

DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INFEÇÕES BUCAIS: PERSPECTIVAS E CUIDADOS A SEREM SEGUIDOS

Elerson GAETTI JARDIM JUNIOR¹

Samira Ambar LINS²

Ellen Cristina GAETTI JARDIM³

Marcelle Marie Buso RAMOS⁴

Rosângela Conceição Miotti AGUIAR⁵

Robson Varlei RANIERI⁶

RESUMO

O diagnóstico de doenças infecciosas da região de cabeça e pescoço constitui importante etapa do tratamento das mesmas. Entretanto, a despeito do fato de que a grande maioria das enfermidades que acometem a região de cabeça e pescoço ser de natureza infecciosa, diversos motivos colaboram para o dentista não solicitar testes laboratoriais para auxiliar o diagnóstico clínico. Nessa revisão de literatura, baseada principalmente em artigos sobre os métodos mais modernos e seguros de diagnóstico em microbiologia clínica, os autores discutem as vantagens e desvantagens de cada método selecionado, bem como os aspectos relevantes para a coleta e transporte de espécimes para o laboratório. Saliva, biofilme, pus e sangue constituem os principais espécimes clínicos para o diagnóstico microbiológico, sendo que os métodos mais usados são a cultura e os métodos baseados na detecção do ácido desoxirribonucléico microbiano

¹ Doutor em Microbiologia, Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – SP, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) e Professor Titular da mesma Instituição.

² Doutora em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” e Diretora Pedagógica das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul – SP (FUNEC).

³ Mestre em Estomatologia, Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – SP, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP).

⁴ Mestranda em Odontologia (Estomatologia). Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – SP, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP).

⁵ Mestranda em Odontologia (Estomatologia). Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – SP, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP).

⁶ Graduado (Farmácia e Bioquímica), Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – SP, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP).

por meio da reação em cadeia da polimerase. Enquanto a cultura depende da viabilidade celular e apresenta baixa sensibilidade, além de necessitar de condições favoráveis de coleta e transporte, o PCR apresenta grande sensibilidade e especificidade, mas não permite a realização do antibiograma, o que reduz sua utilidade. Além disso, poucos laboratórios possuem condições de realizar cultura de microrganismos anaeróbios obrigatórios ou possuem experiência na detecção molecular desses microrganismos.

Palavras-chave: Diagnóstico. Antimicrobianos. Infecções de cabeça e pescoço.

ABSTRACT

The diagnosis of head and neck infections constitutes relevant step in their treatment. However, in spite of the fact that most of diseases in head and neck region are infectious in nature, several reasons collaborated for dentists do not ask laboratory tests in order to help clinical diagnosis. By mean of this review literature, based on research articles about the newest and most reliable methods of diagnosis for clinical laboratories, the authors discuss the advantages and disadvantages of each selected method and the relevant aspects in transportation of the specimens to the laboratory. Saliva, biofilm, pus, and blood are the most frequent specimens for microbial diagnosis, being that the most used methods are culture and those based on detection of deoxyribonucleic acid by polymerase chain reaction method. Whereas, the culture depends on cellular viability, and has reduced sensitivity, as well as needs favorable conditions in the sample collection and transportation, PCR shows high sensitivity and specificity, but it does not allow the determination of antibiogram, what reduces its usefulness. In addition, few laboratories possess conditions to perform cultivation of obligate anaerobes or have experience in the molecular detection of these microorganisms.

Keywords: Diagnosis. Antimicrobials. Head and neck infections.

INTRODUÇÃO

A presença de determinadas espécies tem sido considerada fator de risco para doença periodontal e o desenvolvimento de diversas outras doenças infecciosas na região de cabeça e pescoço. Dentre esses microrganismos destacam-se os microaerófilos e anaeróbios obrigatórios, como

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* entre outras (BROOK, 2007; BROOK, 2008). A maioria desses microrganismos dificilmente acaba sendo cultivada em laboratórios clínicos em nosso país, o que impede a realização de testes para a obtenção do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos (LINS *et al.*, 2007).

Esses e outros problemas, como custos, falta de sensibilidade dos testes, bem como dificuldades na coleta dos espécimes clínicos, acabaram por evitar que os cirurgiões-dentistas viessem a solicitar toda uma grande categoria de testes de diagnóstico microbiológico. Esses problemas se avolumaram com o advento da AIDS, aumento da expectativa de vida, seleção de microrganismos super-resistentes e superinfectantes, obrigando uma nova postura dos profissionais de saúde, que passa pelo ensino dos principais métodos de coleta, transporte e análise de espécimes clínicos, nos cursos de odontologia.

A possibilidade de se detectar os principais patógenos bucais ou exógenos por métodos moleculares, de custo mais acessível, além de elevada sensibilidade e especificidade, acabou por modificar essa realidade. Entretanto, todos esses métodos possuem vantagens e desvantagens e devemos respeitar essas peculiaridades como forma de extrair os melhores e mais confiáveis resultados.

Assim, o objetivo do presente estudo é discutir as principais características dos métodos laboratoriais para diagnóstico de doenças infecciosas de cabeça e pescoço, bem como suas indicações, de forma a facilitar sua utilização pelo dentista, além de prover dados sobre como coletar espécimes clínicos e transportá-los até o laboratório de análise.

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS

Os métodos de detecção de microrganismos na cavidade bucal que se mostram mais importantes são a cultura e a detecção molecular do DNA microbiano por PCR, sendo que esses dois métodos representam muito mais do que o passado e o futuro da microbiologia clínica, mas a associação dos dois poderá vir a constituir a melhor arma disponível no diagnóstico microbiológico, particularmente quando parcela da classe odontológica advoga a necessidade de dentistas trabalharem em associação a outros profissionais

da saúde em ambiente hospitalar e, mais recentemente, em unidades de tratamento intensivo.

CULTURA

O cultivo de microrganismos é o método padrão para a avaliação da microbiota presente no interior de processos sépticos ou parte da microbiota bucal. Esse método depende de um conhecimento aproximado da provável composição da microbiota associada à condição que se pretende estudar, de forma a prover as condições atmosféricas e nutricionais adequadas aos mais variados tipos microbianos (GAETTI-JARDIM JÚNIOR *et al.*, 2007). Nesse sentido, desde que a microbiota normalmente associada às infecções de cabeça e pescoço é anaeróbia obrigatória ou se desenvolve melhor em condições de anaerobiose, o laboratório clínico deve ser apto a realizar o cultivo em condições de ausência desse agente oxidativo, o que não constitui rotina no Brasil.

Além desse aspecto, a coleta dos espécimes clínicos necessita de cuidados, como o rápido transporte para o laboratório de análise e, sempre que possível, com auxílio de meios de transporte adequados, que impedem ou minimizam a desidratação e a oxidação dos materiais coletados, mas cuja preparação é trabalhosa, cara e necessita de mão-de-obra bastante qualificada, destacando-se os meios de transporte Ringer-PRAS, RTF (MARTIN *et al.*, 2002) e VMGA III (COGULU *et al.*, 2008), com destaque para esse último. A necessidade desses meios reduz a quase zero a possibilidade de material clínico oriundo da cavidade bucal de pacientes permitir o cultivo de amostras de microrganismos anoxibiontes, visto que os mesmos não são utilizados ou estão disponíveis para que o clínico venha a fazer uso quando necessário.

Quando o clínico não puder utilizar esses meios de transporte, o mesmo deve procurar obter a maior quantidade do espécime clínico que se deseja analisar, dando-se preferência para a biópsia aspirativa (pus, secreção sero-sanguinolenta) ou biópsia excisional ou incisional, como formas de minimizar o contato com a atmosfera oxidante externa, como ocorre nos casos de osteomielites crônicas (LINS *et al.*, 2007).

Além desse aspecto, é indispensável que o cultivo de microrganismos seja realizado em meios de cultura seletivos, contendo agentes inibitórios para a maioria dos microrganismos bucais, mas que permitem o desenvolvimento de colônias de grupos ou espécies particulares, destacando-se o ágar Mitis

Salivarius, para estreptococos de boca, ágar Mitis Salivarius Bacitracina e Sacarose, para os estreptococos cariogênicos do grupo mutans, muito utilizado para avaliação do risco à cárie, ágar tripticaseína de soja soro bacitracina e vancomicina, para o cultivo de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ágar Rogosa, para lactobacilos, ágar cristal violeta eritromicina, para fusobactérias, além de numerosos outros de domínio menos específico da microbiologia oral. De forma geral, esses meios de cultura são utilizados em associação a outros meios enriquecidos, uma vez que a quase totalidade dos processos infecciosos de cabeça e pescoço é associada a uma microbiota mista, polimicrobiana (BROOK, 2007; BROOK, 2008).

Outro problema técnico que um laboratório de análises clínicas teria de solucionar para realizar o cultivo desses microrganismos anoxibiontes seria a obtenção de condições redox adequadas. A substituição mecânica de gases, através de bombas de vácuo que retiram a atmosfera original em de vidro e a substitui por outra sem oxigênio em quantidade significativa, é economicamente viável, mas permite um número modesto de amostras ser processado simultaneamente, além de inviabilizar o cultivo de microrganismos mais sensíveis ao oxigênio, mas desde que a quase totalidade das bactérias bucais cultiváveis e associadas a infecções de cabeça e pescoço pode se desenvolver nessas condições, esse problema é minimizado. O emprego de câmaras de anaerobiose é realidade em alguns centros de pesquisa no país, mas seu custo ainda é proibitivo.

De forma geral, para laboratórios com pequena rotina na área de microbiologia de anaeróbios, como os poucos laboratórios clínicos privados que atuam nessa área no Brasil, a melhor relação custo benefício seria a utilização de sistemas de geração química de anaerobiose, como os envelopes Gaspak® e Oxoid, entre outras, utilizando-se de jarras plásticas hermeticamente fechadas em cujo interior as placas de Petri com os diferentes meios de cultura são colocadas e o sistema gerador acaba liberando hidrogênio que, pela ação de catalisadores, consome o oxigênio atmosférico. Esse método apresenta todas as vantagens e desvantagens da troca mecânica de gases, mas com pouco investimento de recursos na montagem de infra-estrutura, com o agravante de que esse método é inviável se o número de amostras for maior.

Além desse aspecto, a identificação dos isolados é cara e depende de métodos demorados,

como provas bioquímicas ou através de kits comerciais, como os sistemas automatizados API ou similares, agravado pelo fato de que vários isolados são obtidos em culturas mistas (SOCRANSKY *et al.*, 1987; GAETTI-JARDIM JÚNIOR *et al.*, 2008).

Apesar da existência de métodos convencionais, como cultura, ensaios imunológicos e enzimáticos para a detecção de microrganismos específicos na cavidade bucal (LISTGARTEN, 1992), nenhum desses tem sido satisfatórios em termos de sensibilidade, especificidade e/ou confiabilidade (NOZAKI *et al.*, 2001). Assim, novas tecnologias no diagnóstico microbiológico, como utilização de sondas de DNA e a detecção do DNA microbiano através da reação em cadeia da polimerase (PCR), têm expandido as possibilidades do estudo de uma grande quantidade de espécies com custos relativamente baixos.

MÉTODOS ENVOLVENDO A DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS DE DNA

A hibridização DNA-DNA através de sondas permite a detecção de dezenas das espécies (as consideradas com maior probabilidade de ocorrer em um dado sítio anatômico). As sondas, *per se*, consistem em segmentos específicos de DNA, de fita simples, que reconhecem e hibridizam com sequências complementares presentes no genoma bacteriano, formando moléculas híbridas de fita dupla. A análise através de sondas de DNA oferece sensibilidade apropriada e metodologia específica e equivalem aos métodos de cultura para a detecção de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* nas amostras de biofilme subgingival, mas de forma menos trabalhosa e com independência das condições de viabilidade celular microbiana (FRENCH *et al.*, 1986).

O uso de sondas para as regiões hipervariáveis dos genes que codificam para o RNA ribossômico mostra-se como uma alternativa satisfatória para o diagnóstico preciso, sendo que a técnica continua sendo empregada, com poucas modificações, até o presente (COLOMBO *et al.*, 2009). Entre os muitos potenciais sítios de amplificação o gene 16S rRNA aparece como o mais utilizado para reações de PCR e está presente na maioria das bactérias, sendo altamente específicos para cada espécie (KUBONIWA *et al.*, 2004). Contudo, essa metodologia é bastante sensível a falhas experimentais e resultados falso positivos podem ocorrer com frequência.

Para sua utilização, as sondas são marcadas com radioisótopos, enzimas ou moléculas quimioluminescentes, para que as moléculas híbridas possam ser identificadas após o teste. Esse método permite, também, a quantificação do DNA alvo, desde que o pesquisador possua uma curva padrão da quimioluminescência ou outro elemento quantificável proporcional à quantidade de DNA detectada. Assim, por comparações com diluições seriadas de uma amostra do DNA alvo, pode-se comparar com os dados obtidos com as diferentes amostras clínicas. Esse método permite o processamento de muitas amostras simultaneamente, mas possui o inconveniente de ter sensibilidade e especificidade inferiores aos métodos que envolvem a amplificação do DNA por PCR, além de necessitarem de infra-estrutura laboratorial complexa.

A técnica do PCR permite a detecção de patógenos isolados (nesse caso a identificação de microrganismos obtidos por cultura) ou diretamente em material clínico, mesmo se presentes em pequenas quantidades (RIGGIO *et al.*, 1996; NOZAKI *et al.*, 2001), através da amplificação de seqüências nucleotídicas de DNA específicas contidas no patógeno, geralmente nos genes que codificam para o 16S rRNA e 23S rRNA. Essa amplificação pode ser obtida através de um processo de síntese de DNA dirigida, que compreende: desnaturação das moléculas de DNA presentes na cultura bacteriana ou amostra clínica; ligação ou hibridização de iniciadores específicos (os chamados “*primers*”), que são pequenas seqüências nucleotídicas complementares às seqüências presentes nas extremidades que ladeiam o segmento-alvo de DNA, e extensão do mesmo, ou melhor, a polimerização do DNA alvo pela ação de uma DNA polimerase. Esse método é claramente superior, em termos de sensibilidade e especificidade, aos métodos descritos acima.

Nesse sentido, sua especificidade por vezes limita a quantidade de informações que podem ser fornecidas pelo teste, uma vez que apenas detecta um ou alguns patógenos em cada conjunto de ciclos de amplificação do DNA, o que obriga o clínico e o técnico de laboratório a ter uma noção dos principais agentes infecciosos que acometem o sítio anatômico em estudo.

Outros métodos que envolvem o PCR, como o nested PCR ou o semi-nested PCR aumentam ainda mais a sensibilidade da reação de amplificação e nada mais são do que dois conjuntos de ciclos de amplificação nos quais o produto do primeiro ciclo de amplificação utilizando-se de

iniciadores externos é submetido a um novo conjunto de ciclos empregando-se, agora, iniciadores internos, bastante específicos (AHMAD *et al.*, 2002; LIGUORI *et al.*, 2009). No caso do semi-nested PCR, utilizado primeiramente para diferenciar as espécies do gênero *Candida* que habitam a boca, um dos iniciadores empregados é utilizado tanto no primeiro conjunto de ciclos de amplificação, quanto no segundo conjunto de reações.

Com o advento do PCR em tempo real, além da presença de dado organismo, pode-se realizar a quantificação do DNA do mesmo na amostra clínica, em tempo real, o que permitiria acompanhar a eficácia do tratamento instituído. Contudo, dada a sensibilidade do método, esse e outros tipos de amplificação do DNA por PCR requerem a presença de profissionais bem preparados e protocolos de manuseio e extração do DNA que impeçam a contaminação acidental das amostras, bem como minimizem a presença de agentes inibitórios para a DNA polimerase, o que obriga a utilização de kits de extração de DNA ao invés de métodos mais simples e baratos.

Embora vários sistemas de PCR em tempo real existam, o sistema TaqMan é considerado superior, uma vez que a especificidade da reação é confirmada pela presença de uma sonda de oligonucleotídeos de fita simples marcada com compostos quimioluminescentes, de forma que a amplificação do DNA somente é detectada quando a sonda hibridiza com a região do DNA alvo situada entre os iniciadores da reação. Esse tipo de PCR elimina a necessidade de separação eletroforética dos produtos da amplificação do DNA alvo (amplicons), tampouco utilização de substâncias carcinogênicas como o brometo de etídio para a visualização dos amplicons. Contudo, o custo dessas reações ainda é bastante superior ao do PCR convencional e suas variações.

A detecção de microrganismos utilizando-se métodos de alta especificidade e sensibilidade é de particular importância em infecções graves e/ou raras, como as periodontites agressivas generalizadas na dentição decídua ou em infecções graves, como as infecções de ateromas de coronarianas (GAETTI-JARDIM JR *et al.*, 2009). Nesses casos, é possível que patógenos permaneçam na região infectada e continuem a sobreviver em pequenos números, de forma que a detecção desses microrganismos pode contribuir para a identificação de pacientes com potencial de risco de agudização do quadro infeccioso e poderia

colaborar na avaliação da eficácia do tratamento (OKADA *et al.*, 2000).

Entretanto, se nos métodos envolvendo biologia molecular a manutenção da viabilidade celular não é ponto relevante, o transporte dos espécimes em condições em que a DNA possa manter sua integridade é fundamental. Assim, independentemente do método de coleta, os espécimes devem ser transportados em temperaturas baixas para evitar a ação de DNAses microbianas. Nesse sentido, a simples manutenção das amostras em gelo durante o transporte é satisfatória. Além desse aspecto, quando o espécime clínico é submetido à avaliação microbiológica por métodos moleculares, a quantidade de material removido ou coletado do paciente não constitui etapa crítica, visto que a sensibilidade do método se impõe.

Se a quantidade de material biológico presente nas amostras clínicas não é um problema crítico no emprego do PCR para fins de diagnóstico, a extração do DNA e a eliminação de agentes capazes de inibir a ação da DNA polimerase são etapas cruciais. Nesse sentido, diversas técnicas, que vão desde a simples lise térmica das células alvo e inativação de DNAses por fervura, extração do DNA e eliminação do conteúdo protéico e lipídico pela ação de solventes como o método do fenol-clorofórmio e, principalmente, o emprego de kits comerciais, foram descritas para esse fim. Embora o método da fervura seja mais rápido e extremamente simples, a presença de grande quantidade de contaminantes e agentes interferentes dificulta a realização de reações envolvendo o PCR em tempo real, o qual é reservado para as amostras tratadas com auxílio de kits comerciais, que são caros e trabalhosos. O método do fenol-clorofórmio apresenta o inconveniente da presença de resíduos de fenol, um inibidor da DNA polimerase, mesmo em concentrações traço, e um rendimento inferior aos kits comerciais em termos de quantidade de DNA obtida.

DISCUSSÃO

O progresso e a disponibilidade dessas novas técnicas têm sido extremamente úteis na descrição mais precisa de espécies subgingivais e, conseqüentemente, determinando o papel dessas espécies nas doenças infecciosas bucais. Assim, a detecção de microrganismos e a caracterização da microbiota bucal por diferentes métodos pode ser bastante útil no monitoramento dos pacientes e

cada método tem suas indicações e pode responder indagações clínicas diferentes.

Tecnologias para a identificação da microbiota bucal incluem cultura, testes imunológicos e enzimáticos e métodos de biologia molecular (PCR e sondas de DNA). Os métodos de cultura consomem muito tempo, são caros e podem falhar ao não permitirem o crescimento de alguns microrganismos relevantes. Os métodos de diagnósticos imunológicos requerem anticorpos reagentes específicos, mas podem levar a reações cruzadas e sua sensibilidade é incomparavelmente inferior ao do PCR (ASHIMOTO *et al.*, 1996). Por outro lado, a utilização do PCR e sondas de DNA tem sido capaz de detectar e identificar microrganismos que se apresentam em pequeno número, com a vantagem de serem reações rápidas e mais sensíveis, além de possibilitar a caracterização genética de microrganismos (RIGGIO *et al.*, 1996; DOGAN *et al.*, 1999;).

Entretanto, uma vez que a cavidade bucal humana é habitada por inúmeros grupos e espécies microbianas e a grande maioria dos processos infecciosos de cabeça e pescoço é de natureza mista, com predomínio de espécies anaeróbias obrigatórias (BROOK, 2007; BROOK, 2008), existe a necessidade do profissional de saúde, em particular o dentista, seja instruído sobre como e quando utilizar resultados de laboratórios de microbiologia para aprimorar o tratamento oferecido. Nessas condições e desde que o clínico não tenha uma suspeita mais detalhada sobre a etiologia do processo séptico, a realização de tratamento dependerá apenas de critérios clínicos, mas se exames laboratoriais tiverem de ser utilizados, a realização de cultura é o método de escolha, além de permitir a realização de testes de susceptibilidade.

No entanto, em certas circunstâncias, quando a suspeita da presença de um grupo reduzido de microrganismos se apresenta, como nos casos de osteomielite de mandíbula ou retratamento endodôntico, a cultura pode ser associada ao PCR e demais métodos moleculares, ou mesmo substituída por esses últimos quando se investiga a presença de algum microrganismo que definitivamente está ligado ao processo séptico ou que pode ser utilizado como fator de risco, como os enterococos da espécie *E. faecalis* em casos de infecções endodônticas ou periapicais refratárias (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009).

Além dessas indicações, as técnicas de biologia molecular e cultura podem ser associadas para a caracterização de organismos que exibem

alta semelhança genética e fenotípica, como *Prevotella intermedia* e *P. nigrescens* (ASHIMOTO *et al.*, 1996) ou outro exemplo relacionado se dá entre *A. actinomycetemcomitans* e *Haemophilus aphrophilus*, espécies encontradas no biofilme subgingival e que exibem morfologia colonial e características morfo celulares semelhantes. Nesses casos, o emprego de iniciadores específicos para seqüências do gene que codifica para o 16S rRNA é capaz de diferenciar tais microrganismos (ASHIMOTO *et al.*, 1996). Por outro lado, o emprego do AP-PCR (PCR com iniciadores arbitrários ou, mais precisamente, ao acaso), no qual o emprego de iniciadores pequenos e com baixa especificidade, como os iniciadores OPA-3 e OPA-5, pode colaborar para diferenciação genética microrganismos isolados de diferentes indivíduos, como mães e filhos (PAJU *et al.*, 2000).

Segundo Nozaki *et al.* (2001), as técnicas de biologia molecular provêm uma eficiente detecção de anaeróbios, com alta sensibilidade e especificidade, sendo considerado, por esses autores, como o melhor procedimento, na atualidade, para detecção desses microrganismos anoxibiontes. Além disso, muitos desses anoxibiontes não crescem adequadamente em cultura, particularmente se o transporte para o laboratório foi realizado sem cuidados com as condições de oxidação e redução.

Nesse sentido, algumas das dificuldades técnicas relativas ao PCR, como a temperatura de anelamento dos iniciadores e a concentração de magnésio nas reações, podem ser facilmente superadas. Altas temperaturas de anelamento e baixas concentrações de magnésio geralmente melhoram a distinção de espécies microbianas, mas podem resultar em baixa sensibilidade. Em contraste, baixas temperaturas de anelamento e altas concentrações de magnésio aumentam a sensibilidade de detecção, mas podem resultar em reatividade cruzada e amplificação de bandas não específicas. As condições ótimas de PCR devem ser verificadas para cada espécie individualmente.

Outras dificuldades também podem ser encontradas com a utilização de sondas de DNA, pois as mesmas não discriminam entre células viáveis e não viáveis, produzindo resultados falso-positivos (CHEN; SLOTS, 1999). Por outro lado às limitações na utilização das sondas de DNA e PCR são muitos menores do que as apresentadas pelos métodos de cultura (RIGGIO *et al.*, 1996; VAN STEENBERGEN *et al.*, 1996; COLOMBO *et al.*, 2002).

As vantagens das técnicas moleculares consistem na sua sensibilidade, especificidade e segurança. Em termos de segurança, estas técnicas não exigem o isolamento do agente infeccioso e podem ser efetuadas em amostras retiradas diretamente da infecção. Em virtude de sua sensibilidade, é possível detectar amostras muito diluídas e microrganismos em pequeno número (WATANABE; FROMMEL, 1993) e por fim sua especificidade permite a distinção de diferentes espécies envolvidas no processo séptico sem que reações cruzadas significativas ocorram (ASHIMOTO *et al.*, 1996), sendo que o PCR em tempo real ainda permite a quantificação do conteúdo séptico, o que poderia colaborar no monitoramento do tratamento (GAETTI-JARDIM JÚNIOR *et al.*, 2009).

CONCLUSÕES

O monitoramento microbiológico pode ser de grande importância nos casos de periodontites de progressão rápida, tão bem quanto aquelas que não respondem adequadamente ao tratamento periodontal convencional.

As técnicas de biologia molecular para a detecção de periodontopatógenos apresentam alta sensibilidade, especificidade e segurança.

A detecção por PCR e sondas de DNA é particularmente valiosa para microrganismos que não podem ser cultivados ou distinguidos com facilidade por meios de cultura.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. *et al.* Seminedsted PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n.7, p. 2483-9, 2002.
- ASHIMOTO, A. *et al.* Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol. Imunol.**, v.11, n. 4, p. 266-73, 1996.
- BROOK, I. Microbiology and management of joint and bone infections due to anaerobic bacteria. **J. Orthop. Sci.**, v. 13, p. 160-9, 2008.
- BROOK, I. The role of anaerobic bacteria in upper respiratory tract and other head and neck infections. **Cur. Infect. Dis. Reports.**, v. 9, p. 208-17, 2007.

- CHEN, C.; SLOTS, J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontol.** **2000**, v. 20, p.53-64, 1999.
- COGULU, D. *et al.* PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Rad. Endod.**, v.106, n.3, p. 443-9, 2008.
- COLOMBO, A.P.V. *et al.* Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. **J. Periodontol.**, v.80, p.1421-32, 2009.
- COLOMBO, A.P.V. *et al.* Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v.73, p.360-9, 2002.
- DOGAN, B.; SAARELA, M.; ASIKAINEN, S. Genotyping of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype d isolates based on polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.14, p.387-90, 1999.
- FRENCH, C.K. *et al.* DNA probe detection of periodontal pathogens. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 1, n.1, p. 58-62, 1986.
- GAETTI-JARDIM JR, E. *et al.* Occurrence of yeasts, enterococci and other enteric bacteria in subgingival biofilm of HIV-positive patients with chronic gingivitis and necrotizing periodontitis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, p.257-61, 2008.
- GAETTI-JARDIM JR, E. *et al.* Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 1568-75, 2009.
- GAETTI-JARDIM JR, E. *et al.* Susceptibility of strict and facultative anaerobes isolated from endodontic infection to metronidazole and beta-lactams. **J. Appl. Oral Sci.**, v.15, p.539-45, 2007.
- KUBONIWA, M. *et al.* Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 168-76, 2004.
- LIGUORI, G. *et al.* Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 24, p. 76-8, 2009.
- LINS, S.A. *et al.* Microbiota Associada à Osteomielite Crônica dos Maxilares: Estudo de casos. **Rev. Odontol.** Araçatuba, v. 28, p. 33-7, 2007.
- LISTGARTEN, M.A. Microbiological testing in the diagnosis of periodontal diseases. **J. Periodontol.**, n.63, p.332-7, 1992.
- MARTIN, F.E. *et al.* Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.1698-704, 2002.
- NOZAKI, T. A sensitive method for detecting *Porphyromonas gingivalis* by Polymerase Chain Reaction and its possible clinical application. **J. Periodontol.**, v. 72, p.1228-35, 2001.
- OKADA, M.; HAYASHI, F.; NAGASAKA, N. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, p.763-8, 2000.
- PAJU, S. *et al.* Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n.1, p. 79-84, 2000.
- RIGGIO, M. P. *et al.* Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. **J. Periodont. Res.**, v.31, p.496-501, 1996.
- SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. **J. Oral Microbiol.**, Brasil, 05 Nov 2009. Disponível em: <<http://www.journaloforalmicrobiology.net/index.php/jom/article/viewArticle/2009/2329>>. Acesso em: 05 nov 2009.
- SOCRANSKY, S.S. *et al.* Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v.14, p.588-93, 1987.

VAN STEENBERGEN, T.J.M. *et al.* Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. **J. Clin. Periodontol.**, v.23, p.955-9, 1996.

WATANABE, K.; FROMMEL, T O. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. **J. Dent. Res.**, v.72, p.1040-4, 1993.