

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

LIGIA VALÉRIA NASCIMENTO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS PRINCIPAIS TREPONEMAS
PATOGENICOS PROVENIENTES DE LESÕES DE DERMATITE
DIGITAL BOVINA**

*Molecular identification of the main pathogenic treponeme from bovine digital dermatitis
lesions*

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2013

LIGIA VALÉRIA NASCIMENTO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS PRINCIPAIS TREPONEMAS
PATOGENICOS PROVENIENTES DE LESÕES DE DERMATITE
DIGITAL BOVINA**

*Molecular identification of the main pathogenic treponeme from bovine digital dermatitis
lesions*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff

Co-orientador: Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2013

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	vii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	viii
RESUMO GERAL.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 DERMATITE DIGITAL NO BRASIL E NO MUNDO.....	3
2.2 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DA DERMATITE DIGITAL BOVINA.....	6
2.3 ESTABELECIMENTO DA ETIOPATOGENIA: PERSPECTIVAS E IMPORTÂNCIA.....	7
CAPÍTULO 3	
3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS PRINCIPAIS TREPONEMAS PATOGÊNICOS PROVENIENTES DE LESÕES DE DERMATITE DIGITAL BOVINA.....	10
Resumo.....	10
Abstract.....	11
3.1 INTRODUÇÃO.....	11
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.4 CONCLUSÃO.....	24
CAPÍTULO 4	
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS.....	26

APÊNDICES..... 36

Dedico a Deus e a todos os
colaboradores.

AGRADECIMENTOS

Obrigada meu Grande Deus por colocar em meu caminho pessoas tão maravilhosas que me ajudaram e apoiaram na execução das pesquisas deste mestrado.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff, por me aceitar como sua orientada, por me ajudar durante toda a execução das pesquisas e por me ensinar a ser uma profissional melhor. Dono de um vasto conhecimento, eu só tenho a agradecer e se um dia eu adquirir a terça parte de seu conhecimento e profissionalismo, já estarei feliz.

A minha mãe responsável pela minha educação e realização dos meus sonhos, tudo que conquistei foram graças ao seu esforço, apoio e dedicação, realizados com muito amor e carinho.

Maria Christine Rizzon Cintra, agradeço pela amizade e pelo apoio imensurável, esta que foi estudar sobre o assunto para poder me ajudar nas colheitas e processamento laboratorial, com receio de que suas dúvidas fossem me atrapalhar.

Agradeço a todos os médicos veterinários que entraram em contato conosco informando as propriedades que possuíam lesões de dermatite digital, assim, como aos proprietários que disponibilizaram seus rebanhos para a execução destas pesquisas

Aos inúmeros colaboradores que de alguma forma me ajudaram na conclusão das pesquisas, desde levando chá com bolo para me alimentar como nas atividades à campo e laboratorial.

Obrigada a todos, esta conquista não seria possível sem vocês.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral dos objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 revê a literatura sobre a dermatite digital bovina, abordando aspectos de sua epidemiologia e apresentando o status de sua etiologia.

O capítulo 3, em formato de artigo, identifica molecularmente os principais treponemas patogênicos provenientes de lesões de dermatite digital bovina.

O Capítulo 4 finaliza esta dissertação com considerações finais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

As enfermidades do casco bovino constituem um conjunto de afecções causadoras de grandes perdas econômicas mundiais. A dermatite digital bovina (DDB) é considerada a principal doença contagiosa do casco bovino. O objetivo deste trabalho foi avaliar pela primeira vez em condições brasileiras através de biologia molecular a presença de *Treponema* sp. em lesões de DDB clinicamente diagnosticadas, associados a três filogrupos de treponema: Tmv (*T. medium/T. vincentii*-like), Tph (*T. phagedenis*-like), Tdp (*T. denticola/T. putidum*-like). Inspeccionaram-se 200 bovinos leiteiros de raças variadas em 28 rebanhos distintos, dos quais foram colhidas cirurgicamente 22 lesões de DDB, classificadas clinicamente em estágios que vão do M1 ao M4 e registradas fotograficamente. Para o transporte e acondicionamento das lesões até o laboratório, utilizaram-se dois meios distintos (à fresco e imerso em PBS). As espiroquetas encontradas nas lesões de DDB através de PCR foram classificadas usando fragmentos do gene 16S rRNA específicos para os grupos de treponema e para o gênero *Treponema*. O estudo revelou que das 22 lesões colhidas e acondicionadas em PBS, 95,45%, 100% e 86,36% obtiveram o DNA bacteriano amplificado para o grupo Tmv, Tph e Tdp respectivamente, enquanto que das 20 lesões colhidas e mantidas a fresco, 100%, 100% e 75%, obtiveram o DNA bacteriano amplificado para os grupos Tmv, Tph e Tdp, respectivamente. Todas as amostras foram positivas para o gênero *Treponema*. Das 22 lesões avaliadas e classificadas clinicamente, 13,64% foram M1; 45,45% M2; 22,73% M3 e 18,18% M4. Pela primeira vez no Brasil evidenciaram-se diferentes filogrupos de *Treponema* spp. em lesões de DDB. O isolamento de pelo menos duas espécies de treponema por lesão sugere que mais de uma espécie de treponema tem que estar presente para que ocorra a lesão clínica. Novos estudos serão necessários para identificar a ação dos diferentes grupos de treponema na patogenia da DDB.

Palavras-chave: Dermatite digital bovina. *Treponema*. Casco. PCR. Classificação clínica.

ABSTRACT

The bovine foot disorders are a group of diseases that cause great economic losses worldwide. Bovine digital dermatitis (BDD) is considered the main contagious bovine foot lesion. The aim of this study was, for the first time under Brazilian conditions, identify the presence of *Treponema spp.* associated with three treponeme phylogroups Tmv (*T. medium* /*T. vincentii*-like), Tph (*T. phagedenis*-like), Tdp (*T. denticola*/*T. putidum*-like), applying molecular biology upon bovine digital dermatitis lesions clinical diagnosed.. We examined approximately 200 dairy cattle of various breeds from 28 different herds, removing surgically 22 digital dermatitis lesions clinically classified (stages M1 to M4) and recorded photographically. For the transport to the laboratory, two different ways were chosen (fresh or in PBS). The spirochetes found in the lesions of BDD by PCR were classified using specific group gene fragments of the 16S rRNA gene specific for treponeme phylogroups or for the genus *Treponema*. The study revealed that of the 22 lesions in PBS, 95,45%, 100% and 86,36% had bacterial DNA amplified for the group Tmv, Tph and Tdp respectively. For the 20 lesions transported without fresh 100%, 100% and 75% obtained bacterial DNA amplified for groups Tmv, Tph and Tdp, respectively. All lesions were positive for the presence of *Treponema spp.* Of the 22 lesions evaluated and classified clinically, 13,64% were M1, 45,45% M2, 22,73% M3 and 18,18 M4. For the first time in Brazil different phylogroups of treponemes were described in lesions of BDD. The isolation of at least two species of treponeme each lesion suggests that more than one kind of treponeme must be present for the occurrence of clinical lesions. Further studies are needed to identify the action of different groups of treponeme in the pathogenesis of BDD.

Keywords: Bovine digital dermatitis. Treponeme. Claw. PCR. Clinical classification.

LISTA DE ABREVIATURAS

DD	Dermatite digital
DDB	Dermatite digital bovina
PFGE	Gel de eletroforese em campo pulsado
T	Treponema
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
PBS	Tampão fosfato salino
FISH	Hibridização fluorescente in situ
µL	Microlitros
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
nº	Número
°C	Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogênio

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Descrição das quatro classificações da lesão clínica com o desenvolvimento de dermatite digital bovina, Segundo Döpfer et al., 1997; Holzhauer et al., 2008.....	14
Tabela 2. Primers utilizados para a detecção de treponema e três filogrupos de em lesões de dermatite digital bovina. Adaptado de Evans et al. (2009).....	15
Tabela 3. Comparação entre os meios de acondicionamento das amostras (fresco e PBS), para aos grupos: gene 16S, Tmv (<i>T. medium/T. vincentii</i> -like), Tph (<i>T. phagedenis</i> -like), Tdp (<i>T. denticola/T. putidum</i> -like) e <i>Treponema</i> sp.....	18

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Régua metálica sendo utilizada para registro individual do dígito bovino	13
Figura 2. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, demonstrando protocolo de PCR para detecção do gene 16S, <i>Treponema</i> sp. e para os filogrupos Tmv, Tph, Tdp, dos animais 1 (quadrante superior esquerdo), 19 (quadrante superior direito), 51 (quadrante inferior esquerdo) e 63 (quadrante inferior direito) separados pelo marcador de peso molecular (centro do gel), tendo sido identificado por setas os diferentes pesos moleculares.....	17
Figura 3. Fotografados quatro estágios lesionais de dermatite digital bovina (M1 a M4) propostos por Döpfer et al.(1997) em bovinos do Estado do Paraná (2012).....	20
Figura 4. Estágio clínico misto de lesão de dermatite digital M2, com região ulcerativa avermelhada ativa ao centro, apresentando também áreas de hiperqueratose com tecido proliferativo de aproximadamente 2 cm ao redor, característico de fase M4.....	21
Figura 5. Estágio clínico misto de lesão de dermatite digital M2, com extensa área à direita do sulco interdigital apresentando tecido proliferativo e projeções papilomatosas características de estágio M4.....	21
Figura 6. Estágio clínico misto de lesão de dermatite digital classificada M3, com focos erosivos da epiderme próximos ao perióplio à esquerda do sulco digital característicos de estágio inicial M1....	22

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

As enfermidades do casco bovino constituem um conjunto de afecções causadoras de grandes perdas econômicas mundiais. As afecções do aparelho locomotor no bovino representam a terceira causa de problemas em bovinos leiteiros mais importantes economicamente, após problemas reprodutivos e mastite (Miller e Dorn, 1990). O Brasil, por possuir um rebanho bovino leiteiro em crescente tecnificação e conseqüentemente, produtividade, está inserido nesse panorama mundial. Apesar dessa realidade, o estudo das doenças que acometem o aparelho locomotor distal dos bovinos, sua etiopatogenia, as formas de tratamento e as possíveis profilaxias, ainda não acompanha o ritmo de desenvolvimento dos nossos rebanhos.

Existem no Brasil todas as enfermidades podais encontradas mundialmente devido às diferenças de ambientes e manejos. Suas incidências e prevalências são variáveis ao longo do território. Molina et al. (1999) em estudo realizado em Minas Gerais detectaram a prevalência de 30,3% de distúrbios podais em vacas leiteiras, dessas, 48,5% apresentaram erosão de talão, 13,5% dermatite interdigital e 9,6% pododermatite séptica. Quando observado somente a dermatite digital bovina, diversos pesquisadores brasileiros encontraram prevalências que variaram de 5,95 %¹ em Minas Gerais (Molina et al.,1999) a 24,4% em Goiás (Silva et al.,2001) e 29,9% no Rio Grande do Sul (Cruz et al.,2001).

A DDB ou doença de Mortellaro é uma inflamação contagiosa da epiderme próxima ao espaço interdigital ou a banda coronária com erosão, muitas vezes extensa e dolorosa. No início, os pêlos no local estão eriçados, posteriormente tomando um aspecto granuloso, podendo também adquirir forma erosiva/ulcerativa. Neste estágio, caracteriza como doença do morango, devido ao seu aspecto macroscópico, ou proliferativo, com projeções papilomatosas semelhantes a verrugas, também chamadas verrugas podais, ou papilomas podais (Döpfer et al., 1997; Demirkan et al., 2000). Entre os fatores predisponentes estão a má higiene e umidade (Rodriguez-Lainz et al.

¹ O valor de 5,95 % foi obtido somando-se os valores referentes à dermatite digital clássica e sua forma crônica (verrucosa).

1996), pois o material orgânico como fezes e urina favorecem a proliferação do agente etiológico, assim como outros microrganismos que contribuem como porta de entrada para proliferação do agente etiológico (Döpfer et al., 1997; Borges, 2003; Leão et al., 2009). Entre os principais microrganismos envolvidos estão o *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum*, *Campylobacter* spp., espiroquetas do gênero *Treponema* e *Borrelia* spp. (Blowey e Sharp, 1988; Collighan e Woodwarn, 1997; Silva, 1997; Demirkan et al., 2000; Cruz et al., 2001; Borges, 2003). Porém, principalmente na última década, existe uma convergência de conceito mundial entre os autores, de que o *Treponema* seja o principal agente etiológico da DDB (Borges, 2003; Cruz et al., 2005; Pringle et al., 2008; Evans et al., 2009), inclusive existe uma semelhança da DDB com o Foot root, doença encontrada em ovinos, sendo discutido também o *Treponema* como agente etiológico nesta espécie de ruminante (Moore et al., 2005). A evidência da necessidade de *Treponema* sp. para causar a lesão é confirmada pelo cultivo destas a partir de lesões da DDB (Walker et al., 1995; Döpfer et al., 1997, Döpfer et al., 2012), pela identificação por imunohistoquímica (Demirkan et al., 1998; Cruz et al., 2005) ou técnicas de biologia molecular (Demirkan et al., 2006; Pringle et al., 2008; Evans et al., 2009; Yano et al., 2010 a, b) .

A vantagem da identificação microbiológica através da biologia molecular é dispensar o cultivo, essencial principalmente quando investiga-se agentes, como algumas *Treponemas* de difícil cultivo ou não cultiváveis em laboratório (Stamm et al., 2002). Utilizando as técnicas PCR, hibridização *in situ*, e RAPD consistentemente os autores Klitgaard et al. (2008), Pringle et al. (2008) e Evans et al. (2009) identificaram espiroquetas advindas de lesões de dermatite digital pertencentes às espécies *T. phagedenis*, *T. medium*, *T. vicentii*, *T. denticola* e *T. putidum*. No Brasil, desconhecem-se quais os tipos de *Treponema* que ocorrem nas lesões de dermatite digital, pois não houve nem cultivo nem identificação molecular destas bactérias provenientes de lesões do casco bovino até o presente momento. Com isso, o objetivo deste trabalho é identificar biomolecularmente a presença de espiroquetas do gênero *Treponema* oriundas de lesões de dermatite digital bovina, de animais clinicamente diagnosticados em condições brasileiras.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DERMATITE DIGITAL BOVINA NO BRASIL E NO MUNDO

Dentre as principais enfermidades digitais infecciosas de grande importância econômica e produtiva, destaca-se a dermatite digital bovina. Relatada pela primeira vez por Cheli e Mortellaro em 1974 ao longo do Vale do Rio Pó na Itália, no qual encontraram um rebanho com lesões extensas e dolorosas na epiderme próximo ao espaço interdigital do casco afetando cerca de 70% do rebanho. Descrições semelhantes foram realizadas de lesões em bovinos desde o final de 1980 nos Estados Unidos da América (Rebhun et al., 1980) e no Reino Unido (Blowey e Sharp, 1988).

Existem no Brasil todas as enfermidades podais encontradas mundialmente devido à diversidade de ambientes e manejos. Suas incidências e prevalências são variáveis ao longo do território.

A primeira publicação mencionando a presença de DDB no Brasil cabe a Ribeiro et al. (1992) em um estudo realizado num abatedouro com bovinos de corte e a Borges et al. (1992) avaliando a incidência de afecções podais de bovinos leiteiros em propriedades no Rio de Janeiro.

Seguindo a classificação de Greenough et al. (1983), outros pesquisadores brasileiros Silva et al. (1997) e Ramos (1999), encontraram uma prevalência de 29,67% de afecções podais, destas, 87,60% em membros pélvicos e 12,40% em membros torácicos, tendo como lesões mais frequentes com 24,36% a dermatite digital, 14,53% a dermatite verrucosa, além de outras como a de pododermatite necrosante (13,68%) e a dermatite interdigital (10,26%). Também Cruz et al. (2001) em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, observaram a dermatite digital com 29,9 % preponderando sobre outras causas de claudicação como a úlcera de sola (18,3%) e a dermatite interdigital(17,8%). Em Goiás, Leão et al. (2009), avaliando duas propriedades de bovino leiteiro, de raças, sistema de manejo, alimentação e forma de criação semelhantes, encontraram 3,85% de animais acometidos com a DDB na propriedade A e 2,66% na propriedade B, números relativamente baixos, mas enfatizados pelos

autores, que a obtenção de prevalências menores não minimiza a gravidade da doença, desencadeando diferentes graus de claudicação e portanto perdas econômicas.

Mortellaro et al. (1994), Bergsten (1997) e Nicoletti (2004) caracterizam a DDB como sendo uma inflamação na pele próximo ao espaço interdigital palmar/plantar ou dorsal, podendo ocorrer também na região limítrofe entre o cório coronário e o talão. A lesão pode adquirir aspecto erosivo ou ulcerativo, comumente chamada de doença do morango, ou em lesões proliferativas, também denominada papilomatosa ou verrucosa. Os mesmo autores descrevem uma lesão na fase inicial da doença como uma inflamação altamente infecciosa, seguida por ulceração na epiderme, próxima à margem coronária, evoluindo para a forma erosiva. Segundo Blowey (1993), Greenough e Weaver (1997), essa apresentação clínica é caracterizada por uma lesão circular irregular variando de um a quatro centímetros de diâmetro, coberta por debris celulares, com visível tecido de granulação, podendo, em alguns casos, apresentar pêlos com crescimento de duas a três vezes maiores que o normal. A lesão inicia-se com hiperemia e eczema úmido dorsal ou palmar/plantar no espaço próximo ao espaço interdigital (Weaver et al., 1981; Blowey, 1993). Nicoletti (2004) afirmou que a lesão é circunscrita por uma borda epitelial branca, de centro avermelhado, com inúmeras papilas córneas brancas, dando à ferida um aspecto de morango.

Para Weaver et al. (1981) a forma verrucosa é uma inflamação proliferativa decorrente da cronicidade do processo, podendo ser uma evolução da lesão erosiva. Possui aspecto hiperplásico de couve-flor, com presença de pêlos na periferia da lesão e descarga serosa nas proximidades do bulbo dos talões. A forma erosiva, freqüentemente, acomete a pele entre os talões e as sobre unhas (Rodrigues-Argáez et al. 1997). Em 1998 Döpfer e Willemen tentaram padronizar a nomenclatura para a dermatite digital, considerando que as formas que apresentam aspectos proliferativos e hiperqueratóticos, denominados de dermatite papilomatosa, nada mais são que uma forma de evolução da lesão da dermatite digital clássica.

Os sinais clínicos inespecíficos da DDB compreendem a claudicação de intensidade variada, relutância em se locomover, posturas antiálgicas como a xifose para distribuir melhor o peso do corpo e a marcha em passadas curtas (Nocek, 1993).

Uma tentativa de classificar e descrever nosograficamente os diferentes estágios de evolução da DDB foi realizada por Döpfer et al. (1997), que a classificou em 5 estágios, sendo: M0 – animal saudável; M1 – animal com início de lesões com áreas circunscrita granulomatosa, variando de 0,5 a 4 cm de diâmetro; M2 – fase dolorosa e erosiva, fase ulcerativa clássica da dermatite digital bovina; M3 – formação de crosta por cima da lesão, comumente vista quando se iniciam tratamentos; M4 – forma crônica, proliferativa, apresentando projeções papilomatosas. Esta classificação tem sido adotada por outros autores como Somers et al. (2003), Holzhauer et al. (2008), Mumba et al. (2011) e Berry et al. (2012).

As lesões acarretam grandes perdas econômicas, devido à queda na produção leiteira, perda de peso, problemas reprodutivos, gastos com médicos veterinários e protocolos terapêuticos, podendo em alguns casos levar o animal ao descarte prematuro, (Collick et al., 1989; Barkema et al., 1994; Britt et al., 1996; Coberllini, 1994; Rodriguez- Lainz et al., 1999; Ramos et al., 2001). No Brasil a DDB foi descrita também em raças de bovinos de corte como a Nelore (Moura et al., 2010).

Com uma tendência de produzir-se de forma cada vez mais intensificada (maior produção por área) e um aumento do custo de áreas ao redor dos grandes centros urbanos brasileiros (IBGE, 2009), em futuro próximo a expectativa é que haverá um aumento da prevalência das principais enfermidades do bovino, principalmente em bovinos leiteiros, devido a sua forma de produção, manejo intensivo em confinamento ou semi-confinamento.

Mundialmente a busca por formas de controle e tratamento da DDB é intenso, sendo que substâncias com considerável impacto ambiental como metais pesados (cobre e zinco) (Holzhauer et al., 2012; Relun et al., 2013) ou com restrições para uso em animais em lactação como os antibióticos (Evans et al., 2012; Relun et al., 2013) continuam apresentando os melhores resultados, portanto existe nesta área uma janela de oportunidades para a pesquisa brasileira apresentar alternativas.

2.2. TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DA DERMATITE DIGITAL BOVINA

A DDB pode ser considerada uma enfermidade de origem multifatorial. Entre os fatores que podem influenciar em sua instalação relacionam-se:

- o ambiente: como clima e umidade (Molina et al., 1999; Silva et al., 2004;), instalações (Demirkan et al., 2000; Albuquerque et al., 2009);
- a nutrição: através de alimentação desequilibrada, minerais, excesso de proteína (Somers et al., 2005).

Tanto o ambiente quanto a nutrição agem sobre o bovino influenciando as suas defesas, compostas entre outros, pelo seu sistema imune humoral e celular. Apesar destas evidências o estudo da imunidade do bovino principalmente a campo com relação à DDB ainda é incipiente (Moe et al., 2010), havendo no entanto indícios que com a contínua exposição ao patógeno a ocorrência de lesões de DDB diminui (Logue et al., 2012).

O fator determinante para a sua contagiosidade, no entanto, reside em sua etiologia microbiana (Yano et al., 2010 a, b).

Entre os microorganismos que foram relacionados na década de 1980, estão, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum* e a presença de bactérias espiraladas semelhantes a *Treponema* sp. (Sabo et al., 1988; Blowey e Sharp, 1988), na década de 1990, *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* e algumas espiroquetas, tais como *Treponema* sp. e *Borrelia* sp. (Collighan e Woodwar, 1997; Döpfer et al., 1997) e na virada e início deste século, os seguintes agentes *Dichelobacter nodosus*, espiroquetas do gênero *Treponema* sp., tais como *T. phagedenis*, *T. medium* e *T. denticola*, (Demirkan et al., 2000; Moore et al., 2005; Demirkan et al., 2006; Evans et al., 2009).

Como a descrição clínica das lesões está sujeita a um certo grau de subjetividade e o cultivo de diferentes espiroquetas, é difícil ou ainda não foi conseguido (Stamm et al., 2002) foram desenvolvidas técnicas sorológicas (Vink et al., 2009) para uma tentativa de diagnóstico. Moe et al. (2010) trabalhando com a técnica de “Western blot” e ELISA e a IgG, relatam que apesar de terem isolado somente o

treponema *T. phagedenis*, havia uma grande diversidade antigênica na população estudada. Também usaram-se técnicas de histopatologia com coloração de prata (Cruz et al., 2005) e de imunohistoquímica (Demirkan et al., 2000). Por constituírem técnicas com alta sensibilidade e especificidade, técnicas moleculares tem sido mais comumente utilizadas para o diagnóstico, tais como, PCR (Demirkan et al., 2008; Evans et al., 2009); PFGE (eletroforese de gel em campo pulsado) (Trott et al., 2003), hibridização *in situ* (Klitgaard et al., 2008) e FISH – hibridização fluorescente *in situ* (Nordhoff et al., 2008).

A necessidade de diagnosticar rapidamente um grande número de animais em rebanhos cada vez mais tecnificados, impulsiona a adoção de técnicas diagnósticas precisas, rápidas e adaptadas para uso em grandes rebanhos, considerando-se igualmente a facilidade de colheita de amostras, transporte e armazenagem. As técnicas moleculares caminham para suprir esta necessidade, auxiliando no aumento da produtividade do rebanho bovino brasileiro, somente possível nas próximas décadas melhorando a saúde deste rebanho, diminuindo custos para o produtor e melhorando a qualidade do produto para o consumidor.

2.3 ESTABELECIMENTO DA ETIOPATOGENIA: PERSPECTIVAS E IMPORTÂNCIA

Apesar das evidências fortes correlacionando as espiroquetas como sendo o agente etiológico da DDB, os postulados de Koch ainda não foram totalmente preenchidos utilizando cepas purificadas em infecções experimentais. Read e Walker (1996) conseguiram reproduzir a doença em bezerros utilizando material lesional. Elliott et al. (2007) utilizaram um modelo murino para induzir uma resposta imune ao treponema e conseguiram, com uma cepa de seis testadas, reproduzir lesões ulcerativas. Gomez et al. (2012) conseguiram reproduzir em um modelo bovino em 67% dos casos lesões a partir de material lesional, decrescendo para 25% dos casos quando usavam cultura pura de *Treponema* sp. A dificuldade existente em isolar esses agentes a partir de material clínico e a escassez de laboratórios veterinários especializados na realização do isolamento e cultivo, assim como, a grande diversidade genética observada nas cepas estudadas, faz com que a etiologia precisa

ainda permaneça obscura (Choi et al., 1997; Walker et al., 1995; Trott et al., 2003). Apesar disto, os métodos para isolar e caracterizar anaeróbios existentes foram consideravelmente melhorados, conforme relatado por Wyss et al. (2001) em um estudo no qual realizaram o isolamento de treponemas a partir de lesões periodontais.

Diversos estudos fazem uma correlação entre filotipos distintos de treponemas e o aparecimento das lesões de DDB (Walker et al., 1997; Demirkan et al., 1999; Trott et al., 2003; Dhawi et al., 2005).

A dificuldade em isolar anaeróbios exigentes, de lesões de DDB, favorece a utilização de técnicas moleculares para identificar esses organismos, sem isolamento. O método molecular mais utilizado, envolve a comparação das sequências do gene 16S rRNA. O gene 16S rRNA possui regiões conservadas alternando com regiões variáveis. A PCR com primers complementares, as regiões de interesse vão sendo amplificadas (Woese, 1987). O objetivo da PCR é multiplicar um trecho específico do DNA (gene ou parte dele) utilizando desoxinucleotídeos como monômeros até um ponto em que sua concentração em dada solução seja tão alta, que possa ser facilmente detectável por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias. A multiplicação desses trechos específicos se dá alternando-se a temperatura entre desnaturação das cadeias do DNA genômico, anelamento dos primers, usados para delimitar a sequência a ser amplificada, e a temperatura específica de funcionamento da enzima (72°C) e o reinício do ciclo (Watson et al., 2009).

Análises anteriores de treponema utilizando PCR para o seqüenciamento do gene 16S rRNA, com lesões diretas de DDB, identificaram pelo menos cinco filotipos diferentes de treponema nos bovinos, dos quais dois destes possuíam uma relação filogenética com os treponemas orais *T. denticola* e *T. vincentii*, que são suspeitos de estarem envolvidos em casos de periodontites em seres humanos (Klitgaard et al., 2008). Tendo em conta a exposição constante dos cascos com fezes e urina, não é surpreendente de que lesões de DDB sejam infecções polimicrobianas, com dificuldade de estabelecermos uma relação causal direta entre a lesão e um único microrganismo. Shibahara et al. (2002) relata a presença de treponema no trato gastrintestinal e o

aparecimento de lesões epiteliais. Em um estudo realizado com eqüinos, relata a presença de treponemas no ceco e estas sendo responsáveis por diversos distúrbios, incluindo diarréias. Há a possibilidade de tais treponemas estarem passando pelo trato gastrintestinal e serem eliminados ativos nas fezes, podendo, serem assim os responsáveis pelos aparecimentos de lesões epiteliais.

O trato gastrointestinal de bovinos, em especial os pré-estômagos, são ricos em diferentes espécies de treponemas. Apesar de parecer plausível que ocorra uma contaminação através das fezes e colonização subsequente principalmente dos dígitos pélvicos, Evans et al. (2011) não conseguiram encontrar uma relação filogenética direta entre as espécies isoladas de lesões de DDB e aquelas encontradas no rúmen.

Portanto, as técnicas biomoleculares são fundamentais no estabelecimento da etiopatogenia, pois podem ser aplicadas em diferentes tecidos e resultaram na descoberta de novas espécies de espiroquetas de lesões de DDB como a *Guggenheimella bovis* (Wyss et al.,2001) e a *T. brennaborensis* (Klitgaard et al., 2008)

CAPÍTULO 3

3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS PRINCIPAIS TREPONEMAS PATOGENICOS PROVENIENTES DE LESÕES DE DERMATITE DIGITAL BOVINA

(Molecular identification of the main pathogenic treponemes from bovine digital dermatitis lesions)

RESUMO

Examinaram-se 200 bovinos leiteiros de raças variadas de 28 rebanhos brasileiros diferentes, identificando-se 11% de bovinos com dermatite digital bovina (DDB). As lesões foram classificadas segundo seu estágio clínico, do inicial ao crônico, em M1 a M4. Colheram-se 22 lesões de DDB acondicionadas em dois meios distintos (fresco e PBS) e extraído seu DNA bacteriano para análise por Nested-PCR. Foram utilizados cinco pares de primers diferentes, respectivamente para os grupos gene 16S, *Treponema* sp., Tmv (*Treponema medium/ Treponema vincentii*-like), Tph (*Treponema phagedenis*-like) e Tdp (*Treponema denticola/ Treponema putidum*-like). 13,64% das lesões encontravam-se em estágio inicial M1, 45,45% em M2, 22,73% em M3 e 18,18% em M4. Em ambos os meios de acondicionamento das lesões foi possível identificar o *Treponema* sp. e seus filogrupos, tendo sido identificado em todas as análises de 2 a 3 filogrupos de treponema por lesão. 100% da lesões foram positivas para os filogrupos Tmv e Tph e 90,91% para o Tdp. Este estudo evidencia a importância destes três filogrupos de treponemas na etiologia da DDB, além de identificar pela primeira vez estes treponemas de lesões de DDB no Brasil e no subcontinente sul-americano.

Palavras-chave: Dermatite digital bovina. Espiroqueta. Nested-PCR.

ABSTRACT

200 cows of different breeds of dairy cattle from 28 Brazilian herds were examined, identifying 11% of cattle with bovine digital dermatitis (BDD). The lesions were classified according to their clinical stage, initial to chronic, from M1 to M4. 22 lesions of BDD were collected and transported in two distinct ways (fresh and PBS) and their bacterial DNA extracted for analysis by Nested-PCR. Five different pairs of primers were used, for groups 16S gene, *Treponema* sp., Tmv (*Treponema medium*/*Treponema vincentii*-like), Tph (*Treponema phagedenis*-like) and Tdp (*Treponema denticola*/*Treponema putidum*-like). 13.64% of the lesions were in the initial stage M1, 45.45% in M2, 22.73% in M3 and 18.18 in M4. With both transport media *Treponema* sp. and their phylogroups were identified, having been identified in all samples 2-3 phylogroups per lesion. 100% of the lesions were positive for Tmv and Tph and 90.91% for Tdp. This study highlights the importance of these three phylogroups of treponemes in the etiology of BDD, besides identifying for the first time these treponemes from lesions of BDD in Brazil and the South American subcontinent.

Keywords: Bovine digital dermatitis. Spirochete. Nested-PCR.

3.1 INTRODUÇÃO

A dermatite digital bovina (DDB) é uma inflamação contagiosa da epiderme próxima ao espaço interdigital ou a banda coronária com erosão. A campo, o médico veterinário utiliza somente o quadro clínico para diagnosticar a enfermidade, recorrendo a manuais e livros como os de Acuña (2004) e de Nicoletti (2004). A enfermidade possui distribuição mundial e é endêmica no Brasil (Borges et al., 1992; Rodriguez-Argáez et al., 1997; Cruz et al. 2001). A enfermidade causa claudicação (Bergsten, 1997) e portanto prejuízos econômicos consideráveis (Miller e Dorn, 1990; Kossaibati e Esslemont, 1997; Losinger, 2006). O primeiro relato publicado da DDB foi feito por Cheli e Mortellaro (1974), porém nas Américas a primeira publicação sob o nome de papilomatose interdigital da vaca leiteira foi realizada por Rebhun et al. (1980), o que hoje é considerada a forma crônica da DDB. Os tratamentos e as medidas preventivas são variáveis em sua eficácia (Manske et al., 2002; Laven e Logue, 2006; Silva, 2007)

necessitando-se melhorar o conhecimento sobre a etiopatogenia desta enfermidade. Existem evidências consistentes de que os principais microrganismos envolvidos na etiologia da DDB são espiroquetas do gênero *Treponema* (Blowey e Sharp, 1988; Döpfer et al., 1997; Demirkan et al., 1999; Demirkan et al., 2000; Cruz et al., 2005; Evans et al., 2009; Brandt et al., 2011).

Os *Treponemas* isolados de lesões de DDB podem ser agrupadas filogeneticamente e taxonomicamente em três grandes grupos: *Treponema medium/Treponema vincentii*-like identificados por Stamm et al. (2002); Evans et al. (2008) e Evans et al. (2009), *Treponema phagedenis*-like identificados por Trott et al. (2003); Evans et al. (2008); Pringle et al. (2008); e *Treponema putidum/Treponema denticola*-like identificados por Stamm et al. (2002).

Foram descritos na Alemanha espécies diferentes de espiroquetas isoladas de lesões de DDB, que no entanto, parecem caracterizar eventos raros (Nordhoff et al., 2008).

No Brasil, até o presente momento, não se identificou, nem por cultivo e nem molecularmente, as espiroquetas provenientes de lesões de DDB. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença ou ausência destes três principais grupos de *treponemas* em lesões de DDB em diferentes estágios de evolução clínica.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídas no estudo propriedades de bovinos leiteiros no Estado do Paraná, contatadas através de médicos veterinários e consultores das mesmas, relatando a presença de DDB.

Após identificação e contenção do bovino, realizou-se a inspeção do dígito para verificar a presença ou ausência de lesão. Confirmado o diagnóstico clínico de DDB, realizou-se uma higienização prévia do membro, com água e sabão, para remoção de sujidades e com isso uma prévia redução microbiana foi realizada, com o intuito de reduzir possíveis fatores que venham a interferir na extração do DNA bacteriano. O dígito limpo era registrado por meio fotograficamente como sugerido por Bergsten (1993) com uma modificação através do auxílio de uma placa metálica com régua de 1

cm de espaçamento. A placa era de fácil higienização e recebia a identificação do animal (Figura 1).

Figura 1: Régua metálica sendo utilizada para registro individual do dígito bovino



Uma vez classificada a lesão clinicamente segundo Döpfer et al. (1997) e Holzhauer et al. (2008) (tabela 1), retirou-se a lesão cirurgicamente sob anestesia de Bier com lidocaína 2%. O tecido retirado foi acondicionado de duas formas distintas, um fragmento foi acondicionado em PBS e o outro mantido somente refrigerado. O dígito foi tratado topicamente com antibiótico (oxitetraciclina) e enfaixado. O transporte das amostras foi realizado em caixas de isopor com temperatura interna de 4° a 8°C até o seu processamento laboratorial.

Tabela 1: Descrição das quatro classificações da lesão clínica com o desenvolvimento de dermatite digital bovina, Segundo Döpfer et al., 1997; Holzhauer et al., 2008.

Classificação da lesão	Descrição
M1	Dermatite digital bovina em fase inicial, com área circunscrita granulomatosa de 0,5 a 4cm de diâmetro na superfície epitelial ou até 2mm de profundidade
M2	Ulceração clássica de dermatite digital bovina, área afetada próxima a banda coronária, com até 7 cm de diâmetro e tecido granulomatoso quando a lesão tem mais de 2mm abaixo do epitélio
M3	Ulceração clássica de dermatite digital bovina no processo de cicatrização coberta por crostas
M4	Alteração próxima à banda coronária. As lesões cutâneas são hiperqueratóticas podendo apresentar aspectos proliferativo

No laboratório, após fragmentação minuciosa da amostra e a extração do DNA bacteriano segundo Sambrook et al. (1989) e Zhu et al. (2002), com modificações (apêndice 1). Para a identificação das bactérias em interesse foram utilizados cinco pares de primers: primer do gene 16S, *Treponema sp.*, Tmv- *Treponema medium/ Treponema vincentii*-like, Tph- *Treponema phagedenis*-like e Tdp- *Treponema denticola/ Treponema putidum*-like, em concordância com Moore et al. (2005) e Evans et al. (2009) visualizável na tabela 2. A primeira PCR foi realizada com o gene 16S rRNA, e colocados no termociclador, no qual seguiu-se o respectivo programa, 95°C por 5 min, 25 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 3 min e 72°C durante 3min, com etapa de extensão final de 72°C durante 7 min, para os demais fez-se Nested-PCR, utilizando o ciclo de temperatura de 95 ° C, durante 5 min, seguido por 40 ciclos de 95 ° C durante 1 min; 68°C por 2 min , para o Tmv com temperature de extensão de

72°C por 10 min. Para o Tph utilizou 1min a 64°C, 30s a 68°C para o Tdp, com temperaturas de extensão a 72°C durante 2 min e em seguida etapa final de alongamento com temperatura de 72°C por 10 min, para o *Treponema* sp. utilizou-se 34 ciclos de 95°C por 15s, 53°C por 30s, 72°C por 30s, seguido por 72°C durante 5min (Moore et al., 2005; Evans et al., 2009).

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1%, colocados em cubas de eletroforese a 100-110 volts, corados com brometo de etídeo e visualizados em luz ultra violeta. O produto de amplificação restante foi armazenado a -20°C

Tabela 2: Primers utilizados para a detecção de treponema e três filogrupos de em lesões de dermatite digital bovina. Adaptado de Evans et al. (2009).

Primer	Seqüência do primer	Pares de base (pb)
Universal gene 16S	16S F (5'-AGAGTTTGATCCTGG-3') 16S R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3')	1,526
Tmv (<i>T. medium</i> / <i>T. vincentii</i> -like)	Tmv F (5'- GAATGCTCATCTGATGACGGTAATCGACG-3') Tmv R (5'- CCGGCCTTATCTAAGACCTTCTACTAG-3')	475
Tph (<i>T. phagedenis</i> - like)	Tph F(5'-GAAATACTCAAGCTTAACTTGAGAATTGC-3') Tph R (5'-CTACGCTACCATATCTCTATAATATTGC-3')	400
Tdp (<i>T. denticola</i> / <i>T.</i> <i>putidum</i> -like)	Tdp F (5'-GGAGATGAGGGAATGCGTCTTCGATG-3') Tdp R (5'-CAAGAGTCGTATTGCTACGCTGATATATC-3')	475
<i>Treponema</i> sp.	Tsp F (5'-AARCATGCAAGTCGARCGGCAAG-3') Tsp R (5'-TCCATTGCGGAATATTCTTA-3')	335

A pesquisa foi submetida ao e aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal da PUCPR registro nº: 646 de 2011.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram inspecionados 200 bovinos de 28 rebanhos visitados. Confirmou-se a presença da DDB em 17 rebanhos, 22 vacas apresentavam lesões de DDB, sendo colhidas amostras para análise laboratorial. Observou-se que das 22 amostras mantidas a fresco colhidas e analisadas em gel de agarose (figura 2) todas obtiveram seu DNA bacteriano amplificado para o gene 16S, *Treponema* sp., Tmv e Tph, representando 100%, sendo o Tdp com 25% de amostras não amplificadas (tabela 3), o que condiz com dados encontrados por Evans et al. (2009), que em suas pesquisas obteve maior variação de resultados para o grupo correspondente ao primer *T. denticola*/ *T. putidum*-like, aqui representado pelo grupo Tdp. No entanto, amostras que não obtiveram seu DNA bacteriano amplificadas no Tdp fresco, obtiveram sua amplificação em amostras acondicionadas em PBS, que das 22 amostras colhidas, todas obtiveram seu DNA bacteriano amplificado para o gene 16S, *Treponema* sp. e Tph, representando 100%, sendo o Tmv e o Tdp, com 95,45% e 86,36% respectivamente, da amplificação do DNA bacteriano.

Figura 2: Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, demonstrando protocolo de PCR para detecção do gene 16S, *Treponema* sp. e para os filogrupos Tmv, Tph, Tdp, dos animais 1,19,51 e 63 separados pelo marcador de peso molecular (centro do gel), tendo sido identificado por setas os diferentes pesos moleculares

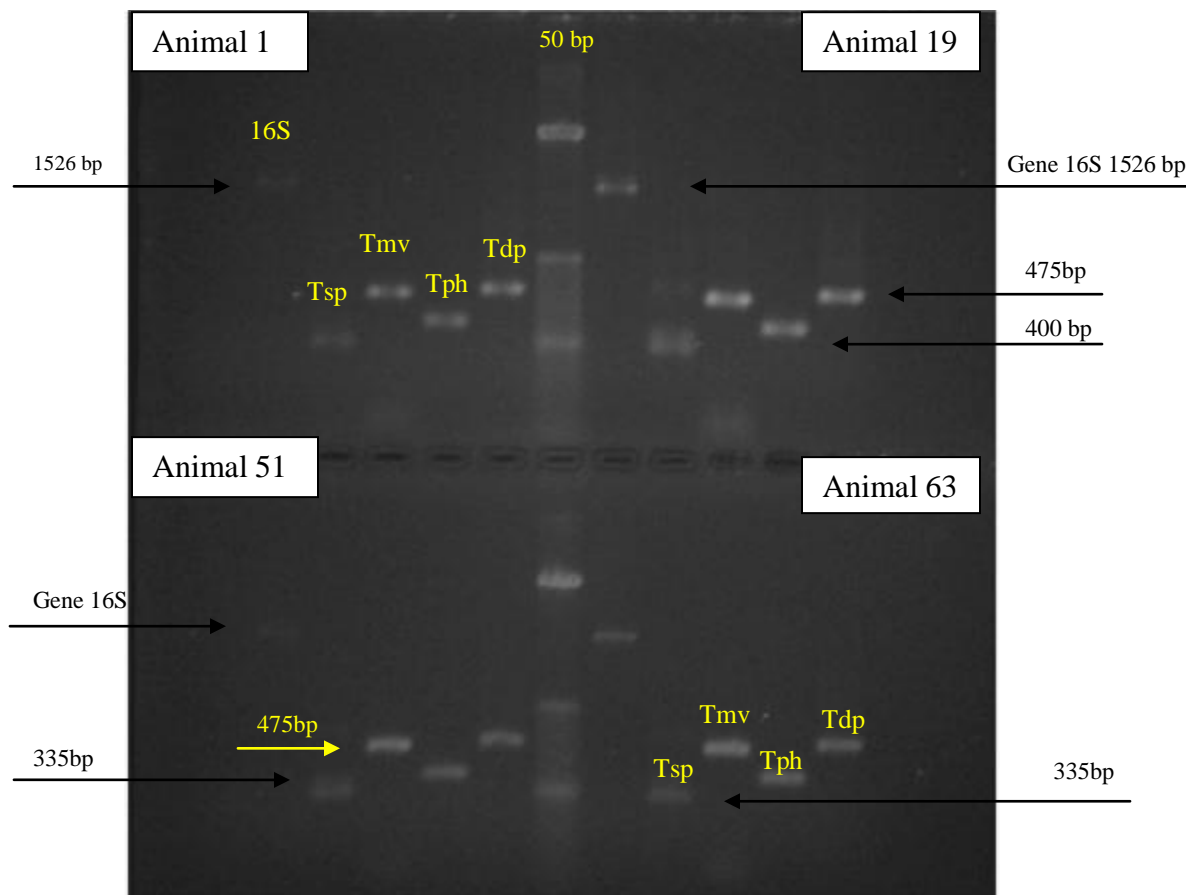


Tabela 3: Comparação entre os meios de acondicionamento das amostras (fresco e PBS), para aos grupos: gene 16S, Tmv (*T. medium/T. vincentii*-like), Tph (*T. phagedenis*-like), Tdp (*T. denticola/T. putidum*-like) e *Treponema* sp.

Animal	Fresco					PBS				
	16S	Tsp	Tmv	Tph	Tdp	16S	Tsp	Tmv	Tph	Tdp
665	∅	∅	∅	∅	∅	+	+	+	+	+
764	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
765	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
779	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
821	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
1127	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1685	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2596	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2645	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2665	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2669	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2677	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2683	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2696	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2700	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2703	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2716	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
318 a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
355 a	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
39 m	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
811 m	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
frida a	∅	∅	∅	∅	∅	+	+	+	+	-
Total	100%	100%	100%	100%	75%	100%	100%	95,45%	100%	86,36%

Classificando as lesões conforme seu grau de evolução segundo Döpfer et al., 1997; Holzhauser et al., 2007 (figura 3), representados aqui na tabela 3, observa-se que um maior número de lesões clinicas encontradas foram M2, sendo estas lesões caracterizadas como infecção ativa, em sua fase clássica ulcerativa, muitas vezes dolorosas na palpação, no entanto foi possível observar animais que continham lesões classificadas aqui M2 e M3, mas que continham áreas M1 e M4 em uma mesma lesão (figuras, 4, 5 e 6), caracterizando um quadro crônico e de reagudização da doença, demonstrando que ciclos de erosão e proliferação de tecido podem se suceder na DDB. A própria autora da classificação original em conferência mais recente realizada no Canadá, descreve a possibilidade de lesões concomitantes M1 e M4, denominando-

as de M4.1 (Döpfer 2009), porém lesões em estágio M2 com M4 e M1 com M3, como os 3 casos aqui encontrados aparentemente não foram ainda descritas. Este também é o primeiro relato brasileiro de casos mistos de lesão de DDB em diferentes estágios de desenvolvimento. Gomez et al. (2012) trabalhando com uma infecção experimental somente conseguiram produzir uma lesão clínica em novilhas em estágio até M2, sugerindo que a lesão tenha que permanecer por mais que 60 dias ou outros fatores concomitantes, de natureza ambiental, microrganismos ou intrínsecos do próprio animal tenham papel no desenvolvimento de lesões de estágios mais avançados M3 e M4. O quanto processos imunológicos estão envolvidos na patogenia e portanto na aparência clínica das lesões, neste momento não nos é possível afirmar, principalmente devido à grande diversidade antigênica e de provável virulência das treponemas envolvidas (Moe et al. 2010).

Figura 3: Fotografados quatro estágios lesionais de dermatite digital bovina (M1 a M4) propostos por Döpfer et al.(1997) em bovinos do Estado do Paraná (2012)

M1



M2



M3



M4



Figura 4: Estágio clínico misto de uma lesão de dermatite digital classificada como M2, com região ulcerativa avermelhada ativa no centro, porém com grandes áreas de hiperqueratose e tecido proliferativo aproximadamente 2 cm ao redor, característico de fase M4



Figura 5: Estágio clínico misto de lesão de dermatite digital M2, com extensa área à direita do sulco interdigital apresentando tecido proliferativo e projeções papilomatosas características de estágio M4



Figura 6: Estágio clínico misto de lesão de dermatite digital classificada M3, com focos erosivos da epiderme próximos ao perióplio à esquerda do sulco digital característicos de estágio inicial M1



Conforme pode ser extraído da tabela 3, 100 % da lesões foram positivas para os filogrupos Tmv e Tph e 90,91 % para o Tdp.

Etiopatogenicamente estes resultados sugerem que nos bovinos analisados, em lesões de DDB sempre bactérias do grupo *T. medium*/*T. vicentii*-like e *T. phagedenis*-like estarão envolvidos. O grupo *T. phagedenis*-like parece ser igualmente o mais isolado mundialmente de DDB (Demirkan et al., 2000; Moore et al., 2005; Demirkan et al., 2006; Evans et al., 2009). O número de lesões restrito, não nos permitiu estabelecer correlações seguras entre a presença ou ausência de determinadas treponemas e o estágio lesional, no entanto isto poderia ser um ponto de partida para estudos futuros, tendo como intuito desvendar melhor a patogenia desta enfermidade. Moter et al. (1998) trabalhando com a identificação e localização espacial de espiroquetas no tecido de lesões de DDB, verificou que *T. phagedenis* localiza-se mais profundamente, o que pode denotar uma maior capacidade de agressão ao tecido. Evans et al. (2009) sugere que as treponemas penetrem pelos folículos pilosos para atingir tecidos mais

profundos. Para o desenvolvimento do aspecto clássico da lesão de DDB e principalmente para as sucessivas respostas proliferativas parece haver a colaboração de ao menos dois grupos de treponemas, Tmv (*T. medium/T. vincentii*-like) e Tph (*T. phagedenis*-like), pois estes grupos obtivemos 100% do DNA bacteriano amplificado. A igual origem do *T. medium* patogênico tanto da cavidade oral (Brandt et al., 2011) quanto do rúmen (Evans et. al., 2011) instiga a possibilidade de um acúmulo de bactérias potencialmente patogênicas no ambiente e causando a DDB advindas do trato gastrointestinal. Outros treponemas de origem da cavidade oral como o grupo *T. denticola/ T. phagedenis*, também puderam ser identificados. Especula-se que como os treponemas patogênicos conviveriam juntamente com uma grande maioria de treponemas não patogênicos da flora residente ruminal (Bekele et al., 2011) sem causar lesões no rúmen, necessita de um maior aprofundamento da compreensão tanto dos mecanismos usados pelos treponemas para invadir o tecido do casco, quanto da ecologia ruminal. A possibilidade de flora do rúmen ou da cavidade bucal contaminar o meio ambiente, é conhecida desde a década de 1960 (Eadie, 1962) e poderia ser a possível via de contaminação do meio ambiente com treponemas patogênicos.

O isolamento de várias cepas de treponema de uma mesma lesão (animal) foram anteriormente observados por Evans et al. (2008). Os mesmos autores em pesquisa publicada posteriormente (Evans et al., 2009), no entanto, verificaram a presença igualmente de *T. medium/T. vincentii*-like e *T. phagedenis*-like em lesões de DDB. Um efeito simbiótico ainda desconhecido entre as cepas de treponemas tem sido sugerido por Klitgaard et al. (2008), Nordhoff et al. (2008) e Evans et al. (2009). A existência no Brasil dos principais grupos de treponemas isolados mundialmente de lesões de DDB, encontrados no presente estudo, reitera o conceito consensual de que a maioria das enfermidades bovinas existentes nos rebanhos brasileiros foram introduzidas juntamente com a aquisição original destes animais. Novos estudos serão necessários para elucidar a etiopatogenia da DDB, principalmente com relação à interação das treponemas entre si e com o tecido animal e a identificação do reservatório das treponemas fora da lesão para poder desenvolver-se medidas profiláticas e terapêuticas eficazes.

3.4 CONCLUSÃO

Em condições brasileiras observaram-se três grupos de espiroquetas em lesões de dermatite digital bovina: *T. medium*/ *T. vincentii*-like; *T. phagedenis*-like; *T. denticola*/*T. putidum*-like. *T. medium*/ *T. vincentii*-like e *T. phagedenis*-like são os principais causadores de DDB presente em todos os casos. A ocorrência de mais de uma cepa na mesma lesão pode ser necessária para o aparecimento da lesão, tanto aguda quanto a crônica e proliferativa. A forma de acondicionamento e transporte de amostras de campo a fresco ou em uma solução de PBS não influenciam o resultado de amplificação do DNA bacteriano através de técnicas de PCR. Formas clínicas de lesões em diferentes estágios clínicos concomitantes ocorreram nos rebanhos observados.

CAPÍTULO 4

4 Considerações finais

Em condições brasileiras observaram-se três grupos de espiroquetas em lesões de dermatite digital bovina: *T.medium/T.vincentii*-like; *T. phagedenis*-like; *T. denticola/T. putidum*-like. *T.medium/T.vincentii*-like e *T. phagedenis*-like são os principais causadores de DDB presente em todos os casos. A ocorrência de mais de uma cepa na mesma lesão pode ser necessária para o aparecimento da lesão, tanto aguda quanto a crônica e proliferativa. A forma de acondicionamento e transporte de amostras de campo a fresco ou em uma solução de PBS não influenciam o resultado de amplificação do DNA bacteriano através de técnicas de PCR. Formas clínicas de lesões em diferentes estágios clínicos concomitantes ocorreram nos rebanhos observados. A presente dissertação abre perspectivas para a realização de futuras pesquisas envolvendo tanto uma maior compreensão sobre possíveis reservatórios das treponemas envolvidas na etiologia da DDB, quanto apresenta pontos de partida para uma melhor compreensão da patogenia desta enfermidade. A partir dos resultados obtidos, poder-se-á iniciar o desenvolvimento de novas estratégias para pesquisar métodos profiláticos e terapêuticos.

REFERÊNCIAS

Acuña R. Cojeras Del bovino: fisiologia y profilaxis. 1ª ed. Buenos Aires: Inter Médica. 2004.

Albuquerque PI de, Ximenes FHB, Moscardini ACR, Gouvêa LV de, Mota ALA de A, Godoy RF de, Borges JRJ. Caracterização das afecções podais em rebanho de gado Holandês confinado. *Ciência Animal Brasileira*, 2009

Argáez-Rodríguez F de J, Hird DW, Anda JH de, Read DH, Rodríguez-Lainz A. Papillomatous digital dermatitis on a commercial dairy farm in Mexicali, Mexico- incidence and effect on reproduction and Milk production. *Prev. Vet. Med*, 1997;32: 275-286.

Barkema HW, Westrik JD, Van Keulen KAS, Schukken YH, Brand A. The effects of lameness on reproductive performance, milk production and culling in Dutch dairy farms. *Prev. Vet. Med*, 1994; 20: 249-259.

Bekele AZ, Satoshi K, Kobayashi Y. Phylogenetic diversity and dietary association of rumen treponema revealed using group- specific 16S rRNA gene based analysis. *FEMS Microbiol Lett*. 2011; 51-60.

Bergsten C. A photometric method for recording hoof diseases in cattle with special reference to haemorrhages of the sole. *Acta veterinaria scandinavica*.1993; 34: 281 - 286.

Bergsten C. Infectious diseases of the digits. In: GREENOUGH PR, WEAVER AD, Lameness in Cattle, 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 1997: p89 - 100

Borges JR, Mársico Filho F. Custos do tratamento e descarte causado por doenças digitais em rebanho leiteiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 1992.

Borges JRJ. Doença Digital Bovina: Proposta de Nomenclatura. *Anais do XI Congresso Latinoamericano de Buiatria*. Salvador, 2003.

Blowey RW, Sharp MW. Digital dermatitis in dairy cattle. *Veterinary Record*, London, 1988.

Blowey RW. Common disease of the foot: cattle lameness and hoof care. Ipswich: Farming Impress, 1993: 39-55.

Brandt S, Apprich, V, Hackl, V, , Tober R, Danzer, M, Kainzbauer C, Gabriel, Chr, , Stanek Chr, Kofler, J. Prevalence of bovine papillomavirus and *Treponema* DNA in bovine digital dermatitis lesions. *Veterinary Microbiology* 2011, 148, 161-167

Britt JS, Gaska J, Garret, EF, Konkle D, Mealy M. Comparison of topical application of three products for treatment of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle. *Journal American Vet Med Association*, Shamburg, 1996; 209: 1134-1136.

Cheli R, Mortellaro CM. La dermatitis digitale del bovino. Proc. 8th International Conference on Diseases of Cattle, Milan Italy, 1974: 208-213.

CRUZ C, Driemeier D, Cerva C, Corbellini LG. Clinical and epidemiological aspects of bovine digital lesions in southern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2001; 53: 654-657.

Cruz CE, Pescador CA, Nakajima Y, Driemeier D. Immunopathological investigations on bovine digital epidermitis. *Veterinary Record*, 2005; 157: 834-840.

Coberllini CN. Factores nutricionales de riesgo par alas afecciones podales. In: *Enfermedades podales del bovino. Jornada Taller para medicos veterinaries*, Navarro, 1994: 1-15.

Collighan RJ, Woodward MJ. Spirochaetes and other bacterial species associated with bovine digital dermatitis. *FEMS Microbiology Letters*, 1997;156: 37-41.

Collick DW, Ward WR, Dobson H. Associations between types of lameness and fertility. *Veterinary Record*, 1989; 125: 103- 106.

Dhawi A, Hart CA, Demirkan I, Davies IH, Carter SD. Bovine digital dermatitis and severe virulent ovine foot rot: a common spirochaetal pathogenesis. *Vet. J.*, 2005; 169: 232-241.

Demirkan I, Carter SD, Hart CA, Woodward MJ. Isolation and cultivation of a spirochaete from bovine digital dermatitis. *Vet. Rec*, 1999; 145: 497-498.

Demirkan I, Carter SD, Murray RD, Blowey RW, Woodward MJ. The frequent detection of a treponeme in bovine digital dermatitis by immunocytochemistry and polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 1998; 60:285-292.

Demirkan I, Carter SD, Murray RD. Skin diseases of the bovine digit associated with lameness. *Vet Bull*, 2000; 70: 149-171.

Demirkan I, Williams HF, Dhawi A, Carter SD, Winstanley C, Bruce KD, Hart CA. Characterization of a spirochaete isolated from a case of bovine digital dermatitis. *Journal of Applied Microbiology*, 2006;101: 948-955.

Döpfer D, Koopmans A, Meijer FA, Szaka'Il I, Schukken YH, Klee W, Bosma RB, Cornelisse JL, Van Asten AJ, Huurne AAHM. Histopathological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. *Veterinary Record*, 1997;140:620-623.

Döpfer, D.Willemen, W. Standardisation of infectious claw diseases (Workshop report) X International Symposium on Lameness in Ruminants, Lucerne, Swiss, 1998, p.244-255

Döpfer D. Digital Dermatitis The dynamics of digital dermatitis in dairy cattle and the manageable state of disease In: *Can West Veterinary Conference, Canadá, 2009.*

Eadie JM. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. *Journal of General Microbiology*, 1962; 29: 563-778.

Elliott MK, Alt DP, Zuerner RL. Lesion formation and antibody response induced by papillomatous digital dermatitis - associated spirochetes in a murine abscess model. *Infection and Immunity*, 2007;75:4400-4408.

Ettema JF, Ostergaard S. Economic decision making on prevention and control of clinical lameness in Danish dairy herds. *Livestock Science*, 2006; 102: 92-106.

Evans NJ, Brown JM, Demirkan I, Murray RD, Vink WD, Blowey RW, Hart CA, Carter SD. Three unique groups of spirochetes isolated from digital dermatitis lesions in UK cattle. *Vet. Microbiology*, 2008; 130:141-150.

Evans NJ, Brown JM, Demirkan I, Birtles R, Hart CA, Carter SD. The association of unique, isolated spirochetes with BDD lesions. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009;136: 115-120.

Evans NJ, Brown JM, Murray RD, Getty B, Birtles R, Hart CA, Carter SD. Characterization of novel bovine gastrointestinal tract *Treponema* isolates and comparison with bovine digital dermatitis treponemes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011:138–147.

Felske A, Akkermans AD, DE VOS WM. Quantification of 16S rRNA in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied Environmental Microbiology*, 1998; 64: 4581- 4587.

Ferreira PM. *Enfermidades podais em rebanho leiteiro confinado (Tese Doutorado)* Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte; 2003.

Freitas KC, Gabriel JE, Leite LC, Armas RD, Lanna DPD, Madeira H MF. Molecular characterization of ruminal bacterial diversity in vitro. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 2008;30.

Gomez, A, Bernardoni, N, Dusick, A, Rieman, J, Read, D, Socha, M, Cook, N. Döpfer, D An experimental infection model for digital dermatitis. XXVII World Buiatrics Congress, Lisbon, 2012, p. 257-258

Greenough PR, Weaver AD. Lameness in cattle. 3. Ed Philadelphia: W.B. Saunders, 1997: 96-99.

Holzhauser M, Bartels CJM, Döpfer D, Schaik Van G. Clinical course of digital dermatitis lesions in an endemically infected herd without preventive herd strategies
Journal of Dairy Science, 2008; 177: 222–230.

IBGE - Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, Pesquisa Trimestral do Leite, Pesquisa Trimestral do Couro e Pesquisa da Produção de Ovos de Galinha. Acesso em 17 de agosto de 2009.

Klitgaard K, Boye M, Capion N, Jensen TK. Evidence of multiple *Treponema* phylotypes involved in bovine dermatitis as shown by 16s rRNA gene analysis and fluorescence in situ hybridization. J. Clin. Microbiol, 2008; 46: 3012-3020.

Kossaibati MA, Esslemont RJ. The costs of production diseases in dairy herds in England. The veterinary Journal, 1997; 154: 41-51.

Laven RA, Logue DN. Treatment strategies for digital dermatitis for the UK. Vet. J., 2006; 171: 79-88.

Leão MA, Silva LAF, Jayme V de SÁ, Silva LM da, Moura MI de, Barbosa VT. Aspectos epidemiológicos da dermatite digital bovina em duas propriedades produtoras de leite do estado de Goiás, Brasil, Ciência Animal Brasileira, 2009;10:1135-1147.

Losinger WC. Economic impact of reduced milk production associated with papillomatous digital dermatitis in the USA. Journal of Dairy Research, 2006; 73: 244-256.

Manske T, Hultgren J, Bergsten C. Topical treatment of digital dermatitis associated with severe heel horn erosion in a Swedish dairy herd. Prev. Vet. Med, 2002; 53: 215-231.

Miller GY, Dorn CR. Costs of dairy cattle diseases to producers in Ohio. *Preventive Veterinary Medicine*, 1990; 8:171-182.

Moe KK, Takahisa Y, Kazuhiro M, Chikara K, Wataru Y, Michio M, Naoaki M. Analysis of the IgG Immune Response to *Treponema phagedenis*-Like Spirochetes in Individual Dairy Cattle with Papillomatous Digital Dermatitis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010; 376-383.

Molina LR, Carvalho AU, Facury Filho EJ, Ferreira VCP. Prevalence and classification of foot problems in lactating cows in Belo Horizonte, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 1999; 51: 149-152.

Moore LJ, Woodward MJ, Grogono-Thomas R. The occurrence of treponemes in contagious ovine digital dermatitis and characterisation of associated *Dichelobacter nodosus*. *Veterinary Microbiology*, 2005; 108: 57-67.

Morris TR. *Experimental design and analysis in animal sciences*. Wallingford: CABI Publishing International, 1999 ;208.

Mortellaro CM, Romussi S, Scavia G. Preliminary report on the onset and evolution of digital skin disease in a group of 32 heifers. In: *International Symposium on Disorders on the Ruminant Digital Conference on Bovine Lameness*, 1994: 171-179.

Moter A, Leist G, Rudolph R, Schrank K, Choi BK, Wagner M, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. *Microbiology*, 1998; 144: 2459–2467.

Moura, MI, Goulart, DS, Orlando, CFP, Franco, LG, Silva, OC, Silva, LAF. Dermatite digital em bovinos da raça Nelore: avaliação do ganho de peso, medidas testiculares e epididimárias, no pósoperatório das lesões. *Veterinaria e Zootecnia*, 2010;17(2): 239-249.

Mumba T, Döpfer D, Kruitwagen C, Dreher M, Gaastra W, Van der Zeist BA. Detection of spirochetes by polymerase chain reaction and its relation to the course of digital

dermatitis after local antibiotic treatment in dairy cattle. *Journal of Veterinary Medicine*, 2011;46: 117–126.

Nicoletti JLM. *Manual de podologia bovina*. Barueri: Manole, 2004: 125p.

Nocek JE. *Hoof care for dairy cattle*. Fort Atkison: W.D. Hoard and Company, 1993: 32.

Nordhoff M, Moter A, Schrank K, Wieler LH. High prevalence of treponemes in bovine digital dermatitis - a molecular epidemiology. *Vet. Microbiol*, 2008; 131: 293-300.

Pringle M, Bergsten C, Fernström LL, Höök H, Johansson KE. Isolation and characterization of *Treponema phagedenis*-like spirochetes from digital dermatitis lesions in Swedish dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2008; 50: 1-8.

Ramos L.S., Silva L.A.F., Meirinhos M.L.G., Juliano R.S., Prado L.F., Cunha P.H.J., Moraes R.R.e Fioravanti M.C.S.. Avaliação de parâmetros reprodutivos em fêmeas bovinas de aptidão leiteira portadoras de pododermatite necrosante. *Ars Vet*. 2001; 17(2):98-106.

Read D, Walker R. Experimental transmission of papillomatous digital dermatitis (footwarts) in cattle. *Veterinary pathology*, 1996; 33: 607.

Rebhun WC, Payne RM, King JM, Wolfe M, Begg SN. Interdigital papillomatosis in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1980; 177: 437-440.

Ribeiro PN, Borges JLJ, Ronconni MA, Marsico Filho F, Pitombo CA. Incidência de afecções podais em bovinos de corte abatidos no Rio de Janeiro. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia*, 1992; 15: 28-33.

Rodriguez-Lainz A, Hird DW, Carpenter TE, Read DH. Case-control study of papillomatous digital dermatitis in southern California dairy farms. *Prev. Vet. Med.* 1996; 28:117-131.

Rodriguez-Lainz A, Melendez-Retamal P, Hird DW, Read DH, Walker RL. Farm and host level risk factors for papillomatous digital dermatitis in Chilean dairy cattle. *Prev. Vet. Med.*, 1999;42: 87-97.

Sabo J, Hudac A, Fendtova E. The ecology of anaerobic nonsporulating bacteria in relation to dermatitis in cattle. *Veterinary Medicine*, 1988; 33: 265-272.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Schlafer S, Nordhoff M, Wyss C, Strub S, Hübner J, Gescher DM, Petrich A, Göbel UB, Moter A. Involvement of *Guggeimella bovis* in digital dermatitis lesions of dairy cows. *Veterinary Microbiology*, 2008; 128: 118-125.

Shibahara T, Kuwano A, Ueno T. Intestinal Spirochetosis in a 21 month old throughbred colt., *Aust. Vet. J.*, 2002; 64: 633-636.

Silva CA. identificação e isolamento do *Dichelobacter nodosus* e do *Fusobacterium necrophorum* de bovinos portadores de pododermatite, relações com a etiopatogenia, dados edafoclimáticos e avaliação do tratamento (Dissertação de mestrado) Escola de medicina veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1997.

Silva LAF, Silva LM, Romani AF, Rabelo RE, Fioravanti MCS, Souza TM, Silva CA. Características clínicas e epidemiológicas das enfermidades podais em vacas lactantes do município de Orizona-GO. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, 2001.

Silva LAF, Atayde IB, Fioravanti, MCS, Eurides D, Oliveira KS, Silva CA, Vieira D, Araújo EG. Comparative study of three surgical treatments for two forms of the clinical presentation of bovine pododermatitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004; 1026: 118-124.

Somers JGJC, Frankena K, Noordhuizen – Stassen EN, Metz JHM. Prevalence of claw disorders in Dutch dairy cows exposed to several floor systems. *J. of Dairy Science*, 2003;86: 2082-2093.

Somers JGJC, Frankena K, Noordhuizen – Stassen EN, Metz JHM. Risk factors for digital dermatitis in dairy cows kept in cubicle houses in The Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, 2005; 71:11-21.

Stamm LV, Bergen HL, Walker RL. Molecular typing of papillomatous digital dermatitis associated *Treponema* isolates based on analysis of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 19: 336-339.

Trott DJ, Moeller MR, Zuerner RL, Goff JP, Waters WR, Alt DP, Walker RL, Wannemuehler MJ. Characterization of *Treponema phagedenis*-like spirochetes isolated from papillomatous digital dermatitis lesions in dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41:2522-2529.

Vink WD, Jones G, Johnson WO, Brown J, Demirkan I, Carter SD, French NP. Diagnostic assessment without cut-offs: application of serology for the modeling of bovine digital dermatitis infection. *Prev. Vet. Med.*, 2009; 92: 235-248.

Walker RL, Read DH, Loretz KJ, Nordhausen RW. Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. *Veterinary Microbiology*, 1995; 47: 343-355.

Walker RL, Read DH, Loretz KJ, Hird DW, Berry SL. Humoral response of dairy cattle to spirochetes isolated from papillomatous digital dermatitis lesions. *Am. J. Vet. Res*, 1997; 58: 744-748.

Watson JD, Mayers MR, Caudy AA, Witkowski JA. *DNA Recombinate- Genes e Genomas*. 3 ed. Porto Alegre-RS; Artmed.2009.

Weaver AD, Anderson L, Batting AL, Demerzis PN, Knezevic PF, Peterse DJ, Sankovic F. Review of disorders of the ruminant digit with proposal of anatomical and pathological terminology and recording. *Vet Record*, London, 1981; 7: 117-120.

Weaver AD. Animal Welfare with Special Reference to Cattle and Education. Iranian Journal of Veterinary Surgery, Supplement for the 2nd ISVS & 7th ISVSAR, 2008.

Wyss C, Dewhirst EF, Gmur R, Thurnheer T, Xue Y, Schupbach P, Guggenheim B, Paster BJ. *Treponema parvum* sp nov., a small, glucuronic or galacturonic acid dependent oral spirochaete from lesions of human periodontitis and acute necrotizing ulcerative gingivitis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2001; 51: 955-962.

Wyss C, Dewhirst EF, Paster BJ, Thurnheer T, Luginbühl A. *Guggenheimella bovis* gen. nov., sp. nov., isolated from lesions of bovine dermatitis digitalis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005; 55: 667-671.

Yano T, Yamagami R, Misumi K, Kubota C, Moe KK, Hayashi T, Yoshitani K, Ohtake O, Misawa N . Genetic Heterogeneity among Strains of *Treponema phagedenis*-Like Spirochetes Isolated from Dairy Cattle with Papillomatous Digital Dermatitis in Japan. Clinical and Vaccine Immunology, 2010 a: 376-383.

Yano, T. Moe KK, Yamazaki K, Ooka T, Hayashi T, Misawa N. Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. Veterinary Microbiology, 2010 b; 143: 352-365.

Zhu XY, Zhong T, Padya Y, Joerger RD. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. Applied Environmental Microbiology, 2002;68:124-137.

APÊNDICES

Extração de DNA adaptado de Sambrook et al. (1989) e Zhu et al. (2002)

- Colocar o conteúdo fragmentado em um tubo Falcon® + 10 ml de PBS
- Remover debris por centrifugação a 2300rpm por 2 minutos
- Coletar o sobrenadante e centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos
- Descartar o sobrenadante
- Lavar o pellet 2 vezes com 10 ml de PBS e centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos
- Descartar sobrenadante e estocar o pellet a -20°C até a extração do DNA

Extração do DNA

- Tratar o pellet com 300 µL de lisozima (concentração final de 2mg/mL) durante 30 minutos a 37°C
- Na sequência, tratar com 400 µL de SDS 1% (concentração final de 0,5%) e 8 µL de proteinase K 10mg/mL (concentração final de 0,1mg/mL) durante 2 hora a 37°C
- Transferir a solução para tubo de rosca com bolas de zircônia de 0,1 mm de diâmetro (± até a marcação de 0,5 mL do tubo)
- Adicionar 300 µL da mistura fenol: clorofórmio (1:1) em cada amostra losada
- Em seguida submeter as amostras a 3 intervalos de 1 minutos cada no bead beating na velocidade alta
- Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
- Transferir a fase aquosa para tubo novo toando cuidado para não pegar a interfase
- Remover os resíduos de fenol adicionando igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1)
- Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos
- Transferir o sobrenadante para novo tubo
- Adicionar 1/5 de volume de NaCl 5M e 1/10 de volume de CTAB 10% ao sobrenadante e incubar a 65°C por 5-10 minutos

- Centrifugar 12000 rpm por 10 minutos para remover o precipitado de polissacarídeos
- Recuperar o sobrenadante em novo tubo e precipitar o DNA adicionando 1/10 de volume de acetato de sódio 3M e igual volume de isopropanol 100% gelado
- Misturar por inversão (verificar a presença de “grumos” de DNA semelhantes a algodão)
- Incubar a temperatura ambiente por 1 hora ou overnight em geladeira
- Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos
- Lavar o pellet com 500 µL de etanol 70% e misturar por inversão
- Centrifugar a 12000rpm por 10 minutos
- Remover o sobrenadante com ponteira (cuidado para não perder o pellet)
- Deixar secar o etanol de modo que o pellet fique translúcido
- Ressuspender em 100 µL de TE+RNAse; estocar as amostras a -20°C