

ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E ENDOTÓXICAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE LESÕES PERIDENTÁRIAS DA "CARA INCHADA" DOS BOVINOS¹

IVERALDO DOS SANTOS DUTRA², MASAMITSU KANOE³ e HANS BLOBEL⁴

ABSTRACT.- Dutra I.S., Kanoe M. & Blobel H. 1986. [Enzymatic and endotoxic activities of bacteria isolated from periodontal lesions of calves with "Cara inchada".] Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 6 (2): 59-63. Institut für Bakteriologie und Immunologie, Justus Liebig-Universität, Frankfurter Str. 107, D-6300 Giessen, W.-Germany.

Bacteria isolated from periodontal lesions of calves with "cara inchada" were examined for enzymatic and endotoxic activities. Black-pigmented cultures of *Bacteroides* produced deoxyribonuclease, collagenase, chondroitin sulfatase, fibrinolysin, gelatinase, hyaluronidase, lipase and protease. Trypsin-like proteolytic activities were demonstrated in cultures of black-pigmented asaccharolytic *Bacteroides* that were also high producer of collagenase. *Actinomyces israelii*, *A. pyogenes* and *Fusobacterium nucleatum* showed weak production of hydrolytic enzymes. Biological activities of lipopolysaccharides extracted from *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides* spp. and *F. nucleatum* were examined by the ability to produce a Shwarzman-reaction in rabbits. Endotoxic lipopolysaccharides from *F. nucleatum* had higher biological activities than those from *Bacteroides*. These findings suggest a possible role of the bacterial enzymes and endotoxins in the development of periodontal lesions in young cattle.

SINOPSE.- Estudos foram realizados para determinar as atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias de bezerros com "cara inchada". Amostras "pigmentadas" de *Bacteroides* hidrolisaram o maior número de substratos, produzindo desoxirribonuclease, colagenase, sulfato de condroitinase, fibrinolissina, gelatinase, hialuronidase, lipase e protease. Atividade proteolítica semelhante à da tripsina foi observada nas amostras assacarolíticas de *Bacteroides*, que foram também mais ativas na produção de colagenase. *Actinomyces israelii*, *Actinomyces pyogenes* e *Fusobacterium nucleatum* foram pouco ativos na produção de enzimas hidrolíticas. Atividade biológica de lipopolissacarídeos extraídos de *Bacteroides* spp., *B. melaninogenicus* e *F. nucleatum* foi testada pela capacidade de produção da reação dérmica de Shwarzman em coelhos. Endotoxina de *F. nucleatum* foi mais ativa, quando comparada com a de *Bacteroides*. Os resultados sugerem uma possível participação de enzimas e endotoxinas bacterianas no desenvolvimento das lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos.

INTRODUÇÃO

"Cara inchada" (CI) é uma doença peridentária que acomete bezerros mantidos em determinadas áreas de pastagens recém-formadas, nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil. A doença caracteriza-se por uma lesão peridentária progressiva, uni- ou bilateral, tendendo para uma periostite crônica ossificante, com afrouxamento e perda dos dentes premolares e molares, e abaulamento ósseo maxilar (Döbereiner et al. 1974). Em casos avançados os animais apresentam um mau estado nutricional, causado pela incapacidade em se alimentar, e podem morrer por inanição. A doença pode incidir mais que 60% dos animais em fase de dentição, nos primeiros anos após a abertura de pastos novos em áreas de derrubada, ou pastagens cultivadas do cerrado, com tendência a diminuir no decorrer do tempo.

A etiologia da CI é desconhecida. Fatores alimentares e nutricionais tem sido citados como possíveis causas determinantes no seu aparecimento (Döbereiner et al. 1975, Döbereiner et al. 1976, Rosa et al. 1976). As lesões da CI não ocorrem, no entanto, sem a presença de determinadas bactérias anaeróbias Gram-negativas. Recentemente Blobel et al. (1984), realizando estudos bacteriológicos das lesões peridentárias em 23 bezerros, isolaram *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides bivius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces* (*Corynebacterium*) *pyogenes* e *Actinomyces israelii*. Embora repetidas inoculações intra-gengivais de *A. pyogenes* e *B. melaninogenicus* em bezerros não provocaram lesões semelhantes à da doença, não pode ser descartado uma possível participação de bactérias no seu desenvolvimento.

O acúmulo e produção de enzimas, toxinas e outros produtos metabólicos por bactérias anaeróbias Gram-negativas no

1 Aceito para publicação em 30 de abril de 1986.

Trabalho realizado com o apoio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)/Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas (IICA) e da Sociedade Alemã de Pesquisa (Deutsche Forschungsgemeinschaft), Bonn, República Federal da Alemanha.

2 Bolsista da Embrapa.

3 Instituto de Microbiologia Veterinária, Universidade Yamaguchi, Yoshida, Japão.

4 Instituto de Bacteriologia e Imunologia, Universidade Justus Liebig, Frankfurter Str. 107, D-6300 Giessen, RFA.

solco gengival são considerados fatores primários importantes na etiologia de doença peridontária no homem (Löe et al. 1965, Ellinson 1970, Slots 1982) e nos animais (Lindhe et al. 1973, Slots & Hausmann 1979). Estas bactérias não invadem, de uma maneira geral, o tecido peridontário, mas elaboram uma série de produtos que podem participar direta-ou indiretamente na destruição de tecidos (McDonald et al. 1960, Socransky 1970, Page & Schroeder 1976, Slots & Genco 1984).

O propósito deste trabalho foi o de verificar a produção "in vitro" de enzimas hidrolíticas pelas principais espécies de bactérias isoladas de lesões peridontárias da CI, assim como a atividade biológica de endotoxinas extraídas das bactérias anaeróbias Gram-negativas.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias

As amostras de bactérias foram isoladas de lesões peridontárias de acordo com a metodologia descrita por Blobel et al. (1984). Biópsias das lesões de 5 bezerros, com CI, mantidas em N₂ líquido, foram plaqueadas diretamente em meio de cultura CDC enriquecido com hemina (5 mg/ml), vitamina K (0,5 mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Os cultivos foram examinados após 5-7 dias de incubação a 37°C, quando mantidos em anaerobiose (Gas Pak, Becton Dickinson, Cockeysville, Maryland, USA), e de 2-3 dias quando em microaerobiose. As colônias isoladas dos cultivos primários foram mantidas como culturas puras através de repetidos subcultivos semanais. A identificação foi feita considerando-se as características apresentadas pela coloração de Gram, morfologia, crescimento em aerobiose e anaerobiose e reações bioquímicas (API 20 A, API-System S.A., Montalieu, Vercieu, França), de acordo com os critérios descritos por Holdeman et al. (1977). As amostras de *Actinomyces* foram identificadas segundo Buchanan & Gibbons (1974) e Hartwig (1980).

Testes enzimáticos

As atividades enzimáticas determinadas no presente estudo foram qualitativas. O teste para verificar a produção de desoxirribonuclease (DNase) foi realizado segundo Porschen & Sonntag (1974). Bactérias foram plaqueadas em DNase-agar⁵ e, após o período de incubação, cerca de 3 ml de uma solução 1 N de HCl foram pipetados uniformemente na superfície do meio de cultura. Produção de DNase resulta numa hidrólise do DNA em frações nucleotídicas, que não são precipitadas pelo HCl, formando-se assim uma zona clara em torno das colônias.

Os testes para produção de sulfato de condroitinase e hialuronidase foram realizados pelo crescimento das bactérias em BHI-agar⁶, contendo um ou outro substrato (Smith & Willet 1968). Ácido hialurônico⁷ e sulfato de condroitina⁷ foram incorporados ao agar numa concentração de 400 mg/ml. A precipitação dos mucopolissacarídeos intactos foi feita com uma solução 2 N de ácido acético.

O método utilizado na detecção de fibrinolise foi o descrito por Hentschel & Blobel (1968). Fibrinogênio⁸ foi acrescentado numa concentração de 3 mg/ml em Tryptic soy-agar⁹. Atividade fibrinolítica foi caracterizada pela formação de um halo claro em torno das colônias, após a incubação.

Gelatinase e lipase foram determinadas, respectivamente, pela liquefação da gelatina e pela desintegração de tributirina contida em Tributirina-agar⁵ (Holdeman et al. 1977). Protease foi determinada em Heart Infusion-agar⁹ contendo 1% de caseinato de sódio (Wilkström et al. 1981). Para determinação da atividade proteolítica semelhante à da tripsina foi utilizado BANA⁷ (N-Benzoyl-DL-Arginine-2-Naphtylamide) como substrato (Laughon et al. 1982). De acordo com a metodologia descrita, este teste foi realizado em aerobiose e com período de incubação de 18 horas.

Quando bactérias anaeróbias foram testadas para as atividades enzimáticas acima descritas, as placas foram mantidas em anaerobiose por 5 dias a 37°C. As amostras de *A. pyogenes* foram incubadas 72 horas em

microaerobiose (37°C). Todas as amostras foram testadas em duplicatas; e *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.* e *Clostridium spp.*, pertencentes à coleção do Instituto de Bacteriologia e Imunologia, Giessen, serviram como controles.

Atividade collagenolítica foi determinada preliminarmente, em todas as amostras isoladas, pela inoculação das bactérias em 10 ml de Trypticase-yeast extract⁹ (TYE) contendo 10 mg de colágeno⁷ (tipo I) insolúvel (Mayrand & Grenier 1985). Após 14 dias de incubação em anaerobiose, o conteúdo de hidroxiprolina no sobrenadante foi determinado segundo Mitoma et al. (1959). As amostras positivas foram recultivadas em TYE e submetidas a um processo de extração do componente bacteriano responsável pela atividade enzimática, de acordo com a metodologia descrita por Hausmann & Kaufman (1969). Placas contendo colágeno⁷ (tipo III) como substrato foram preparadas segundo Wellish et al. (1984); e a especificidade do teste foi confirmada com tripsina⁷ (50 mcg/ml). Collagenase de *Clostridium histolyticum*⁷ (100 mcg/ml) foi utilizada como controle positivo. Liquefação do colágeno após 3 horas de incubação a 37°C foi considerada como reação inespecífica.

Endotoxinas

Lipopolissacarídeos (LPS) foram extraídos de *Bacteroides spp.*, *B. melaninogenicus* e *F. nucleatum* segundo o método de extração por fenol e água (Westphal et al. 1952) modificado por Sasaki (1979). Foram utilizadas duas amostras de cada espécie de bactéria, escolhidas ao acaso. Para o teste biológico, 5 mg de LPS foi dissolvido em 2,5 ml de uma solução salina isotônica (0,85% NaCl) e sonificado por 2 minutos a 0°C para homogeneização. Diluições das suspensões de LPS (1 mcg - 1000 mcg em 0,5 ml de salina) foram inoculados via intra-dérmica na linha mediana do abdômen de coelhos brancos com pesos variando entre 1,5 e 2,0 kg. Após 24 horas das injeções preparatórias, os LPS homólogos (100 mcg/kg) foram inoculados via intravenosa, para provocação da reação dérmica de Shwarzman. Os controles foram feitos com inoculação intra-dérmica de solução salina. As leituras foram realizadas 4, 7 e 24 horas após as injeções provocativas.

RESULTADOS

Foram isoladas das lesões peridontárias de 5 bezerros com CI um total de 58 amostras de bactérias pertencentes aos gêneros *Actinomyces*, *Bacteroides* e *Fusobacterium*. Todas as 31 culturas de *Bacteroides* isoladas formaram colônias pigmentadas de preto após 5-7 dias de incubação em anaerobiose e foram classificadas, na sua maioria (18), como *Bacteroides melaninogenicus*. As 13 amostras pertencentes ao grupo melaninogenico, mas que não fermentaram nenhum dos açúcares testados nas reações bioquímicas, foram denominadas *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium nucleatum* (9 amostras), *Actinomyces israelii* (8) e *Actinomyces pyogenes* (10) ocorreram em todas as lesões examinadas, mas em número menor que bactérias do gênero *Bacteroides*.

Os resultados dos testes enzimáticos estão resumidos no Quadro 1. As atividades enzimáticas que ocorreram com maior frequência nas amostras de bactérias testadas foram DNase e protease. Com exceção do BANA (tripsina), todos os outros substratos foram hidrolisados por no mínimo duas das bactérias presentes nas lesões.

5 Fa. BBL Microbiology Systems, Cockeysville, USA.

6 Fa. Merck, Darmstadt, RFA.

7 Fa. Sigma, St. Louis, USA.

8 Fa. Deutsche Kabi, München, RFA.

9 Fa. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

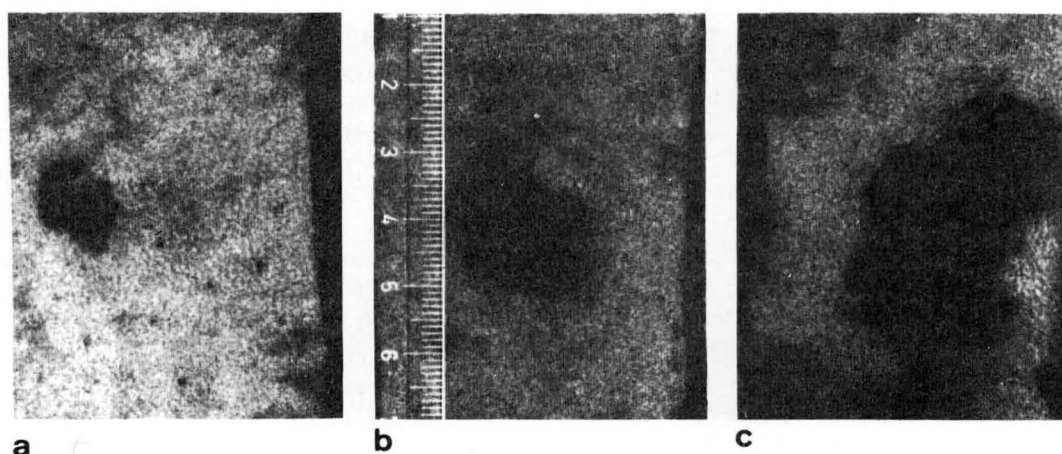


Fig. 1. Reação dérmica de Shwarzman em coelho produzida por LPS de *Fusobacterium nucleatum*. As injeções preparatórias foram de (a) 10, (b) 100 e (c) 200 mcg de endotoxina em volumes de 0,5 ml de salina. Áreas de necrose hemorrágica desenvolveram 7 horas após a injeção provocativa de endotoxina (100 mcg/kg).

Quadro 1. Atividades enzimáticas de bactérias isoladas das lesões peridentárias de bovinos com "cara inchada"

Bactéria	Amostras examinadas	Número de amostras positivas								
		DNase	COL	CON	FIB	GEL	HIA	LIP	PRO	TRI ^(a)
<i>Actinomyces israelii</i>	8	2	0	0	0	0	0	5	4	0
<i>Actinomyces pyogenes</i>	10	10	0	1	0	0	0	0	6	0
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	18	15	3	16	12	14	18	3	18	0
<i>Bacteroides</i> spp.	13	13	10	13	10	8	13	0	13	13
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	9	8	0	0	7	0	0	6	0	0

(a) Abreviaturas: DNase (Desoxiribonuclease), COL (Colagenase), CON (Sulfato de Condroitinase), FIB (Fibrinolisinase), GEL (Gelatinase), HIA (Hialuronidase), LIP (Lipase), PRO (Protease), TRI (Tripsina).

Quadro 2. Reação de Shwarzman em coelhos, provocada por LPS isolados das bactérias anaeróbias Gram-negativas

Bactéria	Endotoxina ^(a) (mcg)	Tempo ^(b) (h)
<i>Bacteroides</i> spp. (A)	100	24
<i>Bacteroides</i> spp. (B)	100	24
<i>B. melaninogenicus</i> (A)	200	24
<i>B. melaninogenicus</i> (B)	400	24
<i>F. nucleatum</i> (A)	10	7
<i>F. nucleatum</i> (B)	10	7

(a) Dose preparatória mínima, necessária para provocar necrose hemorrágica.

(b) Aparecimento da reação após a aplicação da dose provocativa.

Enquanto colagenase, gelatinase, hialuronidase e tripsina foram produzidas somente pelas amostras de *Bacteroides*, lipase foi mais frequentemente observada em *A. israelii* e *F. nucleatum*. *Bacteroides* spp. e *B. melaninogenicus* hidrolisaram o maior número de substratos. As amostras de *Bacteroides* spp. foram as únicas que apresentaram atividade proteolítica semelhante à da tripsina. *A. israelii*, *A. pyogenes* e *F. nucleatum* foram, de uma maneira geral, pouco ativos na hidrólise dos substratos testados.

A propriedade endotóxica das bactérias anaeróbias Gram-negativas foi determinada através da reação dérmica de Shwarzman em coelhos. Todas as preparações de LPS extraídos das amostras de *Bacteroides* spp., *B. melaninogenicus* e *F. nucleatum* possuíam atividade biológica característica de endotoxina. Variações foram observadas, no entanto, quanto às doses preparatórias mínimas, necessárias para provocação de necrose hemorrágica, e tempo de aparecimento das lesões (Quadro 2). Endotoxina de *F. nucleatum* apresentou alta atividade biológica quando comparada com as de *Bacteroides*. Doses preparatórias de 10 mcg foram suficientes para provocar a reação de Shwarzman (Fig. 1).

DISCUSSÃO

No presente estudo foram demonstradas atividades enzimáticas e endotóxicas de microorganismos isolados de lesões peridentárias de bezerros com CI. A predominância de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Actinomyces* nas lesões da doença (Blobel et al. 1984) e os resultados obtidos neste trabalho, permitem considerações sobre uma possível participação de microorganismos no desenvolvimento das lesões peridentárias. Estes gêneros de bactérias são impor-

tantes constituintes da microflora associada com doença peridantária no homem (Moore et al. 1982, Marsh & Martin 1984) e nos animais (Slots & Hausmann 1979, Syed et al. 1980).

Espécies de *Bacteroides* que formam colônias pigmentadas de preto em presença de hemina crescem massivamente nos cultivos diretos das lesões da CI. Enquanto a identificação das amostras sacarolíticas (*B. melaninogenicus*) pode ser feita por métodos convencionais, o mesmo não ocorreu com as amostras assacarolíticas. A atividade enzimática pode ser, no entanto, de interesse na sua identificação. Bactérias pertencentes a este grupo (assacarolítico), oriundas da placa subgengival de homem e que possuem atividade enzimática semelhante à da tripsina, são atualmente classificadas como *B. gingivalis* (Laughon et al. 1982). Embora todas as 13 amostras de *Bacteroides* spp. isolados possuíssem esta atividade proteolítica, a sua exata identificação permaneceu incerta devido à limitada informação taxonômica. Estudos adicionais podem ser de interesse na determinação das espécies "pigmentadas" de *Bacteroides* presentes nas lesões da CI; as diferenças entre as espécies não são apenas metabólicas, sorológicas e genéticas, mas sobretudo de patogenicidade (Mayrand et al. 1980).

A produção de enzimas hidrolíticas e outros produtos tóxicos por *Bacteroides* tem sido considerada como um dos fatores de virulência em doença peridantária (Slots & Genco 1984). Utilizando-se de métodos qualitativos e substratos específicos, as atividades enzimáticas das amostras isoladas foram determinadas. Os gêneros de bactérias isoladas das lesões da hidrolisaram pelo menos três dos nove substratos testados. *Bacteroides* spp. e *B. melaninogenicus* foram as amostras mais ativas.

A presença de atividade collagenolítica em amostras de *Bacteroides* pode ser de significado no aparecimento das lesões iniciais da CI. Colágeno é o maior constituinte do periodôncio e sua massiva destruição é o principal achado no estágio inicial de doença peridantária (Page & Schroeder 1976). Embora Golub et al. (1976) demonstrassem que a collagenase presente no fluido gengival de lesões peridantárias (no homem) é oriunda do próprio organismo, a possibilidade da participação de collagenase bacteriana não pode ser descartada. Aproximadamente 80% das amostras de *Bacteroides* spp. (assacarolíticos) testados e 16% de *B. melaninogenicus* apresentaram atividade collagenolítica. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Mayrand & Grenier (1985), que também observaram um maior número de atividade collagenolítica nas amostras assacarolíticas de *Bacteroides*.

A atividade proteolítica semelhante à tripsina nas amostras de *Bacteroides* spp. sugere que esta enzima possa participar indiretamente na destruição de tecidos observada na doença peridantária de bezerros. Estudos tem demonstrado que tripsina pode ativar collagenase latente do tecido gengival, pela destruição dos inibidores desta enzima presentes normalmente no soro (Birkendal-Hansen et al. 1975).

Outras enzimas histolíticas, específicas para diferentes constituintes de tecidos, também foram demonstradas. Protease, DNase e fibrinolise ocorrem principalmente no gênero *Bacteroides*, que foram pouco ativos somente na hidrólise da tributirina (lipase). A maioria das amostras deste gênero hidrolisaram também os ácidos mucopolissacarídeos testados. Os resultados destes testes enzimáticos estão de acordo com trabalhos de outros autores (Rudek & Haque 1976, Steffen & Hentges 1981, Dahlen et al. 1984).

De acordo com a metodologia descrita por Sazaki (1979) foi possível a extração de endotoxinas de *Fusobacterium* e *Bacteroides*. A demonstração da atividade biológica foi realizada na pele de coelhos devido à facilidade na interpretação dos resultados. Embora o tecido gengival seja mais susceptível que a pele, na provocação da necrose hemorrágica em coelhos, as manifestações gerais e histológicas seguintes à aplicação de endotoxinas são semelhantes em ambos os tecidos (Mergenhausen et al. 1961). Os LPS extraídos das amostras de *Fusobacterium* foram biologicamente muito mais ativos que os de *Bacteroides*. A baixa atividade biológica da endotoxina de *Bacteroides*, isolados da cavidade oral do homem, tem sido descrita por Hofstad (1970) e é atribuída à ausência de 2-queto-3-deoxioc-tonato (Hofstad 1974).

Hausmann (1974) tem sugerido que endotoxinas de bactérias anaeróbias Gram-negativas possam ser responsáveis pela intensa reabsorção óssea observada em algumas formas de doença peridantária no homem e nos animais. LPS isolados de *B. melaninogenicus* e *F. nucleatum* estimulam a reabsorção óssea em culturas de tecidos (Hausmann et al. 1970, Sveen & Skaug 1980). A exposição de epitélio do sulco gengival à permanente presença de bactérias, pode resultar na penetração de endotoxinas com propriedades biológicas e causar as alterações ósseas observadas na CI.

Os resultados do presente estudo indicam uma possível participação primária de bactérias no desenvolvimento das lesões peridantárias da CI. Estudos complementares, considerando os aspectos bacteriológicos da doença, são de interesse no esclarecimento da sua etiologia.

REFERÊNCIAS

- Birkendal-Hansen, H., Cobb, C.M., Taylor, R.E. & Fullmer, H.M. 1975. Trypsin activation of latent collagenase from several mammalian sources. Scand. J. Dent. Res. 83: 302-305.
- 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.
- Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (ed.) 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland.
- Dahlen, G., Wilkström, M. & Möller, A. 1984. Production of histolytic enzymes by a combination of oral bacteria with known pathogenicity. J. Dent. Res. 62: 1041-1044.
- Döbereiner, J., Inada, T. & Tokarnia, C.H. 1974. "Cara inchada", doença peridantária 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" (doença peridantária) para pastos de região indene. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet., 10: 90-103.
- Döbereiner, J., Rosa I.V. & Lazzari A.A. 1976. "Cara inchada" (doença peridantária) em bezerros mantidos em pastos de *Panicum maximum*. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet., 11: 43-47.
- Ellison, S.A. 1970. Oral bacteria and periodontal disease. J. Dent. Res. 49: 198-202.

- Golub, L.M., Siegel, K., Ramamurth N.S. & Mandel I.D. 1976. Some characteristics of collagenase activity in gingival crevicular fluid and its relationship to gingival diseases in humans. *J. Dent. Res.* 55: 1049-1057.
- Hartwig, H. 1980. Corynebakterien, p. 279-343. In: Blobel, H. & Schliesser, Th. (ed): *Handbuch der bakteriellen Infektion bei Tieren*, Bd. 2, Fischer Verlag Stuttgart.
- Hausmann, E. 1974. Potential pathway for bone resorption in human periodontal disease. *J. Periodontol.* 45: 338-343.
- Hausmann, E. & Kaufman, E. 1969. Collagenase activity in a particulate fraction from *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochim. Biophys. Acta* 194: 612-615.
- Hausmann E., Raisz, L.G. & Miller W.A. 1970. Endotoxin stimulation of bone resorption in tissue cultures. *Science* 168: 862-864.
- Hentschel, G. & Blobel H. 1968. Untersuchung über Staphylokokken-Fibrinolysin. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig.* 206 (2): 193-201.
- Hofstad, T. 1970. Biological activities of endotoxin from *Bacteroides melaninogenicus*. *Arch. Oral. Biol.* 15: 343-349.
- Hofstad, T. 1974. The distribution of heptose and 2-keto-3-deoxyoctonate in Bacteroidaceae. *J. Gen. Microbiol.* 85: 314-320.
- 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.
- Laughon B.E., Syed S.A. & Loesche W.J. 1982. Rapid identification of *Bacteroides gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* 15: 345-346.
- Lindhe J., Hamp S.E. & Löe, H. 1973. Experimental periodontitis in the beagle dog. *J. Periodont. Res.* 8: 1-10.
- Löe, H., Theilade, E. & Jensen, S.B. 1965. Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.* 36: 177-187.
- MacDonald, J.B., Gibbons, R.J. & Socransky, S.S. 1960. Bacterial mechanisms in periodontal disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85: 467-478.
- Marsh, P.D. & Martin, M.V. (ed). 1984. *Oral microbiology*. 2nd ed. Am. Soc. Microbiol., Washington.
- Mayrand, D. & Grenier, D. 1985. Detection of collagenase activity in oral bacteria. *Can. J. Microbiol.* 31:134-138.
- Mayrand, D., McBride, B.C., Edwards, T. & Jensen, S. 1980. Characterization of *Bacteroides asacharolyticus* and *B. melaninogenicus* oral isolates. *Can. J. Microbiol.* 26: 1178-1183.
- Mergenhagen, S.E., Hampp, E.G. & Scherp, H.W. 1961. Preparation and biological activities of endotoxins from oral bacteria. *J. Infect. Dis.* 108: 304-310.
- Mitoma, C., Smith, T.E., Davidson, J.D., Udenfriend, J., Da Costa, F.M. & Sjoerdsma, A. 1959. Improvements in methods for measuring hydroxyproline. *J. Lab. Clin. Med.* 53: 970-976.
- Moore W.E.C., Holdeman L.V., Smibert R.M., Good I.J., Burmeister J.A., Palcanis K.G & Raney R.R. 1982. Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect. Immun.* 38: 651-667.
- Page R.C. & Schroeder H.E. 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. *Lab. Invest.* 33: 235-249.
- Porschen, R.K. & Sonntag, S. 1974. Extracellular deoxyribonuclease production by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.* 27: 1031-1033.
- Rosa, I.V., Carvalho, J.C., Houser, R.H. & Döbereiner, J. 1976. Influência de ração balanceada sobre a "cara inchada" (doença periodontária) de bezerros. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.*, 11: 59-63.
- Rudek, W. & Haque, R. 1976. Extracellular enzymes of the genus *Bacteroides*. *J. Clin. Microbiol.* 4: 458-460.
- Sazaki S. 1979. Biological activity of lipopolysaccharides isolated from bacteria in human periodontal lesions. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 20: 159-174.
- Slots J. 1982. Importance of black-pigment *Bacteroides* in human periodontal disease, p. 27-45. In: Genco R.J. & Mergenhagen S.E. (ed). *Host-parasite interactions in periodontal disease*. Am. Soc. Microbiol., Washington.
- Slots, J. & Genco, R.J. 1984. Black-pigmented *Bacteroides species*, *Capnocytophaga species* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J. Dent. Res.* 63: 412-421.
- Slots J. & Hausmann E. 1979. Longitudinal study of experimentally induced periodontal disease in *Macaca arctoides*. Relationship between microflora and alveolar bone loss. *Infect. Immun.* 23: 260-269.
- Smith R.F. & Willet N.P. 1968. Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin-sulfatase-producing microorganisms. *Appl. Microbiol.* 16: 1434-1436.
- Socransky, S.S. 1970. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. Dent. Res.* 49: 203-222.
- Steffen, E.K. & Hentges, D.J. 1981. Hydrolytic enzymes of anaerobic bacteria isolated from human infections. *J. Clin. Microbiol.* 14: 153-156.
- Sveen, K. & Skaug, N. 1980. Bone resorption stimulating by lipopolysaccharides from *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Veillonella*, and by lipid A and the polysaccharide part of *Fusobacterium* lipopolysaccharide. *Scand. J. Dent. Res.* 88: 535-542.
- Syed, S.A., Svanberg, M. & Svanberg, G.K. 1980. The predominant cultivable dental plaque flora of beagle dogs with gingivitis. *J. Periodont. Res.* 15: 123-136.
- Wellish, G., Cohen, E., Cahane, Z. & Horowitz, J. 1984. Simple method for collagenase determination in 38 *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Clin. Microbiol.* 20: 1020-1021.
- Westphal O., Luderitz O. & Bister F. 1952. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturf.* 7b: 148-155.
- Wilkström M., Elwing H. & Linde A. 1981. Determination of proteolytic activity: a sensitive and simple assay utilizing adsorbed to a plastic surface and radial diffusion in gel. *Anal. Biochem.* 118: 240-246.