

## Microbiota anaeróbia isolada de bovinos com pododermatite

(*Anaerobic bacterial species isolated from bovines with pododermatitis*)

C.A. Silva<sup>1</sup>, L.A.F. Silva<sup>2</sup>, A.J. Mesquita<sup>2</sup>, M.C.S. Fioravanti<sup>2</sup>, C.S. Acypreste<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da UFMG

<sup>2</sup>Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás

Caixa Postal 131

CEP 74001-970 - Goiânia, GO

<sup>3</sup>Estudante de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da UFG

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar espécies bacterianas anaeróbias presentes nos pés de bovinos portadores de vários graus de pododermatite. Foram utilizados 60 bovinos, distribuídos em quatro grupos de 15. O grupo I foi constituído por animais saudáveis e serviu de controle; o grupo II, por bovinos na fase inicial do processo; o grupo III, por animais portadores de pododermatite interdigital vegetativa e o grupo IV, por bovinos portadores de pododermatite necrosante. Foram colhidos fragmentos de tecido interdigital para cultura e as principais espécies bacterianas isoladas foram: *Dichelobacter nodosus* nos grupos II, III e IV e *Fusobacterium necrophorum* nos grupos III e IV, com frequências de 26,7%, 6,7%, 20,0%, 6,7% e de 13,3%, respectivamente. Encontraram-se também *Fusobacterium symbiosum* em 40,0% no grupo I, 6,7% no grupo II, 13,3% no grupo III e 13,3% no grupo IV, *Bacteroides* sp. em 6,7% nos grupos I e IV, *Bacteroides ruminatus* em 33,3% no grupo I, 6,7% no grupo II, 33,3% no grupo III e 13,3% no grupo IV, *Bacteroides oralis* em 6,7% no grupo III e *Fusobacterium mortiferum* em 6,7% no grupo IV.

Palavras-Chave: Bovino, pododermatite, bactéria anaeróbia

### ABSTRACT

The objective of this study was to isolate and identify the anaerobic bacteria species in bovine with different degrees of pododermatitis. Sixty bovines were divided into four groups of 15 as follows: group I included healthy animals, used as control; group II with animals in the initial phase of the process; group III, with animals displaying interdigital skin hyperplasia and group IV with animals with footrot. Interdigital tissue fragments were collected and processed for isolation and identification of anaerobic agents. The bacteria species isolated were: *Dichelobacter nodosus* in groups II, III and IV and *Fusobacterium necrophorum* only in groups III and IV, with frequencies of 26.7%, 6.7%, and 20.0% for the former and 6.7% and 13.3% for the latter, respectively. In addition, *Fusobacterium symbiosum* was present in 40.0% of group I, 6.7% of group II, 13.3% of group III and 13.3% of group IV; *Bacteroides* sp. in 6.7% of groups I and IV; *Bacteroides ruminatus* in 33.3% of group I, 6.7% of group II, 33.3% of group III and 13.3% of group IV; *Bacteroides oralis* in 6.7% of group III, and *Fusobacterium mortiferum* in 6.7% of group IV.

Keywords: Bovine, pododermatitis, anaerobic bacteria

Recebido para publicação em 7 de agosto de 1998.

Colaborador: G.T. Borges

## INTRODUÇÃO

Nos bovinos, as doenças dos dígitos como dermatite interdigital, erosão ungular, dermatite verrucosa, dermatite digital, flegmão interdigital, pododermatite asséptica (laminite), pododermatite circunscrita (úlceras de sola), fissuras longitudinais e transversais, deformação ungular, pododermatite séptica (necrobacilose interdigital, "footrot") e hiperplasia interdigital são consideradas causadoras de claudicação, sendo a pododermatite séptica a mais comum (Nocek, 1993).

A fase inicial da doença caracteriza-se por tumefação na pele do espaço interdigital, acompanhada de claudicação, aumento de volume da extremidade do membro e, em alguns casos, fistulação com exsudação de líquido sanguinolento de odor desagradável, sem lesões macroscopicamente visíveis no estojo córneo, espaço interdigital, perioplo, sola e talão (Silva et al., 1998). Segundo Mgasa (1987), após instalado, o processo infeccioso desencadeia várias alterações no tecido interdigital que resultam em claudicação severa e queda de produção. Para Greenough (1994), os sinais clínicos variam com a localização da infecção, porém a claudicação aguda é o principal sintoma.

A etiologia e descrição das diversas formas das afecções do casco foram estudadas por vários autores (Saraiva, 1984b; Greenough, 1987; Pesce et al., 1992; Edmonson, 1994; Blowey & Done, 1995), sendo *Dichelobacter nodosus* e *Fusobacterium necrophorum* os principais agentes infecciosos envolvidos (Pesce et al., 1992).

O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar a microbiota anaeróbia dos pés de bovinos saudáveis e portadores de três formas de apresentação clínica de pododermatite: fase inicial do processo, pododermatite interdigital vegetativa e pododermatite necrosante.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 60 bovinos com idade entre 15 e 156 meses, de peso corporal, sexo, raça, aptidão e manejo variados, provenientes de propriedades rurais com casos de pododermatite. Os animais foram separados, após realização de exame clínico, em quatro grupos de mesmo número, sendo o grupo I constituído por animais

cl clinicamente saudáveis (controle); o grupo II, por animais na fase inicial da doença, com claudicação porém sem lesão macroscópica aparente do estojo córneo e da pele; o grupo III, por animais com a patologia estabelecida, portadores de fibrose interdigital (pododermatite interdigital vegetativa) e o grupo IV, por animais com lesões do tipo ulcerativas, com fissura e necrose evidente (pododermatite necrosante).

Os animais foram atendidos e tratados nas propriedades de origem. Os bovinos foram contidos em decúbito lateral e submetidos a biópsia. A extremidade do membro locomotor foi lavada com água e sabão e a anti-sepsia completou-se com aplicação de solução à base de iodophor<sup>1</sup>. Para a colheita do fragmento do tecido interdigital, primeiramente removeu-se a camada superficial da pele íntegra nos animais dos grupos I e II, e nos do grupo III, quando não existia necrose na área fibrosada. Nos bovinos do grupo IV retirou-se todo o tecido necrosado. Imediatamente após, trocou-se a lâmina do bisturi e colheram-se fragmentos de aproximadamente 0,5cm<sup>2</sup> com que foram depositados em tubos de ensaio com caldo de carne cozida e selados com óleo mineral.

O meio para colheita de material, caldo de carne cozida, foi preparado segundo Métodos... (1981), esterilizado a 121°C por 15 minutos e acondicionado a 4°C em geladeira. Para cada 10ml de água destilada foram adicionados 1,18g de coração de boi, 0,052g de peptona bacteriológica, 0,005g de glicose e 0,013g de cloreto de sódio.

Os meios de cultura utilizados na repicagem do material eram preparados em pequena quantidade, sempre que necessário, com o objetivo de manter um nível propício de umidade para o crescimento bacteriano. Utilizaram-se dois meios de cultura, conforme metodologia proposta por Saraiva (1984a,b), um seletivo (ágar sangue com cristal violeta) e outro para isolamento (ágar sangue). Os procedimentos metodológicos foram adaptados visando o eficaz isolamento bacteriano. Seguindo este princípio, da menor complexidade possível desse processo, o Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA) da Escola de

<sup>1</sup> BIOCID - Pfizer Química Ltda. - Guarulhos, São Paulo.

Veterinária da Universidade Federal de Goiás desenvolveu uma síntese do prescrito por Saraiva (1984a,b). O ágar sangue com cristal violeta foi usado como meio seletivo para Gram-negativo e continha um litro de água destilada, 52g de ágar cérebro-coração, 0,1% de cloridrato de cisteína, 0,01% de cristal violeta, 5% de sangue desfibrinado de ovino e pH 7,4. O ágar sangue, utilizado como meio de isolamento, foi preparado com um litro de água destilada, 52g de ágar cérebro-coração, 5% de sangue desfibrinado ovino e pH 7,4. Os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Todo o material colhido do espaço interdigital foi inoculado em caldo de carne cozida e mantido em temperatura ambiente até chegar ao laboratório para, em seguida, ser incubado à temperatura de 37°C, por 48 horas. Fez-se a primeira repicagem em ágar sangue com cristal violeta e a incubação em jarra de anaerobiose a 37°C, por 48 horas. Ao término desse período, as colônias típicas foram repicadas em ágar sangue e as placas incubadas em anaerobiose a 37°C, por 48 horas. O ambiente de anaerobiose foi obtido por meio de sachês<sup>1</sup> e o grau de anaerobiose medido por meio de fitas<sup>2</sup> afixadas com fita adesiva à parede da jarra.

A morfologia das colônias bacterianas e a motilidade do *D. nodosus* e do *F. necrophorum* foram estudadas e caracterizadas de acordo com Saraiva (1984a,b), Holdeman et al. (1986) e Baron et al. (1994).

Após o isolamento das colônias, procedeu-se ao teste do KOH a 3%, realizado para classificar a bactéria em Gram-negativa ou positiva, conforme as recomendações de Baron et al. (1994).

Obtidos os resultados das provas acima descritas, as colônias foram diluídas em meio basal anaeróbio API e em seguida distribuídas em fitas API 20A<sup>3</sup> com as seguintes provas bioquímicas: indol (IND), uréia (URE), glicose (GLI), manitol (MAN), lactose (LAC), sacarose (SAC), maltose (MAL), salicina (SAL), xilose (XIL), arabinose (ARA), esculina (ESC), glicerol (GLY), celobiose

(CEL), manose (MNE), melizitose (MLZ), rafinose (RAF), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), trealose (TRE) e catalase (CAT). Foram identificadas e incubadas por 48 horas, a 37°C, em anaerobiose, após o que, procedeu-se à leitura.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização clínica da pododermatite utilizada neste trabalho foi definida por Silva et al. (1998) e fundamentou-se na sintomatologia descrita por Saraiva (1984a, b), Magsa (1987), Nocek (1993), Greenough (1994), Edmondson (1994) e Silva et al. (1996).

A detecção da bactéria na pele do tecido interdigital pode ser feita por "swab" (Duran et al., 1990), cultura tecidual ou por esfregaços corados pelo método de Gram (Depiazzi et al., 1998). Neste trabalho utilizou-se somente a cultura, uma vez que se optou por verificar a presença de bactérias em camadas mais profundas do tecido.

A metodologia utilizada para a colheita do material para a cultura foi eficiente, pois permitiu o crescimento da microbiota esperada. Esse procedimento é similar ao proposto por Saraiva (1984a, b), Duran et al. (1990) e Carter et al. (1995). O meio de enriquecimento preparado com caldo de carne cozida também mostrou-se eficiente para o crescimento de bactérias anaeróbias, podendo ser utilizado como método alternativo. Este meio também é recomendado pelo Métodos... (1981), entretanto, os autores acima não mencionam qualquer método de selagem, medida que foi considerada de grande importância, pois manteve o meio de cultura com baixa tensão de oxigênio.

Muitos meios de cultura são utilizados para o isolamento do *D. nodosus* e do *F. necrophorum*. Duran et al. (1990) utilizaram seis diferentes meios de cultura e o que produziu melhor resultado para o primeiro agente foi o ágar brucela enriquecido com G-N suplemento anaeróbio e, para o segundo, foi o ágar gema de ovo *Fusobacterium*. Ambos foram incubados em jarra de anaerobiose a 37°C por três dias. Thomas (1978), citado por Saraiva (1984b), recomenda para *D. nodosus* a utilização do meio de casco ovino composto por extrato de carne, extrato de levedura, protease peptona, ágar

<sup>1</sup> Anaerocult A Microbiologie - Merck, Alemanha

<sup>2</sup> Anaerotest Microbiologie - Merck, Alemanha

<sup>3</sup> API 20A - Analytica Profile Index 1981, Alemanha

e água; o pH deve ser de 7,4 e a incubação a 37°C por 48 horas em anaerobiose. Pesce et al. (1992) recomendam para *D. nodosus* o ágar prezunho a 4% com incubação em anaerobiose a 37°C, por 96 horas. Scanlan et al. (1986) conseguiram isolar *F. necrophorum* em ágar BHI (infusão de cérebro-coração). Entretanto, optou-se pelos meios de cultura ágar sangue com cristal violeta e ágar sangue (Saraiva, 1984a,b), preparados segundo metodologia do CPA, devido à praticidade na elaboração e à sua eficiência no isolamento dos agentes bacterianos estudados.

Nas culturas foram isolados e identificados três gêneros de bactérias anaeróbias: *Dichelobacter*, *Fusobacterium* e *Bacteroides*. A identificação das colônias foi realizada de acordo com as características morfológicas e tintoriais de cada agente, descritas por Holdeman et al. (1986) e Baron et al. (1994).

A realização das provas bioquímicas foi o último passo para a identificação bacteriana. As principais provas utilizadas para a caracterização do *Dichelobacter nodosus* e do *Fusobacterium*

*necrophorum* foram a produção de indol e de urease, a fermentação da glicose, do manitol, da lactose, da sacarose, da maltose, da salicina, da xilose, da arabinose, da esculina, do glicerol, da celobiose, da manose, da melizitose, da rafinose, do sorbitol, da rhamnose e da trealose, e a produção da catalase (Virginia..., 1975). Nesse experimento, as provas bioquímicas para a classificação bacteriana em espécie mostraram-se eficazes e proporcionaram confiabilidade nos resultados. Virginia... (1975) e Holdeman et al. (1986) recomendam, ainda, o uso de outras provas como a liquefação da gelatina, a digestão da carne e a utilização do adonitol. No experimento piloto, a utilização das provas bioquímicas citadas inicialmente foi suficiente para identificar as bactérias estudadas, fato que determinou a preterição das três últimas. A diminuição no número de provas efetuadas na classificação é importante uma vez que reduz o custo final do diagnóstico.

As diferentes espécies bacterianas encontradas nos diferentes grupos experimentais estão relacionadas na Tab. 1.

Tabela 1. Gêneros e espécies bacterianas isolados de cascos de bovinos segundo a caracterização clínica da pododermatite

Bactéria identificada	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
<i>Dichelobacter nodosus</i>	-	4 (26,7%)	1 (6,7%)	3 (20,0%)
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-	-	1 (6,7%)	2 (13,3%)
<i>Fusobacterium symbiosum</i>	6 (40,0%)	1 (6,7%)	2 (13,3%)	2 (13,3%)
<i>Bacteroides sp.</i>	1 (6,7%)	-	-	1 (6,7%)
<i>Bacteroides ruminatus</i>	5 (33,3%)	1 (6,7%)	5 (33,3%)	2 (13,3%)
<i>Bacteroides oralis</i>	-	-	1 (6,7%)	-
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	-	-	-	1 (6,7%)

*D. nodosus* foi encontrado com maior frequência no grupo II, ou seja, nos animais na fase inicial da doença, o que pode significar uma possível participação desta bactéria na etiopatogenia do processo patológico em questão, apesar de, macroscopicamente, não se observarem lesões no espaço interdigital, no perioplo ou no estojo córneo. A ocorrência de lesões é considerada por Duran et al. (1990) fator essencial para a entrada dos agentes bacterianos. Dessa forma, acredita-se que, pelo fato de não se observar qualquer lesão aparente nesse local, seria necessária a realização

de exames histopatológicos do tecido cutâneo interdigital, de modo a identificar a presença de reações inflamatórias e/ou infecciosas nas camadas mais profundas do tecido, o que possibilitaria a indicação da participação do *D. nodosus* como agente desencadeante do processo. Esses achados estão de acordo com os resultados obtidos por Ribeiro (1980), Saraiva (1984b), Fajardo et al. (1987) e Baron et al. (1994), os quais afirmam ser o *D. nodosus* o agente etiológico da pododermatite bovina. Blowey (1992) relata que a necrobacilose interdigital está associada ao *F. necrophorum*, o

que confirma os achados deste experimento, pois foi possível isolá-lo nos animais dos grupos III e IV, com os bovinos do último grupo apresentando necrose característica advinda da presença desse agente.

Para Ribeiro (1980), Holdeman et al. (1986), Pesce et al. (1992), Baron et al. (1994) e Carter et al. (1995), a pododermatite bovina resulta da ação sinérgica do *D. nodosus* e do *F. necrophorum*. Todavia, diante dos resultados obtidos, a pequena porcentagem dos dois agentes encontrada nos animais portadores de pododermatite não foi considerada suficiente para afirmar que eles eram os principais agentes desencadeadores da doença. No entanto, como se trata de agentes anaeróbios exigentes, pode não ter sido possível recuperar todas as bactérias presentes no tecido interdigital. Além disso, na pododermatite interdigital vegetativa, o tecido fibroso é protegido pela pele e, nos casos onde não existe solução de continuidade, as condições não são adequadas para a penetração e desenvolvimento do agente microbiano. Blowey & Done (1995) não conseguiram isolar *D. nodosus* e *F. necrophorum* de animais portadores de pododermatite. Clark et al. (1985) não reproduziram a doença por meio de injeções subcutâneas de culturas puras de *F. necrophorum* e de *B. melaninogenicus*. Duran et al. (1990) isolaram, de ovinos portadores de pododermatite necrosante, *D. nodosus* em 56,8% dos animais estudados e *F. necrophorum* em 19,2%. A avaliação desses dados permite concluir que, mesmo nos casos clínicos da doença, nem sempre é possível isolar as bactérias a partir das lesões de pododermatite.

Como no presente experimento utilizaram-se somente meios de cultura específicos para bactérias anaeróbias e não se realizaram esfregaços, não foi possível verificar a presença de espiroquetas, microrganismos encontrados por Peterse (1992), Borgman et al. (1996) e Doherty et al. (1998) em lesões de pododermatite. Entretanto, isolaram-se e identificaram-se microrganismos como *Fusobacterium symbiosum*, 40,0% no grupo I, 6,7% no grupo II, 13,3% no grupo III e 13,3% no grupo IV; *Bacteroides sp.*, 6,7% nos grupos I e IV; *Bacteroides ruminatus*, 33,3% no grupo I, 6,7% no grupo II, 33,3% no grupo III e 13,3% no grupo IV; *Bacteroides oralis*, 6,7% no grupo III e *Fusobacterium mortiferum* 6,7% no

grupo IV.

Duran et al. (1990) também isolaram inúmeras espécies do gênero *Bacteroides* e concluíram que a pododermatite é, provavelmente, um processo multifatorial, resultante da invasão de uma lesão prévia do casco por bactérias presentes no solo. No entanto, os animais estudados por esses autores eram portadores de pododermatite necrosante e, como nesses casos a integridade do casco encontra-se comprometida, a invasão por inúmeras espécies bacterianas é inevitável.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARON, E.J., PETERSON, L.R., FINEGOLD, S.M. *Diagnostic microbiology*. 9.ed. St. Louis: Mosby, 1994. 958p.
- BLOWEY, R.W. Diseases of the bovine digit. Parte 1- description of common lesions. *In Pract.*, v.4, p.85-90, 1992.
- BLOWEY, R.W., DONE, S.H. Failure to demonstrate histological changes of digital or interdigital dermatitis in biopsies of slurry heel. *Vet. Rec.*, v.7, p.379-380, 1995.
- BORGMAN, I.E., BAILEY, J., CLARK, E.G. Spirochete-associated bovine digital dermatitis. *Can. Vet. J.*, v.37, p.35-37, 1996.
- CARTER, G.R., CHENGAPPA, M.M., ROBERTS, A.W. *Essentials of veterinary microbiology*. 5.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995. 394p.
- CLARCK, B.L., STEWART, D.J., EMERY, D.L. The role of *Fusobacterium necrophorum* and *Bacteroides melaninogenicus* in the aetiology of interdigital necrobacillosis in cattle. *Aust. Vet. J.*, v.62, p.47-49, 1985.
- DEPIAZZI, L.J., ROBERTS, W.D., HAWKINS, C.D. et al. Severity and persistence of footrot in Merino sheep experimentally infected with a protease thermostable strain of *Dichelobacter nodosus* at five sites. *Aust. Vet. J.*, v.76, p.32-38, 1998.
- DOHERTY, M.L., BASSETT, H.F., MARKEY, B. et al. Severe foot lameness cattle associated with invasive spirochaetes. *Ir. Vet. J.*, v.51, p.195-198, 1998.
- DURAN, S.P., MANZANO, J.V., VALERA, R.C. et al. Obligately anaerobic bacterial species isolated from footrot lesions in goats. *Br. Vet. J.*, v.146, p.551-558, 1990.
- EDMONDSON, In: SMITH, B.P. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. São Paulo: Manole, 1994. v.2, 1738p.
- FAJARDO, M.R.C., LARIOS, G.F., VALERO, E.G. et al. Estudio de um brote de pododermatite infecciosa severa bovina. *Tec. Pec. Méx.*, v.25, p.99-102, 1987.
- GREENOUGH, P.R. An illustrated compendium of bovine lameness. Part 3. *Mod. Vet. Pract.*, v.68, p.148-152, 1987.
- GREENOUGH, P.R. Structure and function of the digit. In: SYMPOSIUM ON DISORDERS OF THE RUMINANT DIGIT AND INTERNATIONAL CONFERENCE ON

- BOVINE LAMENESS, 8. 1994, Banff. *Proceedings and Abstracts...*, Banff: [s.n.], 1994, p.82-91.
- HOLDEMAN, L.V., ELLEY, R.W., MOORE, W.E.C. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1986. v.1.
- MÉTODOS analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília: Ministério da Agricultura/LANARA, 1981.
- MGASA, M.N. Footrot in cattle in Morogoro, Tanzania. *Bull. Anim. Health. Prod. Afr.*, v.35, p.332-5, 1987.
- NOCEK, J.E. *Hoof care for dairy cattle*. Fort Arkinson: W. D. Heard, 1993. 32p.
- PESCE, L., BERMUDEZ, J., BONINO, J. et al. *Enfermidades podais de los ruminantes*. Montevideo: Hemisfério Sur, 1992. 168 p.
- PETERSE, D.J. Foot lameness. In: ANDREWS, A.H., BLOWEY, R.W., BOYD, H. et al. *Bovine medicine*. London: Blackwell, 1992. p.353-363.
- RIBEIRO, L.A.O. Footrot dos ovinos: etiologia e controle. *Bol. IPVDF Gualba*, p.41-5, 1980.
- SARAIVA, D. *Bacteroides nodosus*. In: GUERREIRO, M.G., OLIVEIRA, S.J., SARAIVA, D. et al. *Bacteriologia especial de interesse em saúde animal e saúde pública*. Porto Alegre: Sulina, 1984b. 492p.
- SARAIVA, D. *Fusobacterium necrophorum*. In: GUERREIRO, M.G., OLIVEIRA, S.J., SARAIVA, D. et al. *Bacteriologia especial de interesse em saúde animal e saúde pública*. Porto Alegre: Sulina, 1984a. 492p.
- SCANLAN, C.M., BERG, J.N., CAMPBELL, F.F. Biochemical characterization of leukotoxins of three bovine strains of *Fusobacterium necrophorum*. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p.1422-1425, 1986.
- SILVA, C.A., SILVA, L.A.F., FIORAVANTI, M.C.S. et al. Caracterização clínica e tratamento de três formas da pododermatite bovina. *Vet. Not.*, 1998 (no prelo).
- SILVA, L.A.F., SILVA, C.A., FIORAVANTI, M.C.S. et al. Estudo comparativo entre três tratamentos cirúrgicos para duas formas de apresentação da pododermatite bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. 24. 1996, Goiânia. *Resumos de temas livres...*, Goiânia: [s.n.], 1996. p.34.
- VIRGINIA Polytechnic Institute and State University Anaerobe Laboratory. The. 3.ed., Virginia: Southern Printing., 1975. 132p.