificadas podem ser captadas por quimiorreceptores desses agentes e podem atraí-los para esses pontos enfraquecidos, facilitando assim, sua penetração. A doença periodontal é uma infecção mista e complexa semelhante à DD, que envolve fatores de virulência, tais como, adesão tecidual, supressão imunitária e destruição do tecido (Chan et al, 1993). Outros fatores de virulência também já foram identificados em *Treponemas* causadores de doenças periodontais em seres humanos, como a produção de adesinas e de enzimas proteolíticas e colagenolíticas que causam danificação e destruição tecidual (Rosen et al, 1994; Rosen et al, 1995).

Vários trabalhos já mostraram que bactérias do gênero *Treponema* podem causar algum grau de depressão das respostas imunológicas, prejudicando não só a resposta imune inata, mas também a reparação tecidual (Shenker et al, 1984; Sela et al, 1997; Losinger et al, 2006). Se todos esses fatores de virulência encontrados nos *Treponemas* causadores da doença periodontal em seres humanos estiverem presentes nos *Treponemas* que causam a DD, é possível que este agente possa sozinho, colonizar e lesar o tecido sadio através da produção de enzimas proteolíticas e colagenolíticas, formando assim a lesão de DD. Trabalhos como de Kliggaard et al. (2013) mostraram que a presença de outras bactérias que não pertenciam ao gênero *Treponema* nas partes intermediárias e profundas das lesões foram insignificantes.

Foram identificados sete filotipos de *Treponema* nas amostras de DD pela técnica de *FISH*. Não foi verificada diferença entre a frequência dos filotipos *T. refringes*, *T. phagedenis*, *T. médium* e *T. pedis*, porém houve diferença estatística de frequência entre *T. refringes* e *T. phagedenis* quando comparados com PT13 e PT3. É importante destacar que *T. phagedenis* foi o filotipo encontrado em maior densidade. A observação dos resultados da análise estatística sugere que o *T. pedis* ocupe uma posição intermediária entre o *T. phagedenis* e os filotipos *T. refringes* e *T. pedis* em relação a densidade Tab. 4 e Tab.5. *T. pedis* apresentou diferença estatística quando comparado aos filotipos PT3 e PT18 e *T. phagedenis* também apresentou diferença estatística quando comparado aos filotipos PT3, PT18 e PT13. Klitgard et al (2013) semelhante a este trabalho também encontrou os filotipos PT3, PT18 e PT13 em menores frequências e densidades nas lesões.

Os filotipos achados nesse estudo, também foram encontrados em diversos trabalhos realizados em diferentes países no mundo (Klitgaard et al, 2008; Santos et al, 2012; Klitgaard et al, 2013; Krull et al, 2014; Nielsen et al, 2016). Pela técnica de sequenciamento de nova geração foram encontrados os filotipos *T. phagedenis*, *T. pedis*, *T. refringes* e *T. medium* e em grande proporção *Treponemas* ainda não identificados e classificados pela literatura.

Apesar da DD ser uma doença extremamente importante, que leva os animais a severas claudicações e elevadas perdas econômicas, principalmente na bovinocultura de leite, este trabalho é um dos poucos estudos no Brasil que utilizaram técnicas moleculares para tentar descrever os possíveis agentes patogênicos envolvidos nessa enfermidade. Nascimento et al. (2015) utilizando a técnica de PCR foi o primeiro trabalho que descreveu as espécies de

*Treponemas* em lesões de DD em rebanhos leiteiros no sul do Brasil. Eles encontraram os filotipos *T. phagedenis*, *T. medium*, *T. vicentii*, *T. denticola* e *T. putidum* juntos em mais de 80% das biópsias de DD. No presente trabalho, pela alta frequência, alta proporção e distribuição espacial, os filotipos *T. phagedenis*, *T. pedis* e *T. refringes*, diagnosticados pela técnica de *FISH*, são os principais *Treponemas* envolvidos na DD. Além disso, os dados apresentados nesse estudo pela técnica de sequenciamento de nova geração mostram que grande parte das lesões apresentaram, em altas proporções, *Treponemas* ainda não classificados pela literatura, levando a hipótese de que podem existir mais filotipos participando da etiologia dessa enfermidade. Diante dessa realidade são necessários mais estudos sobre a etiologia dessa doença tão importante e melhor definição da participação de outras espécies de *Treponema*.

Outras bactérias encontradas com alta frequência nas lesões foram *D. nodosus* e *F. necrophorum*, Tab. 3 e Fig. 5. A Dermatite interdigital dos bovinos tem como principal agente etiológico *D. nodosus* (Cervigni et al, 2008). Já o Flegmão interdigital que se caracteriza por uma inflamação aguda e difusa, com hipertermia local, hiperemia, edema, aumento de volume acentuado e dor, levando a manqueira grave nos animais, tem como principal agente o *F. necrophorum* (Nicolletti, 2004). Esses dois agentes também agem em sinergismo para causar o *footrot* ou pododermatite infecciosa dos ovinos, uma doença contagiosa onde *D. nodosus* é o agente primário e *F. necrophorum* o agente secundário (Bishop et al, 2010; Egerton et al, 1969; Witcomb et al, 2014). Maboni et al. (2016) também concordam com essa teoria, mas reforça que são necessários mais estudos para compreender a ação sinérgica entre esses dois microrganismos e elucidar melhor quem é o agente etiológico primário e quem é o secundário e como ocorre essa interação.

Rasmunssen et al. (2012) semelhante a esse estudo, encontraram a presença de *D. nodosus* em 51% das biópsias de DD e levantaram a hipótese de que *D. nodosus* através da sua produção de proteases extracelulares, podem causar danos ao tecido e facilitar a penetração e colonização de bactérias do gênero *Treponema*, dessa forma esses dois agentes podem agir sinérgicamente, principalmente na fase inicial da doença. Em relação ao *F. necrophorum* outros trabalhos também já conseguiram identificá-lo nas lesões (Sullivan et al, 2015; Nielsen et al, 2016), porém ainda não foi elucidado sua real participação na DD. Esses dois agentes foram encontrados em densidades inferiores aos *Treponemas* e, além disso, mais de 80% das biópsias encontraram *Treponema* na parte mais profunda da lesão, contra 25% de *D. nodosus* e *F. necrophorum*. Esses microrganismos podem ter uma contribuição no estabelecimento da lesão a partir da produção de proteases, abrindo portas de entrada ou criando ambientes favoráveis ao *Treponema* ou ainda colonizando tecidos lesados primariamente pelos *Treponemas* e ocasionando necrose.

Alguns trabalhos mostram uma associação sinérgica de *P. levii* e *F. necrophorum* para ocasionar o flegmão interdigital (Quinn et al, 2005) e, além disso, a espécie *Porphyromonas gingivalis* em associação com *T. denticola* podem levar a doenças periodontais crônicas em seres humanos. Esta bactéria, *P. gingivalis*, é conhecida por ter vários fatores de virulência que causam destruição e penetração no tecido conjuntivo periodontal, como a produção de proteases, metaloproteinases e collagenases que causam lesão tecidual. Possuem também a presença de fimbrias para adesão e colonização ao tecido e são bactérias anaeróbicas, Gram negativas, que tem em sua parede lipopolissacarídeos (LPS) que estimulam grandes respostas inflamatórias e perturbam o processo de remodelação óssea e reparação do tecido (Walter et al, 2004; How et al, 2016; Leon et al, 2016).

Nesse trabalho *P. levii* foi encontrada pela técnica de sequenciamento de nova geração como uma das bactérias mais frequentes e pelo método de *FISH*, esteve presente apenas na parte superficial

da lesão, além disso, foi encontrada em duas de três amostras de pele íntegra. Vale a pena destacar que pelo método de *FISH* foi realizado diagnóstico apenas da espécie *P. levii*, enquanto no método de sequenciamento diagnosticou-se o Gênero *Porphyromonas* em alta frequência e proporção. Assim, merece destaque, a possibilidade de outras espécies de *Porphyromonas* estarem envolvidas na patogenia da DD. Este agente pode ter uma participação na fase inicial da doença, agindo em sinergismo com outras bactérias para colonização do tecido ou podem ser bactérias oportunistas que colonizam a lesão secundariamente. Ou até mesmo estarem diretamente ligadas com a patogênese da DD. Como ocorre também com *D. nodosus* e *F. necrophorum*. A *Porphyromonas* foi encontrada em grande proporção pela técnica de sequenciamento de nova geração na fase M3 da DD, o que sugere uma colonização mais tardia da lesão.

Outro agente encontrado nesse estudo pela técnica de sequenciamento de nova geração foram as bactérias do gênero *Mycoplasma*, esse microrganismo foi achado em 85,7% das lesões e em 14,3% delas teve uma proporção maior que 20% em relação ao número total de bactérias encontradas (Fig.8, Tab.13). *Mycoplasmas* são os menores procariontes com replicação autônoma, sendo bactérias extracelulares com afinidade pelas mucosas, onde vivem como comensais ou patógenos. Esse agente pode causar várias doenças nos bovinos como pleuropneumonias, artrites, ceratoconjuntivites e mastites, porém seus fatores de virulência não foram completamente esclarecidos (Radostits et al, 2016). Exceto pelo trabalho de Krull et al. (2014) que levantaram a hipótese de que *Mycoplasma* pode ter importância na transição de lesões iniciais para lesões ativas (M2), este agente até o momento não tem recebido muita atenção como um agente patogênico da DD. O trabalho de Krull et al. (2014) e Nielsen et al. (2016) foram os dois únicos trabalhos que identificaram esse agente em lesões de DD, logo são necessários mais estudos para elucidar sua importância e seu real papel na DD.

As bactérias *Corynebacterium*, *Alloicoccus* e *Helcococcus* foram ambas encontradas em 2,9% das lesões com uma proporção maior que 20% do número total de bactérias pela técnica de sequenciamento de nova geração. Esses agentes quando encontrados em outros estudos como Zinicola et al. (2015), também foram achados em um número pequeno de biópsias de DD e a hipótese é que são agentes oportunistas que colonizam a lesão.

No ano de 1870, Robert Koch propôs um número de critérios que tinha que ser preenchido por determinado agente para ser confirmado como causa de uma doença específica. Para os postulados de Koch serem preenchidos, o microrganismo deve ser demonstrado pelo isolamento em culturas puras dos tecidos de animais com a doença. Além disso, quando introduzido em um animal susceptível saudável, deve causar a doença. Deve também ser possível isolar o microrganismo do animal infectado experimentalmente e o isolado deve ser idêntico ao microrganismo original. Embora muitas doenças infecciosas dos animais possam preencher os postulados de Koch, fica claro que algumas não os preenchem. Os postulados de Koch não se aplicam a doenças causadas por patógenos oportunistas. Da mesma forma, também não são preenchidos por doenças causadas por agentes infecciosos múltiplos (Quin et al, 2005).

Os resultados desse trabalho mostram que a DD é principalmente uma doença polimicrobiana com predomínio de bactérias do gênero *Treponema*. Devido a dificuldade em cultivar essas bactérias, associado à interação de vários agentes para causar a lesão de DD é que os postulados de Koch apresentam dificuldades para serem cumpridos na DD.

## 6.2 MICROBIOMAS ENCONTRADOS NO RÚMEN E FEZES DE VACAS LEITEIRAS

Quando utilizado as probes V1 e V2 pela técnica de sequenciamento de nova geração, tanto no rúmen como nas fezes foram encontradas diversas espécies bacterianas, incluindo bactérias do gênero *Treponema*, que foram achadas em baixa proporção em relação ao total de bactérias. Essas bactérias foram encontradas na proporção média de 0,87% e 1,36% respectivamente. As mesmas amostras (rúmen e fezes) foram testadas com as probes V3 e V4 específicas para *Treponema* e foram encontradas em grande frequência *Treponemas* ainda não cultivados e identificados na literatura. Nenhum filotipo identificado no líquido ruminal e nas fezes foram encontrados nas lesões de DD nesse estudo.

A transmissão da DD dentro dos rebanhos não é totalmente esclarecida, assim como sua etiologia, que é objeto de estudo a mais de três décadas. Nos últimos anos, alguns poucos trabalhos tentaram elucidar se existem outros locais que podem servir como reservatórios ou rotas de transmissão para DD dentro das propriedades. Uma possível hipótese é que os próprios bovinos possam ter em seu trato gastrointestinal bactérias do gênero *Treponema* e que os próprios animais sejam reservatórios e mantenham esses agentes dentro das fazendas. Evans et al. (2011) semelhante a esse estudo, não encontraram no trato gastrointestinal de bovinos os mesmos *Treponemas* relacionados à DD. Já Klitgaard et al. (2014) encontraram *Treponemas* relacionados à DD em amostras fecais de vacas leiteiras, porém a frequência destes foi extremamente baixa, sendo inferior a 0,5% do número total de bactérias. Nascimento et al. (2015) coletaram fluido ruminal de 15 vacas leiteiras portadoras de DD em sete diferentes propriedades e utilizando a técnica de PCR encontraram em 60% das amostras de líquido ruminal, pelo menos um dos filotipos patogênicos para DD, sendo *T. phagedenis* o mais frequente. Zinicola et al. (2015) também encontraram filotipos patogênicos relacionados a DD em amostras de fezes e líquido ruminal.

Neste trabalho foi encontrado filotipos de *Treponemas* no rúmen e nas fezes caracterizados como não patogênicos, porque não estavam presentes nas lesões de DD, porém também foi encontrado em alta frequência filotipos ainda não identificados e não classificados na literatura tanto nas amostras de fezes e rúmen como nas lesões de DD. Isso leva a hipótese de que podem existir filotipos de *Treponemas* ainda não conhecidos e que estão causando a DD dentro dos rebanhos e o próprio bovino pode servir como um reservatório dessas bactérias, sendo esses agentes parte da flora comensal dos animais.

## 6.3 TREPONEMAS ENCONTRADOS NO AMBIENTE

No piso ao redor do bebedouro, lava-pés, sala de espera e pista de alimentação foi encontrado o filotipo *T. zuelzerae* que não foi achado em nenhuma lesão de DD e em grandes proporções *Treponemas* ainda não identificados e classificados pela literatura, no pedilúvio foi encontrado *T. medium* que esteve presente em altas frequências e altas densidades nas lesões de DD, como mostrado na Tab. 6. Klitgaard et al. (2014) também encontraram *Treponemas* nas amostras ambientais, mas em proporções muito baixas. Clegg et al. (2015) relataram um aumento nos casos de claudicação em alces selvagens na América do Norte e realizaram biópsias desses animais, sendo quatro, de alces clinicamente saudáveis e três de alces com uma lesão semelhante a DD. Foi encontrada a presença de *Treponemas* nas lesões e na pele íntegra não foi encontrado. Este foi o primeiro relato de DD em animais selvagens e uma das hipóteses levantadas pelos autores é que as pastagens utilizadas pelos alces foram anteriormente usadas por bovinos e ovinos, sugerindo que o ambiente pode atuar como um potencial reservatório para essas bactérias.

Como nas amostras colhidas de rúmen e fezes foi também encontrado no ambiente uma alta frequência de *Treponemas* ainda não identificados pela literatura, sugerindo que alguns locais dentro da propriedade possam servir como rotas de transmissão para esses microorganismos. Apesar de ter sido encontrado *T.medium* dentro do pedilúvio, o número de leituras para esse filotipo, pela técnica de sequenciamento de nova geração foi extremamente baixa, dessa forma não podemos afirmar que o pedilúvio, uma ferramenta importante para prevenção de doenças podais, possa ser também um veículo de transmissão de doenças. Ambientes úmidos e com grande quantidade de matéria orgânica podem aumentar a incidência e disseminação da DD (Relun et al, 2013), mas existem poucos trabalhos que conseguiram isolar *Treponema* de amostras ambientais.

#### 6.4 MICROBIOMAS ENCONTRADOS NAS VÁRIAS FASES DA DERMATITE DIGITAL E NA PELE ÍNTEGRA

O presente estudo identificou diferenças no microbioma de lesões de DD, nas fases M1, M2 e M3. As bactérias do gênero *Treponema* representaram na fase M1 mais de 50% do total de bactérias encontradas, na fase M2, *Treponemas* representaram quase 70% do total de bactérias encontradas e na fase M3, *Treponemas* já não foram mais vistos (Fig. 16). Nessa fase as bactérias predominantes foram *Porphyromonas*. Essa mudança da microbiota em diferentes fases da lesão também foi encontrada em outros trabalhos como Santos et al. (2012); Krull et al. (2014); Zinicola et al. (2015) e Nielsen et al. (2016) onde as fases M1 e M2 classificadas como lesões ativas, apresentaram um grande predomínio de bactérias do gênero *Treponema* e foram sendo substituídas gradativamente por outras bactérias nas fases M3 e M4, classificadas como lesões inativas.

Nas três amostras de pele saudável os Filos predominantes encontrados pela técnica de sequenciamento de nova geração foram *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, esses Filos também foram encontrados nos trabalhos de Santos et al. (2012) e Nielsen et al. (2016) e as bactérias predominantes na pele íntegra que também foram encontradas em médias e altas proporções nas lesões de DD foram *Porphyromonas* e *Fusobacterium* (amostra PI1) e *Porphyromonas* (amostra PI3). Pela técnica de *FISH* foi encontrado nas amostras PI1 a presença de *Treponemas* e na amostra PI2 a presença de *D. nodosus*. Como as biópsias de pele íntegra foram feitas adjacentes a lesão e não de animais clinicamente saudáveis, não se pode afirmar que essa seja a microbiota correspondente de um animal saudável, uma vez que a pele íntegra pode já ter sido invadida pelas bactérias da lesão de DD.

### 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados nesse estudo mostram que a DD é uma doença polimicrobiana. As bactérias do gênero *Treponema* parecem ser as mais importantes na sua etiologia, com presença de vários filotipos, o que a caracteriza como “multitreponemal”. Além dos *Treponema*, outras bactérias como *D. nodosus*, *F. necrophorum* e *Phorphyromonas* foram encontradas em intensidade variada entre as amostras e os métodos de diagnóstico utilizados. Com isso, há a necessidade de elucidar melhor a interação entre estas bactérias, bem como a participação dos filotipos de *Treponemas*, de forma a esclarecer quais são os verdadeiros agentes etiológicos primários e secundários, quais participam ativamente da formação da lesão e quais poderiam abrir portas de entrada ou criar ambientes favoráveis a proliferação das outras bactérias. Além disso, o trato gastrointestinal dos bovinos parece ser um reservatório para os *Treponemas*, porém não foram encontrados os mesmos filotipos presentes nas lesões. Vale a pena destacar que a maioria

dos filotipos encontrados pela técnica de sequenciamento de nova geração tanto no rúmen quanto nas lesões de DD, ainda são desconhecidos pela literatura.

Apesar da DD ser amplamente distribuída dentro das propriedades leiteiras, com altas prevalências e incidências, existem propriedades livres dessa patologia, logo um estudo do microbioma do trato gastrointestinal e da pele sadia dos pés dos animais de propriedade livres da doença, precisam ser realizadas, para compreensão dos bovinos como reservatórios dessas bactérias.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, a partir da metodologia utilizada, permitem concluir que a etiologia da DD é “polimicrobiana e multitreponemal”. Existem vários filotipos de *Treponema* envolvidos na etiologia da DD, porém entre os conhecidos, o *T. phagedenis* e o *T. pedis* merecem destaque pela sua frequência e densidade. Existe um grande número de filotipos de *Treponema* ainda não classificados, circulando no ambiente e presentes nas lesões de DD e no trato gastrointestinal das vacas, sugerindo que a microbiota do trato gastrointestinal e o ambiente da fazenda podem atuar como reservatórios de bactérias envolvidas na patogênese da DD.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.; FUCHS, B.M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Cur. Opin. Biotechnol.*, v.12, n.3, p.231–236, 2001.
- APLEY, M.D. Clinical evidence for individual animal therapy for papillomatous digital dermatitis (hairy heel wart) and infectious bovine pododermatitis (foot rot). *Vet. Clin. North Am Food Anim. Pract.*, v. 31, n. 1, p. 81-95, 2015.
- BARKER, Z. E.; LEACH, K. A.; WHAY, H. R.; BELL, N. J.; MAIN, D. C. J. Assessment of lameness prevalence and associated risk factors in dairy herds in England and Wales. *J. Dairy Sci.*, v. 93, n. 3, p. 932–941, 2010.
- BAUMAN, J.G.J.; WIEGANT, J.; BORST, P.; DUIJN, P. A new method for microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp. Cell Res.*, v.128, n. 2, p.485- 490, 1980.
- BERRY, S.L.; READ, D.H.; FAMULA, T.R.; MONGINI, A.; DÖPFER, D. Long-term observations on the dynamics of bovine digital dermatitis lesions on a California dairy after topical treatment with lincomycin HCl. *Vet. J.*, v.193, n. 3, p. 654–658, 2012.
- BISHOP, S.C.; AXFORD, R.F.E.; NICHOLAS, F.W.; OWEN, J.B. *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. 3. ed. Londres: Cabi, 2010, 338p.
- BLOWEY, R.W.; SHARP, M.W. Digital dermatitis in dairy cattle. *Vet. Rec.*, v. 122, n. 21, p. 505–508, 1988.
- BORGES, J.R.J.; PITOMBO, C.A.; SANTIAGO, S.S.; RIBEIRO, P.N.; RONCONI, M.A. Incidência de afecções podais em bovinos leiteiros submetidos a diferentes sistemas de manejo. *Arq. Esc. Med. Vet. UFBA*, v. 14, p. 34 –42, 1992.
- BRANDT, S.; APPRICH, V.; HACKL, V.; TOBER, R.; DANZER, M.; KAINZBAUER, C.; GABRIEL, C.; STANEK, C.; KOFLER, J. Prevalence of bovine papillomavirus and *Treponema* DNA in bovine digital dermatitis lesions. *Vet. Microbiol.*, v. 148, n. 2-4, p. 161–167, 2011.
- BRUIJNIS, M.R.N.; HOGEEVEEN, H.; STASSEN, E.N. Assessing economic consequences of foot disorders in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model. *J. Dairy Sci.*, v. 93 n. 6, 2010.

CAPION, N.; BOYE, M.; EKSTRØM, C.; DUPONT, K.; JENSEN, T. K. A Study into Digital Dermatitis Transmission and Bacterial Associated Pathological Changes Involved in the Disease. *Open J. Vet. Med.*, v. 3, n. 2, p. 192–198, 2013.

CAPION, N.; THAMSBORG, S.M.; ENEVOLDSEN, C. Prevalence of foot lesions in Danish Holstein cows. *Vet. Rec.*, v. 163, n. 3, p. 80-85, 2008.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciênc. Rural*, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CASAGRANDE, F.P. *Perfil metabólico e mineral de vacas no período peri-parto: qualidade e conformação dos cascos*. 2013. 125f. (Tese de Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CASTRO, G. R.; BRITO, L. A. B.; FIORAVANTI, M. C. S.; SILVA, L. A. F.; ARAÚJO, E. G.; ORLANDO, C. F. P.; FRANCO, L. G.; MOURA, M. I. Estudo anatomopatológico de lesões de Dermatite Digital em bovinos. *Ciênc. Animal Bras.*, v. 9, n. 4, p. 1159-1166, 2008.

CERVIGNI JUNIOR, N.; BARROS, R.G.; TOLEDO-PINTO, E.A. Dermatite Interdigital. *Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.*, n. 10, 2008.

CHAN, E. C.; SIBOO, R.; KENG, T.; PSARRA, N.; HURLEY, R.; CHENG, S. L.; IUGOVAZ, I. *Treponema denticola* (ex Brumpt 1925) sp. nov., nom. rev., and Identification of New *Spirochete* Isolates from Periodontal Pockets. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 43, n. 2, p. 196–203, 1993.

CHELI, R. e MORTELLARO, C.M. Digital dermatitis in cattle. *Proceedings of the 8th International Meeting on Diseases of Cattle*, Milan, Italy, p. 208–213, 1974.

CLEGG, S.R.; MANSFIELD, K.G.; NEWBROOK, K.; SULLIVAN, L.E.; BLOWEY, R.W.; CARTER, S.D.; EVANS, N.J. Isolation of digital dermatitis *Treponemes* from hoof lesions in Wild North American Elk (*Cervus elaphus*) in Washington State, USA. *J. Clin. Microbiol.*, v. 53, n. 1, p. 88–94, 2015.

CORBELLINI, C.N. *Factores nutricionales de riesgo para las afecciones podales*. In: *Enfermedades podales del bovino*. Jornada - Taller para médicos veterinarios. Navarro, p. 1-5, 1994.

CRAMER, G.; LISSEMORE, K.D.; GUARD, C.L.; LESLIE, K.E.; KELTON, D.F. Herd-level risk factors for seven different foot lesions in Ontario Holstein cattle housed in tie stalls or free stalls. *J. Dairy Sci.*, v. 92, n. 4, p. 1404-1411, 2008.

CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; CERVA, C.; CORBELLINI, L.G. Bovine digital dermatitis in southern Brazil. *Vet. Rec.*, v. 148, n. 18, p. 576–577, 2001.

DIRKSEN, G.; STÖBER, E.M. As afecções dos cascos dos bovinos: melhor prevenir que curar. *Hora Vet.*, Porto Alegre, v. 1, n. 3, p. 13-18, 1981.

DÖPFER, D.; KOOPMANS, A.; MEIJER, F.A.; SZAKALL, I.; SCHUKKEN, Y.H. KLEE, W.; BOSMA, R.B.; CORNELISSE, J.L.; VAN ASTEN, A.J.A.M.; TER HUURNE, A.A.H.M. Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to *Spirochaetes* and *Campylobacter faecalis*. *Vet. Rec.*, v. 140, p. 620–623, 1997.

EGERTON, J.R.; ROBERTS, D.S.; PARSANSON, I.M. The etiology and pathogenesis of ovine foot-rot. I. A histological study of the bacterial invasion. *J. of Comp. Pathol.*, v. 79, n. 2, p. 207-216, 1969.

EVANS N. J.; BROWN J. M.; DEMIRKAN I.; MURRAY R. D.; VINK W. D.; BLOWEY R. W.; HART C. A. & CARTER S. D. Three unique groups of *Spirochaetes* isolated from digital dermatitis lesions in UK cattle. *Vet. Microbiol.*, v. 130, n. 1-2, p. 141-150, 2008.

EVANS, N. J.; TIMOFTE, D.; ISHERWOOD, D. R.; BROWN, J. M.; WILLIAMS, J. M.; SHERLOCK, K.; LEHANE, M. J.; MURRAY, R. D.; BIRTLES, R. J.; ANTHONY HART, C.; CARTER, S. D. Host and environmental reservoirs of infection for bovine digital dermatitis *Treponemes*. *Vet. Microbiol.*, v. 156, n. 1-2, p. 102–109, 2012.

EVANS, N.J.; BROWN, J.M.; MURRAY, R.D.; GETTY, B.; BIRTLES, R.J.; HART, C.A.; CARTER, S.D. Characterization of novel bovine gastrointestinal tract *Treponema* isolates and comparison with bovine digital dermatitis *Treponemes*. *Appl. Environ Microbiol.*, v. 77, n. 1, p. 138–147, 2011.

FAJT, V.R.; APLEY, M.D. Antimicrobial issues in bovine lameness. *Vet. Clin. north Am. food anim. pract.*, v.17, n.1, p.159- 173, 2001.

FERREIRA, P.M. *Enfermidades podais em rebanho leiteiro confinado*. 2003. 79p. (Tese de Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FRANKENA, K.; SOMERS, J.G.C.J.; SCHOUTEN, W.G.P.; VAN STEK, J.V.; METZ, J.H.M.; STASSEN, E.N.; GRAAT, E.A.M. The effect of digital lesions and floor type on locomotion score in Dutch dairy cows. *Prev. Vet. Med.*, v. 88, n. 2, p. 150-157, 2009.

GOMEZ, A.; COZINHE, N.B.; BERNARDONI, J.; RIEMAN, J.; DUSICK, A.F.; HARTSHORN, R.; SOCHA, M.T.; LEIA, D.H.; DOPFER, D. An experimental infection model to induce digital dermatitis infection in cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 95, n. 4, p. 1821-1830, 2012.

GREEN, L. E.; HEDGES, V. J.; SCHUKKEN, Y. H.; BLOWEY, R.W.; PACKINGTON, A.J. The impact of clinical lameness on the milk yield of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 85, n. 9, p. 2250–2256, 2002.

HASSALL, S.A.; WARD, W.R.; MURRAY, R.D. Effects of lameness on the behaviour of cows during the summer. *Vet. Rec.*, v. 132, n. 23, p. 578–580, 1992.

HOLZHAUER, M.; HARDENBERG, C.; BARTELS, C.J.; FRANKENA, K. Herd- and cow-level prevalence of digital dermatitis in the Netherlands and associated risk factors. *J. Dairy Sci.*, v. 89, n. 2, p. 580–588, 2006.

HOW, K. Y.; SONG, K.P.; CHAN, K.G. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front. Microbiol.*, v. 7, n. 53, p. 1-14, 2016.

KARLSSON, F.; KLITGAARD, K.; JENSEN, T. K. Identification of *Treponema pedis* as the predominant *Treponema* species in porcine skin ulcers by fluorescence in situ hybridization and high-throughput sequencing. *Vet. Microbiol.*, v. 171, n. 1-2, p. 122–131, 2014.

KLITGAARD, K.; BOYE, M.; CAPION, N.; JENSEN, T. K. 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.*, v. 46, n. 9, p. 3012–3020, 2008.

KLITGAARD, K.; BRETO, A.F.; BOYE, M.; JENSEN, T.K. Targeting the Treponemal microbiome of digital dermatitis infections by high-resolution phylogenetic analyses and comparison with fluorescent in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, v. 51, n. 7, p. 2212–2219, 2013.

KLITGAARD, K.; NIELSEN, M. W.; INGERSLEV, H. C.; BOYE, M.; JENSEN, T. K. Discovery of bovine digital dermatitis-associated *Treponema* spp. in the dairy herd environment by a targeted deep-sequencing approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 80, n. 14, p. 4427–4432, 2014.

KNAPPER-POINDECKER, M.; GILHUUS, M.; JENSEN, T.K.; VATN, S.; JORGENSEN, H.J.; FJELDAAS, T. Cross-infection of virulent *Dichelobacter nodosus* between sheep and co-grazing cattle. *Vet. Microbiol.*, v. 170, n. 3-4, p. 375-382, 2014.

KONIAROVA, I.; ORSAG, A.; LEDECKÝ, V. The role anaerobes in dermatitis digitalis et interdigitalis in cattle. *Vet. Med.*, v. 38, n. 10, p. 589–596, 1993.

KRULL, A.C.; SHEARER, J.K.; GORDEN, P.J.; COOPER, V.L.; PHILLIPS, G.J.; PLUMMER, P.J. Deep sequencing analysis reveals the temporal microbiota changes associated with the development of bovine digital dermatitis. *Infect. Immun.*, v. 82; n. 8, p. 3359-3373, 2014.

LEACH, K. A.; WHAY, H. R.; MAGGS, C. M.; BARKER, Z. E.; PAUL, E. S.; BELL, A. K.; MAIN, D. C. J. Working towards a reduction in cattle lameness: 1. Understanding barriers to lameness control on dairy farms. *Res. Vet. Sci.*, v. 89, n. 2, p. 311–317, 2010.

LEÃO, M.A.; SILVA, L.A.F.; JAYME, V.S.; SILVA, L.M.; MOURA, M.I.; BARBOSA, V.T. Aspectos Epidemiológicos da Dermatite Digital Bovina em duas Propriedades Produtoras de Leite do Estado De Goiás, Brasil. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 10, n. 4, p. 1135-1147, 2009.

LEON, V.H.R.; LIMA, E.K.N.S.; PIMENTEL, A.C.M.; MIRANDA, P.M.; CARVALHO FILHO, P.C.; XAVIER, M.T. *Porphyromonas Gingivalis* e Periodontite Crônica - Avanços Recentes. *Rev. Bahiana Odontol.*, v. 7, n. 2, p. 147-154, 2016.

LIMA, S. D. *Microbiota presente em abscesso de sola e dermatite digital em bovinos leiteiros de Minas Gerais*. 2008. 16p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LOSINGER, W.C. Economic impacts of reduced milk production associated with papillomatous digital dermatitis in dairy cows in the USA. *J. Dairy Res.*, v. 73, n. 2, p. 244–256, 2006.

LUX, R.; MILLER, J.N.; PARK, N.H.; SHI, W. Motility and chemotaxis in tissue penetration of oral epithelial cell layers by *Treponema denticola*. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 10, p. 6276–6283, 2001.

MABONI, G.; FROSTH, S.; ASPÁN, A.; TOTEMEYER, S. Ovine footrot: new insights into bacterial colonisation. *Vet. Rec.*, v. 179, n. 9, 228p., 2016.

MARTINS, C.F.; SARTI, E.; BUSATO, I.; PIRES, P.P.; FIORI, C.H.; MOREIRA, C.; SOARES, K.; BETINI, B.; VELASQUEZ, M. Prevalência e classificação das afecções podais em vacas lactantes na bacia leiteira de Campo Grande (Capital) e municípios arredores, MS. *Ensaio e Ciências*, v. 6, n. 2, p. 113-137, 2002.

MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; FERREIRA, P.M.; FERREIRA, V.C.P. Prevalência e classificação das afecções podais em vacas lactantes na bacia leiteira de Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 51, n. 2, p. 149-152, 1999.

MOORE, L.J.; WOODWARD, M.J.; GROGONO-THOMAS, R. The occurrence of *Treponemes* in contagious ovine digital dermatitis and the characterisation of associated *Dichelobacter nodosus*. *Vet. Microbiol.*; v. 111, n. 3-4, p. 199–209, 2005.

MOTER, A.; LEIST, G.; RUDOLPH, R.; SCHRANK, K.; CHOI, B.K.; WAGNER, M.; GOBEL, U.B. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured *Treponemes* in biopsies from digital dermatitis lesions. *Microbiol.*, v. 144, p. 2459–2467, 1998.

NASCIMENTO, L.V.; MAUERWERK, M.T.; SANTOS, C.L.; FILHO, I.B.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; SOTOMAIOR, C.S.; MADEIRA, H.M.; OLLHOFF, R.D. *Treponemes* detected in digital dermatitis lesions in Brazilian dairy cattle and possible host reservoirs of infection. *J. Clin. Microbiol.*, v. 53, n. 6, p. 1935–1937, 2015.

NELSON-FILHO, P.; VALDEZ, R. M.; ANDRUCIOLI, M. C.; SARAIVA, M. C.; FERES, M.; SORGI, C. A.; FACCIOLI, L. H. Gram-negative periodontal pathogens and bacterial endotoxin in metallic orthodontic brackets with or without an antimicrobial agent: An in-vivo study. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, v. 140, n. 6, p. 281–287, 2011.

NEVES, S.M.N.; GUEDES, R.M.C. Hibridização in Situ Fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. *Arq. Inst. Biol.*, v. 79, n. 4, p. 627-632, 2012.

NICOLETTI, J.L.M. *Manual de podologia bovina*. Barueri, SP: Manole, 2004. 126p.

NIELSEN, M. W.; STRUBE, M. L.; ISBRAND, A.; AL-MEDRASI, W. D. H. M.; BOYE, M.; JENSEN, T. K.; KLITGAARD, K. Potential bacterial core species associated with digital dermatitis in cattle herds identified by molecular profiling of interdigital skin samples. *Vet. Microbiol.*, v. 186, p. 139–149, 2016.

PALMER, M.A.; DONNELLY, R.F.; GARLAND, M.J.; MAJITHIYA, R.; O'CONNELL, N.E. The effect of slurry on skin permeability to methylene blue dye in dairy cows with and without a history of digital dermatitis. *Animals*, v. 7, n. 10, p. 1731-1737, 2013.

PALMER, M.A.; O'CONNELL, N.E. Digital Dermatitis in Dairy Cows: A Review of Risk Factors and Potential Sources of Between-Animal Variation in Susceptibility. *Animals*, v. 5, p. 512-535, 2015.

PASTER, B.J.; CANALE-PAROLA, E. Physiological diversidade de rumen *Espiroquetas*. *Appl. Environ Microbiol.*, v. 43, p. 686-693, 1982.

PLOEG, M. Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century. *Eur. J. Histochem.*, v.44, p.7-42, 2000.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas*. Porto Alegre: Artimed, 2005, 511p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.V.; BLOOD, D.C. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2016. 1737p.

RASMUSSEN, M.; CATION, N.; KLITGAARD, K.; ROGDO, T.; FJELDAAS, T.; BOYE, M.; JENSEN, T. K. Bovine digital dermatitis: Possible pathogenic consortium consisting of *Dichelobacter nodosus* and multiple *Treponema* species. *Vet. Microbiol.*, v. 160, n. 1-2, p. 151-161, 2012.

READ, D.H.; WALKER, R.L. Papillomatous digital dermatitis (footwarts) in California dairy cattle: Clinical and gross pathologic findings. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 10, n. 1, p. 67-76, 1998.

REBHUN, W. C; PAYNE, R. M; KING, J. M.; WOLF, M.; BEGG, S.N. Interdigital papillomatosis in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 177, n. 3, p. 437-440, 1980.

REFAAI, W.; DUCATELLE, R.; GELDHOF, P.; BELGACEM, M.; OPSOMER, G. Digital dermatitis in cattle is associated with an excessive innate immune response triggered by the keratinocytes. *BMC Vet. Res.*, v. 3, n. 9, p. 193-199, 2013.

RELUN, A.; LEHEBEL, A.; BRUGGINK, M.; BAREILLE, N.; GUATTEO, R. Estimation of the relative impact of treatment and herd management practices on prevention of digital dermatitis in French dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, v. 110, n. 3-4, p. 558-562, 2013.

RIVIERE, G. R.; SMITH, K. S.; CARRANZA, N.J. R.; TZAGAROULAKI, E.; KAY, S. L.; DOCK, M. Subgingival distribution of *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, and pathogen-related oral spirochetes: prevalence and relationship to periodontal status of sampled sites. *J. Periodontol.*, v. 66, n. 10, p. 829–837, 1995.

RODRIGUEZ-LAINZ, A.; MELENDEZ-RETAMAL, P.; HIRD, D. W.; READ, D. H.; WALKER, R. L. Farm- and host-level risk factors for papillomatous digital dermatitis in Chilean dairy cattle. *Prev. Vet. Med.*, v. 42, n. 2, p. 87–97, 1999.

ROSEN, G.; NAOR, R.; KUTNER, S.; SELA, M. N. Characterization of fibrinolytic activities of *Treponema denticola*. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 5, p. 1749–1754, 1994.

ROSEN, G.; NAOR, R.; RAHAMIM, E.; YISHAI, R.; SELA, M. N. Proteases of *Treponema denticola* outer sheath and extracellular vesicles. *Infect. Immun.*, v. 63, n. 63, p. 3973–3979, 1995.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3 ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2010. 264p.

SANTOS, T.M.; PEREIRA, R.V.; CAIXETA, L.S.; GUARD, C.L.; BICALHO, R.C. Microbial diversity in bovine papillomatous digital dermatitis in holstein dairy cows from upstate New York. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 79, p. 518–529, 2012.

SELA, M. N.; BOLOTIN, A.; NAOR, R.; WEINBERG, A.; ROSEN, G. Lipoproteins of *Treponema denticola*: their effect on human polymorphonuclear neutrophils. *J. Periodontal Res.*, v. 32, n. 5, p. 455–466, 1997.

SHENKER, B. J.; LISTGARTEN, M. A.; TAICHMAN, N. S. Suppression of human lymphocyte responses by oral spirochetes: a monocyte-dependent phenomenon. *J. Immunol.*, v. 132, n. 4, p. 2039–2045, 1984.

SHIBAHARA, T.; OHYA, T.; ISDII, R.; OGIHARA, Y.; MAEDA, T.; ISHIKAWA, Y.; KADOTA, K. Concurrent spirochaetal infections of the feet and colon of cattle in Japan. *Aust. Vet. J.*, v. 80, n. 8, p. 497-502, 2002.

SOMERS, J.K.C.J.; FRANKENA, K.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N.; METZ, J.H.M. Risk factors for digital dermatitis in dairy cows kept in cubicle houses in The Netherlands. *Prev. Vet. Med.*, v. 71, n. 1-2, p. 11–21, 2005.

SOUZA, R.A.; TULIO, L.M.; GAI, V.F. Incidência de lesões podais em bovinos de aptidão leiteira na região oeste do Paraná. *Rev. Cultiv. Sab.*, p. 194-202, 2015.

SOUZA, R.C. *Enfermidades podais em Vacas Leiteiras: Eficiência e Custos de Tratamentos, Efeitos na Produção e Reprodução, Histopatologia e Aspectos Econômicos*. 2005. 92f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, R.C. *Perfil epidemiológico e clínico das afecções podais em vacas nas bacias leiteiras de Belo Horizonte e Pedro Leopoldo*. 2002. 72f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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. Presence of digital dermatitis *Treponemes* on cattle and sheep hoof trimming equipment. *Vet. Rec.*, v. 175, n. 8, p. 2-5, 2014.

SULLIVAN, L.E.; CARTER, S.D.; DUNCAN, J.S.; GROVE-WHITE, P.H.; ANGELL, J.W.; EVANS, N.J. The gastrointestinal tract as a potential infection reservoir of digital dermatitis-associated *Treponemes* in beef cattle and sheep. *Appl. Environ Microbiol.*, v. 81, n. 21, p. 7460-7469, 2015.

SVARTSTROM, O.; MUSHTAQ, M.; PRINGLE, M.; SEGERMAN, B. Genome-wide relatedness of *Treponema pedis*, from gingiva and necrotic skin lesions of pigs, with the human oral pathogen *Treponema denticola*. *J. PLOS ONE*, v. 8, n. 8, p. 1-9, 2013.

USDA, 2009, Fort Collins. *Dairy 2007, part IV: Reference of dairy cattle health and management practices in the united states*. Fort Collins: USDA APHIS, 2009, 178p.

VARUZZA, L. *Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração Versão 2.0.1*. Bioinformática, 76p, 2013. Disponível em: <[http://lvaruzza.com/files/apostila\\_bioinfo\\_2.0.1.pdf](http://lvaruzza.com/files/apostila_bioinfo_2.0.1.pdf)>. Acesso em: 02/10/2016.

WALTER, C.; ZAHLTEN, J.; SCHMECK, B.; SCHAUDINN, C.; HIPPENSTIEL, S.; FRISCH, E.; HOCKE, A.C.; PISCHON, N.; KURAMITSU, H.K.; BERNIMOULIN, J.P.; SUTTORP, N.; KRÜLL, M. *Porphyromonas gingivalis* Strain-Dependent Activation of Human Endothelial Cells. *Infect. Immun.*, v. 72, n. 10, p. 5910-5918, 2004.

WELLS, S. J.; GARBER, L. P.; WAGNER, B. A. Papillomatous digital dermatitis and associated risk factors in US dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, v. 38, n. 1, p. 11-24, 1999.

WHAY, H. R.; MAIN, D.C.; GREEN, L.E.; WEBSTER, S.J.F. Assessment of the welfare of dairy cattle using animal-based measurements: Direct observations and investigation of farm records. *Vet. Rec.*, v. 153, p. 197–202, 2003.

WILSON-WELDER, J.H.; ALT, D.; NALLY, J. The etiology of digital dermatitis in ruminants: recent perspectives. *Vet. Med. Res. Rep.*, v. 6, p. 155-164, 2015.

WILSON-WELDER, J.H.; DAVID, P.; ALT, D.P.; NALLY, J.E. Digital Dermatitis in Cattle: Current Bacterial and Immunological Findings. *Animals*, v. 5, n. 4, p. 1114-1135, 2015.

WITCOMB, L.A.; GREEN, L.E.; KALER, J.; UL-HASSAN, A.; CALVO-BADO, L.A.; MEDLEY, G.F. A longitudinal study of the role of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* load in initiation and severity of footrot in sheep. *Prev. Vet. Med.*, v. 115, n. 1-2, p. 48-55, 2014.


YANO, T.; MOE, K.K.; YAMAZAKI, K.; OOKA, T.; HAYASHI, T.; MISAWA, N. Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. *Vet Microbiol.*, v. 143, n. 2-4, p. 352-363, 2010.

ZINICOLA, M.; HIGGINS, H.; LIMA, S.; MACHADO, V.; GUARD, C.; BICALHO, R. Shotgun Metagenomic Sequencing Reveals Functional Genes and Microbiome Associated with Bovine Digital Dermatitis. *J. PLOS ONE*, v. 10, n. 7, p. 1-17, 2015.

ZINICOLA, M.; LIMA, F.; LIMA, S.; MACHADO, V.; GOMEZ, M.; DOPFER, D.; GUARD, C.; BICALHO, R. Altered microbiomes in bovine digital dermatitis lesions, and the gut as a pathogen reservoir. *J. PLOS ONE*, v. 10, n. 3, p. 1–23, 2015.

## 10. ANEXOS

### 10.1 CERTIFICADO NO PROJETO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/UFMG

 <b>UFMG</b>	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
<b>CERTIFICADO</b> Certificamos que o Protocolo nº. 121 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Epidemiologia de doenças podais e estabelecimento de um plano de controle e determinação de patógenos associados a dermatite digital", que tem como responsável Antonio Ultimo de Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 12/05/2015. Este certificado expira-se em 12/05/2020.	
<b>CERTIFICATE</b> We hereby certify that the Protocol nº. 121 / 2015, related to the Project entitled "EPIDEMIOLOGY OF HOOF LESIONS AND ESTABLISHMENT OF CONTROL PROGRAM AND IDENTIFICATION OF PATHOGENS ASSOCIATED BOVINE DIGITAL DERMATITIS", under the supervision of Antonio Ultimo de Carvalho, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 12/05/2015. This certificate expires in 12/05/2020.	
Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 12/05/2015.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a>	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005 31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a>	