



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

FERNANDA DORNELLES FEIJÓ

“SEGURANÇA E EFICÁCIA DA VACINA PBB-001 FRENTE AO *Dichelobacter nodosus* EM CONDIÇÕES DE CAMPO”

Trabalho de Conclusão do Curso de Zootecnia
Dom Pedrito

2012

F297s Feijó, Fernanda Dornelles

Segurança e eficácia da vacina PBB-001 frente ao *Dichelobacter nodosus* em condições de campo / Fernanda Dornelles Feijó ; orientadora Profa. Dra. Larissa Picada Brum. – Dom Pedrito : UNIPAMPA, Curso de Zootecnia, 2012.

1. Foot-rot 2. Vacina 3. Eficácia I. Título

CDD 636.3

FERNANDA DORNELLES FEIJÓ

“SEGURANÇA E EFICÁCIA DA VACINA PBB-001 FRENTE AO *Dichelobacter nodosus* EM CONDIÇÕES DE CAMPO”

Trabalho de Conclusão de Curso em Zootecnia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Dra. Larissa Picada Brum

**Dom Pedrito
2012**

FERNANDA DORNELLES FEIJÓ

“SEGURANÇA E EFICÁCIA DA VACINA PBB-001 FRENTE AO *Dichelobacter nodosus* EM CONDIÇÕES DE CAMPO”

Trabalho de Conclusão de Curso em Zootecnia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Área de Concentração: Ciências Agrárias

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 04 /07 /2012.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Larissa Picada Brum
Orientadora
Campus Dom Pedrito – UNIPAMPA

Prof. Dr. Fernando Zocche
Campus Dom Pedrito - UNIPAMPA

Dra. Anelise Afonso Martins
Campus Dom Pedrito - UNIPAMPA

AGRADECIMENTO

À Deus, em primeiro lugar por permitir que tudo isso fosse possível.

À professora Larissa, pela orientação, apoio, confiança, dedicação, paciência e constante incentivo durante a graduação.

Ao PhD Charles, por abrir as portas do Laboratório Hipra Saúde Animal para fazer parceria com a Universidade. Pela orientação, dedicação, confiança e estímulo.

À minha avó Suelly, que sempre esteve do meu lado torcendo por mim e pela minha vitória.

À minha mãe Carmem, pelo constante incentivo, apoio e confiança depositada durante toda a minha jornada.

Ao meu pai David, que onde estiver sei que esta torcendo por mim.

Aos colegas Guilherme Barbieri, Mozer Manetti e Willian Leal por terem me ajudado nesses 5 anos de graduação, fazendo quase que todos os trabalhos juntos, e principalmente por me aguentarem nas minhas “crises existenciais”.

Aos produtores rurais por entenderem a importância desta pesquisa disponibilizando a propriedade e os animais para as coletas.

Muito Obrigado!!

“Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma, em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados por uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer a nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata e, quando atingimos nossos objetivos ficamos surpresos com nossa própria capacidade.”

Autor desconhecido

RESUMO

A pododermatite ovina é uma doença altamente contagiosa de ovinos que resulta em laminites e significativas perdas na produção. A doença é causada por dois agentes patogênicos, a bactéria gram-negativa *Dichelobacter nodosus* e bactéria gram-negativa *Fusobacterium necroforum*. O desenvolvimento de vacinas que induzam altos títulos de anticorpos são importantes para o controle da doença. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a segurança e eficácia da vacina PBB-001 contra a pododermatite contagiosa dos ovinos (foot-rot), frente a condições de campo em uma região endêmica da doença. O experimento foi realizado entre os meses de maio a dezembro de 2011 em duas propriedades predefinidas no município de Dom Pedrito-RS. Foram utilizadas 140 fêmeas ovinas da raça Corriedale, com idade média de oito meses, divididas em dois grupos, sendo que um grupo recebeu solução salina (placebo), e o outro a vacina a ser testada. Cada grupo recebeu três doses de 2ml/animal, aos 0, 21 e 175 dias. Os títulos de anticorpos da análise sorológica frente ao *D. Nodosus* apresentaram diferenças significativas ($P < 0,001$) aos 60 dias e altamente significativas ($P < 0,0001$) aos 30 e 185 entre os grupos testados. Os resultados demonstraram que a ocorrência da doença nos animais vacinados foi de 2,85% frente à 17,14% nos animais não vacinados. Além disso a vacina demonstrou uma eficácia superior a 80% associado a ausência de reações locais ou gerais em todos os animais. Baseado nesses resultados a vacina PBB-001 apresenta-se como uma opção segura e eficaz para o controle e prevenção do foot-rot em ovinos.

Palavras-chave: Eficácia. Foot-rot. Ovinos. Segurança. Vacina.

ABSTRACT

Ovine footrot is a highly contagious disease of sheep that results in lameness and substantial production loss. The disease is caused for two pathogens, the primary pathogen is a gram-negative, anaerobic bacterium *Dichelobacter nodosus* and a second pathogen gram-negative anaerobic bacterium, *Fusobacterium necrophorum*. Vaccine developments to induce high antibodies titers are important for control of disease. The present work evaluated the safety and efficacy of the PBB-001 vaccine against the contagious ovine pododermatitis (footrot) under field conditions in a endemic region of the disease. The experiment was performed between May and December of 2011, in 2 properties located in Dom Pedrito-RS. For this experiment we used 140 female sheep, Corriedale breed, with an average age of 8 months, segregated in 2 groups where 1 group received PBS (placebo), and the other received the vaccine to be tested. Each group received 3 dosis of 2ml/animal, at days 0, 21 e 175. Antibody titers of the ELISA for *D. nodosus* presented significant difference ($P<0,001$) at 60 days and highly significant ($P<0,0001$) at 30 and 185 days, between the groups tested. Results showed that the disease occurrence in the vaccinated animals was 2,85% against 17,14% on the unvaccinated animals. In addition to that, PBB001 vaccine had over 80% efficacy and absence of local and general clinical signs in all animals. Together, these results show that PBB001 vaccine presents efficacy and safety needed for the control and prevention of the ovine foot-rot.

Key-words: Efficacy. Foot-rot. Safety. Sheep. Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Temperatura média mensal e índice pluviométrico de junho a dezembro de 2011.....	17
Figura 2 – Temperatura retal dos animais, durante a vacinação e revacinações.....	23
Figura 3 – Resposta sorológica frente ao <i>D. nodosus</i> no soro de ovinos.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cronograma das atividades do teste de campo da vacina PBB-001.....	19
Tabela 2 - Descrição dos parâmetros utilizados para a avaliação das reações locais e gerais em ovinos.....	20
Tabela 3 – Eficácia da vacina PBB-001 em ovinos	23

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Localização e históricos das propriedades	17
2.2 Animais	18
2.3 Coleta de sangue	18
2.4 Vacina	20
2.5 Monitoramento clínico e avaliação da eficácia da vacina	21
2.6 Análise estatística.....	22
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
REFERÊNCIAS	28
APÊNDICE	33

INTRODUÇÃO

A criação de ovinos e caprinos vem ganhando incremento nos últimos anos no Brasil. No Rio Grande do Sul após a queda na produção de ovinos, ocorrida no final da década de 80 até a década de 90, a ovinocultura vem demonstrando indícios de recuperação, possibilitada pelo aumento do poder aquisitivo da população e pelo abate de ovinos jovens para produção de carne (VIANA e SILVEIRA, 2009).

Essa nova condição está atrelada a intensificação da produção, melhorias nos índices produtivos e implantação de tecnologias para o desenvolvimento da produção. A competitividade depende de vários fatores que contribuem para o crescimento e qualidade da atividade, dentre esses, programas sanitários, que buscam prevenir e controlar enfermidades.

Dentre as enfermidades que afetam os ovinos podemos citar a pododermatite contagiosa ovina também conhecida como foot-rot. O foot-rot é uma enfermidade podal crônica e necrosante da epiderme interdigital e matriz do casco, que na sua forma virulenta leva a manqueira (RIBEIRO, 1998).

A ocorrência da doença é favorecida por condições climáticas como calor e umidade (RADOSTITS et al., 2007). Condições essas, encontradas na primavera, outono e verões chuvosos no estado do Rio Grande do Sul.

As principais perdas econômicas causadas pelas enfermidades do aparelho locomotor são atribuídas ao descarte prematuro dos animais afetados, diminuição de produtividade na forma de perda de peso e lã, redução da fertilidade, além de altos custos com mão de obra, tratamentos e em alguns casos até a morte, causada pela combinação de fome, sede e outras infecções sistêmicas que ocorrem em animais que permanecem imóveis por um período prolongado de tempo (BOKKO e CHAUDHARI, 2001; STEWART, 1989).

O foot-rot é uma doença passível de controle e prevenção e até mesmo de erradicação, quando aplicados programas sanitários bem estruturados, juntamente com condições climáticas conhecidas (ou favoráveis). Na Austrália, programas regionais de erradicação têm sido bem sucedidos, porém no Reino Unido a erradicação do foot-rot não é percebida como uma meta alcançável (ABBOTT e LEWIS, 2005).

Segundo Jopp et al. (1984), a Austrália e a Nova Zelândia possuem métodos de erradicação bem sucedidos, pois nessas regiões o período do ano que ocorrem as transmissões do foot-rot é conhecido, facilitando a identificação dos casos da doença. No Reino Unido o período de transmissão não é definido, e de acordo com Hosie (2004) a transmissão pode

ocorrer em qualquer época do ano, o que dificulta a identificação dos surtos da doença e consequentemente seu controle.

Em New South Wales, Austrália, um programa denominado "NSW - Footrot Strategic Plan" foi desenvolvido e implantado visando a erradicação do foot-rot virulento das fazendas. O programa baseou-se na utilização de uma combinação de tratamento, vacinação, abate e quarentena rigorosa dos animais infectados (BENNETT e HICKFORD, 2011). Após a implantação deste programa verificou-se uma queda significativa na proporção de rebanhos infectados, havendo queda de 15% para apenas 1% na prevalência de foot-rot no estado. O sucesso na erradicação do foot-rot foi atribuído a grande colaboração dos fazendeiros que aderiram ao programa (EGERTON et al., 2004; BENNETT e HICKFORD, 2011).

O foot-rot é causado pela associação sinérgica de duas bactérias: *Dichelobacter nodosus* e *Fusobacterium necrophorum*, sendo o último habitante natural do trato intestinal dos ovinos (AGUIAR et al., 2011).

O principal agente do foot-rot é o *Dichelobacter nodosus*, bacilo gram negativo anaeróbico e o *Fusobacterium necrophorum*, bacilo gram negativo, habitante natural do trato intestinal dos ovinos, presente no solo e nas fezes, que provoca uma dermatite interdigital permitindo a invasão do tecido córneo pelo do *D. nodosus* (WANI e SAMANTA 2006). O *D. nodosus* é uma bactéria obrigatória da epiderme interdigital de ruminantes com foot-rot que não permanece viável no solo por muito tempo e que possui proteases e queratinases capazes de dissolver o tecido córneo dos cascos dos ovinos ocasionando o foot-rot (BENNETT et al., 2009).

Existem dois sistemas de classificação de sorogrupos do *D. nodosus*, um sistema descrito na Austrália onde são classificados 10 sorogrupos (A ao I e o M) e identifica alguns sorotipos; totalizando 19 subtipos, enquanto o sistema descrito no Reino Unido classifica o microorganismo em 17 sorogrupos (A ao R sem o I). Alguns sorotipos do sistema Australiano, particularmente B₂, B₃ e B₄, são classificados como distintos sorogrupos no sistema utilizado no Reino Unido (GHIMIRE et al., 1998).

O *F. necrophorum* possui duas subespécies descritas, subespécie *necrophorum* (biótipo A) encontrado normalmente em animais e a subespécie *funduliforme* (biótipo B) encontrado em humanos (NAGARAJA et al., 2005). Ambas subespécies produzem leucotoxinas distintas utilizadas para diferenciá-las, sendo um dos principais fatores de virulência os quais conferem diferenças na patogenia de cepas encontradas em caprinos, ovinos e bovinos (ZHOU et al., 2009).

A pododermatite interdigital dos ovinos, foot-rot, exibe uma vasta gama de virulência e a doença tem sido classificada por alguns autores em virulenta, benigna e intermediária (STEWART et al., 1986; ABBOTT e EGERTON, 2003). A virulência de um surto específico é causada por uma população específica ou populações de *D. nodosus* que interagem com o hospedeiro e em condições favoráveis causam as infecções (BENNETT e HICKFORD, 2011). A pele interdigital normalmente é resistente à infecção bacteriana, tornando-se susceptível geralmente após uma exposição prolongada à condições de umidade e/ou chuva, levando a maceração, desvitalização e posterior colonização do casco (CROSS, 1978).

Myers et al. (2007) descreveram vários fatores de virulência para o *D. nodosus*, entre eles as fímbrias, proteases e proteínas de membrana. As fímbrias estão relacionados à ligação nas células epiteliais, a motilidade, a absorção de DNA extra-celular e a exportação de proteases para o espaço extra-celular. A secreção de proteases extra-celulares por *D. nodosus* é particularmente importante na sua biologia pois proteínas do meio extra-celular suprem a célula bacteriana de aminoácidos que não são sintetizados por ela. Já proteínas de membrana parecem ser altamente imunogênicas, modulando a resposta imune do hospedeiro.

Cepas benignas de *D. nodosus* causam inflamação da pele interdigital sem separação do tecido córneo, de modo que é impossível diferenciá-la clinicamente da dermatite interdigital causada exclusivamente por *F. necrophorum*. Os sinais clínicos do foot-rot benigna regridem espontaneamente na maioria dos animais afetados quando o ambiente torna-se seco (GREEN e GEORGE, 2008).

O foot-rot virulento é caracterizado clinicamente por separação do tecido do córneo e partes mais profundas do casco. As cepas virulentas produzem proteases que permitem a degradação do tecido do córneo do casco (BILLINGTON et al., 1996). No entanto, outros fatores, incluindo a resistência animal e condições ambientais, também são importantes na ocorrência de foot-rot benigna ou virulenta (ABBOTT e EGERTON, 2003).

A ação inflamatória e capacidade destrutiva do *D. nodosus* é pequena antes de alcançar a junção pele-casco, após atingir essa porção ele passa a exibir uma grande afinidade pelas células epidermais da matriz do casco associado à capacidade de produzir altos níveis de uma protease termoestável (EGERTON, 1969).

O diagnóstico clínico do foot-rot é realizado de acordo com as características da lesão, aparecimento de surtos associados às épocas úmidas e quentes do ano e pelo caráter crônico e recidivante da doença. O sinal clínico mais evidente da pododermatite contagiosa dos ovinos é a claudicação. Sinais clínicos da infecção variam desde uma suave vermelhidão

(inflamação) da pele interdigital até a completa separação do tecido córneo do casco (RIET-CORRÊA et al., 2001).

O controle da doença baseia-se em medidas de manejo como quarentena em animais recém adquiridos, separação de animais doentes e sadios, corte adequado de casco (casqueamento), utilização de tratamento tópico e parenteral dos animais gravemente afetados, bem como medidas preventivas como utilização de pédilúvio, vacinação, segregação de animais cronicamente afetados entre outras (RIET-CORRÊA et al., 2001).

O casqueamento é usado normalmente para promover uma boa conformação dos membros, bem como remover o tecido doente do casco (STEWART, 1989). No entanto, deve-se ter cuidado para que o corte não seja excessivo, o que poderá provocar uma porta de entrada ao *F. necrophorum* e ao *D. nodosus* predispondo ao aparecimento da doença (HOSIE, 2004).

A utilização de pédilúvio como medida preventiva é recomendada, sendo as substâncias mais utilizadas o sulfato de cobre e a formalina. Nas últimas décadas o sulfato de cobre vem sendo substituído pelo sulfato de zinco, pois em contato com fezes e urina perde seu poder bactericida. As soluções de formalina podem ser utilizadas em concentrações variáveis entre 2% a 10% sendo que em concentrações superiores pode causar lesões nos cascos dos ovinos. O sulfato de zinco normalmente é utilizado em concentrações de 10 a 15% (RIBEIRO, 1998).

Infecções naturais de foot-rot produzem uma resposta sorológica pequena nos títulos de anticorpos contra a doença, insuficiente para proteger os ovinos de reinfecções com amostras homólogas de *D. nodosus* (EGERTON e ROBERTS, 1971).

As vacinas contra *D. nodosus* têm se mostrado eficazes no tratamento e prevenção de foot-rot. No entanto, há diferenças significativas nos níveis de proteção proporcionado por diferentes vacinas, em alguns casos relacionados a competição antigênica entre variantes de *D. nodosus* quando múltiplos sorogrupos são utilizados na formulação (SCHWARTZKOFF et al., 1993).

A combinação de diversos sorotipos de *D. nodosus* em uma mesma vacina pode resultar em deficiência na resposta imune, quando comparada a vacinas monovalentes como relatado por Abbott e Lewis (2005).

A formulação de vacinas deve levar em conta os sorogrupos de *D. nodosus* prevalentes na região. Em estudos de prevalência realizados por Fialho e Ribeiro (1992) os principais sorogrupos encontrados no Rio Grande do Sul e Uruguai foram o A, B, D, E e F.

Segundo Lambell (1986) e Raadsma, et al. (1994) vacinas comerciais contendo 9 sorogrupos protegem ovinos por um curto período de tempo, em torno de 10 semanas. Enquanto vacinas monovalentes ou bivalentes protegem os animais por pelo menos 16 semanas (STEWART et al., 1986).

De acordo com estudos realizados por Hunt et al. (1994), a duração da proteção conferida pela vacina multivalente foi inferior a duração da proteção conferida pela vacina monovalente, sendo o tempo de proteção de 8 e 12 semanas respectivamente.

A vacinação é uma ferramenta importante em programas de controle, prevenção e erradicação do foot-rot. A utilização de vacinas monovalentes e bivalentes têm sido usada com sucesso em programas de controle de surtos e prevenção da doença em várias partes do mundo, incluindo o Nepal (EGERTON et al., 2002), Butão (GURUNG et al., 2006) e Austrália (DHUNGYEL et al., 2008).

Diferentes formulações de vacinas monovalentes e ou multivalentes contendo diferentes tipos de adjuvantes contra foot-rot foram testadas ao redor do mundo, conferindo distintos níveis de proteção (HUNT et al., 1995; GURUNG et al., 2006; SKERMAN et al., 1982)

A utilização de vacinas contra o foot-rot é um método barato e simples, quando comparado à utilização de tratamentos antibióticos em rebanhos de criação extensiva afetados (BENNETT e HICKFORD, 2011). No entanto, a grande variação de sorogrupos e os baixos títulos de anticorpos induzidos por algumas vacinas inativadas dificultam essa prática.

Segundo Bennett e Hickford (2011), esforços devem ser concentrados para o desenvolvimento de vacinas universais, com vários sorogrupos de *D. nodosus* e o desenvolvimento de novas formulações de vacinas que confirmam títulos de anticorpos, com mínimas reações adversas são requeridas no mercado. Neste o objetivo deste trabalho foi avaliar a segurança e eficácia conferido pela vacina PBB-001 em rebanhos endêmicos para foot-rot no município de Dom Pedrito.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas fazendas, denominadas 1 e 2, localizadas no interior do município de Dom Pedrito-RS. Os animais de ambas as propriedades pertenciam a raça de ovinos Corriedale. Em cada propriedade foram selecionadas 70 fêmeas entre 8 a 14

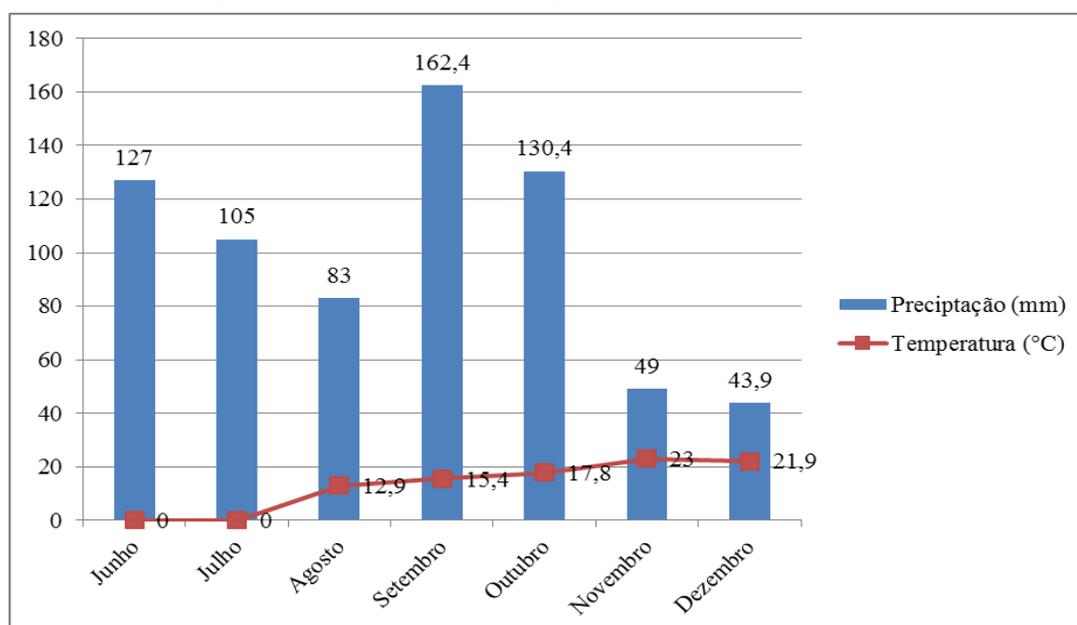
meses de idade. O período do experimento compreendeu os meses de junho a dezembro de 2011. Ambas as propriedades possuem histórico de casos clínicos de foot-rot.

2.1 Localização e históricos das propriedades

O município de Dom Pedrito localiza-se na região da Campanha Gaúcha, em uma altitude de 149 m acima do mar, latitude 30°55'28" e longitude 54°46'53". O clima é subtropical com temperaturas médias anuais de 16°C.

Na Figura 1 estão demonstradas as temperaturas médias e precipitação pluviométrica acumulada mensal ocorridas durante o período do experimento.

Figura 1 – Temperatura média mensal e índice pluviométrico de junho a dezembro de 2011;



Fonte: Estância Guatambu.

A propriedade 1 possuía 1100 ha, destinados a criação de ovinos e bovinos consorciados, totalizando 1550 animais, sendo 700 ovinos e 850 bovinos. Os animais eram mantidos em campo nativo, sendo a terminação dos cordeiros para abate realizada em pastagem cultivada de azevém. O manejo sanitário realizado na propriedade constituiu de vacina contra clostridiose no pré-parto das fêmeas e revacinação realizada em todas as categorias no momento da caudectomia, sendo todos os animais vermifugados a cada 40 dias.

A propriedade 2 possuía 800 ha, destinados a criação de em média 600 ovinos e 700 bovinos consorciados. Todos os animais eram mantidos em campo nativo.

2.2 Animais

Os 140 animais selecionados encontravam-se soronegativos frente ao *D. nodosus*, sem lesões de foot-rot na inspeção clínica, sendo identificados por brincos na orelha esquerda e divididos em dois grupos em ambas as propriedades, grupo 1 (G=1) animais vacinados com a vacina PBB-001 e grupo 2 (G=2) animais que receberam apenas solução salina (placebo).

2.3 Coleta de sangue

Foram realizadas coletas de sangue por meio da punção da veia jugular em todos os animais dos diferentes tratamentos, utilizando tubos vacutainer sem anti-coagulante, as coletas de sangue obedeceram o cronograma demonstrado na tabela 1. Após a coleta das amostras de sangue, estas foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pampa onde foram centrifugadas a 5000 rpm para separação do soro, o sobrenadante foi coletado e identificado em tubos tipo eppendorf, posteriormente armazenados a temperatura de -20°C até o processamento por ELISA (Ensaio Imuno Enzimático) para medida de anticorpos contra o *D. nodosus*.

Tabela 1 – Cronograma das atividades do teste de campo da vacina PBB-001.

Operações/ dias+ horas	-30	0-2 h	0	0+2 h	0+4 h	1	2	7	14	21-2 h	21	21+2 h	21+4 h	22	23	30	60	90	120	175	180	
Identificação dos animais	X	X																				
Avaliação Clínica		X		X	X	X	X			X		X	X	X	X							
Coleta e Avaliação Sorológica	X	X						X	X	X						X	X	X	X			X
Vacinação			X																			
Revacinação											X										X	

Fonte: Autor

2.4 Vacina

A vacina foi produzida pela empresa Hipra Saúde animal LTDA, sendo formulada com uso de adjuvante aquoso e diferentes sorotipos de *D. nodosus* (B,C,D,E,F,G e H). A vacina foi formulada contendo uma concentração fixa de antígeno de cada um dos sorotipos de *Dichelobacter nodosus*.

A segurança da vacina foi avaliada utilizando-se parâmetros relacionados às reações locais (inchaço, inflamação no local de aplicação, claudicação) ou gerais (temperatura e comportamento, perda de peso). Conforme descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos parâmetros utilizados para a avaliação das reações locais e gerais em ovinos

	<p><u>Peso: 50 a 70 Kg</u></p> <p><u>Temperatura retal:</u> nenhum animal deve ter aumento > 2°C e a média de aumento de temperatura dos animais tratados não deve ser > 1,5°C da média de aumento dos animais controle.</p> <hr/> <p><u>Comportamento:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Normal: sem alterações no comportamento. • Apático: animal tem reações lentas e relativa indiferença a estímulos normais. • Alerta: responde normalmente a estímulos externos, como som e movimento. • Excitado: ansiedade ou apreensão na forma moderada (animal alerta com normalidade de movimentos) podendo progredir para manifestações de dor e desconforto até graus extremos de excitação (mania e frenesi). <hr/> <p><u>Ingestão de Alimentos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Normal (alimenta-se normalmente). • Pouco apetite (não procura o alimento). • Não se alimenta. <hr/> <p>Clínicos</p> <p><u>Fezes:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Consistência normal (formato de sibilas). • Consistência líquida (diarréia). • Consistência endurecida (tenesmo). <hr/> <p><u>Reação inflamatória local:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 0: sem presença de inchaço no local da aplicação. • 1: Edema leve no local de aplicação (< 1cm). • 2: Edema leve a moderado no local de aplicação (entre 1 e 3 cm). • 3: Edema grave no local <hr/> <p><u>Presença de claudicação:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 0: sem claudicação • 1: leve claudicação. • 2: claudicação moderada • 3: claudicação intensa (não apóia o pé no chão) <hr/> <p><u>Avaliação das lesões macroscópicas típicas do Foot-rot:</u></p>
--	---

- 0: Não há evidência de inflamação
- 1: Leve dermatite interdigital (pele congestiva, tumefeita e úmida). Não há separação entre a pele e o casco, nem afecção deste.
- 2: Dermatite interdigital com supuração na borda coronária do casco. Pode haver ligeira separação da pele e casco (< 5mm).
- 3: Dermatite interdigital severa que se estende afetando o tecido branco do talão e a sola do casco. A separação da pele e casco pode ser superior a 5mm.
- 4. Dermatite interdigital muito severa que se estende afetando o tecido córneo de toda a parede do casco. Pode haver desprendimento do casco que se inicia no talão e se estende até a sola e ponta do casco. Abaixo do mesmo pode-se observar pus necrótico-caseoso de odor desagradável.

Sorológicos Pesquisa de anticorpos contra *D. nodosus*, através de ELISA, no soro de cada ovino.

Fonte: EGERTON et al., 1971

Os animais foram vacinados com 2 ml da vacina PBB-001 (G=1) administrada por via subcutânea no antebraço de cada animal e o grupo G= 2 recebeu 2 ml de uma solução salina (Placebo) no mesmo local. A vacinação foi realizada de acordo com o cronograma da Tabela 1.

2.5 Monitoramento clínico e avaliação da eficácia da vacina

A eficácia da vacina PBB-001 foi avaliada baseada em dois parâmetros:

- a) Proteção frente aos sinais clínicos do foot-rot: Para a avaliação deste, foram utilizados os índices da Tabela 2, onde escore 2 de claudicação e 2 de lesão macroscópica, é considerado positivo para a enfermidade.
- b) Presença de anticorpos específicos da classe IgG frente ao *D. nodosus*: A presença de anticorpos específicos frente ao *D. nodosus* foi medida através do teste sorológico Ensaio Imuno Enzimático (ELISA). Para realização do ELISA, placas polysorb foram sensibilizadas com concentrados iguais dos diferentes sorotipos de *D. nodosus* inativados. O protocolo do ELISA segue o que foi utilizado por Bishop et al. (1982) e Prieto et al. (2003), com algumas adaptações. Para a sensibilização das placas, foi utilizado 0,001 OD₆₅₀ (Densidade Óptica) de cada um dos sorotipos de *D. nodosus*. Após incubação com os soros dos ovinos e com o anticorpo secundário anti-IgG HRP (Peroxidase), as placas foram incubadas com substrato ABTS (Substrato Líquido Grau Ultra Puro) e lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405nm. Os resultados dos títulos dos soros testados basearam-se nos valores de densidade óptica dos controles positivo e negativo.

O monitoramento clínico de reações adversas à vacina foi realizado por meio da avaliação da temperatura retal, comportamento dos animais, ingestão de alimentos, consistência das fezes, reação inflamatória local, presença de claudicação e avaliação das lesões (Tabela 1 e Tabela 2).

O grau de proteção/eficácia da vacina foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\frac{(\% \text{ de ovelhas afetadas não vacinadas} - \% \text{ de ovelhas afetadas vacinadas}) \times 100}{\% \text{ de ovelhas afetadas não vacinadas}}$$

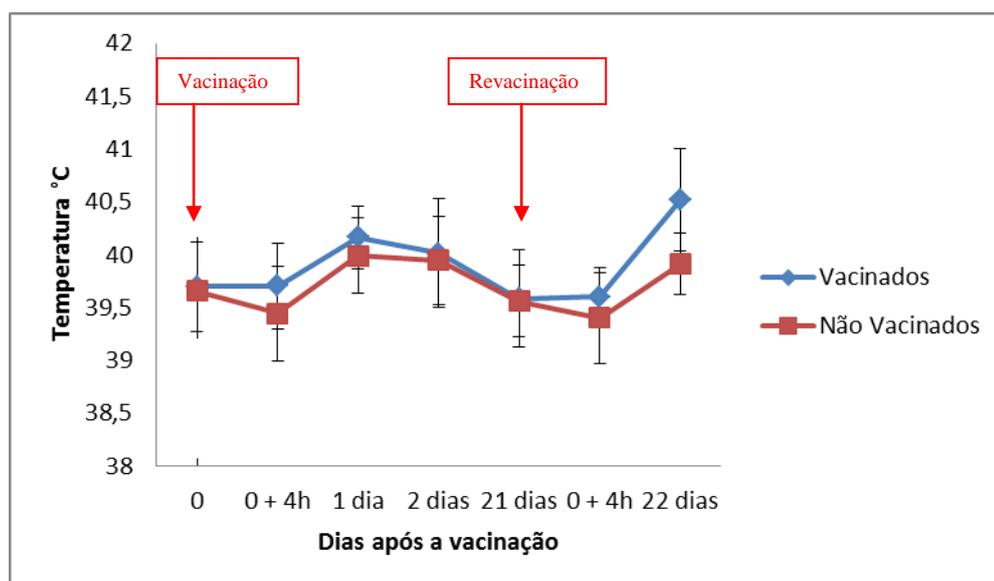
2.6 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa Graph Pad Prism 5.0 sendo consideradas significativas as diferenças onde $P < 0,001$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à segurança da vacina PBB-01, demonstraram que não houve reações adversas locais e/ou gerais após a administração da vacina no dia 0, 21 e 175, não sendo observadas lesões locais, como inchaço, nódulos ou abscessos. Na avaliação geral dos animais não se observou alterações clínicas ou comportamentais durante o experimento. Quanto à temperatura dos animais não foi observado aumento considerável de temperatura retal relacionada às doses vacinais, conforme demonstra a Figura 2. Estes resultados demonstram a segurança da vacina PBB-001 para a utilização em ovinos.

Figura 2 – Temperatura retal dos animais, durante a vacinação e revacinações.



Fonte: Autor

A eficácia da vacina PBB-001 foi avaliada conforme os parâmetros citados na Tabela 3. O teste clínico da vacina constituiu-se na observação de sinais clínicos nos animais do grupo vacinado e não vacinado, no período experimental.

Tabela 3 – Eficácia da vacina PBB-001 em ovinos.

Grupo	Nº de animais afetados/total	Percentagem do total	Grau de proteção/eficácia
Vacinados	2/70	2,85	83,3
Não Vacinados	12/70	17,14	

Fonte: Autor

Foram observadas lesões clínicas compatíveis com foot-rot em 2,85% dos animais vacinados e 17,14% dos não vacinados (dados referentes a propriedade 2). Ressalta-se que a prevalência média de animais doentes em propriedades provenientes de área endêmica pode variar consideravelmente e esta diretamente relacionada a períodos com umidade elevada e temperaturas amenas. A ocorrência de foot-rot nos animais durante o período experimental foi considerada relativamente baixa e atribuída às precipitações pluviométricas registradas depois do período de setembro a outubro, sendo que os casos clínicos foram observados após um período em que houve um registro maior de chuvas e temperaturas médias de 19°C, fator este

determinante para a sobrevivência do *D. nodosus* no solo e predisponente para o aparecimento de casos clínicos da doença (Figura 1).

Segundo Ribeiro 1978, a ocorrência de foot-rot no Rio Grande do Sul é no outono e primavera, quando as condições de umidade favorecem a transmissão da doença. Precipitações consistentes durante várias semanas, bem como temperaturas superiores a 10,8°C parecem ser necessárias para transmissão de foot-rot e ocorrência de surtos como descrito por Graham e Egerton (1968).

Aguiar et al. (2011), estudando a prevalência de foot-rot na região semi-árida do Nordeste brasileiro, em fazendas com fatores predisponentes à ocorrência da infecção, encontraram uma média de 19,41% de animais com enfermidade de cascos, sendo que 12,1% atribuídas a lesões de foot-rot.

O resultado de eficácia obtido pelo teste da vacina PBB-001 foi de 83,3%, superior ao valor descrito pelas autoridades australianas que estabelecem uma eficácia mínima de 70% para vacinas contra foot-rot (STEWART et al., 1985). Os dados referentes à eficácia da vacina encontram-se na Tabela 3, e são baseados na ocorrência da enfermidade dos grupos vacinado e não vacinado.

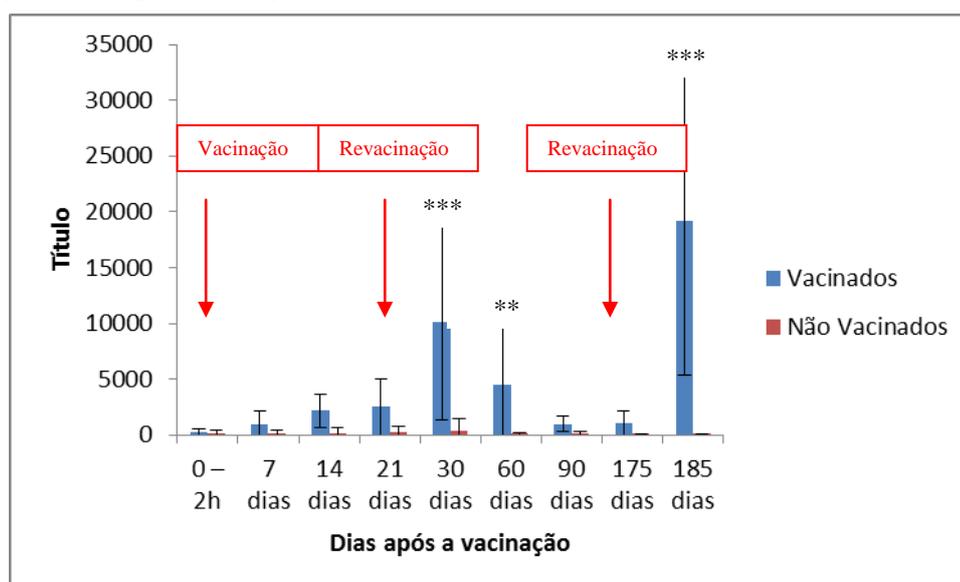
Vacinas autógenas e/ou multivalentes contra o *D. nodosus* são utilizadas para controle da doença em rebanhos. No Butão, Gurung et al. (2006), demonstraram uma acentuada diminuição de casos clínicos em rebanhos apenas vacinados, mesmo sem a utilização de práticas preventivas contra foot-rot. Apesar da curta proteção atribuída à vacinas multivalentes, quando estas são administradas frequentemente de acordo com os períodos de transmissão, pode-se obter o controle da doença, com ou sem a implantação de medidas preventivas. O controle e prevenção da doença em determinadas situações também pode ser alcançada com a utilização de vacinas autógenas ou monovalentes específicas (EGERTON 2000; ABBOTT e LEWIS, 2005). Rodrigues (2010), estudando a eficácia de uma vacina monovalente comparada a uma vacina polivalente, encontrou alta eficácia nas duas vacinas, porém a vacina monovalente induziu maiores títulos de anticorpos atribuídos a menor competição antigênica.

Os resultados do ELISA foram submetidos a análises estatísticas e demonstraram uma diferença significativa ($P < 0,0001$) entre os títulos sorológicos dos grupos não vacinados e vacinados.

Os títulos de anticorpos encontrados depois da vacinação tiveram um aumento progressivo até os 21 dias, momento da revacinação. Aos 60 dias, ou seja, em torno de 30 dias após a segunda dose o título de anticorpos apresentou média significativa em relação aos

grupos não vacinado ($P < 0,001$), onde 95% dos animais apresentaram títulos superiores a 1:3200, dez dias após a 1ª revacinação e dez dias após a 2ª revacinação (dias 30 e 180) os títulos de anticorpos apresentaram resultados altamente significativos ($P < 0,0001$), com títulos superiores a 1:6000, com animais atingindo 1:50.000, conforme demonstrado na Figura 3.

Figura 3 – Resposta sorológica frente ao *D. nodosus* em soro de ovinos



*** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$.

Fonte: Autor

Os títulos de anticorpos contra *D. nodosus* diferem em vacinas monovalentes e multivalentes. Vacinas multivalentes conferem um menor título de anticorpos em comparação a vacinas monovalentes e/ou autógenas, necessitando muitas vezes revacinações frequentes para a proteção eficaz de rebanhos, principalmente aqueles com fatores predisponentes ao aparecimento de foot-rot. O aumento de títulos de anticorpos após revacinações é esperado em vacinas inativadas contra foot-rot. Sendo preconizadas revacinações frequentes em zonas endêmicas, principalmente em períodos predisponentes a transmissão. Resultado semelhante também foi encontrado por Skerman et al. (1982), Gurung et al. (2006) e Rodrigues (2010), quando observaram aumento significativo dos títulos de anticorpos após a revacinação. Segundo Egerton et al. (1989), animais com títulos de anticorpos acima de 1:3000 estão protegidos contra a enfermidade.

A infecção natural pelo *D. nodosus* confere um aumento de títulos de anticorpos pouco duradouros evidenciando-se um aumento significativo de anticorpos entre a 3ª e 4ª semana pós infecção caindo progressivamente até das 12ª semana, semelhante aos níveis de anticorpos induzidos por vacinas inativadas contra o *D. nodosus* (WHITTINGTON, 1996).

De acordo com Egerton (1971), após o 1º contato de um rebanho com doença, há um aumento nos títulos de anticorpos, porém esses títulos são baixos e passageiros, não sendo suficientes para prevenir infecções posteriores.

Após a primeira vacinação alguns ovinos demonstraram melhora clínica, porém após a revacinação espera-se que cerca de 55-100% dos animais respondam positivamente a vacinação (LIARDET et al., 1989 e SCHWARTZKOFF et al., 1993).

A adição de adjuvantes em vacinas pode induzir uma resposta imunológica mais efetiva, com maiores títulos de anticorpo por um período de proteção pós-vacinal mais prolongado e com menor quantidade de antígenos, principalmente em vacinas inativadas podendo assim diminuir os custos na produção de vacinas (SILVA et al., 2004 e RESENDE et al., 2004). Em muitas vacinas veterinárias são utilizadas substâncias adjuvantes como hidróxido de alumínio, saponina, avridine, entre outros, que conseguem amplificar a resposta inflamatória inicial induzida pela vacinação e aumentar a resposta imune a antígenos específicos (PRETO et al., 1991). Os sais de alumínio têm um longo registro de segurança, apesar de causarem algumas reações locais, como nódulos, granulomas, eritemas e entre outras reações (CLEMENTS e GRIFFITHS, 2002).

No Reino Unido as vacinas disponíveis contra foot-rot eram compostas por adjuvantes oleosos. Segundo Lambell (1986) este tipo de adjuvante provoca reações locais, com edemas de até 4 cm de diâmetro. No entanto, os adjuvantes oleosos possuem a propriedade de reter os antígenos no sítio de inoculação, estimulando uma melhor resposta humoral (PRESTES, 2008). Em estudos realizados por Egerton e Thorley (1981) comparando duas vacinas de foot-rot, com diferentes adjuvantes, encontraram que a vacina com adjuvante oleoso protegeu os animais por oito semanas, enquanto que a vacina com adjuvante a base de sulfato de alumínio e potássio, manteve a proteção por apenas quatro semanas.

Para o teste da vacina PBB-001 foi utilizado adjuvante aquoso, que demonstrou segurança pela ausência de reações locais e gerais e eficácia superior a 80% conferindo também altos níveis de anticorpos nos animais testados.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi demonstrado que a vacina PBB-001 não apresentou sinais clínicos e reações locais ou gerais nos animais testados, além de promover altos níveis de anticorpos contra *D. nodosus*.

Os níveis de eficácia da vacina PBB-001 foram satisfatórios quando avaliou-se o nível de proteção contra o foot-rot em animais vacinados e não vacinados, apresentando-se dessa forma como uma promissora opção no controle e prevenção do foot-rot em ovinos.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, K.A; EGERTON J.R. **Effect of climatic region on the clinical expression of foot rot of lesser clinical severity (intermediate foot rot) in sheep.** Australian Veterinary Journal. v 81(12), p 756-762, 2003.
- ABBOTT, K.A; LEWIS, C.J. **Current approaches to the management of ovine footrot.** The Veterinary Journal. v. 169, p. 28-41, 2005.
- AGUIAR, G.M.N; SIMÕES, S.V.D; SILVA, T.R; ASSIS, A.C.O; MEDEIROS, J.M.A; JÚNIOR, F.G; RIET-CORREA, F. **Foot rot and other foot diseases of goat and sheep in the semiarid region of northeastern Brazil.** Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 31(10) p. 879-884, 2011.
- BENNETT, G.N; HICKFORD, J.G.H. **Ovine footrot: New approaches to an old disease.** Veterinary Microbiology. v. 148, p. 1-7, 2011.
- BENNETT, G; HICKFORD, J; SEDCOLE, R; ZHOU, H. ***Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* and the epidemiology of footrot.** Veterinary anaerobes and diseases. v.15, 173–176, 2009.
- BILLINGTON S.J., JOHNSTON J.L; ROOD J.I. **Virulence regions and virulence factors of the ovine foot rot pathogen, *Dichelobacter nodosus*.** FEMS Microbiology Letters. v. 145, p. 147-156, 1996.
- BISHOP, B. B. S; SCHURI, G. G; TROUTT, H. F. **Enzyme-linked immunodorbent assay for measurement of anto-*Moraxella bovis* antibodies.** American Journal Veterinary Research, v. 43, n 8, 1982.
- BOKKO, B.P. e CHAUDHARI, S.U.R. **Prevalence of Lameness in Sheep in the North East Region of Nigéria.** International Journal of Agriculture and Biology. v. 3, n. 4, p.519-521, 2001.
- CLEMENTS, C. J; GRIFFTHS, E. **The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants.** Vaccine. v 20, p.24-33. 2002.
- CROSS, R.F. **Influence of environmental factors on transmission of ovine contagious foot rot.** Journal of the American Veterinary Medical Association. v. 173, p.1567–1568, 1978.
- DHUNGYEL, O.P; LEHMANN, D.R; WHITTINGTON, R.J. **Pilot trials in Australia on eradication of footrot by flock specific vaccination.** Veterinary Microbiology. v. 132, p. 364–371, 2008.
- EGERTON, J. R. **Foot-rot and other foot conditions.** In: Martin, I.D., Aitkem, I.D. (Eds), Diseases of sheep, third ed. Blackwell Science, London, 2000.
- EGERTON, J. R; GHIMIRE, S. C; DHUNGYEL, O. P; SHRESTHA, H. K; JOSHI, H. D; JOSHI, B. R; ABBOTT, K. A; KRISTO, C. **Eradication of virulent footrot from sheepe**

and goats in an endemic area of Nepal and an evaluation of specific vaccination. Veterinary Record. v. 151, p. 190-195, 2002.

EGERTON, J. R.; ROBERTS, D.S; PARSANSON, I.M. **The aetiology and pathogenesis of ovine foot-rot.** I. A histological study of the bacterial invasion. Journal of Comparative Pathology. v. 79, p. 207-216, 1969.

EGERTON, J R; ROBERTS, D S. **Vaccination against ovine foot-rot.** Journal of comparative pathology. v, 81, p 179-185, 1971.

EGERTON, J.R., SEAMAN, J.T., WALKER, R.I. **Eradication of virulent footrot from New South Wales.** In: Proceedings of the 13th International Symposium and 5th Conference on Lameness in Ruminants. Maribor, Slovenija, 11–15th February, p. 215–221, 2004.

EGERTON, J.R.; THORLEY, C. M. **Effect of alum-precipitated or oil-adjuvant Bacteroides nodosus vaccines on the resistance of sheep to experimental foot- rot.** Research en veterinary Science. v. 30, p. 28-31, 1981.

EGERTON, J.R., YOUNG, W.R., RIFFKIN, G.G., **Footrot and foot abscess of ruminants.** CRC Press, Florida, USA. 262p.,1989.

ESTÂNCIA GUATAMBU, Temperaturas médias e precipitação pluviométrica. Acessado em 06 de junho de 2012. Disponível em: <<http://www.estanciaguatambu.com.br>>

FIALHO, M; RIBEIRO, L.A.O. **Experiencia a campo con vacuna contra foot rote n ovinos en Uruguay. Enfermedades podales de los ruminantes,** 1 ed, Montevideo, Editorial Hemisferio Sur, p. 127-138, 1992.

GHIMIRE, S.C; EGERTON, J. R; DHUNGYEL, O.P; JOSHI, H.D. **Identification and characterization of sorogroup M among Neplase isolates of *Dichelobacter nodosus*, the transmitting agent of foot rot in small ruminants.** Veterinary Microbiology. v.62, p 217-233, 1998.

GRAHAM, N.P.H., EGERTON, J.R. **Pathogenesis of ovine foot-rot: the role of some environmental factors.** Australian Veterinary Journal. v. 44, p. 235–240, 1968.

GREEN, L. E. E GEORGE, T.R.N. **Assessment of current knowledge of foot rot in sheep with particular reference to *Dichelobacter nodosus* and implications for elimination or control strategies for sheep in Great Britain.** Veterinary Journal. v. 175, p. 173-180, 2008.

GURUNG, R.B, DHUNGYEL, O.P; TSHERING, P; EGERTON, J. R. **The use of an autogenous *Dichelobacter nodosus* vaccine to eliminate clinical signs of virulent footrot in a sheep flock in Bhutan.** The Veterinary Journal. v. 172, p. 356–363, 2006.

HOSIE, B. **Footrot and lameness in sheep.** The Veterinary Record. v. 154, p. 37–38, 2004.

HUNT, J. D; JACKSON, D. C; BROWN, L. E; WOOD, P. R; STEWART, D. J. **Antigenic competition in a multivalent foot rot vaccine.** Vaccine. v.12(5), p 457-464, 1994.

HUNT, J. D; JACKSON, D. C; WOOD, P. R; STEWART, D. J; BROWN, L. E. **Immunological parameters associated with antigenic competition in a multivalent footrot vaccine.** *Vaccine*. v. 13(17), p 1649-1657, 1995.

JOPP, A.J., JACKSON, R., MULVANEY, C.J. **A perspective on ovine footrot control.** *New Zealand Veterinary Journal*. v. 32, p. 211–212, 1984.

LAMBELL, R.G. **A field trial with a commercial vaccine against footrot in sheep.** *Australian Veterinary Journal*. v.63, p.415–418, 1986.

LIARDET, D.M., CHETWIN, D.H., MCNERNEY, D.M., HINDMARSH, F.H. **Reduction of the prevalence of footrot on New Zealand farms by vaccination.** *Veterinary Journal*. v. 37, p. 129–130, 1989.

MYERS, G.S; PARKER, D; AL-HASANI, K; KENNAN, R.M; SEEMANN, T; REN, Q; BADGER, J.H; SELENGUT, J.D; DEBOY, R.T; TETTELIN, H; BOYCE, J.D; MCCARL, V.P; HAN, X; NELSON, W.C; MADUPU, R; MOHAMOUD, Y; HOLLEY, T; FEDOROVA, N; KHOURI, H; BOTTOMLEY, S.P; WHITTINGTON, R.J; ADLER, B; SONGER, J.G; ROOD, J.I; PAULSEN, I.T. **Genome sequence and identification of candidate vaccine antigens from the animal pathogen *Dichelobacter nodosus*.** *Nature Biotechnology*. v. 25, p. 569–575, 2007.

NAGARAJA, T. G; NARAYANAN, S. K; STEWART, G. C; CHENGAPPA, M. M. **Fusobacterium necrophorum infections in animals: Pathogenesis and pathogenic mechanisms.** *Veterinary anaerobes and diseases*. v.11, p.239–246, 2005.

PRESTES, A. F. R. O. **Avaliação de adjuvantes em novas formulações de vacina tríplice bacteriana.** Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo - Instituto Butantan. São Paulo: 2008.

PRETO, A.A; FERNANDES, M.J; HAYASHI, Y; GERMANO, P.M.L; BURER, S.P. **Preparação da vacina anti-rábica PV/BHK em emulsão oleosa e avaliação do poder imunogênico em bovinos.** *Arquive Biology Technology*. v.34, p.609-616, 1991.

PRIETO, C. I; RODRIGUEZ, M. E; BOSCH, A; CHIRDO, F. G; YANTORNO, O. M. **Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for cell-bound *Moraxella bovis* pili.** *Veterinary Microbiology*. v. 91, p.157-168, 2003.

RAADSMA, H.W; O'MEARA, T.J; EGERTON, J.R; LEHRBACH, P.R; SCHWARTZKOFF, C.L. **Protective antibody titres and antigenic competition in multivalent *Dichelobacter nodosus* fimbrial vaccines using characterised rDNA antigens.** *Veterinary Immunology Immunopathology*. v.40(3), p.253–274, 1994.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W; CONSTABLE, P.D. *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10.ed, p.1079-1086, 2007.

RESENDE, F. C. B; PASSOLD, J; FERREIRA, S. I. A. C; ZANETTI, C. R; LIMA, H. C. **Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais.** *Revista Brasileira Alergia e Imunopatologia*. v. 27, n. 3, 2004.

RIBEIRO, L. A. O. Foot-rot dos ovinos no estado do Rio Grande do Sul. I. Epidemiologia. Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finador. V.3, p 67-70,1978.

RIBEIRO, L.A.O. **Footrot dos ovinos.** p. 203-210. In. RIET-CORREA, F; SCHILD, A.L; MENDEZ, M.D.C. Doenças de ruminantes e equinos. Ed. Universitário, 1998.

RIET-CORREA, F; SCHILD, A.L; MENDEZ, M.C; LEMOS, R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Equinos.** 2 ed. São Paulo: Varela, 998 p., 2001.

RODRIGUES, P. R. C. **Controle do foot-rot em rebanho ovino no estado do Rio Grande do Sul: Uso de vacina autógena e resposta sorológica.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Veterinária – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Porto Alegre, 2010.

SCHWARTZKOFF, C.L; EGERTON, J.R; STEWART, D.J; LEHRBACH, P.R; ELLEMAN, T.C; HOYNE, P.A. **The effects of antigenic competition on the efficacy of multivalent footrot vaccines.** Australian Veterinary Journal. v. 70, p. 123–126, 1993.

SILVA, L. C; TAKIUCHI, E; MÉDICI, K. C; ALFIERI, A. F; ALFIERI, A. A. **Avaliação da capacidade adjuvante do cloreto de dimetildioctadecilamônio associado ao hidróxido de alumínio na indução da resposta imune humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarréia viral bovina.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. v.41, p.201-206, 2004.

SKERMAN, T.M; ERASMUSON, S. K; MORRISON, L. M. **Duration of resistance to experimental footrot infection in Romney and Merino sheep vaccinated with *Bacteroides nodosum* oil adjuvant vaccine.** New Zealand Veterinary Journal. v.30, p.27-31, 1982.

STEWART, D.J; CLARK, B.L; PETERSON, J.E; EMERY, D.L; SMITH, E.F; GRIFFITHS, D.A; O'DONNELL, I.J. **The protection given by pilus and whole cell vaccines of *Bacteroides nodosus* strain 198 against ovine foot-rot induced by strains of different serogroups.** Australian Veterinary Journal. v.62(5), p. 153-159, 1985.

STEWART, D.J; CLARK, B.L; EMERY, D.L; PETERSON, J.E; JARRETT, R.G; O'DONNELL, I.J. **Crossprotection from *Bacteroides nodosus* vaccines and the interaction of pili and adjuvants.** Australian Veterinary Journal. v. 63, p.101–106, 1986.

STEWART, D.J. **Footrot of sheep.** In: Egerton, J.R., Yong, W.K., Riffkin, G.G. (Eds.), Footrot and Foot Abscess of Ruminants. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, p. 5–45., 1989.

VIANA, J.G.A. e SILVEIRA V.C.P. **Análise econômica da ovinocultura: estudo de caso na Metade Sul do Rio Grande do Sul, Brasil.** Ciência Rural. v. 39(4), p.1176-1181, 2009.

WANI, S.A. e SAMANTA I. **Current understanding of the aetiology and laboratory diagnosis of foot rot.** Veterinary Journal. v. 171, p. 421-428, 2006.

WHITTINGTON, R. J. **Further observations on the primary and anamnestic humoral responses to *Dichelobacter nosodus* in sheep in relation to the diagnosis of footrot.** Research in Veterinary Science. v. 60, p. 120-133, 1996.

ZHOU, H; BENNETT, G; HICKFORD, J. G. H. **Variation in *Fusobacterium necrophorum* strains present on the hooves of footrot infected sheep, goats and cattle.** *Veterinary Microbiology*. v.135, p. 363–367, 2009.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Lesões de casco

