

Diagnóstico laboratorial da infecção periodontal

Aline Cavalcanti VIANA^a, Carolina Freire de Carvalho CALABRICH^b,

Silvana Regina Perez ORRICO^c

^a*Cirurgiã-Dentista, Aluna do Curso de Mestrado da Pós-Graduação em Periodontia, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia, UNESP, 14801-903 Araraquara - SP*

^b*Cirurgiã-Dentista, Aluna do Curso de Especialização em Ortodontia, Departamento de Odontologia Social e Pediátrica, UFBA, Salvador, BA*

^c*Professor Adjunto do Depto de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia, UNESP, 14801-903 Araraquara - SP*

Viana AC, Calabrich CFC, Orrico SRP. Laboratorial diagnosis of the periodontal infection. Rev Odontol UNESP. 2006; 35(2): 133-141.

Resumo: Atualmente, existem diversos métodos para a detecção de microrganismos periodontopatogênicos. Os testes laboratoriais são complementares ao exame clínico periodontal, podendo auxiliá-lo no diagnóstico e na escolha da conduta terapêutica a ser adotada. O objetivo deste trabalho é realizar uma revisão crítica dos principais testes disponíveis para o diagnóstico laboratorial da infecção periodontal.

Palavras-chave: *Técnicas microbiológicas; técnicas e procedimentos de laboratório; periodontite.*

Abstract: At this moment, there are several methods for the detection of periodontopathic bacteria. The laboratorial tests are complementary to the periodontal clinic examination, they can be an aid in the periodontics diagnostic and treatment decisions. The purpose of the authors is to present the principal tests used in the laboratorial diagnosis of the periodontal infections.

Keywords: *Microbiological techniques; laboratory techniques and procedures; periodontitis.*

Introdução

A associação da placa bacteriana com a inflamação gengival foi demonstrada pelo estudo clínico e microbiológico de Løe et al.¹.

Após diversos estudos, atualmente é aceita a existência de duas placas distintas: uma anaeróbia facultativa gram-positiva e uma anaeróbia gram-negativa. Os microrganismos anaeróbios gram-negativos são apontados como um dos fatores etiológicos mais importantes para o início e a progressão da doença periodontal^{2,3}.

Contudo, apenas poucos microrganismos apresentam significância na etiologia da periodontite. Fatores como o potencial de virulência, bem como um aumento da massa crítica e a conseqüente resposta tecidual do hospedeiro influenciariam o processo⁴.

As espécies consideradas mais importantes são *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*). Outras

espécies consideradas intimamente ligadas à periodontite são *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* e espiroquetas, por exemplo *Treponema denticola*⁵ (Tabela 1).

O desafio dos pesquisadores tem sido identificar, de forma simples, por meio de testes diagnósticos, os pacientes e/ou sítios infectados por patógenos periodontais, esclarecer os mecanismos patogênicos e, assim, fornecer subsídios para o tratamento preventivo ou curativo.

O objetivo deste trabalho é descrever os principais testes utilizados no diagnóstico laboratorial da infecção periodontal.

Revisão de literatura

Os procedimentos tradicionais utilizados para o diagnóstico da doença periodontal (DP), tais como profundidade de sondagem, nível de inserção e avaliação radiográfica,

Tabela 1. Microrganismos relacionados à doença periodontal

Microrganismos	Gram	Morfologia	Características
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Negativo	Bastonete	Anaeróbico facultativo
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Negativo	Bastonete	Anaeróbico
<i>T. forsythensis</i> (<i>B. forsythus</i>)	Negativo	Bastonete (fusiforme)	Anaeróbico
<i>Treponema denticola</i>	Negativo	Espiroquetas (helicoidais)	Anaeróbico
<i>Prevotella intermedia</i>	Negativo	Bastonete (arredondado)	Anaeróbico
<i>Eikenella corrodens</i>	Negativo	Bastonete	Anaeróbico facultativo
<i>Campylobacter rectus</i>	Negativo	Vibrião móvel	Anaeróbico

forneçam a informação da experiência passada da doença, mas não da presente atividade sítio-específica, nem da possibilidade de futura perda de inserção^{6,7}.

Contudo, técnicas avançadas de diagnóstico têm por finalidade a detecção precoce dos sítios susceptíveis a episódios futuros de destruição periodontal previamente às suas manifestações clínicas⁸.

Entre os testes microbiológicos disponíveis, podem ser citados: cultura bacteriana, microscopia de contraste de fase e de campo escuro, métodos enzimáticos, testes imunológicos e técnicas de biologia molecular.

Cultura bacteriana

O método de cultura, ou seja, o cultivo, o isolamento e a identificação das espécies periodontopatogênicas, é considerado como padrão ouro quando comparado às outras metodologias⁹. Nesse método, a placa bacteriana é semeada em um meio seletivo ou não-seletivo, e a microbiota cultivável predominante é identificada¹⁰. Considerado o único método existente capaz de identificar novas espécies, consegue ainda detectar múltiplas espécies bacterianas simultaneamente e até algumas inesperadas¹¹. Sua grande vantagem é a possibilidade de verificar a sensibilidade microbiana aos antibióticos⁴.

Contudo, é de pouca praticidade por se tratar de um processo demorado, além de muito oneroso para ser utilizado rotineiramente^{12,13}. Outra desvantagem é a limitação técnica pela dificuldade de estabelecer espécies quando estas estão em número reduzido^{11,14}. Além disso, o teste de cultura nem sempre pode revelar a real população microbiana, já que algumas bactérias na bolsa periodontal não são viáveis *in vitro*^{10,15}.

Algumas bactérias importantes encontradas no biofilme subgingival, como *Treponema* sp. e *Tannerella forsythensis*, que requerem condições estritas de crescimento, como condições de anaerobiose, são difíceis de serem detectadas por meio de cultura¹⁶. O cultivo e a identificação de outras espécies, como o *C. rectus*, também são extremamente difíceis¹⁷.

Microscopia

A microscopia de contraste de fase e a de campo escuro têm sido usadas na avaliação de amostras de placa bacte-

riana⁴, e a utilidade dessas técnicas para a Periodontia foi descrita por Callens¹⁸. A microscopia de contraste de fase é baseada em dois princípios da geometria, amplitude e comprimento de onda, para criar uma imagem das células iluminadas; já a microscopia de campo escuro utiliza raios de luz que, através de uma inclinação específica, dirigem-se para o objeto formando uma imagem brilhante num fundo escuro.

O exame microscópico não é aceito comumente pelos clínicos, embora seja tecnicamente um procedimento simples, uma vez que exige investimento elevado e permite determinar apenas a presença e/ou a semi-quantificação de tipos morfológicos sem a identificação da espécie microbiana¹³. Por isso, sua principal utilidade seria na observação de uma mudança no grupo bacteriano predominante no sítio periodontal após a terapia⁴.

Métodos enzimáticos

As bactérias mais frequentemente associadas à periodontite são microrganismos anaeróbios gram-negativos e podem utilizar principalmente proteínas e peptídeos como fonte de energia¹⁹. Assim, uma ou mais enzimas proteolíticas, exclusivas dessas bactérias, serviriam como marcadores moleculares e, conseqüentemente, do risco e/ou da infecção causada por esses microrganismos¹⁹.

O peptídeo sintético N-Benzoil-DL-Arginina-2-Naftilamida (BANA), por sofrer hidrólise pela microbiota subgingival, foi o primeiro substrato a ser sugerido como sendo de possível valor diagnóstico²⁰. O teste é realizado colocando-se uma amostra de placa dental numa tira de papel impregnada com o peptídeo BANA. Caso haja pelo menos um dos três grupos microbianos (*T. forsythensis* (*B. forsythus*), *T. denticola* e *P. gingivalis*), o BANA é hidrolisado promovendo uma reação de cor (do azul ao preto), cuja intensidade é correspondente à quantidade desses microrganismos⁴.

O início da utilização do método enzimático, BANA, ocorreu em 1982. Os autores procuraram identificar o perfil enzimático de três grupos de microrganismos que poderiam estar envolvidos na etiologia da doença periodontal²¹. Contudo, esse teste foi incapaz de distinguir as proporções relativas de cada uma das três bactérias (*T. forsythensis*

(*B. forsythus*), *T. denticola* e *P. gingivalis*), além de não poder identificar a presença de outros periodontopatógenos importantes, ou, até mesmo, identificar os patógenos testados quando presentes em número reduzido^{4,9}.

Segundo Bretz, Loesche²², o teste BANA tem as seguintes aplicações na Periodontia: no diagnóstico inicial; na determinação da efetividade do tratamento inicial e da necessidade de modalidades adicionais de tratamento; em visitas de manutenção e para prever possíveis episódios de inflamação e perdas periodontais futuras.

Schmidt et al.²³ afirmam que o teste BANA é um indicador positivo da presença de espécies periodontopatogênicas da placa subgingival. Contudo, o estudo realizado por Tunes et al.²⁷ relata que a colonização subgingival, detectada por esse teste, é influenciada por microrganismos da placa supragingival.

A apresentação do teste BANA, denominada de fase sólida, foi desenvolvida com o intuito de possibilitar que a leitura dos resultados fosse feita no consultório, em um tempo reduzido (15 minutos), tornando-o prático e acessível^{20,22-26}.

Testes imunológicos

A DP inflamatória é considerada uma resposta à ação das bactérias contidas no biofilme dentário. Um dos mecanismos propostos é o da difusão de produtos bacterianos através do epitélio do sulco gengival, o que provoca uma resposta inflamatória e imune²⁸. Forgas, Nilius²⁹ relataram que os métodos imunológicos podem ser utilizados para avaliar espécies bacterianas, envolvendo reação antígeno - anticorpo. Esses métodos são mais apropriados para detectar microrganismos específicos em amostras clínicas, com a vantagem de não requererem bactérias cultiváveis, promovendo uma estimativa quantitativa ou semiquantitativa dos microrganismos-alvo⁹.

Nisengard et al.³⁰, em seu estudo, sugeriram que o exame de Aglutinação de Látex pode ser utilizado na detecção de patógenos periodontais. Esse método envolve o uso de “microesferas” de látex revestidas com o anticorpo espécie-específico que, ao entrar em contato com os antígenos da superfície celular, ou extratos de antígeno das espécies bacterianas, desencadeia uma ligação cruzada, formando complexos antígeno-anticorpo, geralmente entre 2 e 5 minutos³¹. A reação cruzada dos anticorpos é o maior problema do teste. Outra desvantagem é a detecção de apenas microrganismos com antígenos acessíveis, além de não ser capaz de avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos^{5,7,9}.

A Citometria de fluxo ou Citofluorografia tem sido aplicada rotineiramente para estudar bactérias bucais como *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans* e *P. gingivalis*³². O procedimento envolve a reação de bactérias da placa com anticorpos específicos marcados com fluoresceína. Utiliza-

se o citômetro de fluxo, que leva à incidência de um feixe de raios laser na suspensão obtida pelo biofilme dentário e pelos anticorpos específicos a essas bactérias. As células dispersam a luz em diferentes ângulos, que são medidos por detectores apropriados. Como cada tipo celular possui um padrão e volume de reflexão característicos, o procedimento permite a identificação dos microrganismos³³. Essa técnica apresenta como desvantagem a necessidade de aparelhagem dispendiosa^{9,34}.

O ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) envolve a ligação de reagentes sorológicos (anticorpos) aos orifícios das placas de poliestireno (previamente sensibilizadas pelo antígeno bacteriano) ou nas membranas colocadas em sua base para absorção. Essa ligação é detectada por uma reação de cor, que pode ser avaliada visualmente ou medida por um espectrofotômetro, cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de bactérias da amostra^{9,29,35,36}. O ELISA oferece identificação rápida e quantitativa de patógenos periodontais, e estudos clínicos têm mostrado que esse teste é, no mínimo, tão sensível e específico quanto os métodos de cultura padrão na identificação de microrganismos subgingivais³⁷.

Diversos pesquisadores têm utilizado, também, a Microscopia de Imunofluorescência, direta e indireta, para identificar patógenos. São empregados anticorpos combinados com fluoresceína que se ligam ao antígeno e, posteriormente, são examinados em microscópio de imunofluorescência. É um teste rápido para a análise qualitativa, mas demorado para a quantitativa. As limitações dos testes diretos e indiretos incluem o uso de anticorpos monoclonais, que são extremamente específicos, podendo resultar em falso-negativo³⁴. Apesar de detectarem células bacterianas em pequenas quantidades e não necessitarem de células viáveis, esses testes exigem experiência técnica, reagentes específicos e microscópio de fluorescência^{35,38}.

O teste Membrana de Imunoanálise é destinado a detectar níveis de colonização compatíveis com o comprometimento periodontal do sítio infectado. É fornecido sob o formato de um *kit*, pelo qual a detecção e a diferenciação do microrganismo ocorrem em aproximadamente 5 minutos e os resultados são interpretados visualmente. A viabilidade bacteriana não influencia no resultado³⁹.

Os preparos monoclonais de anticorpos na Análise *dot-blot* permitem a avaliação de várias amostras de placa ao mesmo tempo, sendo um método econômico, simples e conveniente. A técnica não necessita de equipamento especial, pode ser realizada no consultório, e o resultado é obtido em cerca de 2 horas e meia¹⁷.

Técnicas de biologia molecular

As técnicas de análise de DNA e RNA baseiam-se na capacidade de hibridização do DNA com seqüências com-

plementares de DNA ou RNA. Devido à alta sensibilidade e especificidade, esses testes são importantes na detecção de patógenos de difícil cultivo, de microrganismos que compõem uma microbiota mista ou ainda daqueles presentes em números reduzidos⁴⁰. Algumas técnicas de hibridização são capazes de fornecer um acesso simultâneo a mais de 40 espécies bacterianas⁴¹.

Os testes com sonda de DNA são realizados a partir da purificação do DNA bacteriano de uma espécie alvo, ou seja, o DNA fragmentado e purificado em partículas menores. Os fragmentos são marcados e ligados ou hibridizados com o DNA bacteriano isolado da mesma espécie. As amostras são enviadas ao laboratório e colocadas em um filtro, e o DNA marcado poderá ser evidenciado em filme fotográfico. Quanto mais pontos escuros estiverem sensibilizando o filme, maiores serão as quantidades de DNA marcado e, conseqüentemente, da espécie-alvo presente na amostra⁴². Contudo, cromossomos inteiros usados como sondas de DNA podem resultar em reação cruzada ou resultados falso-positivos⁴³.

De acordo com Stefani et al.⁴⁴ e Liu et al.⁴⁵, esse é o método mais sensível para a detecção de patógenos periodontais. Entretanto, sua utilização clínica é questionável, pois a identificação de um patógeno não implica em diagnóstico preciso, uma vez que, muitas vezes, é necessária a associação entre várias espécies para o aparecimento dos sinais clínicos da doença periodontal⁴⁴.

Komiya et al.⁴⁶ desenvolveram um teste baseado em sonda de DNA, realizado manualmente em consultório, para a detecção de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*. O tempo total do teste é de 2 horas, e é utilizada uma placa de cultura para a sua realização. Outra sonda de DNA rápida, usando placa de cultura, foi relatada por Tanner et al.⁴⁷, sendo este teste automatizado, com resultados obtidos em 35 minutos.

A Análise de endonuclease de restrição é feita a partir de endonucleases, que são enzimas capazes de reconhecer e clivar o DNA de fita dupla em seqüências específicas de genes. Estes fragmentos são separados por eletroforese, corados e visualizados em luz ultravioleta, havendo padrões e fragmentos específicos a cada amostra microbiana⁴⁸. Assim, a comparação do padrão eletroforético dos fragmentos de DNA revela uma homogeneidade ou uma heterogeneidade genética com a amostra estudada⁴⁹.

A técnica de *Checkerboard DNA-DNA*, desenvolvida por Socransky et al.⁴¹, é baseada na utilização de genomas inteiros e sondas de DNA marcadas por digoxigenina. Essa técnica facilita o processamento de amostras de placa, respeitando a múltipla hibridização de 40 espécies em um único teste. Os sinais quimiofluorescentes resultantes da hibridização são quantificados e utilizados para avaliar a sensibilidade e especificidade das sondas⁵⁰. As sondas de DNA utilizadas nessa tecnologia são comumente ajustadas para detectar

10⁴ células de cada espécie, sendo necessários, portanto, equipamentos e laboratórios especializados. Esses fatores levaram à restrição do uso da técnica para fins diagnósticos, usada, contudo, em pesquisas epidemiológicas^{9,51}.

A Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)⁵² é uma amplificação in vitro de seqüências de nucleotídeos (*primer*) de DNA ou RNA por meio de repetidos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão dos mesmos por meio da polimerase do DNA⁵³. A sensibilidade e a especificidade extremas dessa técnica permitem a detecção de 10 patógenos entre uma amostra da ordem de 10⁶ bactérias⁵⁴. O PCR é teoricamente capaz de detectar um único microrganismo numa amostra clínica pela sua habilidade de transformar um único segmento de DNA em milhares de cópias idênticas. Esse método tem sido aplicado em estudos epidemiológicos de transmissão familiar de supostos patógenos periodontais^{11,42,48}. Contudo, podem ocorrer resultados falso-negativos por variações na seqüência de nucleotídeos usados como *primer*¹¹. A tecnologia padrão do PCR apresenta, ainda, limitação quanto à quantificação do microrganismo.

O advento recente do *real-time PCR* com *primers* espécie-específico fornece um método altamente sensível e específico para a detecção precisa do microrganismo-alvo e, ao mesmo tempo, permite a quantificação de espécies bacterianas individualmente¹¹. O teste mostra-se capaz de distinguir diferentes espécies de espiroquetas⁵⁵. Há casos em que a sonda é dispensada, reduzindo os preparos e o custo da técnica⁵⁶. O *real-time PCR* é mais preciso e menos laborioso que os métodos de *PCR* quantitativos anteriores⁵⁷. Além disso, não necessita de manejo manual posterior, prevenindo uma potencial contaminação do produto no transporte⁵⁸. Contudo, pode apresentar incompatibilidade de certas plataformas com fluorescências químicas⁵⁷.

Discussão

A cultura microbiana é o método clássico de diagnóstico para detecção de microrganismos do ambiente subgingival, sendo, por isso, utilizada muitas vezes como padrão ouro para comparação com outros métodos (Tabela 2).

Loesche et al.⁵⁹ realizaram um estudo comparativo entre os testes BANA, microscopia de imunofluorescência indireta, sonda de DNA e cultura microbiana quanto à capacidade de detecção de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis* (*B. forsythus*). Os três primeiros testes apresentaram alta sensibilidade (90 a 96%) e exatidão (83 a 92%), demonstrando uma equivalência entre eles na detecção da infecção, enquanto a cultura obteve apenas 50 a 62% de acurácia.

Em 2002, Eick, Pfister⁶⁰ realizaram uma comparação entre um método comercial baseado em PCR (micro-Dent[®]) e a cultura microbiana para a detecção de espécies periodontopatogênicas. Foi avaliada a presença de

Tabela 2. Resumo das vantagens e desvantagens dos métodos apresentados

Técnicas	Identificação de novas espécies	Deteção de múltiplas espécies	Sensibilidade Microbiana a antibióticos	Necessidade de bactérias viáveis	Sensibilidade e especificidade	Quantificação	Custo	Duração	Simplicidade
Cultura Bacteriana	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Alto	Longa	Não
Microscopia	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Alto	Curta	Sim
BANA	Não	Não	Não	Não	baixa	Não	Baixo	Curta	Sim
Aglutinação de látex	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Alto	Curta	Sim
Citometria de fluxo	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Alto	Longa	Não
ELISA	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Alto	Longa	Não
Microscopia de imunofluorescência	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Alto	Longa	Não
Membrana de imuno-análise	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Baixo	Curta	Sim
Análise de dot-blot	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Baixo	Longa	Sim
Sonda de DNA	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Alto	Longa	Não
Endonuclease de restrição	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Alto	Longa	Não
Checkerboard DNA-DNA	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Alto	Longa	Não
PCR	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Alto	Longa	Não
PCR-RT	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Alto	Longa	Média

A. actinomycetemcomitans, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* (*Bacteroides forsythus*), *P. intermedia* e *T. denticola*. Após análise dos resultados, os autores relataram que o micro-Dent® se mostrou bastante sensível e específico para os cinco patógenos avaliados, podendo ser indicado como auxiliar no diagnóstico microbiológico.

A cultura microbiana foi também comparada à sonda de DNA na identificação de *P. gingivalis* e *T. forsythensis* (*B. forsythus*) na placa bacteriana subgingival. A porcentagem de sítios com patógenos detectados pela sonda de DNA foi um pouco mais elevada (*T. forsythensis* (*B. forsythus*): 79,2%; *P. gingivalis*: 36,8%) do que a detectada pelo método de cultura (*T. forsythensis* (*B. forsythus*): 70,4%; *P. gingivalis*: 30,8%). Os autores sugeriram que o melhor desempenho da sonda de DNA seria justificado pela capacidade desta em detectar até mesmos microrganismos não-viáveis e pela dificuldade da cultura em suprir as exigências de crescimento dessas bactérias¹⁰.

Outros estudos comparativos têm sido realizados com a técnica de *Real-time PCR* (PCR-RT). Lau et al.¹¹ avaliaram a capacidade de detecção e quantificação do PCR-RT para o *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythensis* (*B. forsythus*) em amostras de placa subgingival obtidas de indivíduos em diferentes condições periodontais, comparada à do método convencional de cultura microbiana. Os resultados demonstraram um bom nível de concordância entre o PCR-RT e a cultura para *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*; já em relação à *T. forsythensis* (*B. forsythus*), o PCR-RT mostrou-se superior.

De forma semelhante, Jervoe-Storm et al.⁶¹ realizaram uma comparação entre essas técnicas, acrescentando, contudo, dois periodontopatógenos: *Fusobacterium nucleatum* e *P. intermedia*. A concordância entre os métodos foi excelente para *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, satisfatória para *T. forsythensis* (*B. forsythus*) e fraca para *F. nucleatum* e *P. intermedia*.

Frente a grande variedade de testes de diagnóstico, o profissional deve conhecer suas características para escolher aquele que melhor se adapte às suas necessidades clínicas.

A microscopia de contraste de fase e a de campo escuro não têm sido muito utilizadas no meio clínico devido ao seu alto custo e à incapacidade de identificação da espécie microbiana^{4,13}.

Em relação aos testes enzimáticos, o Teste BANA teve um grande uso em consultório devido à simplicidade, objetividade e rapidez²³. Entretanto, problemas como baixa sensibilidade (Evalusite®) e especificidade (Perioscan®) levaram-no a um rápido desaparecimento do mercado⁹.

Os testes imunológicos envolvem, basicamente, reação antígeno-anticorpo. O exame de Aglutinação de Látex apresenta desvantagem na reação cruzada dos anticorpos e no fato de detectar somente microrganismos com antígenos acessíveis. Quanto à Citometria de fluxo, esta é menos

indicada devido à necessidade de aparelhagem dispendiosa e ao escasso fornecimento de dados sobre o biofilme bacteriano^{9,34}. Para uma identificação mais rápida, sensível e específica de patógenos periodontais, pode-se indicar o teste ELISA³⁷. Entretanto, deve ser levado em conta o custo do *kit* empregado. As Microscopias de imunofluorescência direta e indireta têm sido usadas devido à sua rapidez para análise qualitativa e capacidade na detecção de células bacterianas em pequenas quantidades. Porém, possuem limitações como: uso de anticorpos monoclonais, necessidade de profissional com experiência técnica e do microscópio de fluorescência. A membrana de imuno-análise tem como vantagem a sua praticidade, já que é fornecida em forma de *kit*, demonstrando uma rápida apresentação do resultado.

Em relação aos testes de detecção molecular, a Sonda de DNA tem uso clínico restrito devido ao alto custo e à dificuldade na fase laboratorial⁴⁴. Por outro lado, a Análise de Endonuclease de Restrição mostrou grande importância na detecção da grande variabilidade genética entre as espécies. Já a técnica de hibridização “*Checkerboard DNA-DNA*” tem a vantagem de não requerer bactérias viáveis e permitir a avaliação de grande número de amostras e múltiplas espécies^{9,51}. A técnica de PCR apresenta vantagem pela extrema sensibilidade e especificidade^{11,42,48}. Contudo, a necessidade de equipamento especializado¹⁷ e suas limitações quanto à quantificação dos microrganismos têm limitado seu uso¹¹. Em virtude disso, o advento do PCR-RT pode ser considerado uma solução para esse problema, já que, além de apresentar alta sensibilidade e especificidade, ainda é capaz de quantificar as espécies bacterianas individualmente. Isso justifica seu uso em estudos epidemiológicos e, ainda, como método adicional no diagnóstico clínico periodontal^{11,14,55}.

Assim, pode-se observar que existe uma tendência à substituição das análises tradicionais, baseadas mais no fenótipo do patógeno, pelas rápidas tecnologias de amplificação e detecção baseadas em ácidos nucleicos⁵⁷. Contudo, são necessários mais estudos clínicos que possam validar técnicas como o PCR-RT, demonstrando sua utilidade no diagnóstico e a relação custo-benefício⁹.

Conclusão

Dado o seu caráter multifatorial, a doença periodontal, para ser tratada corretamente, pode, em algumas situações, requerer exames complementares em associação ao exame clínico.

Apesar do grande número de testes microbiológicos existentes, não existe um que consiga, isoladamente, reunir todas as características ideais, sendo necessário, por isso, que o profissional saiba avaliar cada característica para escolher aquele que melhor se adapte às diversas situações.

Espera-se que, no futuro, os testes sejam capazes de distinguir bactérias virulentas e não virulentas e de diferenciar

microrganismos endógenos e exógenos do sulco gengival, caracterizando indivíduos susceptíveis ou resistentes à doença periodontal. Além disso, é preciso estabelecer o número de patógenos capaz de induzir doença, pois só assim o clínico podera interferir em seu curso, impedindo o início ou a recidiva da patologia periodontal.

Referências

- Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965;36:177-87.
- Newman HN. Plaque and chronic inflammatory periodontal disease. A question of ecology. *J Clin Periodontol.* 1990;17:533-41.
- Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease – current concepts. *J Periodontol.* 1992;63:322-31.
- Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2004;34:49-56.
- Genco RJ, Kornman K, Williams R, Offenbacher S, Zambon JJ, Ishikawa I, et al. Consensus report periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996;1: 926-32.
- Dreyer WP. Technological advances in the clinical diagnosis of periodontal diseases. *Int Dent J.* 1993;43:557-66.
- Louie H, Larjava H. A critical evaluation of diagnostic tests for periodontal diseases *J Periodontol.* 1994;60:1042-8.
- Pilatti GL, Ferreira ZA, Pereira OL. Métodos avançados de diagnóstico da doença periodontal. *RGO.* 1998; 46:230-4.
- Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol.* 2004;31:1034.
- Tsai CY, Wolff LF, Germaine G, Hodges J. A rapid DNA probe test compared to culture methods for identification of subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol.* 2003;30:57-62.
- Lau L, Sanz, M, Herrera D, Morillo JM, Martyn C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2004;31:1061-9.
- Chan EC, Siboo R, Keng T, Psarra N, Hurley R, Cheng SL, et al. *Treponema denticola* (ex. Brumpt 1925) sp. nov., nom. rev., and identification of new spirochete isolates from periodontal pocket. *Int J Syst Bacteriol.* 1993: 43; 196-203.
- Grisi MFM, Silva Neto CR, Salvador SL, Ito IY. Teste Bana - análise da literatura, utilização na clínica de periodontia. *Periodontia.* 1996; 5:352-8.
- Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Martyn C, Silva A. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol.* 2004;31:1054-60.
- Wolff LF, Aeppli DM, Pihlstrom B, Anderson L, Stoltenberg J, Osborn J, et al. Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1993;20:699-706.
- Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen.nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:841-9.
- Ihara H, Miura T, Kato T, Ishihara K, Nakagawa T, Yamada S, et al. Detection of *Campylobacter rectus* in periodontitis sites by monoclonal antibodies. *J Periodontal Res.* 2003;38:64 -72.
- Callens A. Darkfield or phase contrast microscopy. Usefulness in periodontology. *Ned Tijdschr Tandheelkd.* 1992;99:381-4.
- Loesche WJ, Bretz W, Kerschensteiner D. Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoil-DL-arginine-naphthylamide. *J Clin Microbiol.* 1990;28:1551-9.
- Loesche WJ. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral Microbial Immunol.* 1986;1:65-72.
- Laughon BE, Syed SA, Loesche WJ. API ZYM system for identification of *Bacteroides spp.* and spirochetes of oral origin. *J Clin Microbiol.* 1982;15:97-102.
- Bretz WA, Loesche WJ. Characteristics of trypsin-like activity in subgingival plaque samples. *J Dent Res.* 1987;66:1668-72.
- Schmidt EF, Bretz WA, Hutchinson RA, Loesche WJ. Correlation of the hydrolysis of benzoyl-arginine-naphthylamide (BANA) by plaque with clinical parameters and subgingival levels of spirochetes in periodontal patients. *J Dent. Res.* 1988;67:1505-9.
- Loesche WJ, Syed SA, Stoll J. Trypsin-like activity in subgingival plaque. A diagnostic marker for spirochetes and periodontal disease? *J Periodontol.* 1987; 58:266-73.
- Fonseca L. Correlação entre o teste BANA da placa subgingival de crianças brasileiras, níveis de inflamação e presença de espiroquetas [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1990.
- Salvador S, Grisi MFM, Romanelli R, Schork A, Bretz W. Similarities of periodontal clinical and

- microbiological parameters in mother-child pairs. *Braz Dent J*. 1997;8:99-104.
27. Tunes UR, Fonseca L, Correia AP. Estudo de alterações periodontais em gestantes e sua relação com a microbiota de amostras da placa subgingival, detectada pelo teste BANA. *Periodontia*. 1999;8(1):73-86.
28. Kinane DF, Adonogianaki E, Moughal N, Mooney J, Thornhill M. Immunocytochemical characterization of cellular infiltrate, related endothelial changes and determination of GCF acute phase proteins during human experimental gingivitis. *J Periodontol Res*. 1991;26:286-8.
29. Forgas LB, Nilius AM. Assessing periodontal disease activity. The role of bacteriological, immunological and DNA assays. *J Dent Hyg*. 1991;65:188-93.
30. Nisengard RJ, Mikulski L, McDuffie D, Bronson P. Development of a Rapid latex agglutination test for periodontal pathogens. *J Periodontol*. 1992;63:611-7.
31. Barbosa e Silva E, Peruchi CMS, Silva FB, Cardozo WV, Ferreira HC, Garcia VG. Os atuais métodos para diagnóstico em periodontia. *JBC: J Bras Clin Estet Odontol*. 1999;3(16): 81-7.
32. Kornman KS. Detection and quantification of *Bacteroides gingivalis* in bacterial mixtures by means of flow cytometry. *J Periodontol Res*. 1984;19:570-3.
33. Cortelli SC, Cortelli JR, Auad RM, Jorge AOC. Métodos para detecção de patógenos periodontais. *PGR: Pós-Graduação em Revista*. 2000; 3:97-104.
34. Greenstein G. Microbiologic assessments to enhance periodontal diagnosis. *J Periodontol*. 1988;59:508-15.
35. Zambon JJ. Immunological assays for putative periodontal pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 1986;1:39-44.
36. Genco RJ, Zambon JJ. Clinical microbiology in the diagnosis and treatment of periodontal disease. *J Am Coll Dent*. 1989;56:19-27.
37. Melvin WL, Assad DA, Miller GA, Gher ME, Simonson L, York AK. Comparison of DNA probe and ELISA microbial analysis methods and their association with adult periodontitis. *J Periodontol*. 1994;65:576-82.
38. Gmur R, Guggenheim B. Monoclonal antibodies for the detection of periodontopathic bacteria. *Arch Oral Microbiol Immunol*. 1990;35:1455-515.
39. Snyder B, Ryerson CC, Corona H, Grogan EA, Reynolds HS, Contestable PB, et al. Analytical performance of an immunologic-based periodontal bacterial test for simultaneous detection and differentiation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia*. *J Periodontol*. 1996;67:497-505.
40. MacPhee IT, Muir KF. Dark ground microscopy in relation to 3 clinical parameters of chronic inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1986;12:900-4.
41. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994;17:788-92.
42. Zambon JJ. Periodontal disease: microbiological factors. *Ann Periodontol*. 1996; 1: 879-925.
43. Conrads G, Pelz K, Hughes B, Seyfarth I, Devine DA. Optimized oligonucleotides for the differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrecens*. *Oral Microbiol Immunol*. 1997;12:117-20.
44. Stefani A, Sallum AW, Lima AFM. Diagnóstico microbiológico através da sonda de DNA. *Periodontia*. 2001;11(3):18-21.
45. Liu L, Wen X, He H, Shi J, Ji C. Species-specific DNA probe for the detection of *Porphyromonas gingivalis* from adult chinese periodontal patients and healthy subjects. *J Periodontol*. 2003;74:1000-6.
46. Komiya A, Kato T, Nakagawa T, Saito A, Takahashi J, Yamada S, et al. A rapid DNA probe method for detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*. 2000;71:760-7.
47. Tanner ACR, Maiden MF, Zambon JJ, Thoren GS, Kent RL Jr. Rapid chair-side DNA probe assay of *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res*. 1998;33:105-17.
48. Armitage GC. Periodontal diseases: diagnosis. *Ann Periodontol*. 1996;1(1):37-215.
49. Newman MG, Sanz M. Diagnóstico por técnicas avançadas. In: Carranza Júnior FA, Newman MG. *Periodontia clínica*. 8a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 399-414.
50. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, et al. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19:352-62.
51. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol*. 2001;28:597-609.
52. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-50.
53. Lotufo RF. Técnicas microbiológicas no diagnóstico periodontal. In: Tunes UR, Rapp GE, coordenadores. *Atualização em periodontia e implantodontia*. São Paulo: Artes Médicas; 1999. P. 121-8.
54. Gumerlock PH, Tang Yj, Meyers FJ, Silva Jr J. Use of the polymerase chain reaction for the specific and direct detection of *Clostridium difficile* in human feces. *Rev Infect Dis*. 1991;16:1053-60.
55. Yoshida A, Kawada M, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Saito T, et al. TaqMan real-time polymerase chain reaction as-

- say for the correlation of *Treponema denticola* numbers with the severity of periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19:196-200.
56. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K. Rapid cycle real-time PCR. *Methods and applications.* Berlin: Springer-Verlag; 2001.
57. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:1292 -305.
58. Kubar A, Saygun I, Yapar M, Ozdemir A, Slots J. Real-time PCR quantification of cytomegalovirus in aggressive periodontitis lesions using TaqMan technology. *J Periodontal Res.* 2004;39:81-6.
59. Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, Van Poperin N, Hujjoel PP. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? *J Clin Microbiol.* 1992;30:4118-26.
60. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial nucleic acid based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2002;29:638-44.
61. Jervoe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dorfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2005;32:778-83.

