

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ISOLADAS DE LESÕES PERIDENTÁRIAS DA "CARA INCHADA" DOS BOVINOS¹

RITA M. BOTTEON², IVERALDO S. DUTRA³, JÜRGEN DÖBEREINER⁴ e HANS BLOBEL⁵

ABSTRACT.- Botteon R.M., Dutra I.S., Döbereiner J. & Blobel H. 1993. [Characterization of anaerobic bacteria isolated from periodontal "cara inchada"-lesions of cattle.] Caracterização de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(3/4):51-55. Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970, Brazil.

Anaerobic, non-sporulating, Gram negative bacteria were isolated from periodontal "cara inchada"-lesions and characterized. The capacity of fermentation and hydrolysis of different substrates by 52 isolates was studied by means of the API 20 A - System. Fifteen isolates which formed black pigmented or brown non-fermenting colonies, were classified as *Bacteroides asaccharolyticus* according to their growth pattern in CDC culture medium and their morphologic staining properties, as well as to their biochemical and physiologic profile. Twenty-three isolates which showed the same colonial characteristics, but were non-fermentative, were classified as *Bacteroides* spp. Based on these results, 8 other cultures were indentified as non-pigmented *Bacteroides* spp. and 6 isolates as *Fusobacterium nucleatum*. In addition, 68 strains of the 4 groups of bacteria isolated were studied regarding their growth in BGA (*Bacteroides gingivalis* agar) and the formation of a fluorescent pigment. No correlation between the growth on BGA and the fluorescence of the brown or black-pigmented cultures was found. Furthermore, although the API 20 A - System allowed an extensive characterization of the isolates, it could not be sufficient for definite taxonomic purposes.

INDEX TERMS: Periodontitis, "cara inchada", bovines, anaerobic bacteria, *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides* spp., *Fusobacterium nucleatum*.

SINOPSE.- Foram caracterizadas amostras de bactérias anaeróbias não esporuladas Gram negativas isoladas de quatro bezerros com periodontite ("cara inchada"). A capacidade de fermentação ou hidrólise de diferentes substâncias de 52 amostras foi verificada pelo Sistema API 20 A. De acordo com o crescimento em meio de cultivo CDC, das características morfotintórias e do perfil bioquímico e fisiológico, 15 amostras formadoras de colônias pigmentadas de negro ou marrom não fermentativas foram classificadas como *Bacteroides asaccharolyticus* e 23, com as mesmas características das colônias, no entanto fermentativas, como *Bacteroides* spp. Com base nos resultados, foram ainda caracterizadas 8 amostras como *Bacteroides* spp, não pigmentadas e 6 como *Fusobacterium nucleatum*. Adicionalmente, outras 68 amostras de bactérias pertencentes aos 4 grupos isolados, foram

estudadas quanto à capacidade de crescimento em meio de cultura seletivo BGA (*Bacteroides gingivalis* agar) e de formação de pigmento fluorescente, perfazendo-se assim 120 amostras. Não foram observadas correlações entre o crescimento em BGA e a fluorescência das amostras pigmentadas de marrom ou negro. Além disso, ainda que o Sistema API 20 A tenha permitido uma caracterização extensa das amostras isoladas, este não podia ser eficaz para fins taxonômicos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Periodontite, "cara inchada", bovinos, bactérias anaeróbias, *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides* spp., *Fusobacterium nucleatum*.

INTRODUÇÃO

A "cara inchada" dos bovinos (CI) é uma periodontite que acomete animais na idade de erupção dos dentes, quando mantidos em determinadas áreas de pastagem. A doença está relacionada com a formação de pastos em solos virgens (Döbereiner et al. 1990) e com a renovação dos mesmos (Dutra et al. 1993). Nos primeiros anos de ocorrência a doença pode incidir em grande número de animais, tendendo a diminuir naturalmente com o decorrer dos anos. Clinicamente a doença caracteriza-se por alterações peridentárias geralmente com início entre o se-

¹ Aceito para publicação em 8 de dezembro de 1992.

Este trabalho é parte da tese de Mestrado do primeiro autor, jul 6 à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

² Pós-graduação em Microbiologia Veterinária, UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970.

³ Depto Medicina Veterinária, Unesp-Campus de Araçatuba, São Paulo, R. José Bonifácio 1193, Araçatuba, SP 16015-050; bolsista CNPq (305967/85-1).

⁴ Proj. Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970; bolsista CNPq (305294/88-1).

⁵ Institut f. Bakteriologie u. Immunologie, Justus Liebig-Universität, Frankfurter Str. 107, D-6300 Giessen, República Federal da Alemanha.

gundo e o terceiro dentes premolares decíduos maxilares, com formação de pequenas bolsas na gengiva marginal, resultando em periodontite purulenta. Casos avançados caracterizam-se por mau estado nutricional, ocorrendo freqüentemente a morte por inanição (Döbereiner et al. 1974).

A presença de microrganismos anaeróbios não esporulados nas lesões peridentárias da doença (Blobel et al. 1984), a constatação de que os mesmos produzem substâncias com potencial para destruição tissular (Dutra et al. 1986), e os aspectos patológicos e epidemiológicos da CI indicam o envolvimento primário de bactérias no processo (Döbereiner 1990). Assim, este trabalho objetiva a caracterização de microrganismos anaeróbios isolados de lesões peridentárias da CI, considerando-se os seus aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados no experimento

Foram utilizados 4 bezerros mestiços nelore e guzerá de 3 meses a 1 ano de idade, provenientes de áreas com elevada prevalência de CI (São Simão e Campos Novos Paulista, SP), e transferidos para o biotério da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Núcleo de Pesquisa em Saúde Animal, Seropédica, RJ. Os animais foram identificados por brincos de números 0039, 0052, 0065 e 0092.

Obtenção das amostras

Com auxílio de um abre-bocas, e utilizando-se de cureta odontológica estéril, o material foi obtido diretamente da bolsa peridentária entre os segundos e terceiros pré-molares decíduos (Pd e Pd₂) maxilares. O material colhido foi imediatamente acondicionado em frasco estéril, contendo 1 ml de solução de Ringer lactato pré-reduzida, e o plaqueamento realizado dentro de um período máximo de 1 hora, seguindo-se recomendação de Loesche (1969).

A partir do material originalmente colhido foram realizadas sucessivas diluições em solução de Ringer lactato pré-reduzida. Com auxílio de uma alça de Drigalsky, 2 gotas das diluições foram uniformemente espalhadas sobre a superfície dos meios de cultura CDC (Central for Disease Control), enriquecido com hemina (5 µg/ml), vitamina K1 (0,5 mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro, conforme descrito por Blobel et al. (1984) e agar sangue (AS). De cada diluição foram realizados plaqueamentos pareados. A incubação em anaerobiose foi pelo Sistema Gaspack⁶ a 37°C por 5 a 7 dias. As colônias morfológicamente diferentes e mais freqüentes na cultura original foram agrupadas em categorias considerando-se a pigmentação, forma, aspecto dos bordos e elevação. Para obtenção de culturas puras as mesmas foram repicadas em CDC. Após esta etapa foram selecionadas apenas amostras anaeróbias estritas, certificadas pelo plaqueamento das mesmas em AS e CDC e incubação em aerobiose e microaerofilia.

Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica das amostras

Foram observados os critérios estabelecidos por Holdeman et al. (1977), como as propriedades morfológicas pelo método de

Gram, tempo de crescimento em anaerobiose, pigmentação das colônias após 7 e 14 dias de incubação a 37°C e catalase. A caracterização bioquímica das amostras foi realizada através do sistema API 20 A⁷, constando as reações de fermentação ou hidrólise de glicose, maltose, manose, lactose, sacarose, salicina, xilose, arabinose, glicerina, celobiose, melezitose, rafinose, sorbitol, raminose, trealose, gelatina, manitol e urease, e as provas de esculina, indol e catalase.

Ainda foram observadas a capacidade de crescimento em meio seletivo BGA (*Bacteroides gingivalis* agar), segundo Coykendal et al. (1980), comparando-se com o crescimento em CDC, e formação de pigmento fluorescente quando submetidas à luz ultravioleta de comprimento longo, de acordo com Shah (1979).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De culturas totais de material obtido diretamente da bolsa peridentária dos pré-molares decíduos maxilares de animais com lesões ativas de CI, foram isoladas 120 amostras de bactérias anaeróbias estritas. Baseando-se na observação da formação de pigmento aos 7 e 14 dias de incubação em meio de cultivo CDC e nas características quanto à forma, aspecto do bordo e elevação das colônias, foi possível distinguir quatro grupos bacterianos (Quadro 1). Foi observada uma correlação quanto ao aspecto do crescimento bacteriano, isolando-se os mesmos

Quadro 1. Aspectos do crescimento em meio de cultura CDC, dos principais grupos de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos (CI)

Característica da colônia	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Pigmentação após 7 e 14 dias de incubação	Negra	Marrom	Azul	Amarela
Forma	Esférica	Esférica	Esférica	Esférica
Aspecto do bordo	Regular liso	Regular liso	Regular liso	Irreg. ondulado
Elevação	Convexa	Convexa	Plana	Umbilicada

grupos dos 4 animais estudados. Os microrganismos cultivados apresentaram ainda características comuns, crescendo bem em meio de cultura contendo hemina, vitamina K₁ e sangue. Quanto ao aspecto morfológico, as bactérias dos 4 grupos foram Gram negativas e apresentaram formas variáveis de pequenos bacilos, com poucas formas cocoides e alguns filamentos longos. As formas filamentosas foram mais comuns nas amostras pigmentadas de negro (Grupo 1) em culturas com mais de 7 dias de incubação.

As amostras que apresentaram pigmentação marrom das colônias após 7 e 14 dias de incubação deveriam ser observadas aos 21 dias ou mais para verificar uma eventual produção de pigmento negro mais tardiamente, o que parece ocorrer freqüentemente em algumas espécies de *Bacteroides* (Krieg & Holt 1984). No entanto esta obser-

⁶ Sistema Gaspack, Cockeysville, Maryland, EUA.

⁷ Api System S.A., Montalieu Vercieu, França.

vação não pôde ser realizada. Um fato observado no desenvolvimento dos trabalhos de isolamento foi a dificuldade de manutenção de amostras como culturas puras. Diversos fatores são citados como limitantes ao isolamento e manutenção de culturas de anaeróbios não esporulados, dentre eles a utilização de técnicas adequadas, condições de anaerobiose e meios de cultivo (Dowell & Hawkins 1968, Dowell Jr. 1970). Várias tentativas de isolamento de amostras foram ineficientes, as amostras cresceram bem somente em culturas mistas, sendo difícil a sua manutenção como culturas puras através de subcultivos. Diversas amostras pigmentadas de negro, após um ou dois subcultivos cresceram mas não produziram o pigmento característico. Estes fatores podem ser explicados em parte, segundo Duerden (1980), pelas características nutricionais de diferentes espécies de *Bacteroides* que são complexas e ainda não bem esclarecidas.

Das 120 amostras isoladas, foram escolhidas ao acaso 52 amostras para verificação do perfil bioquímico pelo Sistema API 20 A. Destas, 25 pertenciam ao Grupo 1, 13 ao Grupo 2, 8 ao Grupo 3 e 6 ao Grupo 4. Os resultados obtidos estão registrados nos Quadros 2, 3 e 4. De acordo com os critérios estabelecidos para interpretação e análise

Quadro 2. Perfil bioquímico de 25 amostras de colônias de bactérias pigmentadas de negro, isoladas de lesões peridentárias da CI, determinado pelo Sistema API 20 A, da fluorescência e do crescimento em BGA

	Número de amostras caracterizadas											
	1	1	1	1	1	5	1	1	4	1	1	7
Indol	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Esculina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Manose	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
Fluorescência	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
BGA ^b	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-

^a - Reação negativa, + reação positiva.
^b + Crescimento, - nenhum crescimento.

taxonômica, os microrganismos constantes dos Quadros 2 e 3 pertencem ao gênero *Bacteroides*. As dificuldades surgiram, no entanto, quando se pretendeu fazer a classificação em nível de espécie. Das 38 amostras pigmentadas de negro ou marrom estudadas, 15 foram não fer-

Quadro 3. Perfil bioquímico de 13 amostras de colônias de bactérias pigmentadas de marrom isoladas de lesões peridentárias da CI, determinado pelo Sistema API 20 A, da fluorescência e do crescimento em BGA

	Número de amostras caracterizadas								
	1	2	2	1	1	3	1	1	1
Indol	- ^a	-	+	+	+	+	-	-	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Glicose	+	-	-	-	-	+	+	-	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Maltose	-	-	-	+	-	+	+	-	+
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Gelatina	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manose	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Catalase	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Fluorescência	-	+	-	+	-	+	-	-	+
BGA ^b	-	+	-	-	-	-	+	-	+

^a - Reação negativa, + reação positiva.
^b + Crescimento, - nenhum crescimento.

Quadro 4. Perfil bioquímico de amostras de bactérias anaeróbias, pertencentes aos Grupos 3 e 4, isoladas de lesões peridentárias da CI, determinado pelo Sistema API 20 A, e capacidade de crescimento em BGA

	Número de amostras caracterizadas									
	Grupo 3							Grupo 4		
	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2
Indol	- ^a	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Manitol	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Manose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGA ^b	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-

^a - Reação negativa, + reação positiva.
^b + Crescimento, - nenhum crescimento.

mentativas e apresentaram perfil semelhante ao *Bacteroides asaccharolyticus*, enquanto que as 23 restantes não se enquadraram em qualquer das espécies descritas. Estas amostras apresentaram graus diferentes de fermentação ou hidrólise de substratos, algumas com características comuns, outras apenas individuais, sendo, desta maneira, classificadas como *Bacteroides* sacarolíticos pigmentados de negro ou marrom. As amostras englobadas no Grupo 3 apresentaram freqüentemente capacidade de fermentação em diversos açúcares testados, sendo que apenas uma foi indol positiva. Com este perfil bioquímico, foram caracterizadas como *Bacteroides* não pigmentados de negro. A mesma dificuldade surgiu quando nenhuma das amostras apresentou perfil semelhante às espécies já descritas na literatura e que são consideradas pelo Sistema API 20 A.

As 6 amostras pertencentes ao Grupo 4 foram caracterizadas como *Fusobacterium nucleatum*, segundo o Manual do Sistema API 20 A, embora o aspecto morfológico da colônia seja diferente daquele descrito na literatura.

A maioria das amostras estudadas foi catalase negativa, no entanto, algumas amostras, pigmentadas de negro ou marrom foram positivas. Esta condição tem sido descrita para amostras assacarolíticas isoladas de cães Beagle (Syed 1980).

Adicionalmente, outras 68 amostras de bactérias pertencentes aos 4 grupos isolados forma acrescentados aos estudos da capacidade de crescimento em meio de cultura BGA e formação de pigmento fluorescente, perfazendo-se assim um total de 120 amostras. Os resultados são apresentados nos Quadros 5, 6 e 7.

Todos os grupos foram capazes de crescer em BGA, com diferentes intensidades e variações quando comparados ao crescimento em CDC. Das 40 amostras pigmenta-

Quadro 5. Aspectos do crescimento em BGA e da fluorescência aos 7 e 14 dias de amostras de bactérias com colônias pigmentadas de negro isoladas de lesões da CI

Bovino n ^o	Número de amostras testadas	Crescimento em BGA ^a			Fluorescência	
		+	±	-	7 dias	14 dias
0039	10	4	2	4	7	5
0052	10	8	0	2	6	5
0065	10	5	0	5	6	6
0092	10	4	2	4	5	5

^a + Crescimento abundante, comparável ao crescimento em CDC, ± pouco crescimento, - nenhum crescimento.

Quadro 6. Crescimento em BGA e fluorescência aos 7 e 14 dias de amostras de bactérias com colônias pigmentadas de marrom isoladas de lesões da CI

Bovino n ^o	Número de amostras testadas	Crescimento em BGA ^a			Fluorescência	
		+	±	-	7 dias	14 dias
0039	10	4	0	6	2	2
0052	10	4	0	6	2	2
0065	10	3	1	6	3	3
0092	10	3	1	6	2	2

^a + Crescimento abundante, comparável ao crescimento em CDC, ± pouco crescimento, - nenhum crescimento.

Quadro 7. Crescimento das amostras de bactérias anaeróbias estrías, classificadas nos Grupos 3 e 4, em meio de cultura BGA

Bovino n ^o	Número de amostras testadas por grupo	Resultado do crescimento ^a					
		Grupo 3			Grupo 4		
		+	±	-	+	±	-
0039	5	2	2	1	1	2	2
0052	5	1	2	2	1	1	3
0065	5	1	1	3	2	0	3
0092	5	1	1	2	2	0	3

^a + Crescimento abundante, comparável ao crescimento em CDC, ± pouco crescimento, - nenhum crescimento.

das de negro testadas, 24 apresentaram pelo menos alguma capacidade de crescimento em BGA, enquanto que das pertencentes ao Grupo 2, 15 amostras foram positivas. Em relação à fluorescência, as amostras pertencentes aos Grupos 3 e 4 foram negativas, enquanto que 24 e 9 das amostras pigmentadas de negro ou marrom testadas foram positivas. Shah et al. (1979) descrevem que para amostras pigmentadas de negro, a fluorescência sob luz ultra-violeta foi estável na maioria dos isolamentos depois que as colônias se tornaram totalmente pigmentadas e que algumas culturas velhas podem perder a capacidade de produzir fluorescência. No presente estudo foram observados diferentes comportamentos em relação à esta descrição. Algumas amostras fluorescentes aos 7 dias de incubação apresentaram fluorescência fraca aos 14 dias, e amostras com fluorescência fraca na primeira observação foram negativas na segunda.

A capacidade de crescimento em BGA e de formação de pigmento fluorescente é considerada critério de triagem para o isolamento e caracterização inicial de microrganismos pertencentes ao gênero *Bacteroides*. O meio seletivo BGA (*Bacteroides gingivalis* agar) teoricamente inibiria o crescimento de grande número de amostras, favorecendo o crescimento de outras, que, em sendo não fermentativas e não fluorescentes, possivelmente se caracterizariam como *Bacteroides gingivalis* (Coykendall et al. 1980). O meio de cultura BGA não demonstrou, no entanto, eficiência na seletividade em relação às amostras isoladas de bezerras com CI, uma vez que todos os grupos, com diferentes perfis bioquímicos, se mostraram capazes de crescer neste meio. Não se observou nenhuma relação estreita entre o crescimento em BGA e a fluorescência.

Os resultados obtidos evidenciam a presença de grupos específicos de bactérias Gram negativas não esporuladas nas lesões peridontárias da CI, com predominância de *Bacteroides* spp. pigmentados de negro e marrom, sacarolíticos e não sacarolíticos, de *Bacteroides* spp. não pigmentados e fermentativos e de *Fusobacterium nucleatum*, e corroboram com os trabalhos de Blobel et al. (1984) e Dutra et al. (1986). Estudos taxonômicos adicionais, com a utilização de técnicas mais precisas como a análise cromatográfica dos produtos metabólicos finais e a determinação do conteúdo de citosina e guanina (C + G) do DNA celular, são necessários caso se pretenda

identificar corretamente as espécies de bactérias presentes nas lesões periodontárias progressivas da doença e verificar sua participação na etiopatogenia da CI.

REFERÊNCIAS

- Blobel H., Döbereiner J., Lima F.G.F. & Rosa I.V. 1984. Bacterial isolation from "Cara inchada"-lesions of cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 4(2): 73-77.
- Coykendall A.I., Kaezmarek F.S. & Slots J. 1970. Genetic heterogeneity in *Bacteroides asaccharolyticus* (Holdeman and Moore 1970) *Finegold and Barnes* 1977 (Approved Lists, 1980) and proposal of *Bacteroides gingivalis* sp. nov. and *Bacteroides macacae* (Slots and Genco) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:559-564.
- Döbereiner J. 1990. Zur Ätiologie der "cara inchada", einer periodontalen Erkrankung der Junggrinder in Brasilien. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 97:482-490.
- Döbereiner J., Inada T. & Tokarnia C.H. 1974. "Cara inchada" doença periodontária em bovinos. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.* 9:63-85.
- Dowel Jr. V.R. 1970. Anaerobic infections, p. 15. In: *Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections*. American Public Health Assoc., New York.
- Dowel Jr. V.R. & Hawkins T.M. 1968. *Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology*. National Center for Disease Control, Atlanta, p. 1803.
- Duerden B.J. 1980. The isolation of *Bacteroides* spp. from the normal human gingival flora. *J. Med. Microbiol.* 13:89-100.
- Dutra I.S., Kanoe M. & Blobel H. 1986. Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 6(2):59-63.
- Dutra I.S., Matsumoto T. & Döbereiner J. 1993. Surtos de periodontite em bezeros ("cara inchada") associados ao manejo do solo. *Pesq. Vet. Bras.* 13(1/2):1-4.
- Holdeman I.V. Cato E.P. & Moore W.E.C. 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed. VPI Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, p. 58.
- Krieg N.R. & Holt J.C. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Loesche W.J. 1969. Oxygen sensitivity of carious anaerobic bacteriae. *Appl. Microbiol.* 18(5):723-727.
- Shah H. 1979. The porphyrin pigmentation of subspecies of *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochem J.* 180:45-50.
- Syed S.A. 1980. Characteristics of *Bacteroides asaccharolyticus* from dental plaques of Beagle dogs. *J. Clin. Microbiol.* 11(5):522-526.