

Modificação da microbiota associada às lesões peridentárias da “cara inchada” em bezerros transferidos para área indene¹

Iveraldo S. Dutra², Rita C.M. Botteon³ e Jürgen Döbereiner⁴

ABSTRACT.- Dutra I.S., Botteon R.C.M. & Döbereiner J. 2000. [Modification of the microflora associated with the periodontal lesions of “cara inchada” in calves transferred to a disease-free area.] Modificação da microbiota associada às lesões peridentárias da “cara inchada” em bezerros transferidos para área indene. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20(2):71-74. Depto Apoio, Produção e Saúde Animal, Curso de Medicina Veterinária, Unesp–Campus de Araçatuba, Cx. Postal 533, Araçatuba, SP 16015-050, Brazil.

Observations on the epizootiology of “cara inchada” in cattle (CI) indicated that animals affected by the disease recover spontaneously when they are transferred from the CI-prone area to CI-free pastures. In the presente study 13 young bovines with actively progressing periodontal CI-lesions were transferred to a CI-free area, in order to investigate the clinical course of the disease and the composition of the microflora in the periodontal lesions in two distinct situations: (1) in the actively progressing lesions, and (2) in the healed periodontal pouches of clinically recovered animals. The semi-quantitative and qualitative bacteriological study was undertaken in regard to the percentage of black-pigmented *Bacteroides* in cultures. In the actively progressing lesions of the 13 CI-diseased bovines the percentage of these bacteria was 71.3% in average. The evaluation of the composition of the microflora in the healed periodontal pouches of the clinically recovered bovines showed that bacteria of the black-pigmented *Bacteroides* group existed only at an average of 1.7%. The results of this investigation give further support for the infectious nature of the CI-periodontitis and the primary involvement of these bacteria.

INDEX TERMS: “Cara inchada”, cattle, periodontal lesions, modification of the microflora.

RESUMO.- Observações sobre a epizootiologia da “cara inchada” dos bovinos (CI) indicam que animais clinicamente positivos se recuperam espontaneamente quando transferidos para área indene. No presente estudo, 13 bovinos com lesões peridentárias progressivas da “cara inchada” foram transferidos para área indene com a finalidade de se verificar a evolução clínica da doença e a composição da microbiota da bolsa peridentária em duas situações distintas: (1) nas lesões progressivas e (2) quando da recuperação clínica. O es-

tudo bacteriológico semi-quantitativo e qualitativo foi realizado tendo como referência a percentagem de *Bacteroides* pigmentados de negro presentes nos cultivos. Nas lesões progressivas a percentagem média destes microrganismos foi de 71,3%. Após 4 a 7 meses da transferência os animais se recuperaram espontaneamente, observando-se uma melhora na condição nutricional, desaparecimento do abaulamento facial e do odor fétido bucal e cicatrização com epitelização das lesões peridentárias. Na avaliação da composição da microbiota das bolsas peridentárias dos bezerros quando clinicamente recuperados, este mesmo grupo de microrganismos representou em média 1,7%. Os resultados revelaram a ocorrência de uma predominância de *Bacteroides* pigmentados de negro nas lesões peridentárias progressivas da “cara inchada” e sua remissão quantitativa percentual após a recuperação clínica dos animais, consubstanciando as evidências de sua natureza infecciosa primária.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: “Cara inchada”, bovinos, lesões peridentárias, modificação da microbiota.

¹Aceito para publicação em 3 de novembro de 1999.

²Curso de Medicina Veterinária/DAPSA, Unesp-Campus de Araçatuba, Caixa Postal 533, Araçatuba, SP 16015-050. Bolsista do CNPq. E-mail: isdutra@fmva.unesp.br

³Depto Clínica Médica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ 23851-970.

⁴Embrapa-CNPAB/PSA (Projeto Sanidade Animal Embrapa/UFRRJ), Seropédica, RJ 23851-970.

INTRODUÇÃO

A "cara inchada" dos bovinos (CI) é uma enfermidade infecciosa multifatorial que acomete principalmente bezerros em fase de dentição (Döbereiner et al. 2000). De grande importância econômico-sanitária nas décadas de 60 e 70, onde frequentemente eram observados surtos em extensas áreas recém-formadas das regiões Centro-Oeste e Norte do país (Döbereiner et al. 1974), a CI na atualidade limita-se a surtos esporádicos em áreas de reforma de pastagem em regiões anteriormente enzoóticas (Dutra et al. 1993). O isolamento de bactérias anaeróbias Gram-negativas não esporuladas em lesões progressivas da enfermidade (Blobel et al. 1984, Botteon et al. 1993), evidenciaram a participação de microrganismos com potencial periodontopatogênico na sua etiopatogenia, incluindo a capacidade de produção de enzimas histolíticas e endotoxinas (Dutra et al. 1986). As bactérias anaeróbias estritas predominantes nas lesões progressivas da CI, pertencentes ao gênero *Bacteroides*, são formadoras de colônias pigmentadas de negro e marrom em meio de cultura suplementado com hemina e vitamina K (Botteon 1991).

Döbereiner et al. (1975) transferiram bovinos de diferentes idades com lesões peridentárias progressivas da CI para fazenda considerada indene, baseados em informações obtidas de que animais afetados se recuperavam espontaneamente quando transferidos a tempo, ou seja, antes de atingirem a debilidade excessiva provocada pela incapacidade de se alimentarem. Os bovinos que sobreviveram após um período de observação de 4 a 6 meses, apresentaram cura clínica, com cicatrização das bolsas peridentárias, desaparecimento do odor fétido bucal, regressão do abaulamento facial e melhora no estado nutricional.

O objetivo deste trabalho foi o de verificar a modificação da microbiota associada às lesões peridentárias progressivas da CI, em bezerros enfermos transferidos para área indene, através de um estudo bacteriológico semi-quantitativo e qualitativo da bolsa peridentária, tendo como referência as bactérias anaeróbias estritas formadoras de colônias pigmentadas de negro e marrom, pertencentes ao gênero *Bacteroides*, quando cultivadas em meio de cultura contendo hemina e vitamina K.

MATERIAL E MÉTODOS

Bovinos

Treze bovinos com idade variando entre 45 dias e 18 meses, de ambos os sexos, e com lesões peridentárias progressivas uni- ou bilaterais, provenientes de fazendas situadas nos municípios paulistas de Campos Novos Paulista, São Simão, Santa Rosa do Viterbo e Cássia dos Coqueiros, foram transferidos no período de 1987 a 1988, para a Embrapa - Sanidade Animal, Seropédica, Rio de Janeiro, em área sabidamente indene para CI. Os animais foram selecionados com base na presença de lesões peridentárias, com retração gengival e formação de bolsa peridentária, odor fétido bucal, abaulamento facial e eventualmente diarreia, caracterizando um processo ativo e progressivo. Os animais receberam alimentação constituída basicamente de capim Napier picado e água. Durante o período de observação não receberam sal mineral e a vermifugação foi o único

tratamento efetuado. Os animais foram sacrificados em épocas distintas ou no final do experimento, de acordo com a finalidade.

Exame clínico

Os bovinos devidamente identificados foram examinados por ocasião da transferência para a área indene, anotando-se o estado nutricional, aspecto dos pelos, as lesões da cavidade bucal incluindo o afrouxamento e perda de dentes premolares e as alterações da face. No exame clínico da cavidade bucal, com o auxílio de abridor de bocas, foram observadas somente as alterações presentes na porção lingual da gengiva maxilar. Quando da necropsia pode-se avaliar também a porção bucal. Dois animais foram sacrificados logo após a transferência, com o objetivo de se avaliar melhor os locais ideais para colheita de amostras e ainda a composição da microbiota. Da mesma forma, um dos animais foi sacrificado 3 meses após a transferência. Os animais restantes foram sacrificados para a avaliação final do experimento, em períodos distintos, após serem considerados recuperados clinicamente. Cinco animais apresentavam diarreia por ocasião da transferência. As observações clínicas foram realizadas nas coletas de material para o exame bacteriológico ou ainda mensalmente. A recuperação clínica da CI foi considerada quando houve desaparecimento do odor fétido bucal, regressão do abaulamento facial e melhora no estado geral dos animais, com cicatrização e epiteliação da bolsa peridentária.

Estudo bacteriológico semi-quantitativo e qualitativo

A verificação da microbiota da bolsa peridentária de animais com lesões peridentárias da CI foi realizada através da colheita de material logo após a transferência para a Embrapa - Sanidade Animal ou após o sacrifício dos animais. Com o auxílio de abridor de boca e cureta odontológica estéril o material foi obtido diretamente da profundidade das bolsas peridentárias formadas entre os dentes premolares deciduos (Pd) ou molares (M) maxilares, após limpeza com auxílio de gaze estéril. Nas lesões progressivas as bolsas peridentárias além da retração do bordo gengival, exposição das raízes dos dentes e acúmulo de fragmentos alimentares, apresentavam presença de material untuoso de mau cheiro. Após a curetagem na profundidade da bolsa peridentária, o material foi acondicionado em frasco estéril com tampa de rosca, contendo pérolas de vidro e solução Ringer Lactato pré-reduzida, conforme descrito por Loesche (1969). Quando não processados imediatamente, os materiais foram armazenados em nitrogênio líquido. Para realizar o estudo semi-quantitativo e qualitativo os materiais foram diluídos sucessivamente em solução Ringer Lactato estéril. Com o auxílio de alça de Drigalsky, 0,1 ml das diluições decimais 10^{-3} e 10^{-6} foram espalhados sobre a superfície do meio de cultura CDC, enriquecido com hemina, vitamina K e 5% de sangue desfibrinado de carneiro, conforme descrito por Blobel et al. (1984). De cada diluição foram realizados plaqueamentos em duplicatas. Após um período de incubação de 7 dias a 37°C em anaerobiose, os cultivos foram submetidos à leitura com o auxílio de microscópio estereoscópio, observando-se a morfologia e pigmentação das colônias, conforme descrito por Botteon et al. (1991). Os valores médios, obtidos pela leitura do número de colônias pigmentadas de negro e marrom/nº total de colônias, em pelo menos dois campos distintos, foram expressos em percentagem.

RESULTADOS

Todos os 13 animais transferidos para a área indene apresentavam estado nutricional de ruim a péssimo em função da dificuldade na mastigação e ruminação, decorrentes das lesões peridentárias da CI. A diarreia observada em cinco animais cessou já na primeira semana após a transferência.

Quadro 1. Localização das lesões peridentárias e alteração facial em bezerros com "cara inchada", por ocasião da transferência para área indene

Bovino	Idade (meses)	Lesões peridentárias maxilares ^a						Abaulamento facial ^b	
		Lado esquerdo			Lado direito			Lado esq.	Lado dir.
		Pd ₂₋₃	Pd ₃₋₄	Pd _{4-M₁}	Pd ₂₋₃	Pd ₃₋₄	Pd _{4-M₁}		
4633	9		+		+	+		+	++
4634	9		+		+	+		++	++
4635	9		+			+		+	
4640	18		+				+	+	+
4641	9		+		+	+		++	++
4642	9		+			+		++	+
4644	4		+		+	+		+	+
4645	5		+					+	
4646	1,5		+			+		++	
4647	3		+			+		+	++
4656	8	+	+		+	+		+	+
4657	8		+	+		+		+	+
4658	8	+	+			+	+	++	++

^a + Lesão peridentária presente. Pd = Premolares decíduos, com numeração filogenética.

^b + Abaulamento facial discreto, ++ moderado.

Quadro 2. Resultado do exame bacteriológico das lesões peridentárias da "cara inchada" em bovinos transferidos para área indene

Bovino	Exame bacteriológico (% colônias pigmentadas)		Recuperação clínica (meses)	Sacrificado após (meses)	Condição clínica (CI)
	Inicial	Final			
4633	61,4	2,3	6	9	Recuperado
4634	59,0	3,2	7	14	Recuperado
4635	67,5	3,1	5	14	Recuperado
4640	68,0	NR ^a			Positivo
4641	67,0	1,7	7	10	Recuperado
4642	60,2	0	6	14	Recuperado
4644	87,3	0	5	13	Recuperado
4645	82,3	1,8	4	11	Recuperado
4646	83,5	1,0	4	11	Recuperado
4647	68,4	2,1	5	11	Recuperado
4656	64,6	1,8	6	6	Recuperado
4657	81,3	NR			Positivo
4658	76,4	NR		3	Positivo
% Média	71,3	1,7			

^aNR = Não realizado.

Os resultados das observações clínicas da cavidade bucal e da face dos animais por ocasião da transferência são apresentados no Quadro 1. Com exceção de um animal, todos apresentavam retração gengival bilateral com diferentes intensidades, estendendo-se principalmente entre Pd₂ (primeiro premolar decíduo) e M₁ maxilares. Todos os animais apresentavam abaulamento considerado de leve a moderado em pelo menos um dos lados da face, que praticamente desapareceu com o decorrer do tempo nos dez animais mantidos em observação até a recuperação clínica.

O Quadro 2 apresenta os resultados semi-quantitativos e qualitativos do estudo para a avaliação da microbiota das bolsas peridentárias, com referência às bactérias formadoras de colônias pigmentadas de negro e marrom (*Bacteroides*), em duas situações distintas: nas lesões progressivas e nas

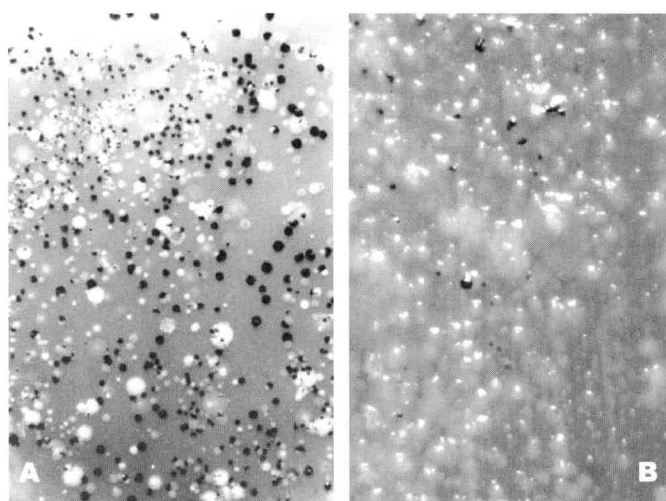


Fig. 1. (A) Cultivo típico de lesão peridentária progressiva da "cara inchada" de bovino, mostrando a predominância de colônias negras de *Bacteroides*. (B) Cultivo de bolsa peridentária cicatrizada e epitelizada da periodontite da "cara inchada".

lesões dos animais recuperados clinicamente. Nas lesões progressivas de todos os animais foi constatada a predominância de bactérias formadoras de colônias pigmentadas de negro (71,3%) em meio de cultura CDC contendo hemina e vitamina K (Fig. 1A). No exame bacteriológico realizado por ocasião do sacrifício dos animais, após serem considerados recuperados clinicamente, ocorreu uma redução quantitativa deste grupo de microrganismos, quando avaliado a percentagem de colônias pigmentadas de negro e marrom (1,7%) presentes no cultivo (Fig. 1B).

Os animais apresentaram recuperação clínica espontânea, em períodos variando de 4 a 7 meses após a transferência. Com o decorrer do tempo houve uma melhora na condição corporal dos animais, desaparecimento do abaulamento facial uni- ou bilateral e do odor fétido bucal. No exame clínico das

lesões peridentárias, após o sacrifício dos animais considerados recuperados clinicamente, pode-se observar a cicatrização e epiteliação das bolsas peridentárias de diferentes extensões e profundidades e desaparecimento do odor fétido característico do processo inflamatório purulento progressivo. Em dois animais ocorreu a perda de dentes premolares devido ao afrouxamento pela exposição das raízes.

DISCUSSÃO

A participação primária de bactérias anaeróbias Gram-negativas nas lesões peridentárias progressivas da "cara inchada" dos bovinos foi evidenciada em estudos realizados por Blobel et al. (1984) e Botteon et al. (1993). O grupo predominante de bactérias anaeróbias nas lesões peridentárias da CI, pertencentes ao gênero *Bacteroides*, tem a característica de formar colônias pigmentadas de negro e marrom em meio de cultura CDC enriquecido com hemina e vitamina K, quando incubado por 7 dias a 37°C. As colônias pigmentadas de marrom são colônias típicas pertencentes também ao gênero *Bacteroides*, que adquirem a coloração negra após um período mínimo de 14 dias de incubação (Botteon 1991). Atualmente este gênero apresenta grande variação taxonômica, principalmente os isolados da cavidade oral sendo classificados como *Porphyromonas* e *Prevotella*.

A associação deste grupo de bactérias com diversos tipos de periodontite nos humanos e animais (Marsh & Martin 1992), as evidências da sua participação nas lesões da CI (Blobel et al. 1984, Botteon et al. 1993) e as observações realizadas por Döbereiner et al. (1975), de que bovinos enfermos transferidos para região indene apresentavam recuperação clínica espontânea das lesões após 4 a 6 meses, motivaram a realização deste trabalho. O estudo bacteriológico foi realizado em duas etapas: quando as lesões peridentárias apresentavam-se ainda progressivas e quando ocorreu a recuperação clínica, sem a presença dos sinais que caracterizam o processo ativo. Em áreas enzoóticas para a CI o estado geral dos animais, a presença de diarreia, as lesões peridentárias incluindo o afrouxamento e até perda de dentes premolares, o odor fétido bucal e o abaulamento facial são considerados indicadores clínicos da presença e evolução da enfermidade (Döbereiner et al. 1974).

Os resultados das observações clínicas não diferiram dos descritos por Döbereiner et al. (1975), quando transferiram bovinos com CI de região enzoótica para área de Cerrado natural considerada indene e constataram a sua recuperação. No presente estudo, após 4 a 7 meses da transferência os bovinos também já apresentavam uma melhora na condição corporal, diminuição acentuada ou ausência de odor fétido bucal e das alterações faciais. A diarreia presente em cinco animais por ocasião da transferência cessou já na primeira semana. Embora não tenha sido objeto o estudo detalhado de cada fase da remissão do processo inflamatório, pode-se observar que os animais com lesões peridentárias brandas se recuperaram mais rapidamente que os animais com lesões extensas e profundas. Da mesma forma, observou-se que quando da queda de dentes houve o desaparecimento do odor

fétido exalado das lesões e a epiteliação ocorreu mais rapidamente.

Os resultados do estudo bacteriológico semi-quantitativo e qualitativo das lesões peridentárias progressivas demonstraram o predomínio das colônias de *Bacteroides* pigmentados. A percentagem média de bactérias formadoras de colônias pigmentadas de negro e marrom nos cultivos foi de 71,3%. Nas bolsas peridentárias dos dez bovinos recuperados clinicamente a percentagem deste grupo de microrganismo considerado periodontopatogênico foi de 1,7%. Isto demonstrou uma remissão quantitativa percentual do número de *Bacteroides* pigmentados de negro nas lesões peridentárias da CI (Quadro 1), quando avaliados nas duas situações clinicamente distintas. Como o sacrifício dos animais foi efetuado até 14 meses após a sua transferência e a recuperação clínica ocorreu dentro de até 7 meses (Quadro 2), pode-se constatar que estas bactérias permaneceram na cavidade oral dos animais. Segundo Marsh & Martin (1992), este grupo de microrganismos, considerados potencialmente periodontopatogênicos e responsáveis por diversos tipos de periodontites, são constituintes da microbiota oral normal dos homens e animais.

A constatação de que a recuperação clínica dos animais, após a transferência para área indene, está relacionada com a modificação quantitativa percentual de *Bacteroides* formadores de colônias pigmentadas de negro e marrom nas lesões peridentárias da doença, corrobora as evidências apresentadas por Döbereiner et al. (2000) de que a CI é uma enfermidade infecciosa multifatorial com o envolvimento primário destas bactérias.

REFERÊNCIAS

- Blobel H., Döbereiner J., Lima F.G.F. & Rosa I.V. 1984. Bacterial isolations from "cara inchada"-lesions of cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 4(2):73-77.
- Botteon R.C.M. 1991. Isolamento, caracterização e patogenidade de bactérias associadas às lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. Tese de Mestrado, Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro. 100p.
- Botteon R.C.M., Dutra I.S., Döbereiner J. & Blobel H. 1993. Caracterização de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 13(3/4):51-55.
- Döbereiner J., Inada T. & Tokarnia C.H. 1974. "Cara inchada", doença peridentária em bovinos. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.* 9:63-85.
- Döbereiner J., Chaves J.A., Rosa I.V. & Houser R.H. 1975. Efeito da transferência de bovinos com "cara inchada" (Doenças peridentária) para pastos de região indene. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.* 10:99-103.
- Döbereiner J., Dutra I.S., Rosa I.V. & Blobel H. 2000. "Cara inchada" of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependant periodontitis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 20(2):47-64.
- 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 bezerros ("cara inchada") associados ao manejo do solo. *Pesq. Vet. Bras.* 13(1/2):1-4.
- Loesche W.J. 1969. Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.* 18(5):723-727.
- Marsh P. & Martin M. 1992. *Oral Microbiology*. 3rd ed. Chapman and Hall, London. 249p.