

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia**

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.

Sueli Diniz

Belo Horizonte, Minas Gerais

2008

Sueli Diniz

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.

Tese apresentada no Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Dra. Elizabeth Spangler Andrade Moreira

Co-orientadora Dra. Patrícia Silva Cisalpino

Colaboradores: Dr. Antônio Último Carvalho

Dr. Paulo Marcos Ferreira

Dra. Maria Rosa Quaresma Bomfim

Dra. Maria Raquel S. Carvalho

Belo Horizonte

2008

Agradecimentos

Ao Senhor Deus pelo seu cuidado para comigo, as minhas filhas muito queridas Mariana e Célia pelo amor, dedicação e estímulo, ao meu genro Giovanni e meus netos João Lima Grossi e Isabela Lima Grossi.

SUMÁRIO

I- RESUMO.....	5
II – ABSTRACT.....	6
III INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	8
IV - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
1. Enfermidades podais.....	10
2. Epidemiologia.....	21
3. Fatores predisponentes.....	25
V - OBJETIVOS.....	32
1. Geral.....	32
2. Específicos.....	32
VI- MATERIAL E MÉTODOS.....	33
1. Animais.....	33
2. Colheita dos espécimes.....	36
2.1 Colheita dos espécimes para abscesso de sola.....	36
2.2 Colheita dos espécimes para dermatite digital.....	36
3. Isolamento e identificação de bactérias de lesões de abscesso de sola.....	37
4. Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos.....	38
4.1 Pesquisa de β - lactamase.....	39
5. Pesquisa de espiroquetas em lesões de dermatite digital por exame direto.....	40
6. Isolamento de espiroquetas de lesões de dermatite digital.....	40
7. Extração de DNA total de cultura bacteriana.....	41
8. Detecção de bactérias espiraladas de amostra clínica por PCR (16S r DNA).....	42
9. Reação de PCR gene 16s rDNA.....	42
10. Sequenciamento.....	43
VII-RESULTADOS.....	45
VIII-Discussão.....	69
	78
IX-CONCLUSÕES.....	80
X- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	
XI - ANEXO.....	95

I - RESUMO

Objetivando determinar a microbiota presente em abscesso solear, perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e de lesões de dermatite digital emprego da PCR para detectar bactérias espiraladas em bovinos de aptidões leiteira. Foi feita a coleta de nove espécimes clínicos de bovinos acometidos de abscesso solear e foi possível a identificação de 108 amostras bacterianas obtidas de bovinos de três fazendas leiteiras (1, 2, e 3). Os anaeróbios facultativos, representados por 107 amostras, a família *Enterobacteraceae* foi mais prevalente, representando (75,0%) das amostras identificadas. Destacam-se, *Escherichia coli*, que representou (35,2%) do total de amostras identificadas, *Klebsiella oxytoca* (12,1%) e *Enterobacter cloacae* (8,3%). Também foram identificados *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae*. Dos bacilos Gram-positivo anaeróbios facultativos, destacaram-se *Bacillus* spp (9,2%), *Corynebacterium aquaticum* (3,7%) e, com menor frequência, *C. minutissimum*, *Brevibacterium* spp e *Listeria grayi*. Entre os cocos Gram-positivo, foram identificados *Enterococcus faecalis*. (2,7%), também foi identificado o bacilo Gram-negativo *Fusobacterium* sp. anaeróbio obrigatório. A variedade de microrganismos presente nos abscessos de sola confirma sua etiologia polimicrobiana. Quanto ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, a partir de 67 amostras isoladas dos animais procedentes de duas fazendas (2,3), foi verificado que das amostras isoladas na fazenda 2, foram testadas 13 amostras de *E.coli* das quais 12 eram resistentes a ampicilina /sulbactam e tetraciclina, enquanto que, na fazenda 3, das 25 amostras de *E.coli* submetidas a testes 22 foram sensíveis para ampicilina /sulbactam e apenas 11 para tetraciclina. Na fazenda 3, testadas 14 amostras de *K. oxytoca*, 8 foram sensíveis para ampicilina /sulbactam, assim como 11 para tetraciclina. Também nesta fazenda, foram testadas 9 amostras de *E. cloacae*, das quais 8 mostraram-se resistentes a ampicilina /sulbactam e 7 foram sensíveis para a tetraciclina, já as 3 amostras de *C. sakazakii*, 2 foram resistentes para ampicilina /sulbactam e 3 sensíveis para tetraciclina. Das 3 amostras testadas de *E. faecalis* 2, da fazenda 2 e uma da fazenda 3 foram sensíveis para ampicilina /sulbactam e resistentes para tetraciclina. Foram observadas variações quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos ampicilina/ sulbactam e tetraciclina em uma mesma fazenda e em fazendas diferentes. O DNA extraído de cultura pura de

duas amostras de microrganismos espiralados isolados de biópsias de dois animais, acometidos de dermatite digital, da fazenda 1 foi amplificado por PCR e obtido um fragmento de 900 pb. As análises dos nucleotídeos dos seqüenciamentos somadas aos resultados obtidos pela construção da árvore filogenética permitem-nos afirmar que os animais pesquisados são portadores de dermatite digital causada por microrganismos de difícil cultivo. Foi encontrada uma similaridade de 99% destas amostras seqüenciadas com microrganismos não cultiváveis, 75% de similaridade para *Treponema denticola*, 70% para *Treponema phagedenis* e 68% para *Treponema pedis*. Também foi feita PCR, utilizando DNAs extraídos de biópsias de 6 animais acometidos de dermatite digital na fazenda 4 e foi amplificado um fragmento de 900pb para estas amostras. Os dados obtidos permitem sugerir a aplicação da PCR para a confirmação do diagnóstico de dermatite digital.

II- ABSTRACT

With the purpose to determine the microorganisms present in the sole abscess, the profile of antimicrobial susceptibility of bacterial samples isolated and for the digital dermatitis lesions a PCR to detect spirochaetes, from 9 clinical specimens collected from dairy cattle affected by sole abscess, from three distinct farms it was possible to identify 108 bacterial samples. Among the facultative anaerobes, representing 107 samples, the Enterobacteriaceae family was the most prevalent, representing 75.0% of the samples identified. Among them, *Escherichia coli* represented (35.2%) of the samples identified, *Klebsiella oxytoca* (12.1%) and *Enterobacter cloacae* (8.3%). *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae*. Of the Gram-positive bacilli facultative anaerobes, it could be highlighted the presence of the *Bacillus* spp (9.2%), *Corynebacterium aquaticum* (3.7%) and, less frequently, *C. minutissimum*, *Brevibacterium* spp and *Listeria grayi*. Among the Gram-positive cocci, *Enterococcus faecalis* (2.7%) was identified. *Fusobacterium* spp was also identified among the Gram-negative bacilli, strict anaerobe. The diversity of microorganisms present in sole abscesses indicates its polymicrobial etiology. Concerning the profile of antimicrobial susceptibility from 67 samples of animals coming from 2 farms (2 and 3), it was found that 12 out of 13 *E. coli* samples from farm 2 showed to be resistant to ampicillin / sulbactam and tetracycline, while 22 out of 25 samples of *E. coli* from

farm 3 were sensitive to ampicillin / sulbactam and 11 out of 25 samples were sensitive to tetracycline. In this farm, it was also seen that 8 out of 14 samples of *K. oxytoca* tested were sensitive to ampicillin / sulbactam and 11 over 14 were sensitive to tetracycline; 8 from 9 samples of *E. cloacae* proved to be resistant to ampicillin / sulbactam and 7 were sensitive to tetracycline; the 3 samples of *C. sakazakii* 2 were resistant to ampicillin / sulbactam and 3 were sensitive to tetracycline. The 2 samples of *E. faecalis* from farm 2 and one sample from farm 3 were sensitive to ampicillin / sulbactam and resistant to tetracycline. The were found variations in the susceptibility profile to ampicillin / sulbactam and tetracycline among samples originated from the same farm and from two different farms. The DNA extracted from pure cultures of two samples of spirochaetes isolated from biopsies of 2 animals with digital dermatitis, from farm 1, was amplified by PCR and a 900 bp fragment was obtained. The analyses of the nucleotide sequences added to the results obtained by the construction of phylogenetic trees allow us to say that the animals had digital dermatitis caused by microorganisms difficult to cultivate. It was found a similarity of 99% of these sequenced samples with non-cultivable microorganisms, 75% similarity to *Treponema denticola*, 70% with *Treponema phagedenis* and 68% with *Treponema pedis*. PCR was also performed using DNA samples extracted from biopsies of 6 animals affected by digital dermatitis in the farm 4 and a 900pb fragment was also amplified. Data obtained allow suggesting that specific PCR would be useful to confirm the diagnosis of digital dermatitis.

III - INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As enfermidades digitais, juntamente com mastite e distúrbios reprodutivos, figuram entre os maiores problemas que acometem a bovinocultura leiteira em todo o mundo, acarretando grandes perdas econômicas. As doenças dos dígitos são responsáveis por perdas relacionadas a custos com tratamento, prejuízos devidos à baixa produtividade, menor desempenho reprodutivo, reduzida produção de leite, aumento dos descartes involuntários, além da maior probabilidade de os animais apresentarem mastite e outras doenças. Admite-se que as doenças podais em bovinos de aptidões leiteiras sejam influenciadas por fatores genéticos, fisiológicos, nutricionais, ambientais e de manejo.

A busca pelo aumento da produção observada nos últimos anos na bacia leiteira de Belo Horizonte introduziu nos sistemas produtivos alguns fatores diretamente relacionados ao aumento das enfermidades do aparelho locomotor. São citados como os mais importantes: o confinamento e a predominância de raças européias no rebanho.

No Brasil, nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Ilha de São Luiz, MA, São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, há relatos da ocorrência de enfermidades digitais dos bovinos. No estado de Minas Gerais, a prevalência de tais afecções é de 30%, para vacas de aptidão leiteira mantidas em regime de confinamento, considerando os problemas clínicos e sub clínicos é de 89,4% e 92,7% nas mantidas em sistema semi-intensivo e intensivo, respectivamente.

Entre as várias enfermidades digitais dos bovinos, duas são de grande importância clínica e econômica: o abscesso solear e a dermatite digital. O abscesso solear é uma enfermidade do tecido córneo que pode ser desencadeada por laminite crônica ou subclínica. A ocorrência de doença da linha branca, erosão do talão ou úlcera de sola também são considerados fatores predisponentes à afecção. Os animais acometidos por abscesso solear são, geralmente, os estabulados com higiene precária, mantidos em baixadas úmidas e que, passam longos períodos semi-estabulados. A sola do casco torna-se plana e macia,

predispondo-se a traumatismos causados por cascalho, pisos irregulares e cimento muito áspero.

Dos microrganismos isolados de animais acometidos pela doença, destacam-se os bastonetes Gram-negativo anaeróbios, bastonetes Gram-negativo e Gram-positivo e cocos Gram-positivo anaeróbios facultativos.

Nos casos de abscessos de sola, os cascos deverão ser tratados por abertura, com drenagem para eliminação de tecidos necróticos e dos exsudatos purulentos e posterior utilização de bandagem com antibióticos e aplicação de tamanco de madeira na unha contralateral saudável.

A dermatite digital, terminologia mais aceita, também é denominada dermatite verrucosa, verruga do casco, doença de Mortellaro, papilomatose interdigital ou calcanhar em amora. Foi descrita pela primeira vez na Itália por Cheli e Mortellaro em 1974. É uma doença que nos últimos 15 anos tornou-se a maior causa de claudicação em rebanhos leiteiros de diversos países: Alemanha, França, Itália, Holanda, Austrália, Áustria, Nova Zelândia, Estados Unidos, México, Canadá, Japão, Irã e Israel. No Reino Unido a dermatite digital ocorre de forma endêmica. Ocorre também em países da África do sul, da América do Sul, Argentina, Chile inclusive no Brasil, onde no Rio Grande do Sul de 524 animais com claudicação 29% apresentavam dermatite digital. Em Goiás no município de Orizona observou-se dermatite digital em 24,36% das 224 vacas lactantes examinadas. Na bacia leiteira de Campo Grande (capital) e municípios arredores, MS de 481 vacas lactantes a dermatite digital foi lesão mais freqüente em 26,4% dos animais. Em Minas Gerais na bacia leiteira de Belo Horizonte e em Pedro Leopoldo em 606 vacas lactantes a dermatite digital teve uma prevalência de 32%.

A dermatite digital, por sua vez, é uma enfermidade dos dígitos que acomete o tecido mole. Algumas evidências clínicas e epidemiológicas sugerem ser afecção de origem microbiana. De lesões provocadas pela doença, já foram isolados vários microrganismos, mas espiroquetas do gênero *Treponema* foram os predominantes em casos estudados na Inglaterra, nos Estados Unidos, no Canadá, na Itália, na Alemanha e em outros países, sugerindo serem esses os agentes primários da doença. Não existem vacinas eficientes para prevenção de dermatite digital. No

Brasil, tais espiroquetas, difíceis de serem cultivados, ainda não foram isolados. Entretanto, o estudo desses microrganismos se mostra sobremaneira importante porque, em outros países, já foram identificados vários treponemas relacionados filogeneticamente, cujo perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, podem diferenciarem-se das amostras aqui existentes.

O tratamento recomendado no caso de dermatite digital é aplicação de antibióticos na forma tópica ou com o uso de bandagem. O uso de antibiótico via parenteral também pode ser utilizado, mas, em função do alto custo e pela presença de resíduos no leite, torna-se inviável na maioria das vezes. Em Minas Gerais, o tratamento se processa de forma empírica, pois não está bem determinada a etiologia das enfermidades podais, não tendo sido estudada, ainda, a eficácia dos antibióticos e dos quimioterápicos recomendados em outros países. O que se sabe, por relatos de veterinários de campo, é que têm ocorrido recidivas.

O estudo da microbiota presente em abscesso solear e lesões de dermatite digital, bem como a determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas, que poderá proporcionar suporte científico para a clínica, incluindo diagnóstico e orientação terapêutica adequada, minimizando a seleção de amostras resistentes que podem contribuir para as recidivas. Além disso, o conhecimento dos agentes etiológicos da dermatite digital poderá colaborar na elucidação da etiopatogenia da enfermidade.

IV - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – Enfermidades podais

As afecções que acometem os cascos de bovinos constituem a maior perda na indústria de leite e a principal causa de dor e desconforto para os animais (VERMUNT & GREENOUGH, 1995). Acometidos por tais enfermidades, eles apresentam dificuldade de locomoção, passando a claudicar. O desgaste causado limita a longevidade da vaca de aptidão leiteira, aumentando sensivelmente a taxa de descarte anual do plantel. Tanto para o bovino produtor de carne quanto para o produtor de leite, as enfermidades digitais constituem causa significativa de menor

rendimento, pois provocam diminuição na ingestão de alimento e na conversão alimentar, acarretando perda de peso e redução da produção de leite. Levantamentos realizados em países europeus as identificaram como o terceiro maior problema de saúde em animais produtores de leite, só suplantadas pela mamite e pela infertilidade (BAGGOT & RUSSEL, 1981; VERMUNT & GREENOUGH, 1995; HOLZHAUER et al., 2006). Também no Brasil as enfermidades podais resultam em perdas econômicas significativas para a pecuária bovina (SILVA et al., 2001, 2005; FERREIRA, 2003; FERREIRA et al., 2004 ; SOUZA, 2005; SOUZA et al.,2006; SOUZA et al.,2007).

Admite-se que as enfermidades dos dígitos são influenciadas por vários fatores: genéticos, fisiológicos, nutricionais, ambientais e de manejo (GREENOUGH, 1998; BERGSTEN, 1981). Dos processos patológicos que as causam, destacam-se as doenças do tecido mole e as do tecido córneo. São lesões do tecido mole: **dermatite digital**, dermatite interdigital (gabarro), hiperplasia interdigital e flegmão interdigital. Doença da linha branca, úlcera de sola, úlcera da pinça, erosão do talão, **abscesso solear**, hemorragias de sola, pododermatite asséptica difusa (laminite) e deformações ungulares (casco em saca-rolha, casco em tesoura e estrias) são lesões podais do tecido córneo (BORGES & GARCIA, 1997).

As alterações podais são mais freqüentes nos membros pélvicos, provavelmente devido à presença mais intensa de fezes e urina junto aos membros pélvicos, além das próprias características biomecânicas, que favorecem a ocorrência de alterações naqueles membros. Em estudo realizado por SOUZA (2002), dermatite digital foi a lesão mais freqüente nos membros pélvicos (29,1%); nos torácicos, a dermatite interdigital ocorreu em 3,3%. Alguns autores, entretanto, relatam que tanto a doença da linha branca quanto a do casco em saca-rolha, assim como as estrias horizontais, não apresentam distribuição diferente entre membros pélvicos e torácicos (RUSSEL et al., 1982; MOLINA et al., 1999; SOUZA, 2002). Em 2002, SOUZA observou ocorrência de alterações podais múltiplas em bovinos mantidos em sistema de criação semi-intensivo e no intensivo, o que pode estar relacionado à coexistência de condições predisponentes (fatores de risco) a duas ou mais alterações simultâneas.

Dentre os microrganismos isolados de enfermidades podais (abscesso solear, flegmão interdigital, dermatite interdigital e erosão do talão), destacam-se os bastonetes Gram-negativo anaeróbicos, como *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum*, *F. symbiosum* e *F. mortiferum*. Os agentes secundários mais comuns são os anaeróbios pigmentados dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*, cocos Gram-positivo *Peptostreptococcus* (LANGWORTH, 1977; QUINN et al., 1994 e 2005; GREENOUGH, 1998; SILVA et al., 1999; BERRY, 2001, 2006). Entre os facultativos, são citados *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* e *Bacillus* (SWEDEN, 1997; GREENOUGH, 1998; QUINN et al., 2005).

A seguir, tratar-se-á das peculiaridades do abscesso solear e da dermatite digital, objetos do presente trabalho. Algumas características das demais enfermidades podais são comentadas no anexo 1.

Doença da linha branca, erosão do talão e úlcera de sola podem evoluir para o abscesso solear, o qual acomete bovinos na fase de engorda e bovinos de aptidão leiteira, quando criados estabulados em condições precárias de higiene ou quando mantidos em baixadas , úmidas e, depois, semi-estabulados por longo período. A presença de umidade e a laminite crônica ou subclínica tornam a sola plana e macia, predispondo-a a

traumatismos por cascalho, vidro, pregos e pisos irregulares ou quebrados, fatores esses que aumentam o efeito da abrasão causada pelo cimento muito áspero ou mesmo novo (BORGES & GARCIA ,1997).

Havendo presença de laminite, posteriormente podem aparecer hemorragias de sola, talão e linha branca, alterações de coloração e da resistência do tecido córneo. A linha branca se torna larga e o seu tecido será de má qualidade, favorecendo a penetração de fragmentos, sujidades e de microrganismos que podem infectar o cório. Poderá ocorrer drenagem de secreção purulenta pela banda coronária, chegando a atingir até a articulação. Os animais acometidos pela enfermidade geralmente sentem muita dor na região da pinça, dor que pode estender-se à sola, em um ou em ambos os cascos do mesmo membro, o que faz com que não se alimentem, (BORGES & GARCIA ,1997; GREENOUGH et al.,1997; FERREIRA, 2003).

Há dois tipos de abscesso de sola: o superficial, com prognóstico favorável e o profundo, com prognóstico desfavorável. Os casos não tratados podem evoluir para artrite séptica interfalangeana, chegando a osteomielite, com necrose da terceira falange, flegmão generalizado dos tecidos moles e septicemia (SINGH et al., 1993; BORGES & GARCIA, 1997; GREENOUGH et al., 1997; DIAS, 1999; FERREIRA, 2003).

Na identificação da doença, depois de retirada a camada córnea superficial, torna-se visível uma pequena mancha negra, de aproximadamente 1 mm, localizada na sola, na linha branca. Ao aprofundar-se o corte, seguindo a área escurecida, evidencia-se o abscesso de sola, contendo pus acinzentado sob forte pressão (MAUCHLE 2001).

Dentre os microrganismos isolados de abscessos de sola destacam-se os bastonetes Gram-negativo anaeróbicos, como *D. nodosus*, *F. necrophorum*, *F. symbiosum*, *F. mortiferum*, os anaeróbios pigmentados dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*, *Porphyromonas levii* agindo sinergicamente com *F. necrophorum*, cocos Gram-positivo, *Peptostreptococcus*. (LANGWORTH, 1997; QUINN et al., 1994; GREENOUGH, 1998; SILVA et al., 1999; BERRY, 2001; QUINN, et al.,2005; STEVEN, 2006). Contudo, é imperativo ressaltar o papel dos anaeróbios facultativos

no desenvolvimento das doenças causadas pelos microorganismos anaeróbios obrigatórios, pois que os primeiros utilizam parte do oxigênio disponível, diminuindo assim o potencial de oxirredução (Eh) no sítio da infecção, o que favorece o desenvolvimento das populações de anaeróbios obrigatórios. Portanto, as bactérias anaeróbias facultativas exercem um papel sinérgico, sob vários aspectos, nas doenças infecciosas causadas por anaeróbios. Entre os facultativos, são citados *A. pyogenes*, *E. coli* e *S. aureus* (SWEDEN, 1997; GREENOUGH, 1998; QUINN, et al. 2005).

Nos casos de abscesso de sola, os animais deverão ser tratados por abertura da lesão com drenagem para eliminação de tecidos necróticos e dos exsudatos purulentos e posterior antissépsia da área com iodo degermante, aplicação de solução de iodo a 10%, curativo com pasta de furazolidona e tetraciclina, seguido de bandagem, aplicação de tamanco de madeira na unha contra-lateral saudável e impermeabilização com emulsão asfáltica. (FERREIRA, 2003; FERREIRA et al, 2004; SOUZA, 2005; SOUZA et al, 2006). Segundo FERREIRA et al., (2004) e SOUZA et al.(2006), todos os animais acometidos por abscesso de sola que foram tratados se recuperaram satisfatoriamente (em um período de 26,8 a 24,5 dias), mediante cirurgia com a exposição e a limpeza completa dos focos, sendo que, a cada três dias. fazia-se revisão das feridas e novas bandagens eram feitas até a cicatrização.

A dermatite digital, também é denominada dermatite verrucosa, verruga do casco, doença de Mortellaro, papilomatose interdigital ou calcanhar em amora (CHELI & MORTELLARO, 1974; STOKKA et. al,1997) ocorre em rebanhos leiteiros de diversos países (AMSTEL & SHEARER, 1995; Rodriguez-Lainz et al.,1998; SILVA et al., 2001; SOUZA, 2002; SOUZA et al.,2007; STAMM et al., 2002; TROTT et al.,2003; FERREIRA, 2003; HOLZHAUER, et al., 2006). Trata-se de processo inflamatório, superficial e contagioso, da epiderme próxima à margem coronariana ou do espaço interdigital (BERGSTEN, 1981).

Sua etiologia ainda não está bem estabelecida, mas acredita-se que seja multifatorial, envolvendo causas ambientais, de manejo, fisiológicos e

microbiológicos (GOURREAU et al. 1992; DOPFER et al., 1997; MUMBA et al., 1999; BERRY, 2001, 2006; HOLZHAUER et al., 2006). Das lesões causadas pela doença, já foram isoladas bactérias anaeróbias como *D. nodosus*, *Porphyromonas spp*, *Prevotella melaninogenica*, *P. orallis*, *P. bivia*, *Porphyromonas spp*. *Bacteroides fragilis*, *B. capillosus*, *B. corrodens*, *F. necrophorum*, *F. nucleatum*, *F. mortiferum*, *Peptococcus anaerobius*, *P. saccharolyticus*, *P. activus*, *P. niger*, *P. aerogenes*, *Peptostreptococcus productus*, *P. micros*, *P. intermedius*, *Clostridium sporogenes* (GOURREAU et al., 1992; DÖPFER, 2000); *Campylobacter fecalis* e *C. sputorum biovar bubulus* (OHYA et al., 1999; SHIBAHARA et al, 2002; TROTT,2003). WYSS et al. (2005), isolaram e identificaram fenotípica e genotipicamente uma nova bactéria, *Guggenheimella bovis gen, nov., sp.*, de lesões de dermatite digital de bovinos na Suíça. Também foram recuperadas bactérias aeróbias, *Streptococcus* e *Staphylococcus*, prováveis agentes de infecção secundária (GOURREAU et al. 1992). 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 na Alemanha, Inglaterra, Estados Unidos e no Canadá, foram encontrados espiroquetas como microrganismos predominantes em lesões de dermatite digital, detectados por exames microscópicos, usando-se técnica de colocação com sais de prata, colocação do Gram e microscopia de campo escuro, em biópsia das lesões de animais acometidos. A localização dos espiroquetas na junção entre o tecido vivo e necrosado e a sua aparente invasão do tecido queratinizado da epiderme sugerem que eles sejam agentes primários da enfermidade (BORGMANN et al., 1996; DÖPFER et al.,1997; DEMIRKAM et al.,1998).

WALKER et al., (1995) relataram o primeiro cultivo *in vitro* de espiroquetas associados à dermatite digital de bovinos de aptidão leiteira da Califórnia – E.U.A. Os espiroquetas, de crescimento fastidioso e metabolismo anaeróbio, foram diferenciados em dois fenótipos, com base em características morfológicas, antigênicas e bioquímicas. Ambos os fenótipos possuem características consistentes com o gênero *Treponema*, confirmado pela digestão dos DNAs com endonucleases de restrição.

STAMM et al., (2002) também relataram que espiroquetas isolados de dermatite digital de bovinos dos estados da Califórnia e Iowa, nos EUA, possuem características fenotípicas do gênero *Treponema*. Pela análise da seqüência parcial de 16S rDNA os autores verificaram que os vários clones isolados pertenciam a três tipos filogeneticamente relacionados aos treponemas da cavidade oral humana (*T. denticola*, *T. medium*, *T. vincentii* ou da área genital, *T. phagedenis*). Também foram feitas análises comparativas da seqüência de 16S –23S rDNA ISR1 e ISR2 (região inter-específica) com o objetivo de tipagem molecular dos isolados, permitindo diferenciar melhor bactérias filogeneticamente relacionadas. 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 seqüência 16S rDNA idêntica e que a similaridade a *T. phagedenis* foi de 98% e 99% com um espiroqueta não cultivável (amostra DDLK-4). As amostras isoladas eram semelhantes quanto ao perfil de proteína total, mas apresentaram diversidade antigênica de lipopolissacarídeos (LPS) e diversidade genética, que foi detectada por eletroforese de campo pulsado (digestão de DNA genômico), revelando diferenças em cinco das seis amostras estudadas.

CHOI et al. (1997), analisando seqüências de 16S rDNA, identificaram cinco tipos filogenéticos de *Treponema* não cultiváveis associados com dermatite digital de bovinos na Alemanha. Destes cinco, três tipos filogenéticos eram relacionados a *T. denticola*, *T. vincentii* ou *T. phagedenis*. Os outros dois aproximavam-se com o IV Grupo de *Treponema* sp. orais, que estão associados a periodontites em humanos. Ainda na Alemanha, MOTER et al. (1998), usando “Fluorescence in Situ Hybridization” (FISH) em biópsia de lesões de dermatite digital, verificaram distribuição espacial de treponemas dentro da epiderme.

DEMIRKAN et al. (1998,1999), a partir de material de biópsia de dermatite digital de bovinos do Reino Unido, cultivaram espiroquetas utilizando separação imunomagnética e pela pesquisa do gene 16S rDNA determinaram que essas pertenciam ao gênero *Treponema* e estavam relacionadas com o *T. denticola*, em concordância com RIJKEMA (1997). Também no Reino Unido, EDWARDS et al., (2003) e na Austrália, RUSSEL et al. (2000), os resultados obtidos pelo cultivo de espiroquetas de biópsias de bovinos com dermatite digital e de ovinos com dermatite

digital contagiosa (CODD) e pela análise da sequência de 16S rDNA mostram que os isolados de bovinos e ovinos estão próximos filogeneticamente a *T. denticola*, *T. vincentii* e *T. médium*. Embora várias espécies do gênero *Treponema* possam estar presentes nas lesões, a atividade de cada espécie na patogenia da doença não está bem esclarecida (CHOI et al. 1997; EDWARDS et al., 2003; DHAWI et al., 2005).

Pesquisando a presença simultânea de espiroquetas em lesões de dermatite digital e de colite em bovinos no Japão, SHIBAHARA et al. (2002), por exames histopatológicos, constataram reação inflamatória, edema e dilatação vascular na pele do dígito acometido por dermatite digital e no intestino grosso do mesmo bovino acometido de colite, úlceras, reação inflamatória e edema na lâmina própria e mucosas do ceco e cólon. Numerosas bactérias espiraladas estavam presentes nas lesões de dermatite digital e nas lesões intestinais visualizadas pelas colorações do Gram e de Warthin-Starry. Pela microscopia eletrônica foi possível verificar semelhanças quanto à morfologia de tais espiroquetas. Pela técnica de imunoperoxidase, usando soro anti-*Treponema pallidum*, os autores verificaram que não houve aparente diferença na reatividade entre o anticorpo reagente e os organismos observados em dermatite digital e em colite, o que os levou a sugerir que as duas doenças podem ter uma etiologia próxima. O quadro 1 apresenta as diferentes técnicas utilizadas na identificação de microrganismos espiralados em lesões de dermatite digital.

A enfermidade pode ser introduzida no rebanho por animais doentes, às vezes aparentemente sadios, provenientes de rebanhos infectados e espalhar-se rapidamente. Entre rebanhos a dermatite digital pode ser transmitida por veterinários e casqueadores por meio dos instrumentos de trabalho (WYSS et al., 2005). A prevalência anual varia de 3% a 80%, com tendência a ser maior em animais confinados do que nos mantidos em pasto. Dos animais acometidos, de 25% a 40% podem claudicar (BERGSTEN, 1981; WEAVER, 1981). Na Alemanha, BLOWEY & SHARP (1998) relataram incidência de 29%; na Itália, 70% dos animais adultos produtores de leite foram acometidos (DEMIRKAN et al., 1998). Com relação à localização, observou-se que 82% das ocorrências da doença eram proximais e adjacentes ao espaço interdigital palmar/plantar; 9% eram proximais e adjacentes ao

bulbo do talão; 8% envolviam a região dorsal do plantar; 2% envolviam exclusivamente o espaço interdigital (READ et al., 1994).

Em condições onde a presença de matéria orgânica, contendo os agentes da dermatite digital, é elevada, na presença de umidade constante e de baixas tensões de oxigênio, os surtos de dermatite digital são favorecidos (READ & WALKER, 1992 ; BERRY et al., 2006).

Quadro 1: Estudos realizados sobre dermatite digital em bovinos para detectar a presença de espiroquetas

MATERIAL	AUTOR E PAÍS	EXAME	ASPECTOS
Biópsia de DD	BORGMAN, 1996; DERMIKAN, et al., 1998; DÖPFER, et al., 1997	Histopatológico corado pela prata, Gram , MCE	Aspecto morfológico de espiroquetas
Biópsia de DD	WALKER, et al., 1995 California	Exame direto de MCE Cultivo, ME, Atividade enzimática, REA “Immunoblot”	Dois morfotipos de espiroquetas, dois fenótipos do gênero <i>Treponema</i> .
Biópsia de DD <i>postmortem</i>	RUIPKEMA et al., 1997, Grã-Bretanha.	PCR-gene 16S rRNA de espiroqueta	Gênero <i>Treponema</i> e é semelhante a <i>T. denticola</i>
Biópsia de DD material fresco	CHOI et al., 1997, Alemanha	MCE, Gram, Histopatológico, ME, PCR-gene 16S rDNA, clonagem, análise filogenética e hibridização	Cinco tipos filogenéticos de Treponemas não cultiváveis sendo três relacionados a <i>T. denticola</i> , <i>T.</i> <i>vincentii</i> ou <i>T. phagedenis</i> e dois ao IV grupo de Treponemas orais
Biópsia de DD material fresco e congelado	DEMIRKAN et al., 1998, Reino Unido	Coloração imunohistoquímica, PCR-gene 16S rDNA	Anticorpo policlonal para <i>T.</i> <i>denticola</i> e <i>T. vincentii</i> , -petence ao gênero <i>Treponema</i>
Biópsia de DD	MOTER et al., 1998, Alemanha	FISH	Distribuição espacial de Treponemas na epiderme
Biópsia de DD	DEMIRKAN et al., 1999, Reino Unido	Cultivo e separação imunogenética	Anticorpo policlonal para <i>T.</i> <i>denticola</i>
Biópsia de DD	SCHRANK, et al., 1999; Alemanha	Cultivo, chemotaxonomiy, análise de proteína PCR-gene 16S	<i>T. brennaborensis</i> sp. nov. semelhante <i>T. maltophilum</i>
Biópsia de DD e colite, bovino.	SHIBAHARA et al., 2002, Japão.	Histopatológico, Gram, Warthin-Starry, ME, Imunoperoxidase	Treponemas, as duas doenças podem ter a mesma etiologia.
Biópsia de DD	STAMM, et al., 2002, California, Iowa	Cultivo, PCR-gene 16S rDNA de clones e análise de 16S-23S rDNA ISR1 e ISR2	Pertence ao gênero <i>Treponema</i> . Verificaram seqüência parcial de clones, pertenciam a três tipos filogenéticos relacionados aos <i>T.</i> <i>denticola</i> , <i>T. médium</i> , <i>T. vincentii</i> ou <i>T. phagedenis</i> . Tipagem molecular
Biópsia de DD	DARREN et al., 2003, California, Iowa	MCF, cultivo, ME, PCR-gene 16S rDNA, eletroforese em campo pulsado	Aspecto morfológico, 16S rDNA, seqüências tem 98% de similaridades <i>T. phagedenis</i> e 99% com espiroqueta não cultivável, diversidade genética e antigênica nas amostras “like” <i>T. phagedenis</i>
Biópsia de DD em bovinos e CODD em ovinos	EDWARDS et al., 2003, Reino Unido	Cultivo, PCR-gene 16S, rDNA, clonagem, seqüenciamento, análise filogenética	Dois isolados de ovinos e bovinos são do gênero <i>Treponema</i> , filogeneticamente próximos a <i>T.</i> <i>médium</i> e <i>T. vincentii</i> e entre ambas, outros dois isolados estão próximos a <i>T. denticola</i> e entre eles.
Biópsia de DD em bovinos	EVANS ,et al., 2008 Reino Unido	Cultivo, PCR-gene 16S, rDNA, gene flabB2 , seqüenciamento, análise filogenética	Há 3 grupos filogenéticos 1 <i>T. médium</i> e <i>T. vincentii</i> -like; 2 - <i>T. phagedenis</i> -like; 3 <i>T. denticola</i> <i>/T. putidum</i> -like-

MCE= microscopia de campo escuro; ME= microscópio eletrônico; REA=“Restriction endonuclease analysis;”

MCF=microscopia de contraste de fase; FISH= “Fluorescence in situ hybridization”; DD=dermatite digital;

CODD=dermatite digital contagiosa dos ovinos

Morfologicamente, as lesões associadas com dermatite digital podem ser descritas sob três formas clínicas distintas: lesão hiperplásica (Grau 1), caracterizada por ligeira hiperemia da pele ao redor de pequena erosão, acompanhada de dor intensa; lesão ulcerativa (Grau 2), caracterizada por acentuada hiperemia da pele com formação de tecido de granulação na forma de morango, muitas vezes com exsudato de odor desagradável; lesão proliferativa (Grau 3), apresentada em forma de verrugas ou papilomas com fenda central bastante profunda, contendo matéria orgânica e tecido necrótico, muitas vezes apresentando crescimento de pêlos (WEAVER, 1981; SOUZA,2005; SOUZA et al., 2006). Em 2006 (SOUZA et al.) em cortes histopatológicos de biópsias da dermatite digital corados por hematoxilina e eosina, observaram-se as camadas da epiderme e da derme das amostras. Na dermatite digital hiperplásica foi observada intensa hiperqueratose na epiderme; já na forma ulcerativa a epiderme apresentava-se descontínua, com erosão do estrato córneo e necrose, além de hemorragias e células inflamatórias. Nos casos de lesão de grau 3, foi visualizado espessamento da epiderme, com formações papilares pronunciadas passando pelo estrato espinhoso até o estrato cóneo, com células inflamatórias. As lesões de grau 1 (hiperplásica) demoram 28 dias para assumir a forma grau 2, (ulcerativa) que por sua vez demora 45 dias para atingir a forma grau 3(proliferativa).

O diagnóstico clínico de dermatite digital normalmente se dá com base no aparecimento de uma afecção epidêmica. O exame da área lesada, previamente limpa, revela lesões características, circulares, dolorosas, com superfície de aspecto semelhante ao morango, exalando odor desagradável (BERGSTEN, 1981; MORTELLARO, 1994). Por sua localização e pela lesão característica, pode ser distinguida das demais enfermidades podais (WEAVER, 1981). Como medida de prevenção de significativa importância, BERRY (2001) preconiza utilização do pedilúvio e a realização de quarentena nos casos de dermatite digital e de outras lesões de caráter infeccioso.

Quanto ao tratamento dos animais acometidos, segundo BRITT & MCCLURE (1998), LAVEN & LOGUE (2006), citado por STEVEN (2006), e HOLZHAUER et. al. (2006), existem vários tipos: a aplicação tópica usando “spray”, bandagem e

antibiótico via parenteral. O uso de penicilina, lincomicina e oxitetraciclina (que é usada como padrão ouro para comparação com outros medicamentos), além de iodo, tem apresentado resultados satisfatórios.

Souza, em 2005, submeteu 75 animais acometidos por dermatite digital aleatoriamente a um dos três tipos de tratamento: cirúrgico, bandagem ou tópico. No tratamento cirúrgico, era feita exérese da dermatite digital, com remoção das áreas necrosadas, depois da limpeza do local com solução de iodo degermante e aplicação de solução de iodo a 10%. Sobre a ferida cirúrgica, colocava-se uma pasta composta de furazolidona com tetraciclina em pó; em seguida era feita uma proteção para a coroa do casco com algodão ortopédico e o enfaixamento do espaço interdigital, com atadura elástica. Em seguida, a bandagem era coberta com uma camada de emulsão asfáltica. O tratamento com bandagem, depois da limpeza da lesão e aplicação de solução de iodo a 10%, era feito o mesmo procedimento do tratamento cirúrgico. No tratamento tópico, os membros dos animais eram lavados com água sobre pressão; a seguir, era aplicada uma solução aquosa de tetraciclina em pó a 2,5% sobre a lesão, com o uso de uma bomba costal. Tal procedimento era repetido, diariamente, por 10 dias. Os animais submetidos a tratamento cirúrgico e os submetidos a bandagem recuperaram-se com 8,6 e 18,2 dias, respectivamente. Recidiva ocorreu em 16% dos animais tratados pelo método da cirurgia, após 128 dias, e em 78% dos tratados pelo método da bandagem após 81,6 dias. Os animais tratados de forma tópica recuperaram-se, em média, com 29,5 dias e 82,4% apresentaram recidivas após 65,6 dias do tratamento.

2. Epidemiologia

De acordo com GREENOUGH (1997), SEYMOUR et al. (2002), DIAS & MARQUES (2003) e Ferreira et al.(2004), as afecções podais são doenças de origem multifatorial. Dentre os fatores que predispõem a sua ocorrência, destacam-se os genéticos, os fisiológicos (idade, lactação, nutrição, conformação do casco), os ambientais (umidade, higiene, tipo de instalação, tipo de piso, estação do ano) e os de manejo. Estudando a epidemiologia das afecções podais, verificaram diferenças quanto à prevalência das diversas formas de afecção entre países e entre diferentes

regiões geográficas de um mesmo país. Tal fato pode ser atribuído à presença diferenciada de fatores predisponentes à ocorrência de afecções podais.

Em estudo realizado na Holanda, envolvendo 2.121 bovinos de aptidão leiteira mantidos em sistema de “free stall”, SMITS et. al. (1992) observaram a prevalência de 83,1% de dermatite interdigital, 17,6% de dermatite digital, 7,6% de doença da linha branca, 5,5% de úlcera de sola, 4,9% de sola dupla, 4,5% de laminite e 0,4% de flegmão interdigital. No mesmo estudo, os autores relataram que a prevalência elevada envolvia principalmente problemas subclínicos, não identificados pelos proprietários.

Em levantamento feito na Costa Rica, de 759 vacas de aptidão leiteira examinadas, 97,8% apresentaram lesões podais. A afecção mais prevalente foi laminite (77,1%), seguida por doença da linha branca (66,1%), dermatite interdigital (52,0%), lesões de sola (12,9%), dupla sola (12,1%) (BEEMASTER et al., 1992). Os fatores de risco encontrados para a laminite foram a idade dos animais (2 a 3 anos) e a longa distância por eles percorrida diariamente em piso áspero. O início da lactação, a raça Jersey e a umidade foram os fatores de risco para a dermatite interdigital.

No México, ARGÁEZ-RODRÍGUES et al. (1997) verificaram que, de 577 bovinos em lactação, 33% eram acometidos por dermatite digital. Em 79% dos rebanhos leiteiros nos Estados Unidos, WELLS et al. (1999) encontraram, durante um período de 12 meses, incidência de 43,5% de dermatite digital. Do rebanho leiteiro daquele país, 9,7% foram acometidos pela doença, apresentando claudicação, o que representa 57% dos bovinos com tal sintoma. Na Noruega, SOGSTAD et al. (2005), estudando 1547 vacas e 403 novilhas “Red breed”, encontraram, em 29% dos animais, um ou mais de um tipo de lesão.

No Brasil, BORGES et al. (1992), estudando vacas da raça holandesa e mestiças (holandesa – zebu), encontraram prevalência de lesões podais em 11,1% dos animais mantidos em baixadas úmidas e de 14,1% nos mantidos em sistema de confinamento no Estado do Rio de Janeiro. RIBEIRO et al. (1992) observaram baixa incidência (0,88%) de lesões digitais em garrotes zebuínos criados em regime extensivo e abatidos em Gramacho (RJ). CRUZ et al. (2001), também no Rio Grande

do Sul, relatam ocorrência de enfermidades podais responsáveis por claudicação. Os animais foram observados por 18 meses, em 4 fazendas. A prevalência de animais acometidos foi de 50,2%. Vários desses animais foram importados dos Estados Unidos, do Canadá ou da Argentina. De 1.043 animais, 524 da raça *Holandesa* foram tratados de claudicação. Desses, 29,9% apresentaram dermatite digital, com 86% de ocorrência nos membros pélvicos. A doença acometera principalmente animais jovens em lactação, alojados em “free stalls”, mas também acometera novilhas e vacas no período seco, mantidas em pastagens. Segundo os autores, a alta prevalência de dermatite digital nas fazendas foi atribuída às precárias condições de higiene, presença de matéria orgânica e umidade no sistema “free stalls”. Nos animais mantidos nos pastos, os fatores predisponentes foram o clima úmido, áreas lamacentas e lodosas nas pastagens.

PARDO & STURION (1997) estudaram afecções podais em um rebanho de 1.000 animais de 15 propriedades leiteiras de Presidente Prudente (SP). Foram catalogados 100 bovinos com afecções podais. Os membros pélvicos foram os mais acometidos, com 78% dos casos. A faixa etária mais atingida foi a de quatro a oito anos, com 91% dos casos.

SILVA et al.(2001), estudando a prevalência das doenças de casco em vacas lactantes na bacia leiteira do município de Orizona - GO, observaram que, nas 224 vacas examinadas, havia 234 lesões – 87,66% nos membros pélvicos e 12,34% nos torácicos. As enfermidades de maior ocorrência foram dermatite digital (24,36%), dermatite verrugosa (14,53%) e pododermatite séptica (13,68 %). A inspeção das propriedades mostrou que seis possuíam solos duros; três solos pedregosos; e quatro, pisos irregulares nos estábulos. Em todas as propriedades a higienização era deficiente nas instalações e nos piquetes.

Em Minas Gerais, MOLINA et al. (1999), ao examinarem, em dez fazendas da bacia leiteira de Belo Horizonte, 469 vacas em período de lactação — todas mantidas em regime de confinamento —, verificaram que 30,3% das vacas examinadas apresentavam afecções podais, destacando-se a erosão do talão (48,5%), a dermatite intergital (13,48%) e a pododermatite séptica (9,6%). MAUCHLE (2001), em estudo realizado em duas propriedades também na bacia leiteira de Belo

Horizonte, encontrou alta prevalência de afecções podais, sendo que erosão do talão foi a mais freqüente (50,0%), seguida por dermatite digital (29,09%). A autora verificou também que nas fazendas estudadas havia elevada ocorrência de lesões podais de baixa gravidade.

SOUZA (2002) promoveu levantamento da freqüência de afecções podais em vacas nas mesmas regiões da bacia de Belo Horizonte e Pedro Leopoldo, em Minas Gerais. O estudo envolveu propriedades que adotavam sistema semi-intensivo (57 fazendas) e intensivo (6 fazendas). O autor detectou, em todas elas, ocorrência de lesões podais. Foram examinadas 323 vacas, entre da raça holandesa e mestiças, sendo que a freqüência de animais acometidos no sistema intensivo (92,7%) foi superior à encontrada no semi-intensivo (89,4%). Considerando os problemas clínicos e subclínicos. Por ordem de ocorrência, as lesões prevalentes foram erosão do talão (59,8%), dermatite digital (30,3%), casco em tesoura (24,1%) e doença da linha branca (16,4%). A maior parte das lesões apresentava gravidade em graus variando de leve a moderado. A maior ocorrência de alterações podais múltiplas em ambos os sistemas possivelmente poderia estar relacionada às condições predisponentes coexistentes para mais de uma alteração simultânea.

FERREIRA (2003) e FERREIRA et al. (2004), examinando 112 vacas da raça Holandesa em lactação, confinadas em sistema de "free stall" em Pedro Leopoldo – MG, observaram que a freqüência de animais acometidos de afecções podais conseqüentes a laminite era de (78,3%). Entre as lesões de tecido córneo, as mais observadas foram o abscesso de sola (31,3%), a erosão de talão (13,4%) e a doença da linha branca (25,9%). Entre as lesões de tecido mole digital, a mais freqüente foi a dermatite digital (37,6%). SOUZA (2005) e SOUZA et al. (2006) avaliaram 100 vacas em lactação confinadas em sistema "free-stall", no município de Esmeraldas, Minas Gerais, e as afecções podais mais observadas foram: abscesso de sola e talão, úlcera de sola e dermatite digital, que representaram (87,3%) das ocorrências. O custo adicional anual por vaca alojada no rebanho foi de US\$125,36, considerando-se tratamento, redução na produção de leite, perdas reprodutivas e mastites. A incidência de mastite e metrite em vacas com manqueira neste estudo foi de 60% e 25% respectivamente. Esses resultados foram superiores

($P < 0,05$) aos 29% e 12,5% para mastite e metrite, respectivamente, observados em vacas sadias.

Devido ao elevado número de animais acometidos, os autores MOLINA et al. (1999), MAUCHLE (2001), SOUZA (2002, 2005), SOUZA et al. (2006) e Ferreira (2003), FERREIRA et al. (2004) concluíram que as afecções podais em vacas de aptidão leiteira confinadas constituem um sério problema em fazendas na bacia leiteira de Belo Horizonte. Nas fazendas estudadas, o piso das instalações era cimentado e a limpeza feita por raspagem. Observaram-se acúmulo de grande quantidade de matéria orgânica e presença de alto teor de umidade que propicia o amolecimento dos cascos, fatores que justificam a elevada prevalência de erosão da camada córnea e as precárias condições de higiene, tornando os animais mais suscetíveis às infecções bacterianas. A alta prevalência da erosão de talão e abscesso de sola verificada nos trabalhos citados também pode ser resultante de distúrbios circulatórios, que resultariam na formação de um tecido córneo de baixa qualidade. A dermatite digital foi mais prevalente no sistema intensivo (43,9%) do que no semi-intensivo (28,4%). As condições ambientais observadas nas propriedades onde ocorria a doença, associada com maior densidade populacional no sistema intensivo, foram os fatores que favoreceram a manutenção e a disseminação da dermatite digital. Em uma das fazendas, as vacas apresentavam baixa qualidade de tecidos córneos relacionada à ocorrência elevada de laminites e à presença de matéria orgânica no estábulo. Havia uma alta incidência de problemas infecciosos nos tecidos córneos secundários à laminite, constituídos de abscessos de sola e de talão e doença da linha branca. Tais achados eram esperados, já que havia presença constante de fatores relacionados à ocorrência de laminites e falta de medidas eficientes de controle. Uma condição precária de higiene, associada a não utilização de medidas profiláticas como o casqueamento preventivo, e as utilizações inadequadas do pedilúvio foram possivelmente as principais causas da ocorrência dessas alterações.

3. Fatores predisponentes

Muitos são os fatores que interferem direta ou indiretamente na saúde dos cascos, predispondo-os à ocorrência de afecções podais. Entre eles, são citados: umidade,

condições precárias de higiene, tipo de piso, laminite crônica com crescimento exagerado, desgaste excessivo dos cascos, peso e escore corporal, período e ordem de lactação, ordem de parto, doenças sistêmicas, fatores nutricionais, predisposição genética, instalações, manejo, comportamento, falta ou uso inadequado de pedilúvios, casqueamento incorreto, má conformação dos cascos, idade, falta ou excesso de exercícios (GREENOUGH, 1997; BLOWEY, 1998; DIAS & MARQUES, 2003; COOK et al., 2004; HOLZHAUER et al., 2006).

Estudos sobre fatores predisponentes para dermatite digital sugerem que certas práticas de manejo predispõem os animais a infecções. Estes fatores são: grande número de animais no rebanho, presença de umidade e de matéria orgânica, falta de higiene nos estábulos ou currais, presença de pedregulhos na trilha, o instrumental contaminado usado por casqueadores, uso inadequado do pedilúvio, a introdução de novilhas para reposição sem o devido cuidado com exame do aparelho locomotor e especificamente do casco e com a quarentena necessária, para impedir a introdução de animais doentes no rebanho (CRUZ et al., 2001; SILVA et al., 2001; FERREIRA, 2003; SOUZA, 2005; BORUT, 2006; HOLZHAUER, 2006).

Para o abscesso de sola, os fatores predisponentes seriam a ocorrência de laminite, principalmente a subclínica, estábulos com elevado grau de umidade, presença de matéria orgânica, falta de higiene, piso de concreto abrasivo, pedregulhos nas trilhas pelas quais os animais se locomovem, além da não utilização de casqueamento preventivo e do uso incorreto de pedilúvio (CRUZ et al., 2001; FERREIRA, 2003; SOUZA, 2005).

3.1. Instalações e manejo

Vários autores relatam que inadequadas condições de higiene das instalações, com ênfase na presença de matéria orgânica e umidade, são fatores importantes para a ocorrência de lesões podais, especialmente as de origem infecciosa (RAVEN, 1995; GREENOUGH, 1997; BLOWEY, 1998; BERRY, 2001; MAUCHLE, 2001; SOUZA, 2002; 2005; Ferreira, 2003; BORGES et al., 2006).

BLOWEY (1998) relatou que as instalações com piso de concreto abrasivo predispõem à ocorrência de doença da linha branca e de abscesso de sola. O desgaste excessivo dos cascos após a estabulação resultaria em desgaste: o cório estaria menos protegido pelo estojo córneo e, assim, mais suscetível a injúrias traumáticas (LEACH et al., 1997; COOK et al., 2004). A permanência dos animais em piso de concreto não deve ultrapassar de 10 a 12 horas por dia. Em instalações adequadas, os animais permanecem deitados entre 12 a 14 horas por dia. LEONARD et al. (1996) observaram que vacas de primeira cria mantidas em instalações que impossibilitaram um tempo ideal de descanso apresentaram uma maior ocorrência de hemorragias de sola. O uso de camas de feno diminuiu efetivamente a ocorrência de doença da linha branca e úlceras de sola. Em condições onde há densidade populacional elevada e os animais são impossibilitados de se exercitarem, ocorre impedimento do fluxo sanguíneo normal nos cascos (BLOWEY, 1998), pois estes são fatores predisponentes para as lesões podais.

HARRIS et al. (1988); ACUÑA & ALZA (2006) e VERMUNT (2006) observaram, em bovinos de raças leiteiras criados a pasto na Austrália, na Argentina e no Uruguai que o fator ambiental mais importante na incidência de lesões podais com claudicação era a trilha por onde transitavam os animais. As características avaliadas: presença de declives acentuados, tipo de cascalho, extensão e conservação das trilhas. As principais alterações que causaram claudicação foram desgaste excessivo, hematomas de sola e presença de pedra no espaço interdigital.

3.2. Peso e escore corporal

Vacas com alto peso corporal apresentaram maior predisposição para úlcera de sola devido ao aumento de pressão sobre os tecidos produtores da camada córnea (ENEVOLDSEN et al., 1991). WELLES et al. (1993), observaram que cada aumento de 100Kg no peso corporal estava associado ao acréscimo de 1,9 vezes nos índices de claudicação.

3.3. Período de lactação–número de lactação-parição

Segundo ENEVOLDSEN et al., 1991^a e SILVA et al., 2004, as lesões decorrentes de laminite (erosão de talão, úlcera de sola, doença da linha branca, hemorragia de

sola, abscesso de sola) aumentam com a ordem de parição e com o estágio da lactação (KOENIG et al.,2005). SHEARER (1997) afirmou que vacas primíparas são mais suscetíveis a lesões podais nos primeiros 60 a 90 dias de lactação. Segundo BLOWEY (1998), enfermidades digitais são mais freqüentes durante o início da lactação, possivelmente devido à maior suscetibilidade do cório do casco a traumatismos e às mudanças nutricionais e de manejo que ocorrem no período.

ENEVOLDSEN et al. (1991^a), examinando vacas leiteiras na Dinamarca, encontraram, nas de primeira lactação, incidência de 43,8% de erosão de talão, 4,5% de dermatite interdigital e 9% de hiperplasia interdigital. Já em vacas de segunda lactação, erosão de talão ocorreu em 69,1%; dermatite interdigital, em 7,6%; hiperplasia interdigital, em 5,9%. Segundo os autores, tratar-se do primeiro parto foi fator importante na etiologia da úlcera de sola, assim como o número de lactações foi por eles considerado importante fator de risco para ocorrência de doenças podais.

3.4. Doenças sistêmicas

Problemas de claudicação em bovinos podem ser sinais de doenças sistêmicas — fato muitas vezes despercebido, uma vez que, na maioria das condições infecciosas que acometem os bovinos, os pés, assim como a boca, estão envolvidos (GREENOUGH, 1997). Importante salientar também que o inverso algumas vezes pode ocorrer no animal acometido por laminite aguda ocorre à presença de toxinas que irão prejudicar órgãos como o fígado e os rins. Doenças do pós-parto como metrite, mastite, acetonemia, retenção de placenta e edema de úbere provocam liberação de histamina ou endotoxinas, que podem causar alterações vasculares no cório e, conseqüentemente, laminite (VERMUNT & GREENOUGH, 1994).

3.5. Nutrição

O consumo de rações contendo altas proporções de concentrado e baixo teor de fibra — com conseqüente ocorrência de acidose ruminal — é o fator nutricional mais importante na patologia da laminite, causando claudicação devida ao aparecimento de lesões como úlcera de sola e abscesso de linha branca (BLOWEY, 1998;

Ferreira, 2003). GREENOUGH (1997) e Cruz et. al (2001) relataram vários fatores nutricionais envolvidos com as alterações podais por provocarem distúrbios, principalmente acidose ruminal: ingestão de alimentos com excessiva quantidade de grãos ou que sejam fontes ricas em carboidratos prontamente fermentáveis; forma com que os alimentos concentrados são ofertados ao longo do dia; excesso de proteína; pouca fibra; tamanho das partículas; falta de adaptação dos animais no período periparto. HOBLET & WEISS (2001) associaram vários fatores nutricionais com a função normal dos queratinócitos e a produção de tecido córneo saudável. Alguns minerais são fundamentais na formação e na manutenção da integridade do casco como enxofre, zinco, cobre, molibdênio, selênio, vitaminas D e E (SILVA et. al 2004; PARDO et al.,2004). Segundo BERGSTEN et al. (2003) a suplementação de biotina durante o período de lactação contribui para a saúde dos cascos.

3.6. Genética

Há relatos de predisposição hereditária a laminite em determinadas raças. As características hereditárias de conformação podem ser responsáveis por uma diferença de suscetibilidade à doença entre diversas raças (VERMUNT & GREENOUGH, 1994). Segundo HUANG et al. (1995), bovinos das raças Jersey e Ayrshire apresentam menor suscetibilidade a doenças podais do que animais das raças Pardo Suíço, Guernsey e Holandesa. Já GOGOI et al. (1981) relataram maior incidência de afecções podais em animais da raça Jersey (39,4%) e Holandesa (37,7%), quando comparadas aos animais das raças Haryana (8,1%), Sindhi (7,9%), Dinamarquês vermelho (2,8%) e Pardo Suíço (0,4%). Segundo KOENIG et al. (2005), geneticamente os problemas de saúde ocorrem em grupo, por exemplo: uma vaca acometida por uma afecção podal terá um fator predisponente para mostrar outro tipo de lesão podal.

3.7. Pedilúvio

A não utilização de pedilúvio favorece o aumento das enfermidades digitais. Banhar os pés com soluções de formalina, sulfato de cobre ou sulfato de zinco deveria ser de uso rotineiro, como medida de controle das afecções podais, principalmente as de origem infecciosa da pele e do espaço interdigital, como a dermatite digital, a interdigital e o flegmão interdigital. No caso da primeira, o uso de solução a base de

antibióticos, como a tetraciclina, produz também bons resultados curativos (GREENOUGH, 1997; BERRY, 2001; SILVA, et al., 2004; SOUZA, 2005; BORUT, 2006). A concentração dos componentes das soluções para o pedilúvio e a frequência de seu uso variam em função do tipo de lesão, nutrição, manejo e instalação (GREENOUGH, 1997; BERRY, 2001). Segundo DAVIES (1982), a utilização do pedilúvio com solução de formalina a 1% diminuiu em 5,3% a incidência de claudicação, sendo que no grupo de animais não tratados a incidência aumentou 9,6%.

3.8– Casqueamento

GREENOUGH (1997) e VAN AMSTEL & SHEARER (2001) preconizam o casqueamento — ferramenta importante na profilaxia de patologias — como forma de corrigir as irregularidades dos cascos, identificar e tratar precocemente as afecções podais. O processo — que consiste no aparo mecânico dos cascos — nem sempre, entretanto, remove totalmente as anormalidades, e os sintomas poderão prevalecer por algum tempo (HUANG et al., 1995; DIAS & MARQUES, 2003; SILVA et al., 2004;) relatam que intervalos de casqueamento inferiores a quatro meses estão associados à elevação dos escores de gravidade para todas as lesões podais, com exceção de úlcera de sola e casco em saca-rolha.

3.9. Conformação geral e de cascos

Segundo VERMUNT & GREENOUGH (1994), a conformação geral refere-se ao peso corporal e à forma do corpo e dos membros. Animais com membros excessivamente retos (com pouca angulação do joelho e dos jarretes) são mais suscetíveis a afecções podais, devido à menor absorção de choques por músculos, tendões e ligamentos.

A conformação anormal do casco pode ser considerada fator predisponente a afecções podais. Cascos com ângulos da pinça mais agudos e comprimento da borda dorsal mais longo estão estreitamente correlacionados com o aumento da incidência de claudicação, erosão do talão, crescimento excessivo da unha e pododermatite necrótica crônica (GITAU et al., 1997).

RUSSEL et al. (1982) observaram maior ocorrência de úlceras de sola e hemorragia de talão em animais com claudicação que apresentavam cascos com crescimento exagerado. Porém, hiperplasia interdigital, doença da linha branca, fissura vertical e sépsis profunda apresentam frequência semelhante em cascos normais e em cascos com crescimento exagerado. EDDY & SCOTT (1980) observaram incidência elevada de cascos com conformação anormal associado à doença da linha branca (33,7%) e úlcera de sola (39,8%).

Devido ao elevado número de animais acometidos, as afecções podais constituem sério problema em fazendas nas bacias leiteiras de Belo Horizonte, Pedro Leopoldo e outros municípios do Estado de Minas Gerais. Nos estudos epidemiológicos e clínicos realizados por MOLINA et al. (1999), MAUCHLE (2001), SOUZA (2002,2005), FERREIRA (2003) não foi incluído o diagnóstico laboratorial para determinar a etiologia das afecções podais. O tratamento dos animais foi realizado com base na indicação clínica dos antibióticos e quimioterápicos, tendo havido relatos de veterinários clínicos sobre ocorrência de recidivas. Portanto, o estudo da microbiota presente em abscesso de sola e em dermatite digital, bem como a determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas, irá proporcionar suporte científico para a clínica, incluindo diagnóstico e orientação terapêutica adequada, minimizando a seleção de amostras resistentes que podem estar contribuindo para as recidivas. Importante ressaltar que a técnica da PCR poderá ser um valioso método de diagnóstico da dermatite digital, metodologia que ainda não é utilizada no Brasil.

V - OBJETIVOS

Geral:

Estudar a microbiota prevalente em abscesso de sola, determinando o perfil de sua suscetibilidade a antimicrobianos, e os espiroquetas presentes em dermatite digital em bovinos de Minas Gerais

Específicos:

1. Isolar e identificar as bactérias presentes em abscessos de sola por métodos morfológicos e bioquímicos convencionais.
2. Determinar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras bacterianas isoladas de abscessos de sola e pesquisa de β -lactamase.
3. Isolar espiroquetas em lesões de dermatite digital e identificá-las por exame direto de biópsias e pela PCR, utilizando iniciadores para o gene 16S rDNA.

VI - MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizadas neste estudo nove vacas leiteiras acometidas por abscesso de sola procedentes de três fazendas dos municípios mineiros de Esmeraldas, Serra do Cipó e João Monlevade, sendo uma vaca da raça holandesa, três vacas mestiças Jersey e Holandesa e cinco vacas Jersey PO (puras de origem). Destes animais as coletas foram realizadas em 18/12/2003 na 1ª fazenda, 27/04/2005 na 2ª fazenda e 31/08/2005 na 3ª fazenda. Para cada uma das propriedades citadas, foram obtidas informações sobre o manejo dos animais, as condições ambientais e características do rebanho. Tais informações foram fornecidas pelos veterinários responsáveis.

A fazenda 1 tinha um rebanho formado por 100 vacas em lactação, todas da mesma raça, alojadas em sistema intensivo “free stall”, sendo que uma delas, holandesa preto e branco com cinco anos de idade e que tinha duas crias, estava acometida por abscesso de sola. A higiene nos estábulos era inadequada, com a retirada da matéria orgânica feita por raspagem. O piso, de cimento abrasivo, era lavado uma vez por semana e o dimensionamento dos frisos e das canaletas não proporcionavam boa drenagem, contribuindo para o acúmulo de fezes e urina. Naquela fazenda, as enfermidades digitais ocorrem durante todo o ano, com registro de que 10% dos animais eram acometidos e, destes, 4% foram descartados e 30% estavam acometidos por mastites. Como medida preventiva, os animais eram casqueados uma vez ao ano, no período seco das vacas, e o pedilúvio usado diariamente. As visitas do veterinário ocorriam semanalmente. A dieta dos animais feita com silagem de milho, feno de *tifton*, concentrado preparado (à base de milho, farelo de soja, sal mineral, polpa cítrica e caroço de algodão) na própria fazenda.

Na fazenda 2 havia duas vacas, da raça Jersey PO, acometidas por abscesso de sola. Uma delas tinha duas lesões, sendo que uma das lesões já havia recebido tratamento, sem que houvesse cura. A outra vaca havia recebido tratamento e também não se obteve cura. Nesta mesma fazenda havia um rebanho de 30 vacas em lactação, da raça Jersey PO, sendo que 30% daqueles animais foram

acometidos por afecções podais ocorridas durante todo o ano. Dos animais doentes, 15% foram descartadas. A limpeza dos estábulos era feita pela raspagem da matéria orgânica (fezes e urina) e pela lavagem diária. O piso era de cimento não abrasivo, mas as estradas pelas quais os animais eram conduzidos até os piquetes tinham muitos pedregulhos, o que poderia causar lesões nos cascos. Em 50% das vacas de primeira cria, aparecia lesão no espaço interdigital. Como medida preventiva, os animais eram casqueados uma vez por ano, no período seco das vacas, e o pedilúvio era usado duas vezes por mês. A dieta fornecida para as vacas em lactação era balanceada e consistia de volumoso, concentrado e sais minerais. A visita do veterinário ocorria uma vez por mês.

Na fazenda 3 havia seis vacas acometidas por abscesso de sola, sendo três mestiças, Jersey e holandesa, e três Jersey PO. Uma delas Jersey PO tinha lesão nos cascos dos dois membros pélvicos, a outra vaca mestiça havia recebido tratamento no casco de um dos membros pélvicos e não houve cura. Também as três vacas Jersey PO já haviam sido tratadas sem apresentarem cura. Os tratamentos não foram conduzidos conforme prescrição feita pelo veterinário responsável. Na mesma fazenda havia um rebanho de 100 vacas em lactação, mestiças, Jersey e holandesa, e Jersey PO. As afecções podais ocorriam durante todo o ano e era o maior problema na propriedade; 20% dos animais foram acometidos e destes 50% foram descartados. Os animais eram estabulados em sistema semi-intensivo, o piso dos estábulos era de cimento não abrasivo, mas os caminhos para a sala de ordenha eram irregulares. As condições de higiene eram péssimas, nos estábulos a limpeza se fazia apenas raspando a matéria orgânica, o piso era úmido e irregular, desfavoráveis aos animais. O casqueamento não era usado como medida de prevenção, mas sim como medida curativa. O pedilúvio era usado duas vezes por mês. A dieta fornecida às vacas em lactação era balanceada e consistia de volumoso, concentrado e sais minerais. A visita do veterinário ocorria uma vez por mês.

Também foram utilizadas neste estudo oito vacas de aptidão leiteira, todas acometidas por dermatite digital, procedentes da fazenda 1, do município de Esmeraldas, e fazenda 4, do município de Caeté.

Da fazenda 1 foi feita a colheita do material clínico em dois animais acometidos por dermatite digital, sendo uma novilha mestiça da raça holandesa e Gir, com 22 meses de idade, primípara, que apresentava lesão tipo proliferativa. A outra vaca, da raça holandesa, apresentava lesão tipo ulcerativa.

A fazenda 4 tinha um rebanho de 190 animais, com 48 vacas em lactação, das raças holandesa PO, Jersey PO e mestiça Girolando. As novilhas eram mantidas no pasto e as vacas, depois do parto, eram estabuladas em sistema intensivo “free-stall”, durante toda a lactação, e recebiam no cocho forragem e ração balanceada. O piso dos estábulos era de cimento não abrasivo. As condições de higiene eram ruins: nos estábulos a limpeza se fazia apenas raspando-se a matéria orgânica, o piso era úmido. O veterinário informou que, 20 dias depois de serem os animais estabulados, apareciam as lesões de dermatite digital. As primíparas eram as mais acometidas. No rebanho havia 15 vacas acometidas por dermatite digital.

Foi feita a coleta dos espécimes clínicos de seis vacas com dermatite digital:

- Vaca da raça holandesa PO, com três anos e uma cria, apresentava lesão com 30 dias (ulcerativa) e já havia recebido tratamento tópico com terramicina e bandagem, sem cura. Estava acometida de metrite;
- Vaca da raça holandesa PO com quatro anos e duas crias, tinha lesão há 30 dias (ulcerativa) e recebeu só um curativo;
- vaca da raça holandesa PC, de seis anos de idade e quatro crias, tinha lesão de dermatite digital há 90 dias (proliferativa);
- vaca da raça holandesa PC, com idade de oito anos e quatro crias, lesão de dermatite digital há 90 dias (proliferativa);
- vaca Jersey PO, com idade de dez anos e quatro crias, com lesão de dermatite digital havia 30 dias (ulcerativa) em forma de morango. Não recebeu tratamento;
- vaca Jersey PO, com idade de seis anos e três crias, a lesão tinha 30 dias (ulcerativa). de acordo com descrição de SOUZA,(2005).

2. Coleta dos espécimes

2.1. Coleta dos espécimes de abscesso de sola

Os animais identificados com abscesso de sola, após inspeção individual dos membros, foram conduzidos para o tronco de casqueamento para ser feita a coleta do espécime clínico. O casco de cada animal foi lavado com água e auxílio de uma escova e feito anti-sepsia com solução Iodex (*Pfizer*). Em seguida, foi feita curetagem das áreas escuras na sola do casco, pesquisando-se, com o uso de rineta, a presença de abscessos. Encontrado abscesso, a secreção era retirada com zaragatoa estéril. Cada espécime coletado foi transferido para frasco contendo 2 ml de meio de transporte anaeróbio (solução de *Ringer*, pré-reduzida – PRAS) (SUTTER et al., 1995), sob fluxo de CO₂, para condução ao laboratório.

2.2 Coleta de espécime clínico de dermatite digital

Da fazenda 1 foi realizada a coleta do material clínico em dois animais acometidos por dermatite digital, sendo uma novilha mestiça da raça holandesa e Gir e uma vaca da raça holandesa. Da fazenda 4 foi feita a coleta dos espécimes clínicos de seis vacas acometidas de dermatite digital: duas da raça holandesa PO, duas da raça holandesa PC e duas vacas Jersey PO.

A fim de se proceder à biópsia, a lesão foi rigorosamente lavada com jato de água e escova para remover a matéria orgânica. O membro de cada animal foi anestesiado com 5 ml de lidocaína, via sub-cutânea, em área próxima ao sítio lesado. Foi feita biópsia de 6 mm da área ulcerativa ou proliferativa da lesão. O material foi colocado em frasco contendo 2 ml de meio de transporte anaeróbio (pré-reduzido, peptona, levedura e glicose – PRAS – PYG) sob fluxo de CO₂, e conduzido ao laboratório. Seu processamento foi feito até seis horas após a colheita.

3. Isolamento e identificação de bactérias de lesões de abscesso de sola por método bioquímico-fisiológico

3.1 Microrganismos anaeróbios obrigatórios

Os espécimes coletados no meio de transporte (PRAS) foram processados em câmara anaeróbica (Model 1025, Forma Scientific), com atmosfera de 85% de nitrogênio, 10% de hidrogênio e 5% de gás carbônico. Depois de homogeneizados, para maior dispersão, foram diluídos seriadamente (10^{-1} a 10^{-7}) em solução de Ringer PRAS. Para isolamento de bactérias anaeróbias estritas, alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram plaqueadas em ágar Brucella (VETEC Química fina Ltda); ágar de soja tripticaseína (TSA) (Acumedia); *Phenylethyl alcohol agar* (PEA, BBL). Todos os meios de cultura foram suplementados com 5% de sangue de carneiro, hemina (5mg/ml), menadiona (10 mg/ml) e 0,5% de extrato de levedura. Foram também utilizados o meio Omata-Disraeli e Ágar Bacteróides–Bile-Esculina – BBE (LIVINGSTON et al., 1978). Em seguida, as placas foram incubadas na câmara de anaerobiose a 37°C, por 72 horas.

De cada espécime foi preparado um esfregaço em lâmina para coloração pelo método de Gram, visando à observação direta dos tipos morfotintoriais.

Após o período de incubação, processou-se a contagem do número de colônias isoladas por placa e sua identificação preliminar, com base em características morfocoloniais e morfotintoriais. Em seguida, cinco colônias de cada morfotipo, isoladas das placas contendo de 30 a 300 colônias, foram repicadas em ágar sangue suplementado, com incubação em condições de anaerobiose, a 37°C, por 72 horas, para obtenção de culturas puras.

As amostras foram identificadas com base nas características coloniais, morfotintoriais e o teste respiratório, pela incubação, em meio de ágar sangue, em condições de aerobiose, microaerofilia (método da vela) e anaerobiose (método mecânico câmara de anaerobiose). Foi considerado anaeróbio estrito aquele isolado que cresceu somente em condições de anaerobiose. de acordo com EDELSTINE,

1990. A identificação no nível de espécie não foi realizada devido à contaminação por fungos na câmara de anaerobiose e conseqüente perda das amostras.

3.2 Microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos

Para recuperação de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos, os espécimes foram diluídos como descrito anteriormente e, em capela de fluxo laminar, foram semeados em ágar sangue e em ágar eosina-azul-de-metileno (Agar EMB, Difco). Em seguida, foram incubados em estufa bacteriológica, a 37°C, por 24 a 48 horas. De cada espécime foi preparado esfregaço em lâmina para coloração pelo Gram, visando observação dos tipos morfotintoriais. A identificação presuntiva foi baseada nos aspectos das colônias em ágar sangue e em ágar EMB e nas características morfotintoriais, conforme FINEGOLD. (1990), KRIEG. (1994) e KONEMAN et al.(2001). Os microrganismos recuperados foram submetidos a testes bioquímicos com utilização de *kits* para Enterobactéria API – 20E (Biomerieux), para os bastonetes Gram-positivo API Coryne (Biomerieux) e coloração de Albert Layborn.

As amostras isoladas foram mantidas em ágar sangue durante a realização das provas, e criopreservadas em freezer a –86°C, no caso dos anaeróbios estritos, e a –20°C para os anaeróbios facultativos.

4- Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

Os testes de suscetibilidade foram realizados pelo método de diluição em ágar conforme recomendado pelo CLSI (*The National Committee for Clinical Laboratory Standards Institute*). Os aeróbios e os anaeróbios facultativos foram cultivados em ágar Mueller Hinton (Acumedia) e incubados a 35°C, de 16 a 20 horas.

A padronização do inóculo foi realizada utilizando-se de 3 a 5 colônias do mesmo tipo morfológico, semeadas em ágar TSA e incubadas a 37°C, de 2 a 6 horas, para as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas. A densidade da suspensão foi ajustada (utilizando-se solução de salina estéril 0,85%) para cerca de 10⁸ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml), comparando-se sua turvação com o

padrão 0,5 da escala de MacFarland, para obtenção de concentração final de 10^5 UFC por ponto.

De acordo com lista sugerida pelo CLSI, baseando-se na literatura (FAJT et al.,2001; SOUZA 2005) e em comunicação pessoal com veterinários, foram utilizados os seguintes antimicrobianos: Penicilina G em sua forma comercial (CEME), Ampicilina/sulbactam (Pfizer), Tetraciclina (SIGMA Chemical Co.) e Metronidazol (SIGMA Chemical Co.). As soluções estoque dos antimicrobianos foram esterilizadas por filtração (membrana $0,22\mu\text{m}$) e mantidas, por até 90 dias, a -20°C . Concentrações crescentes (de $0,0625\mu\text{g/ml}$ a $256,00\mu\text{g/ml}$) de cada droga, a partir de soluções estoque, foram adicionadas a 40 ml de ágar Mueller-Hinton e posteriormente distribuídos em placas de Petri. Utilizando-se o replicador de Steers (Steers et. al; 1959), os inóculos padronizados (10^5 UFC por ponto) foram adicionados seqüencialmente às placas contendo as drogas, em ordem crescente de concentração. As placas foram incubadas a 37°C , em condições de aerobiose, para os aeróbios e anaeróbios facultativos, por 24 a 48 horas.

Após o período de incubação, foi realizada a leitura dos resultados, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) de cada droga, para cada amostra bacteriana testada. Foi considerada como CIM, a menor concentração de cada antibiótico que inibiu totalmente o crescimento de cada amostra bacteriana testada. O controle de qualidade é de grande importância, no caso das provas de sensibilidade a antimicrobianos, devido ao grande número de variáveis que poderão interferir nos resultados. Foram utilizadas as seguintes amostras bacterianas de referência: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

4-1 Pesquisa de β -lactamase

As amostras bacterianas foram submetidas ao teste de produção de β -lactamase, conforme ELLEN et al.(1999) e MAHON et al.(1995). Foi utilizado o método cromogênico da cefalosporina, que se baseia na detecção visual do produto final da ação hidrolítica da β -lactamase, o qual é demonstrado por uma reação colorimétrica. No procedimento foram utilizados discos de Cefinase (BBL)

impregnados com nitrocefim. Para realização dos testes, discos de nitrocefim foram distribuídos na superfície de uma placa da Petri e umidecidos com água destilada esterilizada. Em seguida, colônias isoladas de cada amostra, obtidas de cultura com 18-24 horas de incubação, foram friccionadas sobre o disco com auxílio de alça esterilizada. Depois de uma hora, os discos foram avaliados quanto à mudança de cor. A reação positiva foi visualizada pela mudança de cor do disco, de amarelo para vermelho. Se nenhuma alteração de cor ocorreu, o teste foi considerado negativo para a produção de β -lactamase. Como controle de qualidade foram utilizadas as amostras de referência *S. aureus* ATCC 29213 (β -lactamase positivo) e *E. coli* ATCC 25922 (β -lactamase positivo).

5- Pesquisa de espiroquetas em lesões de dermatite digital por exame direto

Para verificar a presença de microrganismo espiralado, foi realizado exame direto do material de biópsia da lesão de dermatite digital (em solução PRAS-PYG), a partir de esfregaço corado pela técnica do Gram, segundo metodologia descrita por BLOWEY e SHARP (1988) e pela técnica de microscopia de campo escuro (READ et al., 1999).

6 – Isolamento e identificação de espiroquetas de lesões de dermatite digital

Para isolamento de espiroquetas, 0,1 ml de suspensão do material da biópsia, homogeneizado em solução PRAS-PYG, foi inoculado em caldo OTI (meio de enriquecimento e seletivo para isolamento de *Treponema* oral, contendo rifampin 1 μ g/ml e enrofloxacin 5 μ g/ml). Também foram feitas sementeiras em meio de ELLINGHAUSEN & MCCULLOGH, modificado por JOHNSON & HARRIS (EMJH), acrescido de albumina bovina (JOHNSON & FAINE, 1984), que é utilizado para o cultivo de *Leptospira*. Os inóculos foram incubados a 37°C, por cerca de 4 a 8 semanas. Todas as etapas foram executadas em câmara anaeróbica. Quando detectadas espiroquetas pelo exame em microscópico de campo escuro das culturas, outros repiques eram feitos em caldo OTI e em meio EMJH.

7- Extração de DNA total de cultura bacteriana

Foi utilizado o método descrito por WILSON et al. (1992) para extração total dos ácidos nucléicos. Cada amostra bacteriana foi inoculada em tubos contendo caldo OTI, com incubação a 37°C, durante 4 semanas, em anaerobiose. Após o crescimento, 3,0 ml da cultura foram transferidos para tubos cônicos de centrifugação de polipropileno, com capacidade de 15 ml e centrifugados a 10.000 x g 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 1,0 ml de TE 1:10, pH 8,0 (10mM Tris – 1mM EDTA). A suspensão foi centrifugada a 10.000 x g 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 350µl de tampão TE 1:10 (Tris 10 mM – EDTA 1 mM, pH 8,0). Depois da homogeneização, para a lise das células, foram adicionados 150 µl de solução de lisozima (10 mg/ml) e a mistura foi mantida a 37°C, durante 15 minutos. A ela foram acrescentados 40 µl de SDS a 10%, seguindo-se a homogeneização por inversão do tubo durante um minuto ou até que a suspensão ficasse clara. Em seguida foram adicionados 60 µL de Proteinase K (20 mg/ml). A mistura foi incubada a 60°C, durante 30 minutos. Em seguida foi adicionado acetato de sódio para concentração final de 0,5 M, com incubação por uma hora, a 50°C. O volume da mistura foi completado para 3 ml com tampão STE (NaCl 150 mM, Tris – HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e homogeneizado com igual volume de fenol – clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1), por duas vezes. Após cada etapa, o material foi centrifugado a 6.100g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e transferido para novo recipiente, acrescentando-se RNase para concentração final de 1 mg/ml. Após incubação a 37°C, durante 30 minutos, foi realizada nova etapa de extração com fenol – clorofórmio – álcool isoamílico. O DNA foi precipitado com etanol absoluto por 18 horas, a –20°C e, então, centrifugado por 20 min, a 6.100g, sob refrigeração (4°C), lavado com etanol 70% mantido à temperatura ambiente (20 – 28°C) para secagem. Como etapa final, o DNA foi solubilizado com tampão TE 1:10 (Tris 10mM e EDTA 1mM). A integridade dos DNAs obtidos foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, a 4v/cm, por 4 horas. A concentração e o grau de pureza dos DNAs foram determinados por espectrofotometria (absorbância 260 nm e 280 nm).

8- Detecção de bactérias espiraladas de amostra clinica por PCR (16SrDNA)

Para a detecção de bactérias espiraladas, cerca de 6 mm do material de biópsia de cada animal foram divididos em três partes, as quais foram imersas em 3ml de tampão de lise (500mM Tris, pH 9,0, 20mM EDTA, 10mM NaCl, 1% SDS e 0,5 mg/ml de proteinase K) e incubadas a 60°C, por 16 a 24 horas, em agitador, a fim de que fosse liberado o DNA (BERGMANS et al., 1995). O material foi centrifugado a 2000 x g por 10 minutos e o sobrenadante tratado com fenol – clorofórmio – álcool isoamílico, conforme citado no item anterior. O DNA precipitado foi solubilizado em água e estocado a –20°C (RIJPKEMA et al; 1997).

9- Reação de PCR – 16S rDNA

A reação de PCR foi feita inicialmente utilizando-se o conjunto de iniciadores universais 16S (8F 5'AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG 3' e 907R 5'CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT 3') de acordo com NERCESSIAN et al.(2005) e RIJPKEMA et al. (1997). A reação de amplificação foi realizada em termociclador marca MJ-Research Inc., modelo PTC 100, sendo que cada tubo de reação, com volume final de 25 µL, consistiu de 5µL de tampão de Taq polimerase (Phoneutria), (5X-10mM Tris pH 8,5, 50mM KCl, 0,1% de Triton X-100, 1,75mM MgCl₂), 200µM de cada desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's) (Invitrogen), 1,5U Taq polimerase (Phoneutria), 20 pmoles de cada iniciador e 2µL de DNA molde (50 ng/µL) previamente diluído em água Milli-Q esterilizada. Para diminuir a amplificação inespecífica, foi usado o programa, conforme quadro abaixo (Don et al., 1995).

Componentes da PCR por tubo de reação		
iniciador 8F (senso)	20 picomoles	0,5 µL
Iniciador 907R (anti-senso)	20 picomoles	0,5µL
dNTP's	200 µM	1,0µL
Tampão da Taq DNA polimerase	1X	5,0µL
Taq DNA polimerase	1,5 Unidades	0,4µL
DNA molde	2 µl (50 ng/µL)	
Volume final	25µl	

Ciclo	Desnaturação	Pareamento	Extensão
1	94°C 5' e 1'	64°C 1'	72°C 1,5'
2	94°C 1'	62°C 1"	72°C 1,5'
3	94°C 1'	60°C 1'	72°C 1,5'
4	94°C 1'	58°C 1'	72°C 1,5'
5	94°C 1'	56°C 1'	72°C 1,5'
6*	94°C 1'	54°C 1'	72°C 1,5'
7	Extensão final	4°C infinito	72°C 10'

*25 ciclos nesta condição

Foram incluídos controles negativos (tubos contendo a mistura dos reagentes usados para a PCR sem DNA molde). O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, em Tampão TAE 1x (4 mM Tris acetato; 1mM EDTA), a 5V/cm, corado pela prata.

10. Seqüenciamento

Para a confirmação dos resultados obtidos na PCR com os DNAs das amostras 7A e 8A, isoladas de lesões de dermatite digital de duas vacas leiteiras da **fazenda 1**, os produtos amplificados foram purificados e posteriormente seqüenciados segundo o método originalmente descrito por SANGER *et al.*, (1977).

Inicialmente foi feita a purificação dos produtos amplificados usando o Kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (AMERSHAM BIOSCIENCES) conforme instruções do fabricante. O produto purificado foi seqüenciado em ambas as direções (senso e anti-senso), no mínimo duas vezes, empregando-se os mesmos iniciadores utilizados para a amplificação pela PCR. Os seqüenciamentos foram feitos no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em dias diferentes com produtos purificados em diferentes dias. Foram utilizados nos seqüenciamentos os reagentes do Kit “DyEnamic™ ET Dye Terminator” a corrida foi feita em seqüenciador automático capilar Mega BACE 1000™ (AMERSHAM BIOSCIENCES) Sequencing System .

As seqüências nucleotídicas dos diferentes seqüenciamentos foram analisadas no programa BLASTn (pacote BLAST 2.0 - BASIC ALIGNMENT SEARCH TOOL), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para a busca de similaridade entre as seqüências obtidas e aquelas constantes no “*GenBank*”.

Os eletroferogramas obtidos dos seqüenciamentos foram analisados no programa PHRED (<http://adenina.biomol.unb.br/phph/index.html>) (EWING *et al.*, 1998; EWING & GREEN, 1998) para a verificação da qualidade das bases e formação da seqüência consenso de cada fragmento. Assim, somente as bases de alta confiabilidade, repetidas nos diferentes seqüenciamentos foram utilizadas para a montagem da fita consenso final através do programa CAP3 (<http://genome.cs.mtu.edu> - *Sequence Analysis Server* – HUANG & MADAN. 1999) e PHRED.

Para o alinhamento das seqüências consenso das amostras seqüenciadas foram utilizados os programas MultAlign (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) e CLUSTALW software package (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Para a construção da árvore filogenética foi usado o programa MEGA Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 4 (<http://www.megasoftware.net/>) (TAMURA *et al.*, 2007). O nível de reprodutibilidade foi garantido pela análise de “Bootstrap” de 1000 repetições.

VII- Resultados

1- Abscesso de sola

Do material coletado dos nove abscessos de sola, foram recuperadas 133 amostras bacterianas, representativas de todos os tipos de colônias crescidas em meio de ágar sangue e nos meios seletivos. Todas as amostras foram analisadas preliminarmente quanto às características morfocoloniais, morfotintoriais e teste respiratório. A Tabela 1 registra a distribuição das amostras de bactérias recuperadas segundo tipo morfológico e respiratório e a procedência do animal.

Das 133 amostras bacterianas recuperadas de lesões dos animais das fazendas, 107 foram caracterizadas como anaeróbias facultativas e corresponderam a 80,5% do total de amostras isoladas. Como anaeróbias obrigatórias, foram recuperadas 26 amostras que corresponderam a 19,5% das isoladas das três fazendas. Em relação aos tipos morfológicos, os bacilos Gram-negativo predominaram entre os anaeróbios facultativos representados por 84 amostras, que corresponderam a 63,2%. Ainda foram isolados 20 amostras de bacilos Gram-positivo e três amostras de cocos Gram-positivo anaeróbios facultativos.

No grupo dos anaeróbios obrigatórios, houve o predomínio de cocobacilos Gram-negativo produtores de pigmento negro, com 25 amostras, que não foram identificadas e corresponderam a 18,8% dos isolados. Também foi isolada uma amostra de bacilo Gram-negativo. Analisando cada fazenda, pode-se observar que na fazenda 1 só foram recuperadas amostras de bactérias anaeróbias facultativas: nove amostras de bacilos Gram-positivo e sete de bacilos Gram-negativo, num total de 16 amostras.

Da fazenda 2 foram recuperadas 36 amostras, sendo 18 anaeróbios facultativos com predominância de bacilos Gram-negativo, com 16 amostras, seguido por cocos Gram-positivo, com duas amostras. Também foram isoladas 18 amostras de cocobacilos Gram-negativo anaeróbios obrigatórios e produtores de pigmento negro.

Dos animais da fazenda 3 foram isoladas 81 amostras bacterianas, sendo 73 de anaeróbios facultativos, com predomínio de bacilos Gram-negativo (61 amostras), vindo em seguida os bacilos Gram-positivo, com 11 amostras, e uma amostra de coco Gram-positivo. Dos anaeróbios obrigatórios foram isoladas oito amostras, sendo sete de coco bacilos Gram-negativo produtores de pigmento negro e uma de bacilo Gram-negativo.

Tabela 1 – Número de bactérias recuperadas de abscessos de sola de nove vacas com aptidão leiteira provenientes de três fazendas em Minas Gerais, segundo tipo morfológico e respiratório.

Tipo morfológico	Nº Anaeróbios facultativos (%)				Nº Anaeróbios obrigatórios (%)				Total (%)
	F1	F2	F3	Total	F1	F2	F3	Total	
Cocobacilo Gram-negativo	—	—	—	—	—	18	07	25	25(18,8)
Bacilo Gram negativo	07	16	61	84 (63,2)	—	—	01	01	85 (63,9)
Bacilo Gram-positivo	09	—	11	20 (15,0)	—	—	—	—	20 (15,0)
Coco Gram-positivo	—	02	01	03 (2,3)	—	—	—	—	03 (2,3)
TOTAL	16	18	73	107 (80,5)	—	18	8	26 (19,5)	133

Com base em características morfocoloniais, morfotintoriais, teste respiratório e testes bioquímico-fisiológicos foi possível a identificação, por gênero ou por espécie, de 108 amostras bacterianas obtidas de nove vacas acometidas por abscesso de sola. A Tabela 2 mostra a distribuição de 108 amostras bacterianas por fazenda, agrupadas por animal. Na fazenda 1 foram identificadas amostras recuperadas de um espécime clínico colhido de uma vaca da raça holandesa acometida por abscesso de sola onde foram predominantes: *Corynebacterium aquaticum*, entre os bacilos Gram-positivo (quatro amostras), seguida por *Corynebacterium minutissimum* (uma amostra), *Brevibacterium* spp (duas amostras) e *Listeria grayi* (duas amostras). Entre os bacilos Gram-negativo foram identificadas: *Salmonella arizonae*, com três amostras, *Salmonella* spp, com uma amostra, e *Citrobacter freundii*, com duas amostras da família *Enterobacteriaceae*, seguida por uma amostra de *Aeromonas sobria*, também bacilo Gram-negativo. Todas as amostras identificadas são anaeróbias facultativas, totalizando 16 amostras, com predominância de bacilos Gram-positivo.

A tabela 2 também registra a distribuição das amostras identificadas de duas vacas da raça Jersey PO, procedentes da fazenda 2. Ambas as vacas possuíam dois tipos de lesões, por isso foi feita a colheita de dois espécimes clínicos de cada lesão. Em continuidade, as vacas desta fazenda receberam os números 2 e 3 neste estudo. Da vaca 2 foram isoladas 11 amostras bacterianas, sendo observado o predomínio de anaeróbios facultativos. *Escherichia coli* foi a espécie predominante, com dez amostras, seguida pela *Klebsiella pneumoniae*, com uma amostra. Da vaca 3 foram identificadas sete amostras de anaeróbios facultativos, sendo cinco da família *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli* (três amostras), *Proteus vulgaris*, (duas amostras) e cocos Gram-positivo *Enterococcus faecalis*, também duas amostras.

Da fazenda 3, a distribuição das amostras isoladas de seis vacas acometidas por abscesso de sola, sendo três vacas mestiças Jersey e holandesa e três Jersey PO, também estão apresentadas na Tabela 2. As vacas daquela fazenda receberam os números de 4 a 9 neste estudo.

Da vaca 4 foram identificadas 13 amostras, todas anaeróbias facultativas, pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e tendo a *Escherichia coli* como a de maior frequência (nove amostras), seguida por *Klebsiella oxytoca* (duas amostras), *Escherichia fergusonii*, com uma amostra, e *Citrobacter freundii*, com uma amostra.

Da vaca 5 foram identificadas 12 amostras, todas anaeróbias facultativas e também pertencentes à família *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca*, ambas com quatro amostras, *Cromobacter sakazakii* e *Enterobacter cloacae*, com duas amostras cada.

Do material clínico colhido da vaca 6, foram identificadas 19 amostras bacterianas. Predominaram os anaeróbios facultativos, sendo o gênero *Bacillus spp* o mais freqüente, com dez amostras, seguido por uma amostra de *Listeria grayi*. Também foram identificadas da família *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella oxytoca* (cinco amostras), *Escherichia coli* (duas amostras) e *Enterobacter cloacae* (uma amostra).

Foram identificadas 13 amostras bacterianas da vaca 7, sendo predominantes os anaeróbios facultativos da família *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli* (oito amostras); *Enterobacter agglomerans* (duas amostras) e *Klebsiella oxytoca* (uma amostra). Também foram identificados cocos Gram-positivo, *Enterococcus faecalis* (uma amostra), e uma amostra de anaeróbio obrigatório, o *Fusobacterium* sp .

Da vaca 8 foram identificadas dez amostras de bactérias, com predominância de *Enterobacter cloacae*, com cinco amostras. Em seguida, *Klebsiella oxytoca*, com duas amostras, *Serratia liquefaciens*, com duas amostras, e *Klebsiella pneumoniae*, com uma amostra. Todas anaeróbias facultativas e pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

Foram identificadas 7 amostras de bactérias provenientes da vaca 9, todas anaeróbias facultativas: *Aeromonas sobria*, com duas amostras, e as da família *Enterobacteriaceae* – *Escherichia coli*, com duas amostras, *Enterobacter cloacae*, *Cromobacter sakazakii* e *Salmonella spp*, com uma amostra cada.

TABELA 2– Amostras bacterianas identificadas de abscessos de sola de 9 vacas de aptidão leiteira das 3 fazendas em Minas Gerais.

Gênero/espécie	Fazenda 1	Fazenda 2		Fazenda 3							T	(%)
	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9			
<i>Fusobacterium sp</i>							01				1	
Anaeróbios obrigatórios							01					
<i>Citrobacter freundii</i>	02			01							3	2,77
<i>Enterobacter agglomerans</i>							02				2	1,86
<i>Enterobacter cloacae</i>					02	01		05	01		9	8,3
<i>Cromobacter sakazakii</i>					02				01		3	2,7
<i>Escherichia coli</i>		10	03	09	04	02	08			02	38	35,2
<i>E.fergusoni</i>				01							1	0,93
<i>Klebsiella oxytoca</i>				02	04	05	01	02			14	12,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		01						01			2	1,86
<i>Proteus vulgaris</i>			02								2	1,86
<i>Salmonella arizonae</i>	03										3	2,7
<i>Salmonella spp</i>	01								01		2	1,86
<i>Serratia liquefaciens</i>								02			2	1,86
Total Enterobacteriaceae	06	11	05	13	12	08	11	10	05	81	75,0	
Outros												
<i>Aeromonas sobria</i>	01								02		3	2,7
<i>Bacillus spp</i>						10					10	9,2
<i>Brevibacterium spp</i>	02										2	1,86
<i>C.aquaticum</i>	04										4	3,7
<i>C.minutissimum</i>	01										1	0,93
<i>Listeria grayi</i>	02					01					3	2,7
<i>Enterococcus faecalis</i>			02				01				3	2,7
Anaeróbios facultativos	16	11	07	13	12	19	12	10	07	107	99,0	
Total geral das 3 fazendas	16	11	07	13	12	19	13	10	07	108		

Fazendo uma análise geral da tabela 4, verifica-se que, das 108 amostras identificadas, de todas as nove vacas, foram predominantes os anaeróbios facultativos, representados por 107 amostras (99%), sendo que, da vaca 1, predominaram os bacilos Gram-positivos dos gêneros *Corynebacterium*, com cinco amostras, e *Listeria*, com duas amostras. Da vaca 6, o gênero *Bacillus* foi o mais prevalente, com dez amostras (9,2%). Entre as *Enterobacteriaceae*, *E coli*, com 38 amostras (35%), foi identificada como amostra predominante nas vacas 2, 3, 4,5, e 7, mas também foram identificadas nas vacas 6 e 9, com duas amostras cada; *klebsiella oxytoca* foi identificada nas amostras clínicas das vacas 4,5,6,7,e 8; correspondendo a 12,10% dos identificados. *Enterobacter cloacae*, com 8,3%, foi identificada nas vacas 5, 6, 8 e 9; *Cromobacter sakazaki* foi identificada nas vacas 5 e 9; *Citrobacer freundii* foi identificada nas vacas 1 e 4; *k. pnemoniae* só foi identificada nas vacas 2 e 8; *Salmonella spp* e *Aeromonas sobria* só foram identificadas nas vacas 1 e 9. Algumas amostras bacterianas foram recuperadas apenas de um animal: *Enterobacter agglomerans* (vaca 7), *E. fergusonii* (vaca 4), *Proteus vulgaris* (vaca 3) e *Salmonella arizonae* (vaca 1). Quanto aos bacilos Gram-positivo, o gênero *Bacillus* só foi identificado na vaca 6; *Listeria grayi* foi identificada nas vacas 1 e 6 e as amostras de *Corynebacterium aquaticum* e *Corynebacterium minutissimum* só foram identificadas na vaca 1. Quanto aos cocos Gram-positivo, *Enterococcus faecalis* foi identificado nas vacas 3 e 7.

O quadro 2 mostra os dados obtidos neste trabalho em relação aos animais, ao manejo e aos fatores ambientais de cada fazenda.

QUADRO 2 - Características das vacas de aptidão leiteira, do manejo e do ambiente nas fazendas onde foram coletados espécimes clínicos de abscessos de sola e dermatite digital.

CARACTERÍSTICA	FAZENDA 1	FAZENDA 2	FAZENDA 3	FAZENDA 4
Vacas em lactação	100	30	100	45
Raça	Holandesa PO	Jersey PO	Jersey PO, mestiça Holandesa/Jersey	Holandesa PO, Jersey PO, Girolando
Afecções podais	Freqüentes, todos os tipos	Freqüentes, todos os tipos	Freqüentes, todos os tipos	Freqüentes, todos os tipos
Quando ocorre	Todo o ano	Todo o ano	Todo o ano	Todo o ano
Animais acometidos	10%	30%	20%	33%
Descartes	4% dos acometidos	15% dos acometidos	50% dos acometidos	20% dos acometidos
Sistema de criação	Estabulado, - intensivo, "free stall"	Estabulado, semi-intensivo	Estabulado, semi-intensivo	Estabulado, - intensivo, <i>free stall</i>
Tipo de piso	Cimento abrasivo e não há declínio ideal	Cimento não abrasivo, trilha com pedregulhos e piquetes com pedregulhos.	Cimento não abrasivo, caminho p/sala de ordenha com piso irregular.	Cimento não abrasivo
Limpeza do piso nos estábulo	Raspando matéria orgânica e lavando uma vez por semana	Raspando matéria orgânica e lavando diariamente	Raspando matéria orgânica	Raspando matéria orgânica
Casqueamento	Preventivo duas vezes, período seco e na lactação	Preventivo, uma vez no período seco	Preventivo não é feito, somente o curativo	Preventivo não é feito
Pedilúvio	Diário	Uma vez por mês	Uma vez por mês	Não é usado
Umidade	Presença	Ausência	Presença	Presença
Matéria orgânica	Presença	Ausência	Presença	Presença
Ocorrência de outras enfermidades	30% vacas já tiveram mastite	50% das vacas primíparas aparecem com lesão no espaço interdigital	30% vacas já tiveram mastite	Ocorre metrite, mamite e retenção placentária.
Visita do veterinário	A cada 7 dias	A cada 30 dias	A cada 60 dias	A cada 15 dias

2- Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e produção de β -lactamase

Os resultados dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos para as 67 amostras bacterianas isoladas, a partir da coleta em três fazendas, foram interpretados considerando-se os pontos críticos das drogas testadas conforme recomendação do CLSI (2007). Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 3, 4, 5. Todas as amostras testadas foram resistentes para penicilina G e para o metronidazol.

Os resultados das provas de suscetibilidade aos antimicrobianos das 15 amostras bacterianas isoladas dos animais procedentes da fazenda 2 estão apresentados na Tabela 3. Das 13 amostras de *E. coli* isoladas de animais da Fazenda 2, 12 (92%) apresentaram resistência a ampicilina/sulbactam e a tetraciclina. As faixas de variação das CIMs para os antimicrobianos testados contra as amostras de *E. coli* foram de 16 a 256 $\mu\text{g/ml}$ para ampicilina/sulbactam, de 8 a >256 $\mu\text{g/ml}$ para tetraciclina e de >256 $\mu\text{g/ml}$ para penicilina G e para o metronidazol. As duas amostras de *E. faecalis* procedentes do animal 3 foram sensíveis a ampicilina/sulbactam e resistentes a tetraciclina.

TABELA 3 – Suscetibilidade a antimicrobianos de 15 amostras de anaeróbios facultativos recuperados de abscessos de sola de duas vacas leiteiras da Fazenda 2 e de duas amostras de referência (CIM em µg/ml), teste da β lactamase.

Nº-Amostra	Espécie	Animal	AP	TT	PN	ME	β lactamase
1	<i>E. coli</i>	2	R	R	R	R	+
2	<i>E. coli</i>	3	R	R	R	R	+
3	<i>E. coli</i>	2	R	R	R	R	+
4	<i>E. coli</i>	2	R	R	R	R	+
5	<i>E. coli</i>	2	R	R	R	R	+
6	<i>E. coli</i>	2	R	R	R	R	+
7	<i>E. coli</i>	2	R	R	R	R	+
8	<i>E. coli</i>	2	R	S	R	R	+
9	<i>E. coli</i>	2	S	R	R	R	+
10	<i>E. coli</i>	2	R	R	R	R	+
11	<i>E. coli</i>	3	R	R	R	R	+
12	<i>E. coli</i>	2	R	R	R	R	+
13	<i>E. coli</i>	3	R	R	R	R	+
14	<i>E. faecalis</i>	3	S	R	R	R	–
15	<i>E. faecalis</i>	3	S	R	R	R	–
ATCC 2913	<i>S. aureus</i>	–	S	S	R	R	+
ATCC25373	<i>E. coli</i>	–	S	R	R	R	+

AP=ampicilina/sulbactam; TT=tetraciclina; P= penicilina; ME= metronidazol

R= resistente S= sensível

A tabela 4 registra a suscetibilidade a antimicrobianos de 25 amostras de *E. coli* recuperadas de abscessos de sola de cinco bovinos leiteiros da Fazenda 3 e de duas amostras de referência (CIM em µg/ml). Todas as amostras foram resistentes a penicilina e a metronidazol. Em relação à ampicilina/sulbactam, 22 amostras apresentaram-se sensíveis; 17 amostras foram também sensíveis a tetraciclina.

Das nove amostras de *E. coli*, isoladas da vaca 4, oito mostraram-se sensíveis a ampicilina/sulbactam; em relação a tetraciclina, três amostras foram caracterizadas como sensíveis e seis amostras mostraram-se resistentes. As faixas de variação das CIMs para os antimicrobianos testados contra as amostras de *E. coli* isoladas da vaca 4 foram de 1,0 a 64,0 µg/ml, para ampicilina/sulbactam, e de 2 a >256 µg/ml para tetraciclina.

Todas as quatro amostras de *E. coli* isoladas da vaca 5 mostraram-se sensíveis a ampicilina /sulbactam e resistentes a tetraciclina. As faixas de variação das CIMs foram de 4,0 a 16,0 µg/ml para ampicilina /sulbactam e de 128 a 256 µg/ml para tetraciclina.

As duas amostras de *E. coli* isoladas da vaca 6 foram sensíveis para ampicilina/sulbactam e para tetraciclina, sendo que a variação das CIMs foram de 8,0 µg/ml para ampicilina/sulbactam e de 2,0 a 4,0 µg/ml para tetraciclina.

Das 8 amostras isoladas da vaca 7, seis foram sensíveis a ampicilina/sulbactam e quatro foram sensíveis a tetraciclina, apresentando variação da CIM 4,0 a 32,0 µg/ml para ampicilina/sulbactam e de 2,0 a 256,0 µg/ml para tetraciclina.

Da vaca 9 foram isoladas duas amostras de *E. coli*, que se mostraram sensíveis a ampicilina/sulbactam e a tetraciclina, com CIM de 8,0 a 16,0 µg/ml para ampicilina/sulbactam e de 4,0 µg/ml para tetraciclina.

TABELA 4 – Suscetibilidade a antimicrobianos de 25 amostras de anaeróbios facultativos recuperados de abscessos de sola de seis vacas leiteiras da Fazenda 3 e de 2 amostras de referência (CIM em µg/ml), teste da β lactamase.

Nº- Amostra	Espécie	Animal	AP	TT	PN	ME	β lactamase
1	<i>E. coli</i>	4	S	S	R	R	+
2	<i>E. coli</i>	4	S	R	R	R	+
3	<i>E. coli</i>	4	R	R	R	R	+
4	<i>E. coli</i>	4	S	S	R	R	+
5	<i>E. coli</i>	4	S	R	R	R	+
6	<i>E. coli</i>	4	S	R	R	R	+
7	<i>E. coli</i>	4	S	S	R	R	+
8	<i>E. coli</i>	4	S	R	R	R	+
9	<i>E. coli</i>	4	S	R	R	R	+
10	<i>E. coli</i>	5	S	R	R	R	+
11	<i>E. coli</i>	5	S	R	R	R	+
12	<i>E. coli</i>	5	S	R	R	R	+
13	<i>E. coli</i>	5	S	R	R	R	+
14	<i>E. coli</i>	6	S	S	R	R	+
15	<i>E. coli</i>	6	S	S	R	R	+
16	<i>E. coli</i>	7	R	S	R	R	+
17	<i>E. coli</i>	7	S	R	R	R	+
18	<i>E. coli</i>	7	S	R	R	R	+
19	<i>E. coli</i>	7	S	R	R	R	+
20	<i>E. coli</i>	7	S	S	R	R	+
21	<i>E. coli</i>	7	S	R	R	R	+
22	<i>E. coli</i>	7	S	S	R	R	+
23	<i>E. coli</i>	7	R	S	R	R	+
24	<i>E. coli</i>	9	S	S	R	R	+
25	<i>E. coli</i>	9	S	S	R	R	+
ATCC 2913	<i>S.aureus</i>	–	S	S	R	R	+
ATCC25373	<i>E. coli</i>	–	S	S	R	R	+

AP=ampicilina/sulbactan; TT=tetraciclina; P= penicilina; ME= metronidazol

R= resistente S= sensível

A tabela 5 registra a suscetibilidade a antimicrobianos de 27 amostras bacterianas recuperadas de abscessos de sola de seis vacas leiteiras da fazenda 3. Todas as amostras testadas apresentaram também resistência a penicilina e a metronidazol. Das 14 amostras de *K. oxytoca* avaliadas, seis apresentaram resistência a ampicilina/sulbactam e três a tetraciclina. Das nove amostras de *E. cloacae*, sete foram sensíveis à tetraciclina e somente uma amostra foi sensível a ampicilina/sulbactam. Das três amostras de *Cromobacter sakazakii* duas foram resistentes a ampicilina/sulbactam e as três sensíveis a tetraciclina. A amostra de *E. faecalis* foi sensível a ampicilina/sulbactam e resistente a tetraciclina.

Das duas amostras de *K. oxytoca*, isoladas da vaca 4, uma foi sensível a ampicilina/sulbactam e a tetraciclina, e outra foi resistente às duas drogas, sendo que a variação das CIMs foram de 8,0 a 32 µg/ml para ampicilina /sulbactam e de 8,0 a 128,0 µg/ml para tetraciclina.

Da vaca 5 foram testadas 4 amostras de *K. oxytoca*, sendo que todas foram sensíveis a tetraciclina. Em relação a ampicilina/sulbactam, duas amostras foram sensíveis e duas resistentes, apresentando variação das CIMs de 16,0 a 32,0 µg/ml para ampicilina /sulbactam e de 2, 0 µg/ml para tetraciclina.

As cinco amostras de *K. oxytoca*, isoladas da vaca 6, foram sensíveis a tetraciclina, e a ampicilina/sulbactam quatro delas, sendo que a variação das CIMs foi de 0,24 a 32,0 µg/ml para ampicilina /sulbactam e de 0,5 a 4,0 µg/ml para tetraciclina.

Uma amostra de *K. oxytoca* isolada da vaca 7 foi sensível a tetraciclina e resistente a ampicilina/sulbactam; os valores de CIM foi de 64,0 µg/ml para ampicilina/sulbactam e de 2,0 µg/ml para tetraciclina. As duas amostras de *K. oxytoca* isoladas da vaca 8, uma foi sensível a tetraciclina e a ampicilina/sulbactam. As CIMs foram de 16,0 a 32,0 µg/ml para ampicilina/sulbactam e de 8,0 µg/ml para tetraciclina. A outra amostra foi resistente a ambas as drogas

Também foram testadas 9 amostras de *E. cloacae*. Das 2 amostras isoladas da vaca 5, uma amostra foi sensível para ampicilina/sulbactam e tetraciclina, a outra foi

resistente para as duas drogas. As variação das CIMs foi de 2,0 a 32,0 µg/ml para ampicilina /sulbactam e de 1,0 a 128 µg/ml para tetraciclina.

A única amostra de *E.cloacae*, isolada da vaca 6, mostrou-se resistente a ampicilina/sulbactam e a tetraciclina, apresentando valor de CIM de 64,0 µg/ml ampicilina/sulbactam e 256,0 µg/ml para tetraciclina. Todas as amostras de *E.cloacae* isoladas da vaca 8 foram resistentes para ampicilina/sulbactam (CIM variando de 32,0 a 64,0 µg/ml) e sensíveis para tetraciclina (CIM de 2,0 µg/ml). Também a amostra isolada da vaca 9 apresentou sensibilidade a tetraciclina (CIM de 2,0 µg/ml) e resistência a ampicilina/sulbactam, com valor de CIM de 32,0 µg/ml.

Também foram testadas 3 amostras de *C. sakazakii* sendo que 2 amostras foram isoladas da vaca 5 e 1 da vaca 9. Ambas amostras isoladas da vaca 5 foram resistentes a ampicilina/sulbactam (CIM de 32,0 µg/ml) e sensíveis a tetraciclina (CIM de 1,0 a 2,0 µg/ml). A amostra de *C. sakazakii* isolada da vaca 9 foi sensível a ampicilina/sulbactam (CIM de 16,0 µg/ml) e a tetraciclina (CIM de 4,0 µg/ml).

A amostra de *E. Faecalis*, isolada do animal 7, se mostrou sensível para ampicilina/sulbactam e resistente para tetraciclina; os valores para CIMs foram de 8,0 µg/ml para ampicilina/sulbactam e de 128,0 µg/ml para tetraciclina.

Todas as 67 amostras bacterianas foram também avaliadas quanto a produção de β-lactamase. Os resultados obtidos, apresentados na tabelas 3, 4 e 5, mostram que somente as 3 amostras de *E. faecalis* foram caracterizadas como β-lactamase negativas.

TABELA 5 – Suscetibilidade a antimicrobianos de 27 amostras representativas de anaeróbios facultativos recuperados de abscessos de sola de seis vacas leiteiras da Fazenda 3 (CIM em µg/ml), teste da β lactamase.

Nº-Amostra	Espécie	Animal	AP	TT	PN	ME	β lactamase
1	<i>K. oxytoca</i>	4	S	S	R	R	+
2	<i>K. oxytoca</i>	4	R	R	R	R	+
3	<i>K. oxytoca</i>	5	S	S	R	R	+
4	<i>K. oxytoca</i>	5	R	S	R	R	+
5	<i>K. oxytoca</i>	5	S	S	R	R	+
6	<i>K. oxytoca</i>	5	R	S	R	R	+
7	<i>K. oxytoca</i>	6	S	S	R	R	+
8	<i>K. oxytoca</i>	6	S	S	R	R	+
9	<i>K. oxytoca</i>	6	S	S	R	R	+
10	<i>K. oxytoca</i>	6	S	S	R	R	+
11	<i>K. oxytoca</i>	6	R	R	R	R	+
12	<i>K. oxytoca</i>	7	R	S	R	R	+
13	<i>K. oxytoca</i>	8	R	R	R	R	+
14	<i>K. oxytoca</i>	8	S	S	R	R	+
15	<i>E. cloacae</i>	5	R	R	R	R	+
16	<i>E. cloacae</i>	5	S	S	R	R	+
17	<i>E. cloacae</i>	6	R	R	R	R	+
18	<i>E. cloacae</i>	8	R	S	R	R	+
19	<i>E. cloacae</i>	8	R	S	R	R	+
20	<i>E. cloacae</i>	8	R	S	R	R	+
21	<i>E. cloacae</i>	8	R	S	R	R	+
22	<i>E. cloacae</i>	8	R	S	R	R	+
23	<i>E. cloacae</i>	9	R	S	R	R	+
24	<i>C. sakazakii</i>	5	R	S	R	R	+
25	<i>C. sakazakii</i>	5	R	S	R	R	+
26	<i>C. sakazakii</i>	9	S	S	R	R	+
27	<i>E. faecalis</i>	7	S	R	R	R	-

AP=ampicilina/sulbactan; TT=tetraciclina; P= penicilina; ME= metronidazol

R= resistente S= sensível

Tabela 6. Síntese dos resultados obtidos na determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. de 67 amostras testadas dos 8 animais das 3 fazendas de exploração leiteira.

Amostra	Fazenda	Amp/sulbactam		Tetraciclina		Penicilina		Metronidazol	
		S	R	S	R	S	R	S	R
<i>E.coli</i>	2	1	12	1	12	0	13	0	13
	3	22	3	14	11	0	25	0	25
<i>K.oxytoca</i>	3	8	6	12	2	0	14	0	14
<i>E. cloacae</i>	3	1	8	7	2	0	9	0	9
<i>C.sakazakii</i>	3	0	3	3	0	0	3	0	3
<i>E.faecalis</i>	2	2	0	0	2	0	R	0	2
	3	1	0	0	1	0	R	0	1

R= resistente S= sensível

Fazendo uma análise da tabela 6 podemos verificar que, na fazenda 2 das 13 amostras testadas de *E.coli* 12 foram resistentes para ampicilina /sulbactam e tetraciclina, enquanto que,na fazenda 3 das 25 amostras de *E.coli* testadas 22 foram sensíveis para ampicilina /sulbactam e 14 foram sensíveis para tetraciclina,

Também nesta fazenda em relação as 14 amostras de *K. oxytoca* testadas 8 foram sensíveis para ampicilina /sulbactam 12 foram sensíveis para tetraciclina, das 9 amostras de *E. cloacae* testadas 8 mostraram-se resistentes a ampicilina /sulbactam e 7 foram sensíveis para a tetraciclina , já as 3 amostras de *C. sakazakii* foram resistentes para ampicilina /sulbactam e sensíveis para tetraciclina.

As 3 amostras de *E. faecalis*,1da fazenda 3 e 2 da fazenda 2 testadas, foram sensíveis para ampicilina /sulbactam e resistentes para tetraciclina.

3 - Pesquisa de espiroquetas em lesões de dermatite digital por exame direto e cultivo

Das biópsias feitas dos animais MG7A e MG8A (da fazenda 1) foram realizados exame direto pelo Gram e em microscopia de campo escuro, mas não foram visualizados microrganismos espiralados. O material da biópsia foi inoculado nos meios de OTI e EMJH e, após quatro semanas de incubação em anaerobiose a 37°C, foram visualizados microrganismos espiralados. Realizaram-se vários repiques para se obter um crescimento abundante com a finalidade de extrair DNA.

Da fazenda 4, foram feitas biópsias dos animais 3,4,5,6,7 e 8. De todas as amostras coletadas, com exceção da obtida no animal 6, foram visualizados microrganismos espiralados pelo exame direto por microscopia de campo escuro.

4 - Pesquisa de espiroquetas em lesões de dermatite digital por PCR e seqüenciamento

Nas reações de PCR, realizadas utilizando DNAs extraídos de cultura pura (animais da fazenda 1; MG7A e MG8A) de amostras clínicas (animais da fazenda 4; 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 8), foi amplificado um fragmento de 900 pb. A Figura 1 mostra o perfil eletroforético dos produtos da amplificação pela PCR do DNA extraído das amostras cultivadas e de material clínico de lesões de dermatite digital de vacas leiteiras.

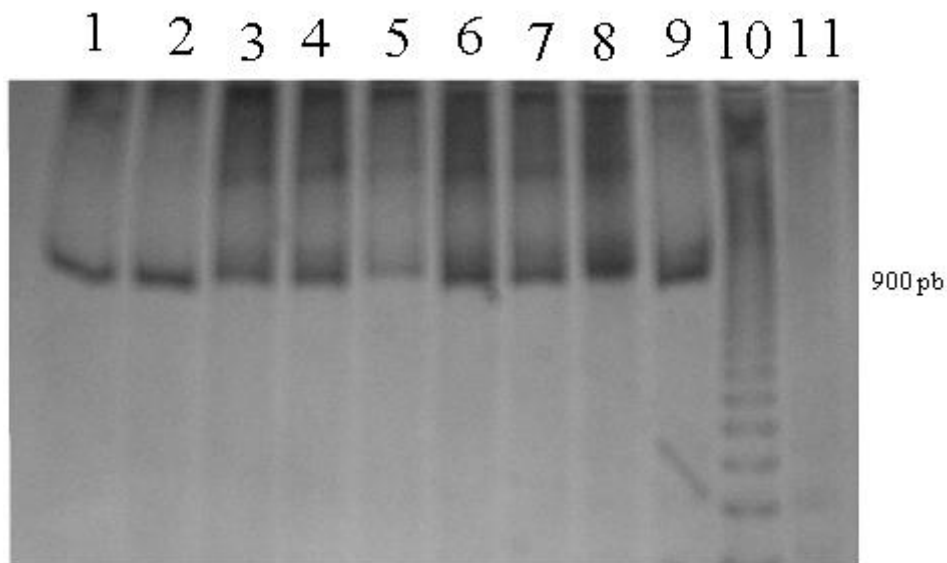


FIGURA 1 – Gel de poliacrilamida 6% mostrando os perfis obtidos pela PCR com o DNA extraído das amostras cultivadas e de biópsias de lesões de dermatite digital de vacas leiteiras. Canaletas 1 e 2, fragmentos amplificados com o DNA extraído de amostras cultivadas, a partir do material clínico coletado de lesões de dermatite digital dos animais MG7A e MG8A, respectivamente; Canaletas 3 a 8, fragmentos amplificados com o DNA extraído diretamente do material de lesões de dermatite digital dos animais, 3, 4, 5, 6, 7, 8; Canaleta 9 controle positivo (DNA de *Leptospira*); Canaleta 10: Padrão de tamanho molecular. 50pb DNA Ladder (INVITROGEN-BRL). Canaleta 11: controle dos reagentes usados na reação PCR.

Para a análise das seqüências nucleotídicas do produto de amplificação das amostras MG7A e MG8A, inicialmente foi avaliada a qualidade dos eletroferogramas pelo programa PHRED, de modo que somente as bases de alta confiabilidade (>30), repetidas em série nos diferentes seqüenciamentos foram selecionadas para a construção da seqüência consenso final. Assim, o programa PHRED/CAP3 gerou uma seqüência consenso final, de 829 pb do seqüenciamento do fragmento de 900pb do produto de PCR purificado para cada uma das amostras.

A busca de similaridade entre as seqüências consenso das amostras MG7A e MG8A foi feita utilizando-se o programa CLUSTAW W, versão 1.6 (THOMPSON *et al.*, 1994). Sendo verificada uma similaridade e identidade de 100% entre elas.

Foi feito também o alinhamento das seqüências consenso das amostras MG7A e MG8A com 13 seqüências disponíveis no “GenBank” usando-se os programas CLUSTAW W e Multialin-Multiple sequence alignment by Florence Corpet Disponível em: <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>. A figura 2 mostra o alinhamento destas amostras. A análise dos dados revelou que os índices de similaridade nucleotídica encontrados entre as amostras isoladas e as do “GenBank” variaram de 68 a 99%. O mais alto valor de similaridade encontrado foi de 99% para as diferentes espécies de microrganismos como mostrado na tabela 8. Os menores índices de similaridade nucleotídica encontrada foram para três espécies de *Treponema*, sendo que este variou de 68 a 75% (tabela 8).

As seqüências de nucleotídeos das amostras MG7A e MG8A e das 13 seqüências do “GenBank” foram utilizadas para a construção da árvore filogenética. Os parâmetros utilizados foram o método de “Neighbor-joining” usando o modelo de substituição de nucleotídeos de Kimura 2 parâmetros implementados no programa Mega versão 4 (TAMURA *et al.*, 2007). O nível de reprodutibilidade da árvore filogenética foi garantido pela análise de “Bootstrap” de 1000 repetições.

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

MG7A - MG8A GACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 Uncultured bacterium-DQ316956 AACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 Uncultured bacterium-EF510326 AACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 Serratia sp. -AM403719 AACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 S.narcescens-RY49885 AACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 Uncultured bacterium-AY700617 AACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 Pseudomonas sp.AM911627 AACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 Bacterium 2-1-D0163941 AACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 P.fluorescens -DQ417330 AACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 S.nematodiphila-EU036987 AACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 Uncultured gamma bacterium AACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 T.denticola-NC-002967 AACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAAATGCTGGGAAA-CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 Treponema pedis-EF061270 GCATGCAGTGCAGCGG---CAGGTAAGAGCTTGCCTTACCTA--GAGTGGCGGACTGGTGGTAAACGCGTAGGTGACTGCCCTGAAATGGGGATAGCTA
 T.phagedenis-EF061266 GCATGCAGTGCAGCGG---CAGGTAAGAGCTTGCCTTACCTA--GAGTGGCGGACTGGTGGTAAACGCGTAGGTGACTGCCCTGAAATGGGGATAGCTA
 Consensus aACGCTGGCGGCagGctTaacaCATGCAGTGCAGCGGTAGCAGCGGGGAGCTTGCCTCCCTGGGTgacGAGCGCGGACgGGTGGTAAATGctcTGGGaaa.CTGCCTgatgagGGGGATAACTA

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260

MG7A - MG8A CTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATA-----ACGTCGCAAGACCRAAGAGG---GGGACCTTCGGGCTCTTGCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA
 Uncultured bacterium-DQ316956 CTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATA-----ACGTCGCAAGACCRAAGAGG---GGGACCTTCGGGCTCTTGCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA
 Uncultured bacterium-EF510326 CTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATA-----ACGTCGCAAGACCRAAGAGG---GGGACCTTCGGGCTCTTGCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA
 Serratia sp. -AM403719 CTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATA-----ACGTCGCAAGACCRAAGAGG---GGGACCTTCGGGCTCTTGCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA
 S.narcescens-RY49885 CTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATA-----ACGTCGCAAGACCRAAGAGG---GGGACCTTCGGGCTCTTGCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA
 Uncultured bacterium-AY700617 CTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATA-----ACGTCGCAAGACCRAAGAGG---GGGACCTTCGGGCTCTTGCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA
 Pseudomonas sp.AM911627 CTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATA-----ACGTCGCAAGACCRAAGAGG---GGGACCTTCGGGCTCTTGCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA
 Bacterium 2-1-D0163941 CTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATA-----ACGTCGCAAGACCRAAGAGG---GGGACCTTCGGGCTCTTGCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA
 P.fluorescens -DQ417330 CTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATA-----ACGTCGCAAGACCRAAGAGG---GGGACCTTCGGGCTCTTGCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA
 S.nematodiphila-EU036987 CTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATA-----ACGTCGCAAGACCRAAGAGG---GGGACCTTCGGGCTCTTGCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA
 Uncultured gamma bacterium CTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATA-----ACGTCGCAAGACCRAAGAGG---GGGACCTTCGGGCTCTTGCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA
 T.denticola-NC-002967 GTAGAAATATTAGTAAATACCGAATGTGCTCATTACATAAAGTAAATGAGAAAGGAG-CTACGG--CTCC-GCTTCAGGATGGGCCCGCTCCCATTA-GCTAGTTGGTAGGTAAGGGCCACCRA
 Treponema pedis-EF061270 GTAGAAATATTAGTAAATACCGAATGTGCTCATTACCGGATAAAGCCGTATAGGAAAGGAG-CTACGG--CTCC-GCTTTAGGATGGGCCCTGCGTCCCATTA-GCTTGTGGTAGGTAACGGCCACCRA
 T.phagedenis-EF061266 CTAGAAATAGGAGGTAATACCGAATACGCTTATACGGATAAAGCCGTATAGGAAAGGAGGCTACGG--CCTT-GCTTAGGATGAGCCCGCTCCCATTAATGCTTGTGGTAGGTAACGGCTTACCRA
 Consensus CTgGAACcgGTAGcTAATACCGcATA.....ACGtcgcAAGAcCRAAGAGG...GGgacCTtCGGgcCTCTtGCcaTcaGATGtGCCagaTgggATTA GCTAGTAgGtGgGTAAtGGCTCACctA

270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390

MG7A-MG8A GGCACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
 Uncultured bacterium-DQ316956 GGCACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
 Uncultured bacterium-EF510326 GGCACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
 Serratia sp. -AM403719 GGCACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
 S.narcescens-RY49885 GGCACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
 Uncultured bacterium-AY700617 GGCACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
 Pseudomonas sp.AM911627 GGCACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
 Bacterium 2-1-D0163941 GGCACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
 P.fluorescens -DQ417330 GGCACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
 S.nematodiphila-EU036987 GGCACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
 Uncultured gamma bacterium GGCACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACCTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTGCACAAATGGGCGCAGCCTGATGCAGCCATGCCCGG
 T.denticola-NC-002967 GGCACGATGGGTATCCGGCTGAGAGGGTGAACGGACACATTGGGACTGAGATACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAAAGATCTTCCGCAATGGACGAAGCTTGCAGCGAGCGACGCCGCTG
 T.pedis-EF061270 GGCACGATGGGTATCCGGCTGAGAGGGTGAACGGACACATTGGGACTGAGATACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAAAGATCTTCCGCAATGGACGAAGCTTGCAGCGAGCGACGCCGCTG
 T.phagedenis-EF061266 GGCACGATGGGTATCCGGCTGAGAGGGTGAACGGACACATTGGGACTGAGATACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAAAGATATTCCGCAATGGACGAAGCTTGCAGCGAGCGACGCCGCTG
 Consensus GGCACGATcccTAgCTGGtCTGAGAGGgATGAcCAGCCAcTGGAACTGAGAcACGGTCCAGAcTCTAcGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATATTgCaCAATGGgCGcAAGcCTGATGCAGCCAtGCCCGG

	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----													
MG7A - MG8A	TGTGTGAAGGAGGCC	TTCGGGTTGTA	AAGCACTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGTGAAC	TTAATACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGCA-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						
ultured bacterium-DQ316956	TGTGTGAAGGAGGCC	TTCGGGTTGTA	AAGCACTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGTGAAC	TTAATACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGCA-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						
ultured bacterium-EF510326	TGTGTGAAGGAGGCC	TTCGGGTTGTA	AAGCACTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGTGAAC	TTAATACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGCA-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						
Serratia sp. -AM403719	TGTGTGAAGGAGGCC	TTCGGGTTGTA	AAGCACTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGTGAAC	TTAATACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGCA-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						
S.narcescens-RY49885	TGTGTGAAGGAGGCC	TTCGGGTTGTA	AAGCACTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGTGAAC	TTAATACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGCA-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						
ultured bacterium-AY700617	TGTGTGAAGGAGGCC	TTCGGGTTGTA	AAGCACTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGTGAAC	TTAATACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGCA-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						
Neudomonas sp.AM911627	TGTGTGAAGGAGGCC	TTCGGGTTGTA	AAGCACTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGTGAAC	TTAATACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGCA-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						
Bacterium 2.1-DQ163944	TGTGTGAAGGAGGCC	TTCGGGTTGTA	AAGCACTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGTGAAC	TTAATACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGCA-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						
P.fluorescens-DQ417330	TGTGTGAAGGAGGCC	TTCGGGTTGTA	AAGCACTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGTGAAC	TTAATACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGCA-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						
S.nematodiphila-EU036987	TGTGTGAAGGAGGCC	TTCGGGTTGTA	AAGCACTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGTGAAC	TTAATACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGCA-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						
ultured gamma bacterium	TGTGTGAAGGAGGCC	TTCGGGTTGTA	AAGCACTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGTGAAC	TTAATACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGCA-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						
T.denticola-NC-002967	TGAATGAAGGAGGCC	GAAAGGTTGTA	AAATCTTTTGCAGATGAAGAA	TAGAAGAGAGGGGATGCTT	TTGATGACGGTAGT	TCATGCGAATAGCCCGGCTAA	TTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA							
T.reponema pedis-EF061270	TGAATGAAGGAGGCC	GAAAGGTTGTA	AAATCTTTTGCAGATGAAGAA	TAGAAGAGAGGGGATGCTT	TTGATGACGGTAGT	TCATGCGAATAGCCCGGCTAA	TTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA							
T.phagedenis-EF061266	TGAATGAAGGAGGCC	GAAAGGTTGTA	AAATCTTTTGCAGATGAAGAA	TAGAAGAGAGGGGATGCTT	TTGATGACGGTAGT	TCATGCGAATAGCCCGGCTAA	TTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA							
Consensus	TGTgTGAAGGAGGCC	tTcGGTTGTA	AAGcaCTTTCAGCGAGGAGGAGG	GGtGAAC	tTAAACGTTCA	TCAATTGACGTTAC	TCGca-GAAGGAGCACCGGCTAACT	CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA						

	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----													
MG7A - MG8A	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	TCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGCGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCAGAT	GTGAATCC	CCGGGCTCA	ACCTGGGAACT	GCATTTGA	AACTGGC	ARGCTAGAGT	TCTCGTA
ultured bacterium-DQ316956	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	TCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGCGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCAGAT	GTGAATCC	CCGGGCTCA	ACCTGGGAACT	GCATTTGA	AACTGGC	ARGCTAGAGT	TCTCGTA
ultured bacterium-EF510326	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	TCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGCGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCAGAT	GTGAATCC	CCGGGCTCA	ACCTGGGAACT	GCATTTGA	AACTGGC	ARGCTAGAGT	TCTCGTA
Serratia sp. -AM403719	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	TCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGCGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCAGAT	GTGAATCC	CCGGGCTCA	ACCTGGGAACT	GCATTTGA	AACTGGC	ARGCTAGAGT	TCTCGTA
S.narcescens-RY49885	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	TCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGCGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCAGAT	GTGAATCC	CCGGGCTCA	ACCTGGGAACT	GCATTTGA	AACTGGC	ARGCTAGAGT	TCTCGTA
ultured bacterium-AY700617	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	TCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGCGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCAGAT	GTGAATCC	CCGGGCTCA	ACCTGGGAACT	GCATTTGA	AACTGGC	ARGCTAGAGT	TCTCGTA
Neudomonas sp.AM911627	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	TCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGCGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCAGAT	GTGAATCC	CCGGGCTCA	ACCTGGGAACT	GCATTTGA	AACTGGC	ARGCTAGAGT	TCTCGTA
Bacterium 2.1-DQ163944	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	TCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGCGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCAGAT	GTGAATCC	CCGGGCTCA	ACCTGGGAACT	GCATTTGA	AACTGGC	ARGCTAGAGT	TCTCGTA
P.fluorescens-DQ417330	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	TCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGCGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCAGAT	GTGAATCC	CCGGGCTCA	ACCTGGGAACT	GCATTTGA	AACTGGC	ARGCTAGAGT	TCTCGTA
S.nematodiphila-EU036987	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	TCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGCGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCAGAT	GTGAATCC	CCGGGCTCA	ACCTGGGAACT	GCATTTGA	AACTGGC	ARGCTAGAGT	TCTCGTA
ultured gamma bacterium	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	TCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGCGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCAGAT	GTGAATCC	CCGGGCTCA	ACCTGGGAACT	GCATTTGA	AACTGGC	ARGCTAGAGT	TCTCGTA
T.denticola-NC-002967	CACGTAGGGGCGAGCG	TGTTCGGAA	TATTGGGCGTA	AAGGATGTAGGCGG	TATGTAAGC	CTGGTGTGA	AATCTACGAGCTCA	ACTCGTAA	ACTGCATTGGG	TACTGCTTG	AACTAC	CGGA		
T.reponema pedis-EF061270	CACGTAGGGGCGAGCG	TGTTCGGAA	TATTGGGCGTA	AAGGATGTAGGCGG	TATGTAAGC	CTGGTGTGA	AATCTACGAGCTCA	ACTCGTAA	ACTGCATTGGG	TACTGCTTG	AACTAC	CGGA		
T.phagedenis-EF061266	CACGTAGGGGCGAGCG	TGTTCGGAA	TATTGGGCGTA	AAGGATGTAGGCGG	TATGTAAGC	CTGGTGTGA	AATCTACGAGCTCA	ACTCGTAA	ACTGCATTGGG	TACTGCTTG	AACTAC	CGGA		
Consensus	TACGgAgGgT	GCAAGCGTT	aaTCGGAA	TACTGGGCGTA	AAGGcGCACG	CAGGCGGTTG	TAAAGTCaGAT	GTGAATCC	cCGGCTCA	ACTGGGAACT	GCATTTG	aaACTGGC	ARGCTAGAgT	TcTcGTa

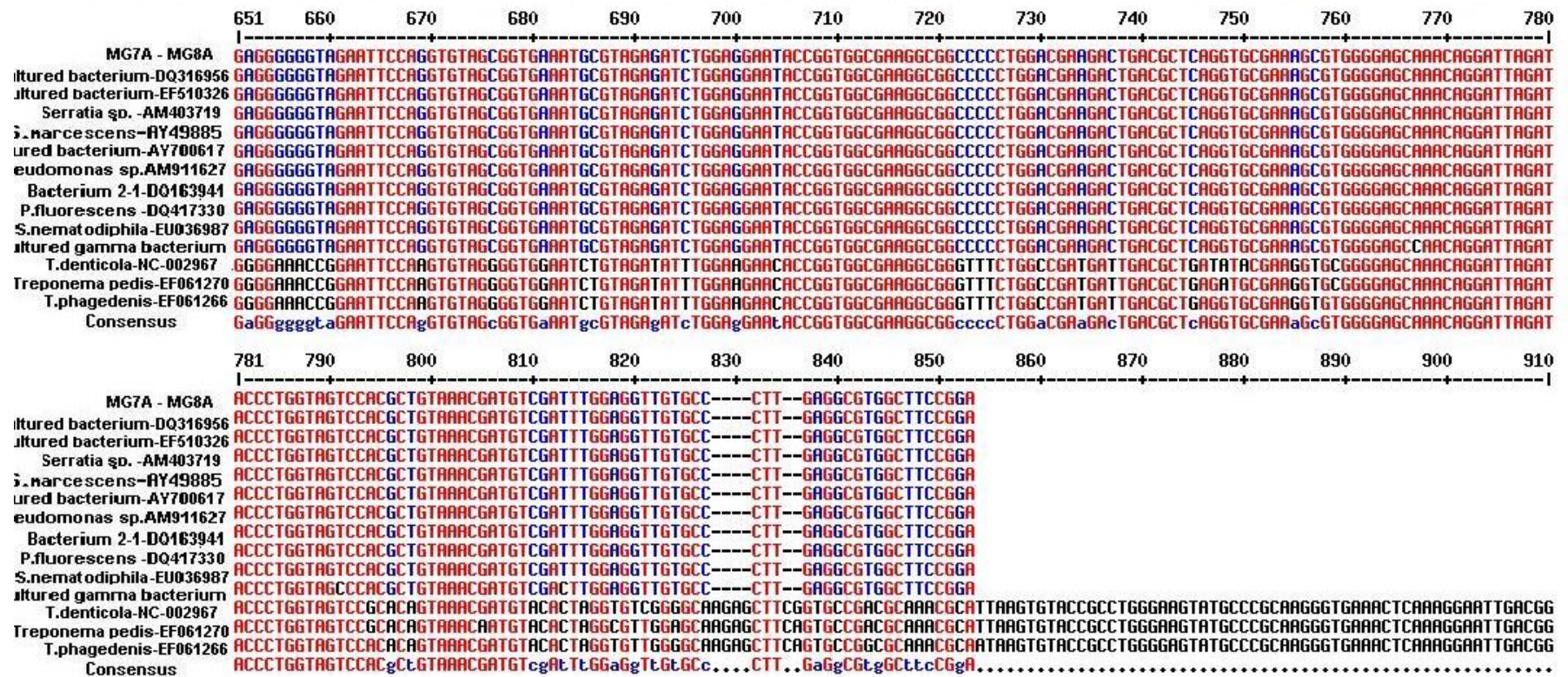


FIGURA 2 Alinhamento das seqüências de nucleótídeos das amostras MG7A e MG8A, isoladas durante este trabalho a partir de lesões de dermatite digital de vacas de aptidão leiteira, com seqüências de referência depositadas no “GenBank”. Para a geração deste alinhamento foi utilizado o programa Multialin-Multiple sequence alignment.

TABELA 7 - Valores de similaridade encontrados quando as seqüências de nucleotídeos das amostras MG7A e MG8A foram comparadas entre si e com demais seqüências de referência do “GenBank”.

Número do acesso no “GENBANK”	Espécie	Similaridade (%)
	Amostra MG7A/MG8A	100
DQ316956	Uncultured bacterium	99
EF510326	Uncultured bacterium	99
AM403719	<i>Serratia sp. EP28</i>	99
AY498856	<i>Serratia .marcescens</i>	99
AY700617	Uncultured bacterium	99
AM911627	<i>Pseudomonas sp.</i>	99
DQ163941	Bacterium 2-1	99
DQ417330	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99
EU036987	<i>Serratia nematodiphila</i>	99
EF071206	uncultured gamma proteobacterium	99
NC_002967	<i>Treponema denticola</i>	75
EF061266	<i>Treponema phagedenis</i>	70
EF061270	<i>Treponema pedis</i>	68

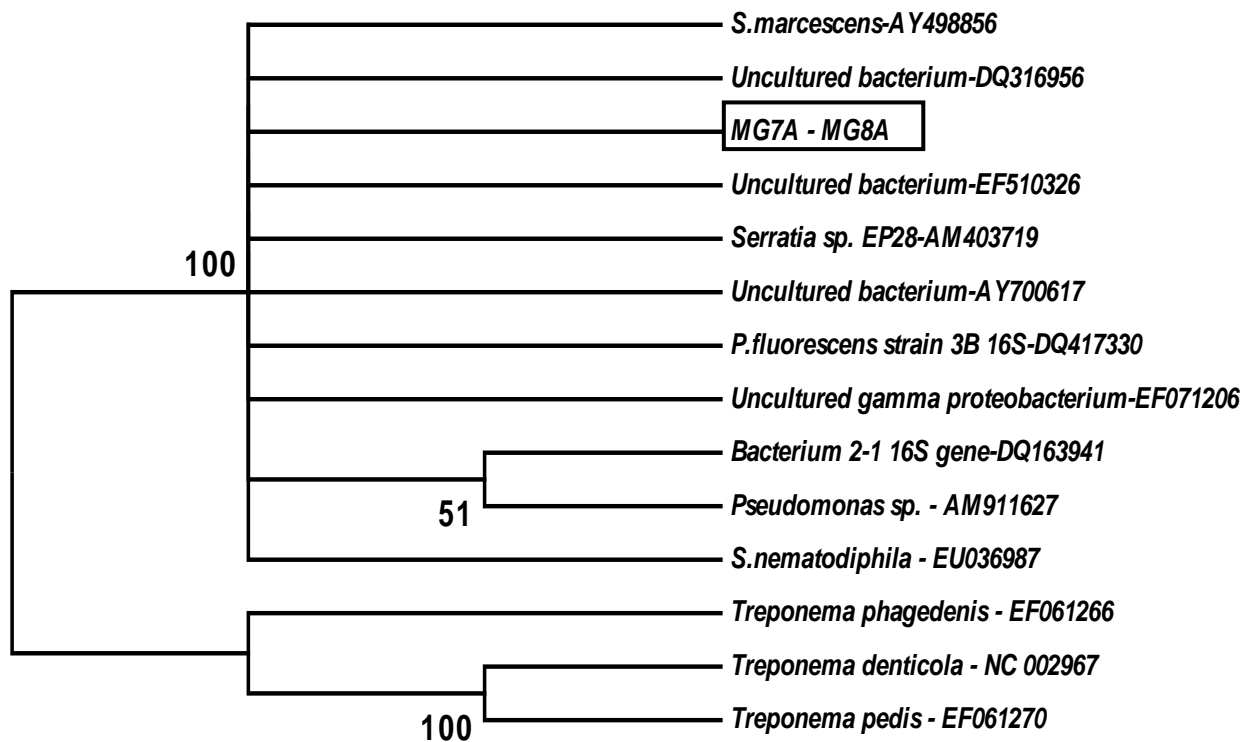


Figura 3 - Árvore filogenética consenso construída com base na seqüência nucleotídica do fragmento de 900bp obtidos com o DNA extraído dos isolados da lesão de dermatite digital dos animais MG7A e MG8A e de seqüências de referência de 13 amostras do “GENBANK”. Para a construção da árvore foi utilizado o programa MEGA versão 4. Em destaque as amostras isoladas, durante este trabalho.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliou-se a participação da microbiota bacteriana em 9 abscessos de sola de bovinos procedentes de três fazendas de exploração leiteira. Os microorganismos anaeróbios facultativos foram os predominantes, correspondendo a 80,5% dos isolados, enquanto os anaeróbios obrigatórios corresponderam 19,5% do total dos isolados. Dentre os anaeróbios facultativos, os bacilos Gram-negativo apresentaram maior frequência de isolamento (63,2% das amostras isoladas). Ainda, foram isolados bacilos e cocos Gram-positivo. No grupo dos anaeróbios obrigatórios, houve predomínio dos cocobacilos Gram-negativo produtores de pigmento negro, que corresponderam a 18,8% dos isolados. Foi também isolada uma amostra de bacilo Gram-negativo.

Analisando os resultados obtidos para cada uma das fazendas, verificam-se diferenças quanto ao tipo morfológico e respiratório dos microrganismos isolados. Dos bovinos da fazenda 1 foram recuperadas 16 amostras de bactérias anaeróbias facultativas, sendo 7 de bacilos Gram-negativo e 9 de bacilos Gram-positivo; não foram isolados microrganismos anaeróbios obrigatórios. Dos animais da fazenda 2, foram recuperadas 36 amostras, sendo 18 anaeróbios facultativos (bacilo Gram-negativo e coco Gram-positivo e 18 anaeróbios estritos (todos cocobacilo Gram-negativo). Nos animais da fazenda 3 foi observada a maior diversidade de isolados, sendo 73 de anaeróbios facultativos (bacilo Gram-negativo, bacilo Gram-positivo e coco Gram-positivo) e 8 de anaeróbios obrigatórios (cocobacilo Gram-negativo e bacilo Gram-negativo).

Foram identificadas 108 amostras bacterianas que foram agrupadas por fazenda e por animal. Novamente, foi observada variação na composição da microbiota isoladas dos diferentes animais. Maior diversidade foi observada na vaca 1, procedente da fazenda 1, da qual foram isoladas 8 espécies bacterianas. Em seguida, os animais 6, 7 e 9 foram os que apresentaram maior diversidade da microbiota de lesão de abscesso de sola, com o isolamento de 5 espécies bacterianas. Os animais 2 e 3, ambos provenientes da fazenda 2, foram os que apresentaram menor diversidade, com o isolamento de duas e três espécies, respectivamente.

Das espécies bacterianas isoladas, *E. coli*, *K. oxytoca* e *E. cloacae* foram as mais freqüentes: dos nove animais estudados *E. coli* foi isolada de sete, *K. oxytoca* de cinco e *E. cloacae* de quatro animais. As demais espécies bacterianas foram isoladas somente de um ou dois animais.

Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que indicam que a etiologia do abscesso de sola é de natureza polimicrobiana e multifatorial (LANGWORTH, 1997; QUINN et al., 1994 e 2005; SWEDEN, 1997; GREENOUGH, 1998; SILVA et al., 1999; BERRY, 2001 e 2006). Com relação à fonte de infecção para os bovinos acometidos por abscesso de sola alguns fatores ambientais e de manejo dos animais devem ser considerados. Os microrganismos identificados neste estudo podem ser originários do trato gastrointestinal dos bovinos, pois as espécies predominantes foram as da Família Enterobacteriaceae. Também podem ser provenientes do solo e do meio-ambiente, como o *L. grayi* que pode vir das pastagens, fezes de animais e da água, assim como *C. aquaticum* (da água).

Segundo MOLINA et al., (1999), em animais estabulados, a limpeza é um fator desafiante, quando a água é usada para limpeza do piso a umidade favorece o amolecimento dos cascos. Por outro lado, a retirada de dejetos somente por raspagem não é suficiente para evitar o acúmulo de matéria orgânica no piso das instalações, o que poderá constituir um problema para o casco dos bovinos. O amolecimento dos cascos por excesso de umidade, presença de matéria orgânica, desgaste excessivo, decorrente da abrasão no piso da maioria das instalações, além de laminites, são os fatores desencadeantes desta enfermidade, pois irão favorecer a penetração dos microrganismos do ambiente através das fissuras da linha branca e muralha do casco.

Esses fatores foram observados nas fazendas estudadas. Em relação ao manejo dos animais acometidos por abscesso de sola nas três fazendas, o sistema de criação era de estabulação intensiva ou semi-intensiva e havia acúmulo de matéria orgânica e umidade no piso das instalações. Na fazenda 1, as afecções podais são freqüentes durante todo o ano, o cimento do estábulo era abrasivo e não havia declínio ideal, a matéria orgânica do piso era retirada por raspagem, lavagem

semanalmente, havendo umidade e como medidas preventivas usava-se pedilúvio diário e casqueamento (Quadro 2).

Na fazenda 2, afecções podais também eram freqüentes durante todo o ano. Embora o cimento do estábulo não fosse abrasivo, as trilhas por onde os animais eram conduzidos para a sala de ordenha continham pedregulhos o que favorecia a penetração de corpos estranhos no casco. A matéria orgânica do piso era retirada por raspagem e lavagem diária, existindo umidade. Como medidas preventivas, usava-se pedilúvio uma vez por mês e casqueamento preventivo (Quadro 2).

Na fazenda 3, afecções podais também eram freqüentes durante todo o ano. Como na fazenda 2, o cimento do estábulo não era abrasivo, mas as trilhas por onde os animais eram conduzidos para a sala de ordenha continham piso irregular o que favorecia a penetração de corpos estranhos no casco. A matéria orgânica do piso era retirada por raspagem, existindo umidade. Como medidas preventivas, usava-se pedilúvio uma vez por mês e casqueamento só era usado como curativo (Quadro 2). Nas três fazendas ocorriam casos de mamite e mastite.

Segundo DIAS e MARQUES, (2003), os fatores predisponentes para as afecções de casco devem ser identificados em cada propriedade leiteira, pois cada rebanho apresenta características próprias. A identificação dos fatores predisponentes é peça chave para o controle da ocorrência de novos casos da doença e para a cura dos animais acometidos. As afecções de cascos têm quatro principais causas: fatores ambientais, genéticos, infecciosos e nutricionais. Na prática, esses fatores predisponentes podem estar associados ou apenas um fator pode estar causando o problema no rebanho. Nas fazendas mencionadas, os fatores predisponentes foram as condições de higiene, piso úmido e irregular desfavorável aos animais e nas fazendas 2 e 3, falta de medidas preventivas para saúde dos cascos.

Com a finalidade de determinar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos foi feito o teste de CIM e pesquisa de β -lactamase em 67 amostras bacterianas isoladas a partir de coletas em 9 vacas leiteiras procedentes de três fazendas em Minas Gerais. Todas as amostras testadas foram resistentes a penicilina G e ao metronidazol. As

amostras bacterianas que foram isoladas em apenas um animal não foram testadas por não ser significativo

De acordo com (BOECK e BOOTHE,1998 QUINN *et. al.*,2005) os antimicrobianos ampicilina e tetraciclina são recomendados para o combate de enfermidades causadas por microrganismos Gram-positivo e Gram-negativo (*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) em Medicina Veterinária. Com a escolha da combinação ampicilina/sulbactam buscou-se avaliar a eficácia de uma droga que tivesse um inibidor de β -lactamase prevendo-se uma possível resistência a ampicilina.

Das 13 amostras de *E. coli* da Fazenda 2 testadas pela CIM, 12 (92,3%) foram resistentes aos antimicrobianos ampicilina/sulbactam e a tetraciclina. Já na fazenda 3, de onde foram isoladas 25 amostras *E. coli*, o resultado foi diferente: 22 (88%) amostras foram sensíveis a ampicilina/sulbactam. Com relação a tetraciclina, 11 (44%) destas amostras foram sensíveis. HOYLE *et al.* (2005) investigando a disseminação e a diversidade genética em amostras de *E. coli*, resistentes a ampicilina/sulbactam e comensais do trato intestinal de bezerros de zero a 21 semanas, encontrou 56 padrões genéticos diferentes e identificou entre elas amostras multirresistentes a tetraciclina entre outros antimicrobianos. Os autores sugerem que a disseminação de amostras multirresistentes ocorre no meio ambiente da fazenda onde vivem os animais e que neste meio os animais também adquirem novas amostras bacterianas. Além disso, MELLATA *et.al.* (1998) verificaram alta frequência de resistência à tetraciclina em bactérias isoladas de bovinos, e que a frequência de transferência de plasmídios conferindo resistência, por conjugação entre isolados de *E.coli* de origem bovina e *E. coli* K12 era elevada e, ainda, que os referidos plasmídios conferiam múltipla resistência a antibióticos.

Com relação aos resultados obtidos em animais das fazendas 2 e 3 podemos sugerir que a resistência a ampicilina/sulbactam e tetraciclina poderia ser atribuída as amostras resistentes do meio ambiente pelo uso destes antimicrobianos ou outros para combater casos de metrite, mastites e afecções podais. Este fato ocorre porque muitas vezes o proprietário não segue as recomendações do veterinário responsável fornecendo aos animais doses incorretas, propiciando o aparecimento de microrganismos resistentes, através de mecanismos biológicos de competição

microbiana e de troca genética, os microrganismos resistentes podem se tornar predominantes.

Com relação aos resultados obtidos pela CIM na fazenda 3, das 14 amostras de *Klebsiella oxytoca* isoladas de 6 animais, 8 (57,1%) foram sensíveis a ampicilina/sulbactam e para tetraciclina 13 (92,9%) amostras foram sensíveis. Também nesta fazenda foram isoladas 9 amostras de *E. cloacae* sendo que 8 (88,9%) foram resistentes a ampicilina/sulbactam, quanto à tetraciclina 7 (77,8%) amostras foram sensíveis. Foram isoladas também 3 amostras de *C.sakazakii* que foram resistentes à ampicilina/sulbactam e sensíveis à tetraciclina.

Com relação a CIM em *E. faecalis* isoladas das fazendas 2 e 3, não foi encontrada diferença no padrão de sensibilidade antimicrobiana para ampicilina/sulbactam e tetraciclina.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura uma vez que o surgimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos parece ser inevitável para a conservação das espécies, mas controlando a utilização dos mesmos poderá limitar o aparecimento de amostras multiresistentes (BLATT, 2003).

Quanto à produção de β -lactamases, enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico dos antibióticos (penicilina G, ampicilina, e outros β -lactâmicos), impedindo sua atividade antimicrobiana. O aumento da prevalência de bactérias produtoras de β -lactamases criou a necessidade de métodos que identifique a presença destas enzimas no microrganismo isolado (MACEDO *et al.*, 2005). O grau de resistência da bactéria depende da quantidade de enzima produzida e da habilidade da enzima em hidrolizar o antimicrobiano em questão. Um dos inibidores da ação desta enzima é o sulbactam que possui ação variável contra enzimas cromossômicas das bactérias Gram-negativa.

Das 13 amostras de *E.coli* isoladas de animais da fazenda 2, todas foram caracterizadas como produtoras de beta-lactamases e 12 (92,3%) foram resistentes a ampicilina/sulbactam. Das amostras bacterianas isoladas de animais da fazenda 3, as 3 amostras de *E.coli*, 8 amostras de *K. oxytoca*, 6 amostras de *E. cloaca* e 3

amostras de *C. sakazakii*, perfazendo um total de 20 amostras produtoras de beta-lactamases e resistentes a ampicilina/sulbactam. Segundo MOHANTY *et al.* (2005) estes resultados podem ser variáveis. Os autores compararam a atividade *in vitro* de diferentes associações de β -lactâmico/inibidor de β -lactamase (cefoperazone/sulbactam, piperacillin/tazobactam e ticarcillin/clavulcanico) e observaram que de 9.004 isolados bacterianos, 3.232 (35,39%) foram sensíveis e 568 (6,31%) foram resistentes a ação do inibidor da beta-lactamase em todas as combinações utilizadas e ainda, 5204 amostras (57,80%), foram resistentes a pelo menos uma das combinações testadas.

De 8 espécimes clínicos de biópsias, em lesões típicas de dermatite digital de 8 vacas leiteiras, foi feito exame direto por microscopia de campo escuro (MCE). Nos espécimes clínicos obtidos de 2 vacas da fazenda 1, não foram observadas espiroquetas. Na fazenda 4, foram coletados 6 espécimes clínicos, em 5 foram observados espiroquetas móveis. A visualização de espiroquetas em material clínico de lesões de dermatite digital, pela utilização de diferentes técnicas de microscopia, tais como microscopia de campo escuro e exames histopatológicos corados pela técnica de Gram, hematoxilina e eosina, sais de prata e outras, tem sido relatada por diversos autores (BORGSMANN *et al.*,1996, CHOI *et al.*,1997, DÖPFER *et al.*,1997, RIJPKEMA *et al.*,1997, DEMIRKAN *et al.*,1998; SHIBAHARA *et al.*, 2002). Outros pesquisadores relataram a visualização de espiroquetas, por microscopia de campo escuro, em material obtido após o cultivo (WALKER *et al.*,1995, DEMIRKAN *et al.*,1999).

Embora considerados de difícil cultivo, alguns pesquisadores obtiveram sucesso no cultivo dos espiroquetas. WALKER *et al.*(1995), na Califórnia - Estados Unidos, foram os primeiros pesquisadores que conseguiram cultivar espiroquetas de biópsias de lesões de dermatite digital. Posteriormente, DEMIRKAN *et al.*(1999); SCHRANK *et al.*(1999), STAMM *et al.*(2002), TROTT *et al.*(2003) e EVANS *et al.*(2008) também cultivaram espiroquetas de lesões de dermatite digital. No trabalho aqui desenvolvido, os materiais das biópsias das 2 vacas da fazenda 1 (MG7A e MG8A) foram inoculados nos meios de OTI e EMJH e, após o período de incubação foram visualizados microrganismos espiralados por MCE.

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 (MG7A e MG8A) e do DNA extraído diretamente de biópsias de lesões de dermatite digital dos animais da fazenda 4 (3, 4, 5, 6, 7, 8). Em todas as reações foi amplificado um fragmento de 900 pb. DEMIRKAM et al.(1998) utilizaram a reação de 16S rDNA-PCR para caracterizar espiroquetas em biópsias de lesões de dermatite digital em bovinos no UK, obtiveram um resultado de 82,8% de positividade.

O produto da amplificação das amostras MG7A e MG8A foram seqüenciados e a análise da similaridade entre as seqüências mostrou que as amostras MG7A e MG8A eram idênticas entre si. Além disso, a inferência filogenética das amostras seqüenciadas neste trabalho, quando comparadas com 13 diferentes seqüências de referência depositadas no *GenBank*, 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*. Estes resultados são similares aos obtidos por outros autores. No entanto, é importante ressaltar que este trabalho foi pioneiro no Brasil na amplificação e no seqüenciamento do DNA extraído de amostras biológicas de bovinos com lesões de dermatite digital pela técnica PCR.

CHOI *et. al.* (1997) comparando as seqüências de 16S rDNA de uma mistura de material de 4 biopsias de animais com dermatite digital observaram a presença de 5 tipos filogenéticos de espiroquetas, que apresentavam similaridades com o gênero *Treponema*. Um tipo (DDKL-4) apresentava 99,4% de similaridade com *Treponema phagedenis*, dois tipos (DDKL-3 e DDKL-13) apresentavam 95,0% de similaridade com *Treponema denticula* e 98,0% de similaridade com *T. vincentii*. Os outros dois tipos filogenéticos (DDKL-12 e DDKL-20), embora não apresentassem similaridade com *Treponemas* cultiváveis, apresentavam similaridade com o Grupo IV *Treponema oral*.

RIJPKEMA *et al.* (1997) utilizando espécimes clínicos de 2 animais com lesão de dermatite digital, identificou parcialmente espiroquetas por PCR utilizando 5 combinações de iniciadores específicos para espiroquetas e para o gênero

Treponema. Os produtos da PCR foram seqüenciados e a análise filogenética indicou similaridade com o gênero *Treponema*, espécie *T. denticola*.

RUSSEL, *et al*, (1997), a partir de DNA extraído de lesões de dermatite digital de bovinos britânicos realizou a amplificação do gene 16S rDNA, utilizando iniciadores universais e específicos para treponemas. Foi possível com iniciadores específicos identificar um treponema com 98,0% de similaridade com *Treponema denticola*.

De modo semelhante, STAMM *et al*. (2002) pelo seqüenciamento do produto de amplificação da região 16S- 23S rDNA ISRS de Treponemas isolados de lesões de dermatite digital de 6 bovinos da Califórnia, concluíram que os isolados se inseriam em 3 grupos filogenéticos do gênero *Treponema*, apresentando similaridade com os Treponemas da cavidade oral humana (*T. denticola*, *T. medium*, *T. vincentii*) ou da área genital (*T. phagedenis*).

TROTT *et al*. (2003), cultivando 4 amostras de espiroquetas de lesões de dermatite digital em bovinos leiteiros de Iowa, juntamente com 2 amostras isoladas da Califórnia, verificaram que todas as amostras bacterianas possuíam a seqüência 16S rDNA idêntica, e que apresentavam 98,0% de similaridade com *T. phagedenis*; resultados semelhantes aos obtidos por CHOI *et. al*. (1997). Entretanto, os autores observaram uma diversidade antigênica de lipopolissacarídeos e genética entre as amostras, que foi detectada por eletroforese de campo pulsado em 5 das 6 amostras. EVANS *et al*. (2008) cultivaram 230 amostras de espiroquetas de 30 espécimes clínicos de lesões de dermatite digital de bovinos no Reino Unido. Foram feitas reações de PCR para o gene 16S rDNA, gene *flaB₂* e seqüenciaram aproximadamente 1420 pb do gene 16S rDNA de cada um dos 23 isolados. Os autores concluíram que as amostras isoladas pertenciam a 3 grupos filogenéticos de *Treponema*: grupo 1 (*T. médium/T. vincentii-like*), grupo 2 (*T. phagedenis-like*) e grupo 3 (*T. denticola/ T.putidum-like*).

Em relação ao manejo das fazendas (1 e 4) onde foram feitas as biópsias das lesões de dermatite digital dos animais acometidos, de acordo com o apresentado no quadro 2, havia presença de umidade, de matéria orgânica, higiene precária, grande número de animais nos rebanhos. Na fazenda 4 além dos fatores de risco citados, foram introduzidas no rebanho vacas com lesões de dermatite digital e o

pedilúvio não era utilizado. De acordo com READ & WALKER,1992 ; BERRY et al., 2006 em condições onde a presença de matéria orgânica é elevada, na presença de umidade constante e de baixas tensões de oxigênio os surtos de dermatite digital são favorecidos (READ & WALKER,1992 ; BERRY et al., 2006).

Estudos sobre fatores predisponentes para dermatite digital sugerem que certas práticas de manejo predispõem os animais a infecções. Estes fatores são: grande número de animais no rebanho, presença de umidade e de matéria orgânica, falta de higiene nos estábulos ou currais, presença de pedregulhos na trilha, o instrumental contaminado usado por casqueadores, uso inadequado do pedilúvio, a introdução de novilhas para reposição sem o devido cuidado com exame do aparelho locomotor e especificamente do casco e com a quarentena necessária, para impedir a introdução de animais doentes no rebanho (CRUZ et al., 2001; SILVA et al., 2001; FERREIRA, 2003; SOUZA, 2005; BORUT, 2006; HOLZHAUER, 2006).

IX-CONCLUSÕES

- O perfil microbiológico dos abscessos de sola neste estudo confirma a sua característica polimicrobiana, com participação de bactérias anaeróbias facultativas, correspondendo a (80,5%) e dos anaeróbios obrigatórios, correspondendo a (19,5%) das amostras, o que vem ressaltar a relevância das interações microbianas nesta afecção podal.
- Houve predominância nos isolados de anaeróbios facultativos da família *Enterobacteriaceae*, sendo *Escherichia coli* a espécie mais prevalente (35,2%) seguida por *Klebsiella oxytoca* (12,1%).
- Houve variações nas amostras bacterianas identificadas dos animais de uma mesma fazenda, ou seja, embora as vacas estivessem sujeitas ao mesmo tipo de manejo e no mesmo ambiente, os microrganismos participantes dos processos foram diferentes. Este fato foi observado nas fazendas 2 e 3.
- Foram observadas variações quanto ao padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos testados, ampicilina /sulbactam e tetraciclina em uma mesma fazenda e em diferentes fazendas. A disseminação de amostras multiresistentes ocorre no meio ambiente da fazenda onde vivem os bovinos e através, de mecanismos biológicos de competição microbiana e de troca genética, os microrganismos resistentes podem se tornar predominantes e isto pode dificultar a terapia das afecções podais
- As espiroquetas podem ser cultivadas de lesões de dermatite digital fato este comprovado no presente trabalho.
- Diante das propostas enumeradas no início deste estudo, vale ressaltar que este trabalho foi pioneiro no Brasil na amplificação e no seqüenciamento do DNA extraído de amostras biológicas de bovinos com lesões de dermatite digital pela técnica PCR.

- Os resultados obtidos nas análises de nucleotídeos somados aos resultados obtidos pela construção da árvore filogenética permitem-nos afirmar que os animais pesquisados são portadores de dermatite digital causada por microrganismos de difícil cultivo. Que possuem similaridade com uma média de 99% para microrganismos não cultiváveis, 75% de similaridade para *Treponema denticola*, 70% para *Treponema phagedenis* e 68% para *Treponema pedis*.
- Por outro lado, os dados obtidos neste trabalho permitem sugerir a aplicação da PCR para a confirmação do diagnóstico de dermatite digital. Como vantagens esta técnica apresenta a rapidez, facilidade de execução e a possibilidade de implementação em laboratórios menos sofisticados que disponham de equipamentos necessários à execução da técnica de PCR.

X- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, R.; ALZA, D. The role of the veterinarian in controlling lameness in pasture managed dairy cows, in South America. The 14th International Symposium and 6th Conference on Lameness in Ruminants-Uruguay, 2006, p. 147-149.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J. ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids. Res.** 25, p. 3389-3402, 1997.

AMSTEL, S. R.V.; SHEARER, J.K. Abnormalities of hoof growth and development. **Vet. Clin.North Am.Food Anim. Pract.** ,v.17,n.1,p. 73 – 91, 2001

ARGÁEZ-RODRÍGUEZ,F.J.; HIRD,D.W.;ANDA,J.H.;READ,D.H.;RODRÍGUEZ-LAINZ,A. Papillomatous digital dermatitis on a commercial dairy farm in Mexicali, México:Incidence and effect on reproduction and milk production. **Prev.Vet.Med.**,v.32,p.275-286,1997.

BAGGOTT, D.G.; RUSSEL. A.M. Lameness in cattle **Br. Vet. J.** , v. 137, n.1, p.113 – 137, 1981.

BAGLEY, C.V. Musculo Skeletal system. Lameness in sheep. In: AJELLO,S.E. (Ed.). **The Merck Veterinary Manual.** 8. ed. Whitehouse Station: Merck & Co.,1998. p.850 – 855

BLATT, J. M. Mecanismo de resistência e detecção das betalactamases de espectro ampliado. Newslab, São Paulo, n.40, p. 86-97, 2003.

BARON, E.J.; FINEGOLD, S. **Bailey Scott'S Diagnostic Microbioly** 11 ed. Mosby-Year book, Inc .St. Louis, Missouri,1999. p.185-188.

BEEMASTER, C.M.T.; QUIRÓS, J.; BURGER,R.; FRANKENA,K. ; DWINGER,R.H. Estúdio epidemiológico sobre lãs lesiones podales del ganado lechero em la region del Poas em Costa Rica. **Cienc. Vet.**(Costa Rica). ,v.14,n.1,p.13-22,1992.

BERGSTEN, C. Infectious diseases of the digits. In: GREENOUGH, P.R.,(Ed.) **Lameness in Cattle**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders ,1981. p .20-27.

BERGSTEN, C.; GREENOUGH, P.R., GAY, J. M. *et. al.* Effects of biotin supplementation on performance and claw lesions on a commercial dairy farm. **J. Dairy Sci.**,v.86, p. 3953-3962, 2003.

BERRY, S. L. Diseases of the digital soft tissues. **Vet. Clin. North Food Anim. Pract.** , v.17,n.1,p.129 – 157, 2001

BERRY, S. L. Infectious diseases of the bovine claw. The 14th International Symposium and 6th Conference on Lameness in Ruminants-Uruguay, 2006, p.52-57.

BOECKH, A.;BOTHE, D.M.i. Introduction antibacterial agent; antifungal agent, Antifungal agent; Antiviral agent and Interferon. In: AJELLO,S.E. (Ed.). **The Merck Veterinary Manual**. 8. ed. Whitehouse Station: Merck & Co.,1998. p.1745-1788

BLOWEY, R. W.; SHARP, W. W. Digital dermatitis in dairy cattle, **Vet. Rec.** ,v.122, p.505-508, 1998

BLOWEY, R.W. Welfare aspects of foot lameness in cattle. **Comp. Vet. Cont. Educ**,v.51, n.4, p.203-207. 1998.

BORGES, J. R.J.; GARCIA, M. **Cattle lameness BAYER'S guide**. Rio de Janeiro: Sony Music Entertainment Ind. Com. LTDA, 1997.1 CD Room.

BORGES,J.R.J., PITOMBO, C. A. ; SANTIAGOT,S. S.; *et al.* Incidência de afecções podais em bovinos leiteiros submetidos a diferentes sistemas de manejo. **Arq. Es Med. Vet. da UFBA**. V.15,n1, p.34-42, 1992

BORGMANN, I. E.; BAILEY, J.; CLARK, E. G. Spirochete-associated bovine digital dermatitis. **Can. Vet.** , v.37, n.1, p.35-37. 1996

BRITT, J. B.; MCCLURE, J.; Field trials with antibiotic and non antibiotic treatments for papillomatous digital dermatitis. **The Bov. Prac.**, v.32, p. 25-29, 1998.

CHELI, R.; MORTELLARO, C. La dermatite digitale del bovino. VIII International Meeting on diseases of cattle, VI Congresso della Societa' Italiana di Buiatria., p.208-213. 1975

CHOI, B.K.; NATTERMANN, H.; GRUND, S.; HAIDER, W.; GÖBEL, U. B. Spirochetes from digital dermatitis lesions in cattle are closely related to treponemes associated with human periodontitis. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.47, n.1, p. 175-181, 1997.

COLLICK, D. W.; WEAVER, A. D. ; GREENOUGH, P. R. Interdigital space and claw. In: GREENOUGH, P.R. (Ed.) **Lameness in cattle**. 3.ed. Philadelphia: W. B. Saunders. 1997. p.101-122.

COOK, N. B.; NORDLUND, K. V.; OETZEL, G. R. Environmental influences on claw horn lesions associated with laminites and subacute ruminal acidosis in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, n. 87, E36-E46, 2004

CRUZ, C.; DREMEIER, D.; CERVA, C.; CORBELLINI, L. G. Bovine digital dermatitis in southern Brazil. **Vet. Re.**, v. 148, p. 576-577, 2001

DAVIES, R.C. Effects of regular formalin footbaths on the incidence of foot lameness in dairy herds. **Vet. Rec.**, v.111, p. 394, 1982.

DAVIS, U.C. Papillomatous digital dermatitis in cattle: footwart in cattle. [on line] 1998. Available from internet: <http://sphinx.ucdavis.edu/research/footwarts/pdd.htm>.

DEMIRKAN, I.; CARTER, S. D.; HART, C. A.; WOODWARD, M. J. Isolation and cultivation of a spirochaete from bovine digital dermatitis. **Vet. Rec.**, v.145, p.497-498, 1999

DEMIRKAN, I.; CARTER, S.D.; MURRAY, R. D.; BLOWEY, R.W.; WOODWARD, M. J. The frequent detection of a treponeme in bovine digital dermatitis by

immunocytochemistry and polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.** , v. 60, p. 285-292, 1998.

DHAWI, A.; HART, C. A.;DEMIRKAN, I.; DAVIES, I. H.; CARTER, S. D. Bovine digital dermatitis and severe virulent ovine foot rot: a common spirochaetal pathogenesis. **Vet. J.**, v.169, n.2, p. 232-241, 2005.

DIAS, R. S. Afecções de casco em vacas leiteiras. **Cad. Tec. Vet. Zootec.** , n.29, p. 71 – 75, 1999.

DIAS, R. S.; MARQUES JUNIOR, A. P.. **Casco em bovinos**. 2 ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2003. 67 p.

DOPFER, D. et al. Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *compylobacter faecalis*. **Vet. Rec.**,, v.140, n.24, p.620-623, 1997.

DOPFER, D. Summary of research activities concerning (papillomatous) digital dermatitis in cattle published or developed since 1998. In proceeding of the XI International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit and III International Conference on Bovine Lamenss, Parma, Italy 3-5 , September 2000.Eds. MORTELLARO, C. M; DE VECCHIS, L.; BRIZZI, A. pp.19-23.

EDELSTINE, M.A.C. Anaerobic Gram-negative Bacilli. In: BARON,E.j.; FINEGOLD,S.M. (Ed.) Baileys & Scott's **Diagnostic microbiology**. 8. ed. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1990. p.508-529.

EDWARD, A. M.; DYMOCK, D.; WOODWARD, M. J.; JENKINSON, H.F. Genetic relatedness and phenotypic characteristics of *Treponema* associated with human periodontal tissues and ruminant foot disease. **Microbiology** v.149, p.1083-1093, 2003

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 spirochetes isolated from digital dermatitis lesions in UK cattle. **Vet. Microbiol.**, 2008. In press.

ENEVOLDSEN, C.; GRÖHN, Y.T.; THYSEN, I. Heel erosion and others interdigital disorders in dairy cows: associations with season, cow characteristics, disease, and productions. **J. Dairy Sci.**, v.74, n.4, p.1299-1309, 1991a.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M.C., and GREEN, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred.I. accuracy assessment. *Genome Research*, Cold Spring Harbor Lab, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer..probabilities. *Genome Res.* v. 8, p. 186-194, 1998.

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.; LEITE, R. C.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; SOUZA, R. C.; FERREIRA, M. G. Custo e resultados do tratamento de seqüelas de laminite bovina: relato de 112 casos em vacas em lactação no sistema *free-stall*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 5. p.589 – 594, 2004

FERREIRA, Paulo Marcos. Afecções podais em vacas leiteiras. 2003. 63f. **Tese**(Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FINEGOLD, S. M.; MARTIN, W. J. Anaerobic Gram-negative Non-sporeforming Bacilli; Indentification of anaerobes In: Finegold, S. M.; MARTIN, W. J. **Methods for Identifacation for Pathogenic Microorganisms.** 8. ed., St. Louis Mosby 1990. p. 309 –18.

GITAU, T.; MBIUKI, S.M; MCDERMONT, J.J. Assessment of bovine hoof conformation and its association with lameness, animal factors and management

practices on small-scale dairy farms in Kiambu district, Kenya. *Onderstepoort J. Vet. Res.* ,v.64, n.2, p.135-140, 1997.

GOGOI, S. N. et al. Incidence of foot disorders in cattle. *Mod. Vet. Pract.* , v.62, n.12, p.941-945, 1981

GOURREAU, J.M.; SCOTT, D.W.; ROUSSEAU, J.F. La dermatite digitée des bovins *Le point Veterinaire*, v.24, p.49-57, 1992.

GREENOUGH, P. R. lameness in cattle. In: AJELLO, S. E, (Ed.). **The Merck Veterinary Manual**. 8. ed. WhiteHouse Station:Merck & Co, 1998.p.781 – 809.

GREENOUGH, P.R. Sand cracks, horizontal fissures, and other conditions affecting the wall of the bovine claw. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* , v.17, n.1, p.93-110, 2001.

GREENOUGH, P.R.; WEAVER, D.A.; BROOM, D.M.; ESSLEMONT, R. J.; GALINDO, F. A. Basic concepts of bovine lameness. In: GREENOUGH, P.R (Ed.) **Lameness in cattle** 3.ed. Philadelphia :W. B. Saunders, 1997. p.3-13.

HAAPASALO, M.; SING, U.; McBRIDE, M. *et al.* Sulfhydryl-Dependent attachment of *Treponema denticola* to Laminin and other proteins. *Infect. Immun.*, p. 4230-4237, 1991.

HARRIS,D.J.et.al.The incidence, cost and factors associate with foot lameness in dairy cattle in south-western Victoria. *Aust.Vet. J.*,v.65,n.6,p.171-176,1998.

HOBLET, K.H.; WEIS,W. Metabolic hoof horn disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.Pract.* ,v. 17, n.1, p. 111-127, 2001

HOLDEMAN, L.V.; KELLEY, W.R.; MORRE, W.E.C. Anaerobic Gram-negative straight, curved and helicoidal rods. In: KRIEG, R.N.; HOLD, G.J. (Ed.) **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1984. cap.6, p.602-637.

HOLZHAUER, M.; HARDENBERG, C.; BARTEIS, J. M.; 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

HOYLE, D.V; YATES,C.M.; CHASE-TOPPING,M.E.; TURNER,E. J.; DAVIES S.E.; LOW,J.C.; GUNN,G.J.; WOOLHOUSE, M.E.J.; AMYES,S.G.B. Molecular epidemiology of antimicrobial-resistant commensal *Escherichia coli* strains in a cohort of newborn calves. **Appl. Environ.Microbiol.**,v.71, n11,p. 6680-6688, 2005

HUANG, X & MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.** 9: 868-877, 1999.

HUANG, Y.C.; SHANKS, R.D.; MCCOY, G.C. Evaluation of fixed factors affecting hoof health. **Liv. Prod. Sci.** ,v.44,n.2,p.115-124,1995.

JOHNSON, R. C. & HARRIS, V. G. Differentiation of pathogenic and saprophytic *Leptospirae*. I.Growth at low temperatures. **J. Bacteriol.** 94, p.27-31, 1967

JOHNSON, R.C & FAINE, S. Family II *Leptospiraceae* . In: N.R.KRIEG and J.G.HOLT (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, The Williams and Wilkins Co., p.62-67, 1984.

JOUSIMIES-SOMER, H.R.; SUMMANEN, P.H.; FINEGOLD, S. M. *Bacteroides, Porphyromonas Prevotella Fusobacterium*, and other anaerobic GRAM-negative bacteria. In: MURRAY, P.R.; BARRON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER,F.C.; YOLKEN, R.H. (Ed.) **Manual of clinical Microbiology**. 6 ed. Washington: ASM Press, 1995. cap. 49, p.603-620.

KOENIG, S.; SHARIFI, A. R.; WENTROT, H.; LANDMANN, D.; EISE, M.; SIMIANER, H. Genetic Parametres of Claw and Foot Disorders Estimated with Logistic Models. **J Dairy Sci.** v. 88, p. 3316-3325, 2005.

KONEMAN,E.W.; ALLEN,S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN,Jr, W. C. Enterobacteriaceae in: **Diagnóstico Microbiológico texto e atlas colorido**. 5. ed .Rio de Janeiro,RJ. Editora Médica e científica Ltda 2001.p.177-261.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY**, vol. 1. 9. ed.Baltimore,USA, Williams & Wilkins, 1994.

LAINZ,A. Papillomatous digital dermatitis on a commercial dairy farm in Mexicali, México:Incidence and effect on reproduction and milk production. **Prev.Vet.Med.**,v.32, p.275-286,1997.

LANGWORTH, B. F. Fusobacterium necrophorum: its characteristics and role as an animal pathogen. **Bacteriol. Rev.**,v. 41,p. 373 –390, 1977.

LEACH,K.et. al. Claw lesions in dairy cattle:development of sole and White line haemorrhages during the first lactation. **Vet. J.** , v.154,p.215-225,1997.

LEIST, G.; RUDOLPH, R.; NATTERMAN, H. Digital dermatitis: a histopathological evaluation and some new aspects in pathogenesis of a multifactorial disease. **Bovine Prart.** , v.32,n.02,p.71-73,1996.

LEONARD,F.F.;OCORNNELL,OFARREL,K.J .Effect of overcrowding on claw health in first-calved Friesian heifers.Br.Vet.J.,v.152,n.4,p.459-472,1992.

LIVINGSTON, S. J.; KOMINOS, S. P. & ,YEE, R. B. New medium for selective and presuntive identification of the *B. fragilis* group. **J.Clinc.Microbiol.**, v.7.p. 448-453,1978.

MACEDO, M. de L. A P.; CARTAXO, R.S.; ALMEIDA,T. C. C.; SOUZA,L. B.S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases. **UNOPAR Cient. Biolog.Saúde**, Londrina, v.7 n.1, p.59-63, 2005

MAHON, C.; MANUSELIS, Jr.G. Introduction to clinical microbiology In: **Text Book of Diagnostic Microbiology** W.B. Saunders Company Philadelphia USA ,1995. p.80-88.

MAUCHLE, Ursula. Afecções podais em bovinos e conformação dos cascos. 2001. 76f. **Dissertação** (Mestrado em Clínica e cirurgia) – Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MELLAT, M.; JACQUEMIN, E.; BAKOUR, R.; MAINIL, J. Résistance aux antibiotiques de souches d' Escherichia coli bovines et aviaries isolées en Algérie. **Ann. Méd. Vét.** v.142, p.129/138, 1998.

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

MORTELLARO, C.M. Digital dermatitis. In: Symposium on disorders of the ruminant digit, N.8, 1994, **Banff. Program Proceedings and Abstracts**. A continuing Veterinary Education Program of the University of Saskatchewan Saskatoon: University of saskatchewan, p.137-141, 1994.

MOTER, A.; LEISTER, G.; RUDOLPH, R.; SCHRANK, K.; BONG-KYU, C.; WAGNER, M.; GÖBEL, U. B. Fluorescence *in situ* hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. **Micrbiol.**, v.144, p. 2459-2467, 1998

MUMBA, T. et al. Detection of spirochetes by polymerase chain reaction and its relation to the course of digital dermatitis after local antibiotic treatment in dairy cattle. **J. Vet. Med. B** v.46, p.117-126, 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for Bacteria that grow aerobically**. Approved Standard M7-A5. NCCLS, WaYne, Pa, 2000.e 2007.

NERCESSIAN, O.; FOUQUET, Y.; PIERE, C.; PRIEUR, D.; JEANTHON, C. Diversity of Bacteria and Archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment

sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge. *Environmen. Microbiol.* v.7, p.698-714, 2005.

NOCEK, J. E. **Hoof care for dairy cattle**. W.D. Hoard & Sons Company. Fort Artkinson. USA, 1993.p.1-13.

OHYA, T.; YAMAGUCHI, H.; NII, Y.; ITO,H. Isolation of *Campylobacter sputorum* from lesions of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle. **Vet. Rec.** ,v.145,p. 316-318, 1999.

PARDO, P. E, BREMER NETO, H.; CHIACCHIO, S.B. ;*et al.* Determinação de zinco da sola do casco de bovinos leiteiros com ou sem lesões podais, suplementados ou não com levedura seca de cana-de-açúcar. **Ciên. Ru.** Santa Maria, v.34, n. 5, p.1501-1504, 2004

PARDO, P. E. ;STURION, D. J. Afecções podais em bovinos leiteiros na região de Presidente Prudente, SP.[on line] maio,2002 .Disponível em :<http://www.unimar.br/ciencias/6-5-1.html>

QUINN, P. J.; CARTER, M.E.; MARKELY, B.K.; CARTER, G.R. Non-spore forming anaerobic bacteria. In: **Clinical veterinary microbiology**. Spain Wolfe publishing, GRAFOS.SA. 1994. Chap. 16. p 184 – 190

QUINN, P. J.;; MARKELY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELL,W. J.; LEONARD, F. G Infecções podais de bovinos, de ovinos e de suínos associados a agentes microbianos. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas.**, Porto Alegre : Artmed, 2005. 512

RAVEN,E.T. Diseases of the quick. In: **Cattle foot care and claw trimming** 1º.ed. United Kingdom. Farming Press Books , 1995 .128 p.

READ, D.H. et al. Papillomatous digital dermatitis and associated lesions of dairy cattle in Califórnia: Pathologic findings. In: SYMPOSIUM ON DISORDERS OF THE

RUMINANT DIGIT,.8, 1994. Banff. **Program proceedings and abstracts**; A continuing veterinary education program of the University of Saskatchewan. Saskatoon: University of Saskatchewan, p.156-163, 1994.

READ, D.H.; WALKER, R.L.; CASTRO, A. E. An invasive spirochaete associated With interdigital papillomatosis of dairy Cattle. **Vet. Rec.** ,p.59 – 60. 1992.

RIBEIRO,P.N. ; BORGES, J.R. J. ; RONCONI , M. A. Incidência de afecções podais em bovinos de corte abatidos no Estado do Rio de Janeiro.**Arq. Esc. Med. Vet. UFBA**, v.15,n.1,p.28-33,1992.

RIJPKEMA,S.G.T.; DAVID,G.P.; HUGHES,S.L.; WOODWARD,M.J. Partial identification of spirochaetes from two dairy cows with digital dermatitis by polymerase chain reaction analysis of the 16S ribosomal RNA gene. **Vet .Rec.** ,v.140, n.10, p.257-259, 1997.

RODRIGUEZ-LAINZ, A.; MELENDEZ-RETAMAL, P.; HIRD, D.W. et al. Papillomatous digital dermatitis in Chilean dairies and avaluation of a screening method. **Prev. Vet. Med.** , v.37, n.14, p. 197-207, 1998.

RUSSEL, A.M. et al. Survey of lameness in British dairy cattle. **Vet. Rec.**, v.111, n.7, p.155-160, 1982.

RUSSEL, J.;C, WOODWARD, J.M. Spirochaetes and other bacterial species associated with bovine digital dermatitis. **FEMS Microbiol Letters.**,v156, p.37-41,1997

RUSSEL, J.;C.;NAYLOR, R. D.; MARTIN, P. K. *et al.* A spirochete isolate from a case of severe virulent ovine foot disease is closely related to a Treponeme isolated from human periodontitis and bovine digital dermatitis. **Vet. Micrbiol.**,v.74, p. 249-257, 2000.

SHEARER, J. K. Lameness of dairy cattle: consequences and causes. **The Bov. Prac.**,v.32, n.1, 1997.

SHIBAHARA, T.; OHYA, T.; ISHII, 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, C. A.; Silva, L. A. F.; MESQUITA, A. J.; FIORAVANTI, M. C.S.; ACYPRESTE, C. S. Microbiota anaeróbia isolada de bovinos com pododermatite. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 51,n.3, p.207-212, 1999.

SILVA, L.A. ; BORGES, N. C.; SILVA, E. B.; SILVA, M. A. M.; SOUZA,V. R.; NUNES, A. G.;ESTROZI, F.; SOUZA,J. N. Laminite bovina.Suplemento técnico. **Revista do Concelho Federal de Medicina veterinária.** n. 31, p.28-37, 2004.

SILVA, L.A. F.; SILVA, C. A.; BORGES, J. R. J.; FIORAVANTI, M, C.S.; BORGES, G. T.; ATAYDE, I. B. A clinical trial to assess the use of sodium hypochlorite and oxytetracycline on the healing of the digital dermatitis lesion in cattle. **Can. Vet. J.** v. 46, p. 345-348, 2005

SILVA, L.A. F.; SILVA, L. M.; ROMANI, A. F.;RABELO, R. E.; FIORAVANTI., M, C.S.; SOUZA, T.M.; SILVA,C.A. Características clínicas e epidemiológicas das enfermidades podais em vacas lactantes do município de Orizona- Go. **Ciência Animal Brasileira**, v,2, p.119-126, 2001

SINGH, S. S.; WARD, W. R.; MURRAY, R. D. Aetiology and pathogenesis of sole lesions causing lameness in cattle: a review. **Vet.Bull.**, v. 63, n.3, p. 303 – 315, 1993

SMILIE, R.H.; HOBLET, K.H.; WEISS, W.P. et al. Prevalence of lesions associated with sub clinical laminitis in first-lactation cows from herds with high milk production. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v.208, n.9, p.1445-1451, 1996.

SOGSTAD, A, M.; FJELDAAS, T.; OSTERAS, O.; Lameness and claw lesions of the Norwegian Red dairy cattle housed in free stalls in relation to environment, parity, stage of lactation. **Acta Vet. Scand.**, v.46,n.4, p.203-217, 2005

SOUZA, R. C.; FERREIRA, P. M.; MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J. Perdas econômicas ocasionadas pelas enfermidades podais em vacas leiteiras confinadas em sistema *free stall*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**,v.58, n.6, p.982-987, 2006

SOUZA, Rogério Carvalho. Enfermidades podais em vacas leiteiras: eficiência e custos de tratamentos, efeitos na produção e reprodução, histopatologia e aspectos econômicos, 2005. 92 f. **Tese**(Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, Rogério Carvalho. Perfil epidemiológico e clínico das afecções podais em vacas nas bacias leiteiras de Belo Horizonte e Pedro Leopoldo. 2002. 76f. **Dissertação** (Mestrado em clínica e cirurgia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, T, M, : SILVA, C. A. Características clínicas e epidemiológicas das enfermidades podais em vacas lactantes do município de Orizona-GO. **Ciê. Anim. Brasi.** V. 2, n.2, p.119-126, 2001.

STAMM, L. V.; BERGEN, H. L.; WALKER, R. L. Molecular typing of papillomatous digital dermatitis-associated *Teponemas* isolates based on analysis of 16S-23 ribossomal 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 cattle. [online]. January, 1997, mf-2070, p.1-6. Available from internet: http://www.oznet.ksu.edu/dp_ansi/Dcattle.htm.

SUMMANEN, P. et al. **Wadsworth anaerobic bacteriology manual**. 5. ed. Belmont : Star Publishing Company, 1993. 230p

SUTTER, L.V.; VARGO, V. L.; FINEGOLD, M.S. **Wadsworth anaerobic bacteriology manual**, ed 2. Los Angeles: University of California Extension Division, 1975, p.75

SWEDEN, C. B. Infectious diseases of digits. In: GREENOUGH, P.R. (Ed.) **Lameness in cattle**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997,p.89-100

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. ; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. **Nucl. Acid. Res.** 22, 4673-4680, 1994.

TROTT, D. J.; MOELLER, M. R.; ZUERNER, R. L.; GROFF, J. P.; WATERS. W. R.; ALT, D.P.; WALKER, R. L.; WANNEMUEHLER, M. J. Characterization of *Treponema phagedenis*- like spirochetes isolated from papilomatous digital dermatitis lesions in dairy cattle. **J. Clin. Microbiol.**,v.41, n.6, p.2522-2529, 2003

VAN AMSTEL S,R.; SHEARER, J.K. Abnormalities of hoof growth and development. **Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Prac.**, v.17, n.1, p.73-91, 2001.

VAN AMSTEL, S. R.; VAN VUUREN, S.; TUTT, C. L. C. Digital dermatitis report of an outbreak. **JL.S. Afr. Vet. Ass.**, v. 66,n. 3, p. 177-181, 1995.

VERMUNT, J.J.; GREENOUGH, P.R. lesions associated with subclinical laminitis of the claws of dairy calves in two management systems. **Br. Vet. J.** ,v.151,n..4, p. 391 – 399, 1995.

VERMUNT, J.J.; GREENOUGH, P.R. Sole hemorrhages in dairy heifers managed under different underfoot and environmental conditions. **Br. Vet. J.**, v.152, n.1, p.57-73, 1996.

VERMUNT, J.J.; reflections on prevention and control of bovine lameness in Australian pature-based systems. The 14th International Symposium and 6th Conference on Lameness in Ruminants-Uruguay, 2006, p.10-14.

WALKER, R.L.; READ, D.H.; LORETZ, K.J.; NORDHAUSEN, R. W. Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. **Vet. Microbiol.** ,. v.47, p.343-355. 1995.

WEAVER, A.D. Digital papillomatosis and digital dermatitis in cattle In: GREENOUGH, P.R.(Ed.) **Lameness in Cattle**.2. ed. Philadelphia: W B Saunders , 1981. p.20-27.

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

WILSON, M. A.; RIMLER, R. B.; HOFFMANN, L.J. Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. **J. clin. Microbiol.** ,v. 30,n. 6,p.1518-1524, 1992.

WYSS, C.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; THURNHEER, T.; LUGINBÜHL, A. *Guggenheimella bovis* gen. nov., sp. nov., isolated from lesion of bovine dermatitis digitalis. **Inst. J. Syst. Evol. Microbiol.**,v.55, p.667-671, 2005

ZEMPLJIC, B. Digital dermatitis-The costs and benefits of the control. The 14th International Symposium and 6th Conference on Lameness in Ruminants-Uruguay, 2006, p.108-109.

XI- ANEXO 1

OUTRAS INFECÇÕES PODAIS RELEVANTES

1. Flegmão interdigital (*foot rot*): inflamação difusa dos tecidos moles do casco, caracterizada por uma abertura com necrose caseosa da derme do espaço interdigital e pelo aumento de volume difuso em torno da banda corionariana e do espaço interdigital. Presença de dor, claudicação de moderada a severa, diminuição da ingestão de alimentos, diminuição da produção de leite e hipertermia são achados freqüentes quando da doença, a qual apresenta caráter agudo. O *Fusobacterium necrophorum*, anaeróbio obrigatório, é o agente predominante. Como agentes secundários, são comumente encontrados anaeróbios pigmentados pertencentes ao gênero *Porphyromonas*, sendo *Porphyromonas levii* o mais comum, provavelmente agindo em sinergia com *Fusobacterium necrophorum*. São também encontradas, como agentes de infecção secundária, espécies do gênero *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, outras dos gêneros *Fusobacterium*, *Streptococci*, *Staphylococci* e *Corynebacterium* e vários fungos, estes últimos presentes quando há umidade no ambiente (BERRY, 2001). Normalmente, acomete um só membro posterior. A ocorrência de traumas ou condições que favoreçam lesões na pele interdigital são fatores predisponentes à enfermidade, pois permite a entrada de agentes microbianos (SWEDEN, 1997; BERRY, 2001).

2. Dermatite interdigital (frieira): inflamação, aguda ou crônica, restrita à epiderme da pele interdigital. Geralmente não causa claudicação e acomete vacas leiteiras estabuladas, principalmente quando em ambientes úmidos e com falta de higiene. Na fase inicial da doença, pode-se observar uma erosão difusa na epiderme interdigital (BERRY, 2001). A maioria dos casos crônicos caracteriza-se por hiperqueratose, com espessamento da pele interdigital e comissuras palmares, plantares e dorsais do espaço interdigital. Um exsudato seroso, cinzento e fétido pode estar presente. É freqüentemente acompanhada de erosão de talão e de úlcera de sola. O *Dichelobacter nodosus* pode ser agente primário ou secundário e pode haver ação sinérgica com *Fusobacterium necrophorum* (SWEDEN, 1997; Berry, 2001).

3. Hiperplasia interdigital: crescimento proliferativo da pele interdigital que pode ocupar todo o espaço interdigital ou parte dele. A presença de claudicação não é

comum, mas, se a lesão for grande ou tornou-se infectada secundariamente, pode ser observada (BERRY 2001). A ocorrência da hiperplasia interdigital é esporádica em vacas leiteiras e de corte, sendo mais freqüente em animais das raças Holandesa e Hereford. Normalmente a lesão inicia-se com o espessamento da pele interdigital adjacente à parede axial da unha lateral de membros posteriores. Quando a afecção atinge mais de uma das patas de animais jovens, sugere predisposição genética (GREENOUGH, 1997). A etiologia da enfermidade está baseada na irritação crônica da pele interdigital, irritação que pode ser decorrente de condições precárias de higiene, superfícies abrasivas ou mesmo má conformação dos cascos. A irritação crônica provocada por dermatite interdigital ou flegmão interdigital pode acarretar hiperplasia (BERRY, 2001).

4. Doença da linha branca : A linha branca é formada principalmente de tecido córneo laminar produzido pela camada germinativa da epiderme, localizando-se acima do cório laminar. Durante episódios de laminite, no cório laminar há formação de tecido córneo de má qualidade, aumentando a suscetibilidade às ações de forças mecânicas sobre o piso de concreto, assim como sobre as erosões do solo, resultando em doença da linha branca. As hemorragias no local são geralmente seguidas pelo aparecimento de pequenas fissuras oblíquas, localizadas na linha branca abacial próxima à junção muralha — talão. Quando esses processos ocorrem, há penetração de matéria orgânica e outros corpos estranhos entre a sola e a parede (linha branca), causando a formação de abscessos (GREENOUGH, 1997). A doença apresenta alta incidência em bovinos confinados com higiene precária. Animais que ficam em baixadas úmidas, e depois passam longos períodos semi-estabulados, são propensos a desenvolver a doença, geralmente associada à erosão do talão. Todos os fatores que ocasionam má qualidade do casco podem causar o aparecimento da separação da linha branca e provocar o abscesso. Os fatores mais comuns são estábulos sujos, úmidos, supercrescimento dos cascos, pododermatite asséptica difusa, cimento muito áspero ou pastos úmidos (BORGES & GARCIA , 1997). As unhas mais afetadas são as laterais dos membros posteriores.

A infecção não está correlacionada à instalação da laminite, entretanto, as alterações anatômicas provocadas pela laminite provocam fissuras do tecido córneo que proporcionam uma porta de entrada para invasão bacteriana, principalmente por anaeróbios, e eventual infecção (MERRIT & RISSER, 1998; BAGGOT &

RUSSEL, 1981; NOCECK, 1993; GREENOUGH, 1997 e 1998; BORGES & GARCIA, 1997; SINGH et al., 1993).

5. Úlceras de sola: são soluções de continuidade localizadas principalmente no cório solear, na junção sola—talão. Normalmente se iniciam como inflamação das lâminas do cório, podendo resultar em aprofundamento ou rotação da falange distal. O cório pode ser traumatizado pelo próprio tecido córneo irregular ou pelo apoio em superfícies, respondendo, algumas vezes, com formação de tecido de granulação que, em alguns casos, pode ser exuberante e sangrar facilmente (VEMUNT & GREENOUGH, 1996; VAN AMSTEL & SHEARER, 2001). Outras alterações — erosão de talão, doença da linha branca, sola dupla — estão freqüentemente associadas às úlceras de sola (ENEVOLDSEN et al., 1991^a; HOBLET & WEISS, 2001).

6. Úlceras de pinça: soluções de continuidade localizadas no ápice da pinça. Ocorrem como resultado de rotação da falange distal causada por laminite e pressão no cório, entre a falange e a pinça do casco, que provoca formação de tecido córneo de má qualidade e conseqüente úlcera de pinça. Há também possibilidade de penetração de matéria orgânica e bactérias que podem ocasionar abscessos, osteítes na parte distal da falange e possíveis fraturas patológicas (VAN AMSTEL & SHEARER, 2001).

7. Erosão do talão: perda irregular do tecido córneo bulbar que se inicia com a formação de pequenos orifícios arredondados que podem coalescer, formando profundas fissuras oblíquas (COLLICK, 1997). Poucas são as vacas de leite criadas em sistema intensivo que não apresentam algum grau da doença. Em estudos conduzidos nos Estados Unidos, em 17 rebanhos, sua prevalência em vacas primíparas foi de 44% e, em múltíparas, de 69% (COLLICK, 1997). MAUCHLE (2001) encontrou, em duas fazendas próximas a Belo Horizonte, a erosão do talão como a alteração mais freqüente. Segundo RAVEN (1995) e BAGGOT & RUSSEL (1981), o *Dichelobacter nodosus* é o agente mais freqüentemente isolado das lesões, seguido pelo *Fusobacterium necrophorum*. Ambientes úmidos e alta densidade de animais aumentam o risco da afecção, por aumentar os níveis de patógenos no ambiente. Está freqüentemente associada à dermatite interdigital (AMSTEL & SHEAVER, 2001). Segundo COLLICK & WEAVER (1997), úlcera de sola e doença da linha branca incluem-se como seqüelas de erosão de talão crônica e extensiva.

8. Hemorragia de sola e de muralha: extravasamento de conteúdo sanguíneo dos vasos, resultante de processos inflamatórios na circulação do cório, causados por substâncias vasoativas ou traumas, interferindo na homeostasia vascular e no fornecimento de nutrientes para os queratinócitos. A produção de tecido córneo de boa qualidade é interrompida e o aparecimento de hemorragias é freqüente, variando em tamanho e localização na sola e na muralha. As hemorragias são consideradas sinais de laminite, principalmente a de forma subclínica, e parte do processo patológico das úlceras de sola (HOBLET & WEISS, 2001).

9. Laminite (pododermatite asséptica difusa): distúrbio na microcirculação do cório, na junção epiderme-derme, acarretando alterações inflamatórias e degenerativas. As seqüelas incluem produção inadequada de tecido córneo, com amolecimento e descoloração difusa; hemorragias na sola, talão, linha branca e muralha; úlceras na sola e no talão; doença da linha branca; deformidades nos cascos. Os principais fatores relacionados com a etiologia da laminite são as doenças sistêmicas, idade, parto, fase da lactação, conformação genética, nutrição, manejo, exercícios, instalações e fatores intrínsecos ao animal (VERMUNT & GREENOUGH, 1995; SWITZERLAND, GREENOUGH, VERMUNT, 1997). Pode apresentar-se nas formas aguda, subaguda, subclínica e crônica. Na forma subclínica, não se tem sinais imediatos. Com o tempo, é diagnosticada pela formação de tecidos córneos de baixa qualidade, hemorragias de sola, na forma de petéquias ou difusas, sola amarela e macia ao corte. Doença da linha branca, úlceras de sola, deformação dos cascos, estrias horizontais, abscessos subsoleares e erosão do talão são suas complicações freqüentes. A laminite crônica é resultante de vários episódios de laminite, cuja ocorrência provoca distúrbios no crescimento do tecido córneo e conseqüente deformação dos cascos. A sola pode se apresentar plana e larga, as pinças alongadas, a muralha do casco com aspecto ondulado devido ao crescimento irregular. Nas formas aguda e subaguda, o aparecimento de sintomas como dor e claudicação são achados freqüentes e de aparecimento súbito. O animal reluta em deambular e apresenta alterações na postura e deambulação. Outros sinais - hiperemia, hipertermia, aumento da pulsação e engurgitamento das veias dos membros - podem ocorrer (SWITZERLAND, GREENOUGH, VERMUNT, 1997).

10. Deformações ungulares:

Casco em saca-rolha é condição hereditária que pode comprometer ambos os cascos posteriores ou anteriores, sendo mais comum nas unhas posteriores laterais. Sua ocorrência acarreta danos à angulação das falanges mediais e distais (GREENOUGH, 1997). Ocorre rotação da pinça para cima e para dentro, o que torna a sola oblíqua, incidindo todo o peso do animal sobre a parede lateral. É um dos defeitos ungulares mais freqüentes, principalmente em vacas holandesas (BORGES & GARCIA, 1997).

- Estrias horizontais são formas moderadas de fendas, pequenas depressões ou ondulações na muralha do casco, com arranjo horizontal. Estão normalmente associadas a doenças sistêmicas severas, estresse, anormalidades nutricionais, peso do animal e volume dos cascos.

- Casco em tesoura é deformidade assim chamada porque o casco assume forma de tesoura: ocorre cruzamento das pinças, pelo crescimento excessivo, com concavidade na parede axial. Seqüela de laminite crônica, o casco acometido apresenta superfície de aspecto rugoso e áspero (BORGES & GARCIA, 1997; & GREENOUGH, 2001).