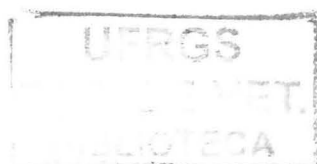


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DERMATITES DIGITAIS EM BOVINOS

Cláudio Estêvão Farias da Cruz

Porto Alegre
2004



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DERMATITES DIGITAIS EM BOVINOS

Autor: Cláudio Estêvão Farias da Cruz
Tese apresentada como um dos requisitos
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias.
Orientador: David Driemeier

Porto Alegre
2004

C957d Cruz, Cláudio Estêvão Farias da
Dermatites digitais em bovinos. / Cláudio Estêvão
Farias da Cruz - Porto Alegre: UFRGS, 2004.

77 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2004. David Driemeier, Orient.

1. Dermatite digital: bovinos 2. Doenças infecciosas
3. Imunoistoquímica 4. Treponema 5. Campylobacter
6. Fusobacterium I. Driemeier, David, Orient. II. Título

CDD 619.44

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

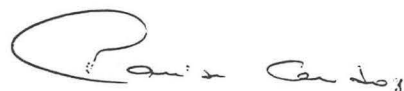
APROVADO POR:



Dr. JOSÉ RENATO BORGES,
Membro da Banca.



Dr. CLAUDIO BARROS,
Membro da Banca.



Dra. MARISA RIBEIRO DE ITAPEMA CARDOSO,
Membro da Banca.

AGRADECIMENTOS

Agradeço atentamente aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária – UFRGS. Fundamentalmente ao professor e amigo David Driemeier, pela orientação e incansável colaboração na realização deste e de outros trabalhos. Aos colegas Paulo Bender e Carlos Alberto Teixeira por proporcionarem importantes oportunidades durante a etapa de coleta de amostras. Às equipes das propriedades rurais Granja & Cabanha VB, Cabanha Laurita e Randon Agropecuária pelas amostras cedidas. Às Professoras Marisa Cardoso e Verônica Schmidt do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva desta unidade por suas valiosas sugestões e colaborações.

DERMATITES DIGITAIS EM BOVINOS¹

Autor: Cláudio Estêvão Farias da Cruz
Orientador: David Driemeier

RESUMO

Na primeira etapa deste estudo descrevem-se a ocorrência da dermatite digital no sul do Brasil, as condições ambientais nas quais tem sido observada e o aspecto macroscópico das lesões. O segundo artigo incluso neste trabalho aborda aspectos comparativos em diferentes lesões da pele digital de bovinos, cujos fragmentos embebidos em parafina foram seccionados e corados com Warthin-Starry, hematoxilina-eosina e, ocasionalmente, Grocott's methenamine silver. Amostras representativas dessas lesões foram testadas com soros antibacterianos, através do método imunohistoquímico da peroxidase, para identificação específica de bactérias. Os microorganismos observados nas lâminas coradas com prata foram classificados em quatro categorias principais. Enquanto espiroquetas foram os organismos mais prevalentes, outros elementos bacilares e esféricos estiveram também presentes em muitos cortes. Os testes imunohistoquímicos demonstraram que aproximadamente 80, 46 e 41% das amostras de dermatites digitais e interdigitais marcaram positivamente quando coradas com anticorpos policlonais contra *Treponema pallidum*, *Campylobacter jejuni*, e *Fusobacterium necrophorum*, respectivamente. Além disso, um organismo ramificado e filamentosos (presumivelmente um actinomiceto) esteve consistentemente presente nas lâminas de amostras de lesões interdigitais leves. A associação destes organismos com as populações microbianas mistas presentes nessas dermatites é indicativa de seu envolvimento na formação das lesões.

Palavras-chave: bovino, dermatites digitais, imunohistoquímica, *Treponema*, *Campylobacter*, *Fusobacterium*.

¹ Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias – Cirurgia e Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (77p.). Agosto de 2004.

BOVINE DIGITAL DERMATITIS¹

Author: Cláudio Estêvão Farias da Cruz
Adviser: David Driemeier

ABSTRACT

The first article of this study reports the occurrence of digital dermatitis in dairy cattle in southern Brazil, describes the environmental conditions in which it has been observed and the clinical appearance of the lesions. The second paper concerns a comparative study on several bovine digital skin lesions, from which paraffin-embedded fragments were sectioned and stained with Warthin-Starry, hematoxylin-eosin, and occasionally Grocott's methenamine silver. Representative samples were additionally screened with antibacterial sera associated with the peroxidase immunohistochemical technique for specific bacterial identification. Microorganisms observed in the silver-stained sections were classified into four major morphological types. While spirochetes were the most prevalent organisms, additional bacillary and coccoid elements were also present in most sections. Immunohistochemical probing demonstrated that approximately 80, 46 and 41% of the digital and interdigital dermatitis sections stained positively with polyclonal antisera to *Treponema pallidum*, *Campylobacter jejuni*, and *Fusobacterium necrophorum*, respectively. Moreover, an unidentified branching filamentous organism (presumed to be an actinomycetes species) was consistently present in the sections of samples from mild interdigital lesions. The immunohistochemical association of these organisms with the polymicrobial communities present in those bovine digital epidermitis lesions is indicative of their involvement in the formation of these lesions and demonstrates additional evidences for their frequently reported multifactorial etiology.

Keywords: bovine, digital epidermitis, immunohistochemistry, *Treponema*, *Campylobacter*, *Fusobacterium*.

¹ PhD Thesis in Veterinary Science, Animal Surgery and Pathology, Federal University of the Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (77p.). August, 2004.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 – Prevalência de lesões digitais e fatores predisponentes – aspectos gerais	5
2.2 – Dermatite digital (DD).....	7
2.3 – Dermatite interdigital (DI).....	12
2.4 – Necrobacilose ou flegmão interdigital (foot rot).....	13
2.5 – Hiperplasia interdigital ou fibroma.....	15
2.6 – Organismos associados com dermatites digitais em bovinos.....	17
2.6.1 – <i>Treponema</i> sp.....	17
2.6.2 – <i>Campylobacter</i> sp.....	21
2.6.3 – <i>Fusobacterium necrophorum</i>	23
2.6.4 – <i>Bacteroides</i> sp.....	24
2.6.5 – Infecções não-específicas.....	26
2.6.6 – Dificuldades de isolamento laboratorial.....	27
2.7 – Imunoistoquímica aplicada ao estudo das dermatites digitais bovinas.....	28
3 – ARTIGO 1.....	30
4 – ARTIGO 2.....	42
5 – DISCUSSÃO, CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	66
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Distribuição (%) por tipo de 883 lesões digitais, associadas com claudicação, diagnosticadas em um período de 18 meses em 4 rebanhos leiteiros do RGS.....	07
-----------	--	----

TABLES 2º ARTICLE

TABLE 1 -	Digital lesions recorded, their predominant clinical appearance and number of lesions sampled.....	59
TABLE 2 -	Total of positive WS-stained sections for the bacterial variations F1 to F4 per category of lesion. Between parentheses is presented the most frequent pattern of distribution of the organisms.....	59
TABLE 3 -	Summary of the principal histological changes observed in the sections from 8 samples of each lesion.....	60
TABLE 4 -	Results obtained by immunohistochemical testing. Between parenthesis is demonstrated the mean degree of the reactions*.....	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Situações de acúmulo de esterco (A) e lama (B) em instalações de bovinos leiteiros, freqüentemente, associadas com alta prevalência de dermatites.....	33
FIGURA 2 -	Aspecto macroscópico de lesões de dermatite digital em diferentes estágios de desenvolvimento.....	34
FIGURA 3 -	Dermatite digital severa com 7 (A) e 12 (B) semanas de desenvolvimento.....	35
FIGURA 4 -	Aspecto macroscópico de lesões de dermatite interdigital em diferentes estágios de desenvolvimento.....	36
FIGURA 5 -	Lesão recente de necrobacilose interdigital no membro à direita (A) e em estágio avançado com presença de necrose e erosão (B). Em (C), aspecto ventral da lesão anterior, mostrando associação com hiperplasia interdigital e dermatite interdigital.....	37
FIGURA 6 -	Área de dermatite interdigital papulosa (A) com espessamento do estrato córneo e presença de bactérias (setas), HE X 100. Em (B), dermatite interdigital com perda do estrato córneo, HE X 100.....	38
FIGURA 7 -	Presença de hiperplasia H , degeneração hidrópica D , necrose N e aglomerados de bactérias T nos estratos granuloso e espinhoso de lesão de dermatite digital com perda do estrato córneo, HE X 100 (A). Detalhe de dermatite digital (B) com degeneração, necrose e aglomerados de bactérias (setas), HE X 300. Dermatite digital, infiltrado inflamatório na derme, HE X 100 (C). Presença de hiperplasia pseudoepiteliomatosa (setas) em dermatite interdigital (D), HE X 100.....	39
FIGURA 8 -	Populações microbianas mistas em dermatites digitais. Presença de diferentes tipos bacterianos, Warthin-Starry, X 1000.....	40
FIGURA 9 -	Dermatite interdigital papulosa com paraqueratose e inúmeros organismos filamentosos invadindo o estrato córneo, WS X 100 (A). Detalhe dos organismos filamentosos ramificados, WS X 1000 (B). Aspecto da fragmentação dos filamentos em múltiplas formas curtas, WS X 1000 (C). Aspecto dos organismos filamentosos na coloração com GMS X 1000 (D).....	41

1. INTRODUÇÃO

As dermatites digitais bovinas permanecem representando um problema universal para pecuária, especialmente a leiteira (Wells *et al.*, 1999; Somers *et al.*, 2003). Estas dermatites são condições dolorosas e, aparentemente, contagiosas dos dígitos de bovinos (Walker *et al.*, 1995). A importância econômica dessas doenças atribui-se à diminuição da produção leiteira, ao comprometimento da performance reprodutiva, ao número aumentado de descartes antecipados e aos custos dos tratamentos e métodos de controle.

A prevalência das doenças digitais apresentou aumento considerável, coincidentemente, com a implementação de técnicas e instalações aprimoradas para manejo intensivo de gado leiteiro (Weaver, 1991; Radostits *et al.*, 1994; Molina *et al.*, 1999). Taxas anuais expressivas como 30% de animais afetados e 14% de descartes por problemas digitais em bovinos leiteiros têm sido registrados (Eddy & Scott, 1980; Radostits *et al.*, 1994). Dentre as lesões podais dos bovinos, somente serão abordadas, neste estudo, aquelas associadas com inflamação da pele digital, excluindo-se aquelas associadas com laminite e alterações córneas.

Entre as enfermidades digitais, a dermatite digital tem recebido destaque especial em função da distribuição universal (Cheli & Mortellaro, 1974; Blowey & Sharp, 1988; Amstel *et al.*, 1995; Read *et al.*, 1992; Rodriguez-Lainz *et al.*, 1999), alta prevalência e rápida disseminação nos rebanhos, além das dificuldades encontradas no seu controle (Blowey & Sharp, 1988; Döpfer *et al.*, 1997; Read & Walker, 1998; Wells *et al.*, 1999; Luginbuhl & Kollbrunner, 2000).

Diferentemente do que tem ocorrido com os problemas podais relacionados com laminite, os surtos de dermatites têm sido associados com consideráveis dificuldades de controle. Embora existam métodos bem estabelecidos para o tratamento e controle das dermatites digitais, as taxas de prevalência e recorrência dessas dermatites permanecem alarmantes. Nos USA, mais de 70% dos rebanhos estão infectados. Entretanto, alguns pesquisadores têm sugerido que a dermatite digital poderia haver sido prevenida em grande porcentagem dos

rebanhos infectados, caso estratégias relacionadas à biosegurança e às condições ambientais houvessem sido aplicadas (Wells *et al.*, 1999).

Vários organismos anaeróbios obrigatórios têm sido associados com as dermatites digital e interdigital. Espiroquetas do gênero *Treponema* têm sido as bactérias mais consistentemente identificadas, inclusive têm sido encontradas formando colônias em lesões ativas e invadindo a epiderme. Devido às semelhanças existentes entre essas duas formas de dermatites, alguns pesquisadores têm sugerido, recentemente, que ambas são formas diferentes do mesmo complexo de doença (Blowey *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1995; Berry, 2001). Apesar do exposto, não há evidências diretas do envolvimento de *Treponema* como agente etiológico primário nessas doenças, mas é muito provável que sejam responsáveis por mediar, pelo menos, parte da sua patologia. Nesse contexto, não há modelos de virulência completamente satisfatórios para estas bactérias digitais.

Enquanto *Fusobacterium necrophorum* e *Bacteroides* spp. têm sido consistentemente associados com necrobacilose interdigital (Berg & Loan, 1975; Cook & Cutler, 1995; Doherty *et al.*, 1998) e dermatite interdigital (Laing & Egerton, 1978; Greenough *et al.*, 1981), espiroquetas também têm sido demonstradas em lesões de necrobacilose interdigital (Doherty *et al.*, 1998) e dermatite interdigital (Blowey *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1995). Além disso, as características morfológicas que permitem diferenciação das condições que afetam a pele digital bovina não são sempre claras e, inclusive, essas lesões podem ser inter-relacionadas ou ocorrer simultaneamente (Hull *et al.*, 1993; Sheldon, 1994; Venter & Amstel, 1994). Portanto, alguma sobreposição pode existir na etiopatogenia dessas condições (Blowey *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1995; Doherty *et al.*, 1998; Read & Walker, 1998).

Populações microbianas complexas (Sabo *et al.*, 1988; Döpfer *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 2003) e fatores ambientais (Sabo *et al.*, 1988; Rodriguez-Lainz *et al.*, 1996 e 1999) têm sido incluídos na etiopatogenia multifatorial proposta para dermatite digital. Embora ainda não completamente esclarecida, a associação de lesões de dermatite digital com diversos organismos anaeróbicos obrigatórios incluindo *Bacteroides* sp. (Blowey & Sharp, 1988; Sabo *et al.*, 1988; Collighan & Woodward, 1997), *Campylobacter* sp. (Döpfer *et al.*, 1997; Ohya *et al.*, 1999) e *Fusobacterium necrophorum* (Sabo *et al.*, 1988; Döpfer *et al.*, 1997) tem sido registrada. Tem sido sugerido que a dermatite digital poderia iniciar e progredir

através de alterações na composição das espécies destas comunidades complexas, concomitantemente com mudanças ambientais, à semelhança do que ocorre na doença periodontal humana (Edwards *et al.*, 2003), onde o sinergismo entre estes organismos tem sido relatado como necessário para sobrevivência e início da inflamação (Kolenbrander *et al.*, 1995).

As dificuldades associadas com o cultivo de bactérias anaeróbicas obrigatórias têm prejudicado, consideravelmente, as pesquisas relacionadas à etiologia de doenças envolvendo estes organismos, durante décadas. Entretanto, o advento dos processos moleculares e imunológicos tem revolucionado este campo de pesquisas, onde muitas espécies ainda não cultivadas têm sido identificadas. Inclusive, bactérias envolvidas nas doenças digitais têm sido, freqüentemente identificadas através destes métodos (Döpfer *et al.*, 1997; Demirkan *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2003).

A falta de uma terminologia padronizada em lesões digitais bovinas (Radostits *et al.*, 1994; Venter & Amstel, 1994; Silveira *et al.*, 1988; Molina *et al.*, 1999) está relacionada com a nomenclatura variada, as dificuldades em realizar exames digitais em bovinos, escassez de trabalhos nessa linha e aquelas inerentes à própria doença podal que, muitas vezes, apresenta sobreposição simultânea de lesões. Entretanto, na última década, devido à globalização do conhecimento, principalmente associada à disseminação de informações através da *Internet*, esse quadro tem se alterado.

Programas de pesquisa voltados à identificação dos agentes infecciosos envolvidos, aos fatores predisponentes e às medidas de tratamento e controle têm sido mantidos em países desenvolvidos e têm produzido, praticamente, todo conhecimento atual sobre estas doenças, o que inclusive tem auxiliado países como o Brasil a enfrentar problemas semelhantes.

No Brasil, apesar de haver poucos registros sobre o assunto, alguns estudos já indicavam a ocorrência das dermatites digitais (Borges *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 1999). Além disso, tanto observações clínicas como constatações em abatedouros indicam que tais doenças têm causado também grande impacto sobre a performance dos rebanhos bovinos nacionais, especialmente, os leiteiros. No Rio Grande do Sul, dados preliminares revelaram que as dermatites digitais podem afetar aproximadamente 30 % de alguns rebanhos leiteiros (Cruz *et al.*, 2001), cuja performance, é, desta forma, afetada sobremaneira.

O presente trabalho inclui dois artigos que descrevem os achados nesta linha de investigação. O Artigo 1 relata a ocorrência da doença no Rio Grande do Sul, descreve as condições ambientais em que foi observada, bem como apresenta, embora resumidamente, a descrição clínica e histológica das lesões. O artigo 2 descreve os achados referentes aos estudos histológicos e imunoistoquímicos associados aos microorganismos que colonizam essas lesões. Essa investigação foi realizada em 250 amostras de lesões de pele digital bovina coletadas tanto em propriedades leiteiras como em frigoríficos no estado do Rio Grande do Sul.

Entre os objetivos deste estudo, destacam-se as investigações de correlações etiológicas entre as diferentes formas clínicas de dermatites digitais bovinas e alguns microorganismos anaeróbicos obrigatórios. Várias têm sido as bactérias relacionadas nestas enfermidades, entretanto espécies dos gêneros *Treponema*, *Bacteroides*, *Campylobacter*, e *Fusobacterium* têm sido as mais freqüentemente associadas às dermatites digitais bovinas, motivo pelo qual foram incluídas neste estudo. Adicionalmente, buscou-se identificar alterações histológicas que pudessem caracterizar as formas distintas de dermatite.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Prevalência de lesões digitais e fatores predisponentes – aspectos gerais

A introdução de técnicas modernas para manejo intensivo nos rebanhos leiteiros tem sido associada a um aumento significativo na prevalência das lesões digitais tanto no Brasil (Borges *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2001), como em outros países. A prevalência de animais afetados tem variado entre 7 e 55% e as lesões mais comumente registradas têm sido erosão do talão (4,5 – 88%), hemorragia de sola (28 – 48%), doenças da linha branca (5,3 – 45%), úlcera de sola (3 – 35%), dermatite digital (0,7 – 35%), ruptura e abscesso de sola (9 – 31%), fibromas (4 – 31%), dermatite interdigital (0,7 – 17,8%), necrobacilose interdigital (2,4 – 16,7%) e infecção profunda (0,7%) (Eddy & Scott, 1980; Russel *et al.*, 1982; Petersen & Nelson, 1984; Silveira *et al.*, 1988; Clarkson *et al.*, 1996; Argaez Rodriguez *et al.*, 1997; Bergsten *et al.*, 1998; Borges *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2001). A prevalência de lesões digitais associadas com claudicação observada em 4 rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul está apresentada na Tabela 1.

Trauma direto ou uma combinação de fatores nutricionais e ambientais podem causar doenças digitais em bovinos. Laminite, a inflamação asséptica das membranas dermais internas do dígito, é considerada a principal causa de lesões podais córneas de origem metabólica (Radostits *et al.*, 1994). Embora de etiologia e patogenia ainda incompletamente conhecidas, esta alteração tem sido referida

como uma síndrome de etiologia multifatorial. Nutrição e laminite estão inter-relacionadas através de desequilíbrios no metabolismo dos carboidratos: sobrecarga de carboidratos fermentáveis no rúmen em associação com inadequação de fibra efetiva. A ligação crítica entre nutrição, acidose e laminite parece estar associada a uma alteração hemodinâmica nos pequenos vasos periféricos, ocasionando uma hipoperfusão permanente, que resulta em isquemia digital e deterioração córnea (Nocek, 1997).

Alterações hormonais associadas com a parição e outras fases do ciclo da lactação podem causar algum impacto sobre certas alterações fisiológicas. Doenças infecciosas tais como mastites, metrites, "podridão do casco", etc. podem originar lesões endotoxêmicas específicas. Aspectos ambientais tais como estábulos com pisos duros, ausência de camas ou de material de cobertura nas camas, pouco exercício ou exercício excessivo sobre superfícies inadequadas podem predispor os animais a dano mecânico. Outros fatores tais como condição corporal, peso corporal e estrutura das pernas e dos pés podem também aumentar a carga sobre os cascos exacerbando injúrias mecânicas internas associadas com laminite. Apesar de constituir assunto controverso, laminite tem sido descrita nas formas aguda, subclínica e crônica. Certas lesões córneas específicas, incluindo malformações das unhas, hemorragias de sola, descoloração amarelada da sola, úlceras de sola, ferimentos e penetrações da sola, erosões de talão e alterações da linha branca têm sido considerados efeitos secundários à laminite (Baggott & Russel, 1981; Shearer & Horn, 1992; Hull *et al.*, 1993; Allestein, 1994; Vermont & Greenough, 1994; Nocek, 1997).

Fatores ambientais associados, especialmente, com os processos inflamatórios da pele digital dos bovinos incluem a qualidade e as condições higiênicas dos pisos ou superfícies onde os animais são mantidos ou aos quais têm acesso (Williams *et al.*, 1986; Radostits *et al.*, 1994; Vermont & Greenough, 1994; Rodriguez-Lainz *et al.*, 1999; Vokey *et al.*, 2001). Apesar de observações opostas (Bassett *et al.*, 1990), o contato dos dígitos bovinos com essas más condições ambientais tem sido associado com maior prevalência das lesões digitais infecciosas. Adicionalmente, a dermatite digital pode também estar ligada

à importação de animais portadores (Radostits *et al.*, 1994; Rodriguez-Lainz *et al.*, 1996; Read & Walker, 1998; Cruz *et al.*, 2001).

Tabela 1. Distribuição (%) por tipo de 883 lesões digitais, associadas com claudicação, diagnosticadas em um período de 18 meses em 4 rebanhos leiteiros do RGS.

Tipo de lesão	Rebanhos				Total
	1	2	3	4	
Dermatite digital	27.6	38.2	26.5	21.3	29.9
Dermatite interdigital	19.5	19.4	17.5	13.9	17.8
Hiperplasia interdigital	7.3	16.7	7.6	5.0	10.4
Flegmão interdigital	5.7	1.4	2.7	1.5	2.4
Erosão de talão	4.9	3.9	4.5	5.4	4.5
Úlcera de sola	17.1	9.3	21.9	30.2	18.3
Corte de sola e abscesso	10.2	7.0	12.6	15.7	10.7
Doença da linha branca	7.3	3.3	6.7	5.9	5.3
Artrite, osteomielite.	0.4	0.8	-	1.1	0.7

Fonte: Cruz *et al.*, 2001.

2.2 Dermatite digital (DD)

As lesões de dermatite digital têm sido, rotineiramente, caracterizadas por seu aspecto erosivo-proliferativo e por sua localização anatômica comum na superfície dérmica plantar que limita, posteriormente, o espaço interdigital, o qual, pode ou não estar envolvido (Blowey & Sharp, 1988; Read *et al.*, 1992). Locais menos comuns incluem os limites palmares interdigitais posteriores, superfícies digitais dorsais e proximidades da unha acessória (Berry, 2001). A doença foi registrada, inicialmente, em bovinos leiteiros estabulados e descrições em bovinos de corte ou leite manejados em pastagens têm sido ocasionais.

A aparência das lesões, localização característica nos membros posteriores e a predileção pelas junções pele-tecido córneo, especialmente aquelas próximas dos talões e do espaço interdigital distinguem esta doença de outras dermatites bovinas (Read & Walker, 1998). Lesões iniciais têm aparência erosiva. Na maioria dos casos, medem de 2 a 6 cm, são circulares ou ovais e têm bordos, claramente, elevados. Pêlos hipertrofiados, freqüentemente, apresentam-se nos bordos das lesões. As superfícies das lesões podem ter papilas filiformes com comprimentos variando entre 1 mm e 3 cm e, diâmetros, entre 0,5 e 1 mm. Lesões sem papilas filiformes podem ter superfície granular. As lesões variam em cor e aparência. Superfícies lavadas são, geralmente, dolorosas, vermelhas e granulares ou apresentam-se em composições contendo papilas brancas, amarelas, cinzas, marrons ou pretas e áreas granulares vermelhas. As lesões sangram, facilmente, se traumatizadas (Berry, 2001).

Alterações histológicas incluem (1) placa circunscrita de epiderme acantótica erodida acompanhada por proliferação papilomatosa e paraqueratótica profusamente colonizada por flora bacteriana dominada por espiroquetas, (2) perda de estrato granuloso, (3) invasão do estrato espinhoso por espiroquetas e (4) infiltração de neutrófilos, células plasmáticas, linfócitos e eosinófilos na derme. A histopatologia auxilia para confirmar o diagnóstico de DD, mas não é necessária, pois as lesões são, facilmente, reconhecidas devido à aparência e localização características (Blowey & Sharp, 1988; Read & Walker, 1998).

Odor pútrido pode ou não estar presente e parece ser devido ao crescimento bacteriano secundário no exsudato que cobre as lesões. Casos não complicados apresentam-se sem edema digital. Claudicação é característica em rebanhos com alta prevalência de DD, mas não é um achado constante em casos individuais, nem, consistentemente, relacionado com tamanho e maturidade de lesão. Caso permaneçam sem tratamento, as unhas dos dígitos com lesões DD podem desenvolver aspecto encastelado, pois os animais afetados preferem apoiar o peso nas pinças que sofrem desgaste, às vezes, expondo o cório nestas áreas. Exposições do cório também podem ocorrer na região dos talões de unhas

de dígitos com lesões DD crônicas, proliferadas e não tratadas (Blowey & Sharp, 1988; Gourreau *et al.*, 1992; Amstel *et al.*, 1995).

O diagnóstico diferencial para DD inclui dermatite interdigital, hiperplasia interdigital, lesão traumática com tecido de granulação e necrobacilose interdigital. Casos envolvendo problemas de claudicação em rebanhos deveriam incluir os problemas associados com laminite, excessivo desgaste de sola e impropriedade ou ausência de correção de cascos (Berry, 2001).

Quando introduzida em um rebanho, DD dissemina-se rapidamente entre as vacas adultas, muitas vezes, afetando a maioria dos adultos no primeiro ano de infecção. Quando estabelecida em um rebanho, a claudicação é mais comumente vista em vacas de primeira e segunda lactação, usualmente após entrada no lote de ordenha. Lesões estão, tipicamente, presentes em uma significativa proporção das vacas mais velhas, mas a claudicação é muito menos evidente do que nos animais jovens. Na Califórnia, a doença parece ser mais severa durante os meses de primavera e verão, mas é mais severa nos meses de inverno na Europa. Animais mantidos em pastagens são esporadicamente afetados. DD é quase exclusivamente vista em bovinos leiteiros, sem predileção de raça ainda demonstrada. A erradicação da doença de um rebanho afetado foi documentada em um pequeno rebanho de uma universidade (Walker *et al.*, 1997; Read & Walker, 1998).

Os principais fatores de risco associados à ocorrência de DD em alta prevalência têm sido excesso de umidade, barro ou esterco nas instalações, compra de animais para reposição, emprego de prestadores de serviços externos para correção de cascos e falta de higiene com equipamento de casqueamento. A doença foi transmitida experimentalmente aplicando-se raspados de lesões DD em dígitos de terneiros mantidos constantemente em locais com excesso de umidade e material fecal, além de baixa tensão de oxigênio. Estas condições são rotineiramente encontradas em propriedades leiteiras com instalações de confinamento, onde o manejo do esterco e a higiene não são adequados (Blowey & Sharp, 1988, Read & Walker, 1998).

Vários organismos anaeróbicos obrigatórios têm sido associados com DD. Espiroquetas do gênero *Treponema* têm sido identificados mais consistentemente em colônias bacterianas nas lesões ativas, além de haverem sido encontradas invadindo epiderme e derme digitais. Embora as lesões DD demonstrem semelhanças com papilomas virais, estes vírus ainda não foram encontrados nas lesões. Evidências atuais indicam que DD é multifatorial, envolvendo fatores ambientais, microbianos, relativos ao hospedeiro e ao manejo. Fatores tais como pisos ásperos, mal drenados, com acúmulo de fezes e urina, sujeira, umidade, ou falta de conforto das camas e superlotações têm efeito adverso sobre a saúde digital e poderiam aumentar o risco de DD (Rebhun *et al.*, 1980; Read & Walker, 1998). Outros organismos anaeróbicos que também têm sido implicados na etiologia da dermatite digital incluem espécies dos gêneros *Bacteroides*, *Campylobacter*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* (Blowey & Sharp, 1988; Sabo *et al.*, 1988; Gourreau *et al.*, 1992; Allestein, 1994; Döpfer *et al.*, 1997; Ohya *et al.*, 1999).

O modo de transmissão entre vacas e entre rebanhos não é claro. Vacas afetadas, clínica e subclínicamente, contaminações em instrumentos de correção de cascos, trailers de transportes de animais e equipamento rurais podem ser fontes para rebanhos sem a doença. Anticorpos contra dois tipos antígenicamente distintos de espiroquetas têm sido encontrados em rebanhos com DD, entretanto não foram observadas reações cruzadas entre os dois tipos nem com outras doenças causadas por espiroquetas em bovinos. A concentração da doença em animais jovens de rebanhos cronicamente afetados sugere que algum grau de imunidade pode se desenvolver em vacas mais velhas. Entretanto, ao que parece, esta imunidade, se existe, é temporária ou incompleta. Até 60% de vacas recuperadas com sucesso têm apresentado recorrência, 7 a 15 semanas após tratamento. Regressão espontânea de lesões também tem sido observada, mas raramente (Walker *et al.*, 1997; Read & Walker, 1998; Berry, 2001).

Diversas são as referências feitas à eficácia dos tratamentos com antibióticos, locais ou em pedilúvios, aplicados às lesões de dermatite digital (Blowey & Sharp, 1988; Read *et al.*, 1992; Read, 1994; Shearer & Elliott, 1998;

Read & Walker, 1998; Laven & Proven, 2000; Manske *et al.*, 2002). Além disto, formulações não antibióticas têm tido sua eficácia testada contra as soluções antibióticas para o tratamento e controle de lesões de dermatite digital (Britt *et al.*, 1996; Hernandez *et al.*, 1999; Laven & Hunt, 2001; Moore *et al.*, 2001). Aspecto interessante é o fato de que lesões de dermatite têm respondido diferentemente ao tratamento com oxitetraciclina em função da localização das lesões (Hernandes & Shearer, 2000). Registros de produtos não antibióticos eficazes são escassos (Hernandes *et al.*, 1999; Britt *et al.*, 1996; Shearer & Hernandez, 2000).

O tratamento mais comum para DD envolve o uso tópico de antibióticos tais como oxitetraciclina, lincomicina ou lincomicina/espectinomicina, aplicados em spray ou bandagens. Para uso em spray local, oxitetraciclina ou lincomicina são misturados em água destilada ou deionizada na proporção de 25 e 8 g / L, respectivamente, e aplicadas diretamente sobre as lesões. A taxa de recorrência é alta e o tratamento deve ser repetido a cada 3-7 dias para controlar a doença. Não tem havido registros de níveis de resíduos preocupantes devido a estes tratamentos. O uso sistêmico de antibióticos como penicilina e ceftiofur tem sido relatado como eficiente por pesquisadores norte-americanos, mas necessita o descarte do leite. Esta terapia não foi eficiente nos casos da Europa (Blowey & Sharp, 1988; Read & Walker, 1998; Britt *et al.*, 1999).

Pedilúvios contendo 5% formalina, lincomicina (1-3 g / L), oxitetraciclina (1-4 g / L), sulfato de cobre (0,25-1 g / L) ou sulfato de zinco (20%) promoveram efetivo controle da doença em rebanhos infectados. Em grandes rebanhos, pedilúvios podem ser mais efetivos para controlar DD, quando a doença ocorre em baixa prevalência (menos que 10%). Em casos de alta prevalência, tratamento tópico individual é, provavelmente, mais eficaz. A eficácia dos pedilúvios pode ser reduzida, se fezes e resíduos se acumulam na solução de tratamento. Este problema pode ser minimizado com a utilização de dois tanques em série, o primeiro contendo água ou uma leve solução detergente para limpeza dos dígitos e o segundo contendo a solução de tratamento. As soluções de tratamento devem ser trocadas a cada 150 – 300 passagens de animais. Estes tanques devem ter medidas aproximadas de 350 cm de comprimento, 80 a 90 cm de

largura e entre 15 e 18 cm de altura. Os tanques devem ser cobertos para minimizar diluição pelas chuvas e devem ser localizados em áreas estratégicas dos centros de manejo dos animais, preferencialmente nos caminhos de saída da sala de ordenha, para evitar o risco de respingos destas soluções nos tetos antes da ordenha. Os banhos deveriam ser repetidos a cada 3 ou 7 dias, conforme o caso (Blowey & Sharp, 1988; Mortellaro, 1994; Berry, 2001). A melhoria das condições de higiene das instalações e ambientes das vacas, associada com a disponibilidade de áreas de descanso secas e confortáveis, redução da concentração de animais nos lotes e melhoria da ventilação podem resultar em diminuição da prevalência e severidade de casos clínicos. Equipamentos de correção de cascos, troncos de casqueamento e transportes de animais deveriam ser, cuidadosamente, limpos, para evitar a transmissão do agente de DD entre propriedades.

2.3 Dermatite interdigital (DI)

Essas lesões têm sido descritas como formas mais leves de epidermite que afetam a pele desprovida de pêlos do espaço interdigital e caracterizam-se por erosões da derme, sem formação de papilas filiformes, sem extensão aos tecidos profundos e que, usualmente, causa sinais clínicos leves (Greenough *et al.*, 1981; Weaver *et al.*, 1981; Toussaint Raven, 1985; Gourreau *et al.*, 1992; Hull *et al.*, 1993; Venter & Amstel, 1994).

Erosões epidérmicas difusas e multifocais na fenda interdigital podem ser vistas em casos precoces. Lesões mais crônicas apresentam hiperqueratose, a qual confere aparência enrugada tanto à pele interdigital quanto às comissuras dorsal e ventral. Exsudato fétido, cinzento e seroso pode estar presente. Esta condição é, freqüentemente, acompanhada por erosões de talão. Esta condição difere de necrobacilose interdigital (foot rot), cuja infecção se estende à derme, causando a formação de fissura, infecção de estruturas profundas e celulite do boleto e da quartela. A condição também foi referida como doença multifatorial (Toussaint Raven, 1985).

A doença ocorre em bovinos leiteiros, especialmente, confinados em ambientes úmidos, entretanto, animais de corte ou leite manejados a campo, onde há muitas chuvas e formação de áreas lamacentas, também podem ser afetados. Frequentemente, os quatro membros estão afetados (Allestein, 1994). Embora a dermatite interdigital seja frequentemente referida como sendo causada por infecções envolvendo *Dichelobacter (Bacteroides) nodosus* (Weaver *et al.* 1981; Toussaint Raven, 1985; Allestein, 1994) em conjunto ou não com *Fusobacterium necrophorum* (Gourreau *et al.*, 1992; Hull *et al.*, 1993), recentes estudos (Blowey *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1995) têm acumulado evidências indicativas de que a dermatite interdigital e a dermatite digital sejam doenças inter-relacionadas ou pertencentes ao mesmo complexo de doença, sendo causadas por espiroquetas do gênero *Treponema* (Blowey *et al.*, 1994; Blowey & Done, 1995; Walker *et al.*, 1995). Ambas as dermatites compartilham características histológicas, incluindo o envolvimento das espiroquetas e ambas podem ser, eficientemente, tratadas com antibióticos tópicos ou pedilúvios contendo 5 a 10% de sulfato de zinco ou cobre. Relatos de que os organismos podem sobreviver em erosões profundas de talão, resistindo, assim, à ação dos banhos, alerta para que aquelas alterações sejam corrigidas regularmente. Entretanto, às vezes, os aspectos morfológicos que determinam a diferenciação entre estas condições podem não ser evidentes, especialmente em casos de lesões concorrentes (Sheldon, 1994; Doherty *et al.*, 1998; Demirkan *et al.*, 1999). As lesões de dermatite, frequentemente, desenvolvem-se sobre fibromas pré-existentes no espaço interdigital (Berry, 2001).

2.4 Necrobacilose ou flegmão interdigital (*foot rot*)

Condição infecciosa caracterizada por formação de fissuras, necrose da pele e dos tecidos subcutâneos do espaço interdigital e edema digital difuso. Dor, claudicação moderada a severa e febre também podem ser sinais comuns da doença. Odor fétido característico, usualmente, ocorre devido à presença de *Fusobacterium necrophorum*. Caso não tratada, precocemente, artrite séptica é uma seqüela comum (Baggott & Russell, 1978; Allestein, 1994).

Sinais clínicos são agudos ou hiperagudos, incluindo eritema e claudicação severa com marcado edema ao redor da banda coronária e no espaço interdigital. É comumente encontrada em um único pé, sendo mais freqüente nos posteriores. Animais apresentam claudicação leve nas primeiras 24 horas, diminuição da produção de leite e febre. Durante a fase inicial, a enfermidade afeta os tecidos profundos, não havendo lesão visível no espaço interdigital (Hull *et al.*, 1993). Com o passar do tempo, a claudicação torna-se severa, havendo então, usualmente, lesão necrótica no espaço interdigital e odor fétido. Sinais são característicos e suficientes para confirmar o diagnóstico (Berry, 2001). O diagnóstico diferencial inclui artrite séptica como seqüela de úlcera de sola, de abscessos da linha branca ou de outras lesões. A maioria das artrites sépticas envolve edema de apenas um dígito e não apresentam necrose interdigital. Em contraste com as dermatites, somente há envolvimento da pele, com desenvolvimento de fissuras e necrose, após ter produzido marcado edema digital (Weaver *et al.*, 1981; Petersen & Nelson, 1984; Hull *et al.*, 1993).

A condição tem sido reconhecida há muitos anos, universalmente. A ocorrência é esporádica em bovinos de corte ou leite. Afeta todas idades, sendo mais comum durante condições de umidade. Vacas estabuladas presas têm menor risco do que as confinadas soltas. Vacas de primeira lactação apresentam maior risco (Berry, 2001). Sua ocorrência pode estar associada a outros problemas podais. Traumas ou outras condições que predisponham ao dano do tecido interdigital podem permitir a entrada dos organismos causadores. Exemplos destas condições incluem pedras, restevras de lavouras, pedaços de madeira, terrenos acidentados, constante contato com acúmulos de esterco ou com barro seco e as dermatites (Hull *et al.*, 1993; Radostits *et al.*, 1994; Rebhun *et al.*, 1995).

A bactéria mais comumente isolada destas lesões é o *Fusobacterium necrophorum*. Invasores secundários são comumente encontrados e acredita-se que atuem em sinergismo com *F. necrophorum*. Os mais comuns têm sido os anaeróbicos produtores de pigmentos do gênero *Porphyromonas*. Outros incluem *Prevotella*, *Peptostreptococcus* e outros *Fusobacterium*. A presença de espiroquetas também tem sido relatada, esporadicamente (Doherty *et al.*, 1998).

Outros estudos sugerem que *Bacteroides melaninogenicus* penetra na epiderme, proporcionando acesso para *Fusobacterium necrophorum* que produz a celulite levando à claudicação (Berg & Loan, 1975; Clark *et al.*, 1985).

Clinicamente, pode ser difícil distinguir se uma lesão é um caso precoce de foot rot ou um caso severo de DI. Muitos casos de DI têm pronunciado odor fétido, também característico em DD. Em lesões DI não há formação de fissuras no epitélio nem o envolvimento da derme visto em foot rot. Muitas DI respondem bem aos antibióticos locais, como DD, mas foot rot necessita tratamento parenteral.

Usualmente responde, adequadamente, à antibioticoterapia parenteral precoce com penicilina (22.000 UI / kg IM – 3 dias) ou oxitetraciclina de ação prolongada (10 mg / kg IM – dose única). Entretanto, outros antibióticos sistêmicos administrados por 3 a 5 dias também podem ser empregados, tais como a amoxicilina e o ceftiofur. Pedilúvios contendo 5-10% de sulfato de cobre ou zinco são indicados como preventivos. O tratamento imediato é crucial para o sucesso. Casos crônicos complicados necessitam tratamento e cuidados especiais. Práticas de manejo que atenuam a prevalência da doença incluem a adequada manutenção do ambiente dos animais, evitando os traumas do tecido interdigital (Hull *et al.*, 1993; Allestein, 1994; Rebhun *et al.*, 1995). Adicionalmente, uma forma severa de *foot rot*, também denominada *super foul* ou *super foot rot*, tem sido descrita nos Estados Unidos e Europa. Nestes casos, em apenas 12 horas, severa necrose interdigital pode estar presente. O tratamento de rotina para foot rot não é adequado para tratar esta forma, a qual requer terapia rápida, em altas doses e continuada por até 8 dias, além de outras medidas. Ainda assim, muitos casos não respondem (David, 1993; Cook & Cuttler, 1995; Berry 2001).

2.5 Hiperplasia interdigital ou fibroma

Essa lesão consiste em um crescimento proliferativo que pode ocupar o espaço interdigital ou parte dele. A conformação digital pode exercer papel importante na patogenia. A claudicação não é comum, a menos que a lesão seja muito grande ou se torne secundariamente infectada. O diagnóstico é baseado na

presença do crescimento hiperplásico no espaço interdigital (Baggott & Russell, 1978).

Geralmente, apresenta ocorrência esporádica em bovinos de corte ou leite. Lesões são mais comuns nos membros traseiros. Certas raças grandes como Holandês, Ayrshire e Hereford são afetadas mais freqüentemente. As lesões, usualmente, começam com o espessamento da pele interdigital adjacente à parede axial do dígito lateral nos membros traseiros. A hiperplasia pode afetar um ou todos os membros. Lesões bilaterais ou nos 4 membros em animais jovens podem sugerir predisposição genética.

Acredita-se que a etiologia da hiperplasia interdigital esteja associada à irritação crônica da pele interdigital, causando uma reação proliferativa. Isto pode ser causado por má higiene do ambiente dos animais ou por abertura excessiva e anormal das unhas devido ao crescimento exagerado, conformação deficiente ou pisos escorregadios. Há também a hipótese de que estas lesões sejam causadas por excessivo espessamento da parede axial do dígito traseiro lateral. A irritação crônica causada por dermatite (Toussaint Raven, 1985) ou flegmão interdigitais também pode levar à hiperplasia. O crescimento alterado e excessivo da sola, especialmente, em bovinos leiteiros sobre cimento, pode levar à oclusão do espaço interdigital e manter esterco naquela região, causando irritação crônica e hiperplasia (Baggott & Russell, 1978; Petersen & Nelson, 1984; Desrochers & St. Jean, 1996).

O tratamento é, usualmente, desnecessário em casos sem claudicação. Se infecções secundárias por DD ou DI estiverem presentes, então o tratamento de escolha pode ser oxitetraciclina ou outro antibiótico local em bandagem ou *spray*. Espiroquetas já foram observados em lesões ulcerativas da superfície de fibromas. Se a lesão é causada por espessamento da parede axial do casco, o desgaste desta, durante o casqueamento, deveria auxiliar na resolução. Se a lesão é grande e está freqüentemente traumatizada, causando claudicação, recomenda-se a ressecção cirúrgica (Rebhun *et al.*, 1995; Desrochers & St. Jean, 1996).

2.6 Organismos associados com dermatites digitais em bovinos

2.6.1 *Treponema* sp.

a) **Habitat.** Cavidades orais, tratos intestinais e genitais de humanos e animais, bem como os pés de animais.

b) **Características morfológicas.** Bastonetes estreitos e espiralados, cujas espiras podem se apresentar com amplitudes variadas, em disposições regulares ou irregulares e aproximadas ou afastadas. Espiroquetas têm a característica única de possuir de um a centenas de flagelos por célula, envoltos por uma membrana externa. Membros do gênero *Treponema* possuem de um a oito flagelos, cada um com uma extremidade ancorada a uma das extremidades da célula e a outra livre no periplasma. Neste espaço, o flagelo enrosca-se e golpeia, conferindo à célula um mecanismo de motilidade muito distinto dos demais, permitindo-lhe nadar através de ambientes altamente viscosos. Em condições desfavoráveis, assumem a forma esférica. São Gram-negativas e coram bem em Giemsa e colorações com prata. Organismos vivos podem ser visualizados por microscopia utilizando iluminação de campo-escuro ou contraste de fase (Timoney *et al.*, 1988).

c) **Exigências para crescimento.** Organismos necessitam meios complexos, são dependentes de soro, preferencialmente soro fetal bovino e, embora não dependentes de fluido ruminal, crescem melhor na sua presença ou em meios adicionados com ácidos graxos de cadeia curta. Geralmente são fermentadores de aminoácidos, mas algumas espécies fermentam carboidratos, preferencialmente, glicose. Necessitam anaerobiose, enriquecimento em meio seletivo e propagação sem antibiótico (Timoney *et al.*, 1988). Esferas magnéticas revestidas com anticorpos policlonais para *Treponema denticola* e *Treponema vincentii* têm sido empregadas com sucesso para enriquecer e purificar cultivos de lesões de ovinos e bovinos (Demirkan *et al.*, 1999). Um método mais simples de isolamento utiliza a vantagem da motilidade destes organismos. Amostras

contendo *Treponema* spp. podem ser inoculadas (stab) em meios de cultura semi-sólidos e após diversos dias pode-se notar a migração através do meio, permitindo a recuperação de cultura pura da periferia do crescimento visível (Chan *et al.*, 1997). Seguem-se modelos previamente utilizados para isolamento de *Treponema* spp. de lesões digitais animais:

I) Biópsias pré-lavadas em solução salina são acondicionadas em caldo-peptona-glucose-levedura (PRAS-PYG) pré-reduzido anaerobicamente e esterilizado. Enriquecimento seletivo em caldo *Oral Treponeme Isolation* (OTI) (*Anaerobe Systems*, CA) com rifampicina (1µg/ml) ou combinação de rifampicina (1µg/ml) e enrofloxacin (5µg/ml) a 37°C por 24-48 h antes do repique em placas OTI sem antibióticos. Toda manipulação é executada em condições de anaerobiose estrita em uma câmara anaeróbica (Bactron IV, *Anaerobe Systems*) (Walker *et al.*, 1995).

II) Caldo *Oral Treponeme Enrichment* (OTE) (*Anaerobe Systems*) com 10 µm/ml rifampicina, 500 µg/ml ácido nalidíxico e 10-20% soro fetal bovino. Anaerobiose. O soro tem sido essencial para perpetuar o crescimento, especialmente soro fetal bovino (Demirkan *et al.*, 1999).

III) Swabs são colocados em meio multi-transporte (Portagerm; BIOMÉRIEUX) até o laboratório e cultivados em *Fastidious Anaerobic Blood Agar* (FABA) com 5% de sangue eqüino, FABA com 75 µg/ml sulfato de neomicina (Seleção Gram-positivos), FABA com 2,5 µg/ml de vancomicina e 10 µg/ml de ácido nalidíxico (Seleção Gram-negativos) e em Trypticase Arginina Serina Hoof (TASH) para isolamento de *Dichelobacter nodosus*. Swabs também são lavados em 1 ml de solução salina e examinados em microscopia de campo escuro (Naylor *et al.*, 1998).

d) Prováveis mecanismos de lesão no hospedeiro. Infecções por *Spirochaetes* são caracterizadas por longos períodos de persistência dos organismos nos hospedeiros, apesar da forte resposta imune. Embora quase nada se saiba a respeito dos fatores patogênicos das infecções animais por *Treponema* sp., vários polipeptídeos têm sido identificados como supostos determinantes de virulência em *Treponema* spp. orais humanos.

Proteinases bacterianas são alguns dos fatores mais importantes envolvidos no processo de doença periodontal. A mais bem caracterizada é a CTLP (*Chymotrypsin-like protease*) de *T. denticola* que é exposta na superfície da célula e degrada componentes da matriz, facilitando a migração. CTLP é secretada em vesículas extracelulares e também na forma de complexos com a *Major-surface-protein* (Msp). A protease é composta por três subunidades polipeptídicas, uma delas degrada fibronectina, gelatina, colágeno tipo IV e queratina. CTLP é também capaz de converter pró-colagenase derivada de neutrófilos na forma ativa, estimulando a degradação dos colágenos tipo I e II. CTLP aumenta a aderência de *T. denticola* às células epiteliais, possivelmente por modificar a disponibilidade dos receptores da superfície das células epiteliais. Entretanto, existe alguma controvérsia se CTLP tem ou não atividade hemolítica.

Várias outras proteases têm sido identificadas e suas formas extracelulares são, provavelmente, secretadas em vesículas juntamente com Msp e CTLP. Todas proteases agem, presumivelmente, em combinação para gerar peptídeos que são, nutricionalmente, incorporados pelas células. A proteína de superfície OppA fixa proteínas solúveis do hospedeiro, incluindo fibronectina e plasminogênio, cuja fixação pode aumentar a disseminação bacteriana. Estes organismos também produzem hialuronidase, enzima capaz de degradar ácido hialurônico e sulfato de condroitina, caracteristicamente, reconhecida como um fator de propagação que contribui com a invasão dos tecidos e disseminação de organismos.

Msp de *T. denticola*, antígeno dominante exposto na superfície celular, possivelmente, se fixa à fibronectina e à laminina, causando efeitos citopáticos nas células epiteliais, incluindo desregulação de volume. Tais efeitos são quase que certamente devidos à natureza de porina de Msp, formando canais de íons relativamente grandes nas camadas duplas de lipídios. Proteínas tipo Msp têm sido reconhecidas em vários isolados de diversas espécies de *Treponema* sp. Embora Msp seja uma adesina multifuncional e um determinante de virulência importante em *T. denticola*, as funções das proteínas tipo Msp em outras espécies ainda não foram investigadas.

Existem evidências convincentes de que espécies de *Treponema* sp. estejam associadas com doença periodontal humana. No caso das doenças digitais animais, há apenas evidências circunstanciais envolvendo *Spirochaetes*, filogeneticamente, relacionadas com *Treponema* spp. orais humanas. Entretanto todas estas doenças são associadas com comunidades microbianas complexas. É provável que estas doenças se originem e progridam através de substituições na composição das espécies microbianas destas comunidades, concomitantemente, com alterações ambientais. Colonizadores primários fazem a base para o estabelecimento de biofilmes microbianos mais complexos. Bactérias colonizadoras secundárias podem se fixar às colonizadoras primárias através de ligações interbacterianas, envolvendo interações proteínas (lectina) – carboidratos entre as células, ou através de pontes de substrato. A adesão bacteriana específica pode estar associada com inter-relacionamentos nutricionais entre microrganismos. No caso da doença humana, um dos mais importantes colonizadores secundários é o *Fusobacterium nucleatum*. Esta bactéria tem se apresentado associada a muitas outras bactérias orais e pode promover o desenvolvimento da placa, agindo como uma ponte entre os colonizadores primários e secundários. As atividades metabólicas de *Streptococcus* e *Fusobacterium* geram condições de baixa tensão de oxigênio e baixo potencial redox, além de proverem peptídeos e fatores de crescimento que encorajam o crescimento de organismos anaeróbicos, nutricionalmente fastidiosos e fortemente proteolíticos como *Prevotella* e *Treponema*. Estas bactérias têm sido, usualmente, isoladas de lesões periodontais humanas e digitais animais. O entendimento de como esta comunidade microbiana destruidora de tecidos se desenvolve na cavidade bucal humana pode proporcionar hipóteses para o desenvolvimento da doença digital em animais. É provável que DD se origine como uma infecção microbiana mista, e que condições que favoreçam o crescimento de *Treponema* possam ser geradas na formação de uma lesão primária. Neste contexto, também é provável, portanto, que linhagens de *Treponema* sp. animais, assim como os humanos, existam como organismos comensais em condições de não-doença. *Fusobacterium necrophorum* está, usualmente, presente nas infecções digitais

ovinas envolvendo *Treponema*. Estas observações preliminares sugerem a possibilidade de que *Fusobacterium*, como nas comunidades microbianas orais, proporcione o progressivo desenvolvimento de condições, nos tecidos dos dígitos, que favoreçam o crescimento de *Treponema*. Talvez em associação com outras bactérias proteolíticas ainda não identificadas.

Resumindo, as espécies orais humanas de *Treponema* parecem ter um arsenal de fatores de virulência que incluem Msp e diversas proteinases, os quais lhe conferem alta capacidade destruidora de tecidos, aumentada por e, possivelmente, dependente da presença de outras espécies bacterianas. As observações das doenças animais e humanas parecem tão semelhantes que sugerem que este grupo de espécies de *Treponema* possa ter variedade não específica de hospedeiros. Crucial, portanto para o estabelecimento e progressão destas infecções pode ser a natureza e atividades dos outros organismos presentes nestas infecções microbianas mistas (Timoney *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 2003).

2.6.2 *Campylobacter* sp.

a) Habitat. Sistemas reprodutivos e alimentares de humanos e animais.

b) Características morfológicas. Bastonetes curtos, curvos, Gram-negativos e rígidos que podem se apresentar em arranjos individuais ou unidos, em forma espiralada ou sem agrupamento definido. Sua motilidade característica, rápidos movimentos de contorção, pode ser observada em microscopia de campo escuro ou contraste de fase. Membros do gênero *Campylobacter* são ativamente móveis através de um único flagelo polar ou um em cada extremidade da célula e esta motilidade parece exercer função importante na colonização. Variantes imóveis falham em colonizar ou necessitam maior inóculo. Algumas amostras podem apresentar transição entre as formas flagelada e não flagelada (Timoney *et al.*, 1988). Nas lesões recentes de DD, aparecem na forma clássica curva, mas em lesões crônicas aparecem na forma esférica (Döpfer *et al.*, 1997).

c) Exigências para crescimento. Microaerofilia a anaerobiose. Também requerem meios complexos. O crescimento é favorecido com a adição de Fe⁺,

hemina e 10-20% CO₂. Crescem bem a 37°C em ágar cistina ou tioglicolato com 7% de sangue eqüino. O crescimento em ágar chocolate também é melhorado pela suplementação com amido (0,1-1%) ou soro (1-5%). Algumas espécies requerem cloreto de sódio (3-5%) e atmosfera com N₂, CO₂ e H₂. As espécies do rúmen são, especialmente, dependentes de Na⁺. Podem ser empregados meios enriquecidos e seletivos: caldo tioglicolato – ágar Brucella com bacitracina e novobiocina (Buck & Smith, 1987; Timoney *et al.*, 1988).

d) Prováveis mecanismos de lesão no hospedeiro. Prováveis fatores de virulência incluem a fixação através de adesinas flagelares e do lipopolissacarídeo da parede, indução de endocitose, replicação intracelular e disseminação para células adjacentes. Estes processos causam morte das células epiteliais, inflamação e lesões ulcerativas. Os *Campylobacter* spp. possuem duas toxinas, uma enterotoxina ligada a um quadro secretor semelhante à cólera e uma citotoxina associada a hemorragias. A virulência também está associada com a presença de LPS liso e com a natureza química do antígeno O.

Campylobacter fetus apresenta arranjos de subunidades protéicas como componentes mais externos de seu envelope celular, representando um importante fator de virulência que promove aderência e protege contra o complemento e a fagocitose. Estas proteínas celulares, cuja localização sugere atuação nas interações patógeno-hospedeiro, podem ocorrer sob múltiplas formas e pesos moleculares e, provavelmente, com especificidade antigênica diversa. Esta habilidade capacita-os com efetivo mecanismo de defesa contra os fatores imunes do hospedeiro, especialmente a inibição da fixação do complemento. Além disto, há os lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa, onde o lipídio A, um dos principais componentes, é freqüentemente tóxico, constituindo uma endotoxina que pode ser liberada durante multiplicação ou lise. Outro componente importante é a cadeia lateral ou antígeno O, o qual tem diversos açúcares e varia em composição entre amostras bacterianas. Embora estes açúcares possam ser prontamente reconhecidos pelos anticorpos do hospedeiro, essas bactérias podem evadir das defesas através de rápidas alterações da

composição de suas cadeias laterais, evitando assim a detecção (Timoney *et al.*, 1988; Gyles & Thoen, 1993).

2.6.3 *Fusobacterium necrophorum*

a) Características morfológicas e *habitat*. Anaeróbicos obrigatórios, Gram-negativos, não formadores de esporos, habitantes do trato alimentar de humanos e animais. São bastonetes com cerca de 1 μm de largura e que podem ter mais de 100 μm de comprimento. Em tecidos infectados, apresentam forma de longos filamentos retos ou curvos, mas elementos mais curtos e mesmo formas cocóides ocorrem. Às vezes, estão aumentados, podendo ter o dobro da largura habitual. Amostras recentemente isoladas, mostram predomínio de filamentos longos, com lados paralelos e regulares. Depois de prolongados períodos de cultivo, as formas predominantes são curtas. Culturas muito jovens coram uniformemente, mesmo com corantes comuns, mas os filamentos de culturas com mais de 24 h usualmente são vacuolados e as porções coradas ficam separadas por porções quase sem coloração. A distribuição irregular do citoplasma ao longo do filamento pode ser visualizada mesmo em preparações sem coloração. A presença de flagelos não foi demonstrada e a motilidade é ausente (Timoney *et al.*, 1988).

b) Exigências para crescimento. Necessita anaerobiose estrita e a presença de 5-10% de CO_2 melhora o crescimento. Meio com peptona (1%), extrato de levedura (1%), vitamina K, hemina ou sangue com um agente redutor como a cisteína é adequado. Culturas morrem pouco tempo após crescimento inicial. O meio Tioglicolato, sem enriquecimento, é um bom meio de manutenção, mas cultivos devem ser repicados toda semana. Um meio seletivo com ágar gema de ovo contendo 0,02% de cristal violeta, 0,01% verde brilhante e álcool phenethyl (para suprimir o crescimento de Gram-negativas anaeróbicas facultativas) tem sido descrito. Antibióticos como a canamicina, eritromicina e vancomicina têm sido usados em meios seletivos. A bactéria também tem sido cultivada em caldo infusão de coração suplementado com 0,1% ácido ascórbico e 0,1% cisteína por 48 h a 37 °C (Timoney *et al.*, 1988).

c) **Prováveis mecanismos de lesão no hospedeiro.** *Fusobacterium necrophorum* é um agente etiológico primário ou secundário de uma série de infecções necróticas e purulentas em humanos e animais. Seu principal fator de virulência é a leucotoxina, substância tóxica para leucócitos de ruminantes. A habilidade desta toxina para modular o sistema imune do hospedeiro, incluindo ativação celular de PMNs, morte de fagócitos e de células efectoras do sistema imune, representa um mecanismo importante de sua patogenia. A bactéria é comensal do trato alimentar de muitas espécies animais e de humanos. Infecções em animais usualmente ocorrem quando são mantidos em ambientes sem higiene, especialmente com acúmulo de esterco. O organismo tem pouca habilidade para invadir o epitélio normal, mas prontamente entra e se multiplica em tecidos lesados por trauma, maceração, infecção viral ou bacteriana. Em todas as espécies, a lesão típica caracteriza-se por necrose, formação de abscesso e odor pútrido. A bacteremia pode ocorrer com disseminação para o fígado e outros órgãos. O *Fusobacterium necrophorum*, por ser Gram-negativa, apresenta endotoxina associada com a parede celular, onde o lipídio A é o principal componente tóxico. Estes organismos também apresentam uma toxina proteínica citoplasmática com atividade hemolítica e imunogênica. No *foot rot*, tipicamente, a epiderme necessita sofrer uma solução de continuidade para que a infecção evolua, levando à celulite ascendente e edema da banda coronária à quartela. *Bacteroides melaninogenicus* (atualmente *Prevotella melaninogenica*) pode, inicialmente, penetrar a epiderme, proporcionando acesso para *F. necrophorum* que, então, produz a celulite. Pode haver relação entre LPS e formação de abscessos (Timoney *et al.*, 1988; Gyles & Thoen, 1993; Narayanan *et al.*, 2002).

2.6.4 *Bacteroides* sp.

a) **Habitat.** Este gênero foi subdividido em *Bacteroides* (predominantes no cólon de mamíferos), *Prevotella* e *Porphyromonas* (geralmente associados à cavidade bucal e rúmen). Os três gêneros formam atualmente o grupo denominado *Anaerobic Gram-Negative Bacilli* (AGNB). *Bacteroides* são as bactérias

anaeróbicas predominantes na microbiota de membranas mucosas, portanto uma causa comum de infecção endógena, que pode ocorrer em qualquer local do corpo (Brook, 2002).

b) Características morfológicas. *Bacteroides* são bastonetes pleomórficos, anaeróbicos obrigatórios e Gram-negativos. *Bacteroides (Dichelobacter) nodosus* é um bastonete grande caracterizado pela presença de alargamentos terminais, usualmente, em ambas extremidades (Timoney et al., 1988). Toussaint Raven (1985) descreve tais alargamentos em apenas uma extremidade. Tais saliências arredondadas são mais pronunciadas nos organismos vistos em esfregaços de tecidos do que nos de cultivo. Os bastonetes são usualmente retos, mas podem ser levemente curvos e, freqüentemente, apresentam centenas de fimbrias arranjadas em distribuição polar. Em cultivos, podem ser curtos e, até mesmo cocóides. Não são móveis, não formam esporos e coram prontamente com todos os corantes comuns. Algumas espécies produzem cápsula. Os organismos corados com azul de metileno, freqüentemente, demonstram um ou vários grãos metacromáticos, usualmente localizados nas extremidades.

c) Exigências para crescimento. São anaeróbicos obrigatórios. O crescimento é aumentado com acréscimo de 10% ou mais de CO₂. Crescem mais a 37°C, em meio neutro ou alcalino que contenha tripticase ou arginina (0,05M). O crescimento também é estimulado pela adição de 10% de soro equino. Os soros de outras espécies não parecem satisfatórios. *Tripticase Arginina Serina Hoof* (TASH) tem sido um meio apropriado para cultivar *Dichelobacter nodosus* (Caldwell & Arcand, 1974)

d) Prováveis mecanismos de lesão no hospedeiro. *Dichelobacter nodosus* produz poderosas proteases que destroem o tecido córneo e permite a invasão da matriz epidérmica. Tem sido bem estabelecida sua interação sinérgica com *Fusobacterium necrophorum* para causar a necrobacilose interdigital (NI) bovina. Existem evidências sugestivas de que as condições geradas por *D. nodosus* facilitam a invasão e promovem o crescimento de *F. necrophorum* que, então, causa necrose do tecido subcutâneo e fissuras da pele no espaço interdigital, além da celulite ascendente. Outras bactérias, como o *Actinomyces pyogenes* e

outros difteróides aeróbicos, que usualmente crescem na superfície das lesões digitais, removem o oxigênio e reduzem o potencial redox, podendo facilitar o crescimento dos anaeróbicos, mas não são essenciais para causar NI.

A maior parte das infecções por AGNB originam-se na flora endógena das membranas mucosas. Geralmente são infecções mistas, onde o número de isolados pode atingir 5-10 organismos. O tipo de associação de microrganismos depende do local e circunstância de infecção. AGNB promovem infecção através de sinergismo com outros microrganismos aeróbicos e anaeróbicos. Um mecanismo indireto dos AGNB é sua habilidade de produzir beta-lactamases, que protege os próprios microrganismos produtores e outros organismos vizinhos susceptíveis às penicilinas. A formação de abscesso é o resultado da resposta imune à presença dos polissacarídeos capsulares de *Bacteroides*. Outro mecanismo de patogenicidade é a habilidade de inibir a fagocitose, através da produção de cápsula que reduz a habilidade fagocítica dos PMNs. Além disto, secretam um fator ainda não caracterizado que degrada as proteínas do complemento, inibindo a quimiotaxia dos PMNs e a opsonização delas próprias e de outras bactérias vizinhas. Condições predisponentes à infecção por AGNB incluem a exposição de locais estéreis a um grande inóculo da microbiota presente em membranas mucosas e a isquemia que inicia a necrose tecidual, baixando o potencial redox e favorecendo o crescimento de anaeróbios. Condições que baixam o suprimento sanguíneo incluem trauma, corpos estranhos e edema, entre outras. Infecções por bactérias aeróbias podem tornar as condições teciduais locais mais favoráveis para o crescimento de anaeróbios. A infecção por AGNB, muitas vezes, se caracteriza por supuração, tromboflebite, formação de abscessos e destruição de tecidos. Os anaeróbios, incluindo AGNB, são comuns em infecções crônicas (Gyles & Thoen, 1993; Brook, 2002).

2.6.5 Infecções não-específicas. *Bacteroides* spp. e *Fusobacterium* spp. são responsáveis por mais da metade dos casos de infecções inespecíficas em humanos. As fontes de infecção são as mucosas ou o conteúdo intestinal. Além

de seus determinantes de virulência, um achado constante nestes organismos pode ser sua relativa insensibilidade ao oxigênio comparada aos anaeróbicos estritos. Estes organismos podem causar infecções específicas ou não-específicas. Comumente, estes processos envolvem necrose tecidual próxima de uma superfície mucosa e têm envolvimento de anaeróbios oportunistas. Infecções freqüentemente mistas, as quais são facilitadas porque as aeróbicas removem o oxigênio e reduzem o ambiente, promovendo o estabelecimento de anaeróbicos, através da seleção das espécies resistentes às defesas não-específicas do hospedeiro com grande inoculo podendo ter quebrado a barreira mucosa. Estes tipos de associações sinérgicas, decorrentes de fatores de crescimento, geralmente não são bem caracterizadas. A natureza polimicrobiana indica que, muitas vezes, vários fatores de virulência estarão operando. Fímbrias devem ser importantes na aderência às células epiteliais ou a outras bactérias. Cápsulas podem promover resistência para complemento e fagocitose. Enzimas extracelulares ou fixadas à célula incluem a colagenase, IgA e IgG proteases, neuraminidases, DNAase, fibrinolisinase e outras produzidas por *Porphyromonas* e *Bacteroides*, quase todas com ações pouco estabelecidas. A ativação do complemento por ação direta do LPS promove quimiotaxia de neutrófilos que ao liberarem suas enzimas causam dano tecidual. A interferência da opsonização, por depleção de opsoninas, é um importante fator de virulência contributivo das infecções anaeróbicas mistas. Entretanto diversos estudos têm mostrado que LPS de Gram-negativos anaeróbicos tem pequena atividade de quimiotaxia, sendo praticamente não tóxicas se comparadas aos membros da família *Enterobacteriaceae* (Lamont *et al.*, 1995; Brook, 2002).

2.6.6 Dificuldades de isolamento laboratorial

Por serem fastidiosos, dificilmente são isolados e freqüentemente não são encontrados. Seu isolamento requer métodos adequados de coleta, transporte e cultivo. A não observância de técnicas adequadas para coleta, transporte e cultivo de anaeróbios pode levar à suposição de que a infecção é somente por aeróbios. AGNB estão presentes na pele e mucosas, portanto, mesmo uma contaminação

mínima pode ser prejudicial. A aspiração direta por agulha é um método adequado para obtenção de culturas. O transporte de amostras deve ser rápido, a menos que dispositivos apropriados sejam empregados: ambientes livres de oxigênio providos de uma mistura de CO₂, hidrogênio e nitrogênio e um indicador de condições aeróbicas. As amostras devem ser colocadas em condições anaeróbicas tão logo quanto possível. Amostras líquidas ou de tecidos são preferenciais. Amostras líquidas são inoculadas em meio anaeróbico de transporte ou mantidos em seringa com agulha e tampa. Após expulsar todo ar, a agulha tem sua ponta colocada em uma borracha. Devido ao fato de que o ar gradualmente se difunde através da parede plástica, as amostras colhidas desta forma devem ser processadas em menos de trinta minutos. Amostras de tecidos podem ser transportadas em tubos anaeróbicos ou em sacos plásticos em cujo interior foram feitas condições anaeróbicas. A presença de grandes quantidades de outras bactérias contaminantes e ambientais nas lesões digitais consiste em obstáculo adicional ao cultivo e isolamento. (Timoney *et al.*, 1988; Gyles & Thoen, 1993).

Embora, atualmente, inúmeras espécies de *Treponema* sejam rotineiramente cultivadas *in vitro*, sugere-se que 75% do total de espécies de *Treponema* orais ainda não foram cultivadas. Por outro lado, comparações das seqüências gênicas 16S rRNA – amplificação por PCR do DNA de *Spirochaetes* ou de lesões colonizadas têm permitido a identificação e a detecção de organismos ainda não cultivados, além de associações preliminares com várias condições de doença em humanos e animais. Informações adicionais associadas à resistência antimicrobiana e aos requerimentos nutricionais dos membros de *Treponema* permitirão o desenvolvimento de métodos mais seletivos e de melhores taxas de isolamento (Edwards *et al.*, 2003).

2.7 Imunoistoquímica aplicada ao estudo das dermatites digitais bovinas

Tais métodos têm sido empregados principalmente para o estudo das espiroquetas associadas com a dermatite digital. A coloração imunoistoquímica tem identificado espiroquetas presentes em lesões de dermatite digital através dos soros policlonais anti-*Borrelia burgdorferi*, anti-*Treponema denticola* e *T. vicentii*,

entretanto estas espiroquetas não têm marcado quando submetidas à coloração com anticorpo monoclonal anti-*Treponema pallidum* (Demirkan *et al.*, 1998).

Outro estudo demonstrou imunoistoquimicamente as lesões concorrentes de dermatite digital e colite causadas por espiroquetas marcadas com anti-*Treponema pallidum* (Shibahara *et al.*, 2002).

3. ARTIGO 1

Cópia de separata original no formato *short communication* da *Veterinary Record*.

Bovine digital dermatitis in southern Brazil

C. CRUZ, D. DRIEMEIER, C. CERVA,
L. G. CORBELLINI

DIGITAL dermatitis is an epidermitis characteristically affecting the skin at the plantar/palmar aspect of the bovine foot, near the heel bulbs (Weaver and others 1981, Blowey and Sharp 1988, Read 1994). The disease was first described in Italy by Cheli and Mortellaro (1974). Since then, digital dermatitis and a similar condition named papillomatous digital dermatitis have been reported worldwide (Peterse 1986, Blowey and Sharp 1988, Van Amstel and others 1991, Read and others 1992, Rodriguez-Lainz and others 1999). Lately, both designations appear to represent the same disease complex, which in the USA is also known as footwarts, hairy footwarts, heel warts and strawberry foot disease (Read 1994, Read and Walker 1998).

The rapid therapeutic response following topical treatment with antibiotics in most affected animals supports the involvement of bacterial species in the development of the disease (Read and others 1992, Read and Walker 1998). In addition, several bacterial agents, including spirochaetes related to human treponemes (Blowey and others 1992, Read and others 1992, Walker and others 1995, Döpfer and others 1997), *Bacteroides* species (Peterse 1986, Blowey and Sharp 1988) and *Campylobacter* species (Döpfer and others 1997, Ohya and others 1999), have been implicated in the aetiology of digital dermatitis.

Outbreaks of the disease have mainly been reported in housed cattle (Peterse 1986, Blowey and Sharp 1988, Bassett and others 1990, Bergsten and others 1998, Read and Walker 1998, Rodriguez-Lainz and others 1999) suggesting that environmental or biological factors associated with those systems of management may be important risk factors (Rodriguez-Lainz and others 1996, 1999).

Typical lesions have been described as red in colour, circular to oval in shape, alopecic, prone to bleeding, moist and painful to the touch. Larger ulcerative lesions or characteristic raised proliferative processes are associated with later stages of the disease (Blowey and Sharp 1988, Bassett and others 1990, Read and others 1992, Read and Walker 1998).

Thorough cleansing and scraping of the lesions preceding topical applications of oxytetracycline preparations are an effective treatment (Blowey and Sharp 1988, Read 1994, Bergsten and others 1998), and oxytetracycline or lincomycin-pectinomycin footbaths have proved a useful control measure (Blowey and Sharp 1988, Blowey and others 1992, 1994, Read 1994). Topical formaldehyde and parenteral antibiotics have also been reported as highly effective (Read 1994, Read and Walker 1998).

This short communication reports the occurrence of digital dermatitis in dairy cattle in southern Brazil, and describes the environmental conditions in which it was observed and the clinical appearance of the lesions.

A study of practice records of lame cows over an 18-month period was performed on four dairy farms in Rio Grande do Sul, Brazil. All of these dairies had recently bought heifers from the USA, Canada or Argentina. Five hundred and twenty-four Holstein cattle out of 1043 were treated for lameness. Most 30 per cent of recorded lesions were digital dermatitis, 86 per cent of which occurred in the hind feet. The disease only affected young lactating cows housed in free stalls, but was also observed in heifers and dry cows at pasture.

Clinical signs ranged from mild discomfort to severe lameness and there was no associated digital swelling. The lesions

observed in this study typically involved the plantar interdigital commissural skin fold at its junction with the horn of the heels. They were mostly circumscribed, circular or oval, erosive (Fig 1a) to proliferative with raised presenting filiform papillae on their eroded surfaces, painful and often surrounded by a marked ridge of longer hairs. Advanced stages of the disease were associated with the presence of larger erosive or raised lesions with granular or papillary surfaces, often extensively spread over the heels and associated with malformations of the claws as unguular erosions (Fig 1b), increased thickness of the sole, double soles and detachment of the horn.

The lesions of digital dermatitis were characterised by their erosive-proliferative nature and common anatomical location on the plantar/palmar interdigital skin bordering the interdigital space, which was rarely involved. These lesions were differentiated from a milder form of epidermitis, restricted to the hairless skin of the interdigital space, and characterised by erosions of the dermis without the formation of filiform papillae and responsible for slight clinical signs. This type of interdigital lesion was consistent with the condition described as interdigital dermatitis (Greenough and others 1981, Weaver and others 1981, Toussaint Raven 1985, Gourreau and others 1992, Hull and others 1993) and accounted for approximately 17 per cent of recorded lesions. However, recent evidence suggests that digital dermatitis and interdigital dermatitis are both part of the same disease complex (Blowey and others 1994, Blowey and Done 1995, Walker and others 1995, Read and Walker 1998). Another differential diagnosis was interdigital necrobacillosis, caused by *Fusobacterium necrophorum* infection, which involves the skin causing deep fissures, necrosis and sloughing tissues in association with marked and diffuse digital swelling (Gourreau and others 1992, Hull and others 1993). However, in some instances the morphological appearances which allow differentiation of these conditions are not always clear, especially when they are concurrent (Sheldon 1994, Doherty and others 1998, Read and Walker 1998).

Tissue samples from excised lesions taken from three cows with digital dermatitis were processed by standard histological methods and stained by haematoxylin and eosin. The main changes involved the epidermis and included marked rete ridge formation, superficial necrosis and degeneration of

Veterinary Record (2001)
148, 576-577

C. Cruz, DVM,
D. Driemeier, DVM,
C. Cerva, DVM,
L. G. Corbellini, DVM,
Department of Veterinary
Pathology, Faculty of
Veterinary Medicine,
Federal University of Rio
Grande do Sul (UFRGS),
Av Bento Gonçalves, 9090,
Cx P15094, 91540-000,
Porto Alegre RS, Brazil

Correspondence to
Dr Driemeier



FIG 1: (a) Typical ulcerative lesion of digital dermatitis in the plantar aspect near the horn-skin junction adjacent to the bulbs of the heels. (b) Advanced, severe lesion confluent with an area of severe unguular erosion. Plantar aspect

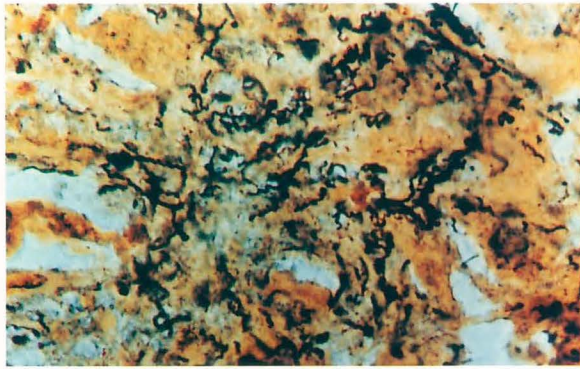


Fig. 2. Invasive spirochaete organisms scattered in the dermal collagen. Warthin and Starry stain. $\times 800$

keratinocytes. There also was mononuclear and polymorphonuclear infiltration in the dermis. Staining by the Warthin and Starry method revealed the presence of invasive spirochaetes in the epithelia (Fig 2).

Topical applications of oxytetracycline powder in combination with formaldehyde aerosol and bandaging for three to five days were highly effective in most of the affected animals. Oxytetracycline footbaths (6 g/litre) for 10 minutes daily (three days) and improvement of general housing hygiene were beneficial as control measures.

Although the prevalence of the disease appeared to be higher whenever environmental conditions were poor, with large volumes of slurry accumulated in the passageways of the free stalls, digital dermatitis has also been observed in cattle housed under high standards of hygiene (Bassett and others 1990) or in grazing systems (Blowey and others 1988, Gourreau and others 1992, Döpfer 1994). In fact, digital dermatitis was also diagnosed in animals on paddocks probably because wet weather is very common in southern Brazil, causing extensive muddy areas, which introduce a previously reported risk factor (Rodríguez-Lainz and others 1996, Read and Walker 1998). There may also have been a link between the bought-in heifers (Rodríguez-Lainz and others 1996, 1999, Blowey and Sharp 1988, Read and Walker 1998) and the condition observed here, but this could not be confirmed.

The clinical, epidemiological and pathological aspects of the disease described in this study are consistent with the condition described as digital dermatitis (Cheli and Mortellaro 1974, Blowey and Sharp 1988, Bassett and others 1990, Van Amstel and others 1991) or papillomatous digital dermatitis (Rodríguez-Lainz and others 1996, 1999, Read and Walker 1998).

Foot disorders are a major welfare and production problem for dairies; preventive measures such as correct trimming, adequate nutrition and providing a clean and comfortable environment for cows should be adhered to. When the observations recorded in this study are considered alongside previous Brazilian reports (Borges and others 1999, Molina and others 1999), they indicate that further studies are required on digital diseases of dairy cattle in this country.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Lander Veterinary Clinic staff and Rick Crouch for providing technical assistance and advice during their stay in California.

References

- BASSETT, H. F., MONAGHAN, M. L., LENIHAN, P., DOHERTY, M. L. & CARTER, M. E. (1990) Bovine digital dermatitis. *Veterinary Record* **126**, 164-165
- BERGSTEN, C., HANCOCK, D. D., GAY, J. M., GAY, C. C. & FOX, L. K. (1998)

- Claw diseases: the most common cause of dairy lameness diagnoses, frequencies and risk groups in a university herd. *Bovine Proceedings* **31**, 188-194
- BLOWEY, R. W. & DONE, S. H. (1995) Failure to demonstrate histological changes of digital or interdigital dermatitis in biopsies of slurry heel. *Veterinary Record* **137**, 379-380
- BLOWEY, R. W., DONE, S. H. & COOLEY, W. (1994) Observations on the pathogenesis of digital dermatitis in cattle. *Veterinary Record* **135**, 115-117
- BLOWEY, R. W. & SHARP, M. W. (1988) Digital dermatitis in dairy cattle. *Veterinary Record* **122**, 505-508
- BLOWEY, R. W., SHARP, M. W. & DONE, S. H. (1992) Digital dermatitis. *Veterinary Record* **131**, 39
- BORGES, J. R., PITOMBO, C. A., SILVEIRA, J. M., GRAÇA, F. S. & SILVA, P. C. A. (1999) Digital diseases in confined milk cows in the south-eastern region of Brazil. Proceedings of the 10th International Symposium on Lameness in Ruminants. September 7 to 10. Lucerne, Switzerland. pp 85-86
- CHELI, R. & MORTELLARO, C. (1974) La dermatite digitale del bovino. Proceedings of the 8th International Conference on Diseases of Cattle. Milan. pp 208-213
- DOHERTY, M. L., BASSETT, H. F., MARKEY, B., HEALY, A. M. & SAMMIN, D. (1998) Severe foot lameness in cattle associated with invasive spirochaetes. *Irish Veterinary Journal* **51**, 195-198
- DÖPFER, D. (1994) Epidemiological investigations of digital dermatitis on two dairy farms. Dissertation, Tierärztlichen Hochschule Hannover
- DÖPFER, D., KOOPMANS, A., MEIJER, F. A., SZAKÁLL, I., SCHUKKEN, Y. H., KLEE, W., BOSMA, R. B., CORNELISSE, J. L., ASTEN, A. J. A. M. & HUURNE, A. A. H. M. (1997) Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. *Veterinary Record* **140**, 620-623
- GOURREAU, J. M., SCOTT, D. W. & ROUSSEAU, J. F. (1992) La dermatite digitale des bovins. *Point Veterinaire* **24**, 49-57
- GREENOUGH, P. R., MACCALLUM, F. J. & WEAVER, A. D. (1981) Diseases of the digital skin and subcutis. In Lameness in Cattle. 2nd edn. Ed A. D. Weaver. Bristol, Wright Scientific. pp 151-169
- HULL, B. L., WEAVER, A. D., KOENIG, G. J., WELKER, B., RINGS, D. M., ST JOHN, G., CRAWFORD, W. H., TULLENERS, E. & AMES, K. (1993) Diseases of the Musculoskeletal System. In Current Veterinary Therapy - Food Animal Practice. 3rd edn. Ed J. L. Howard. Philadelphia, W. B. Saunders. pp 864-881
- MOLINA, L. R., CARVALHO, A. U., FACURY FILHO, E. J., FERREIRA, P. M. & FERREIRA, V. C. P. (1999) Prevalência e classificação das afecções podais em vacas lactantes na bacia leiteira de Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **51**, 149-152
- OHYA, T., YAMAGUCHI, H., NII, Y. & ITO, H. (1999) Isolation of *Campylobacter sputorum* from lesions of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle. *Veterinary Record* **145**, 316-318
- PETERSE, D. J. (1986) Lameness in cattle. Proceedings of the 14th World Congress of Disease of Cattle. August 26 to 29. Dublin, Ireland. pp 1015-1023
- READ, D. H. (1994) Footwarts (papillomatous digital dermatitis): an emerging epidemic in dairy cattle? In Proceedings of the 33rd Annual Dairy Cattle Day. March 30, University of California. Veterinary Medicine Extension, Davis. pp 15-19
- READ, D. H. & WALKER, R. L. (1998) Papillomatous digital dermatitis (footwarts) in California dairy cattle: clinical and gross pathologic findings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **10**, 67-76
- READ, D. H., WALKER, R. L. & CASTRO, A. E. (1992) An invasive spirochaete associated with interdigital papillomatosis of dairy cattle. *Veterinary Record* **130**, 59-60
- RODRIGUEZ-LAINZ, A., DAVID, W. H., CARPENTER, T. E. & READ, D. H. (1996) Case-control study of digital dermatitis in southern California dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* **28**, 117-131
- RODRIGUEZ-LAINZ, A., MELENDEZ-RETAMAL, P., HIRD, D. W., READ, D. H. & WALKER, R. L. (1999) Farm- and host-level risk factors for papillomatous digital dermatitis in Chilean dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine* **42**, 87-97
- SHELDON, I. M. (1994) Digital and interdigital dermatitis in dairy cattle. *Veterinary Record* **135**, 559-560
- TOUSSAINT RAVEN, E. (1985) Cattle footcare and claw trimming. Ipswich, Farming Press. pp 38-40
- VAN AMSTEL, S. R., VAN VUUREN, S. & TUTT, C. L. (1991) Digital dermatitis: report of an outbreak. *Journal of the South African Veterinary Association* **66**, 177-181
- WALKER, R. L., READ, D. H., LORETZ, K. J. & NORDHAUSEN, R. W. (1995) Spirochaetes from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. *Veterinary Microbiology* **47**, 343-355
- WEAVER, A. D., ANDERSON, L., DE LAISTRE BANTING, A., DEMERZIS, P. N., KNEZEVIC, P. F., PETERSE, D. J. & SANKOVIC, F. (1981) Review of disorders of the ruminant digit with proposals for anatomical and pathological terminology and recording. *Veterinary Record* **108**, 117-120



FIGURA 1. Situações de acúmulo de esterco (A) e lama (B) em instalações de bovinos leiteiros, freqüentemente, associadas com alta prevalência de dermatites.

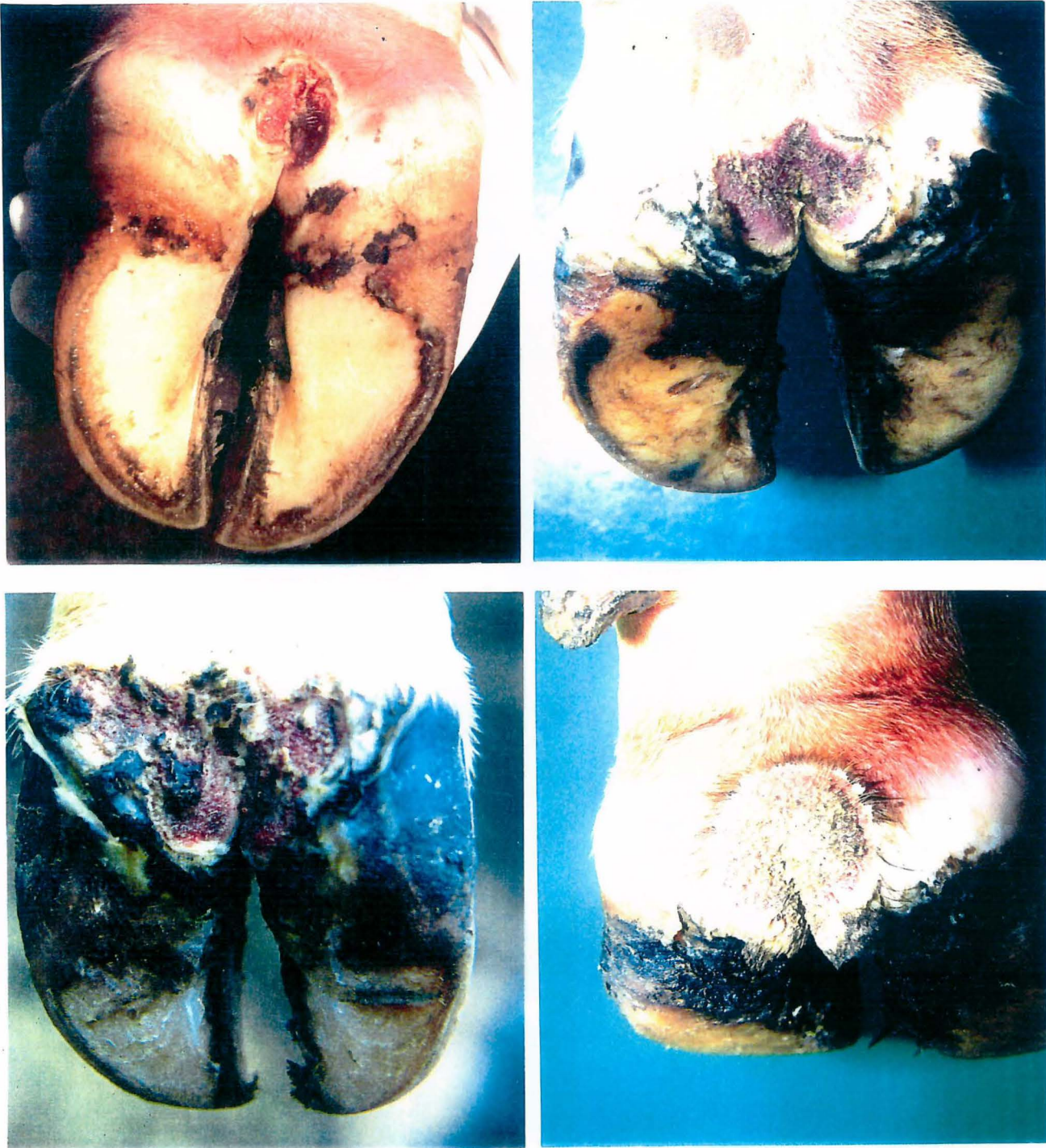


FIGURA 2. Aspecto macroscópico de lesões de dermatite digital em diferentes estágios de desenvolvimento.

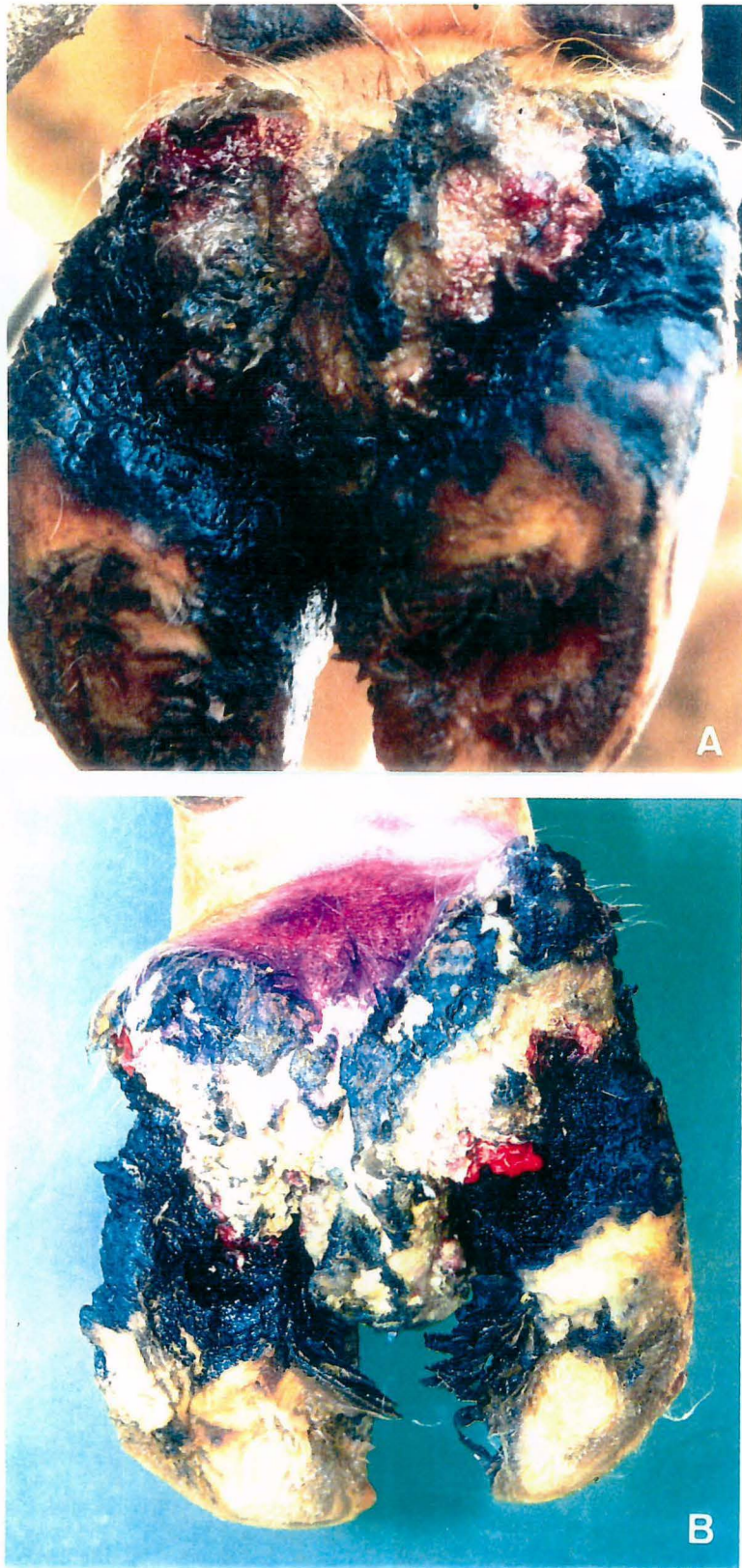


FIGURA 3. Dermatite digital severa com 7 (A) e 12 (B) semanas de desenvolvimento.



FIGURA 4. Aspecto macroscópico de lesões de dermatite interdigital em diferentes estágios de desenvolvimento.

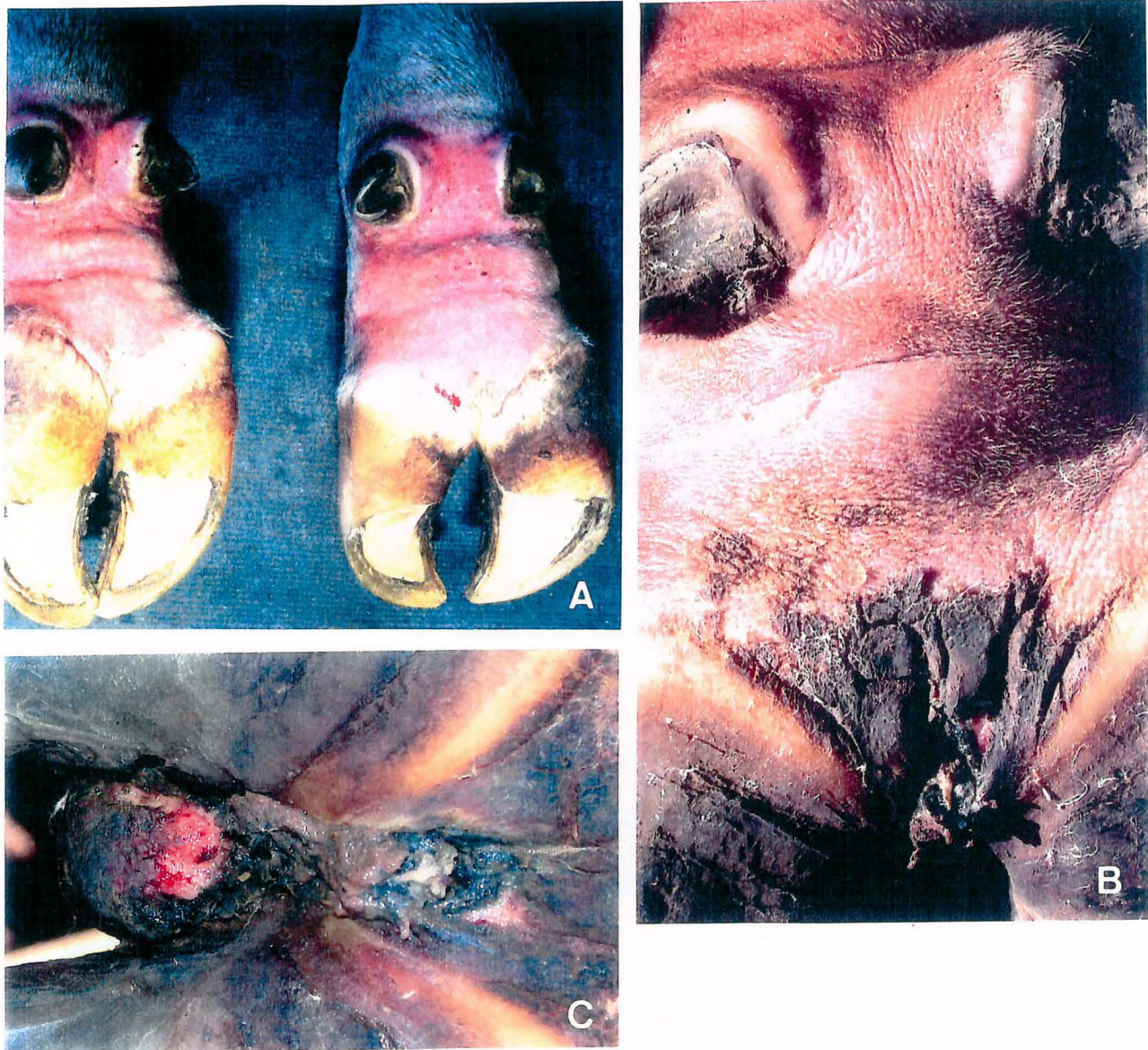


FIGURA 5. Lesão recente de necrobacilose interdigital no membro à direita (A) e em estágio avançado com presença de necrose e erosão (B). Em (C), aspecto ventral da lesão anterior, mostrando associação com hiperplasia interdigital e dermatite interdigital.

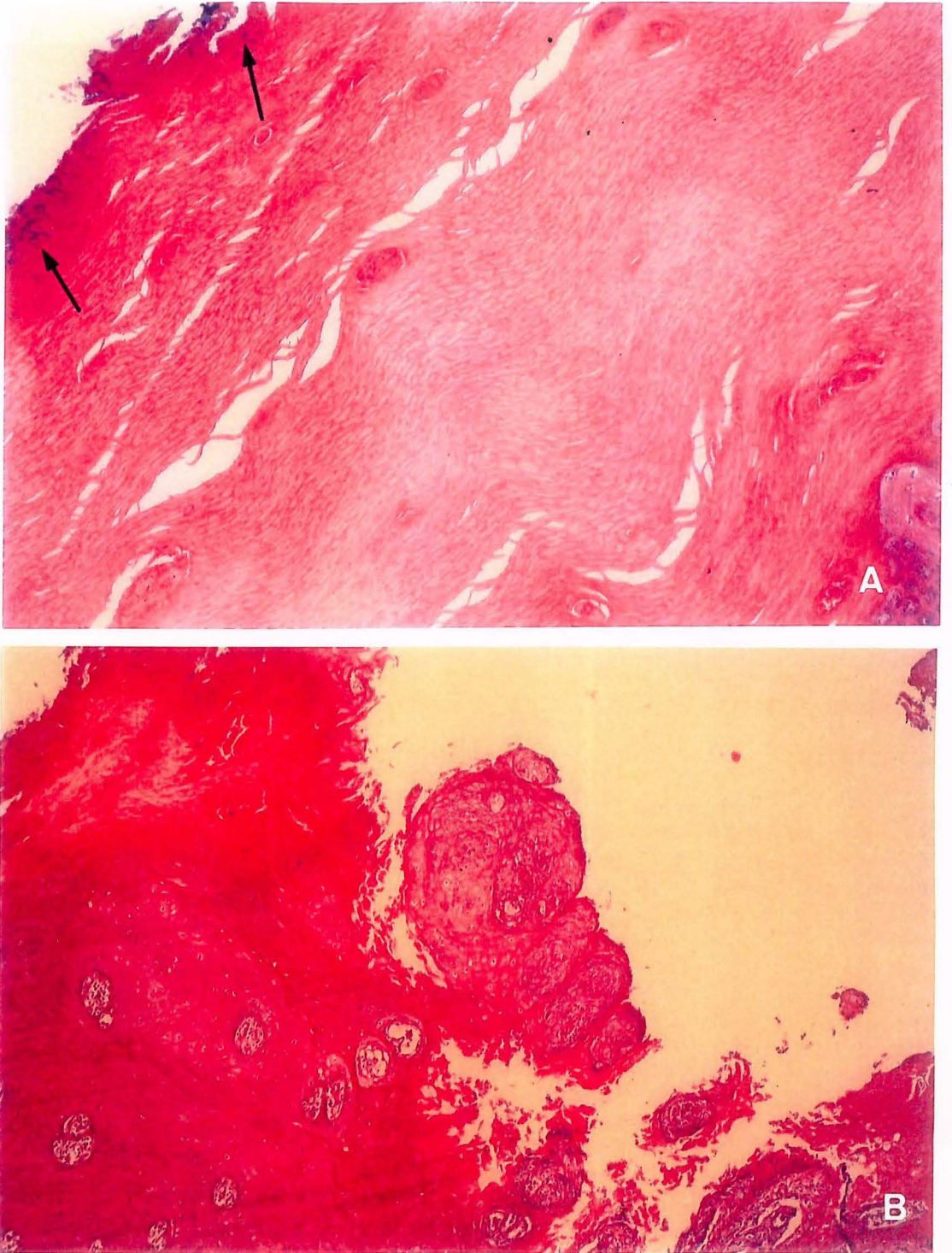


FIGURA 6. Área de dermatite interdigital papulosa (A) com espessamento do estrato córneo e presença de bactérias (setas), HE X 100. Em (B), dermatite interdigital com perda do estrato córneo, HE X 100.

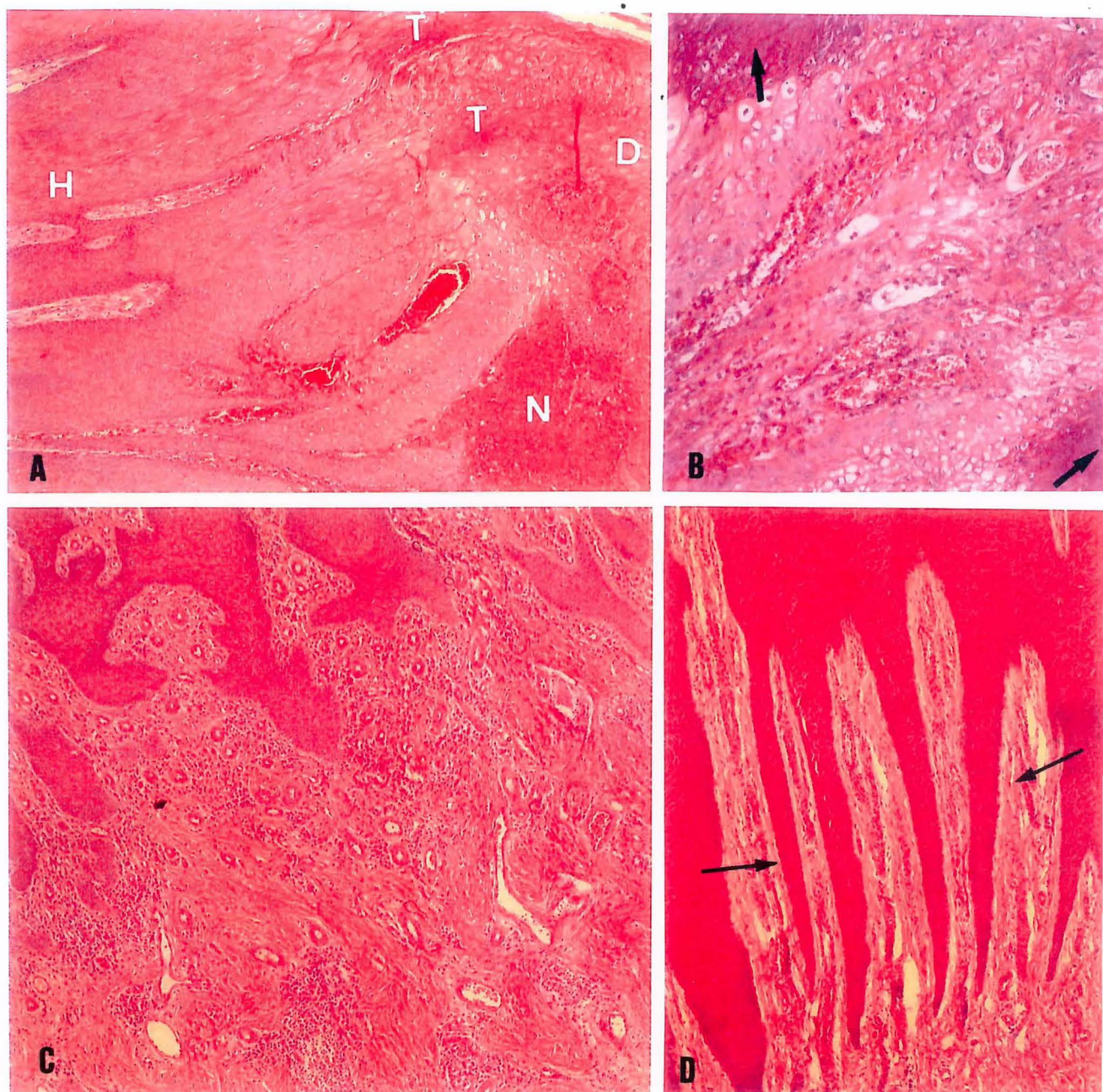


FIGURA 7. Presença de hiperplasia **H**, degeneração hidrópica **D**, necrose **N** e aglomerados de bactérias **T** nos estratos granuloso e espinhoso de lesão de dermatite digital com perda do estrato córneo, HE X 100 (A). Detalhe de dermatite digital (B) com degeneração, necrose e aglomerados de bactérias (setas), HE X 300. Dermatite digital, infiltrado inflamatório na derme, HE X 100 (C). Presença de hiperplasia pseudoepiteliomatosa (setas) em dermatite interdigital (D), HE X 100.

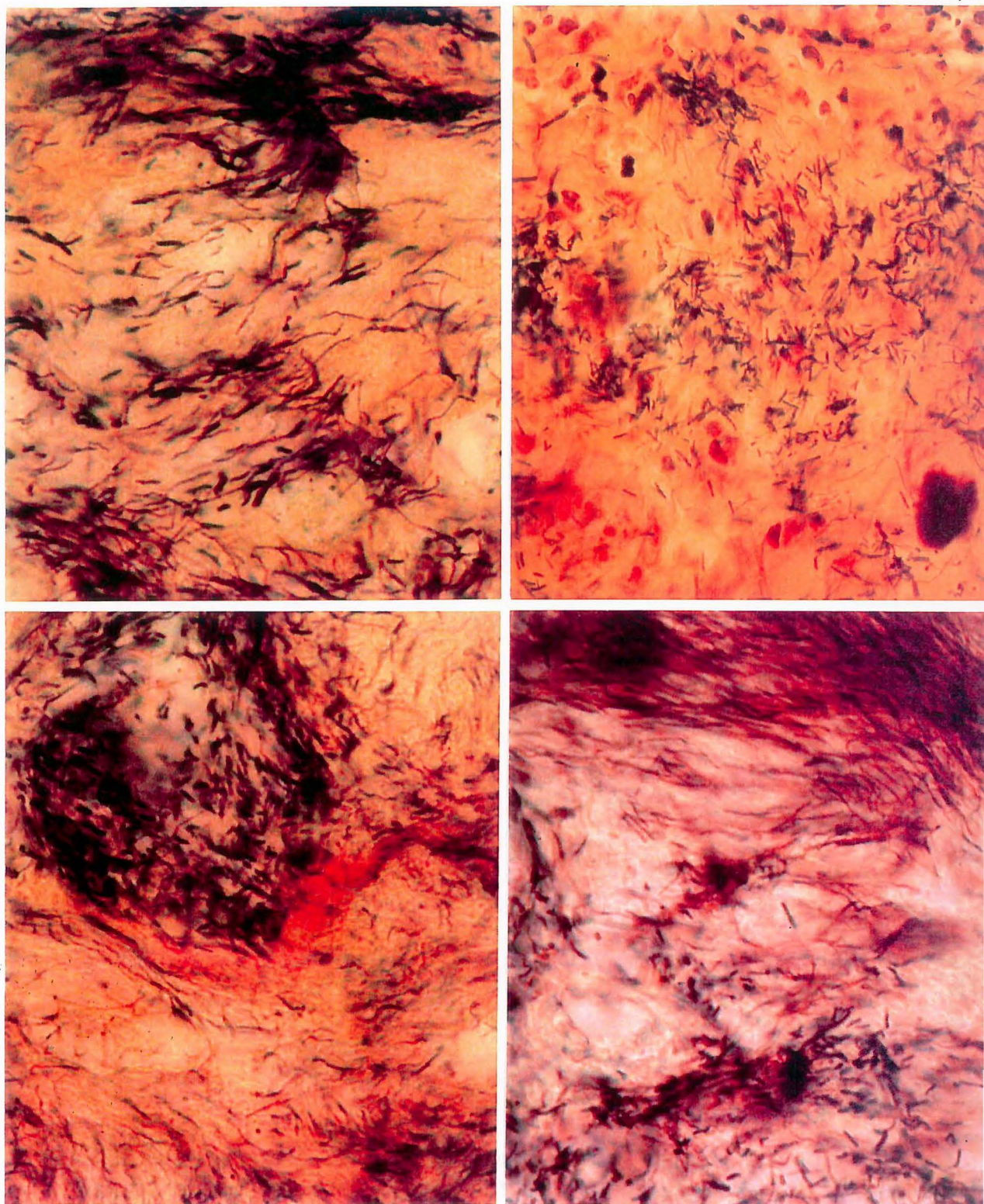


FIGURA 8. Populações microbianas mistas em dermatites digitais. Presença de diferentes tipos bacterianos, Warthin-Starry, X 1000.

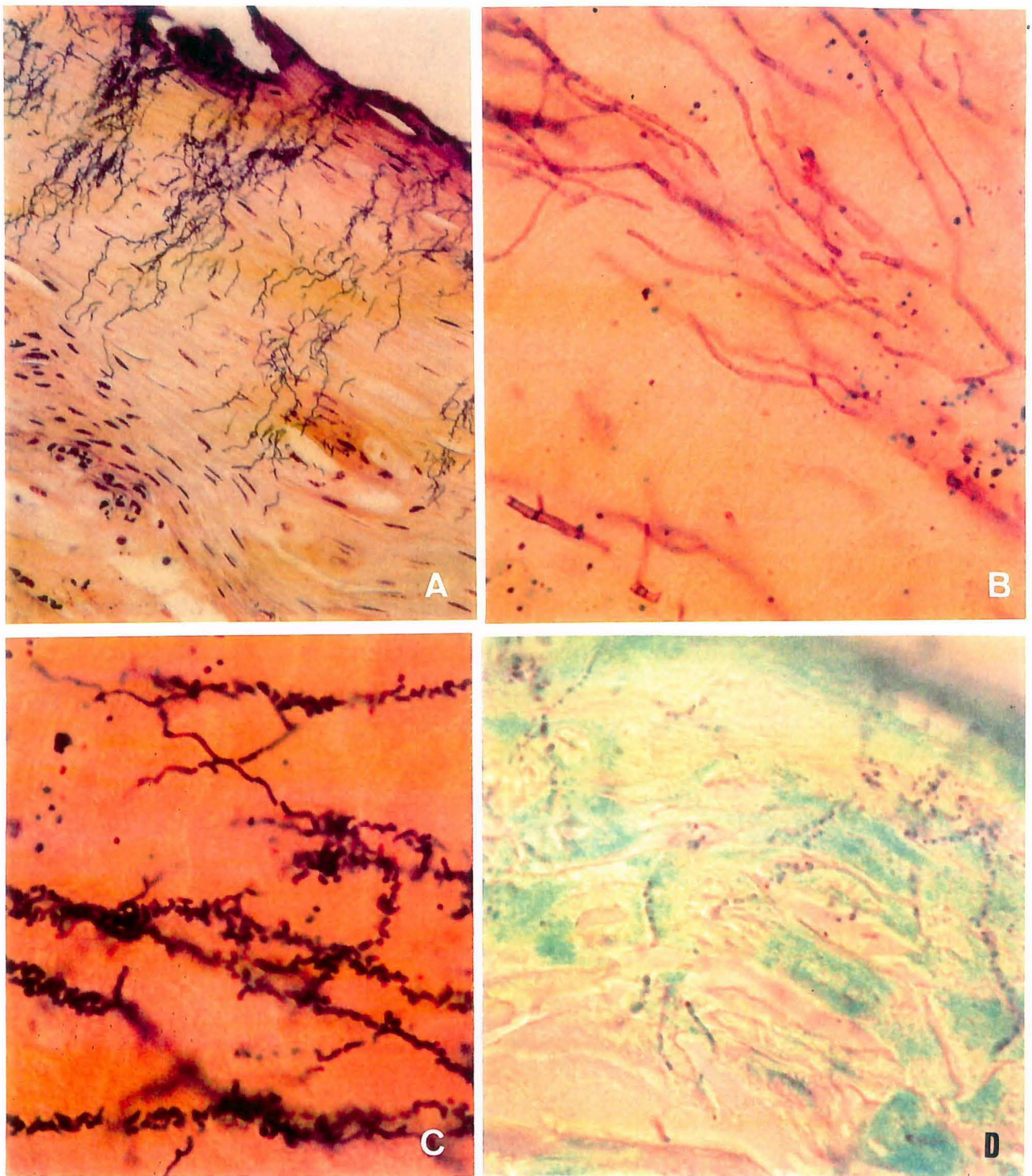


FIGURA 9. Dermatite interdigital papulosa com paraqueratose e inúmeros organismos filamentosos invadindo o estrato córneo, WS X 100 (A). Detalhe dos organismos filamentosos ramificados, WS X 1000 (B). Aspecto da fragmentação dos filamentos em múltiplas formas curtas, WS X 1000 (C). Aspecto dos organismos filamentosos na coloração com GMS X 1000 (D).

4. ARTIGO 2

Neste item estão inclusas cópias das cartas dos editores recomendando alterações, comunicando o aceite para publicação e transferência de direitos autorais, bem como cópia corrigida da versão do artigo. Este artigo será publicado no formato de *original research paper*.

THE
**Veterinary
Record**

7 Mansfield Street
London, W1G 9NQ, UK
tel +44 (0)20 7636 6541
fax +44 (0)20 7637 0620
www.vetrecord.co.uk

Dr D. Driemeier
Faculdade de Veterinaria
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Av. Bento Goncalves, no. 9090
Cx. P 15094
91540-000 Porto Alegre RS
Brazil

June 10, 2004

Ref: P5755

Dear Dr Driemeier

Immunopathological investigations on bovine digital dermatitis

CEF Cruz, CA Pescador, Y Nakajima & D Driemeier

Thank you for submitting the above paper to be considered for publication in *The Veterinary Record*. The manuscript has now been returned by our scrutineers and I am pleased to be able to tell you that, subject to a number of amendments being made, it has been recommended for publication in the journal.

One scrutineer commented that it was an excellent piece of work and thought the photographs were of excellent quality. It was felt, however, that the reference list could be slightly reduced. There are also a number of editorial type points marked on the copy of the manuscript. Please could you revise the manuscript as you feel is appropriate in the light of these comments and return it to me. Can you please place any changes to the text in a different font/style or colour to aid the reviewing process.

I look forward to hearing from you.

Yours sincerely,


Maura O'Malley
Assistant Editor

THE **Veterinary
Record**
In Practice

YOU
YOUR
VET

JSAP
JOURNAL OF SMALL ANIMAL PRACTICE
VETERINARY
NURSING

BVA
PUBLICATIONS

British Veterinary Association.
Registered number: 206456 England.
Company limited by guarantee

THE **Veterinary** Record

7 Mansfield Street
London, W1G 9NQ, UK
tel +44 (0)20 7636 6541
fax +44 (0)20 7637 0620
www.vetrecord.co.uk

Ref: CE/KC P5755

2 July, 2004

Dear Dr Driemeier

Immunopathological investigations on bovine digital epidermitis

I am glad to be able to tell you that your paper has been accepted for publication and I shall be letting you have proofs for approval in due course. A form of copyright is printed below. It would be appreciated if you would complete and return it, after reading the copyright notes for contributors below the form of copyright. A duplicate is enclosed for you to keep.

Yours sincerely



Maura O'Malley, Deputy Editor

Assignment of copyright

To be filled in if copyright belongs to you:

In consideration of the publication in all editions of *The Veterinary Record* of my above contribution, I hereby assign to the British Veterinary Association full copyright in the said publication.

Signed David Driemeier Date 21 July, 2004

To be filled in if copyright does not belong to you:

Name and address of copyright holder:

b The copyright holder hereby grants the British Veterinary Association non-exclusive right to deal with requests from third parties in the manner specified in paragraphs 3 and 5 below.

Signed _____ Date _____

Copyright: Notes for Contributors

- (1) Formal written transfer of copyright from the author(s) to the publishers for all contributions to appear in the journal is required for the following reasons:
 - (a) Ownership of copyright by publishers on behalf of their journals should improve international protection against infringement
 - (b) Requests by third parties to reproduce copyright material will be handled efficiently and consistently, for example through copyright licensing schemes, in accordance with a general policy which is sensitive both to changes in copyright legislation and the general desirability of encouraging the dissemination of knowledge
- (2) In assigning your copyright, you are not forfeiting your right to use your contribution elsewhere. This you may do after seeking permission from the journal and subject to an appropriate acknowledgement
- (3) All requests to reprint your contribution, or a substantial part of it, in another publication will be subject to your approval (which we will assume is given if we have not heard from you within four weeks of writing to you at your last known address)
- (4) The journal is registered with the Copyright Clearance Center, a non profit making organisation which offers centralised licensing arrangements for photocopying within the USA
- (5) It is understood that in some cases copyright will be held by the contributor's employer. If so, the journal requires non exclusive permission to deal with requests from third parties, on the understanding that any requests from third parties will be handled in accordance with paragraph 3 above (ie, you and not your employer will be asked to approve the proposed use)

THE **Veterinary**
Record
In Practice

YOU
YOUR
VET

JSAP
JOURNAL OF SMALL ANIMAL PRACTICE
VETERINARY
NURSING

BVA
PUBLICATIONS

British Veterinary Association.
Registered number: 206456 England.
Company limited by guarantee

Immunopathological investigations on bovine digital epidermitis

Cruz, C.E.F.¹, Pescador, C.A.¹, Nakajima, Y.², Driemeier, D.¹

¹ DVM, Department of Veterinary Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Avenida Bento Gonçalves, 9090, CxP.15094, CEP.91540-000, e-mail. davetpat@vortex.ufrgs.br Porto Alegre, RS – Brazil.

² DVM, Department of Toxic-Pathology, National Institute of Animal Health – National Agricultural Research Organization (NARO), e-mail. yasunk@affrc.go.jp 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan.

Summary

Paraffin-embedded fragments of bovine digital skin lesions were sectioned and stained with Warthin-Starry, hematoxylin and eosin, Grocott's methenamine silver and immunohistochemical techniques. Microorganisms observed in the silver-stained sections were classified into four major morphological variations. While spirochaetes were the most prevalent organisms, additional bacillary and coccoid elements were also present in most sections. Immunohistochemical probing demonstrated that approximately 80, 46 and 41% of the digital and interdigital dermatitis sections stained positively with polyclonal antisera to *Treponema pallidum*, *Campylobacter jejuni*, and *Fusobacterium necrophorum*, respectively. Moreover, an unidentified branching filamentous organism (presumed to be an actinomycetes species) was consistently present in the sections of samples from mild interdigital lesions.

Keywords: bovine, digital epidermitis, immunohistochemistry, *Treponema*, *Campylobacter*, *Fusobacterium*.

Introduction

THE bovine digital epidermitis remain a worldwide welfare and production problem (Read and Walker 1998, Wells and others 1999) and include lesions such as digital dermatitis (DD), interdigital dermatitis (IDD) and interdigital necrobacillosis (IN). Digital dermatitis has been also referred to by papillomatous digital dermatitis, footwarts, verrucous dermatitis and other names (Read and Walker, 1998). DD lesions have been described as well-circumscribed ulcerated and/or papillated erythematous, painful skin lesions, typically affecting the plantar/palmar skin bordering the interdigital space (Blowey and Sharp 1988, Read and Walker 1998). Both, the demonstration of intralesional spirochete-like organisms in DD (Read and others 1992, Blowey and others 1994, Döpfer and others 1997) and their association with genetic groups of *Treponema* (Walker and others 1995, Choi and others 1997, Demirkan and others 1998 and 1999, Trott and others 2003, Edwards and others 2003a) have been well documented.

Although IDD has been widely considered a separate and milder form of epidermitis that is restricted to the hairless skin of the interdigital space and characterized by erosions of the dermis without formation of filiform papillae (Greenough and others 1981, Weaver and others 1981, Toussaint Raven 1985, Gourreau and others 1992, Hull and others 1993), its identity has been recently questioned because it shares some features in common with DD (Blowey and others 1994, Walker and others 1995, Read and Walker 1998). On the other hand, interdigital necrobacillosis, the *Fusobacterium necrophorum* infection, involves the skin causing deep fissures, necrosis and sloughing tissues in association with marked and diffuse digital swelling (Gourreau and others 1992, Hull and others 1993, Venter and Amstel 1994). While *Fusobacterium necrophorum* and *Bacteroides* spp. have been consistently associated with IN (Berg and Loan 1975, Cook and Cutler 1995, Doherty and others 1998) and IDD (Laing and Egerton 1978, Greenough and others 1981, Peterse 1985), spirochetes have also been demonstrated in IN (Doherty and others 1998) and IDD lesions (Blowey and others 1994, Walker and others 1995).

Despite the aforementioned brief descriptions, the morphological characteristics which allow differentiation of the conditions affecting the bovine digital skin are not always clear. Moreover, these lesions may be inter-related or concurrent (Hull and others 1993, Sheldon 1994, Venter and Amstel 1994) and some overlap may exist between the etiopathogenesis of these conditions (Blowey and others 1994, Walker and others 1995, Doherty and others 1998, Read and Walker 1998).

A multifactorial etiopathogenesis associating complex microbial communities (Sabo and others 1988, Döpfer and others 1997, Edwards and others 2003b) with environmental factors (Sabo and others 1988, Rodriguez-Lainz and others 1996 and 1999) has been proposed for DD. Although yet not completely elucidated, the association of DD lesions with several other obligate anaerobic organisms including *Bacteroides* sp. (Blowey and Sharp 1988, Sabo and others 1988, Collighan and Woodward 1997), *Campylobacter* sp. (Döpfer and others 1997, Ohya and others 1999) and *Fusobacterium necrophorum* (Sabo and others 1988, Döpfer and others 1997) has been reported. It has been proposed that digital dermatitis could initiate and progress through shifts in microbial species composition of those complex communities, concomitant with environmental changes, similarly as it occurs in the human periodontal disease (Edwards and others 2003b), in which the synergism between these organisms has been reported as necessary for survival and for initiation of the inflammation (Kolenbrander and others 1995).

This communication reports a study on bovine digital epidermitis lesions with special reference to the histochemical and immunohistochemical findings associated with the micro-organisms that colonize these lesions.

Materials and methods

Samples of digital lesions originated from fragments collected at slaughterhouses and excised lesions of dairy cows at farm visits. Slaughtered cattle were mostly European-Nelore crossbred animals fattened in feedlots from several municipalities of the Rio Grande do Sul state. The dairy cattle from which samples were also collected were managed in stall-barns, but also had daily access to pastured paddocks. Lesions were classified following previous descriptions (Greenough and others 1981, Toussaint Raven 1985, Blowey and Sharp 1988, Hull and others 1993, Read and Walker 1998, Venter and Amstel 1994). If a lesion involved simultaneously the interdigital space and the plantar / palmar skin bordering the interdigital space, then it was classified as DD combined with IDD. If only the hairless skin of the interdigital cleft was affected, even that in its entire extent, it was classified as an IDD lesion. Darkened areas in the interdigital skin bearing numerous small circumscribed solid elevations were named interdigital papuliferous dermatitis (IPD) lesions (Fig 1A). Interdigital stabs and cuts (ISC) secondary to mechanical injuries were also studied. Lesions were additionally classified conform gross appearance and degree of severity. The heel horn erosions (HHE) samples studied here were taken from the horn-skin junctions. The specimens were processed by standard histological methods and stained with Warthin-Starry (WS) method. Sections, in which the occurrence of fungal organisms was suspected, were also stained with Grocott's methenamine silver (GMS) technique. Sections of representative samples from digital epidermitis were additionally stained with hematoxylin-eosin (HE).

The organisms observed on the silver-stained sections were classified according to their morphological type into four major categories. F1: spirochete-like organisms; F2: branching filamentous organisms; F3: variations of bacillary forms and F4: spherical organisms. The occurrence of these variations in the sections was visually evaluated and classified into four additional categories: (1) few to several organisms focally arranged; (2) numerous, focally arranged and/or scattered; (3) huge numbers diffusely dispersed and (4) myriad organisms scattered, but also arranged in agglomerates.

Immunohistochemistry was performed on serial formalin-fixed, paraffin-embedded sections, which were stained by the streptavidin-biotin immunoperoxidase technique using polyclonal rabbit antisera to *Treponema pallidum* (ViroStat, Portland, USA), at 1/250 dilution; to *Campylobacter jejuni* (ViroStat, Portland, USA), at 1/100 dilution and to *Fusobacterium necrophorum* (Shibahara and others 2002), at 1/1500 dilution; and a monoclonal antibody to *Bacteroides fragilis* (Biogenesis, Berlin, Germany) at 1/100 dilution. The specimens were digested in 0.1% trypsin for 15 minutes at 37° C. Diaminobenzidine and, sporadically, permanent red served as chromogens. Positive controls for *Treponema pallidum* stained concurrently with each batch consisted of tissues from a human affected by syphilis. Additionally, tissues from an ovine hepatic abscess caused by *Fusobacterium necrophorum*, a bovine periodontal lesion due to *Bacteroides* spp. infection, and from an aborted bovine fetus by *Campylobacter* spp. served as positive controls for the respective antibodies.

Results

A total of 6504 feet from slaughtered beef cattle was examined for the presence of digital skin lesions, which were recorded and excised or sampled (Table 1). An additional 104 dairy cows from two herds previously studied were lifted in a hydraulic chute for routine foot care and had digital skin lesions occasionally excised or sampled. The form of epidermitis most commonly observed was IDD; however HHE was the most frequent digital change. Except for the typical location and format of lesions and the presence of filiform papillae in 32% of the DD lesions, the IDD and DD lesions (Fig 1B and 1C) presented similar clinical features, which included circumscribed areas of granular ulceration interspersed with whitish proliferated areas.

The evaluation of the WS-stained sections revealed a total of 159 samples (63%) positive for microorganisms (Table 2). Most WS-stained sections presented polymicrobial populations (Fig 2) and although organisms F3 were present in most sections, the most prevalent bacterial type was F1. The F1 organisms were especially observed penetrating into the stratum spinosum through the intercellular junctions (Fig 3), and deeply scattered in the stratum spinosum. F3 and F4 organisms were mostly diffusely scattered between spirochetes F1 (Fig 2), but also were seen forming agglomerates adjacent to the F1-colonies. F2 presented mostly as numerous and scattered organisms superficially infiltrated in the stratum corneum (Fig 4A), but also were seen in small groups focally

arranged. Sporadically, these branched filamentous organisms (Fig 4B) were fragmented into numerous bacillary structures (Fig 4C). F2 organisms were consistently present in the IPD sections and also in a considerable proportion of IDD sections, principally in those from samples of mild lesions. Although faintly stained, these filaments could also be observed in the HE and GMS-stained sections.

DD and IDD sections presented similar patterns of microbial colonisation; however there were some minor differences. F1 organisms were present in all DD, but not IDD sections and F2 organisms were present in considerably more IDD (30%) than DD (15%) sections. Colonies of spirochaetes forming large agglomerates (pattern 4) were often observed in DD, but only sporadically in IDD lesions. Similar patterns were additionally observed in some IPD and IDD WS-stained sections. In six IDD sections, there was a predominance of the F3 and F4 forms.

Although approximately 52% of the dermatitis lesions were combined with some degree of HHE, only 2 of the 34 HHE samples presented a few bacteria similar to that found in dermatitis. Samples of ISH were mostly negative for bacteria; however lesions ISH when combined with IDD presented populations similar to that observed in IDD lesions. Besides organisms classified in the four major categories, additional variations were also occasionally observed. The ISC and IN lesions were mostly colonized by straight and short F3 rods and F4 organisms. However, additional thin, short filaments were sporadically seen in WS-stained sections of IN, ISC and also in some dermatitis sections. These filaments were shorter, thinner and not branched in comparison with the F2 organisms. Bacteria with comma shape were only occasionally observed. Variations of the spirochetes-like F1 organisms were observed principally in sections heavily colonized and included shorter, less twisted and thicker structures mostly distributed in the adjacencies of the agglomerates of F1 organisms. Irregular budding round structures were observed in seven dermatitis sections and stained positively by the GMS method.

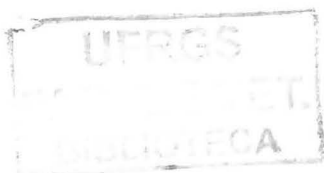
Huge numbers of F1 organisms predominated in severe erosive-proliferative lesions, but several F3 and F4 structures were also present. Erosive lesions presented variable pattern of colonization. In the papuliferous lesions, the F2 type predominated markedly. In this study, only IPD and IDD presented mild lesions, which were also predominantly colonized by F2 filaments, its fragmented forms and numerous shorter structures.

Histological changes observed in IPD, IDD and DD are summarized in Table 3. Histologically, DD and IDD lesions were similar; however there were differences in the degree of severity of lesions. Those lesions characterised by diffuse chronic-active dermatitis, with marked pseudoepitheliomatous hyperplasia and myriad argyrophilic micro-organisms. The ISC and NI lesions characterized especially by edema, intense inflammatory infiltration, degeneration, and necrotic changes.

Immunohistochemically, the most frequent and markedly positive reactions were associated with the *Treponema pallidum* antisera staining (Fig 5). In some DD and IDD sections, the darkened areas observed under WS-staining correlated with positive reactions to *Treponema pallidum* antisera staining (Fig 6). However, in 11 dermatitis samples, the marked areas with the *Treponema pallidum* immuno-staining were considerably smaller than those invaded by spirochaetes in replicate WS-stained sections. Positive reactions were detected in 81% and 78% of the DD and IDD sections stained with the polyclonal antisera to *Treponema pallidum*, respectively (Table 4). These reactions corresponded to organisms F1. Approximately 46 and 41% of the DD and IDD sections also stained positively with the polyclonal antisera to *Campylobacter jejuni* and to *Fusobacterium necrophorum*, respectively. The pattern of the *Campylobacter*-positive (Fig 7) sections was similar to that present in *Treponema*-positive sections and consisted of marked areas in the intercellular junctions. On the other hand, the *Fusobacterium*-positive sections demonstrated diffusely scattered stained areas. Most the *Fusobacterium*-positive reactions were observed in severe erosive-proliferative lesions. Strong reactions stained with *Fusobacterium necrophorum* antisera were observed in NI lesions. *F. necrophorum*-positive sections correlated to replicate HE-sections, in which degenerative and necrotic changes were important findings. Finally, all the sections stained with monoclonal antibodies to *Bacteroides fragilis* resulted negative, including the positive controls. Besides the F2 filaments, other organisms have not stained with the antisera tested here.

Discussion

In the present study, IDD was the most prevalent form of digital epidermitis. Although an investigation on the prevalence of digital epidermitis in dairy cattle has not been performed here, it was interesting to note that just a few typical DD lesions were found in herds which were severely affected by DD in the past (Cruz and others 2001). In this preliminary report only lame animals were lifted in the hydraulic chute and had their lesions



recorded. IDD lesions have been traditionally associated with mild clinical signs (Hull and others 1993, Venter and Amstel 1994, Berry 2001); therefore its prevalence might have been underestimated. This observation may suggest that, if DD and IDD are inter-related lesions of the same disease complex, and there has been constant evidence supporting this hypothesis, it may be possible that as the disease becomes endemic within a herd, IDD could become the commonest clinical form. The differences related to the severity of the clinical signs usually associated with DD and IDD lesions could be, at least in part, linked to the degree of severity of the inflammatory infiltration observed in each condition. Both, the correlation between HHE and dermatitis lesions (Manske and others 2002) and the failure to demonstrate histological changes of dermatitis in samples of HHE (Blowey and Done 1995) have been previously reported and discussed.

Although presenting clearly distinct location and format of lesions, most DD and IDD lesions shared similar clinical features including erosive and proliferative areas concurrently. Despite being traditionally associated with *Dichelobacter (Bacteroides) nodosus* infection (Greenough and others 1981, Toussaint Raven 1985, Gourreau and others 1992), interdigital dermatitis lesions have lately also been linked to spirochaetal involvement, which has been demonstrated histochemically (Blowey and others 1994) and bacteriologically (Walker and others 1995). Since those reports, both lesions have been associated with the same disease complex. Although just briefly studied here, the histological lesions were consistent with both, the previous studies (Bassett and others 1990, Blowey and others 1994, Döpfer and others 1997) and the aforementioned hypothesis. In addition, this spirochaetal involvement in IDD has also been observed here by immuno-staining with polyclonal antisera to *Treponema pallidum*.

Although there was an evident predominance of the spirochaetes-like organisms, most WS-stained DD and IDD sections revealed the presence of polymicrobial populations, which included variations of bacillary and coccoid structures. A profuse colonisation by spirochete-dominant flora had already been reported in DD lesions (Blowey and Sharp 1988, Döpfer and others 1997, Read and Walker 1998). Spirochaetes were seen in almost all depths of the epidermis, but most were deeply infiltrated in the stratum spinosum of lesions, in which only small areas of the stratum corneum remained. Findings related to the morphological variations of the spirochetes were consistent with previous reports (Blowey and others 1995, Read and Walker 1998), however we were not able to observe the degenerative form described by Döpfer and others (1997). These spirochete-like

organisms stained markedly with the polyclonal *Treponema pallidum* antisera used here. These findings are consistent with those reported by Shibahara and others (2002), but differed in part from those described by Demirkan and others (1998), in which spirochetes did not react to monoclonal antibodies against *Treponema pallidum*. However the risk of false negative results when detecting infectious disease agents in paraffin-embedded sections with the use of monoclonal antibodies may be increased (Haines and Chelack 1991). The different results observed between some WS and *Treponema pallidum* immuno-stained replicate sections are suggestive that other spirochetes may also occur in these dermatitis lesions.

Shorter forms including bacilli and cocci were mostly scattered between the spirochetes and were the organisms most prevalent in ISC, but also present in most IDD sections. The *Treponema* species may present potentially high tissue-destructive capabilities, which are reported to be enhanced by, and probably dependent upon, the presence of other micro-organisms present in these polymicrobial infections (Edwards and others 2003b). Positive reactions to *Campylobacter* antiserum were observed in a considerable proportion of the DD and IDD sections. The presence of *Campylobacter* species in DD lesions have already been reported through immunofluorescence testing (Döpfer and others 1997) and bacteriological isolation (Ohya and others 1999); however the immunohistochemical method has identified the organism in association with specific tissues and histological lesions. Furthermore, the selectivity of the immunohistochemical staining enabled the detection of these bacteria, most of which was probably masked by the agglomerates of spirochetes in the WS-stained sections. The pattern of distribution of the *Campylobacter* sp. occupying the space between the epithelial cells is suggestive of invasion. Approximately 41% of the sections of dermatitis lesions also react against antibodies to *Fusobacterium necrophorum*, whose participation in DD lesions had already been suggested (Döpfer and others 1997, Edwards and others 2003b). Bacilli with comma form were only sporadically observed on WS-stained sections. *Campylobacter* sp., as *Fusobacterium necrophorum* and other bacteria, may assume different variations making observation difficult in silver-stained sections and emphasizing the use of the immuno-staining methods.

Campylobacter sp. and *Treponema* sp. are actively motile organisms and motility appears to play an important role in colonisation (Garcia and Brooks 1993). Silver-stained sections showed spirochaetes clearly invading epidermis through the intercellular

junctions. However, immuno-stained sections revealed both, *Campylobacter* and *Treponema* organisms penetrating the epidermis through those areas. *Campylobacter* sp. also may cause excessive epithelial proliferation and necrotizing changes (Garcia and Brooks 1993), which have been associated with DD and IDD (Bassett and others 1990, Blowey and others 1994). *Fusobacterium necrophorum* has been reported as possessing little or no ability to invade normal epithelia, but with capability to enter and multiply in damaged tissues (Timoney and others 1988). Although lesions studied here were of unknown age, the predominant features of the lesions such as mild-erosive and severe-proliferative may be associated with initial and advanced processes (Thomson 1984), respectively. The *Fusobacterium necrophorum*-positive sections originated mainly from severe-proliferative lesions indicating a probable involvement of these bacteria in secondary colonization. The additional filamentous bacteria observed in some WS-stained sections were presumed to be *Fusobacterium necrophorum*, but this has not been confirmed by immuno-staining. Although *Bacteroides* species have usually been linked to these conditions, we were not able to detect them through immuno-staining with the monoclonal antibody used here. Perhaps, in part, these negative results could be related to the already mentioned difficulty associated with the use of monoclonal antibodies in this kind of study (Haines and Chelack 1991). This product has been indicated for use in immuno-fluorescence testing and has only been used here because we found no additional option.

The branching filamentous organisms predominated in the interdigital papuliferous dermatitis lesions and also were frequent in IDD lesions. In fact some IPD and IDD sections presented similar patterns in both, the WS and HE-stained sections. These organisms were associated with mild changes in the epidermis. They usually were located in areas of the stratum corneum, whose coloration was characterised by an enhanced eosinophilic aspect under HE-staining. Those areas in replicate WS-stained sections demonstrated absence of spirochetes. In IPD and IDD similar sections, in which focal erosions and necrosis were established, the presence of a few to several spirochetes was then detected. In 50% of the tested IPD sections, there were slight and superficial *Treponema*-positive reactions, which correlated to areas with crowded organisms, making difficult their evaluation in replicate WS-stained sections. Probably only a few spirochetes were present in those areas. Conversely, in DD and IDD sections, *Treponema*-positive reactions were usually scattered and strongly marked.

These findings raise the possibility that those filamentous organisms could initiate colonization in these interdigital lesions and create conditions for the subsequent development of the following colonizers. The pattern of distribution of these filamentous organisms, their association with mild lesions, their scarce presence in control samples, and the frequent association of huge numbers of spirochetes with lesions in which the stratum corneum was almost completely absent are evidences consistent with this hypothesis. Interestingly, when those filamentous organisms were observed through 200 – 400 X magnifying, although bigger than the spirochaetes, they resembled these organisms. However, when using the 1000 X magnifying lenses, their true morphology became evident. The reasons for the infrequent presence of filamentous organisms in DD lesions are unknown. Perhaps it could be attributed to the scarcity of mild (initial) DD lesions sampled in this study. Neither these F2 filamentous organisms nor the shorter forms associated with them have stained with any of the antisera tested here, but they were moderately evident in both, the HE and GMS-stained sections.

These filamentous organisms are presumed to be an actinomycetes species. The main animal pathogens in the actinomycetes are in the genera *Actinomyces*, *Nocardia* and *Dermatophilus* (Quinn and others 1994). The Nocardiforme Actinomycetes usually produce branched mycelium that may fragment into shorter elements (Holt and others 1994). Areas resembling this process of fragmentation were sporadically seen in WS-stained sections. Actinomycosis is generally characterized by formation of abscesses containing encapsulated aggregates of filaments. In Nocardiosis, intensely purulent or necrotizing inflammatory reaction is associated with slender and branched filamentous bacteria. Dermatophilosis, which is usually limited to the epidermis, is characterized by varying degrees of hyperkeratosis, parakeratosis, acanthosis, ballooning degeneration and scab formation. Characteristically, filaments penetrate the epidermis perpendicularly, have predilection by cornified layers and stain weakly with H&E. The lesions commence as papules and develop into exudative scab formation (Gyles 1993). *Dermatophilus congolensis* has been reported to cause superficial digital infection in humans (Chandler and others 1980) and animals (Gyles 1993, De Meneghi and others 2002). Therefore, there were features in common between the *D. congolensis* infection and the condition described here; however, further study is obviously needed to identify these organisms.

The similarities between these bacteria and fungi organisms have often been reported (Chandler and others 1980, Gyles 1993). These organisms may share some structural

characteristics of their complex polysaccharides that probably could explain the GMS-staining pattern observed in the filamentous organisms. If IPD lesions are associated with initial stages of IDD or are distinct lesions, it remains to be determined. Whether *Actinomyces* species have already been reported to predominate in initial stages of human gingivitis that has been regarded as a precursor to more serious periodontal disease (Gyles 1993, Edwards and others 2003b). The similarity between human periodontal disease and bovine digital dermatitis has often been emphasized (Döpfer and others 1997, Doherty and others 1998, Edwards and others 2003a-b). The immunohistochemical association of *Treponema* sp., *Campylobacter* sp. and *Fusobacterium necrophorum* with the polymicrobial communities present in those bovine digital epidermitis lesions is indicative of their involvement in the formation of these lesions and demonstrates additional evidences for their frequently reported multifactorial etiology. Except for a few cases, these micro-organisms were practically absent in sections from control and traumatic lesions samples, which provides further support for their aetiological roles. Besides the filamentous F2 organisms here described, additional micro-organisms that were observed in WS-stained sections have not stained with the antisera tested in this study, indicating the need for additional investigations.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Marisa R. I. Cardoso and Dr. Verônica Schmidt, Department of Preventive Veterinary Medicine, Veterinary Microbiology - UFRGS, for technical assistance, Dr. Paulo Bender and Dr. Carlos Alberto Teixeira for providing facilities. This study was funded by the CNPq, Brazil.

References

- BASSETT, H.F., MONAGHAN, M.L., LENHAN, P., DOHERTY, M.L., CARTER, M.E. (1990) Bovine digital dermatitis. *Veterinary Record* **126**, 164-165.
- BERG, J.N., LOAN, R.W. (1975) *Fusobacterium necrophorum* and *Bacteroides melaninogenicus* as etiologic agents in foot rot in cattle. *American Journal of Veterinary Research* **36**, 1115-1122.
- BERRY, S.L. (2001) Diseases of the digital soft tissues. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **17**, 129-141.
- BLOWEY, R.W., SHARP, M.W. (1988) Digital dermatitis in dairy cattle. *Veterinary Record* **122**, 505-508.
- BLOWEY, R.W., DONE, S.H., COOLEY, W. (1994) Observations on the pathogenesis of digital dermatitis in cattle. *Veterinary Record* **135**, 115-117.

- BLOWEY, R.W., DONE, S.H. (1995) Failure to demonstrate histological changes of digital or interdigital dermatitis in biopsies of slurry heel. *Veterinary Record* **137**, 379-380.
- CHANDLER, F.W., KAPLAN, W., AJELLO, L. (1980) A colour atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases, 1st edn. Ed. G.B. Carruthers. Weert, Wolfe Medical Publications Ltd, 333p.
- CHOI, B.K., NATTERMAN, H., GRUND, S., HAIDER, W., GÖBEL, U.B. (1997) Spirochetes from digital dermatitis lesions in cattle are closely related to treponemes associated with human periodontitis. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 175-181.
- COLLIGHAN, R.J., WOODWARD, M.J. (1997) Spirochaetes and other bacterial species associated with bovine digital dermatitis. *FEMS Microbiology Letters* **156**, 37-41.
- COOK, N.B., CUTLER, K.L. (1995) Treatment and outcome of a severe form of foul-in-the-foot in cattle. *Veterinary Record* **136**, 19-20.
- CRUZ, C., DRIEMEIER, D., CERVA, C., CORBELLINI, L.G. (2001) Bovine digital dermatitis in southern Brazil. *Veterinary Record* **148**, 576-577.
- DEMIRKAN, I., CARTER, S.D., MURRAY, R.D., BLOWEY, R.W., WOODWARD, M.J. (1998) The frequent detection of a treponeme in bovine digital dermatitis by immunocytochemistry and polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* **60**, 285-292.
- DEMIRKAN, I., CARTER, S.D., HART, C.A., WOODWARD, M.J. (1999) Isolation and cultivation of a spirochaete from bovine digital dermatitis. *Veterinary Record* **145**, 497-498.
- De MENEGHI, D., FERROGLIO, E., BOLLO, E., VIZCAINO, L.L., MORESCO, A., ROSSI, L. (2002) Dermatophilosis of Alpine chamois (*Rupicapra rupicapra*) in Italy. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **144**, 131-136.
- DOHERTY, M.L., BASSET, H.F., MARKEY, B., HEALY, A.M., SAMMIN, D. (1998) Severe foot lameness in cattle associated with invasive spirochaetes. *Irish Veterinary Journal* **51**, 195-198.
- DÖPFER, D., KOOPMANS, A., MEIJER, F.A., SZAKÁLL, I., SCHUKKEN, Y.H., KLEE, W., BOSMA, R.B., CORNELISSE, J.L., ASTEN, A.J.A.M., HUURNE, A.A.H.M. (1997) Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. *Veterinary Record* **140**, 620-623.
- EDWARDS, A.M., DYMOCK, D., WOODWARD, M.J., JENKINSON, H.F. (2003a) Genetic relatedness and phenotypic characteristics of *Treponema* associated with human periodontal tissues and ruminant foot disease. *Microbiology* **149**, 1083-1093.
- EDWARDS, A.M., DYMOCK, D., JENKINSON, H.F. (2003b) From tooth to hoof: treponemes in tissue-destructive diseases. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 767-780.
- GARCIA, M.M., BROOKS, B.W. (1993) *Campylobacter*. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2nd edn. Eds. C.L. Gyles, C.O. Thoen. Ames, Iowa State University Press, pp.262-272.
- GREENOUGH, P.R., MACCALLUM, F.J., WEAVER, A.D. (1981) Diseases of the digital skin and subcutis. In: Lameness in cattle, 2nd edn. Ed. A.D. Weaver. Bristol, Wright Scientifica, pp.151-169.
- GOURREAU, J.M., SCOTT, D.W., ROUSSEAU, J.F. (1992) La dermatite digitee des bovins. *Le Point Vet* **24**, 49-57.
- GYLES, C.L. (1993) Nocardia; Actinomyces; Dermatophilus. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2nd edn. Eds. C.L. Gyles, C.O. Thoen. Ames, Iowa State University Press, pp.124-132.

- HAINES, D.M., CHELACK, B.J. (1991) Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **3**, 101-112.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edn. Baltimore, William & Wilkins, pp.625-650.
- HULL, B.L., WEAVER, A.D., KOENIG, G.J., WELKER, B., RINGS, D.M., ST. JEAN, G., CRAWFORD, W.H., TULLENERS, E., AMES, N.K. (1993) Diseases of the Musculoskeletal System. In: HOWARD, J.L. *Current Veterinary Therapy – Food Animal Practice*, 3rd edn. Philadelphia, W.B. Saunders, pp.864-881.
- KOLENBRANDER, P.E., PARRISH, K.D., ANDERSEN, R.N., GREENBERG, E.P. (1995) Intergenic coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infection and Immunity* **63**, 4584-4588.
- LAING, E.A., EGERTON, J.R. (1978) The occurrence, prevalence and transmission of *Bacteroides nodosus* infection in cattle. *Research in Veterinary Science* **24**, 300-304.
- MANSKE, T., HULTGREN, J., BERGSTEN, C. (2002) Prevalence and interrelationships of hoof lesions and lameness in Swedish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* **54**, 247-263.
- OHYA, T., YAMAGUCHI, H., NII, Y., ITO, H. (1999) Isolation of *Campylobacter sputorum* from lesions of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle. *Veterinary Record* **145**, 316-318.
- PETERSE, D.J. (1985) Laminitis and interdigital dermatitis and heel horn erosion. An European perspective. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **1**, 83-91.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B.K., CARTER, G.R. (1994) *Clinical Veterinary Microbiology*, 2nd edn. London, Mosby, pp. 144-155.
- READ, D.H., WALKER, R.L., CASTRO, A.E. (1992) An invasive spirochaete associated with interdigital papillomatosis of dairy cattle. *Veterinary Record* **18**, 59-60.
- READ, D.H., WALKER, R.L. (1998) Papillomatous digital dermatitis (footwarts) in California dairy cattle: clinical and gross pathologic findings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **10**, 67-76.
- RODRIGUEZ-LAINZ, A., DAVID, W.H., CARPENTER, T.E., READ, D.H. (1996) Case-control study of digital dermatitis in southern California dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* **28**, 117-131.
- RODRIGUEZ-LAINZ, A., MELENDEZ-RETAMAL, P., HIRD, D.W., READ, D.H., WALKER, R.L. (1999) Farm- and host-level risk factors for papillomatous digital dermatitis in Chilean dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine* **42**, 87-97.
- SABO, J., HUDAC, A., FENDTOVÁ, E. (1988) The ecology of anaerobic non-sporulating bacteria in relation to dermatitis digitalis in cattle. *Veterinari Medicina* **33**, 265-272.
- SHELDON, I.M. (1994) Digital and interdigital dermatitis in dairy cattle. *Veterinary Record* **135**, 559-560.
- SHIBAHARA, T., AKIBA, T., MAEDA, T., OGATA, T., HONDA, R., ISHIKAWA, Y., KADOTA, K. (2002) Immunohistochemical and ultrastructural identification of *Fusobacterium necrophorum* in bovine fatal necrotizing glossitis. *Journal of Veterinary Medicine Science* **64**, 523-526.
- SHIBAHARA, T., OHYA, T., ISHII, R., OGIHARA, Y., MAEDA, T., ISHIKAWA, Y., KADOTA, K. (2002) Concurrent spirochaetal infections of the feet and colon of cattle in Japan. *Australian Veterinary Journal* **80**, 497-502.
- THOMSON, R.G. (1984) *General Veterinary Pathology*, 2nd edn. Philadelphia, W.B. Saunders, 463p.
- TOUSSAINT RAVEN, E. (1985) Cattle footcare and claw trimming. Ipswich, Farming Press. 38-40.

- TIMONEY, J.F., GILLESPIE, J.H., SCOTT, F.W., BARLOUGH, J.E. (1988) Hagan and Brunner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, 8th edn. London, Comstock Publishing Associates, 951p.
- TROTT, D.J., MOELLER, M.R., ZUERNER, R.L., GOFF, J.P., WATERS, R., ALT, D.P., WALKER, R.L., WANNERMUEHLER, M.J. (2003) Characterization of *Treponema phagedenis*-like spirochetes isolated from papillomatous digital dermatitis lesions in dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 2522-2529.
- VENTER, B.J., van AMSTEL, S.R. (1994) *Fusobacterium necrophorum*, *Dichelobacter* (*Bacteroides*) *nodosus* and *Bacteroides* spp. Infections. In: Infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa, V.2. Eds. J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson, R.C. Tustin. Oxford, Oxford University Press, pp.1200-1228.
- WALKER, R.L., READ, D.H., LORETZ, K.J., NORDHAUSEN, R.W. (1995) Spirochetes from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. *Veterinary Microbiology* **47**, 343-355.
- WEAVER, A.D., ANDERSON, L., DE LAISTRE BANTING, A., DEMERZIS, P.N., KNEZEVIC, P.F., PETERSE, D.J., SANKOVIC, F. (1981) Review of disorders of the ruminant digit with proposals for anatomical and pathological terminology and recording. *Veterinary Record* **108**, 117-120.
- WELLS, S.J., GARBER, L.P., WAGNER, B.A. (1999) Papillomatous digital dermatitis and associated risk factors in US dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* **38**, 11-24.

TABLES

Table 1: Digital lesions recorded, their predominant clinical appearance and number of lesions sampled.

Type lesion	Lesions recorded (slaughterhouse)	Lesions sampled (dairy herds)	Total lesions sampled	Predominant clinical aspect
Controls	-	-	27	-
DD	22	6	28	erosive-proliferative
IDD	138	17	66	erosive-proliferative
IDD+DD	53	9	21	erosive-proliferative
IPD	87	2	32	darkened skin-papuliferous
IN	-	5	5	edematous-necrotic
ISC	21	5	12	edematous-necrotic-stab/cut
HHE	196	-	32	erosive
ISH	33	2	11	proliferative
ISH+IDD	21	1	16	erosive-proliferative
TOTAL	582	47	250	

DD digital dermatitis, IDD interdigital dermatitis, IPD interdigital papuliferous dermatitis, IN interdigital necrobacillosis, ISC interdigital stabs or cuts, HHE heel horn erosions, ISH interdigital skin hyperplasia.

Table 2: Total of positive WS-stained sections for the bacterial variations F1 to F4 per category of lesion. Between parentheses is presented the most frequent pattern of distribution of the organisms.

	WS Positive sections	F1	F2	F3	F4
Controls	3	-	3 (1)	-	-
Digital dermatitis (DD)	26	26 (4)	4 (1)	26 (2)	12 (2)
Interdigital dermatitis (IDD)	60	48 (3)	18 (2)	56 (2)	32 (2)
DD + IDD	18	15 (4)	6 (1)	16 (2)	8 (2)
Interdigital papuliferous dermatitis (IPD)	23	7 (1)	20 (2)	18 (2)	18 (2)
Interdigital necrobacillosis (IN)	5	2 (1)	2 (2)	5 (3)	5 (3)
Interdigital stabs or cuts (ISC)	10	3 (1)	2 (1)	10 (2)	9 (2)
Heel horn erosions (HHE)	2	-	2 (1)	2 (1)	1 (1)
Interdigital skin hyperplasia (ISH)	-	-	-	-	-
ISH + IDD	12	12 (3)	4 (1)	11 (2)	6 (2)
TOTAL	159	111	61	144	91

F1 spirochaetes, F2 branching filamentous organisms, F3 rods, F4 coccoid structures.

(1) few to several organisms focally arranged; (2) numerous, focally arranged and/or scattered;

(3) huge numbers diffusely dispersed and (4) myriad organisms scattered and also arranged in agglomerates.

Table 3: Summary of the principal histological changes observed in the sections from 8 samples of each lesion.

	IPD	Interdigital dermatitis (IDD)	Digital dermatitis (DD)
Inflammatory infiltration	mild	moderate	severe
Acanthosis	mild, when present	mild – moderate	moderate – severe
Hyperkeratosis	mild, multifocal	mild – severe, focal	moderate – severe, focal *
Superficial necrosis	scarce	frequent	frequent
Superficial erosions	focal, when present	multifocal	multifocal *
Hidropic degeneration	absent	present	present
Microabscesses	absent	present, moderate	present, severe
Micro-organisms	F2 †	F2 + clusters of basophilic bodies	clusters of basophilic bodies

IPD interdigital papuliferous dermatitis

* Four DD lesions presented only residual areas of stratum corneum.

† Branching filamentous organisms

Table 4: Results obtained by immunohistochemical testing. Between parenthesis is demonstrated the mean degree of the reactions*.

Diseases	Samples tested	N° samples positive			
		Treponema	Campylobacter	Fusobacterium	Bacteroides
Interdigital dermatitis	22	18 (++)	10 (++)	9 (++)	-
Digital dermatitis	19	15 (+++)	9 (++)	8 (+)	-
Interdigital papuliferous dermatitis	14	7 (+)	4 (+)	2 (+)	-
Interdigital necrobacillosis	05	1 (+)	-	4 (+++)	-
Controls	04	-	-	-	-
Interdigital stabs or cuts	06	1 (+)	-	2 (+)	-

* Weak (+), moderate (++) and strong (+++).

FIGURE LEGENDS

FIG 1: Gross appearance of excised lesions: interdigital papuliferous dermatitis (A), interdigital dermatitis (B) and digital dermatitis (C). Note the eroded (arrows) and whitish proliferated (arrowheads) areas in the DD and IDD lesions.

FIG 2: Polymicrobial communities in digital dermatitis lesion. Agglomerates of spirochaetes organisms (arrows) and the myriad spirochaetes interspersed with numerous rods (arrowheads). Warthin-Starry staining. X 1000.

FIG 3: Spirochaetes organisms invading epidermis through the intercellular junctions of the stratum spinosum, interdigital dermatitis section, Warthin-Starry staining. X 1000.

FIG 4: IPD lesion showing filamentous organisms invading the stratum corneum, which also presents parakeratosis (A), Warthin-Starry staining. X 300. Note detail of the branched (arrows) filamentous organisms (B), same section, X 1000; and the aspect of the filaments fragmenting (arrows) into shorter forms (C), IPD lesion, Warthin-Starry staining. X 1000. (Original pictures included).

FIG 5: Interdigital dermatitis section positively stained by the polyclonal antisera to *Treponema pallidum*. The marked areas in the inter-cellular junctions of the stratum spinosum are surrounded by areas with suppurative inflammation. Streptavidin-biotin immunoperoxidase. X 400.

FIG 6: Silver-stained IDD section showing huge numbers of organisms (dark areas) infiltrated in the epithelia (A). Warthin-Starry staining, X 200. Replicate section stained with polyclonal antisera to *Treponema pallidum* showing correlation between staining techniques (B). Streptavidin-biotin alkaline phosphatase. X 200.

FIG 7: Digital dermatitis section showing positive reactions to the polyclonal antisera to *Campylobacter jejuni* in the inter-cellular junctions of the stratum spinosum and a diffuse staining pattern probably associated with degenerated bacteria and the suppurative inflammation in the surroundings areas. Streptavidin-biotin immunoperoxidase. X 300.

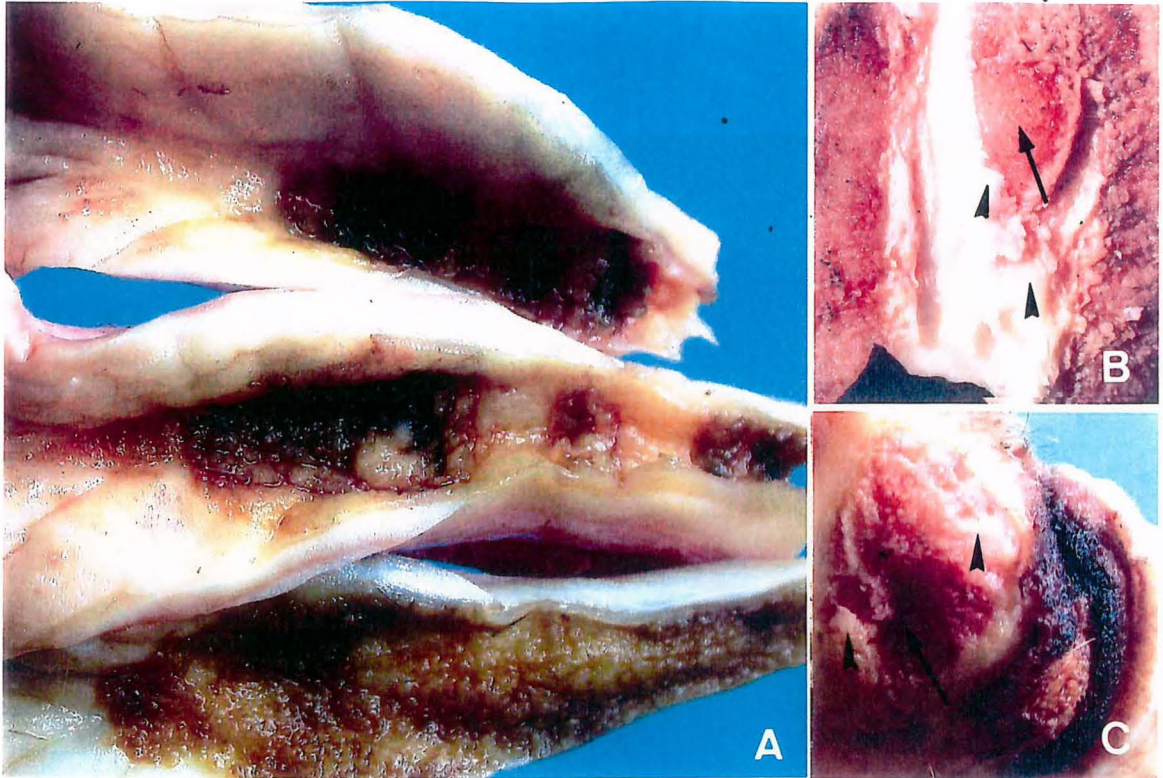


FIGURE 1: Gross appearance of excised lesions: interdigital papuliferous dermatitis (A), interdigital dermatitis (B) and digital dermatitis (C). Note the eroded (arrows) and whitish proliferated (arrowheads) areas in the DD and IDD lesions.

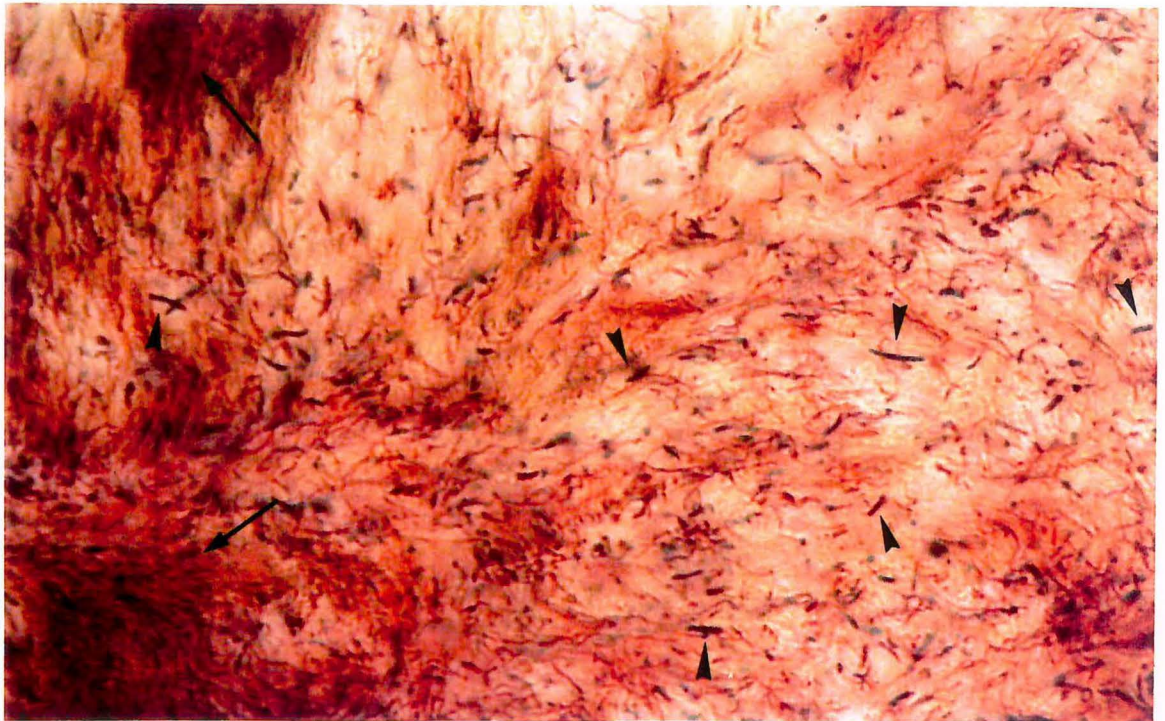


FIGURE 2: Polymicrobial communities in digital dermatitis lesion. Agglomerates of spirochaetes organisms (arrows) and the myriad spirochaetes interspersed with numerous rods (arrowheads). Warthin-Starry staining. X 1000.

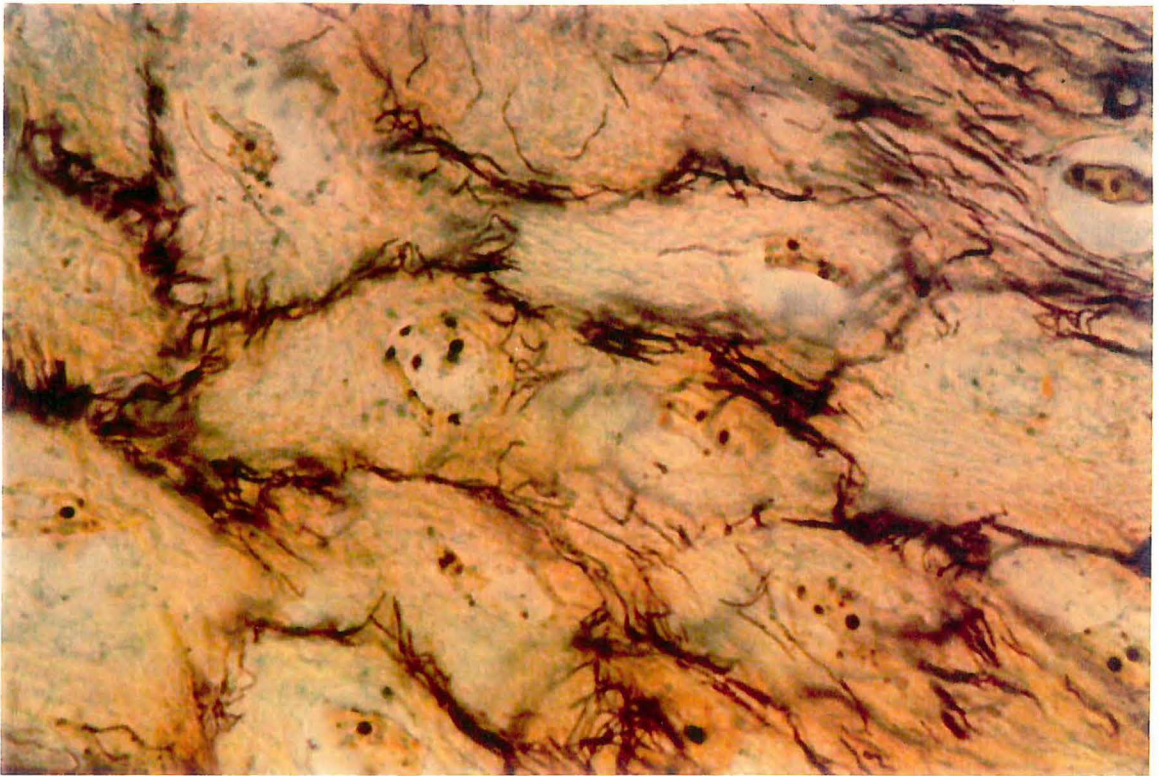


FIGURE 3: Spirochaetes organisms invading epidermis through the intercellular junctions of the stratum spinosum, interdigital dermatitis section, Warthin-Starry staining. X 1000.

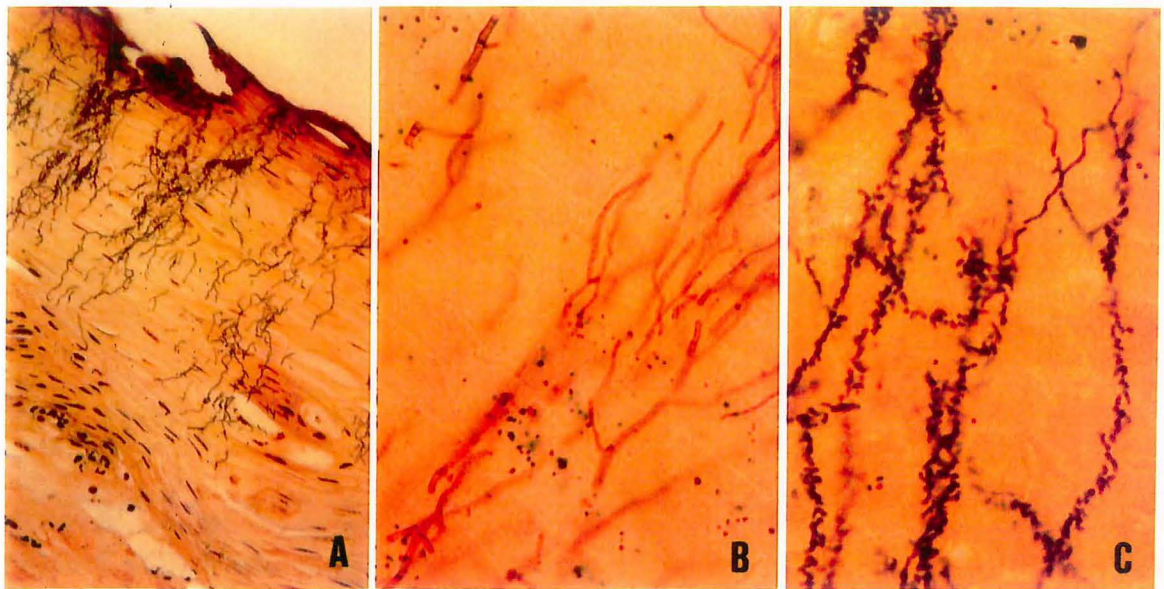


FIGURE 4: IPD lesion showing filamentous organisms invading the stratum corneum, which also presents parakeratosis (A), Warthin-Starry staining. X 300. Note detail of the branched (arrows) filamentous organisms (B), same section, X 1000; and the aspect of the filaments fragmenting (arrows) into shorter forms (C), IPD lesion, Warthin-Starry staining. X 1000.



FIGURE 5: Interdigital dermatitis section positively stained by the polyclonal antisera to *Treponema pallidum*. The marked areas in the inter-cellular junctions of the stratum spinosum are surrounded by areas with suppurative inflammation. Streptavidin-biotin immunoperoxidase. X 400.

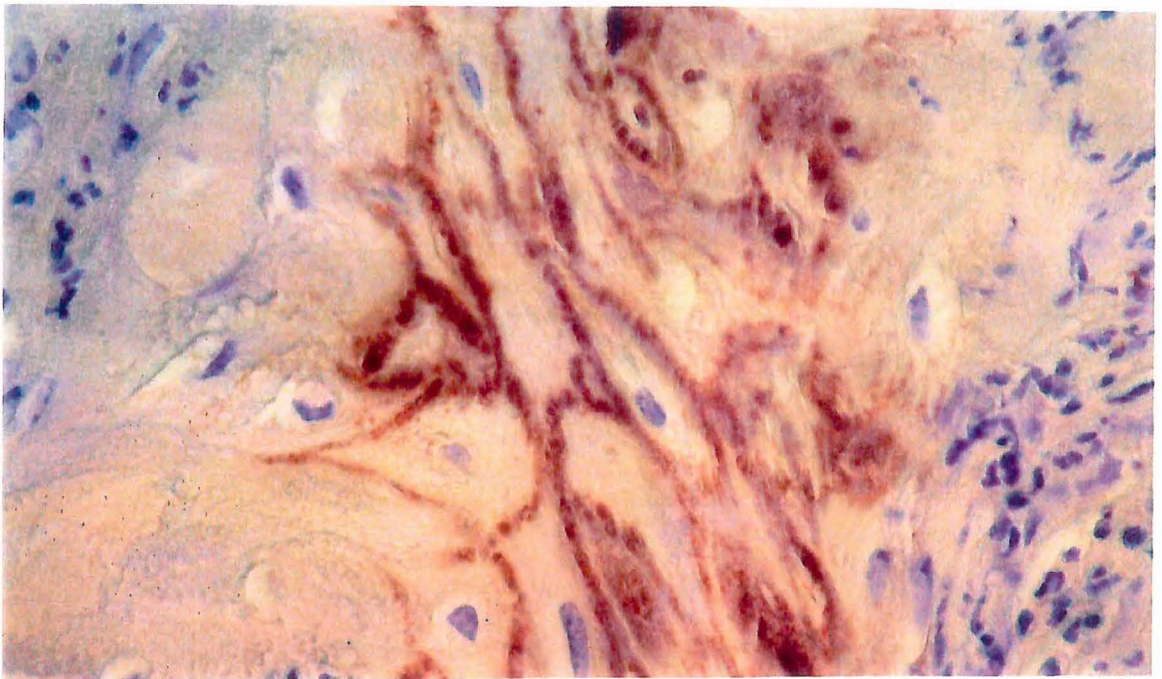


FIGURE 6: Silver-stained IDD section showing huge numbers of organisms (dark areas) infiltrated in the epithelia (A). Warthin-Starry staining, X 200. Replicate section stained with polyclonal antisera to *Treponema pallidum* showing correlation between staining techniques (B). Streptavidin-biotin alkaline phosphatase. X 200.

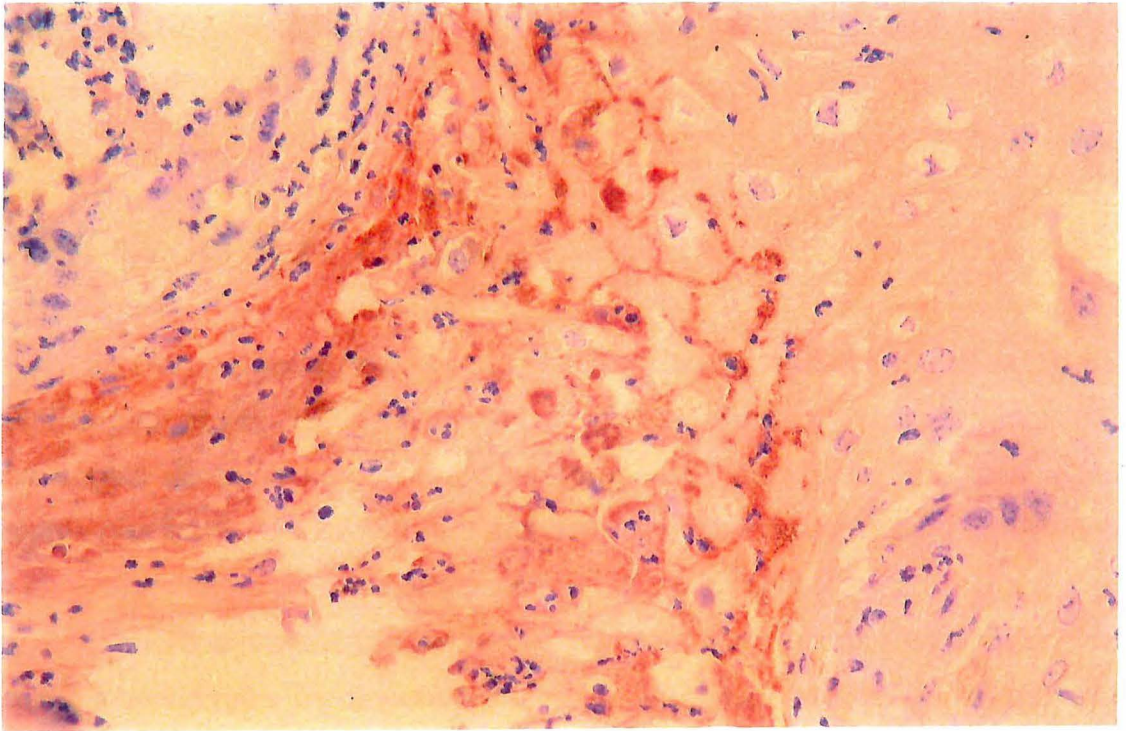


FIGURE 7: Digital dermatitis section showing positive reactions to the polyclonal antisera to *Campylobacter jejuni* in the inter-cellular junctions of the stratum spinosum and a diffuse staining pattern probably associated with degenerated bacteria and the suppurative inflammation in the surroundings areas. Streptavidin-biotin immunoperoxidase. X 300.

5. DISCUSSÃO, CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Registros prévios indicavam a ocorrência de dermatite digital no Brasil central (Borges *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 1999). Entretanto a ocorrência da doença no sul do país, bem como descrições mais detalhadas das condições ambientais nas quais foi observada e dos aspectos clínico-patológicos das lesões foram apresentadas no primeiro artigo incluído neste trabalho.

Embora a prevalência de lesões nos rebanhos leiteiros não tenha sido objeto de investigação no segundo artigo deste estudo, foi evidente a baixa ocorrência de lesões típicas DD em rebanhos severamente afetados por esta enfermidade no passado (Cruz *et al.*, 2001). Interessante também foi a quantidade considerável de lesões DI encontradas nos animais de abate. Lesões DI representaram a forma de dermatite mais comum também em bovinos de leite. Naquele trabalho inicial, apenas foram incluídas lesões associadas com claudicações. As dermatites interdigitais têm sido tradicionalmente associadas com doença clínica discreta, portanto a sua prevalência pode ter sido subestimada no primeiro estudo. Esta observação pode ser sugestiva de que, se as lesões DD e DI são doenças inter-relacionadas, e tem havido constantes evidências suportando esta hipótese, inclusive neste estudo, supõe-se que, à medida que a doença se torna endêmica em um rebanho, DI pode se tornar a forma clínica mais comum da doença. A diferença observada quanto ao grau dos processos inflamatórios que, geralmente, foram mais severos em lesões DD do que DI poderia explicar, pelo menos em parte, a severidade dos sinais clínicos usualmente associados com cada tipo de lesão.

Tanto a correlação entre lesões de erosão de talão e dermatites (Manske *et al.*, 2002), quanto a falha em demonstrar alterações histológicas características de dermatites em erosões de talão (Blowey & Done, 1995) já foram descritas previamente. Neste estudo também foi observada forte correlação entre dermatites e erosões de talão, entretanto apenas em duas das 32 amostras de erosão de talão não associadas com dermatites foram encontradas colonizações bacterianas semelhantes àquelas presentes em lesões de dermatites.

Embora apresentando localização e formato de lesões claramente distintas, a maioria das lesões DD e DI apresentaram aparência clínica semelhante incluindo áreas erosivas e proliferativas, simultaneamente. O envolvimento de espiroquetas em lesões DI já havia sido constatado histoquimicamente (Blowey *et al.*, 1994) e bacteriologicamente (Walker *et al.*, 1995), sendo que neste estudo foi também registrado imunoistoquimicamente. Embora apenas sucintamente estudadas aqui, as lesões histológicas observadas foram compatíveis com detalhados estudos prévios (Bassett *et al.*, 1990; Blowey *et al.*, 1994; Döpfer *et al.*, 1997) e com a hipótese de que ambas formas de dermatite possam ser lesões inter-relacionadas do mesmo complexo de doença. Estas lesões afetam áreas com características anatômicas distintas e, possivelmente, submetidas a condições ambientais também distintas o que sugere a possibilidade de que, pelo menos alguns agentes envolvidos também possam ser mais associados com uma forma do que com outra. Neste estudo, apenas foi possível observar a tendência dos organismos filamentosos serem consistentemente associados com lesões interdigitais discretas. Estudos adicionais referentes a estes organismos e também direcionados aos bacilos anaeróbicos Gram-negativos como *Bacteroides* spp. e *Prevotella* spp., podem ser esclarecedores.

Espiroquetas foram os organismos que predominaram nas lâminas estudadas, mas a maioria das amostras de DD e DI revelaram a presença de populações microbianas mistas, incluindo variações de estruturas bacilares e cocóides. Espiroquetas estiveram presentes em quase todas as camadas da epiderme, mas foram mais comumente observadas infiltradas no estrato

espinhoso de lesões que apresentavam apenas resquícios de estrato córneo. As espiroquetas aqui observadas, em sua grande maioria, marcaram fortemente e consistentemente com o anticorpo policlonal anti-*Treponema pallidum*, o que está de acordo com as observações feitas por Shibahara *et al.* (2002), mas difere do relatado por Demirkan *et al.* (1998), onde espiroquetas em lesões DD não reagiram com anticorpo monoclonal anti-*Treponema pallidum*. Entretanto, tem sido relatado um risco aumentado de resultados falsos negativos durante detecção de agentes infecciosos em fragmentos embebidos em parafina através do uso de anticorpos monoclonais (Haines & Chelack, 1991). O fato de que algumas amostras de dermatite apresentaram, nas lâminas coradas com prata, muitas espiroquetas que não marcaram com anti-*Treponema pallidum* sugere a possibilidade de que outras espiroquetas possam também estar presentes nestas lesões.

O envolvimento de outros organismos em lesões de dermatite tem sido freqüentemente relatado. Neste estudo, foi possível demonstrar a participação de *Campylobacter sp.* e *Fusobacterium necrophorum* em lesões DD e DI ativas. O método da imunistoquímica possibilitou identificar estes organismos, os quais eram de difícil avaliação nas colorações com prata, mesmo porque a presença de grande quantidade de espiroquetas, possivelmente, os encobria ou mascarava. Além disto este procedimento foi capaz de demonstrar estes organismos associados com lesões histológicas. *Campylobacter sp.* e *Treponema sp.* são bactérias ativamente móveis e motilidade parece ser muito importante na colonização (Garcia & Brooks, 1993). Apenas através do método imunistoquímico, foi possível detectar organismos *Campylobacter sp.* penetrando nos espaços intercelulares do estrato espinhoso de forma muito semelhante àquela vista com *Treponema sp.*, a qual também foi observada nas lâminas coradas com prata. A sugestão de que *Fusobacterium necrophorum* pudesse ser um importante colonizador primário nas lesões DD (Edwards *et al.*, 2003) não foi constatada neste estudo, onde, pelo contrário, estes organismos estiveram mais consistentemente associados com lesões crônicas proliferativas, indicando

provável importância como colonizador secundário e esporádico em lesões de dermatites.

Embora organismos *Bacteroides* sp. tenham sido freqüentemente associados com estas condições, não foi possível identificá-los neste estudo, provavelmente, devido ao tipo de anticorpo utilizado aqui, cujas indicações usuais incluem imunofluorescência e Elisa, mas não imunistoquímica.

Os organismos ramificados e filamentosos predominaram nas dermatites interdigitais papulosas. Apesar de não haver registros prévios dessas alterações, elas foram muito comuns nesse estudo. Possivelmente por apresentarem inexpressiva apresentação clínica, estas lesões possam não ter tido descrições prévias divulgadas. Nesse estudo, em função da sistemática das coletas, elas foram incluídas, mesmo porque eram muito freqüentes para não serem percebidas. Estes organismos também estiveram presentes em muitas amostras de DI. Realmente, algumas lâminas de dermatite interdigital e papulosa foram muito semelhantes, tanto em colorações HE como WS. Estes agentes eram vistos infiltrados no estrato córneo de lesões muito discretas, onde não se observavam espiroquetas. Entretanto, em algumas lâminas, onde erosões e necrose já estavam bem estabelecidas, as espiroquetas eram então detectadas. A metade das amostras de dermatite papulosa apresentou marcações muito pequenas com anti-*Treponema pallidum*, provavelmente associadas com a presença inicial de uns poucos indivíduos. Tais observações sugerem a possibilidade de que estes organismos filamentosos possam ser colonizadores primários destas lesões interdigitais. O padrão de distribuição destes organismos, sua associação com lesões discretas, sua presença (ainda que mínima) em amostras controle e a freqüente associação de grandes números de espiroquetas com lesões apresentando apenas resquícios de estrato córneo são evidências compatíveis com esta hipótese.

Tais organismos, interessante, quando observados com aumento X 200 ou X 400, embora maiores, se assemelhavam muito com as espiroquetas, mas quando observados em aumento X 1000, sua real morfologia se tornava evidente. As razões para sua infreqüente detecção em lesões DD são

desconhecidas, entretanto, podem estar associadas com a relativa ausência de lesões DD iniciais amostradas neste estudo. Nem estes organismos filamentosos, nem as formas bacilares associadas com eles coraram com os AC testados aqui, mas eles foram moderadamente visíveis em colorações HE e GMS.

Estes organismos são, presumivelmente, actinomicetos, cujos principais patógenos para animais incluem os gêneros *Actinomyces*, *Nocardia* e *Dermatophilus* (Quinn *et al.*, 1994). Os Actinomicetos Nocardiformes usualmente produzem micélios ramificados que podem fragmentar em elementos mais curtos (Holt *et al.*, 1994). Áreas com aspectos compatíveis com estas fragmentações foram vistas nas colorações WS. Aparentemente, os organismos aqui observados compartilham alguns aspectos descritos em infecções por *Dermatophilus congolensis*, mas obviamente estudos adicionais são indispensáveis para identificar estes organismos.

Se essas lesões papulosas representam estágios iniciais de dermatite interdigital ou são lesões distintas, isto permanece por ser determinado. A semelhança entre a doença periodontal humana e a dermatite digital bovina tem sido freqüentemente enfatizada (Döpfer *et al.*, 1997; Demirkan *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 2003). A associação imunoistoquímica de *Treponema sp.*, *Campylobacter sp.* e *Fusobacterium necrophorum* com as populações microbianas presentes nestas dermatites digitais de bovinos é indicativa de seu envolvimento na formação destas lesões e demonstra evidência adicional para sua freqüentemente referida etiologia multifatorial. Além dos organismos filamentosos, outros organismos também não marcaram com os AC aqui testados.

O caráter oportunista da maioria dos organismos que usualmente apresentam-se associados com essas dermatites ressalta a importância do componente ambiental em ambos: ocorrência da doença e métodos de controle.

O isolamento e identificação destes organismos filamentosos, o incremento de estudos imunoistoquímicos objetivando identificar os agentes que não marcaram no presente estudo e realização de estudos envolvendo amostragens mais amplas, padronizadas e estatisticamente analisadas consistem aspectos interessantes para serem investigados em estudos futuros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLESTEIN, L.C. Distúrbios da locomoção dos bovinos. I.º SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE. **Anais**, São Paulo, p.53-65, 1994.
- AMSTEL, S.R., VAN VUUREN, S., TUTT, C.L. Digital dermatitis: report of an outbreak. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, vol.66, p.177-181, 1995.
- ARGAEZ-RODRIGUEZ, F.D.J., HIRD, D.H., ANDA, J.H., READ, D.H., RODRIGUEZ-LAINZ, A. Papillomatous digital dermatitis on a commercial dairy farm in Mexico: Incidence and effect on reproduction and milk production. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, vol.32, p.275-286, 1997.
- BAGGOTT, D.G.; RUSSELL, A.M. Lameness in cattle. **British Veterinary Journal**, London, vol.137, p.113-132, 1981.
- BASSETT, H.F., MONAGHAN, M.L., LENIHAN, P., DOHERTY, M.L., CARTER, M.E. Bovine digital dermatitis. **Veterinary Record**, London, vol.126, p.164-165, 1990.
- BERG, J.N., LOAN, R.W. *Fusobacterium necrophorum* and *Bacteroides melaninogenicus* as etiologic agents of foot rot in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, vol.136, n.8, p.1115-1122, 1975.
- BERGSTEN, C., HANCOCK, D.D., GAY, J.M., GAY, C.C., FOX, L.K. Claw diseases: The most common cause of dairy lameness diagnoses, frequencies and risk groups in a University herd. **The Bovine Proceedings**, Michigan, vol.31, p.188-194, 1998.
- BERRY, S.L. Diseases of the digital soft tissues. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, vol.17, n.1, p.129-142, 2001.
- BLOWEY, R.W., SHARP, M.W. Digital dermatitis in dairy cattle. **Veterinary Record**, London, vol.122, p.505-508, 1988.
- BLOWEY, R.W., DONE, S.H., COOLEY, W. Observations on the pathogenesis of digital dermatitis in cattle. **Veterinary Record**, London, vol.135, p.115-117, 1994.

- BLOWEY, R.W., DONE, S.H. Failure to demonstrate histological changes of digital or interdigital dermatitis in biopsies of slurry heel. **Veterinary Record**, London, vol.137, p.379-380, 1995.
- BORGES, J.R., PITOMBO, C.A., SANTIAGO, S.S., RIBEIRO, P.N., RONCONI, M.A. Incidência de afecções podais em bovinos leiteiros submetidos a diferentes sistemas de manejo. **Arquivos Escola de Medicina Veterinária-UFBA**, Salvador, vol.15, p.34-42, 1992.
- BORGES, J.R., PITOMBO, C.A., SILVEIRA, J.M., GRAÇA, F.S., SILVA, P.C.A. Digital diseases in confined milk cows in the southeastern region of Brazil. In: 10TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LAMENESS IN RUMINANTS. **Proceedings**. Lucerne, p.85-86, 1998.
- BRITT, J.S., GASKA, J., GARRETT, E.F., KONKLE, D., MEALY, M. Comparison of topical application of three products for treatment of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, vol.209, p.1134-1136, 1996.
- BRITT, J.S., CARSON, M.C., VON BREDOW, J.D., et al. Antibiotics residues in milk samples obtained from cows after treatment for papillomatous digital dermatitis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, vol.215, p.833-836, 1999.
- BROOK, I. <http://www.emedicine.com/med/topic2945.htm> - last update July 15, 2002.
- BUCK, G.E., SMITH, J.S. Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. **Journal of Clinical Microbiology**, vol.25, n.4, p.597-599, 1987.
- CALDWELL, D.R., ARCAND, C. Inorganic and Metal-Organic Growth Requirements of the Genus *Bacteroides*. **Journal of Bacteriology**, vol.120, n.1, p.322-333, 1974.
- CHAN, E.C.S., De CICCIO, A., McLAUGHLIN, R., KLITORINOS, A., SIBOO, R. An inexpensive solid medium for obtaining colony-forming units of oral spirochetes. **Oral Microbiology and Immunology**, vol.12, p.372-376, 1997.
- CHELI, R., MORTELLARO, C. La dermatite digitale del bovino. In; 8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON DISEASES OF CATTLE. **Proceedings**. Milan, p.208-213, 1974.
- CLARK, B.L., STEWART, D.J., EMERY, D.L. The role of *Fusobacterium necrophorum* and *Bacteroides melaninogenicus* in the aetiology of interdigital necrobacillosis in cattle. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, vol.62, n.2, p.47-49, 1985.
- CLARKSON, M.J., DOWNHAM, D.Y., FAUL, W.B., HUGHES, J.W., MANSON, F.J., MERRITT, J.B., MURRAY, R.D., RUSSELL, W.B., SUTHERST, J.E., WARD, W.R. Incidence and prevalence of lameness in dairy cattle. **Veterinary Record**, London, vol.138, p.563-567, 1996.

- COOK, N.B., CUTTLER, K.L. Treatment and outcome of a severe form of foul-in-the-foot. **Veterinary Record**, London, vol.136, p.19-20, 1995.
- CRUZ, C., DRIEMEIER, D., CERVA, C., CORBELLINI, L.G. Aspectos clínicos e epidemiológicos das lesões digitais em bovinos no Sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, vol.53, n.6, p.654-657, 2001.
- DAVID, G.P. Severe foul-in-the-foot in dairy cattle. **Veterinary Record**, London, vol.132, p.567-568, 1993.
- 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. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, vol.60, p.285-292, 1998.
- DEMIRKAN, I., WALKER, R.L., MURRAY, R.D., BLOWEY, R.W., CARTER, S.D. Serological evidence of spirochaetal infections associated with digital dermatitis in dairy cattle. **The Veterinary Journal**, Amsterdam, vol.157, p.69-77, 1999.
- DESROCHERS, A., ST. JEAN, G. Surgical management of digit disorders in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, vol.12, n.1, p.277-298, 1996.
- DOHERTY, M.L., BASSET, H.F., MARKEY, B., HEALY, A.M., SAMMIN, D. Severe foot lameness in cattle associated with invasive spirochaetes. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, vol.51, p.195-198, 1998.
- DÖPFER, D., KOOPMANS, A., MEIJER, F.A., SZAKÁLL, I., SCHUKKEN, Y.H., KLEE, W., BOSMA, R.B., CORNELISSE, J.L., ASTEN, A.J.A.M., HUURNE, A.A.H.M. Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. **Veterinary Record**, London, vol.140, p.620-623, 1997.
- EDDY, R.G., SCOTT, C.P. Some observations of the incidence of lameness in dairy cattle in Somerset. **Veterinary Record**, London, vol.106, p.140-144, 1980.
- EDWARDS, A.M., DYMOCK, D., JENKINSON, H.F. From tooth to hoof: treponemes in tissue-destructive diseases. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, vol.94, p.767-780, 2003.
- GREENOUGH, P.R., MACCALLUM, F.J., WEAVER, A.D. Diseases of the digital skin and subcutis. In: **Lameness in cattle**, 2 ed., Bristol: Wright Sciencetechnica, p.151-169, 1981.
- GOURREAU, J.M., SCOTT, D.W., ROUSSEAU, J.F. La dermatite digitée des bovins. **Le Point Veterinaire**, Maisons-Alfort Cedex, vol.24, p.49-57, 1992.
- GYLES, C.L., THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2 ed. Iowa State University Press / Ames. 331p, 1993.

- HAINES, D.M., CHELACK, B.J. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, vol.3, p.101-112, 1991.
- HERNANDES, J., SHEARER, J.K., ELLIOTT, J.B. Comparison of topical application of oxytetracycline and four nonantibiotic solutions for treatment of papillomatous digital dermatitis in dairy cows. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, vol.214, p.688-690, 1999.
- HERNANDES, J., SHEARER, J.K. Efficacy of oxytetracycline for treatment of papillomatous digital dermatitis lesions on various anatomic locations in dairy cows. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, vol.216, p.1288-1290, 2000.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 9th edn. Baltimore, William & Wilkins, pp.625-650, 1994.
- HULL, B.L., WEAVER, A.D., WELKER, B. *et al.* Diseases of the Musculoskeletal System. In: HOWARD, J.L. **Current Veterinary Therapy – Food Animal Practice**. 3 ed., Philadelphia: Saunders, p.864-881, 1993.
- LAMONT, R.J., CHAN, A., BELTON, C.M., IZUTSU, K.T., VASEL, D. and WEINBERG, A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of epithelial cells. **Infect. Immun.**, vol.63, p.3878-3885, 1995.
- LAVEN, R.A., PROVEN, M.J. Use of antibiotic footbath in the treatment of bovine digital dermatitis. **Veterinary Record**, London, vol.147, p.503-506, 2000.
- LAVEN, R.A., HUNT, H. Comparison of valnemulin and lincomycin in the treatment of digital dermatitis by individually applied spray. **Veterinary Record**, London, vol.149, p.302-303, 2001.
- LUGINBUHL, A., KOLLBRUNNER, M. Increasing number of cattle suffering from papillomatous digital dermatitis in Switzerland. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, vol.142, p.513-519, 2000.
- MANSKE, T., HULTGREEN, J., BERGSTEN, C. Topical treatment of digital dermatitis associated with severe heel-horn erosion in a Swedish dairy herd. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, vol.53, p.215-231, 2002.
- MOLINA, L.R., CARVALHO, A.U., FACURY FILHO, E.J., FERREIRA, P.M., FERREIRA, V.C.P. Prevalência e classificação das afecções podais em vacas lactantes na bacia leiteira de Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, vol.51, p.149-152, 1999.
- MOORE, D.A., BERRY, S.L., TRUSCOTT, M.L., KOZIY, V. Efficacy of a nonantimicrobial cream administered topically for treatment of digital dermatitis in dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, vol.219, p.1435-1438, 2001.

- MORTELLARO, C.M. Digital dermatitis. 8TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DISORDERS OF THE RUMINANT DIGIT. **Proceedings**. Banff, p.137, 1994.
- NARAYANAN, S., STEWART, G.C., CHENGAPPA, M.M., WILLARD, L., SHUMAN, W., WILKERSON, M., NAGARAJA, T.G. *Fusobacterium necrophorum* induces activation and apoptosis of bovine leucocytes. **Infection and Immunity**, vol.70, n.8, p.4609-4620, 2002.
- NAYLOR, R.D., MARTIN, P.K., JONES, J.R., BURNELL, M.C. Isolation of spirochaetes from an incident of severe virulent ovine footrot. **Veterinary Record**, vol.143, p.690-691, 1998.
- NOCEK, J.E. Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal Dairy Science**, Savoy, vol.80, p.1005-28, 1997.
- OHYA, T., YAMAGUCHI, Y., NII, Y., ITO, H. Isolation of *Campylobacter sputorum* from lesions of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle. **Veterinary Record**, London, vol.145, p.316-318, 1999.
- PETERSEN, G.C., NELSON, D.R. Foot Diseases in Cattle. Part II. Diagnosis and Treatment. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Montreal, vol.6, p.565-573, 1984.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B.K., CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**, 2nd edn. London, Mosby, pp.144-155, 1994.
- RADOSTITS, O.M., LESLIE, K.E., FETROW, J. **Herd Health – Food Animal Production Medicine**, 2 ed., Philadelphia: Saunders, p.301-330, 1994.
- READ, D.H., WALKER, R.L., CASTRO, A.E. An invasive spirochaete associated with interdigital papillomatosis of dairy cattle. **Veterinary Record**, London, vol.18, p.59-60, 1992.
- READ, D.H. Footwarts (papillomatous digital dermatitis): an emerging epidemic in dairy cattle? In: 33rd ANNUAL DAIRY CATTLE DAY. **Proceedings**. University of California - Veterinary Medicine Extension: Davis, p.15-19, 1994.
- READ, D.H., WALKER, R.L. Papillomatous digital dermatitis (footwarts) in California dairy cattle: clinical and gross pathologic findings. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Middleton, vol.10, p.67-76, 1998.
- REBHUN, W.C., PAYNE, R.M., KING, J.M., WOLFE, M., BEGG, S.N. Interdigital papillomatosis in dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, vol.177, p.437-440, 1980.
- REBHUN, W.C., GUARD, C., RICHARDS, C.M. Musculoskeletal diseases. In: **Disease of dairy cattle**. 1st ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap.11, p.369-406, 1995.
- RODRIGUEZ-LAINZ, A., DAVID, W.H., CARPENTER, T.E., READ, D.H. Case-control study of digital dermatitis in southern California dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, vol.28, p.117-131, 1996.

- RODRIGUEZ-LAINZ, A., MELENDEZ-RETAMAL, P., HIRD, D.W., READ, D.H., WALKER, R.L. Farm- and host-level risk factors for papillomatous digital dermatitis in Chilean dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, vol.42, p.87-97, 1999.
- SABO, J., HUDAC, A., FENDTOVÁ, E. The ecology of anaerobic non-sporulating bacteria in relation to dermatitis digitalis in cattle. **Veterinarni Medicina**, vol.33, p.265-272, 1988.
- SHEARER, J.K., van HORN, H.H. Metabolic Diseases of Dairy Cattle. In: van HORN, H.H., WILCOX, C.J. **Large dairy herd management**. Champaign: American Dairy Science Association, Cap.37, p.358-372, 1992.
- SHEARER, J.K., ELLIOTT, J.B. Papillomatous digital dermatitis: treatment and control strategies – Part I. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Montreal, vol.20, p.158-163, 1998.
- SHEARER, J.K., HERNANDES, J. Efficacy of two modified nonantibiotic formulations (Victory) for treatment of papillomatous digital dermatitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, vol.83, p.741-745, 2000.
- SHELDON, I.M. Digital and interdigital dermatitis in dairy cattle. **Veterinary Record**, London, vol.135, p.559-560, 1994.
- 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. **Australian Veterinary Journal**, vol.80, n.8, p.497-502, 2002.
- SILVEIRA, J.B., MENECELLI, A.A., ANDRADE, E.F., MATHIAS, L.A. Levantamento epidemiológico das principais afecções podais em bovinos no município de Votuporanga – SP. **Ciência Veterinária Jaboticabal**, Jaboticabal, vol.2, p.18-19, 1988.
- SOMERS, J.G., FRANKENA, K., NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N. METZ, J.H. Prevalence of claw disorders in Dutch cows exposed to several floor systems. **Journal of Dairy Science**, vol.86, n.6, p.2082-2093, 2003.
- TOUSSAINT RAVEN, E. **Cattle footcare and claw trimming**. 2 ed, Ipswich: Farming Press, p.38-40, 1985.
- TIMONEY, J.F., GILLESPIE, J.H., SCOTT, F.W., BARLOUGH, J.E. **Hagan and Brunner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals**. 8 ed., London: Comstock Publishing Associates, 951p, 1988.
- VENTER, B.J., van AMSTEL, S.R. *Fusobacterium necrophorum*, *Dichelobacter (Bacteroides) nodosus* and *Bacteroids* spp. infections. In: COETZER, J.A.W., THOMSON, G.R., TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. Oxford University Press: Cape Town, p.1200-1228, 1994.
- VERMOUNT, J.J., GREENOUGH, P. Predisposing factors of laminitis in cattle. **British Veterinary Journal**, London, vol.150, p.151-164, 1994.

- VOKEY, F.J., GUARD, C.L., ERB, H.N., GALTON, D.M. Effects of alley and stall surfaces on indices of claw and leg health in dairy cattle housed in a free-stall barn. **Journal of Dairy Science**, Savoy, vol.84, p.2686-2699, 2001.
- WALKER, R.L., READ, D.H., LORETZ, K.J., NORDHAUSEN, R.W. Spirochetes from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, vol.47, p.343-355, 1995.
- WALKER, R.L., READ, D.H., LORETZ, K.J. et al. Humoral response of dairy cattle to spirochetes isolated from papillomatous digital dermatitis lesions. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, vol.58, p.744-748, 1997.
- WEAVER, A.D., ANDERSON, L., DE LAISTRE BANTING, A., DEMERZIS, P.N., KNEZEVIC, P.F., PETERSE, D.J., SANKOVIC, F. Review of disorders of the ruminant digit with proposals for anatomical and pathological terminology and recording. **Veterinary Record**, London, vol.108, p.117-120, 1981.
- WEAVER, A.D. Symposium on managing bovine lameness: An often neglected means of decreasing production losses. **Veterinary Medicine**, Lenexa, vol.12, p.1217-1239, 1991.
- WELLS, S.J., GARBER, L.P., WAGNER, B.A. Papillomatous digital dermatitis and associated risk factors in US dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, vol.38, n.1, p.11-24, 1999.
- WILLIAMS, L.A., ROWLANDS, G.J., RUSSELL, A.M. Effect of wet weather on lameness in dairy cattle. **Veterinary Record**, London, vol.118, p.259-264, 1986.