

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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ETIOLÓGICA DA  
DERMATITE DIGITAL BOVINA EM TRÊS REGIÕES DA LESÃO**

**GUILHERME VIEIRA FONSECA**

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2018**

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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ETIOLÓGICA DA  
DERMATITE DIGITAL BOVINA EM TRÊS REGIÕES DA LESÃO**

**GUILHERME VIEIRA FONSECA**

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: Antônio Último de Carvalho

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2018**

F676c

Fonseca, Guilherme Vieira, 1989-

Caracterização morfológica e etiológica da dermatite digital bovina em três regiões da lesão / Guilherme Vieira Fonseca. – 2018.

63 p. : il.

Orientador: Antônio Último de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Claudicação em bovino – Teses. 3. Casco de animais – Teses. I. Carvalho, Antônio Último de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.214 089 69

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### GUILHERME VIEIRA FONSECA

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 26 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Antônio Último de Carvalho  
Presidente - Orientador



Prof. Elias Jorge Facury Filho  
Escola de Veterinária - UFMG



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



Prof. Tiago Facury Moreira  
Universidade Vila Velha - UVV

*“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso,  
ao esforço, a dedicação, não existe meio termo.  
Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz”  
Ayrton Senna*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa senhora Aparecida por tudo que tem me proporcionado e promovido em minha vida.

Obrigado Pai, por ser minha referência, por me aconselhar e mostrar sempre a luz no fim do túnel, e por seu esforço imensurável para que conseguisse chegar até aqui, espero que um dia possa retribuir tudo isso.

Mãe, obrigado por ser o nosso pilar. Uma mulher guerreira que nunca desistiu de fazer de tudo para os filhos e para a família. Vale lembrar dos inúmeros cafés da madrugada.

Ao meu irmão Gustavo, pelo carinho, companheirismo e por sempre me motivar.

A minha noiva Fernanda, obrigado por acreditar em mim, me aconselhar nos momentos que precisava, me motivar nos momentos que tive vontade de jogar tudo para cima, pelo carinho, amor e por tudo que me proporciona.

Ao meu avô, que mesmo não estando mais aqui, tenho certeza que está guiando meus passos. Essa Conquista também é sua “veio”.

Aos meus orientadores, ou posso dizer, quase novos pais, Professor Último e Professor Elias (Lobão) pela amizade, pelos muitos ensinamentos, pela paciência e me acolherem no DCCV. Além de serem grandes mestres, são exemplos de pessoas.

Aos professores da PUC Minas Rogério e Rafahel pela amizade, ensinamentos e inúmeros estágios, grande parte do que sou como médico veterinário foi graças a vocês.

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

Ao Professor Felipe por toda a ajuda na análise histopatológica, e paciência na leitura das lâminas. A Universidade da Dinamarca;

Aos Amigos do Loyola, ou posso dizer amigos do TL, obrigado por todos os momentos de descontração.

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>11</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
3.1	DERMATITE DIGITAL.....	14
3.1.1	HISTÓRICO .....	14
3.1.2	CARACTERIZAÇÃO DA PELE DOS DÍGITOS DOS BOVINOS.....	16
3.1.3	CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DA DERMATITE DIGITAL BOVINA...	18
3.1.4	ACHADOS HISTOLÓGICOS NAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL BOVINA .....	19
3.1.5	EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DA DERMATITE DIGITAL BOVINA:.....	21
3.1.6	MICROBIOMAS ENCONTRADOS NA DERMATITE DIGITAL.....	23
3.1.7	MODO DE AÇÃO DAS BACTÉRIAS ENVOLVIDAS NA DERMATITE DIGITAL BOVINA .....	31
3.2	TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> ( <i>FISH</i> ) E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.....	32
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1	LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL .....	34
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	34
4.3	MANEJO DOS ANIMAIS.....	34
4.4	COLETA DE MATERIAL DE LESÕES DE DERMATITE DIGITAL.....	35
4.5	HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> ( <i>FISH</i> ).....	37
4.6	HISTOLOGIA.....	38
4.7	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO).....	39
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
5.1	PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL.....	40
5.2	MICROBIOMAS ENCONTRADOS EM LESÕES DE DERMATITE DIGITAL.....	43
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>63</b>
9.1	CERTIFICADO NO PROJETO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/UFMG.....	63

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 -	Caracterização da incidência e prevalência de lesões de casco nas últimas décadas.....	15
Tabela 2 -	Avaliação de vacas (n=22) com Dermatite Digital na fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa de acordo com a classificação morfológica (M1, M2, M3 e M4).....	42
Tabela 3 -	Classificação histológica da Epiderme e Derme de três regiões distintas em lesões de Dermatite Digital .....	42
Tabela 4 -	Frequência bacteriana e seus escores (escore 1: quantidade de até 5% do número total de bactérias na amostra; escore 2, 5% e 10% do número total de bactérias e escore 3 mais do que 10%) de densidade pelo método de <i>FISH</i> em cortes histológicos de biópsias da R1 (centro da lesão), R2(borda da lesão) e R3(pele adjacente a lesão) de Dermatite Digital.....	45
Tabela 5 -	Bactérias encontradas em maiores proporções no microbioma de lesões de Dermatite Digital na R1(centro da lesão), R2(centro da lesão) e R3(pele adjacente a lesão) pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2 .....	48

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 -	Diferentes aspectos da dermatite digital. Da esquerda para a direita, uma lesão M1, seguida por uma M2 até estágio crônico da doença com projeções proliferativas.....	19
Figura 2 -	Etapas realizadas para a exérese da Dermatite Digital.....	36
Figura 3 -	Coleta de três diferentes pontos da lesão de Dermatite Digital, sendo R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (pele adjacente a lesão) para a execução da técnica de <i>FISH</i> , histologia e sequenciamento de nova geração) .....	37
Figura 4 -	Escore utilizado para a classificação da invasão bacteriana e densidade bacteriana nos fragmentos das lesões de Dermatite Digital.....	38
Figura 5 -	Diferentes segmentos da pele de lesão de Dermatite Digital apresentam alterações epidérmicas e dérmicas variam de escore 1 a 3 .....	39
Figura 6 -	Corte histológico de biópsias de Dermatite digital – Método de <i>FISH</i> . <i>Treponema sp.</i> .....	44
Figura 7 -	Corte histológico de biópsias de Dermatite digital – Método de <i>FISH</i> . <i>DichelobacterNodosus.</i> .....	44
Figura 8 -	Corte histológico de biópsias de Dermatite digital – Método de <i>FISH</i> . <i>Porphyromonas levii.</i> .....	44

Figura 9 - Corte histológico de biópsias de Dermatite digital – Método de FISH. <i>Fusobacterium necrophorum</i> .....	44
Figura 10 - Frequência bacteriana nas regiões R1(centro da lesão), R2 (borda da lesão), R3 (pele adjacente a lesão) pelo método de FISH em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital.....	44
Figura 11 - Comparação entre as regiões R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (borda adjacente a lesão) de acordo com a média dos escores de densidade de <i>Treponema</i> (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 mais do que 10%) em lesão de Dermatite Digital.....	46
Figura 12 - Frequência bacteriana de invasão bacteriana pelo método de FISH em cortes histológicos para as bactérias do gênero <i>Treponema</i> , <i>D. Nodosus</i> , <i>F. necrophurum</i> e <i>P. levii</i> de biópsias de Dermatite Digital e seus escores (0 representa a ausência de bactérias invasivas, 1 presença de bactérias na superfície, 2 presenças de bactérias no intermédio e 3 bactérias na parte mais profunda da lesão) .....	47
Figura 13 - Bactérias encontradas nas lesões de Dermatite Digital pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2 em diferentes regiões, sendo R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (pele adjacente a lesão) .....	48
Figura 14 - <i>Treponemas</i> encontradas nas lesões de Dermatite Digital pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V3 e V4 em diferentes regiões, sendo R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (pele adjacente a lesão).....	53
Figura 15 - Análise de componente principal de agentes bacterianos e achados histológicos em diferentes regiões R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (borda adjacente a lesão) regiões R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (borda adjacente a lesão) .....	55

## ABREVIATURAS

CEUA- Comissão de Ética de Experimentação Animal  
DDB – Dermatite Digital Bovina  
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  
NRC – *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
RNA – Ácido ribonucleico  
R1- Região central da lesão  
R2- Borda da lesão  
R3- Pele adjacente a lesão  
S2h- *Helcococcus*  
S2r- *Treponema refringens*  
S1t- *Treponema*  
S11- *Alloiococcus*  
S1r- *P. revotella*  
S1b- *Bacteroides*  
S1a- *Anaerococcus*  
S1p- *porphyromonas*  
S2m- *Treponema médium*  
S1m- *Murdochiella*  
S1f- *Fusobacterium*  
s2z- *treponema zuelzeri*  
s2p- *Treponema pedis*  
s2s- *sphaerochaeta globosa*  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
US\$ - Dólar

## RESUMO

As afecções podais são consideradas uma das grandes ocorrências na bovinocultura de leite, sendo a Dermatite Digital a doença infecciosa de maior prevalência nos rebanhos semi intensivos. Sua etiologia ainda é pouco discutida, e apesar de bactérias do gênero *Treponema* serem identificados em tecidos acometidos pela DD, sua etiologia ainda não foi totalmente compreendida. Para tentar elucidar a morfologia e etiologia da doença, foram utilizados 22 animais acometidos com DD e realizado a exérese da lesão. O material extraído foi seccionado em três diferentes pontos, sendo esses denominados: R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (pele adjacente a lesão). Para a avaliação do microbioma da DD foram utilizadas as técnicas de Hibridização Fluorescente *in Situ* (FISH) e sequenciamento de nova geração e a avaliação morfológica ocorreu de forma macroscópica e histológica. A prevalência de DD encontrada neste estudo foi de 29,3%, sendo 23% das amostras classificadas como M1, 64% M2 e 14% como M3. A epiderme na R1 e R2, foram caracterizadas em 54% e 33,5%, respectivamente, por moderadas áreas de proliferação tecidual e acantose, enquanto na R3 observou-se leve proliferação tecidual. A derme na R1 e R2, apresentou moderado aumento de células inflamatórias, já a R3 caracterizou-se por leve aumento de células inflamatórias. Foi encontrado pela técnica de FISH a presença bacteriana na R1, R2 e R3 em 93%, 94% e 76% das lesões, respectivamente. Bactérias do gênero *Treponema* foram as mais frequentes, estando presentes em 88,35% na R1, 84% em R2, e 50% na R3. Já *Dichelobacter nodosus* estava presente em todas as regiões, na região 1 com 66%, R2 52% e R3 40%. *Fusobacterium necrophorum*, presente 44% em R1, 21% em R2 e 25% em R3 e *Porphyromonas levii* foi a bactéria menos frequente na técnica de FISH, sendo encontrado 11,7% em R1, 16% em R2 e 15% em R3. As bactérias do gênero *Treponema* foram as mais profundas na lesão, enquanto *P. levii* as mais superficiais, fato esse ocorreu nas três regiões estudadas. Pela técnica de sequenciamento de nova geração os *Treponemas* estavam presentes assim como *Porphyromonas*, *Mycoplasma*, *Helcococcus*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium*, *Dichelobacter* e *Alloiococcus*. Os filotipos de *Treponemas* com maior frequência foram os T. não classificados seguidos de *T. phagedenis*, 67,5% na R1, 67,3% na R2 e 62,18% na R3. *T. pedis*, *T. refringes* e *T. médium* também foram encontrados. 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, sendo necessário mais estudos para elucidar o real papel de cada bactéria na etiologia da DD.

Palavras-Chave: Dermatite Digital, morfologia, etiologia.

## ABSTRACT

The foot conditions are considered one of the great occurrences in milk cattle, with Digital Dermatitis being the most prevalent infectious disease in semi-intensive herds. Its etiology is still poorly discussed, and although bacteria of the genus *Treponema* are identified in tissues affected by DD, its etiology has not yet been fully understood. To try to elucidate the morphology and etiology of the disease, 22 animals affected with DD were used. The lesion was excised, the extracted material was sectioned in three different points, being these denominated R1 (center of the lesion), R2 (edge of the lesion) and R3 (skin adjacent to the lesion). For the evaluation of the microbioma of the DD, the In Situ Fluorescent Hybridization (FISH) and new generation sequencing techniques were used and the morphological evaluation was performed macroscopically and histologically. The prevalence of DD found in this study was 29.3%, with 23% of the samples classified as M1, 64% M2 and 14% as M3. The epidermis in R1 and R2, were characterized in 54% and 33.5%, respectively, by moderate areas of tissue proliferation and acanthosis, whereas in R3, slight tissue proliferation was observed. The dermis in R1 and R2, presented moderate increase of inflammatory cells, whereas R3 was characterized by slight increase of inflammatory cells. The bacterial presence in the R1, R2 and R3 was found by 93%, 94% and 76% of the lesions, respectively. Bacteria of the genus *Treponema* were the most frequent, being present in 88.35% in R1, 84% in R2, and 50% in R3. *Dichelobacter nodosus* was present in all regions, region 1 with 66%, R2 52% and R3 40%. *Fusobacterium necrophorum*, present in 44% in R1, 21% in R2 and 25% in R3, and *Porphyromonas levii* was the least frequent bacterium in the FISH technique, being found 11.7% in R1, 16% in R2 and 15% in R3. The bacteria of the genus *Treponema* were the deepest in the lesion, while *P. levii* were the most superficial, a fact that occurred in the three regions studied. By the new generation sequencing technique the *Treponemas* were present as well as *Porphyromonas*, *Mycoplasma*, *Helcococcus*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium*, *Dichelobacter* and *Alloiococcus*. The most frequent treponemal phylo-logy was the unclassified T. followed by *T. phagedenis*, 67.5% at R1, 67.3% at R2 and 62.18% at R3. *T. pedis*, *T. refringes* and *T. médium* were also found. 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, and further studies are needed to elucidate the real role of each in the etiology of DD.

Key words: Digital dermatitis, morphology, etiology.

## 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, Whay et al, 2003).

O sistema semiintensivo (SSI) é a forma de exploração leiteira mais observada no Brasil Central, compreendendo atualmente 40% da produção nacional de leite (Olszensvski, 2011). Tal sistema caracteriza-se por vacas com produção média diária de oito a 17 litros de leite, mantidas em sistema de pastejo no período chuvoso e confinadas no período seco com fornecimento de alimentos suplementares no cocho. Doenças de origem infecciosas tais como dermatite digital (DD), dermatite interdigital (DI) e erosão de talão (ET) representam as principais causas de claudicação em bovinos alocados naquele tipo de sistema, sendo a dermatite digital, atualmente, a enfermidade de maior importância nesse contexto (Souza, 2002; Casagrande, 2013, Moreira 2017).

Desde a primeira divulgação em 1974, a dermatite digital bovina (DD) se espalhou por todo o mundo (Evans et al., 2016, Palmer e O'Connell, 2015) sendo que nas últimas décadas, tornou-se o principal problema de locomoção no gado leiteiro. (Evans et al., 2016; Klitgaard et al., 2008; Palmer e O'Connell, 2015). Anteriormente descrita como uma enfermidade causada por espiroquetas do gênero *Treponema* tem sido definida atualmente como uma doença infecciosa multifatorial promovida por um complexo bacteriano, já que bactérias como : *Mycoplasma*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* (Krull et al., 2014; Nielsen et al., 2016) *Bacteroides* spp., *Campylobacter* spp., *Guggenheimella* spp (Zinicola et al., 2015) e *D. nodosus* (Klitgaard et al, 2014) também foram identificadas nas lesões, porém o papel desempenhado por cada um desses grupos bacterianos não é bem conhecido. Caracteriza-se como uma doença da pele digital que aparece como uma lesão próxima à margem coronariana, no espaço interdigital palmar/plantar, sendo mais comum na região plantar (Silva, et.al. 2005).

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). Devido a dificuldade de fazer cultura nas bactérias relacionadas com a DD, 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**

Estudar a etiologia da Dermatite Digital Bovina

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudar as lesões microscópicas das diferentes regiões da Dermatite Digital Bovina
- Realizar a histologia de diferentes partes das lesões de DD.
- Comparar as bactérias encontradas nas diferentes áreas da lesão e sua histologia

## **3. REVISÃO DE LITERATURA:**

### **3.1 DERMATITE DIGITAL**

#### **3.1.1 Histórico**

As enfermidades podais, juntamente com as mastites e as desordens reprodutivas, são consideradas um dos principais impasses econômicos na bovinocultura de leite, sendo responsáveis por perdas na produção de leite, gastos com medicamentos e mão de obra especializada, descarte de leite decorrente do uso de antibióticos, redução na fertilidade e aumento do intervalo entre partos (Ferreira, 2003, Souza 2005, Casagrande, 2013). Pesquisas realizadas no Brasil apresentam um custo médio de U\$45,00 a U\$126,00/vaca por tratamento para as afecções podais (Ferreira, 2003; Souza 2005). Esses

valores são compatíveis com os apresentados por Bruijnjs et al. (2010), para o tratamento de lesão clínica, em média US\$ 95,00 e US\$ 18,00 para a forma subclínica.

Além do alto custo do tratamento por caso, observa-se também aumento na incidência das afecções podais nos sistemas de produção de diversos países, passando de 5% no início da década de 80 (Prentice e Neal, 1972; Eddy e Scott, 1980) para em alguns casos exceder 100% do rebanho (Ferreira, 2003),

Através da análise da Tabela 1, é possível observar taxas de prevalência de lesões de casco em rebanhos leiteiros realizados na década de 70 e 80, enquanto estudos posteriores apresentam valores mínimos de 16%. (Whitaker et al., 1983; Esslemont and Spincer, 1993; Clarkson et al, 1996, Casagrande (2013), Moreira (2017).

Tabela 1- Caracterização da incidência e prevalência de lesões de casco nas últimas décadas.

Prevalência/ Incidência	País	Autor e Ano	Observação
0,0388	Reino Unido	Leech et al. (1960)	
0,14	Nova Zelândia	Dewes (1978)	
5,50%	Reino Unido	Russel et al. (1982)	Diagnóstico feito por veterinário
4,40%	Estados Unidos	Barlett et al. (1986)	
5,10%	Estados Unidos	Kaneene and Hurd (1990)	
20,7%	Nova Zelândia	Tranter and Morris (1991)	
36%	Reino Unido	Esslemont and Spincer (1993)	
55%	Reino Unido	Clarkson et al. (1996)	
13%	Brasil (Minas Gerais)	Molina (1999)	
38%	Reino Unido	Kossaibati and Esslemont (1999)	
69%	Reino Unido	Hedges et al. (2001)	
31%	Estados Unidos	Hernandez et al. (2002)	
9%	Dinamarca	Capion et al. (2009)	
0,50%	Brasil (Rio Grande do Sul)	Cruz et al. (2001)	
3%	Brasil (Goiás)	Silva et al. (2001)	
9%	Dinamarca	Capion et al. (2009)	
26,20%	Nova Zelândia	Gibbs (2010)	
23,80%	Brasil (Minas Gerais)	Casagrande (2013)	
16,00%	Brasil (Minas Gerais)	Moreira (2017)	

Dentre as lesões podais observadas nos estudos, as doenças de origem infecciosa tais como dermatite digital (DD), dermatite interdigital (DI) e erosão de talão (ET) representam as principais causas de claudicação em bovinos alocados em sistemas semi intensivos (Souza, 2002; Casagrande , 2013.).Atualmente, a DD é considerada um problema emergente nos rebanhos leiteiros de diversos países do mundo, tornando-se a principal patologia dos pés dos bovinos (Casagrande , 2013, Klitgaard et al, 2014).

A Dermatite digital (DD) foi descrita pela primeira vez, em 1974, por Cheli e Mortellaro na região norte da Itália, sendo relatada pela primeira vez na América do Norte, em Nova York, Estados Unidos (EUA), por Rebhum (1980) alastrando-se rapidamente para vários outros estados (Read e Walker, 1998). No Brasil, apesar de ser conhecida desde o início da década 90, ocorreram poucas tentativas de descrição dos possíveis agentes patogênicos envolvidos na lesão (Borges et al, 1992; Nascimento et al, 2015, Moreira 2017, Andrade 2017).

### **3.1.2 Caracterização da pele dos dígitos dos bovinos**

A pele normal do dígito do bovino é constituída pela derme e epiderme sendo essa composta por epitélio estratificado, pavimentoso e queratinizado e subdividida em estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo (Webb Calhoun 1954). Via de regra, a epiderme, no organismo do animal, é constituída por 85% de queratinócitos e 15% de não-queratinócitos, dentre os quais, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (König e Liebich, 2004).

Os queratinócitos, também chamados de células epidermais, sofrem três processos biológicos ao longo do seu ciclo celular, sendo esses: proliferação, diferenciação ou queratinização e corneificação. (Greenough, 2007; Van amstel e Shearer, 2012).

O processo de proliferação é caracterizado por sucessivas mitoses no estrato basal, gerando um aumento populacional de células. Ao termino desta etapa, as mesmas sofrem diferenciação celular momento em que passam da forma cúbica ou cilíndrica a pavimentosa, e permanecem ligadas entre si por pontes intercelulares, cemento, formando assim o estrato espinhoso. O estágio final da diferenciação celular é denominado corneificação, etapa em que ocorre a formação de células corneificadas e mortas, com intensa adesão intracelular. Nessa fase ocorre a substituição do conteúdo intracelular por queratina e os queratinócitos se tornam cúbicos e maiores, dando origem assim a camada córnea.

A substituição completa de cada geração de células vivas da epiderme ocorre em aproximadamente 20 a 30 dias, sendo dependes da difusão de nutrientes através da derme, sendo assim, falhas no suprimento vascular causam queda na qualidade do tecido córneo formado (König e Liebich, 2004).

A derme ou cório, é formada de tecido conjuntivo conectivo altamente vascularizado e innervado sendo esse constituído de fibras colágenas e elásticas. A separação da derme e epiderme se dá pela membrana basal. Essa membrana possui importante papel na regulação da proliferação e diferenciação das células da epiderme exercendo função de sustentação e orientação para os queratinócitos durante esses processos. Diante disso, danos à membrana basal podem acarretar alterações na organização epidermal, hiperproliferação ou anormalidades no padrão de crescimento dos queratinócitos (Shearer, 2012).

A queratinização epidérmica é modulada pelas concentrações hormonais sistêmicas e parácrinas e, mudanças hormonais no período de transição, o que pode inibir a deposição de queratina. Os principais hormônios envolvidos nesse processo são: insulina, glicocorticóides, fator de crescimento epidermal e prolactina (Hendry *et al*, 1999). Segundo Casagrande (2013), animais que apresentaram balanço energético negativo mais intenso no pós-parto e valores mais elevados de ácidos graxos não esterificados no plasma, apresentaram maior mobilização de gordura dos coxins plantares, sola mais macia após 60 dias de lactação e menor dureza da sola e muralha após os 90 dias de lactação. As variações dos ácidos graxos não esterificados em animais avaliados, mesmo que leves, resultaram em menor dureza da sola após 30 dias de lactação sendo que aos 60 e 90 dias a dureza se elevou, mas não retornou aos valores encontrados 30 dias antes do parto. A insulina é detectada tanto na derme quanto na epiderme, mais especificamente na periferia e núcleo dos queratinócitos. Segundo um estudo de Hendry *et al*. (1999), ocorreu uma estimulação da proliferação celular em cultura de tecido de casco bovino, na presença de insulina, em 24 horas. No início do período de lactação, o quadro de resistência à insulina apresentado pelas vacas pode comprometer a queratogênese, devido à menor captação de glicose e aminoácidos (Hendry *et al*, 1999). Vacas leiteiras periparturientes são frequentemente sujeitas ao estresse com aumento dos níveis plasmáticos de cortisol. Os glicocorticóides tendem a produzir hiperglicemia, principalmente devido ao aumento da gliconeogênese hepática e do antagonismo periférico à ação da insulina, resultando em diminuição da captação de glicose no músculo e no tecido adiposo. Além disso, reduz a síntese proteica e o aumento da proteólise. A concentração sistêmica de glicocorticóides pode regular a deposição de queratina no casco, afetando a síntese de proteína e a maturação de queratinócitos (Goff e Host, 1997, Hendry *et al*, 1999). Já o fator de crescimento epidermal possui ação mitogênica e é encontrado na camada basal

da epiderme, estimulando a síntese de queratina nos tecidos córneos. No final da gestação, o aumento das concentrações de cortisol diminui a produção local do fator de crescimento epidermal, inibindo a queratogênese (Hendry *et al*, 1999). A prolactina é o principal hormônio lactogênico. A síntese de proteína estimulada pelo fator de crescimento epidermal é antagonizada pela ação da prolactina. Embora, a prolactina sozinha não influencie na síntese de proteína, a sua capacidade de diminuir a produção do fator de crescimento epidermal pode inibir a queratogênese no período de lactação (Hendry *et al*, 1999).

### **3.1.3 Classificação Morfológica da Dermatite Digital Bovina**

Embora o termo mais utilizado para caracterizar a doença seja Dermatite Digital essa enfermidade também recebe outros nomes como verruga do talão, calcanhar em amora, doença de Moterllaro, pododermatite verrucosa, verruga pilosa, (Stokka *et al*, 1997; Trosaint *et al*, 2003).

Caracteriza-se como uma doença da pele digital iniciando-se como uma lesão próxima à margem coronariana, no espaço interdigital palmar/plantar, sendo mais comum na região plantar, podendo variar em tamanho (1 a 6 centímetros de diâmetro), com presença ou não de úlceras e tecido proliferativo (Greenough *et al*, 2005). 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), a classificação macroscópica da DD se dá em três formas clínicas diferentes, sendo grau 1 ou hiperplásica, fase inicial caracterizada por discreta hiperemia no espaço interdigital, com diâmetro variando de 1 a 2 centímetros e ausência de odor fétido; grau 2, também chamada de ulcerativa, com diâmetro de 2 a 4 centímetros, superfície ulcerada com bordas irregulares, de coloração rósea a avermelhada e presença de áreas hemorrágicas após a manipulação da ferida, além de odor fétido; e grau 3 ou proliferativa, as lesões de coloração cinzenta ou enegrecida, de tamanho superior a 4 centímetros, com proliferação da epiderme, odor fétido e presença de pelos circundando a lesão.

De acordo com Nicoletti (2004), a lesão proliferativa pode-se estender ao bulbo dos talões danificando a camada córnea desse local e predispondo o surgimento de erosões no talão. Dopfer et al. (1997), classificam 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 (figura 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.



Figura 1 - Diferentes aspectos da dermatite digital. Da esquerda para a direita, uma lesão M1, seguida por uma M2 até estágio crônico da doença com projeções proliferativas.

### 3.1.4 Achados histológicos nas lesões de Dermatite Digital Bovina

Em estudo de achados histológicos realizado por Blowey e Sharp (1988), constatou-se que a dermatite digital provocava inflamação supurativa aguda da epiderme com áreas de necrose, hiperqueratose, associado a presença de agregados linfocitários e células plasmáticas perivasculares, indicando processo inflamatório nas camadas da derme. Romani (2003) relatou que o aspecto histológico mais encontrado à biópsia do espaço interdigital de bovinos portadores de DD é a nítida predominância dos eosinófilos sobre os demais tipos de polimorfonucleares.

Segundo estudos realizados por Dörfer et al. (1997) e Leist et al. (1998) os achados histológicos na forma hiperplásica da DD se caracterizaram por perda do epitélio e hiperqueratose, além de áreas de degeneração e presença de fibrina. No estrato espinhoso foi evidenciado acantose e no estrato basal aumento de figuras mitóticas com infiltração perivascular na derme. Entretanto, na forma ulcerativa da doença houve perda de todo o estrato córneo, com hemorragias pronunciadas nas bordas da área lesada. Observaram-se

vários abscessos na junção derme/epiderme, além de um pronunciado infiltrado perivascular na derme com predomínio de neutrófilos e eosinófilos. Na forma proliferativa a epiderme encontrou-se espessada, o estrato espinhoso apresentou elevado grau de acantose, com presença de grânulos de ceratohialina. Já o estrato granuloso apresentou-se com aspecto espongiiforme, com inúmeros vacúolos vazios. (Döpfer et al., 1997; Leist et al., 1998)

Souza (2005) após realizar exames histopatológicos de 60 vacas com DD em diferentes graus, observou nas lesões hiperplásicas predominância de 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 de exploração leiteira no estado de Goiás, utilizando 40 fêmeas bovinas em quatro grupos com dez animais cada. 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.

Silva (2009) avaliando 40 fêmeas portadoras de DD, relata como principal achado histológico intensa eosinofilia, sendo que, em animais com lesão mais crônica a intensidade foi superior.

Moreira (2017) realizou 66 biópsias de Dermatite Digital em diferentes propriedades no estado de Minas Gerais, classificando os achados de acordo com Nielsen et al. (2016), em escore de 0 a 3, sendo 0 epiderme normal; 1 a proliferação epitelial leve ou focal e a hiperqueratose; 2 proliferação epitelial moderada e acantose; e 3 dano extenso ou difuso com proliferação epitelial severa, acantose e exsudação, erosão ou necrose da dermal. Já a resposta inflamatória foi classificada como 0 quando não houve alteração; 1 quando houve um aumento leve no número de linfócitos e células mononucleares; 2 quando o aumento das células inflamatórias foi moderado e 3 quando foi grave e difusa. Trinta e oito das 66 biópsias DD, (57,6%) foram caracterizadas por proliferação epitelial severa e acantose, além disso, a epiderme apresentava áreas de erosão, úlcera e a derme apresentava exsudação, necrose de papila dérmica e infiltração inflamatória extensiva, representando assim o escore 3. Vinte e seis amostras (39,4%) apresentaram aumento moderado da espessura da epiderme sem ulceração e infiltração moderada de células inflamatórias na derme (escore 2), enquanto as duas últimas amostras DD (3%) apresentaram alterações menores representadas por leve acantose.

### **3.1.5 Epidemiologia e fatores de risco da Dermatite Digital Bovina:**

Ferreira (2003), trabalhando com 117 vacas da raça Holandês em um sistema intensivo, do tipo free stall, no município de Pedro Leopoldo, relata a prevalência de 44% de DD nos animais avaliados, dados que corroboram com o resultado encontrado por Souza (2002), sendo a dermatite digital responsável por prevalência de 30,3 % das lesões encontradas em 323 vacas da raça Holandês e mestiças de 63 fazendas na região de Pedro Leopoldo. O mesmo autor em 2005 avaliou durante doze meses 100 vacas em lactação da raça Holandês, alocadas em sistemas do tipo free stall, no município de Esmeraldas, Minas Gerais, foi encontrado uma incidência de 55% de claudicação, sendo a DD responsável por 30% dessas lesões. O pesquisador relacionou essa elevada incidência de DD as condições precárias de higiene das instalações (Souza, 2005). 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. Já Casagrande (2013) avaliando 210

animais de sete categorias etárias diferentes encontrou uma prevalência para DD de 23,8%.

Smitis (1992), avaliou a prevalência de lesões podais em sistemas intensivos nos Estados Unidos, onde foi observado uma prevalência de 22,6% de dermatite digital nos animais avaliados, enquanto Rodriguez (1996), encontrou uma prevalência de DD de 36% nas propriedades avaliadas no Sul dos Estados Unidos. Beemaster et al. (1992), estudando 759 vacas leiteiras na Costa Rica, encontraram uma prevalência de lesões de 69,7%, sendo a dermatite digital responsável por uma prevalência de 52%. Em um estudo na Holanda realizado por Shearer et al (1999), utilizando 2121 vacas em sistemas intensivos foi encontrado uma prevalência de 17,6% de dermatite digital nos membros pélvicos. Segundo Warnick et al (2001), nos Estados Unidos, a dermatite digital foi a principal causa de claudicação em bovinos de leite alocados em sistemas intensivos, estando implicada em 50,5% dos casos.

Houlzhauer et al. (2006) avaliaram 383 rebanhos na Holanda, a DD foi encontrada com 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. Pozzatti et al (2009) avaliaram 356 animais alocados em sistemas intensivos, e foi possível observar que 41,1% dos animais claudicantes apresentavam dermatite digital. Em rebanhos do Chile, foram registradas prevalências de variando de 6,6% a 7,7% de dermatite digital em diferentes rebanhos do país. A baixa prevalência em comparação com a situação de outros países pode ser atribuída às condições de criação de bovinos leiteiros naquele país, predominantemente extensiva com os animais a pasto (Flor e Tadich 2008). 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% do rebanho. Moreira (2017) avaliando a prevalência de DD em 48 fazendas encontrou a prevalência de 32,7% dos animais acometidos, sendo a principal afecção podal encontrada nos animais avaliados.

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, não é o único fator envolvido para a disseminação da doença (Wilson-Welder et al, 2015). Materiais utilizados no casqueamento preventivo e corretivo, ambientes úmidos e com grande quantidade de matéria orgânica, falhas ou ausência do uso de pedilúvio são considerados fatores de risco para o início e disseminação da doença (Klitgaard et al, 2014, Moreira 2017). 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).

### **3.1.6 Microbiomas encontrados na dermatite digital:**

Diversos trabalhos mostram a dermatite digital 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 de consórcio com outros agentes. Sendo assim, a discussão sobre a etiologia da DD é relatada por diversos estudos, e atualmente essa patologia vem sendo classificada com doença polimicrobiana, já que outros agentes foram encontrados nessas lesões, tais como: *D. nodosus*, *Porphyromonas*, *Crotonatoxidans Alkaliphilus*, *F. necrophorum*, *Leptospira broomi*, *pepitococcus*, além de *Staphylococcus*, e *Streptococcus*, possivelmente de lesões secundárias (Wilson-Welder et al, 2015, Troot, 2003).

Segundo Stamm et al., (2002) a natureza e a localização das lesões de dermatite digital, juntamente com a presença de contaminação fecal e bactérias ambientais, têm dificultado a identificação definitiva do agente etiológico. Em estudos realizados em países na Europa e América do Norte, foram encontradas espiroquetas como microrganismos predominantes em lesões de DD. A identificação desses agentes ocorreu por microscopia utilizando-se técnica de coloração de sais de prata associado a coloração pelo método de Gram e microscopia em campo escuro. A localização das espiroquetas na junção entre o tecido vivo e necrosado e a sua aparente invasão ao tecido queratinizado da epiderme

sugerem que eles sejam agentes primários da enfermidade (Doffer, et al. 1997, Lima, 2008).

Devido à dificuldade em cultivo de bactérias do gênero *Treponema*, o estudo da etiologia da Dermatite digital se torna grande desafio para os pesquisadores. O primeiro cultivo *in vitro* de espiroquetas associados à dermatite digital de bovinos de aptidão leiteira ocorreu na Califórnia em 1995, sua inferência ao *Treponema* ocorreu devido a características fenotípicas do gênero em questão (Walker et al., 1995). Lima (2008) realizou cultivo e identificação molecular com base na análise de sequências de genes 16S RNAr de isolados de DD. Foram identificadas as seguintes espécies bacterianas, *T. pedis*, *Leptospira broomi*, *L. fainei*, *L. licerasiae*, *L. wolffii*, *Corynebacterium appendicis*, *Cupriavidus gilardii*, *Enterococcus casseliflavus*, *E. gallinarum*.

Diversas tentativas de induzir a doença com a utilização de culturas puras de bactérias já encontradas na lesão através do método de inoculação desses agentes foram malsucedidas (Wilson-Welder et al, 2015). Entretanto, Gomez et al. (2012), conseguiram reproduzir a doença através de um macerado das lesões de DD e posterior inoculação em membros de animais sadios. Permanecendo enfaixados, e mantidos em ambientes com ausência de oxigênio. Após 12 a 25 dias nessas condições, foi reproduzido a lesão e detectado a presença de *Treponema*.

Stamm et al., (2002) também relataram que espiroquetas foram isoladas em animais acometidos com DD no estado da Califórnia, nos EUA, possuem características fenotípicas do gênero *Treponema*. Segundo a análise da sequência parcial de 16S rDNA os autores verificaram que os vários clones isolados pertenciam a três tipos filogeneticamente relacionados aos treponemas da cavidade oral humana, sendo esses :*T. denticola*, *T. medium*, *T. vincentii* ou da área genital, *T. phagedenis*, corroborando com esses dados Trott et al (2003) verificaram que quatro amostras isoladas de dermatite digital de bovinos de aptidão leiteira dos estados da Califórnia e duas amostras de bovinos também de aptidão leiteira de Iowa possuem a sequência 16S rDNA idêntica e que a similaridade a *T. phagedenis* foi de 98% e 99% com um espiroqueta não cultivável. Shibahara et al. (2002), pesquisaram a presença simultânea de espiroquetas em lesões de DD e de colite em bovinos no Japão, constataram que diversas bactérias espiraladas

estavam presentes nas lesões de DD e nas lesões intestinais visualizadas pelas colorações do Gram e de Warthin-Starry.

Diniz (2008), trabalhando com biopsias de lesões de DD, de vacas alocadas em fazendas semi intensivas no Brasil, visualizou a presença de microrganismos espiralados pelo método de microscopia de campo escuro após a inoculação do material nos meios OTI e EMJH. Após essa etapa foi também realizada a amplificação por PCR, com conjunto de iniciadores universais 16S rDNA, a partir do DNA obtido das duas amostras de espiroquetas cultivadas, o produto da amplificação das amostras foram sequenciados e a análise da similaridade entre as sequências, foi concordante com uma média de 99% de similaridade para microrganismos não cultiváveis, 75% de similaridade para *Treponema denticola*, 70% para *Treponema phagedenis* e 68% para *Treponema pedis*.

Atualmente, métodos independentes de cultivo têm sido utilizados para identificar os patógenos envolvidos na etiologia da dermatite digital, 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 bactérias de maior predomínio na DD, são as espiroquetas do gênero *Treponema*, principalmente nas partes mais profundas da lesão, entretanto, outros agentes parecem agir em conjunto com as espiroquetas, sendo esse sinergismo pouco discutido na literatura, assim como o real papel das bactérias na patogênese da doença (Rasmussen et al, 2012; Santos et al, 2012).

Segundo Nielsen et al, 2016 as evidências indicam um papel importante das espiroquetas, especialmente do gênero *Treponema* na etiologia da DD, já que 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. *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).

Evans et al. (2008) avaliaram lesões de DD para identificar os agentes etiológicos presentes nas lesões e na pele integra utilizando os métodos de PCR para fragmentos do gene 16s rRNA e imunohistoquímica. Os pesquisadores dividiram a classificação treponemal em 3 grupos sendo: Grupo 1: Presença de *T. médium*/*T. Vincentinii*, Grupo 2: Presença de *T. phagedenis* e Grupo 3: Presença de *T. putidum*/*T. denticola*.. Em 98%

das amostras analisadas encontraram a presença de treponema, sendo que todos os três grupos apareceram juntos em 74,5% das lesões. A espécie de *Treponema* com maior prevalência foi o grupo 3, presente em 98% das amostras avaliadas. Na pele saudável foi observado a presença de *Treponema*, porém de espécies não pertencentes aos grupos 1, 2 e 3. Resultados que corroboram com o estudo realizado por Moter et al. (1998), onde encontram a presença de 70% de *Treponema* dos Grupos 1,2 e 3 nas lesões avaliadas. Nascimento et al. (2015) utilizando biopsias de animais acometidos com DD encontraram a associação de *T. phagedenis*, *T. medium* e *T. Vicentii* em 94,45% das amostras estudadas.

Utilizando a técnica de imunofluorescência em lesões de DD, Dopfer et al. (1997) encontraram bactérias do gênero *Treponema*, já nas lesões ulceradas e dolorosas foi encontrado grande quantidade de *Campylobacter faecalis* associado ao *Treponema*. Brandt et al. (2011), avaliaram os agentes presentes nas lesões de dermatite digital, além de além de encontrarem vários filotipos de *Treponemas* como *T. pedis*, *T. medium* e *T. phagedenis* nas lesões de DD, localizaram em 22% das lesões a presença de papiloma vírus, sendo a amostra viral também encontrada em fragmentos de tecidos saudáveis.

Zinicola et al. (2015) realizaram um estudo em 140 amostras feitas partir de 89 animais acometidos com DD em diferentes graus. As lesões foram classificadas e adaptadas segundo o método descrito por Dopfer et al. (1997). A distribuição de coleta se deu por uma amostra de 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 íntegra, sem acometimento DD. Os achados mostraram maior prevalência de 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 lesões de DD inativas, em contrapartida as lesões inativas apresentaram menor proporção de *Treponemas* e um aumento das bactérias: *Crotonatoxidans*, *Porphyromonas*, *Sedimentibacter*, *Alkaliphilus*, *Sedimentibacter hydroxybenzoicus*, e *Filifactor villosus*, entretanto a pele saudável foi caracterizada pela presença bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* e *Actinobacteria* (Zinicola et al, 2015). Realizando novos estudos em 2015 os mesmos pesquisadores analisaram 16 amostras de biópsias de oito vacas acometidas com DD, classificadas como lesões ativas, inativas e de pele íntegra. Constataram os filos *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Chordata* em grande proporção na pele saudável. Em

amostras de DD ativa *Spirochetas* e *Bacteroidetes* foram altamente prevalentes, entretanto na lesão inativa observaram a presença de *Proteobacteria* e *Firmicutes* (Zinicola et al, 2015).

De modo semelhante, Rasmussen et al. (2012) realizaram 90 biópsias de lesões de DD e 24 biópsias da pele saudável de animais oriundos de rebanhos leiteiros da Dinamarca e Noruega. Em todas as amostras foram encontradas filotipos de *Treponema*, em média sete por lesão. Os pesquisadores encontraram a presença de *D. nodosus* em 51% das lesões, essa bactéria também foi relatada em três amostras de pele aparentemente saudável. Ocorreu a associação de *Treponema* ao *D. nodosus*, em animais acometidos com DD, e em duas amostras de pele integra, dados esses que corroboram com o estudo realizado por Capion et al. (2008), onde os pesquisadores executaram 132 biópsias de DD, e com a técnica de hibridização *in situ* fluorescência, relataram a presença de 29% das amostras de dermatite digital a presença de *D. nodosus*. Segundo Moore et al. 2005, a bactéria *D. nodosus* associada ao *F. necrophorum* são reconhecidos mundialmente como os agentes causadores da podridão dos cascos em ovinos e caprinos. O agente *D. nodosus*, gera proteases extracelulares que podem desencadear injúrias teciduais facilitando a penetração e colonização do tecido por bactérias do gênero *Treponema*, sendo assim esses dois microrganismos podem apresentar um sinergismo na fase inicial da dermatite digital (Wilson-Welder et al, 2015).

Sullivan et al. (2015) estudando microrganismos presentes em lesões de Dermatite Digital e em pele integra, encontraram *D. nodosus* e *F. necrophorum* respectivamente, em 71% e 44% das lesões de DD avaliadas. Já nas amostras de pele saudável, foram observados mais de 20% a presença desses dois agentes. Knappe-Poindecker et al. (2014), trabalharam com amostras de DD, de 14 rebanhos leiteiros da Noruega, sendo que a associação bacteriana de maior prevalência nas lesões estudadas foram *Treponema* com *D. nodosus*, em 56% das análises. Koniarova et al. (1993) avaliaram 52 biópsias, de animais acometidos com DD, classificados como M2, segundo Dopfer et al. (1997) e encontraram a presença de *F. necrophorum* em 12% das lesões e em 25% foi encontrado a presença de *P. levii*, sendo que todas as amostras foram positivas para *Treponema*. Dados que se assemelham ao estudo realizado por Yano et al. (2010), onde avaliaram cinco lesões de DD e encontraram *T. phagedenis* e *T. denticola* em todas as amostras, e na parte superficial da lesão *P. levii* foi a bactéria predominante.

Klitgaard et al. (2013) utilizando os métodos diagnósticos hibridização *in situ* fluorescência e sequenciamento de nova geração, realizaram biópsias de 36 vacas leiteiras acometidas com DD provenientes de diferentes rebanhos da Espanha. Macroscopicamente, 60% das lesões foram classificadas como M2 e o restante estavam em diferentes fases da lesão. Em 96% das amostras foram detectados a presença de *Treponema*, sendo os mais prevalentes *T. denticola* e *T. pedis* (45% das amostras), *T. phagedenis* (20% das amostras), *T. médium* (18% das amostras) e *T. refringens* (17% das amostras). Nesse estudo também foi observado a presença de 15 filotipos de *Treponema* diferentes, que ainda não tiveram identificações. Em média nas 36 amostras de DD foram encontrados oito filotipos de *Treponemas* por lesão. *D. nodosus* e *F. necrophorum* também foram encontrados nas partes mais profundas e no meio das lesões. Andrade (2017), avaliando 35 amostras de lesões submetidas à técnica de sequenciamento de nova geração pelas probes V1 e V2 realizou 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%

Nielsen et al. (2016) avaliaram 37 animais, sendo que dez animais apresentavam a pele íntegra e os demais presença de dermatite digital em diferentes estágios da lesão. Quatro amostras foram caracterizadas por ulcerações circunscritas e áreas de hiperqueratoses com formação de crostas, classificadas como M3, quatorze como M4, onde as lesões apresentavam áreas circunscritas dominadas por hiperqueratose e proliferação da epiderme com ausência de ulceração. Nove casos foram classificadas como M5, já que expunham discreta hiperqueratose focal com proliferação da epiderme, sendo não definível segundo o método descrito por Dopfer et al. (1997). Foi observado uma diferenciação entre os microrganismos encontrados no tecido saudável e nas lesões de DD. *Treponema*, *Mycoplasma*, *Fusobacterium* e *Porphyromonas* foram encontrados em tecidos afetados, enquanto na pele saudável os filos de maior relevância foram: Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidete. Realizando a técnica de FISH, foi observado predomínio do gênero *Treponema* na parte profunda da lesão, constituindo aproximadamente 90% da microbiota infectante, sendo encontrados 15 filotipos

diferentes, os de maior prevalência foram: *T. phagedenis* e *T. refringens*. Avaliando a superfície epidermal foi observado a presença de *F. necrophorum* e *P. levii*

Santos et al. (2012) trabalharam com amostras de DD e pele íntegra de vacas da raça Holandês alocadas em uma propriedade dos Estados Unidos. As lesões de DD foram divididas em três camadas sendo essas: superficial, intermediária e profunda. A composição microbiana entre amostras integras e de lesões de DD, apresentou diferença, sendo Firmicutes e Proteobacteria os principais filos detectados no tecido saudável, já espiroquetas do gênero *Treponema* foram os principais grupos encontrados na camada mais profunda da DD.

Krull et al. (2014) desenvolveram um estudo longitudinal de três anos na fazenda da Universidade de Iowa, coletando 48 amostras de Dermatite Digital de 26 vacas em lactação, sendo que o rebanho da propriedade consistia em 400 animais em lactação com prevalência estimada de DD em 50%. No decorrer da pesquisa não utilizou nenhuma medida preventiva ou curativa para controlar a doença, permitindo a avaliação da evolução da Dermatite Digital. As lesões foram classificadas em: estágio zero, representando a pele íntegra, A1, caracterizava a lesão inicial com ausência de ulceração, B1, lesão já com discreta ulceração e estágio três, sendo a doença responsável por claudicação. Através da análise de FISH, os pesquisadores observaram a presença das famílias: Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Bacteroidaceae, Corynebacteriaceae e Porphyromonadaceae na pele íntegra. Na fase ulcerativa da lesão as espiroquetas do gênero *Treponema* foram predominantes, correspondendo a 94,3% das bactérias encontradas, principalmente, *T. denticola*, *T. phagedenis*, *T. pedis*, *T. médium*, em contrapartida no estágio inicial da doença e a microbiota da lesão foi semelhante a que foi encontrada na pele íntegra. O curso médio da evolução da doença foi de 135 dias, dado esse não semelhante ao trabalho realizado por Rebhun et al. (1980), onde os pesquisadores observaram um período de 14 a 21 dias entre as mudanças de fases da Dermatite Digital. Segundo Somers et al. (2005), lesões ulcerativas, fase M2, podem persistir por longos períodos no animal, podendo chegar até a meses. Em estudos realizados no Brasil, Souza (2005) observou que 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. De acordo com Losinger (2006), existem espécies de *Treponema* causadoras de Dermatite Digital

que podem gerar imunossupressão de macrófagos, prejudicando a resposta imune inata assim como a reparação tecidual, explicando em parte a persistência da doença.

Andrade (2017), realizando 31 biópsias de DD de vacas leiteiras alocadas na fazenda da Universidade Federal de Minas Gerais, observou a presença bacteriana em 96,55% das lesões avaliadas, sendo bactérias do gênero *Treponema* as mais frequentes, estando presentes em 93,55% das lesões, já *D. nodosus* estava presente em 58,06%, *F. necrophorum* em 35,49% e *P. levii* em 33,43%. O autor também avaliou a densidade de bactérias dentro de cada amostra, para isso utilizou uma classificação de escore de acordo com Rasmussen et al. (2012) e Klitgaard et al. (2013), (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), bactérias do gênero *Treponema* foram as que tiveram maior densidade nas amostras analisadas, apresentando 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%. Avaliando os filotipos de *Treponema* presentes nas lesões foram descritos sete filotipos, sendo eles: *T. pedis*, *T. refringes*, *T. phagedenis*, *T. medium* e alguns filotipos 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). Dados que corroboram com os resultados encontrados por Moreira (2017), onde *Treponema* spp. foram as bactérias mais frequentes e abundantes, presentes em 64 das 66 amostras (97%), já *P. levii* foi a segunda bactéria mais prevalente com 64,6% de amostras positivas, seguido de *D. nodosus* (48,5%) e *F. necrophorum* (23,5%). Ainda nesse trabalho o Andrade, (2017) avaliou a invasão bacteriana total dentro da epiderme em cada amostra de biópsia, e 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. 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.

### 3.1.7 Modo de ação das bactérias envolvidas na Dermatite Digital Bovina:

Bactérias do gênero *Treponema*, se classificam por serem bactérias gram negativas e anaeróbicos facultativos. A participação desse agente na etiologia da DD é descrita por diversos autores (Moreira, 2017, Andrade 2017, Kittgard 2014, Souza 2005). Os treponemas apresentam alguns fatores de virulência sendo eles produção de adesinas, enzimas proteolíticas e colagenolíticas que causam penetração, danificação e destruição tecidual (Losinger et al, 2006). Lux et al. (2001) avaliando doenças periodontais em seres humanos causados por *Treponemas*, principalmente por *T. denticola*, mostraram que as espiroquetas apresentam grande capacidade de penetração tecidual e que sua motilidade permite a migração para locais favoráveis à sua proliferação, sendo assim um importante fator de virulência.

*Dichelobacter nodosus*, são bactérias gram negativas e anaeróbicas, (Witcomb et al 2014). Moreira (2017) e Andrade (2017), observaram a presença das bactérias *D. nodosus*, *F. necrophorum* e *Phorphyromonas Levii* em lesões de Dermatite Digital bovina, sugerindo assim a participação desses agentes na etiologia da doença. Segundo Witcomb et al 2014, o *D. nodosus* apresenta capacidade produtora de proteases extracelulares e extrema capacidade ceratolítica, podendo assim causar danos teciduais. *Fusobacterium necrophorum*, é um bacilo gram negativo anaeróbico e comensal da flora gastrointestinal (Andrade 2017). A ação patogênica dessa bactéria se dá pela liberação de leucotoxinas, endotoxinas, proteases e adesinas, ocasionando inflamação local e destruição dos tecidos acometidos (Sullivan et al, 2015). *P. levii*, bactérias gram negativas e anaeróbicas, sendo o principal fator de virulência a produção de proteases (Leon et al, 2016).

### 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 utilizada em estudos humanos pela primeira vez em 1986 por Pinkel et al. (Pinkel 1986) representa uma técnica citogenética usada para detectar e localizar a presença ou ausência de determinadas sequências de DNA (ácido desoxirribonucleico) ou RNA (ácido ribonucleico) em cromossomos. A técnica em questão consiste em um método

histoquímico que permite a visualização, identificação e enumeração simultânea 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 de oligonucleotídeos com marcação fluorescente em sua sequência alvo (Neves e Guedes, 2012). As principais vantagens da técnica de FISH sobre a imuno-histoquímica são a maior facilidade de sintetizar sondas específicas marcadas do que produzir anticorpos monoclonais ou policlonais e a possibilidade de detectar somente bactérias viáveis, nos tecidos no momento da fixação, sendo assim a técnica de hibridização *in situ* fluorescente apresenta maior sensibilidade e especificidade (Guedes, 2012). Outra grande vantagem na técnica de FISH, é sua utilização em diversos materiais, como sangue periférico, vilosidades coriônicas, tecidos parafinados, dentre outros (Tsshuchia, 2011). Como desvantagem o método de FISH, necessita de modernos equipamentos e com alto valor agregado (Sui, et al. 2009).

As sondas são sequências de oligonucleotídeos complementares e específicos marcados com substâncias fluorescentes, os quais se anelam ao seu alvo. As marcações das sondas podem ocorrer de duas maneiras, sendo essas a: direta e indireta. A etapa direta é a mais utilizada, já que se trata de um processo mais rápido e de fácil execução, onde um ou mais fluorocromos são diretamente conjugados às sondas que se ligam nas regiões 5' ou 3' do alvo. Segundo Botari et al. (2006), a técnica de FISH, tem a FISH tem quatro procedimentos básicos: fixação e permeabilização da amostra, etapa crucial para que as amostras contendo o RNA sejam fixadas, protegendo o RNA da degradação de enzimas endógenas e ocorra a penetração da sonda nas células, a segunda etapa é a hibridização, após esse processo o material passa pela terceira fase onde ocorre a lavagem para remoção das sondas em excesso e detecção pela microscopia fluorescente.

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. Para isso, ocorre a fragmentação do DNA é por um processo químico, mecânico ou enzimático, de forma que todo o genoma seja coberto da maneira mais uniforme possível, posteriormente é feito uma amplificação desse DNA, visando aumentar a fonte de sinal luminoso para a maioria dos sequenciadores, para que se gere em um pequeno espaço físico milhares de cópias de cada fragmento de DNA. 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).

#### **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 EXPERIMENTAL**

O experimento foi conduzido entre maio e agosto de 2016 na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, situada no município de Igarapé/MG. A fazenda está localizada a 20°04'31 de latitude Sul e 44°18'06 de longitude Oeste de Greenwich, com altitude média de 786 metros. A propriedade possui área total de 246 hectares.

##### **4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizadas 22 vacas da raça Girolando, variando nas diferentes composições genéticas Holandês-Zebu, com DD em diferentes graus. Os animais possuíam entre três a sete anos de idade e estavam entre a segunda e sexta lactação, com produção média diária de 19 litros de leite.

##### **4.3 MANEJO DOS ANIMAIS**

As vacas em lactação eram alocadas em piquetes de capim braquiária (*Brachiaria brizantha*), onde recebiam, no período de dezembro a maio, suplementação no cocho após

a ordenha com concentrado a base de milho, farelo de soja, caroço de algodão, mineral e polpa cítrica. Já na estação seca, de maio a novembro, a dieta baseava-se em silagem de milho e concentrado, sendo essa fornecida com base nos dias em lactação e na produção de leite conforme os requerimentos do *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (NRC) 2001. A mistura do concentrado e volumoso era feita manualmente pelo funcionário da fazenda e fornecida em cochos com espaçamento de 70 centímetros por vaca. Os animais eram ordenhados duas vezes ao dia, sendo a primeira ordenha iniciada às seis horas e a segunda às 14 horas. As divisões dos lotes eram baseadas na produção de leite e dias em lactação, sendo agrupadas em quatro lotes. O primeiro alocava as vacas de alta produção e primíparas, segundo lote composto por vacas de produção mediana, o terceiro lote 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, não era realizado nenhum manejo preventivo na secagem e período pré-parto. Nos animais em lactação era realizada passagem no pedilúvio durante três dias consecutivos por semana. Era utilizado no pedilúvio solução de formol a 5%, sendo a mesma trocada a cada 300 passadas. O pedilúvio possuía 2,5 metros de comprimento, 0,80 centímetros de largura, 20 centímetros de altura e era coberto. Ressalta-se que antes de passarem pelo pedilúvio os animais passavam por um lava-pés com mesmas medidas do pedilúvio localizado a 6 metros do mesmo. A limpeza dos currais e instalações era feita por raspagem manual e remoção dos dejetos através de uma carroça puxada por tração animal diariamente.

#### 4.4 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. Resumidamente, a pontuação M1 é uma pequena úlcera ativa (<2 cm de diâmetro) com superfície úmida e coloração vermelho-cinza manchada; M2 é um estágio ativo ulcerativo maior (> 2 cm de diâmetro) e normalmente doloroso após a manipulação; M3 é o estágio de cura onde a lesão é coberta por uma crosta marrom seca, normalmente sem dor na manipulação; M4 é o estágio crônico com crescimentos hiperqueratóticos proliferativos que variam de projeções papiliformes a similares; M4.1 é o estágio crônico com pequeno foco M1 ativo e doloroso.

Para a identificação dos agentes envolvidos na etiologia da DD, foi realizado a exérese da lesão, conforme demonstrado pela figura 2, para isso o membro acometido foi devidamente contido no tronco de casqueamento seguido pela higienização com escova, água corrente, sabão e posteriormente lavada com solução de iodo degermante. Após os processos descritos, o animal foi submetido a uma anestesia local pela técnica de Bier modificada, que consiste na punção da veia digital superficial dorsal ou plantar/palmar e aplicação de cloridrato de lidocaína a 2%. A cirurgia foi feita retirando todo o material lesionado como descrito por Souza (2005). Após o procedimento cirúrgico foi realizado uma lavagem da área acometida com solução de iodo degermante e aplicação de iodo a 10% na região lesionada. Sobre a ferida cirúrgica foi colocado pasta composta de furazolidona com tetraciclina em pó à 10%. 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 (12 cm largura x 3,5 comprimento). A bandagem foi protegida por uma camada de emulsão asfáltica. A cada 3 dias realizou-se a troca da bandagem até a cura da lesão.



Figura 2- Etapas realizadas para a exérese da Dermatite Digital

O material extraído foi colocado em uma bandeja previamente limpa, e seccionado, em três diferentes pontos, sendo esses denominados R1, R2 e R3. Onde R1, correspondia ao centro da lesão, R2 borda da lesão já R3 a pele adjacente a lesão. Cada fragmento seccionado foi dividido em duas metades e cada parte acondicionada em tubos de eppendorff de 1,5 ml com formol tamponado a 10% para execução da técnica de FISH e histopatologia já a outra metade com solução de RNA later para execução da técnica de sequenciamento de nova geração (figura 3).

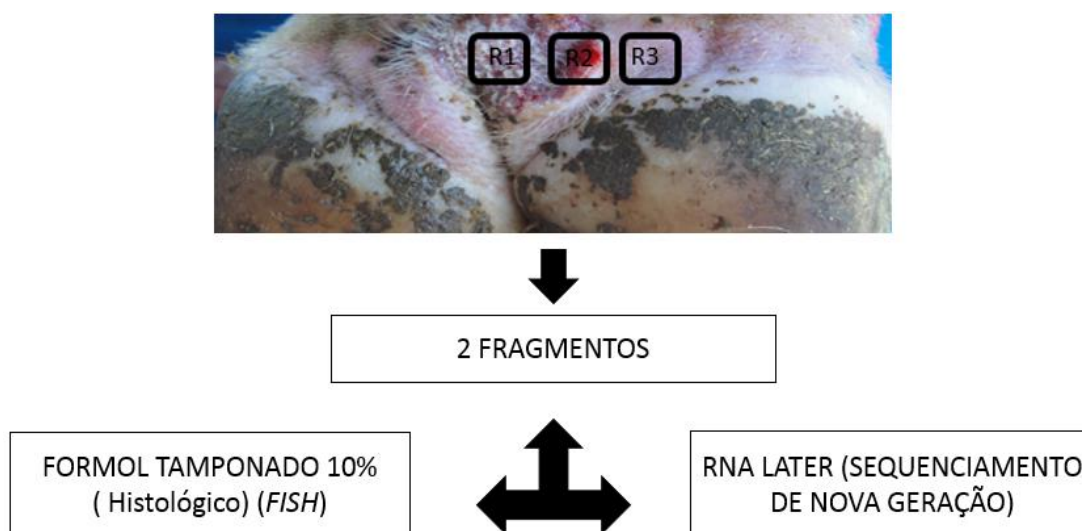


Figura 3-Coleta de três diferentes pontos da lesão de Dermatite Digital, sendo R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (pele adjacente a lesão) para a execução da técnica de FISH, histologia e sequenciamento de nova geração.

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

Secções de aproximadamente 4mm foram cortados e montados em lâminas Super Frost Plus, para realizar a avaliação quanto à frequência, densidade e localização de bactérias do gênero *Treponema*, *D. nodosus*, *F. necrophorum* e *P. levii*. Foram utilizadas sondas de oligonucleotídeos marcados na extremidade 5' com isotiocianato de fluoresceína (FITC) para avaliação do domínio Bacterium. Para as demais bactérias, empregou-se sondas de bactérias específicas marcadas com o derivado de isotiocianato Cy3. Todos os fragmentos da lesão (R1, R2, R3) das 22 amostras, foram classificados quanto à frequência, densidade e localização de bactérias pela técnica de *FISH* (figura 4), de acordo com Klitgaard et al. (2008). Onde a densidade das bactérias foram pontuadas em escore 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), já a invasão bacteriana foi pontuada de 0 a 3 (0, não há bactérias invasivas; 1, bacterias presentes na superfície da lesão; 2, moderado número de bactérias no intermédio da lesão; 3, elevado número de bactérias profundas a lesão invasivas).

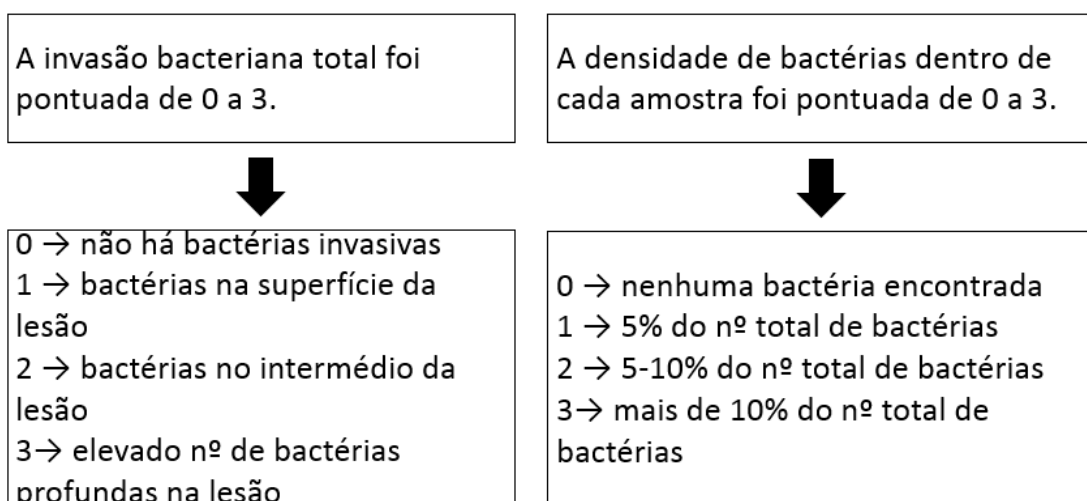


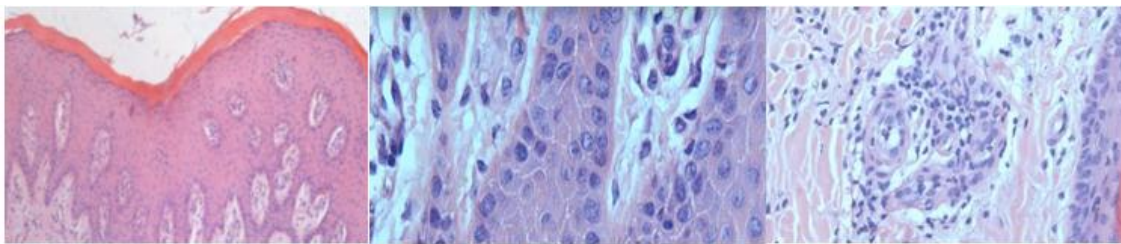
Figura 4- Escores utilizados para a classificação da invasão bacteriana e densidade bacteriana nos fragmentos das lesões de Dermatite Digital

As análises de *FISH* e o sequenciamento de nova geração foram executadas na Universidade Técnica da Dinamarca (DTU).

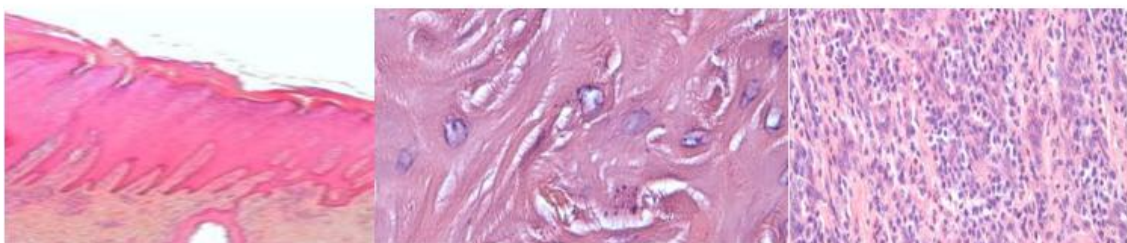
#### 4.6 HISTOLOGIA

As 22 amostras de cada região (R1, R2 e R3) também foram utilizadas para a avaliação histológica. Para isso as amostras foram fixadas em formol tamponado, emblocadas em parafina para posterior corte e confecção das lâminas. Após essa etapa as lâminas foram inicialmente desparafinadas em xilol, hidratadas em soluções de álcoois decrescentes, e a seguir, lavadas com água corrente. Logo após, foram coradas em hematoxilina lavadas, e novamente coradas em eosina. As lâminas foram, então, banhadas em água corrente, desidratadas em soluções de álcool crescente e posteriormente diafanizadas em xilol e montadas, para posterior visualização no microscópio óptico

A epiderme e derme foram classificadas segundo o método proposto por Nielsen et al. (2016) por escore de 0 a 3. A classificação epidermal foi de 0 a 3, onde o escore 0 apresentava uma epiderme íntegra, o escore 1 mostrava uma leve proliferação epitelial e hiperqueratose, já a presença de acantose e moderada proliferação epitelial foi definido como escore 2, já a presença de exsudação, úlceras ou necrose e dano extenso com severa proliferação epitelial foi caracterizada como escore 3. Já a resposta inflamatória foi classificada como 0 quando não houve alteração, pontuação 1 quando houve um aumento leve no número de linfócitos e células mononucleares, pontuação 2, quando o aumento das células inflamatórias foi moderado e o escore 3 quando foi grave e difusa, conforme demonstrado na figura 5, onde é possível observar diferentes estágios de pontuação das alterações epidérmicas e dérmicas em uma lesão de Dermatite Digital.



1



3

Figura 5. Diferentes segmentos da pele de lesão de Dermatite Digital apresentam alterações epidérmicas e dérmicas variam de escore 1 a 3.

#### 4.7 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

22 amostras de cada região (R1, R2 e R3) 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*) de acordo com Klitgaard et al. (2008).

As sequencias obtidas foram encaminhadas para o Centro Nacional de DNA de Sequenciamento de Alto Rendimento da Universidade de Copenhagen, 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.

#### 4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a caracterização macroscópica das lesões, caracterizar os microbiomas encontrados nas 3 regiões estudadas tanto pela técnica de FISH e pelo sequenciamento de

nova geração, assim como a classificação histológica foi utilizado a estatística descritiva. Foi utilizado o teste de *Fisher*, considerando nível de significância  $P \leq 0,05$  (Sampaio, 2010), para comparar a média dos escores encontrados para densidade e invasão bacteriana na *hibridização in situ fluorescência* em cada região estudada. A Análise de Componentes Principais foi utilizada para verificar a tendência da relação entre os achados histológicos e do sequenciamento de nova geração.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLOGICA DAS LESÕES DE DERMATITE DIGITAL.

A prevalência encontrada de DD nas vacas em lactação no presente estudo foi de 29,3% (22 animais acometidos em 75 vacas em lactação). A classificação macroscópica das lesões de DD estão apresentadas na Tabela 2, sendo 23% (5/22) das lesões encontradas como M1, e 64% (14/22) classificadas como M2. Os resultados encontrados, demonstram alta prevalência dessa enfermidade na propriedade, sendo uma doença de extrema importância na bovinocultura de leite, estando ligada a perdas diretas e indiretas, tais como redução de consumo de matéria seca, queda na produtividade, atraso reprodutivo, modificação no bem estar dos animais e claudicação (Andrade, 2017).

Nas lesões M1, não foi observado a presença de exsudato e na maioria dos casos a pele digital e os pêlos que circundavam a lesão, apresentavam-se normais com coloração da pele variando de branco a rosa claro. Já nas lesões M2, os animais apresentavam dor a palpação, lesões ulcerativas e a coloração de pele avermelhada. Não foram encontradas lesões crônicas (M4), e baixa prevalência de lesões de cicatrização, mostrando assim que a propriedade apresentou DD em sua fase aguda, em mais de 87% dos casos, alguns fatores encontrados na fazenda podem ter contribuídos para as lesões estarem nos casos agudos, como uso inconstante de pedilúvio, falta de monitoramento e estação do ano em que foi conduzido o experimento. A prevalência encontrada neste trabalho assemelha-se ao encontrado em outros estudos onde se observa valores de 20 a 32,7% (Souza, 2002; Ferreira 2003; Casagrande 2013; Moreira 2017). A dermatite digital é relativamente descrita como nova nos rebanhos sendo no Brasil relatada pela primeira vez na década de 90, mas possivelmente já estava presente a mais tempo nas propriedades, a prevalência dessa doença vem aumentando devido a fatores de risco, tais como alta densidade animal,

fatores nutricionais, acúmulo de matéria orgânica, fatores climáticos e movimentação de animais entre fazendas. Já sendo descrita nessa fazenda outras vezes, mostrando que tal afecção é endêmica na propriedade, Mauchle (2001), avaliando a prevalência de lesões podais na mesma fazenda do presente trabalho, observou prevalência de 29,09% e 10% de DD respectivamente em vacas e novilhas após o período chuvoso, e 12,31% e 0% respectivamente em vacas e novilhas avaliadas após o período seco. Moreira (2017), também avaliou a prevalência de DD em fazendas na região do Prata- MG, onde encontrou 76,4% das lesões na forma aguda, sendo 51,2% classificadas como M1 e 25,2% como M2, em relação a lesões crônicas M4 ocorreu uma prevalência de 23,6%, dados que se assemelham ao presente estudo em relação a lesões agudas.

Tabela 2- Avaliação de vacas (n=22) com Dermatite Digital na fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa de acordo com a classificação morfológica (M1, M2, M3 e M4).

Número de Vacas	Classificação Macroscópica	Frequência de Classificação
5	M1	23%
14	M2	64%
3	M3	14%

Os resultados histológicos da derme e epiderme seguiram a classificação proposta por Nielsen et al. (2016) (Tab.3). Na R1, 54% das amostras apresentaram moderada proliferação tecidual associado a acantose, já 6% continham dano extenso com severa proliferação epitelial (Tab.3), em R2(borda da lesão) 33,5% das amostras apresentaram escore 2 já em R3(pele adjacente a lesão) 52% apresentaram leve proliferação tecidual . Já a derme foi caracterizada em R1 e R2 por 71% das amostras com moderado aumento de células inflamatórias, já em R3 66% das apresentavam leve proliferação de células inflamatórias (Tab.3).

Tabela 3. Classificação histológica da Epiderme e Derme de três regiões distintas em lesões de Dermatite Digital

Escore	R1(%)		R2(%)		R3(%)	
	Epiderme	Derme	Epiderme	Derme	Epiderme	Derme
1	40	22	56	22	58	66
2	54	71	38	71	38	30
3	6	7	6	7	4	4

R1(centro da lesão), R2(borda da lesão), R3(pele adjacente a lesão) na Dermatite Digital, através de escores de classificação 1(Epiderme: leve proliferação epitelial e hiperqueratose; Derme: leve aumento no número de células inflamatórias), 2(Epiderme: presença de úlceras e dano extenso a camada epitelial; Derme: moderado aumento de células inflamatórias), 3 (Epiderme: severa proliferação epitelial; Derme: aumento difuso de células inflamatórias).

Os achados histológicos foram caracterizados por lesões de caráter agudo com aumento da resposta inflamatória principalmente nas áreas central e borda da lesão associada a espessamento do extrato córneo em R1 e R2, respectivamente, tendo como principal objetivo dessas alterações a eliminação do agente agressor e regeneração da área acometida (Greenough, 2007). Em contrapartida, por se tratar de pele adjacente a lesão, a R3 foi caracterizada por baixa proliferação tecidual associada a leve presença de células inflamatórias. Achados semelhantes foram encontrados por Moreira (2017) onde o autor encontrou baixa prevalência de áreas de necrose e exsudação em lesões de DD crônicas e uma elevada hiperqueratose com alterações inflamatórias moderadas a severas, o mesmo foi relatado por Souza (2005), onde lesões de Dermatite Digital classificadas como grau 1 (hiperplásica) apresentavam hiperqueratose com vacuolização centrocelular com presença de células inflamatórias com predomínio de polimorfonucleares.

## 5.2 MICROBIOMAS ENCONTRADOS EM LESÕES DE DERMATITE DIGITAL

Foram avaliadas 66 biópsias de DD, sendo 22 de cada região (R1, R2, R3), pela técnica de FISH, onde foram caracterizadas: presença bacteriana, bactérias do gênero *Treponema* (Fig.6), *Dichelobacter nodosus* (Fig.7), *Porphyromonas levii* (Fig.8) e *Fusobacterium necrophorum* (Fig.9). Avaliando a frequência de bactérias nas regiões (Fig. 10) observou-se na região 1 a presença de bactéria em 93% das amostras, na região 2 esse valor foi de 94%, e na R3 de 76%. Bactérias do gênero *Treponema* foram as mais frequentes em todas as regiões, estando presentes em 88,35% das amostras R1, 84% em R2 e na R3 em 50% das biópsias. *Dichelobacter nodosus*, foi o segundo gênero de maior frequência, sendo na R1 presente em 66% das amostras, na região 2 em 52%, já na R3 em 40%. *Porphyromonas levii* foi a bactéria menos frequente nas três regiões estudadas, presente em 11,7% nas amostras R1, na região 2 em 16% e na R3 em 15% das amostras. *Fusobacterium necrophorum*, presente em todas as regiões, apresentou prevalência de 44% na R1, 21% na R2 e na região 3 25%. Os resultados encontrados nesse estudo pela técnica de FISH reforçam o conceito de que bactérias do gênero *Treponema* são os agentes mais frequentes envolvidos na patogênese da DD, e a detecção de outros agentes elucidam que a Dermatite digital é uma doença multibacteriana, sendo necessário a associação desses agentes para o desenvolvimento da doença. Esses resultados estão de acordo com 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). Andrade (2017) e Moreira (2017), observaram que aproximadamente que 90% das amostras de DD foram positivas para bactérias do gênero com *Treponema*

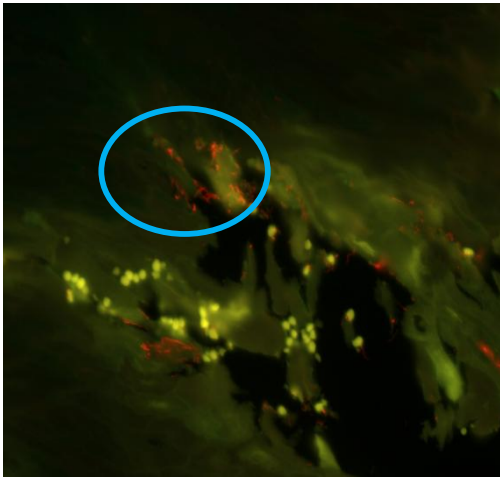


Figura 6. Corte histológico de biopsias de Dermatite digital – Método de FISH. *Treponema* sp.

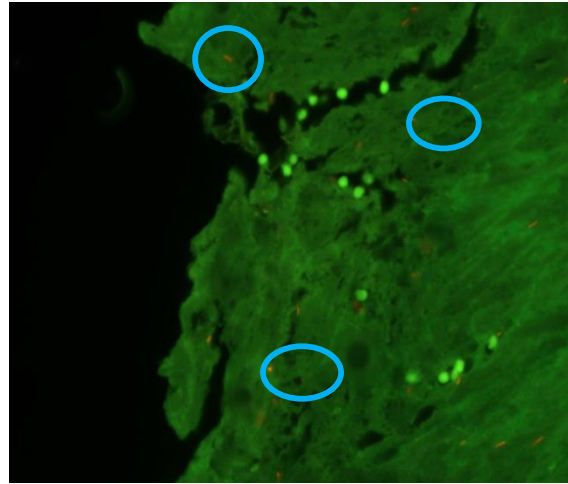


Figura 7. Corte histológico de biopsias de Dermatite Digital – Método de FISH. *D. Nodosus*

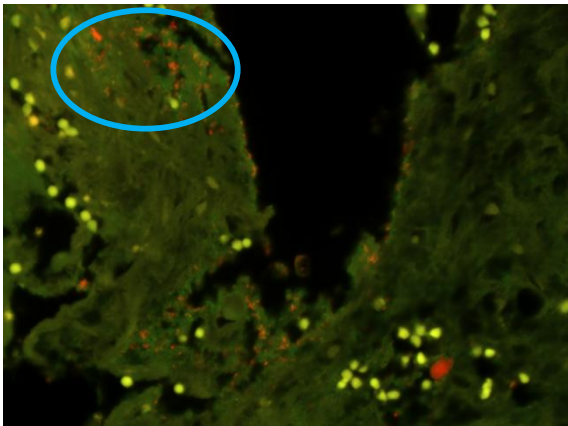


Figura 8. Corte histológico de biopsias de Dermatite digital– Método de FISH. *Porphyromonas levii*.

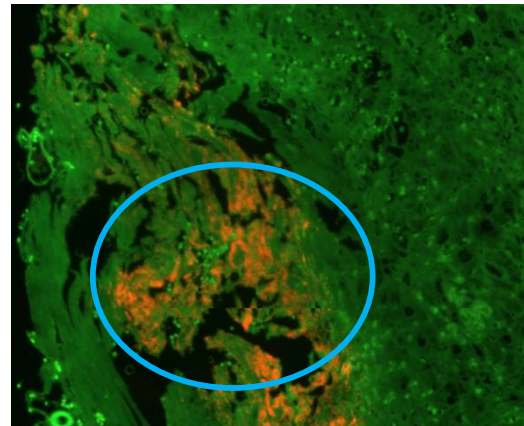


Figura 9. Corte histológico de biopsias de Dermatite Digital – Método de FISH. *Fusobacterium necrophorum*

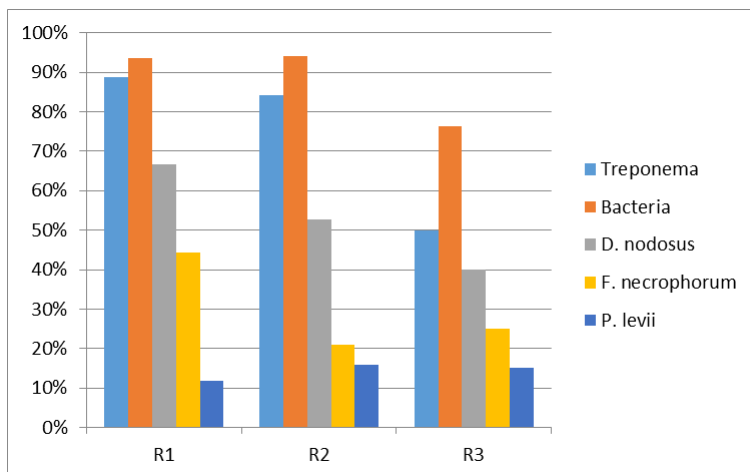


Figura 10. Frequência bacteriana nas regiões R1(centro da lesão), R2 (borda da lesão), R3 (pele adjacente a lesão) pelo método de *FISH* em cortes histológicos de biópsias de Dermatite Digital.

A densidade bacteriana nas diferentes regiões de Dermatite Digital foram classificadas de 0 a 3 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 na região 1, apresentando escore 3 em 88,7% das amostras, seguido de *F. necrophorum* com 11% e *Porphyromonas levii* com 5%, sendo os demais escores representados na tabela 4.

Tabela 4. Frequência bacteriana e seus escores (escore 1: quantidade de até 5% do número total de bactérias na amostra; escore 2, 5% e 10% do número total de bactérias e escore 3 mais do que 10%) de densidade pelo método de *FISH* em cortes histológicos de biópsias da R1 (centro da lesão), R2(borda da lesão) e R3(pele adjacente a lesão) de Dermatite Digital.

Região	Escore	Bacteria(%)	Treponema(%)	D. Nodosus(%)	F. Necrophorum(%)	P levii(%)
R1(centro da lesão)	1	6,25	0	22	27	7
	2	37,5	0	16,6	11	6
	3	50	88	0	11	5
	Total (%)	93,75	88	38,6	49	18
R2(borda da lesão)	1	41,17	0	26,3	10,5	10,5
	2	0	0	0	0	0
	3	35,29	84,2	26,3	10,5	6,7
	Total (%)	76,46	84,2	52,6	21	17,2
R3(pele adjacente a lesão)	1	35	0	10	10,5	0
	2	5	0	5	10,2	15
	3	15	50	20	15	0
	Total (%)	55	50	35	35,7	15

A região 2 (Tab.4), foi caracterizada por bactérias do gênero *Treponema* apresentarem maior densidade, sendo 84,2% das amostras com escore 3, seguido por *D. nodosus*, com 26,3%, e 10% para *F. necrophorum*. Fato esse, se repetiu na R3 (Tab.4), onde o gênero *Treponema*, apresentou 50% com escore 3, seguido *D. nodosus*, com 20%, e 15% para *F. necrophorum*.

Em todas as regiões estudadas bactérias do gênero *Treponema* foram as mais frequentes e de maior escore, sendo assim a Figura 11, mostra a comparação entre média dos escores desse gênero por região estudada, onde foi possível observar que a média dos escores de R1 (centro da lesão) é igual estatisticamente a R2 (borda da lesão), e essas duas regiões são diferentes de R3 (pele adjacente a lesão). Para as demais bactérias foi realizado o mesmo teste de FISHER, porém não ocorreu diferença estatística entre o local da lesão e a média frequência bacteriana.

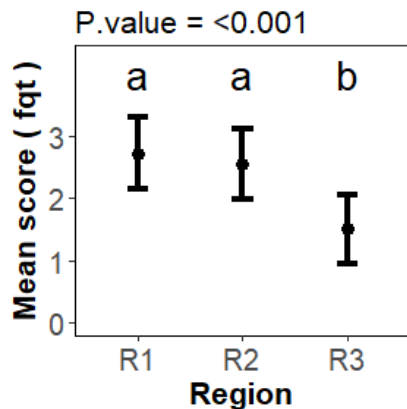


Figura 11. Comparação entre as regiões R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (borda adjacente a lesão) de acordo com a média dos escores de densidade de *Treponema* (escore 1: hibridização escassa, onde foi encontrado uma quantidade de até 5% do número total de bactérias na amostra; escore 2, hibridização moderada entre 5% e 10% do número total de bactérias e escore 3 mais do que 10%) em lesão de Dermatite Digital.

As profundidades das bactérias nas regiões estudadas foram organizadas pela figura 12. Nas três regiões estudadas as bactérias do gênero *Treponema* foram as mais profundas nas lesões (escore 3), sendo 81,5% na R1, 87,5% na R2 e 88% na R3, quando esses valores foram avaliados pela comparação entre média dos escores de profundidade por região não ocorreu diferença estatística ( $p>0,05$ ).

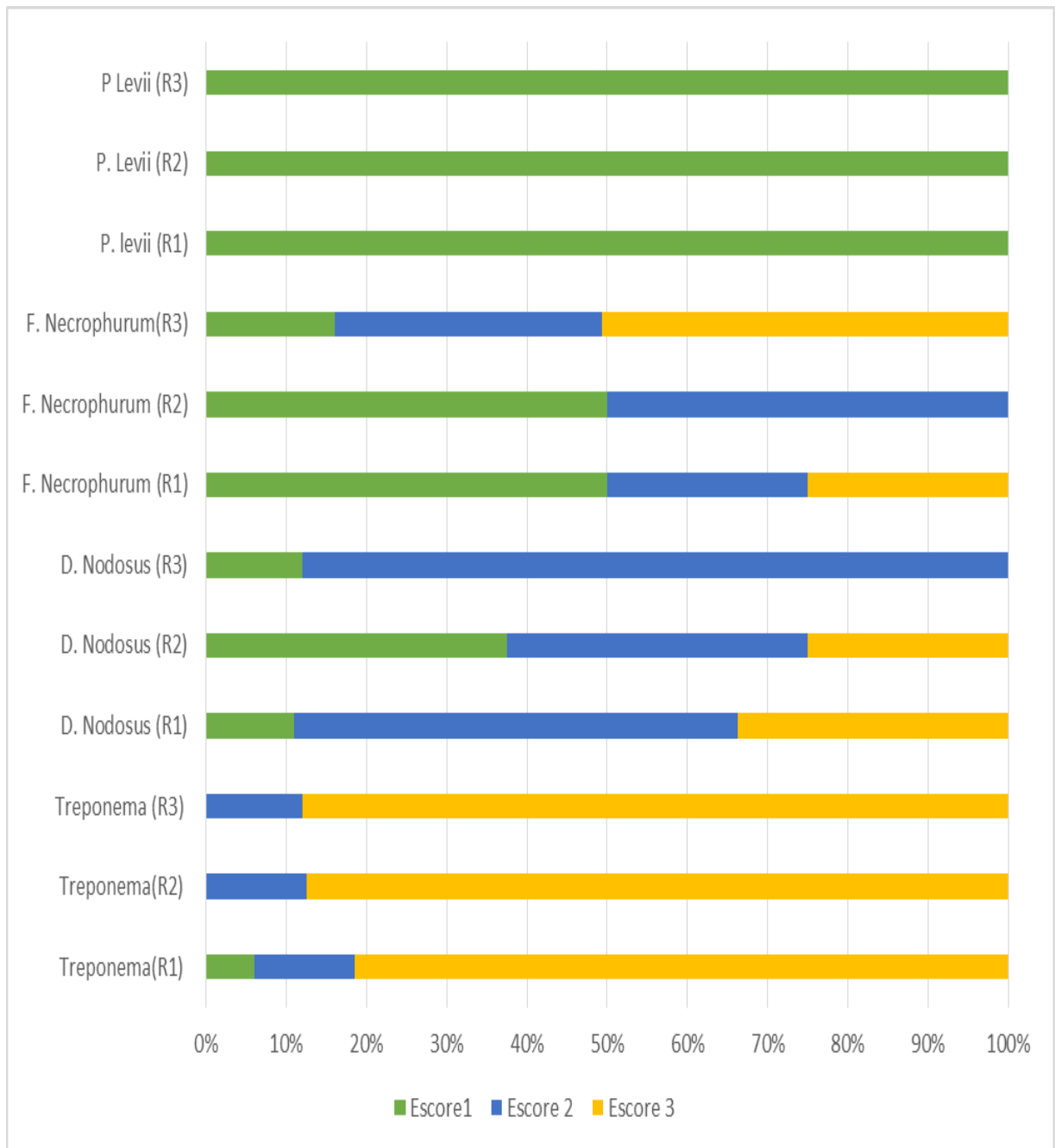


Figura12. Frequência bacteriana de invasão bacteriana pelo método de *FISH* em cortes histológicos para as bactérias do gênero *Treponema*, *D. Nodosus*, *F. necrophurum* e *P. levii* de biópsias de Dermatite Digital e seus escores (0 representa a ausência de bactérias invasivas, 1 presença de bactérias na superfície, 2 presenças de bactérias no intermédio e 3 bactérias na parte mais profunda da lesão)

Ao avaliar as amostras de DD pela técnica de sequenciamento de nova geração utilizando as probes V1 e V2 foi encontrado grande número de bactérias e os *Treponemas* estavam presentes nas 3 regiões estudadas assim como *Porphyromonas*, *Mycoplasma*, *Helcococcus Corynebacterium*, *Fusobacterium*, *Dichelobacter* e *Alloiococcus* como demonstrado na figura 13.

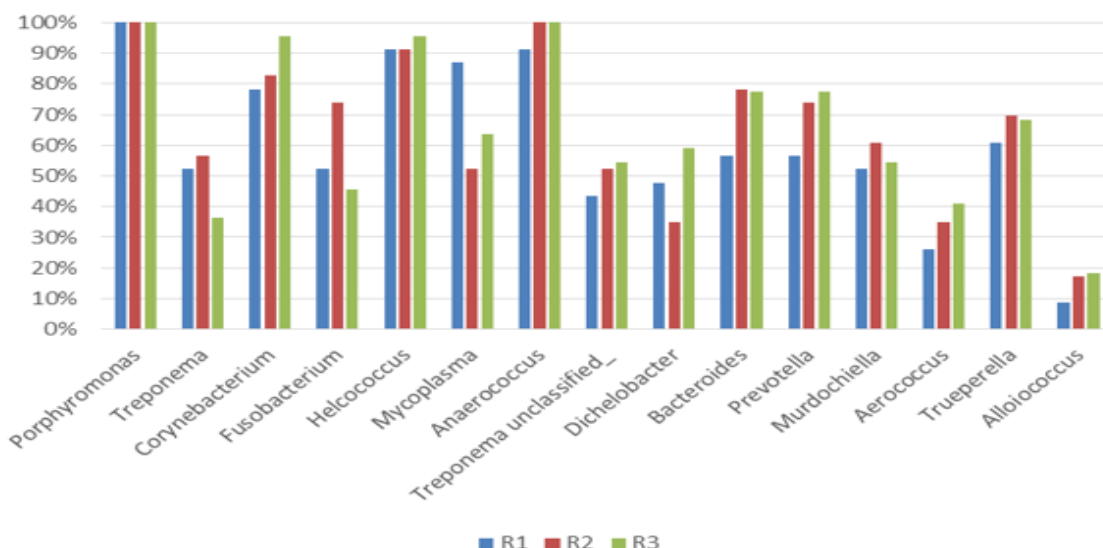


Figura 13. Bactérias encontradas nas lesões de Dermatite Digital pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2 em diferentes regiões, sendo R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (pele adjacente a lesão)

Quando avaliado a proporção de bactérias por amostra, verificou-se que os *Treponemas* apresentaram maior número de amostras com alta densidade em todas as regiões estudadas (Tab.5)

Tabela 5. Bactérias encontradas em maiores proporções no microbioma de lesões de Dermatite Digital na R1(centro da lesão), R2(centro da lesão) e R3(pele adjacente a lesão) pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V1 e V2.

Proporção bacteriana DD	>30%			>50%	
	R1	R2	R3	R1	R2
Treponema	60,0%	48,0%	40,0%	33,0%	32,0%
Porphyromonas	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Mycoplasma	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Fusobacterium	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Alloiococcus	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Ao avaliar densidade bacteriana pela técnica de *FISH*, os *Treponemas* apresentaram maior prevalência em todas as regiões e maior intensidade sendo: 88% das amostras classificadas como escore de densidade 3 em R1(Tab.4), 84,2% em R2 (Tab.4) e 50% na região 3 (Tab.4). Fato esse se repetiu ao avaliar a invasão bacteriana, onde o *Treponema* foi a bactéria mais profunda, sendo 81,5% na região 1(Fig.12) classificadas como escore 3, 87,5% em R2 (Fig.12) e 88% na região 3 (Fig.12). Fato esse se repetiu na técnica de sequenciamento de nova geração, as bactérias do gênero *Treponema* também foram as que tiveram maiores proporções dentro das lesões de DD, 26% compostas por mais de 30% de *Treponemas* na região 1(Tab. 5). Já em R2(Tab. 5) 13% das lesões com mais de

30% de *Treponemas*, e em R3(Tab.5) esse número foi de 4,6%. Uma hipótese para tentar explicar a ação dos *Treponemas* na etiologia da DD, seria os fatores de virulência dessas bactérias, tais como produção de adesinas e de enzimas proteolíticas e colagenolíticas que causam penetração, danificação e destruição tecidual formando assim a lesão, sendo possível que este agente possa sozinho, colonizar e lesar o tecido sadio interferindo na resistência na imunidade local (Losinger et al, 2006). Pelo fato dessas bactérias conseguirem se movimentar e se tratar de bactérias anaeróbicas facultativas podem se alocar em maior quantidade na parte profunda da lesão. A região 3 foi a região de menor intensidade bacteriana, fato esse pode ser explicado por se tratar de uma região adjacente a lesão, possivelmente com características específicas a essa região, uma vez que as alterações histológicas demonstraram alteração na epiderme (Tab. 3), podendo ter existido uma lesão microscópica, com ausência da formação macroscópica. Moreira (2017), relatou que bactérias do gênero *Treponema* foram os agentes mais frequentes encontrados nas partes profundas da lesão de Dermatite Digital, com mais de 86,4% delas classificadas como escore 3. Dados semelhantes foram encontrados por Andrade (2017) que encontrou prevalência de *Treponema* como a bactéria mais profunda em 80% nas lesões de DD, o mesmo autor também avaliou a presença de *Treponemas* na pele integra dos bovinos, e encontrou a presença das espiroquetas em mais de 60% das amostras avaliadas.

Lux et al. (2001) avaliando doenças periodontais em seres humanos causados por *Treponemas*, principalmente por *T. denticola*, mostraram que as espiroquetas apresentam grande capacidade de penetração tecidual e que sua motilidade permite a migração para locais favoráveis à sua proliferação, sendo assim um importante fator de virulência. 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. Os autores sugerem uma teoria para explicar tal ação, onde moléculas liberadas pela danificação celular seria capturada por receptores dos *Treponemas* 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. Diversos estudos mostraram que 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).

O comportamento bacteriano nas regiões estudadas foi semelhante, em relação a intensidade das bactérias por região. *F. necrophorum* e *D. Nodosus* estiveram presentes no centro da lesão (R1) em 22% (Tab.4) e 27% (Tab.4) das amostras com até 5% de bactérias presentes, respectivamente. Quando foi avaliado a presença de mais de 10% de bactérias presente na lesão esse número foi de ausência de *D. Nodosus* no centro da lesão e 11%(Tab.4) para *F. necrophorum*. Ao avaliar a invasão bacteriana na mesma região, o *F.necrophorum* apresentou maior prevalência ao comparar com *D. nodosus*, 50% e 11% (Fig.12) respectivamente, e ao aprofundar a lesão na mesma região *F. necrophorum* diminuiu a sua prevalência na parte média e profunda da lesão, enquanto o *D.nodosus* ficou com prevalência de 55,3 e 33,7% (Fig.12), respectivamente na parte intermediária e profunda da lesão. Na R2, *F. necrophorum* e *D. Nodosus* estiveram na parte superficial da lesão em 50% e 37,5% (Fig.12) respectivamente, e a medida que a lesão aprofundava esses números foram diminuindo nas duas bactérias estudadas. Na pele adjacente a lesão (R3), 10% (Tab.4) das amostras para *D. Nodosus* e *F. Necrophorum* apresentaram amostras com até 5% de bactérias presentes, sendo o *F. necrophorum* mais presente na parte superficial da lesão assim com *D. Nodosus*, 50% e 55,3% respectivamente, e a medida que a lesão aprofundava esses números iriam diminuindo para 25% nas 2 bactérias estudadas. Na R3, o *D. nodosus* foi ausente na parte profunda da lesão, tendo sua maior prevalência na parte média da lesão com 88% (Fig.12), já *F.necrophorum* apareceu mais na parte profunda da lesão com 50,7% (Fig.12). Como foi visto neste estudo existe um consórcio entre essas bactérias em todas as regiões estudadas, e possivelmente *D. nodosus* através da sua produção de proteases extracelulares e de sua grande capacidade ceratolítica, podem causar danos ao tecido e facilitar a penetração de um outro agente, já o *F. necrophorum* exercendo sua ação patogênica através de liberações de leucotoxinas, endotoxinas, proteases e adesinas, ocasionando inflamação e destruição dos tecidos envolvidos, podendo assim em consórcio criarem ambientes favoráveis ao *Treponema* ou ainda colonizarem tecidos lesados primariamente pelos *Treponemas* e ocasionar necrose. Rasmunssen et al. (2012), encontraram a presença de *D. nodosus* em 51% das biópsias de DD e levantaram a hipótese de que *D. nodosus*, podem causar danos ao tecido e facilitar a penetração gênero *Treponema*, que por sua vez consegue lesionar o tecido, dessa forma esses dois agentes podem agir sinergicamente, 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. Andrade (2017), avaliou a

invasão bacteriana total dentro da epiderme em cada amostra de biópsia, e foi pontuada de 0 a 3, de acordo com Rasmussen et al. (2012) e Klitgaard et al. (2013), onde *Treponemas foram* as bactérias encontradas na parte mais profunda da lesão, com 81,25% classificadas como escore 3. 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, dados semelhantes a esse estudo. Moreira (2017), também encontrou *D. nodosus* em mais de 50% das amostras de DD analisadas pelo método de *FISH* e normalmente a maior prevalência dessa bactéria foi na parte superficial da lesão. Em estudo realizado por Marcatili et al (2016), utilizando expressão gênica para esclarecer a etiologia da DD, *P. levii* foi descrito como agente participante da progressão da doença, enquanto *F. Necrophurum* foi descartado, já que não foi encontrado pelo autor. Já *D. nodosus*, foi encontrado não apenas em lesões iniciais mas também em lesões crônicas de DD, especulando que tal bactéria tem um papel no desenvolvimento e expansão da lesão, juntamente com espécies de *Treponema*.

Neste estudo a bactéria *P. levii* foi a bactéria de menor frequência encontrada nas três regiões pela análise de *FISH*, e localizou-se em 100% das amostras na parte superficial das lesões tanto em R1, como em R2 e R3 (Fig.12). O principal fator de virulência desse agente é a produção de proteases, que podem levar a penetração do tecido epitelial e ser a porta de entrada para outras bactérias afim de colonizar o tecido, ou até mesmo serem bactérias oportunistas da lesão. Como essa bactéria esteve presente na R3, possivelmente deve também ser encontrada na pele íntegra dos bovinos. Alguns trabalhos mostram uma associação sinérgica de *P. levii* e *F. necrophorum* para ocasionar o flegmão interdigital (Quinn et al, 2005), podendo também estarem envolvidas na patogenia da DD. Além disso, a espécie *Porphyromonas gingivalis* em associação com *T. denticola* podem levar a doenças periodontais crônicas em seres humanos. Pesquisas mostram que as bactérias *P. gingivalis*, 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, além de serem detentoras de diversos fatores de virulência, sendo esse: produção de proteases, metaloproteinase, e presença de fimbrias adesivas que geram destruição e penetração do tecido conjuntivo periodontal (Walter et al, 2004; How et al, 2016; Leon et al, 2016). Pela técnica de sequenciamento de nova geração, *P.levii* foi uma das bactérias mais frequentes em todas

as três regiões, diferente do resultando encontrado pelo método de *FISH*. Vale 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 nas três regiões estudadas, podendo assim, existir a possibilidade de outras espécies de *Porphyromonas* estarem envolvidas na patogenia da DD.

Pode-se dizer, que neste estudo a medida se aprofundava na lesão a quantidade de *P.levii*, foi diminuindo e *D. nodosus*, *F. Necrophurum* e bactérias do gênero *Treponema*, aumentavam, até a parte profunda da lesão, onde a intensidade de Treponemas, era maior. Este fato foi observado em R1, R2 e R3, mostrando mais uma vez importante papel de interação bacteriana.

Outro agente encontrado nesse estudo pela técnica de sequenciamento de nova geração foram as bactérias do gênero *Mycoplasma*, estando presentes no centro, borda e pele adjacente a lesão. Sendo que na R1, em 11,3% das amostras teve uma proporção maior do que 30% em relação ao número total de bactérias encontradas, já na R2 em 8,3% e na região 3 as bactérias foram encontradas em proporções menores a 30% ao número total de bactérias encontradas (Fig.12), podendo estar envolvido na patogênese da doença uma vez que *Mycoplasmas* são bactérias extracelulares com afinidade pelas mucosas, onde vivem como comensais ou patógenos. Krull et al. (2014) levantaram a hipótese de que *Mycoplasma* pode ter importância na transição de lesões iniciais para lesões ativas (M2), embora seus fatores de virulência ainda não estão elucidados na literatura. Atualmente outros quatro estudos também encontraram essa bactéria em lesões de DD, sendo eles Krull et al. (2014), Nielsen et al. (2016). Os outros trabalhos que encontram *Mycoplasma* foram realizados no Brasil, onde Andrade (2017) encontrou 85,7% das lesões com a presença dessa bactéria e Moreira (2017) descreveu em 28% das amostras avaliadas. Sendo assim, mais estudos são necessários para elucidar seu mecanismo na DD.

As bactérias *Corynebacterium*, *Alloicoccus* e *Helcococcus* foram ambas encontradas em baixa prevalência nos três pontos de estudo, possivelmente esses agentes e a hipótese é que são oportunistas, e colonizam o tecido lesionado. Tais agentes quando encontrados, foram observados em baixa prevalência em outros estudos como Zinicola et al. (2015).

Ao avaliar as amostras em probes V3 e V4 (específicas para bactérias do gênero *Treponema*) foi possível identificar a espécie em 98,7% das leituras, sendo encontrado em todas as regiões *Treponemas* ainda não cultivados e não classificados pela literatura. Os filotipos com maior frequência foram *T. phagedenis*, 67,5% na R1, 67,3% na R2 e 62,18% na R3. *T. pedis*, *T. refringens* e *T. médium*, como demonstrado na Fig.14. Avaliando os diferentes tipos de *Treponema* nas regiões estudadas pode-se perceber que o comportamento dos filotipos de *Treponema* é semelhante. Possivelmente esse filotipos são os principais envolvidos na DD, esse foi o primeiro estudo a utilizar o sequenciamento de nova geração em diferentes partes da lesão de DD, mostrando mais uma vez a importância desse gênero na patogênese da doença e que mais trabalhos dessa magnitude devem ser realizados. Zinicola et al. (2015), encontraram que os principais filotipos presente em lesões de DD foram: *T. Phagedenis*, *T. Refringens*, *T. Médium*, *T. Pedis*, *T. Zuelzerae*.

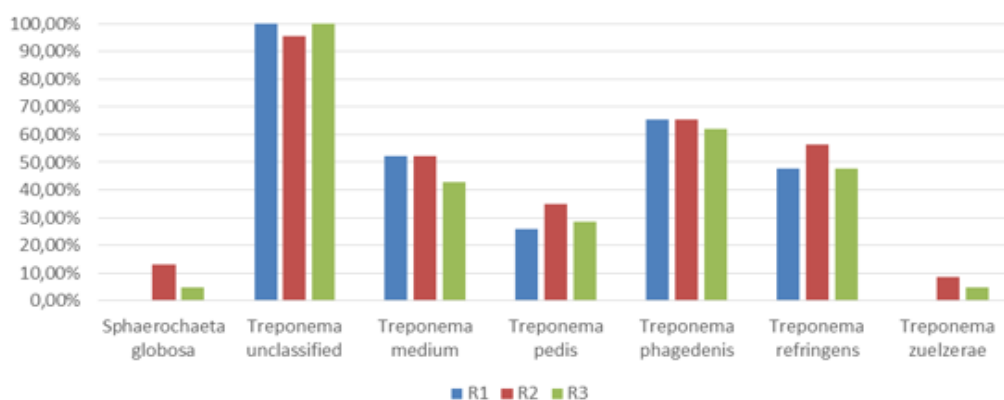


Figura 14. *Treponemas* encontradas nas lesões de Dermite Digital pela técnica de sequenciamento de nova geração com as probes V3 e V4 em diferentes regiões, sendo R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (pele adjacente a lesão).

A análise de componente principal (Fig.15), mostra visivelmente que as três regiões se relacionam, ou seja, observou-se a presença de todos os agentes estudados em todas as partes da lesão, entretanto algumas variáveis se correlacionam entre si, tanto em R1, como em R2 e R3, tais como: *helcococcus* (s2h), *Treponema refringens* (s2r), *Treponema* (s1t), *alioiococcus* (s1l) formam um grupo de variáveis correlacionadas positivamente entre si e correlacionadas negativamente com o grupo formado pelas variáveis *prevotella* (s1r), *bacteroides* (s1b), *anaerococcus* (s1a), *porphyromonas* (s1p). As variáveis *treponema*

*medium* (s2m), *murdochiella* (s1m), *fusobacterium* (s1f), *treponema zuelzerae* (s2z), *Treponema pedis* (s2p), *sphaerochaeta globosa* (s2s), escores 3 da epiderme (hep) e), escores 3 da derme (hid) formam outro grupo de variáveis positivamente correlacionadas entre si, reforçando a hipótese de que os *Treponemas* são os principais agentes envolvidos na partogênese da doença, e negativamente associadas ao grupo formado pelas variáveis *dichelobacter* (s1d), *corynebacterium* (s1c) e *mycoplasma* (s1y), além de mostrar que essas bactérias são capazes de levar maiores injúrias aos tecidos, como severa proliferação epidermal e elevada proliferação inflamatória, possivelmente essa associação está relacionada aos fatores de virulência do *Treponema*, tais como produção de adesinas e de enzimas proteolíticas e colagenolíticas que causam penetração, danificação e destruição tecidual, gerando assim injúrias celulares (Losinger et al, 2006). Esses achados demonstram que o centro da lesão, borda e pele adjacente a lesão são áreas comuns em relação a agentes e achados histológicos para as três regiões estudadas.

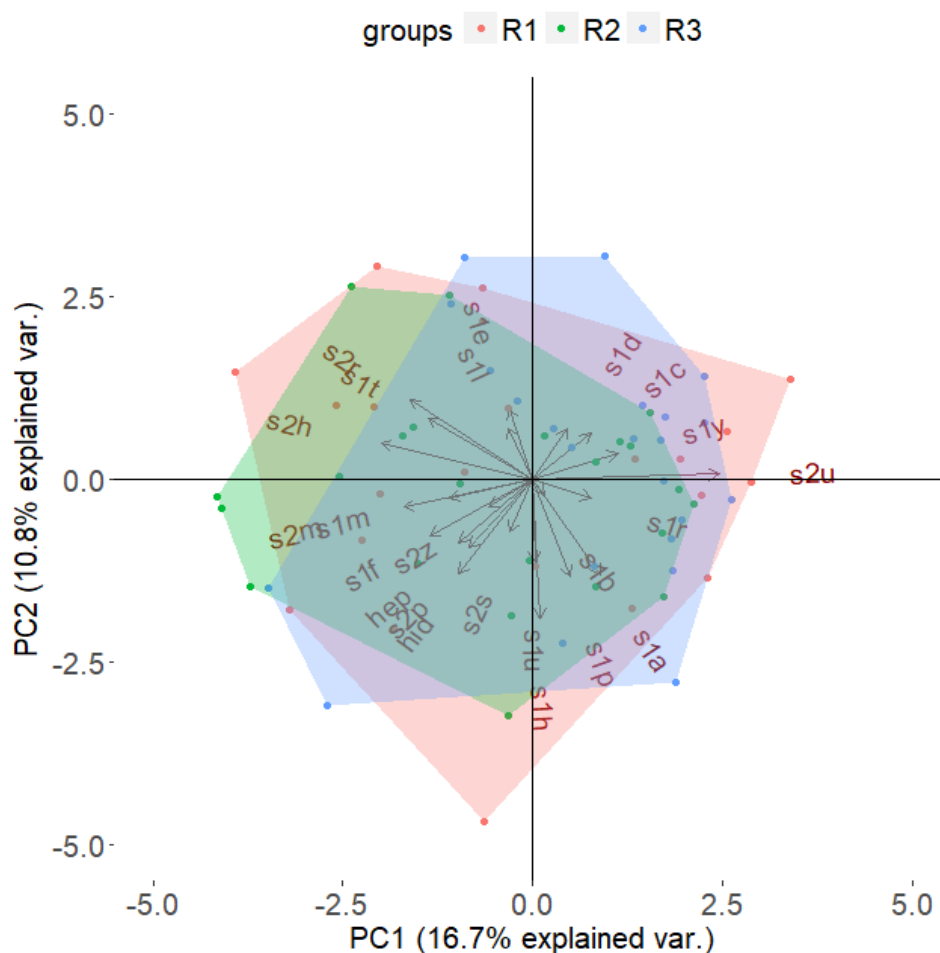


Figura 15. Análise de componente principal de agentes bacterianos e achados histológicos em diferentes regiões R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (borda adjacente a lesão) regiões R1 (centro da lesão), R2 (borda da lesão) e R3 (borda adjacente a lesão)

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prevalência da DD encontrada neste estudo foi de 29,3%. Alguns fatores de risco estão envolvidos para que obtivesse esse resultado como: movimentação dos animais entre fazendas, fatores climáticos, ambientais e nutricionais e aumento da densidade animal, sendo necessário a realização de estudos para avaliar a relação de tais fatores com os agentes envolvidos na doença. Os resultados encontrados mostram que a DD é uma doença polibacteriana. As bactérias do gênero *Treponema* parecem ser as mais importantes em sua etiologia, com presença de vários filotipos, o que a caracteriza como ‘ multitreponemal’. Além dos *Treponemas*, outras bactérias como *D. nodosus*, *F. necrophorum*, *Phorphyromonas* e *Mycoplasma* foram encontradas em intensidade variadas entre as regiões e os métodos de diagnóstico utilizados. A histologia caracteriza as lesões com aumento de resposta inflamatória principalmente no centro e borda da lesão associado a mudanças epiteliais. Possivelmente o sinergismo de *Treponema* e *P. levii* penetram o tecido afim de iniciar a doença necessitando de maiores interações com as demais bactérias para o desenvolvimento da lesão tais como *F.necrophurum* e *D. nodosus*, sendo importante mais estudos para elucidar o real papel de cada bactéria na etiologia da DD. Pelo fato de existirem nichos bacterianos, possivelmente existe uma relação entre alguns agentes, como foi encontrado um perfil bacteriano semelhante na R1, R2 e R3, com exceção na frequência de *Treponemas*, alguns fatores de risco podem estar associados a isso como a presença dessas bactérias na pele integra dos animais e a associação de fatores que diminuem a resistência do tecido local oriundos dos agentes ou do próprio ambiente.

## 7.CONCLUSÕES

A etiologia da DD é “polimicrobiana e multitreponemal”. As bactérias do gênero *Treponema* são as mais frequentes e mais profundas nas três regiões estudadas. *P. Levii* estiveram presentes em 100% das amostras na parte superficial das lesões.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L.S. *Dermatite Digital em vacas: etiologia, reservatórios e rotas de transmissão*. 2017 .71p. (Dissertação de Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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.
- 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.
- 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.
- BOTARI, B.; ERCOLINI, D.; GATTI, M.; NEVIANI, E. Application of FISH technology for microbiological. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.73, p.485-494, 2006.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

DINIZ, S. *Microbiota presente em abscesso solear, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e de lesões de dermatite digital emprego da PCR para detectar bactérias espiraladas em bovinos de aptidão leiteira em Minas Gerais*. 2008. 99f. Tese de Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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, 2016.

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.

FLOR, E.; TADICH, N. Claudicaciones en vacas de rebaños lecheros grandes y pequeños del sur de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 40, n. 2, p. 125–134, 2008.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. In: *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 1260–1268, 1997.

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, 2005.

HENDRY, K.A.K., MACCALLUM, A.J., KNIGHT, C.H., HILDE, C.J. Effect of endocrine and paracrine factors on protein synthesis and cell proliferation in bovine hoof tissue culture. In: *Journal of Dairy Research*. v. 66, p. 23–33, 1999.

- 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.
- 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.
- KÖNIG, H.E. e LIEBICH, H. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. Porto Alegre: Artmed. 2004
- KONJAROVA, 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.
- 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.
- MARCATILI, P.; NIELSEN, M. W.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; et al. A novel approach to probe host-pathogen interactions of bovine digital dermatitis, a model of a complex polymicrobial infection. *BMC Genomics*, v. 17, n. 1, p. 987, 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.

MAUCHLE, U. Afecções podais e conformação dos cascos em bovinos. 2001. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

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.

MOREIRA, T.F. *Epidemiologic survey of hoof health in grazing cattle under tropical condition and etiology of bovine digital dermatitis*. 2017. 89f. (Tese de Doutorado)– Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

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.

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.

OLSZENSWSKI, F.T. *Avaliação do ciclo de vida da produção de leite em sistema sem extensivo e intensivo*: Estudo aplicado. 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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.

POZZATTI, P.N., CASAGRANDE, F.P., PORFÍRIO, L.C., AMORIM, J.B., FERREIRA, L.O., LAGO, L.A., CARVALHO, A.U., FACURY FILHO, E.J., FERREIRA, P.M. Prevalência e classificação das afecções podais de rebanho bovino leiteiro de Sete Lagoas-MG. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13. e ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2009.

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

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.

REFAAI, A.W; LEHEBEL, A.; BAREILLE, N.; et al. Effectiveness of different regimens of a collective topical treatment using a solution of copper and zinc chelates in the cure of digital dermatitis in dairy farms under field conditions. *J. Dairy Sci.*, v. 95, n. 7, p. 3722-35, 2015.

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, 1996.

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.

SHEARER, J.K.; HERNANDEZ, J.; ELLIOTT, J.B. Papillomatous digital dermatitis: treatment and control strategies-Part II. *The Comp. Cont. Educ. Prac. Vet.*, v.20, n.8, p.213-223, 1998

SHEARER, J. K.; VAN AMSTEL, S. R.; BRODERSEN, B. W. Clinical diagnosis of foot and leg lameness in cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, v. 28, n. 3, p. 535-56, nov. 2012.

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.

SILVA, L.A.F.; CASTRO, G.R; J.R.J.; ORLANDO, C.F.P; GOULART, D.S. Eosinofilia tecidual em lesões de dermatite digital bovina. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 4, p. 1294-1302. 2009

SMITIS, R.H. Prevalence of lesions associated with subclinical laminitis in first-lactation cows from herds with high milk production. *J. Am. Vet. Med.* v.208, n.9, p. 1445-1451, 1992

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.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.

STAMM, L. V.; BERGEN, H. L.; WALKER, R. L. Molecular typing of papillomatous digital dermatitis-associated *Treponemas* isolates based on analysis of 16S-23 ribosomal DNA intergenic spacer regions. *J.Clin.Microbiol.* v.40, n.9, p.3463-3469, 2002

STOKKA, A.G.; SMITH, J.F.; DUNHAM, J.R. et al. Lameness in dairy strategies-Part II. *The Com. Cont. Educ. Prac. Vet.*, v.20, n.8, p.213-223, 1997  
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.

VAN AMSTEL, S. e SHEARER, J. Manual for treatment and control of lameness in cattle. Blackwell Publishing, 212p. 2006

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.

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.

## 9. ANEXOS

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

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b>
<b>UFMG</b>	<b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>
<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 espira-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 certificates 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>	