



FACULDADE DE  
MEDICINA DENTÁRIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Monografia de investigação – Artigo de revisão  
Mestrado Integrado em Medicina Dentária

**TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE PATOGÉNIOS PERIODONTAIS:  
COMPARAÇÃO ENTRE CULTURA BACTERIANA E PCR EM TEMPO  
REAL - REVISÃO**

Renaldo Menezes de Aragão Júnior

**Orientador:**

**Professor Daniel Perez Mongiovi**

**Professor Auxiliar Convidado (FMDUP)**

**Co-orientador:**

**Professor Doutor Rúben Miguel Pereira Fernandes**

**Professor Adjunto e Director do Departamento de Engenharia Biomédica do Instituto  
Politécnico do Porto**

Porto, Junho de 2011



FACULDADE DE  
MEDICINA DENTÁRIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Monografia de investigação – Artigo de revisão  
Mestrado Integrado em Medicina Dentária

**TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE PATOGÉNIOS PERIODONTAIS:  
COMPARAÇÃO ENTRE CULTURA BACTERIANA E PCR EM TEMPO  
REAL - REVISÃO**

Renaldo Menezes de Aragão Júnior

**Orientador:**

**Professor Daniel Perez Mongiovi**

**Professor Auxiliar Convidado (FMDUP)**

**Co-orientador:**

**Professor Doutor Rúben Miguel Pereira Fernandes**

**Professor Adjunto e Director do Departamento de Engenharia Biomédica do Instituto  
Politécnico do Porto**

Porto, Junho de 2011

**RENALDO MENEZES DE ARAGÃO JÚNIOR**

**TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE PATOGÉNIOS PERIODONTAIS:  
COMPARAÇÃO ENTRE CULTURA BACTERIANA E PCR EM TEMPO  
REAL – REVISÃO**

Monografia apresentada junto ao curso de Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, nas áreas de concentração de Biologia Celular e Molecular, Microbiologia e Periodontologia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Dentária.

**Orientador:**

**Professor Daniel Perez Mongiovi**

**Professor Auxiliar Convidado (FMDUP)**

**Co-orientador:**

**Professor Doutor Rúben Miguel Pereira  
Fernandes**

**Professor Adjunto e Director do  
Departamento de Engenharia  
Biomédica do Instituto Politécnico do  
Porto**

Porto, Junho de 2011

Dedico este trabalho a uma pessoa que sempre esteve ao meu lado, um exemplo de persistência, de dedicação e de luta a ser seguido: minha mãe, Adélia da Silva Aragão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, por todo o amor e dedicação para comigo, pelo carinho e apoio dispensados em todos os momentos que precisei, em especial a minha mãe Adélia, por ser tão dedicada e amiga, por ser a pessoa que mais me apoiou e acreditou na minha capacidade de vencer, meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir de meus sonhos, pelas horas de sono perdidas a preocupar-se comigo, sem dúvida a pessoa que mais me deu o incentivo para conseguir concluir esse trabalho.

Às minhas irmãs pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo, por todos os conselhos e pela confiança em mim depositada.

A todos os meus familiares que directamente ou indirectamente sempre me ajudaram e acreditaram em mim.

Aos amigos incondicionais Fernanda Sousa e Leonardo Afonso por me apoiarem sempre que foram solicitados, por se tornarem a minha segunda família.

Ao amigo Fernando Moleiro que, com a sua paciência e carinho, sempre teve uma palavra amiga de incentivo.

Ao meu Orientador Professor Daniel Perez Mongiovi e Co-Orientador Professor Doutor Rúben Miguel Pereira Fernandes pelo incentivo, simpatia e presteza no auxílio à realização desta Monografia.

Aos Professores da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto pelo espírito empreendedor na tarefa de multiplicar os seus conhecimentos.

A Deus por me ter dado forças e iluminado meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

*"As aparências para a mente são de quatro tipos.*

*As coisas ou são o que parecem ser;*

*Ou não são, nem parecem ser;*

*Ou são e não parecem ser;*

*Ou não são, mas parecem ser.*

*Posicionar-se correctamente frente a todos esses casos*

*É a tarefa dos sábios."*

*Epictetus, Século II d.C.*

## **RESUMO**

A correcta distinção dos microrganismos envolvidos na patogénese da doença periodontal torna-se importante para o entendimento da progressão da doença e adequado plano de tratamento. Foram desenvolvidos vários métodos de identificação e quantificação de microrganismos que são considerados extremamente sensíveis e precisos na caracterização das espécies bacterianas. Esta revisão bibliográfica tem por objectivo analisar trabalhos existentes na literatura, os quais investigaram comparativamente os métodos de Reacção em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) e a cultura bacteriana na identificação de patogénios periodontais. Através do método de cultura bacteriana é possível a identificação de novos microrganismos e realização de testes de sensibilidade a antibióticos. O RT-PCR é um teste molecular, que dentre as vastas aplicações se incluem a identificação e quantificação de espécies bacterianas. Estas são conseguidas através da amplificação enzimática de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA). Estes métodos moleculares são dotados de elevada sensibilidade, especificidade e menor tempo de trabalho quando comparados à cultura bacteriana. Uma boa concordância entre os resultados obtidos com as duas técnicas foi observada, excepto para as espécies que são de difícil processamento e cultivo em placas de anaerobiose. A alta sensibilidade e especificidade da RT-PCR justificam o seu uso em estudos epidemiológicos das doenças periodontais. A sua capacidade de precisão e quantificação também justificam a sua utilização como auxiliar no diagnóstico clínico de pacientes com doença periodontal. No entanto, é importante lembrar uma grande vantagem das técnicas de cultura, a sua capacidade de detecção de bactérias inesperadas, bem como permitir a determinação da resistência aos antibióticos, apesar de que, mesmo nestas áreas, começam a surgir alternativas moleculares de elevado rendimento.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Cultura Bacteriana, Patogénios Periodontais, Reacção em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), Periodontite, Diagnóstico Microbiológico em Periodontologia.

## **ABSTRACT**

The correct distinction of microorganisms in the periodontal pathogenesis has major importance for the understanding of the development of the disease and for the choice of an adequate plan for its treatment. Several methods for identification and quantification considered extremely sensitive and accurate for the characterization of bacterial species have been developed. The aim of this bibliographic revision is to analyze the literary works which are related to the comparative investigation of the methods of the quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and the bacterial culture in the identification of periodontal pathogens. Using bacterial culture methods it is possible the identification of new microorganisms and testing the sensitivity to antibiotics. The RT-PCR is a molecular approach for the identification and quantification of bacterial strains through enzymatic amplification of Deoxyribonucleic Acid (DNA) fragments, with high sensitivity, specificity and less working time when compared to the bacterial culture. It was observed a good adjustment between the results achieved with both techniques, except to the strains which are difficult to deal with and to test in anaerobic culture. The high sensitivity and specificity of RT-PCR justify its use in epidemiological studies of periodontitis. Its capacity of precision and quantification also justify its use as an auxiliary means in clinic diagnosis of patients with periodontitis. However, it is important to value a big advantage of the culture techniques, its capacity to detect unexpected bacteria as well as to determine the resistance to antibiotics.

## **KEY-WORDS**

Bacterial Culture, Periodontal Pathogens, Real-Time Polymerase Chain Reaction, Periodontitis, Microbiological Diagnosis in Periodontics

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	- 10 -
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	- 12 -
3. DESENVOLVIMENTO .....	- 13 -
3.1. Cultura Bacteriana .....	- 13 -
3.2 A técnica de PCR.....	- 15 -
3.3 RT-PCR .....	- 17 -
3.4 Cultura bacteriana vs. RT-PCR em Periodontologia .....	- 20 -
4. CONCLUSÃO.....	- 31 -
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	- 33 -

## 1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma doença inflamatória crónica de origem multifactorial provocada por um complexo de espécies bacterianas que interagem com os tecidos e células do hospedeiro, levando à libertação de substâncias e mediadores, alguns dos quais levam à destruição das estruturas periodontais, incluindo os tecidos de suporte do dente, como osso alveolar e ligamento periodontal<sup>1</sup>. Clinicamente pode ser caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte periodontais, podendo evoluir até à perda do elemento dentário. O reconhecimento da especificidade da placa subgingival e da existência de diferentes formas de infecções periodontais associadas a diferentes patogénios<sup>2</sup> tem levado pesquisadores e clínicos a um melhor entendimento desse processo patológico e, eventualmente, à elaboração de terapias específicas, com maiores probabilidades de sucesso.

O microambiente subgingival da bolsa periodontal é constituído por grande diversidade microbiana, com mais de 700 espécies isoladas de diferentes indivíduos, entretanto, poucas espécies estão associadas aos diferentes quadros da doença periodontal<sup>3,4</sup>.

Para que uma bactéria seja considerada como agente etiológico da doença periodontal deve-se observar os seguintes critérios<sup>5</sup>: 1) a bactéria deve estar presente em níveis elevados nos sítios activos de doença e inexistente ou presente em pequena quantidade em sítios saudáveis ou com doença inactiva; 2) a remoção da bactéria deve resultar em remissão dos sinais clínicos da doença; 3) os pacientes infectados devem apresentar titulação elevada de anticorpos específicos localmente (saliva e fluido gengival) e sistematicamente (soro) podendo ainda induzir a resposta imune celular; 4) a inoculação da bactéria em modelos animais deveria produzir o desenvolvimento de pelo menos algumas das características da doença; 5) os factores de virulência bacterianos devem estar correlacionados aos achados histopatológicos associados.

Devido à dificuldade na identificação de toda a microbiota e o entendimento de como eles interagem entre si e com o hospedeiro, estudos transversais e longitudinais foram e estão a ser realizados para tentar elucidar o papel etiológico de diferentes patogénios periodontais e formaram evidências que *Porphyromonas*

*gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*<sup>6,7,8</sup> estão envolvidos na periodontite. Evidências científicas sugerem ainda que outras bactérias isoladas da microbiota subgengival como *Campilobacter rectus*, *Porphyromonas endodontalis*, *Filifactor alocis*, *Prevotella tanneriae* são membros residentes da microbiota bucal e podem ser encontrados tanto em pacientes saudáveis como em maior quantidade em pacientes com a doença<sup>9</sup>. De regra geral, os quadros de saúde periodontal estão associados ao predomínio de cocos e bacilos gram-positivos, enquanto os quadros de gengivite estão associados a um ligeiro aumento na quantidade de cocos e bacilos gram-negativos e os quadros de periodontite estão associados ao predomínio de cocos e bacilos gram-negativos, aneróbios estritos ou facultativos.

Embora o papel etiológico dos patogénios periodontais esteja continuamente a ser investigado, o uso e utilidade dos testes diagnósticos na identificação e quantificação dessas bactérias na periodontite são controversos. Dessa forma, grande atenção tem sido dada ao desenvolvimento e aplicação de técnicas específicas, com o objectivo de contribuir para a identificação e caracterização de patogénios periodontais, para o conhecimento sobre as interacções microbianas e a relação com os factores clínicos da periodontite<sup>7,10,11</sup>. Historicamente, o método de cultura bacteriana é bastante utilizado em estudos de caracterização da composição da microbiota subgengival e até então considerado um método de referência em microbiologia. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular com o objectivo de detecção de patogénios periodontais permitiu não somente adquirir conhecimento da genética microbiana, mas também fixou as bases para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas melhoradas como a Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações, como a Reacção em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR). Este trabalho teve como objectivo comparar dois métodos de diagnóstico microbiológico utilizados para identificar e quantificar patogénios periodontais: cultura bacteriana e RT-PCR, dando especial relevo às vantagens e desvantagens destas técnicas, aos critérios que devem ser tidos em conta, quando se pretende utilizá-las, e quais os contributos para o tratamento e compreensão da doença periodontal.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Foi realizada uma pesquisa na base de dados PubMed, via rede de acesso da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. Foi definido um limite temporal delimitado entre o ano 1990 até à actualidade. As palavras-chave utilizadas na pesquisa foram: periodontitis, real-time polymerase chain reaction, anaerobic culture, periodontal pathogens, periodontal pathogen identification, real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture, periodontal microbiology, microbiological diagnosis in periodontics.

Foram seleccionados apenas artigos com versão integral disponível, entre artigos de investigação e de revisão bibliográfica, com informação pertinente e actual sobre o tema. Também foram consultados livros de referência nas áreas de Periodontologia, Microbiologia e Biologia Celular e Molecular.

### **3. DESENVOLVIMENTO**

Enquanto as bases científicas sustentadas pelas técnicas clássicas tiveram poucos acréscimos, os conhecimentos moleculares avançaram e continuam avançando rapidamente proporcionando, de forma incontestável, uma evolução na dinâmica do conhecimento científico e conseqüentemente nos benefícios das pesquisas científicas.

Diferentes métodos têm sido utilizados para detecção de patógenos periodontais de amostras subgengivais. Alguns desses métodos são utilizados estritamente para pesquisas, enquanto outros são adaptados ou modificados para uso clínico.

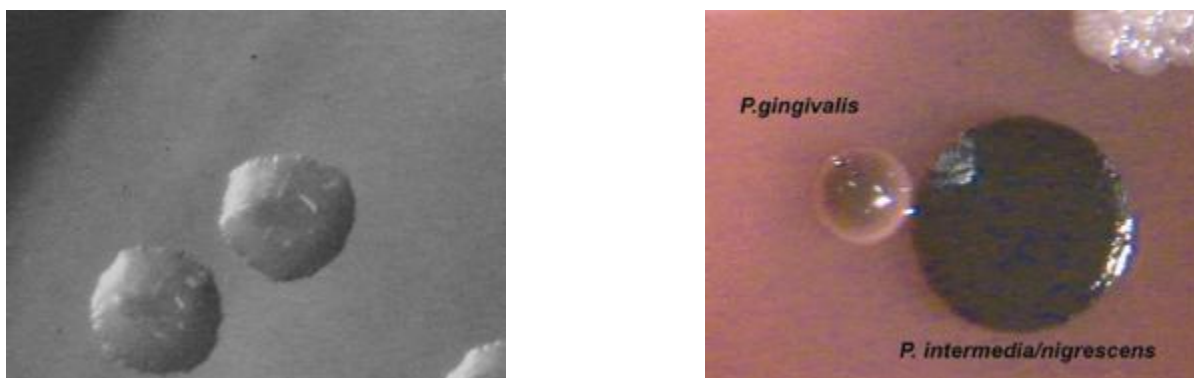
Na medicina dentária, em particular na Periodontologia, a cultura bacteriana e os novos testes de diagnóstico por meio de técnicas de biologia molecular, particularmente o PCR e suas variações, são os mais utilizados na identificação de patógenos periodontais. Este trabalho irá centrar-se na cultura bacteriana e em uma das variações da técnica de PCR, o RT-PCR.

#### **3.1. Cultura Bacteriana**

Na Medicina Dentária, a cultura bacteriana é um método clássico de diagnóstico de patógenos periodontais residentes no biofilme subgengival, sendo capaz de identificar novas espécies, oferecer mensuração quantitativa das espécies viáveis e realização de teste de resistência antibiótica. O resultado disto é que a cultura bacteriana é considerada o padrão ouro no diagnóstico microbiológico periodontal e continua a ser um importante meio de diagnóstico de diversas doenças<sup>6</sup>.

No método de cultura, as amostras são cultivadas anaerobicamente utilizando meios selectivos ou não, juntamente com vários testes bioquímicos de identificação (Figuras 1A e 1B). Esta técnica é capaz de quantificar e identificar a presença ou ausência de determinado microrganismo. A principal vantagem deste método é a possibilidade de se obter contagem absoluta ou relativa da espécie cultivada, como também é um método capaz de caracterizar novas espécies e avaliar a susceptibilidade a antibióticos<sup>12</sup>.

Dessa forma, ao permitir a quantificação de bactérias, a cultura bacteriana possibilita realizar comparação com a condição clínica do paciente, no estado de saúde e doença, bem como é capaz de determinar a proporção de cada micro-organismo em diferentes fases do tratamento, e com isso esclarecer o potencial papel dos mesmos na etiologia complexa da doença periodontal<sup>13</sup>.



**Figura1.** Em **A** observam-se colónias de *A. Actinomycetemcomitans*; Em **B** colónia de *P. gingivalis* ao lado de uma colónia de *P. intermédia*. FONTE: J Clin Periodontol 2004; 31: Pag.1035.

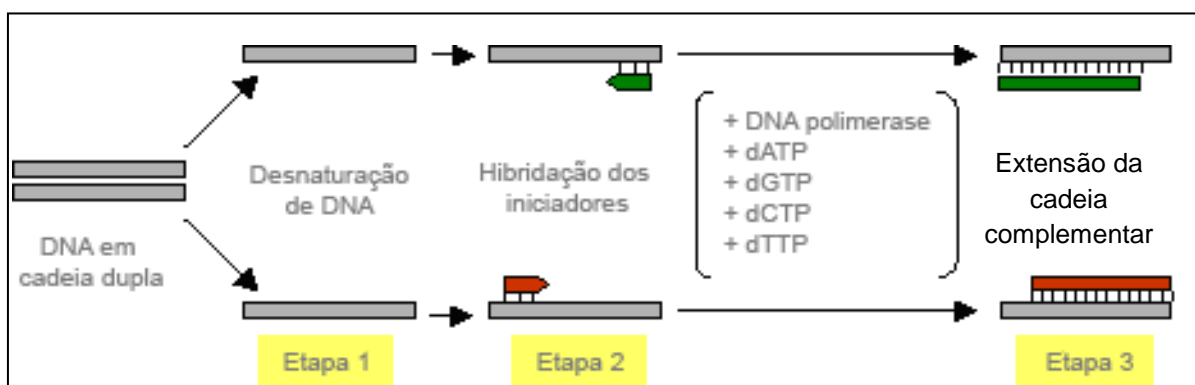
Apesar de apresentar-se como importante método de diagnóstico, a cultura bacteriana possui várias limitações e exigências, como a necessidade de preservar a viabilidade bacteriana, dificuldade de recuperar espécies cultiváveis quando estas são encontradas em número reduzido, incapacidade de detectar micro-organismos em baixas proporções, necessidade de pessoal capacitado, tempo e custo relativamente altos, intensificação do trabalho, condições rigorosas de transporte das amostras e a necessidade de preparo de meios específicos para cada espécie<sup>8,14,15</sup>.

Além das limitações citadas acima, espécies importantes relacionadas com a periodontite, como por exemplo, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, exigem condições rigorosas para seu crescimento e são difíceis de ser detectadas e quantificadas através de métodos convencionais de cultura bacteriana<sup>16,17</sup>. A sensibilidade do cultivo destas bactérias pode ser baixa, especialmente para meios não selectivos, com limite de detecção média de  $10^3 - 10^4$  células bacterianas, perfazendo dessa maneira, número baixo e não detecção de patógenos específicos em amostra subgingival<sup>18</sup>.

### 3.2 A técnica de PCR

Antes de falarmos sobre a técnica de RT-PCR parece ser necessário fazer um breve comentário sobre a técnica de PCR propriamente dita, visto o RT-PCR ser uma modificação desta.

O PCR emergiu como o mais poderoso instrumento para amplificação de genes, permitindo obter grandes quantidades de DNA. O PCR consiste basicamente na amplificação enzimática sequencial de fragmentos de DNA conhecidos e específicos de determinada estirpe. Esta técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e baseia-se no emparelhamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de cadeia simples) utilizados como iniciadores – “*primers*”, que delimitam a sequência alvo da cadeia dupla de DNA que se pretende amplificar<sup>18</sup>. Estes “*primers*” são sintetizados artificialmente de maneira que as suas sequências sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo (Figura 2).

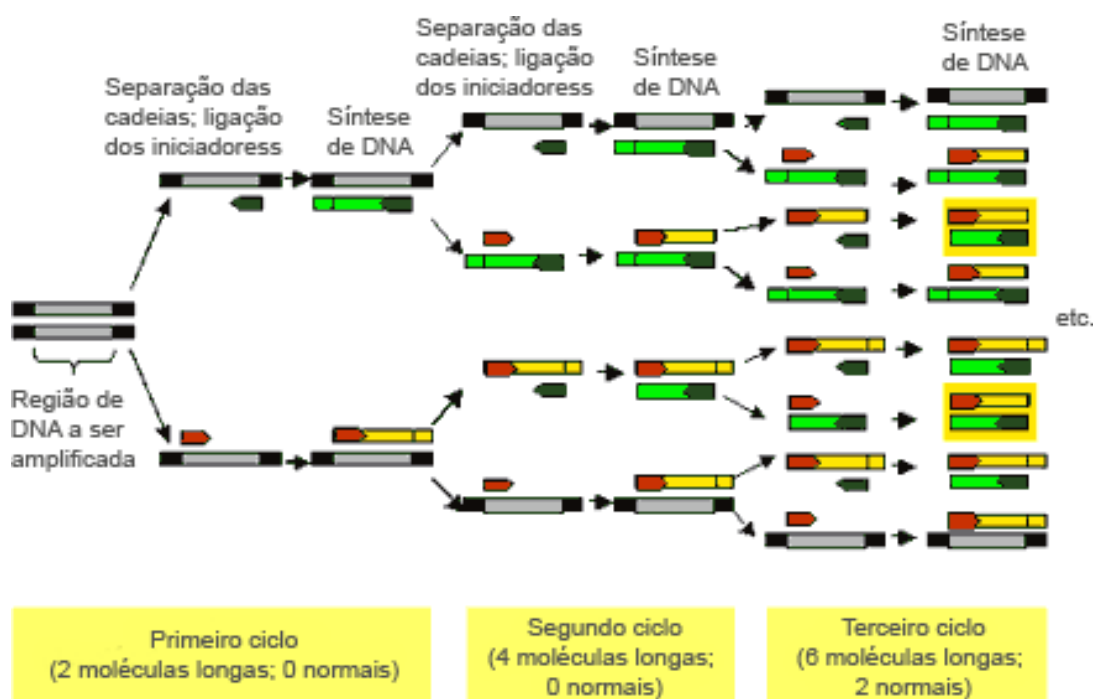


**Figura 2. Esquema da técnica de PCR.** Durante o PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de *primers*, também em cadeia simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleótidos, obtidos por síntese química.

Para realizar PCR são necessárias pequenas quantidades do DNA alvo, um tampão salino contendo a polimerase, oligonucleotídeos iniciadores, os quatro desoxinucleotídeos constituintes do DNA e o cofactor  $Mg^{2+}$ . Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação que consistem em:

- Desnaturação do DNA pelo calor (tipicamente 1 minuto a 94-96°C), de modo a separar as duas cadeias;
- Associação dos iniciadores por ligações de hidrogénio ao DNA alvo em cadeia simples. Para permitir essa associação, a mistura de reacção é arrefecida (tipicamente a temperaturas entre 50 e 65°C, durante 1 minuto; a temperatura a usar depende da % GC da sequência a amplificar);
- Extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela DNA polimerase (tipicamente 1 minuto a 72°C).

O processo envolvendo estes três passos, pode ser repetido várias vezes (25 a 30 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de DNA pré-existente (Figura 3). Em teoria, se for possível levar a cabo 25 ciclos de amplificação seguidos, a concentração de DNA aumentaria  $2^{25}$  vezes embora, na prática, devido a alguma ineficiência no processo de amplificação, esse aumento fique por um milhão de vezes.



**Figura 3.** Ciclos de Amplificação na técnica de PCR.

Como na técnica de PCR se encontram envolvidos vários ciclos de temperaturas diferentes, foi desenvolvido equipamento que permite programar, de forma contínua e automatizada, os vários ciclos de aquecimento e arrefecimento. Para tal ser concretizável, as DNA polimerases utilizadas deverão ser termoestáveis, tendo tal sido conseguido com o isolamento da DNA polimerase da estirpe

termofílica *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerase) que actua a temperaturas elevadas levando assim a um aumento da especificidade da reacção.

Uma vez amplificada esta sequência de nucleotídeos poderá ser detectada por eletroforese em gel de agarose. Esta técnica oferece um tempo de detecção rápido e maior precisão quando comparada com culturas bacterianas<sup>19</sup>. Entretanto, a especificidade da reacção é complexa e depende de factores inter-relacionados, incluindo tamanho do *primer*, temperatura de emparelhamento e concentração do tampão. A maior limitação do PCR é a susceptibilidade do processo por contaminação.

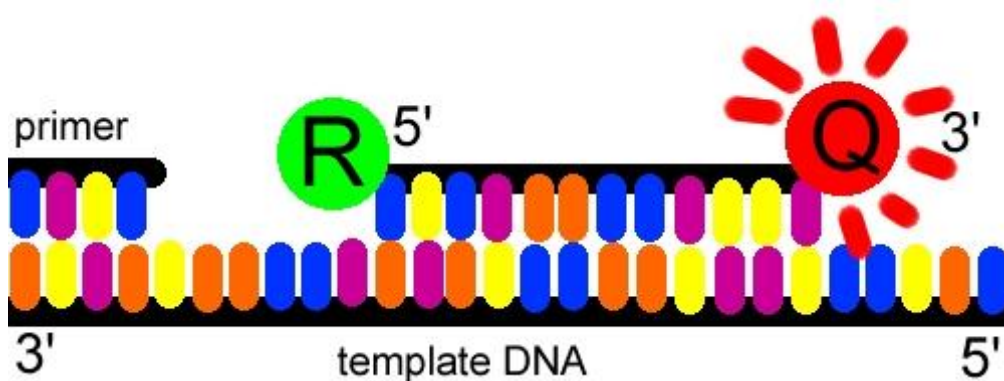
### 3.3 RT-PCR

A RT-PCR é capaz de monitorizar o progresso da PCR enquanto ela progride (ou seja, em tempo real). Os dados são, desta forma, colhidos ao longo da PCR, ao invés de serem apenas no final da reacção. Isso revoluciona completamente o modo de abordagem da quantificação de DNA e RNA pela PCR. A RT-PCR utiliza o momento do ciclo da reacção no qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez, ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. Quanto mais alto o número de cópias iniciais do ácido nucléico alvo, mais rápido será observado o aumento significativo na fluorescência. A RT-PCR também pode ser utilizada para realizar um ensaio *endpoint* (também chamado “ensaio de leitura de placa”), que mede a quantidade de produto da PCR acumulado no final dos ciclos da reacção.

Vários tipos diferentes de RT-PCR estão a ser comercializados para a comunidade científica neste momento, cada um com as suas vantagens. O sistema TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems) e o SYBR Green<sup>®</sup> (Applied Biosystems) são os mais utilizados. Estes sistemas medem o acúmulo dos produtos de PCR mediante a utilização de substratos fluorescentes e, em tempo real, rastreia, com o uso de laser, os produtos finais. O sistema SYBR Green<sup>®</sup> utiliza corantes que se intercalam com qualquer dupla fita de ADN, ou seja, não possui alta especificidade comparado com o sistema TaqMan<sup>®</sup>, porém possui custo mais baixo. O sistema TaqMan<sup>®</sup> possui uma sonda que reconhece e se intercala especificamente entre a ligação primer com

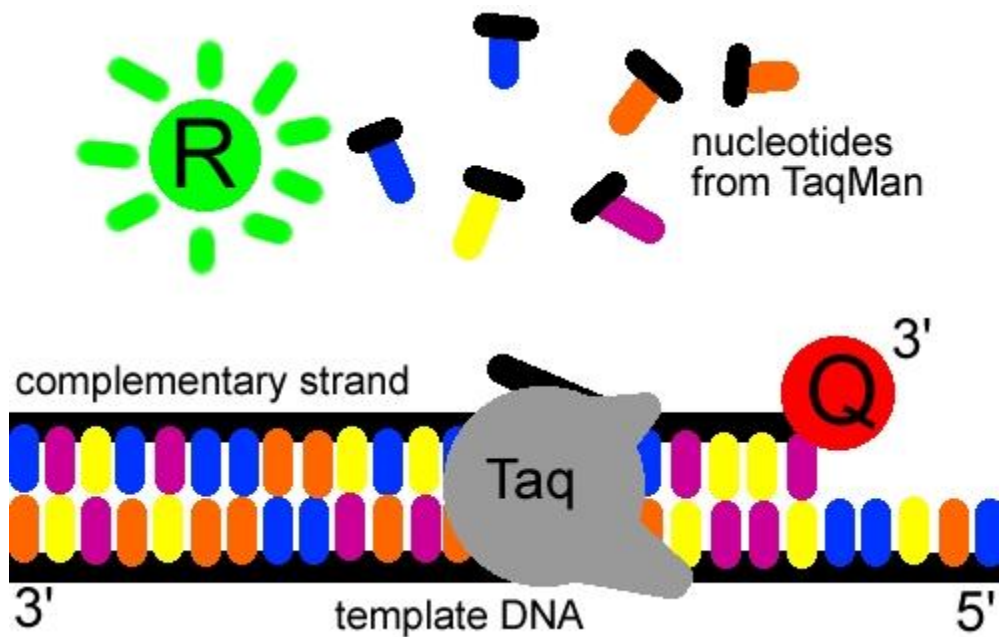
o DNA bacteriano<sup>20</sup>. O TaqMan<sup>®</sup> tem sido o sistema mais utilizado em estudos microbiológicos em Periodontologia. Por isto, para exemplificar a tecnologia RT-PCR utilizaremos o sistema TaqMan<sup>®</sup> como modelo.

O sistema TaqMan<sup>®</sup> utiliza uma sonda fluorescente para permitir a detecção de um produto específico da PCR conforme este se acumula durante os ciclos da PCR. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída contendo um corante *reporter* fluorescente (fluoróforo) na extremidade 5' e um marcador *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo fluoróforo através da transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) através do espaço (Figura 4).



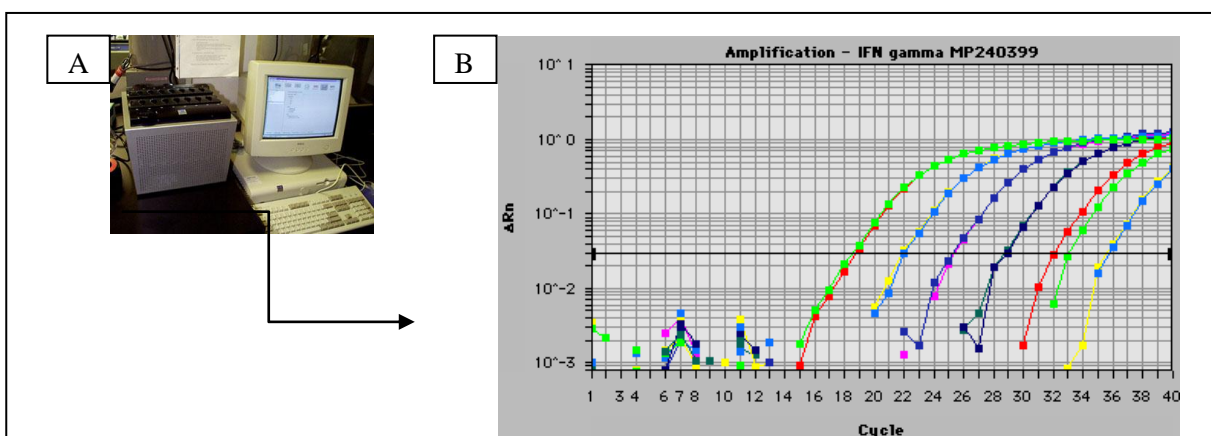
**Figura 4.** O círculo vermelho representa o *quencher* (silenciador) que interrompe o sinal visível emitido a partir do corante *reporter* fluorescente - fluoróforo (círculo verde) quando este está a uma curta distância. FONTE: Imagem criada por Dan Pierce - Department of Biology, Davidson College, Davidson, NC 28035.

Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se hibridiza logo após um dos *primers* e é clivada através da atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. Esta clivagem da sonda separa o fluoróforo do *quencher*, aumentando o sinal do fluoróforo (sinal fluorescente) e remove a sonda da cadeia alvo, permitindo que a extensão do *primer* continue até ao final da cadeia molde<sup>21</sup>. Assim, a inclusão da sonda não inibe o processo geral da PCR. (Figura 5). Moléculas adicionais do fluoróforo são clivadas das suas respectivas sondas em cada ciclo, resultando num aumento na intensidade de fluorescência, que é proporcional à quantidade de *amplicon* produzido.



**Figura 5.** A molécula repórter fluorescente é libertada graças à ação da Taq DNA polimerase. Com o fluoróforo livre o sinal luminoso pode ser observado. FONTE: Imagem criada por Dan Pierce - Department of Biology, Davidson College, Davidson, NC 28035.

A luz emitida a partir do fluoróforo no estado animado é recebida por um computador e representada em um gráfico (Figura 6) que mostra ciclos de PCR no eixo X e uma indicação logarítmica da intensidade de fluorescência captada no eixo Y.



**Figura 6.** A) Equipamento utilizado para realização de RT-PCR; B) Gráfico obtido utilizando o sistema TaqMan ®. FONTE: A) Cortesia: lamar.colostate.edu; B) Cortesia: www.biotech.uiuc.edu.

A quantidade de moléculas dos produtos da RT-PCR sintetizados depende directamente da quantidade de moléculas padrão. Os dados para a quantificação são colectados na fase exponencial do RT-PCR, permitindo quantificação precisa do número de cópias do DNA alvo quando usados padrões internos e externos. O RT-PCR tem sido usado para identificar alguns dos principais patogénios periodontais como: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *T. forsythia* e alguns vírus<sup>7,19</sup>.

Este método de biologia molecular é atraente devido à sua facilidade de utilização, tempo de resposta rápida, bem como ao potencial para ser totalmente automatizado. Pode multiplicar excessivamente pequena quantidade de DNA bacteriano além de detectar baixas quantidades de bactérias. No entanto, nenhuma informação adicional pode ser adquirida, como por exemplo, a detecção de bactérias inesperadas, testes de susceptibilidade antibiótica, os quais podem ser realizados por técnicas de cultura bacteriana<sup>22</sup>. Contudo, existem métodos moleculares de elevada eficiência que permitem a detecção de estirpes inesperadas, mediante a utilização da ribotipagem. Este método tem ainda a vantagem de ser o método *gold standard* para a identificação bacteriana, já que, quando os métodos de cultura e identificação bioquímica não conseguem determinar a estirpe, recorre-se a este método que também se baseia na técnica de PCR.

### **3.4 Cultura bacteriana vs. RT-PCR em Periodontologia**

Como mencionado anteriormente neste trabalho, a cultura bacteriana ainda continua ser o método *gold standard* na identificação de patogénios periodontais. Entretanto com o avanço das técnicas de biologia molecular muitos estudos passaram a utilizar a técnica de RT-PCR na identificação destes microrganismos. Outros estudos compararam a técnica de cultivo bacteriano com a técnica de RT-PCR.

Verner C. *et al.* (2006)<sup>23</sup> realizaram um estudo com o objectivo de comparar a técnica de cultura bacteriana e RT-PCR para a identificação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, e *Treponema denticola*. Neste estudo 72, amostras foram colectadas (72 amostras para serem analisadas por

cultura bacteriana e 72 amostras para serem analisadas através do RT-PCR) de 18 pacientes que sofriam de periodontite agressiva. Os resultados obtidos com cada método foram analisados pela proporção de cada espécie e, em seguida, em comparação com a flora total (Tabelas I e II). Embora o limiar de detecção fosse de apenas  $10^2$  bactérias por análise da RT-PCR, para a cultura anaeróbia foi  $10^3$ . Assim, para comparar os dois métodos, foram analisados resultados originais e ajustados os dados ao nível do processo de cultura anaeróbica ( $10^3$ ; Tabela I).

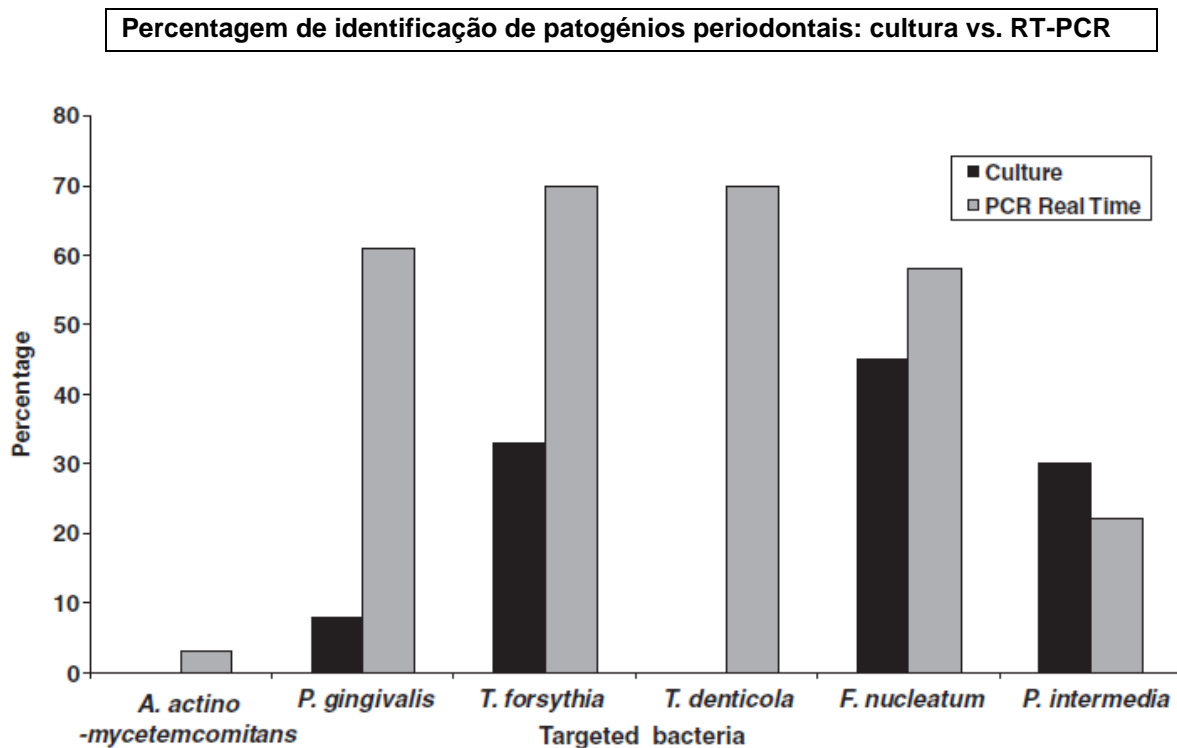
**Tabela I.** Proporção média dos patógenos periodontais de acordo com os dois métodos de detecção

	Culture		Real-time PCR		
	% (by site)	Proportion, mean $\pm$ SD	% (by site)	Proportion (%), mean $\pm$ SD	% ( $>10^3$ )
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	0	0	33.33	0.08 $\pm$ 0.02	2.77
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	8.33	2.99 $\pm$ 6.69	84.72	4.91 $\pm$ 8	59.72
<i>Tannerella forsythia</i>	33.33	6.39 $\pm$ 6.9	75	3.92 $\pm$ 5.74	69.44
<i>Treponema denticola</i>	0	0	80.55	3.64 $\pm$ 5.24	70.83
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	45.83	9.21 $\pm$ 15.54	77.78	0.41 $\pm$ 0.91	58.33
<i>Prevotella intermedia</i>	30.55	12.06 $\pm$ 21.08	36.11	1.06 $\pm$ 2.49	22.22

**Tabela II.** Carga bacteriana total.

	Culture	Real-time PCR
Minimum	$3.5 \times 10^5$	$1 \times 10^5$
Maximum	$4 \times 10^8$	$2.3 \times 10^8$
Mean	$5.48 \times 10^7$	$4 \times 10^7$
Standard deviation	$5.32 \times 10^7$	$4.95 \times 10^7$

Também foi comparada a percentagem do número de sítios onde foram encontrados patógenos periodontais (Figura 7). A interpretação desse estudo mostra resultados bastante diferentes para *P. gingivalis*. Entretanto, quando a proporção total da flora é considerada, uma boa correlação aparece entre as duas técnicas para este patógeno. Essa diferença observada pode ser explicada pelo facto desse anaeróbio ser extremamente sensível ao oxigénio, o que pode ocasionar perda de células vivas durante o processo de amostragem, transporte e sementeira das culturas.



**Figura 7.** Tabela comparativa dos dois métodos de identificação de patogénios periodontais. Percentual do número de sítios em que a bactéria-alvo foi detectada.

Resultados comparáveis foram obtidos para *A. actinomycetemcomitans* com uma diferença de apenas 2,77% entre os dois métodos. A quantidade de *A. actinomycetemcomitans* é muito pequena comparada com a flora total: 0,08% para os testes e 0% para as culturas. Segundo os autores do estudo a presença do patogénio muitas das vezes não atinge o limiar mínimo necessário para a sua detecção em cultura. Os baixos resultados de detecção para o *A. actinomycetemcomitans* pode ser explicado pela distribuição geográfica e étnica desta bactéria, uma vez que no referido estudo houve uma grande quantidade de pacientes caucasianos. Estudos já realizados mostraram que *A. actinomycetemcomitans* é um patogénio periodontal muito raro no norte da Europa<sup>24</sup>. Os resultados foram diferentes para *F. nucleatum* e *P. intermedia*. Para estas duas espécies, surge a questão quanto à fiabilidade da detecção, ou por qPCR ou pela cultura convencional. A teoria mais provável está relacionada com o facto do meio de cultura não ser específico para *P. intermedia* e *P. nigrescens*. Esses dois patogénios são muito semelhantes: eles têm o mesmo metabolismo, e

não apresentam qualquer diferença de patogenicidade. Considerando que as sondas são altamente específicas para *P. intermedia* e diferenciam os dois patogénios e a culturas não os diferenciam, é de se esperar um resultado alto na cultura e um resultado baixo ou mesmo ausência quando se utilizam sondas específicas. Da mesma forma, para *F. nucleatum* e *F. periodonticum*, o meio de não é específico (embora continue a ser possível melhorar o reconhecimento humano, observando-se colónias com luz ultravioleta). A análise pode, assim, induzir a uma leitura superior à real pela confusão das colónias, o que não acontece utilizando sondas. A diferença de 36,11% observada na detecção de *T. forsythia* nos dois métodos é certamente resultado do facto desta bactéria ser de fastidioso cultivo. Para além disso, a amostra do estudo possuía uma pequena quantidade deste patogénio.

Vale a pena ressaltar que no método RT-PCR, houve uma perda de informação para fracas concentrações nas culturas, isto porque o limiar de detecção é de  $10^3$  para a cultura e  $10^2$  para a técnica molecular.

Um estudo realizado por Lau L. *et al.* (2004)<sup>15</sup> avaliou os resultados obtidos com a técnica de RT-PCR na identificação e quantificação de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T.forsythensis* a partir de amostras de placa subgingival tomada de indivíduos com diferentes condições periodontais, quando comparados com os métodos convencionais de cultura bacteriana. Nesse estudo, participaram 92 pacientes adultos e foram divididos em 3 grupos após exame periodontal padrão (sondagem em 6 sítios por dente, avaliação da profundidade de sondagem, avaliação do nível de inserção e avaliação da hemorragia após sondagem – HPS) : grupo com periodontite (32 pessoas), grupo com gengivite (30 pessoas) e grupo com saúde periodontal (30 pessoas). A composição do grupo de estudo é mostrada na Tabela III. A prevalência e contagem média dos patogénios identificados pelos dois métodos são mostradas na Tabela IV.

**Tabela III.** Parâmetros demográficos da amostra da população

Group	Age (years)		Gender	
	range	mean (SD)	female	male
periodontitis	36–71	49.4 (8.99)	16	16
gingivitis	30–62	46.6 (9.82)	17	13
healthy	30–63	37.8 (7.48)	16	14

**Tabela IV. Resultados microbiológicos (frequência de detecção, contagem média, contagem média de amostras positivas)**

	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>		<i>Porphyromonas gingivalis</i>		<i>Tannerella forsythensis</i>	
	culture	PCR	culture	PCR	culture	PCR
Healthy						
<i>n</i>	30	30	30	30	30	30
frequency of detection (%)	0.0	6.7	20.0	13.3	3.3	73.3
mean counts	0.0E+00	1.1E+02	2.5E+03	4.4E+02	1.5E+02	2.6E+05
standard deviation	0.0E+00	6.0E+02	7.0E+03	1.7E+03	8.4E+02	1.4E+06
mean counts (positive)	NA	1.7E+03	1.3E+04	3.3E+03	4.6E+03	3.5E+05
Gingivitis						
<i>n</i>	30	30	30	30	30	30
frequency of detection (%)	6.7	3.3	40.0	30.0	10.0	93.3
mean counts	8.5E+01	1.4E+02	2.9E+04	1.4E+04	2.7E+03	2.5E+05
standard deviation	4.5E+02	7.6E+02	1.1E+05	3.7E+04	8.9E+03	4.6E+05
mean counts (positive)	1.3E+03	4.2E+03	7.2E+04	4.5E+04	2.7E+04	2.7E+05
Periodontitis						
<i>n</i>	32	32	32	32	32	32
frequency of detection (%)	6.3	18.8	84.4	81.3	25.0	100.0
mean counts	1.2E+04	2.6E+03	4.0E+06	9.0E+05	4.0E+05	1.2E+08
standard deviation	6.5E+04	1.0E+04	7.6E+06	1.5E+06	1.7E+06	2.1E+08
mean counts (positive)	1.9E+05	1.4E+04	4.8E+06	1.1E+06	1.6E+06	1.2E+08

Ao analisar os dados da Tabela IV, percebemos que o *A. actinomycetemcomitans* foi o patógeno menos identificado por ambos os métodos (0 - 6,7% para cultura bacteriana e 3,3-18,8% para PCR). A contagem média de amostras positivas foi baixa, tanto no grupo com saúde bem como no grupo com gengivite e sofreu um acréscimo no grupo com periodontite. Neste grupo, a contagem média obtida com a cultura bacteriana foi superiores quando comparada com a obtida com o qPCR ( $1.9 \times 10^5$  versus  $1.4 \times 10^4$ ). Este resultado pode significar um falso positivo identificado pela cultura. Estudos mostram que a espécie *Haemophilus aphrophilus* pode mostrar reactividade cruzada em alguns dos testes bioquímicos utilizados para identificar *A. actinomycetemcomitans*<sup>25</sup>. Outra possibilidade é a presença de falsos negativos com a PCR, o que poderia ser justificada pela presença de variações genéticas na sequência da C-leucotoxina, usada como *primer* neste ensaio de PCR. É importante referir que vários trabalhos publicados mostram uma grande variação nos resultados de prevalência do *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com periodontite. As explicações para esta heterogeneidade podem variar em termos de selecção de paciente, questões metodológicas, diferentes serotipos bacterianos e questões geográficas. Serão necessários estudos de prevalência em diferentes regiões do mundo, para se perceber melhor a influência dos factores geográficos na prevalência do *A. actinomycetemcomitans*.

A prevalência de *P. gingivalis* foi baixa em pacientes saudáveis (20% para a cultura bacteriana e 13,3% para RT-PCR), mais alta no grupo com gengivite (40% e 30%, respectivamente) e atingiu o pico em pacientes com periodontite (84,4% e 81,3%, respectivamente). A média da contagem de amostras positivas foi semelhante em ambos os métodos avaliados, embora mais elevado nas amostras de cultura. Um claro aumento foi observado de pacientes saudáveis para os pacientes com gengivite e destes para os pacientes com periodontite, confirmando um papel importante desse agente patogénico na doença periodontal.

O facto de se observar em algumas situações uma contagem maior no RT-PCR comparado com a cultura pode ser explicado pelo facto do limite inferior de detecção pela técnica de cultura bacteriana. Por sua vez, o facto da técnica de RT-PCR, em algumas situações, mostrar uma contagem inferior quando comparada à técnica de cultura bacteriana parece ser mais difícil de se compreender. Porém estudos sugerem a existência de subtipos não-patogénicos de espécies de *P. gingivalis* com expressão fentípica semelhante<sup>26</sup>. Assim, esses subtipos não seriam identificados pelos sistemas que utilizam sonda de DNA altamente específicas, mas por sua vez responderiam aos testes microbiológicos de identificação de forma semelhante, o que poderia fornecer resultados superiores nos métodos de identificação por cultura quando comparado ao RT-PCR.

A frequência de detecção de *T. forsythensis* mostrou diferenças marcantes entre o método de cultura e RT-PCR, embora a mesma tendência de aumento na prevalência no grupo com saúde à gengivite e desta à periodontite tenha sido observada com ambos os métodos. A prevalência de *T. forsythensis* foi muito elevada em todos os grupos quando o RT-PCR foi utilizado para diagnóstico (73,3% em saúde, 93,3% em gengivite e 100% no grupo com periodontite). Por outro lado, a prevalência desta espécie foi baixa para todos os grupos, quando o método de cultura foi utilizado para a análise (3,3% em saúde, 10% no grupo com gengivite e 25% no grupo com periodontite). Mais uma vez, como dito anteriormente, os resultados para essa espécie poderiam ser parcialmente explicados pela baixa detecção demonstrada em cultura, devido ao seu crescimento fastidioso.

As Tabelas V, VI e VII mostram os resultados qualitativos deste estudo para os diferentes patogénios periodontais estudados.

Quando a cultura bacteriana foi utilizada como referência padrão de diagnóstico, a RT-PCR demonstrou uma alta sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo na detecção de *P. gingivalis*, no grupo de pacientes com periodontite (Tabela V).

**Tabela V.** Resultado comparativo da detecção de *P. gingivalis* entre ambos os métodos de diagnóstico.

All	Cult+	Cult –	Healthy	Cult+	Cult –
PCR+	32	7	PCR+	1	3
PCR –	13	40	PCR –	5	21
Gingivitis	Cult+	Cult –	Periodontitis	Cult+	Cult –
PCR+	6	3	PCR+	25	1
PCR –	6	15	PCR –	2	4
	All	Healthy	Gingivitis	Periodontitis	
sensitivity	0.711	0.167	0.500	0.926	
specificity	0.851	0.875	0.833	0.800	
positive predictive value	0.821	0.250	0.667	0.962	
negative predictive value	0.755	0.808	0.714	0.667	
positive likelihood ratio	4.775	1.333	3.000	4.630	
negative likelihood ratio	2.946	1.050	1.667	10.800	
$\chi^2$ (p-value)	0.0000*	1.0000	0.1200	0.001*	
Pearson's (p-value)	0.0000†	0.3985	0.02†	0.0000†	

\*Statistically significant rejection of independency.

†Statistically significant association.

Cult+, culture positive; Cult –, culture negative; PCR+, polymerase chain reaction positive; PCR –, polymerase chain reaction negative; NA, not available.

Uma associação estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com ambas as técnicas foi obtida para todas as amostras ( $P < 0,001$ ), bem como para a gengivite ( $P = 0,02$ ) e periodontite ( $P < 0,001$ ), o que demonstra um importante acordo entre as duas técnicas de diagnóstico para a detecção de *P. gingivalis*.

Para o *A. Actinomycetemcomitans*, a sensibilidade e especificidade também foram elevadas, embora o valor preditivo positivo tenha sido baixo (Tabela VI). Como resultado do baixo número de amostras positivas de cultura nos grupos de pacientes com saúde e com gengivite, os parâmetros para o diagnóstico de RT-PCR foram difíceis de produzir. Uma associação estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com ambas as técnicas foi obtida para todas as amostras

( $P < 0.001$ ), bem como para a gengivite e as amostras de periodontite ( $P < 0.001$ ), demonstrando assim um importante acordo entre as duas técnicas de diagnóstico.

**Tabela VI.** Resultado comparativo da detecção de *A. actinomycetemcomitans* entre ambos os métodos de diagnóstico.

All	Cult+	Cult –	Healthy	Cult+	Cult –
PCR+	3	6	PCR+	0	2
PCR –	1	82	PCR –	0	28
Gingivitis	Cult+	Cult –	Periodontitis	Cult+	Cult –
PCR+	1	0	PCR+	2	4
PCR –	1	28	PCR –	0	26
		All	Healthy	Gingivitis	Periodontitis
sensitivity		0.750	NA	0.500	1.000
specificity		0.932	0.933	1.000	0.867
positive predictive value		0.333	0.000	1.000	0.333
negative predictive value		0.988	1.000	0.966	1.000
positive likelihood ratio		11.000	NA	NA	7.500
negative likelihood ratio		3.727	NA	2.000	NA
$\chi^2$ ( <i>p</i> -value)		0.0003*	NA	0.0700	0.0300
Pearson's ( <i>p</i> -value)		0.0000†	NA	0.0002†	0.0008†

\*Statistically significant rejection of independency.

†Statistically significant association.

Cult+, culture positive; Cult –, culture negative; PCR+, polymerase chain reaction positive; PCR –, polymerase chain reaction negative; NA, not available.

Para *T.forsythensis*, apenas a sensibilidade foi alta. A especificidade e os valores preditivos foram baixos (Tabela VII). A sensibilidade da RT-PCR foi máxima (1,000) devido à ausência de pacientes com resultado positivo para a cultura e negativo para o RT-PCR. Por outro lado, a especificidade e valores preditivos positivos foram baixos (0,12 e 0,14, respectivamente) tanto ao considerar o total de pacientes bem como quando se considera apenas o grupo com periodontite (0,00 e 0,25). Este patógeno foi sem sombra de dúvidas mais frequentemente identificado com o RT-PCR quando comparado com o método de cultura bacteriana. Portanto, nenhuma associação significativa foi encontrada entre os resultados obtidos com ambas as técnicas para todas as amostras, bem como para as amostras de

gingivite e periodontite. Isto mostra claramente que para *T.forsythensis*, a técnica de RT-PCR foi mais sensível do que a cultura bacteriana.

**Tabela VII.** Resultado comparativo da detecção de *T.forsythensis* entre ambos os métodos de diagnóstico.

All	Cult+	Cult –	Healthy	Cult+	Cult –
PCR+	12	70	PCR+	1	21
PCR –	0	10	PCR –	0	8
Gingivitis	Cult+	Cult –	Periodontitis	Cult+	Cult –
PCR+	3	25	PCR+	8	24
PCR –	0	2	PCR –	0	0
		All	Healthy	Gingivitis	Periodontitis
sensitivity		1.000	1.000	1.000	1.000
specificity		0.125	0.276	0.074	0.000
positive predictive value		0.146	0.045	0.107	0.250
negative predictive value		1.000	1.000	1.000	NA
positive likelihood ratio		1.143	1.381	1.080	1.000
negative likelihood ratio		NA	NA	NA	NA
$\chi^2$ ( <i>p</i> -value)		0.4237	1.0000	1.0000	NA
Pearson's ( <i>p</i> -value)		0.0993	0.2779	0.3198	NA

Cult+, culture positive; Cult –, culture negative; PCR+, polymerase chain reaction positive; PCR –, polymerase chain reaction negative; NA, not available.

Os autores ainda mostraram a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos da cultura bacteriana quando os resultados da RT-PCR foram considerados como padrão de referência (Tabela VIII). Para *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com periodontite, a sensibilidade foi baixa (0,33) enquanto a especificidade e valores preditivo positivo foram máximos (1,0). Para *P. gingivalis*, tanto a sensibilidade e especificidade foram elevadas (0,96 e 0,66, respectivamente), enquanto o valor preditivo positivo também foi elevado (0,92). No que diz respeito à *T.forsythensis*, novamente a sensibilidade foi baixa, (0,25) enquanto a especificidade e valores preditivos foram máximos (1,0).

**Tabela VIII.** Validade do diagnóstico da cultura bacteriana utilizando o RT-PCR como método de referência.

	All	Healthy	Gingivitis	Periodontitis
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>				
sensitivity	0.333	NA	1.000	0.333
specificity	0.987	1.000	0.965	1.000
positive predictive value	0.750	NA	0.500	1.000
negative predictive value	0.932	0.933	1.000	0.867
<i>Porphyromonas gingivalis</i>				
sensitivity	0.8205	0.25	0.666	0.9615
specificity	0.7547	0.8076	0.7142	0.666
positive predictive value	0.711	0.167	0.500	0.926
negative predictive value	0.851	0.875	0.833	0.800
<i>Tannerella forsythensis</i>				
sensitivity	0.130	0.045	0.107	0.250
specificity	1.000	1.000	1.000	NA
positive predictive value	1.000	1.000	1.000	1.000
negative predictive value	0.125	0.276	0.074	0.000

NA, not available; PCR, polymerase chain reaction.

Jervøe-Storm PM *et al.*(2005)<sup>19</sup> compararam a técnica da RT-PCR com a técnica de cultivo bacteriano de cinco periodontopatogénios (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythensis*). A sensibilidade e especificidade para *A. actinomycetemcomitans* foram de 67% e 100%, respectivamente; para *F. nucleatum* 73% e 53%, respectivamente; para *P. gingivalis* 94% e 84%, respectivamente; para *P. intermedia*, 33% e 94%, respectivamente (0,26) e para *T. forsythensis* 92% e 56%, respectivamente. Os coeficientes de correlação de Spearman para os resultados quantitativos de ambos os métodos foram 0,82 para *A. actinomycetemcomitans*, 0,33 para *F. nucleatum*, 0,83 para *P. gingivalis*, 0,38 para *P. intermedia* e 0,67 para *T. forsythensis*. No geral, o acordo entre ambos os testes foi excelente para *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, justo para *T. forsythensis* e pobres de *F. nucleatum* e *P. intermedia*. Estas últimas discrepâncias nos resultados podem ser explicadas por factores inerentes à técnica de cultivo bacteriano.

Atieh M A. (2008)<sup>6</sup> realizou uma meta-análise da acurácia diagnóstica da RT-PCR, visando detectar *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*. A revisão mostrou uma alta precisão diagnóstica da RT-PCR na detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em comparação com a técnica de cultura.

Boutaga K *et al.*(2005)<sup>27</sup> publicaram um estudo que teve por objectivo comparar a RT-PCR com a cultura anaeróbica quantitativa na detecção e quantificação de cinco patogénios periodontais: *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *P. micros* e *F. spp.* Amostras de placa subgengival de 259 pacientes adultos com periodontite foram analisadas com a cultura anaeróbica quantitativa e RT-PCR. Uma curva padrão para quantificação do DNA foi criada para cada *primer*-sonda definida com base em unidades equivalentes formadoras de colónia. Todas as espécies bacterianas foram identificadas correctamente. O limite inferior de detecção por RT-PCR variou entre 10-50 unidades formadoras de colónia, dependendo da espécie. Nenhuma reacção cruzada com o DNA heterólogo de outra espécie bacteriana foi observada. Os resultados da RT-PCR mostraram um alto grau de concordância com os resultados da cultura anaeróbia.

#### 4. CONCLUSÃO

Através da análise dos resultados obtidos ao longo deste trabalho de revisão observa-se uma boa concordância entre os resultados obtidos com a técnica de RT-PCR e a cultura bacteriana.

As limitações intrínsecas da técnica de cultura bacteriana podem causar uma perda de informações quantitativas, pois pelo menos  $10^3$  células da patógeno são necessárias para detecção, por esta técnica. Da mesma forma, expressões fenotípicas semelhantes entre bactérias distintas podem falsear alguns resultados obtidos pelo teste de cultura bacteriana. Também se observa que para *T.forsythensis* a RT-PCR mostrou melhores resultados, o que pode ser explicado pela baixa detecção demonstrada em cultura, devido ao seu crescimento fastidioso. A técnica de RT-PCR mostrou-se eficiente na identificação de patógenos periodontais, apresentando alta sensibilidade e especificidade. A necessidade de mais investigação em diferentes regiões do Mundo mostra-se necessária para se perceber a influência geográfica na prevalência de alguns patógenos periodontais.

Tendo em conta estes resultados, a técnica de RT-PCR mostra-se indicada para estudos epidemiológicos das doenças periodontais. Além disso, a sua especificidade e capacidade de quantificação precisa justificam a sua utilização como meio auxiliar no diagnóstico clínico de pacientes com doença periodontal. No entanto, a técnica de cultura bacteriana, considerada técnica de referência, tem duas vantagens importantes: a detecção de bactérias não esperadas e a possibilidade de realização de testes de sensibilidade aos antibióticos.

Por fim, no que diz respeito ao diagnóstico microbiológico em Periodontologia não há um método ideal para detecção de patógenos periodontais. A escolha da metodologia utilizada para o estudo microbiológico deve ser baseada nos seguintes parâmetros: sensibilidade e especificidade do método; relação custo/benefício; informações fornecidas pelo método escolhido. Assim, o método de cultivo bacteriano mostra-se importante na pesquisa de bactérias não-específicas e na obtenção de informações a respeito da sensibilidade aos antibióticos. Já o RT-PCR mostra-se como uma ferramenta interessante para quantificação e identificação de patógenos periodontais nas fases de manutenção e recorrência da doença, bem como nos casos em que o paciente não responde ao tratamento convencional.

Acreditamos que o RT-PCR terá papel importante no futuro do diagnóstico e tratamento das doenças periodontais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Kortsik C, Elmer A, Tamm I. Pleural effusion due to *Histoplasma capsulatum* and idiopathic CD14 lymphocytopenia. *Respiration* 2003;70:118-122.
- 2) Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000* 1994; 5: 7-25.
- 3) Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA *et al.* Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;12:3770-83.
- 4) Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *P. gingivalis* and *T. denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:1-9.
- 5) Socransky, S. S. *et al.* Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.*, v.25, n.2, p.134-144, Feb. 1998.
- 6) Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol* 2008;79:1620-9.
- 7) 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;31:1034-47.
- 8) Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721-32.
- 9) Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:6-11.

- 10) Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:266-73.
- 11) Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, Van Poperin N, Hujoel PP. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? *J Clin Microbiol* 1992;30:418-26.
- 12) Lamster IB, Celenti RS, Jans HH, Fine JB, Grbic JT. Current status of tests for periodontal disease. *Adv Dent Res* 1993;7:182-90.
- 13) Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J Periodontol* 2005;76:1542-9.
- 14) Lamster IB, Celenti RS, Jans HH, Fine JB, Grbic JT. Current status of tests for periodontal disease. *Adv Dent Res* 1993;7:182-90.
- 15) Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2004;31:1061-9.
- 16) Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assays for *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 2003;38:465-70.
- 17) 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.

- 18) Marianne T, Spolidorio L, Estrela C, Spolidorio D. Patógenos Periodontais: Comparação entre Cultura Bacteriana e PCR em Tempo Real para Teste Diagnóstico. Rev Odontol Bras Central 2010;19(50).
- 19) Jervøe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dörfler 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.
- 20) Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for Porphyromonas gingivalis and total bacteria. J Clin Microbiol 2000;38:2362-5.
- 21) Alberts et al. Molecular Biology of the Cell. – 5th ed. Garland Publishing, Inc. New York, 2008.
- 22) Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. J Clin Periodontol 2002;29:638-44.
- 23) Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giumelli B, N Lakhssassi, Sixou M. Carpegen® real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. Oral Microbiology Immunology 2006: 21: 341–346.
- 24) Haubek D, Poulsen K, Asikainen S, Kilian M. Evidence for absence in northern Europe of especially virulent clonal types of Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Clin Microbiol 1995: 33: 395–401.
- 25) Olsen, I., Shah, H. N. & Gharbia, S. E. (2000) Taxonomy and biochemical characteristics of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. Periodontology 2000 20, 14–52.
- 26) Fournier, D., Mouton, C., Lapierre, P., Kato, T., Okuda, K. & Me´nard, C. (2001) Porphyromonas gulae sp. nov., an anaerobic, Gramnegative coccobacillus from the

gingival sulcus of various animal hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1179–1189.

27) Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005 Aug 1;45(2):191-9.