

Isolamento e caracterização molecular de *Dichelobacter nodosus* isolados de ovinos no estado da Bahia, Brasil

Isolation and Molecular Characterization of *Dichelobacter nodosus* Isolated from Sheep in Bahia, Brazil

Vitor Santiago de Carvalho¹, Charles Fernando Capinos Scherer², Maicon Pereira Lents¹, José Eugênio Guimarães¹, Juliana Targino Silva Almeida e Macêdo³, Karla Alvarenga Nascimento³ & Pedro Miguel Ocampos Pedroso^{1,3}

ABSTRACT

Background: Pododermatitis or footrot is an infectious disease that affects the hoof and interdigital tissue of sheep causing lameness. The disease is caused by the interaction of the agent *Dichelobacter nodosus* and symbiotic bacteria in the complex environment of the epidermal tissues of the hoof and host immune system. *D. nodosus* is not able to invade healthy hooves, so the infection is preceded by colonization of the interdigital skin by *Fusobacterium necrophorum*. The aim of this research was to perform the isolation and characterization of *D. nodosus* in sheep farms of different municipalities of Bahia, obtaining the serogroups present in each herd.

Materials, Methods & Results: The study was carried out in nine sheep farms from eight municipalities in the state of Bahia. All farms presented history of foot diseases. A total of 620 animals were observed, 140 of which were examined for lameness. To collect the contents of the lesions, sterile swabs were introduced into tubes containing sterile Thorley transport medium under refrigeration at 8°C and sent for laboratory analysis. Subsequently, each swab collected was seeded in two Petri dishes containing 4% hoof agar medium and incubated in anaerobic at 37°C for 96 h. The purified samples were seeded on 2% hoof agar and incubated under the same conditions as above. The colonies were identified by the morphological characteristic and Gram staining. The DNA was extracted and stored at -20°C until its use in PCR, for identification and classification of *D. nodosus* in serogroups (A-I). In the nine farms visited were found animals with clinical signs of infectious pododermatitis. After processing, there was success of isolation in 39 samples (41%), confirming the presence of *D. nodosus* in all municipalities evaluated. Seven serogroups (A, B, D, E, F, H, I) were identified, totalizing 52 positive cases involving these serogroups, being the most prevalent the serogroups D, with 59% of the cases (31/52) and H with 17% (7/52). Of the total samples, 11.5% had mixed infections with more than one serogroup per animal. Infection by up to two serogroups was found in 9.5% of the samples. Infection by more than two serogroups was found in only 2.1% of the samples of the present study.

Discussion: The variations found in the number of affected animals and evolution of the lesions can be explained by the nature of the strains present in each farm and by epidemiological factors. According to the literature, it is possible to observe percentage variations of success in culturing *D. nodosus* either in different countries or in different regions within the same country, finding larger, smaller and similar values to this work (41%). These variations usually occur for reasons related to the quantity and viability of the bacteria in the samples. Thus, the number of bacteria in the lesion, degree of contamination with other bacteria, type and use of means of transport, besides the time elapsed among the collection, packaging and shipment are primordial elements to reach good isolation rates. Among all the serogroups found in this experiment, D and H were the predominant ones. The present work is the first in Brazil to characterize isolates of *D. nodosus* by PCR, a more accurate molecular technique than the previously used technique, based on microagglutination, and the first report in the country involving serogroup I, including mixed infections of this species (D + H + I) and other serogroups (E + F, D + H). Thus, the knowledge of the serogroups prevalent in a given state or country is directly related to both prevention and eradication of the disease.

Keywords: footrot, sheep, PCR, serogroups.

Descritores: pododermatite, ovinos, PCR, sorogrupos.

DOI: 10.22456/1679-9216.82618

Received: 14 January 2018

Accepted: 4 May 2018

Published: 26 May 2018

¹Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil. ²Hipra Saúde Animal Ltda., Porto Alegre, RS, Brazil. ³Laboratório de Patologia Veterinária (LPV), Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil. CORRESPONDENCE: P.M.O. Pedroso [pedrosovet@yahoo.com.br - Tel.: +55 (61) 3107-2831]. Laboratório de Patologia Veterinária, UnB. Via L4 Norte s/n. Campus Darcy Ribeiro. CEP 44380-000 Brasília, DF, Brazil.

INTRODUÇÃO

A pododermatite ou footrot é uma doença infecciosa que afeta o casco e tecido interdigital dos ovinos causando claudicação [27]. A doença é causada pela interação do agente *Dichelobacter nodosus* e bactérias simbióticas, no complexo ambiente dos tecidos epidérmicos do casco e sistema imunitário do hospedeiro. O *D. nodosus* não é capaz de invadir cascos saudáveis, por isso a infecção é precedida de colonização da pele interdigital pelo *Fusobacterium necrophorum*. Linhagens de *D. nodosus* diferem em virulência podendo gerar três formas clínicas da doença: virulenta, intermediária e benigna [7].

Convencionalmente, o diagnóstico e diferenciação das formas de footrot são obtidos por exame clínico dos animais afetados e caracterização *in vitro* das cepas de *D. nodosus* isoladas. Com base na antigenicidade fimbrial, existem 10 sorogrupos principais (A-I e M) de *D. nodosus* no sistema australiano [6] e dentro destes sorogrupos uma heterogeneidade adicional foi observada na forma de sorotipos. Este sistema de classificação se baseia em um teste de aglutinação e PCR [8]. Trabalhos realizados na Austrália e diversos países demonstraram haver uma variedade de sorogrupos do organismo e a imunidade contra a doença é relacionada com a presença, na vacina, dos sorogrupos prevalentes a campo [21]. No Brasil, o único levantamento de sorogrupos foi realizado entre o Rio Grande do Sul e o Uruguai, indicando que os mais prevalentes foram A, B, D, E e F [22].

O objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento e caracterização do *D. nodosus* em criações de ovinos de diferentes municípios da Bahia, obtendo os sorogrupos presentes em cada rebanho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

O estudo foi realizado em nove fazendas de criação de ovinos, de oito municípios do estado da Bahia (São Gonçalo dos Campos, Cachoeira, Entre rios, Cruz das almas, Muritiba, Candeias, Mata de São João e São Felipe) entre 2013 e 2015. Todas as fazendas possuíam histórico de doenças podais e foram escolhidas por indicações da Associação de Criadores de Caprinos e Ovinos do Estado da Bahia (ACCOBA), médicos veterinários de campo e lojas agropecuárias.

Durante a visita clínica foi realizada inspeção e exame podal no rebanho para identificação de animais com lesões de pododermatite. Ao todo 620 animais foram observados, sendo 140 examinados por apresentar claudicação. Após triagem, utilizando o sistema de escore podal modificado [25], os animais com escore ≥ 3 foram selecionados e identificados.

Bacteriologia e Reação em Cadeia da Polimerase

A coleta bacteriológica foi realizada por meio de suabe em um total de 95 amostras. Para realização do suabe utilizou-se palitos portugueses estéreis, que impregnados do material das lesões foram introduzidos em tubos contendo meio de transporte estéril [26], mantidos sob refrigeração a 8°C e enviados para processamento no laboratório.

Posteriormente, o material recebido no laboratório cerca de 24 h após a coleta, foi semeado em placas de Petri contendo meio de cultura ágar casco a 4%, e incubadas em anaerobiose a 37°C por 96 h. Cada suabe coletado foi semeado em duas placas de ágar casco a 4%, sendo novamente incubadas anaerobicamente a 37°C por 96 h. As amostras purificadas foram semeadas em ágar casco a 2% e incubadas nas mesmas condições acima referidas. As colônias foram identificadas pela característica morfológica e coloração de Gram conforme literatura [23]. Amostras com crescimento puro de *D. nodosus* foram ressemeadas e cultivadas nas mesmas condições, e logo em seguida, liofilizadas e armazenadas a -80°C. Um frasco liofilizado de cada isolado foi utilizado para controle de processo e extração de DNA, com posterior realização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para classificação.

O DNA foi extraído por meio de um kit comercial DNeasy (Qiagen®)¹ e armazenado a -20°C até a sua utilização na PCR, utilizando protocolos descritos na literatura internacional, com pequenas modificações [8]. Para a PCR utilizou-se tampão 1x (Sinapse Inc)² (20 mM Tris-HCl, 50 mM de KCl), 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1,0 U Taq DNA polimerase, 0,25 a 0,5 µM de cada primer, 3 µL de cDNA e água para uma mistura final de 20 µL. A amplificação ocorreu em termociclador S1000™ Thermal Cycler³ programado para realizar um ciclo a 94°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 5 s, 60°C por 5 s e 72°C por 30 s, seguido de um ciclo final de 72°C por 2 min. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Invitrogen)⁴ a 1% (p/v), contendo brometo de etídio (Sinapse Inc)² e visualizados por luz

ultravioleta. A PCR para sorotipagem (sorogrupos A, B, C, D, E, F, G, H, I) foi previamente estandardizada utilizando controles de cada sorogrupo de *D. nodosus* e o DNA de uma cepa de *Moraxella bovis* foi utilizado como controle negativo. A sorotipagem foi realizada utilizando os mesmos parâmetros de reação e primers já descritos acima [8].

RESULTADOS

Foram observados animais com sinais clínicos de pododermatite infecciosa nas nove fazendas visitadas, porém houve variação na quantidade de animais afetados e na evolução das lesões encontrando-se estágios iniciais, terminais e em convalescença.

Dos 140 ovinos examinados, 95 foram selecionados para colheita por apresentarem lesões mais graves e, portanto, maior chance de viabilidade das amostras. Após processamento, houve isolamento em 39 amostras (41%), confirmando-se a presença do *D. nodosus* em todos os municípios visitados (Tabela 1). A porcentagem de sucesso na cultura das amostras entre as fazendas variou de 5,8 a 62,5%.

No presente estudo, todas as amostras com cultura positiva foram destinadas a PCR para identificação e obtenção dos sorogrupos prevalentes. Durante o experimento, sete sorogrupos (A, B, D, E, F, H, I) foram identificados e sua distribuição está disposta na Tabela 1. Foram totalizados 52 casos positivos envolvendo os sete sorogrupos e os mais prevalentes foram o D com 59% dos casos (31/52) e o H com 17% (7/52). Do total de amostras, 11,5% apresentaram infecções mistas

com mais de um sorogrupo por animal. A infecção por até dois sorogrupos foi encontrada em 9,5% das amostras. Já a infecção por mais de dois sorogrupos foi encontrada em somente 2,1% das amostras.

DISCUSSÃO

As variações encontradas na quantidade de animais afetados e evolução das lesões podem ser explicadas pela natureza dos isolados presentes em cada fazenda e por fatores epidemiológicos. De acordo com a literatura, os isolados responsáveis por pododermatite benigna não apresentam fatores de virulência, desta forma, as lesões não progridem e ocorre regressão espontânea da doença na maioria dos animais, quando o ambiente torna-se seco [28]. Já isolados virulentos causam lesões extensas com necrose e possibilidade de perda do dígito, tornando a doença endêmica por meses ou anos nas explorações infectadas [7]. A diminuição ou aumento dos fatores predisponentes também leva a declínios ou picos da expressão da doença em cada rebanho [1].

Uma possível explicação da variação do percentual de sucesso da cultura das amostras por propriedade, é que algumas amostras podem ter um menor número de bactérias ou as lesões estarem em processo de convalescença [12]. Diversos trabalhos já relataram a grande dificuldade em isolar o *D. nodosus* com amostras de campo, principalmente, devido à natureza anaeróbica, tempo de remessa e contaminação da amostra com outras bactérias [2,4,17]. Amostras de suabe de footrot que permanecem em meios de transporte ou

Tabela 1. Determinação do número de amostras positivas para *Dichelobacter nodosus* (valores absolutos e relativos) e identificação dos sorogrupos presentes em oito municípios do estado da Bahia, Brasil durante o período de 2013 a 2015.

Município	Amostragem	Positivas	Sorogrupos						
			A	B	D	E	F	H	I
São Gonçalo dos Campos	7	4 (57,1%)	0	0	0	4	4	0	0
Cachoeira	8	4 (50,0%)	0	0	4	0	0	0	0
Entre Rios (Fazenda 1)	17	1 (5,8%)	0	1	0	0	0	0	0
Entre Rios (Fazenda 2)	10	4 (40,0%)	2	0	2	0	0	0	0
Cruz das Almas	12	7 (58,3%)	0	0	7	0	0	7	2
Muritiba	14	8 (57,1%)	0	0	8	0	0	0	0
Candeias	8	5 (62,5%)	0	0	5	0	0	0	0
Mata de São João	7	1 (14,3%)	0	1	0	0	0	0	0
São Felipe	12	5 (41,6%)	0	0	5	0	0	0	0
TOTAL	95	39 (41,0%)	2	2	31	4	4	7	2

sobre a bancada de laboratório por mais de 3 h podem ser inviáveis para crescimento, pois as bactérias perdem a capacidade de se multiplicar e o número de colônias diminui [5]. Isto parece ser uma consequência da exposição da bactéria ao oxigênio. Esta dificuldade foi percebida no presente trabalho, pois as coletas ocorriam no interior da Bahia e o laboratório estava localizado no Sul do país, necessitando de longo tempo de envio mesmo utilizando a modalidade de correio expresso e com meio de transporte e temperatura adequados. Em criações com diagnóstico clínico de pododermatite infecciosa o isolamento do *D. nodosus* muitas vezes é realizado em poucos animais do rebanho, já que os testes são caros e existem poucos laboratórios de diagnósticos veterinários regulamentados [18].

Consultando a literatura pode-se observar grande variação no percentual de sucesso de cultura do *D. nodosus* seja em diferentes países ou em diferentes regiões dentro do mesmo país, encontrando-se valores maiores, menores e similares ao deste trabalho (41%). Essas variações geralmente ocorrem por motivos relacionados à quantidade e a viabilidade da bactéria nas amostras. Desta forma, a quantidade de bactérias na lesão, grau de contaminação com outras bactérias, tipo e utilização de meio de transporte, além do tempo decorrido entre a coleta, acondicionamento e remessa são elementos primordiais para se alcançar boas taxas de isolamento. Pesquisas realizadas em diferentes países apontam diferentes taxas de isolamento das amostras coletadas. Pesquisadores obtiveram sucesso em 40,5% das amostras na Nova Zelândia [3]; 45% e 21% em duas regiões do Canadá [18]; 56% na Inglaterra e País de Gales [17] e 54% na Índia [19].

O método de cultura em conjunto com a PCR é mais sensível do que apenas a PCR direta dos suabes na detecção de *D. nodosus* [8,12]. A possível explicação é que o método direto de extração de DNA pode conter substâncias inibidoras de PCR e o número de células no suabe é muito inferior ao da cultura. No entanto, a detecção de *D. nodosus* por PCR direta, é um teste mais rápido em comparação com o método a partir da cultura [5]. O sucesso da PCR está em fatores ligados ao procedimento de coleta, conservação e a rapidez com que as amostras coletadas são analisadas.

A detecção de infecções com mais de um sorogrupo por animal concorda com autores que relataram que infecções mistas de sorogrupos podem ocorrer no rebanho, surgindo em lotes ou em cascos individuais

[17]. No Brasil, o único trabalho registrado envolvendo levantamento de sorogrupos ocorreu em um estudo realizado em rebanhos do Rio Grande do Sul e Uruguai demonstrando a presença de variados sorogrupos, porém sem infecções mistas. Diferindo deste experimento, os dados demonstraram que no RS os sorogrupos mais prevalentes foram E (46%), D (18%) e B (13%) e no Uruguai prevaleceu o F (44%), E (22%) e A (20%) [22]. Desta forma, o presente trabalho é o primeiro no Brasil a caracterizar isolados de *D. nodosus* por PCR, uma técnica molecular mais precisa que a técnica utilizada antigamente, baseada em microaglutinação, e o primeiro relato no país envolvendo o sorogrupo I, inclusive com infecções mistas deste (D+H+I) e de outros sorogrupos (E+F, D+H).

As infecções mistas detectadas no estudo corroboram com achados anteriores de outros pesquisadores em trabalhos na Índia [12,19], Austrália [7], Inglaterra/País de Gales [17] e Estados Unidos [10]. O significado de infecção mista pode ser explicado pelo fato de *D. nodosus* sofrer conversão do sorogrupo, via recombinação homóloga, como um resultado da transformação natural. Este fato já foi comprovado laboratorialmente e supõe-se que ocorra a campo, dessa forma, isto explicaria o porque de uma vacina específica para um sorogrupo falhar e criaria a necessidade de rever o papel de isolados benignos, uma vez que podem desempenhar papel importante como reservatórios de antígenos fimbriais alternativos [14].

A infecção mista com até dois sorogrupos já foi observada em diversos países. Na Índia, trabalhos realizados em diferentes regiões do país apontaram índices diversos como 42% [13], 31% [19] e 1,2% [12] das amostras. Em trabalhos na Inglaterra, infecções mistas foram relatadas em 7,8% das amostras [17], nos EUA em 4,8% [10] e na Austrália em 13% das amostras. A infecção mista com mais de dois sorogrupos ocorreu com baixa porcentagem no presente trabalho corroborando com um estudo que relatou que a infecção por mais de dois sorogrupos de *D. nodosus* é raro, ocorrendo em aproximadamente 2% das amostras [20] e na Índia o mesmo fato foi relatado em 1,50% das amostras [19]. Estes autores sugeriram, que se mais colônias fossem examinadas por casco, um maior número de sorogrupos seria detectado.

Dentre todos os sorogrupos encontrados neste experimento, o D e H foram os predominantes. Fato similar ocorreu no estudo em diversas fazendas do

Reino Unido e Europa ocidental, porém com dominância contrária em relação ao presente estudo, estando o sorogrupo H a frente do sorogrupo D [26]. Historicamente, o sorogrupo H manteve a sua posição de importância na Inglaterra e País de Gales nos últimos 20 anos [17] e o sorogrupo D era o segundo mais comum na Nova Zelândia, porém as pesquisas mais atuais não detectam este sorogrupo e apontam que o sorogrupo E é o mais comum na Nova Zelândia, seguido do sorogrupo B [15].

Coincidentemente, o sorogrupo E é o sorogrupo patogênico mais comum no Nepal, país cuja ovinocultura se originou a partir de carneiros importados da Nova Zelândia [5]. Observando pesquisas em diversos continentes percebemos que o Sorogrupo D ainda não é prevalente ou não ocupa grau de importância em muitos países, ao contrário, o sorogrupo B é o que apresenta maior importância no cenário mundial [10,11,17-19,22,28]. Já o sorogrupo I, pela primeira vez identificado no Brasil, também foi identificado em pesquisas recentes na Inglaterra e País de Gales, Noruega e Índia [16,17].

A quantidade de sorogrupos encontrados em determinado local irá conduzir a necessidade do uso de vacinas mono ou multivalentes. A combinação de múltiplos sorogrupos de *D. nodosus* em uma mesma vacina resulta em uma resposta imunológica menor para cada sorogrupo, quando comparada com a administração de cada sorogrupo isoladamente. Esse fenômeno é conhecido como competição antigênica e foi observado em vários experimentos em que vacinas monovalentes demonstraram superioridade em

prevenir e tratar a pododermatite, quando comparadas com vacinas multivalentes [24]. Há relatos de países em que somente um sorogrupo foi encontrado e após utilização de vacina monovalente, conseguiu-se erradicar a doença cujos surtos persistiam por mais de 10 anos [11]. Desta forma, o conhecimento dos sorogrupos prevalentes em determinado estado ou país está diretamente ligado tanto à prevenção quanto a erradicação da doença.

CONCLUSÕES

A ocorrência da pododermatite infecciosa em ovinos no estado da Bahia envolve a participação de diversos sorogrupos de *Dichelobacter nodosus*, tornando mais complexa a interpretação e formulação de medidas de controle desta doença. A detecção de um novo sorogrupo e de infecções mistas apontam para a necessidade de ampliar o foco da investigação e das medidas de diagnóstico e profilaxia da enfermidade, atualmente dedicado exclusivamente à redução dos casos via tratamento. A ação dos diversos sorogrupos na patologia da doença permanece desconhecida, exigindo análises mais aprofundadas para maiores esclarecimentos.

MANUFACTURERS

¹Qiagen. Hilden, Germany.

²Sinapse Biotecnologia. São Paulo, SP, Brazil.

³Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA.

⁴Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

- 1 **Abbott K.A. & Lewis C.J. 2005.** Current approaches to the management of ovine footrot. *The Veterinary Journal*. 169(1): 28-41.
- 2 **Belloy L., Giacometti M., Boujon P. & Waldvogel A. 2007.** Detection of *Dichelobacter nodosus* in wild ungulates (*Capra ibex ibex* and *Ovis aries musimon*) and domestic sheep suffering from footrot using a two-step Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Wildlife Diseases*. 43(1): 82-88.
- 3 **Bennett G., Hickford J., Sedcole R. & Zhou H. 2009.** *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* and the epidemiology of footrot. *Anaerobe*. 15(4): 173-176.
- 4 **Cagatay I.T. & Hickford J.G.H. 2006.** Characterization of Footrot bacteria *Dichelobacter nodosus* using PCR amplification and DNA sequence analysis. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 30(1): 53-59.

- 5 Cagatay I.T. & Hickford J.G.H. 2005. Update on ovine footrot in New Zealand: Isolation identification and characterization of *Dichelobacter nodosus* strains. *Veterinary Microbiology*. 111(3-4): 171-180.
- 6 Dhungyel O.P., Schiller N., Eppleston J., Lehmann D.R., Nilon P., Ewers A. & Whittington R.J. 2013. Outbreak-specific monovalent/bivalent vaccination to control and eradicate virulent ovine footrot. *Vaccine*. 31(13): 1701-1706.
- 7 Dhungyel O.P., Hunter J.S. & Whittington R.J. 2014. Footrot vaccines and vaccination. *Vaccine*. 32(26): 3139-3146.
- 8 Dhungyel O.P., Whittington R.J. & Egerton J.R. 2002. Serogroup specific single and multiplex PCR with pre-enrichment culture and immuno-magnetic bead capture for identifying strains of *D. nodosus* in sheep with footrot prior to vaccination. *Molecular and Cellular Probes*. 16(4): 285-296.
- 9 Egerton J.R. 2007. Diseases of the feet. In: Aitken I.D. (Ed). *Diseases of the Sheep*. 4th edn. Edinburgh: Moredum, pp.273-281.
- 10 Gradin J.L., Sonn A.E. & Petrovska L. 1993. Serogrouping of *Bacteroides nodosus* isolates from 62 sources in the United States. *American Journal of Veterinary Research*. 54(7): 1064-1068.
- 11 Gurung R.B., Dhungyel O.P., Tshering P. & Egerton J.R. 2006. The use of an autogenous *Dichelobacter nodosus* vaccine to eliminate clinical signs of virulente footrot in a sheep flock in Bhutan. *The Veterinary Journal*. 172(2): 356-363.
- 12 Hussain I., Wani S.A., Qureshi S.D. & Farooq S. 2009. Serological diversity and virulence determination of *Dichelobacter nodosus* from footrot in India. *Molecular and Cellular Probes*. 23(2): 112-114.
- 13 Kabli Z., Wani S., Hussain I., Bhat M., Rather M. & Magray S. 2014. Economic impact of ovine footrot and serological diversity and virulence of *Dichelobacter nodosus* in north Kashmir, India. *The Indian Journal of Animal Sciences*. 84(7): 728-731.
- 14 Kennan R.M., Dhungyel O.P., Whillington R.J., Egerton J.R. & Roods J.I. 2003. Transformation-mediated serogroup conversion of *Dichelobacter nodosus*. *Veterinary Microbiology*. 92(1-2): 169-178.
- 15 Kingsley D.F., Hindmarsh F.H., Liardet D.M. & Chetwin D.H. 1986. Distribution of serogroups of *Bacteroides nodosus* with particular reference to New Zealand and the United Kingdom. In: Stewart D.J., Peterson J.E., Mckern N.M. & Emery D.L. (Eds). *Proceedings of a Workshop on Footrot in Ruminants*. Melbourne: CSIRO Division of Animal Health, pp.143-146.
- 16 Kumar N.V., Karthik A., Vijayalakshmi S. & Sreenivasulu D. 2015. Phylogenetic analysis of *Dichelobacter nodosus* serogroup-specific fimA gene from ovine footrot in Andhra Pradesh. *Veterinary World*. 8(5): 567-571.
- 17 Moore L.J., Wassink G.J., Green L.E. & Grogono-Thomas R. 2005. The detection and characterization of *Dichelobacter nodosus* from cases of ovine footrot in England and Wales. *Veterinary Microbiology*. 108(1-2): 57-67.
- 18 Olson M.E., Gard M.S., Gradin J. & Morck D.W. 1998. Serological classification and virulence determination of *Dichelobacter nodosus* isolated from Alberta and British Columbia Sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 62(1): 33-37.
- 19 Rather M.A., Wani S.A., Hussain I., Bhat M.A., Kabli Z.A. & Magray S.N. 2011. Determination of prevalence and economic impact of ovine footrot in central Kashmir India with isolation and molecular characterization of *Dichelobacter nodosus*. *Anaerobe*. 17(2): 73-77.
- 20 Ribeiro L.A.O. 1981. Distribution of antigenic types of *Bacteroides nodosus* in Australian sheep. In: Beveridge W.I. & Egerton J.R. (Eds). *Ovine footrot*. Sydney: University of Sydney, pp.35-50.
- 21 Ribeiro L.A.O. 2010. *Controle de Footrot (Podridão dos cascos)*. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 24p.
- 22 Ribeiro L.A.O. 1993. Avances en la prevención y control de foot-rot en Rio Grande del Sur. In: Pesce L., Bermúdez J., Bonino J., Rimbaud E. & Hirigoyen D. (Eds). *Enfermedades Podales de los Rumiantes*. Montevideo: Editorial Hemisferio Sur, pp.119-126.
- 23 Ribeiro L.A.O. 1981. The epidemiology of ovine Foot-rot. 126f. Sidney. Thesis (Master of Veterinary Science) - Faculty of Veterinary Science, The University of Sydney.
- 24 Rodrigues P.R.C., Ribeiro L.A.O., Chiminazzo C., Correa L.F.D., Lehueur C.M, Souza F.M., Gracia L.F.G. & Lopes G.F. 2010. Uso de vacina autógena monovalente (sorogrupo D) no controle do footrot em um rebanho ovino no estado do Rio Grande do Sul. *Veterinária em Foco*. 8: 31-45.
- 25 Stewart D.J. & Claxton P.D. 1993. Ovine footrot. Clinical diagnosis and bacteriology. In: Corner L.A. & Bagust T.J. (Eds). *Australian standard diagnostic techniques for animal diseases*. Melbourne: CSIRO, pp.1-27.

- 26 Thorley C.M. & Day S.E.J. 1986.** Serotyping survey of 1296 strains of *Bacteroides nodosus* isolated from sheep and cattle in Great Britain and Western Europe. In: Stewart D.J., Peterson J.E., Mckern N.M. & Emery D.L. (Eds). *Proceedings of a Workshop on Footrot in Ruminants*. Sydney: CSIRO, pp.135-142.
- 27 Wassink G.J., King E.M., Grogono-Thomas R., Brown J.C., Moore L.J. & Green L.E. 2010.** A within farm clinical trial to compare two treatments (parenteral antibacterials and hoof trimming) for sheep lame with footrot. *Preventive Veterinary Medicine*. 96(1-2): 93-103.
- 28 Zhou H. & Hickford J.G.H. 2000.** Extensive diversity in New Zealand *Dichelobacter nodosus* strains from infected sheep and goats. *Veterinary Microbiology*. 71(1-2): 113-123.

