

PCR e cultura na detecção subgengival de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: estudo comparativo

Actinobacillus actinomycetemcomitans detection by PCR and culture technique: comparative study

Sheila Cavalca CORTELLI

Professora Colaboradora Assistente - Microbiologia e Periodontia – UNITAU – Taubaté – SP e UnG – Guarulhos - SP

Antonio Olavo Cardoso JORGE

Professor Titular de Microbiologia e Imunologia – FOSJC/UNESP – São José dos Campos - SP

Silvia Maria Rodrigues QUERIDO

Mestrando - UNITAU – Taubaté - SP

José Roberto CORTELLI

Professor Assistente Doutor - Periodontia UNITAU – Taubaté – SP e UnG – Guarulhos - SP

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi comparar a eficácia de duas técnicas, PCR e cultura, freqüentemente utilizadas para a detecção de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em amostras de placa bacteriana subgengival. Foram avaliados 136 indivíduos de ambos os sexos, acima de 14 anos de idade, diagnosticados com gengivite (n = 47), periodontite crônica (n = 70) ou agressiva (n = 19) segundo os critérios propostos pela AAP³ (1999). Para cada indivíduo foram obtidas amostras de placa bacteriana subgengival de 5 bolsas periodontais, localizadas na face mesial de dentes distintos, equivalentes aos maiores valores de profundidade de sondagem (PS). Diante de valores idênticos de PS o maior grau de inflamação dos tecidos periodontais foi auxiliar na seleção dos sítios. *A. actinomycetemcomitans* foi cultivado em placas de ágar TSBV e identificado de acordo com a morfologia de colônia, coloração de Gram e provas bioquímicas. A PCR foi realizada utilizando-se *primers* para amplificação do gene da leucotoxina. Os resultados foram analisados empregando-se teste Qui-Quadrado e MacNemar. Dezenove indivíduos apresentaram resultados positivos para cultura bacteriana e 35 indivíduos resultados positivos para PCR. Foram encontradas sensibilidade de 0,74 e especificidade de 0,82 considerando-se a cultura como teste padrão. PCR esteve associada a sangramento a sondagem ($c^2 = 7,11$) e detectou mais amostras positivas de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0,05$). Houve superioridade da PCR em relação à cultura na detecção subgengival de *A. actinomycetemcomitans*.

UNITERMOS

Actinobacillus actinomycetemcomitans; cultura; reação em cadeia, polimerase.

INTRODUÇÃO

Baseado nas evidências que implicam certas espécies microbianas como patógenos periodontais, vários ensaios laboratoriais têm sido desenvolvidos para detecção e quantificação relativa das bactérias presentes nas amostras de placa bacteriana dos indivíduos (ALBANDAR et al.² 1997; ZAMBON & HARASZTHY²⁵, 2000). Inúmeros fatores podem interferir nos resultados obtidos a partir do emprego de técnicas microbiológicas e, dentro da

microbiologia periodontal, a seleção de sítios apropriados e em número suficiente, assim como a obtenção das amostras de placa bacteriana influenciam os resultados (SLOTS et al.¹⁹, 1980; ZAMBON²⁴, 1994; KAMMA et al.⁹, 1995; RENVERT et al.¹⁷, 1997; TAKAMATSU et al.²², 1999).

A cultura bacteriana representa um importante meio de caracterização da microbiota periodontal, uma vez que, elucida a maior parte dos microrganismos presentes (NEWMAN & NISENGARD¹⁵, 1994) e fornece informações a respeito da susceti-

bilidade a antimicrobianos (LISTGARTEN¹¹, 1992; CHEN & SLOTS⁵, 1999). O meio agar MGB (*Malachite green bacitracin*), composto por agar soja tripticaseína, verde de malaquita e bacitracina foi um dos primeiros meios de cultura utilizados no isolamento de *A. actinomycetemcomitans* (MANDELL & SOCRANSKY¹², 1981). Logo após, foi desenvolvido outro meio de cultura composto de agar soja tripticaseína acrescido de soro de cavalo, extrato de levedura, bacitracina e vancomicina – agar TSBV (SLOTS¹⁹, 1982), o qual demonstrou recuperar mais unidades formadoras de colônia a partir de amostras bucais. O cultivo de *A. actinomycetemcomitans* em meios de cultura não seletivos apresenta limite de detecção de 0,1 a 0,2% do total de microrganismos viáveis. Mas deve-se considerar que o emprego de meios seletivos, nos quais, a utilização de antimicrobianos limita ou suprime o crescimento de microrganismos indesejáveis, tende a aumentar esse limite de detecção.

A necessidade de entendimento do significado clínico da presença de *A. actinomycetemcomitans* em sítios periodontais, saudáveis ou com doença, associado a dificuldades técnicas relacionadas aos procedimentos de cultura, explica o requerimento de métodos de detecção mais rápidos, específicos e sensíveis (LIN et al.¹⁰, 1994). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de síntese *in vitro* de ácidos nucleicos através do qual um segmento de DNA pode ser especificamente replicado de forma semiconservativa. E, em situações gerais, a PCR exibe limites de detecção excelentes. FLEMMING et al.⁷ (1995), avaliaram a sensibilidade e especificidade de métodos utilizados para detecção de *A. actinomycetemcomitans* na placa bacteriana subgengival e, demonstraram superioridade da PCR quando comparada à cultura com subsequente realização de provas bioquímicas. Entretanto, como apenas uma pequena quantidade do total da amostra é empregada, a alíquota utilizada pode não conter o microrganismo alvo, sobretudo se esse estiver presente em proporções reduzidas. Além de haver a possibilidade de destruição de componentes microbianos por ação de enzimas presentes nas amostras clínicas (CHEN & SLOTS⁵, 1999). Assim, o objetivo do presente estudo foi comparar a eficácia de duas técnicas, PCR e cultura, frequentemente utilizadas para a detecção de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em amostras de placa bacteriana subgengival.

MATERIAL E MÉTODOS

Participaram do presente estudo 136 indivíduos entre 14 e 76 anos de idade ($34,4 \pm 12,2$), de ambos os sexos, diagnosticados (AAP³, 1999) com gengivite (n = 47), periodontite crônica (n = 70) e agressiva (n = 19). Todos os participantes receberam terapia periodontal na clínica de Pós-graduação da Disciplina de Periodontia da Instituição. Foram excluídos diabéticos não metabolicamente controlados, imunossuprimidos, gestantes e lactantes, indivíduos submetidos a tratamento periodontal no ano que antecedeu a realização deste estudo ou submetidos à prévia antibioticoterapia por um período de até seis meses.

Foram selecionados em dentes isolados, cinco sítios periodontais mesiais com os maiores valores de profundidade de sondagem (PS) para obtenção das amostras subgengivais. Diante de valores idênticos de PS, o maior grau de inflamação dos tecidos periodontais (AINAMO & BAY¹, 1975) foi auxiliar na seleção dos sítios. Para cada sítio, um cone de papel autoclavado (nº 30) foi inserido na porção mais apical da bolsa periodontal, mantido em posição por 15 segundos (DAHLÉN et al.⁶, 1989) e colocado em recipiente contendo 1mL de solução de Ringer reduzida (Ringer PRAS). O procedimento de cultura bacteriana de acordo com a metodologia de Slots et al.²⁰, 1980 foi realizado em intervalo de no máximo duas horas. Após homogeneização em agitador (Vortex) por 60 segundos, alíquotas de 0,1mL das amostras foram semeadas, em duplicata, na superfície de placas de agar TSBV constituído de agar soja tripticaseína, extrato de levedura, soro de cavalo inativado (10%) e, bacitracina e vancomicina em concentrações finais de 75mg/mL e 5mg/mL, respectivamente (SLOTS¹⁹, 1982). As placas foram incubadas por cinco dias em atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C (SLOTS²¹ et al.²¹, 1986). As colônias de *A. actinomycetemcomitans* foram identificadas em lupa estereoscópica (Leica, MZ6) através de sua morfologia. Nas colônias características foram realizadas coloração de Gram, provas bioquímicas de fermentação de glicose, sacarose, lactose, frutose e maltose, e reação de catalase (SLOTS¹⁸, 1982).

O restante das amostras foi imediatamente congelado e mantido a -20° C até a realização de PCR utilizando-se os *primers* 5'-GCAGGATCCATAT-TAAATCT CCTTGT-3' e 5'- GCGGTGCACA-ACCTGATAACAGTATT-3'. As amostras de pla-

ca bacteriana subgengival foram homogêneas em agitador (Vortex, Phoenix, AP56) por 60 segundos. Deste material, 300mL foram centrifugados por 10 minutos à velocidade de 7000 r.p.m. Ao material sedimentado foram adicionados 200mL de matriz comercial de purificação de DNA (*Instagene*, Bio-Rad). Após homogeneização por 10 segundos, o material foi mantido em banho-maria por 30 minutos a 56°C e a seguir homogeneizado por 30 segundos e colocado em água em ebulição por 8 minutos. O material foi novamente homogeneizado por 30 segundos e centrifugado por 4 minutos. A PCR foi realizada em condições padronizadas (HARASZTHY et al.⁸, 2000) e para a análise dos produtos amplificados foi empregada eletroforese em gel constituído de 40mL de solução tampoadora (TBE buffer, Sigma; 400mL de água destilada; 30mL de brometo de etídio), e agarose a 1%. O gel foi corrido a 10V/cm e analisado em câmara de irradiação ultravioleta.

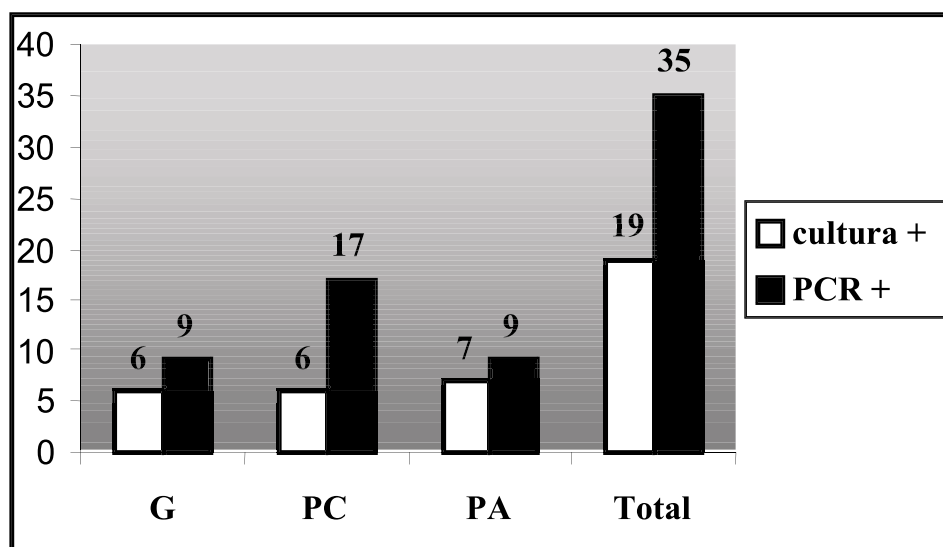
A homogeneidade entre os resultados obtidos pelas duas técnicas microbiológicas foi avaliada pelo teste McNemar ($p < 0,05$). Foi considerado teste padrão, a cultura bacteriana estabelecendo-se ainda sua sensibilidade e especificidade quando comparado a PCR. A correlação entre cultura, PCR e as variáveis clínicas foi avaliada pela estatística Qui-quadrado (c^2 ; $p < 0,05$). Foram estabelecidas

ainda, a sensibilidade e especificidade dos testes em relação à ocorrência de doença bem como seus valores preditivos positivo e negativo.

RESULTADOS

A distribuição de amostras positivas de *A. actinomycetemcomitans* de acordo com o método de detecção e diagnóstico periodontal está expressa na FIGURA 1. A variável PS não apresentou correlação com os métodos de detecção utilizados ($c^2 = 1,91$). O sangramento a sondagem não influenciou os resultados da cultura bacteriana, mas esteve associado com identificação de *A. actinomycetemcomitans* por PCR ($c^2 = 7,11$).

A PCR detectou mais amostras positivas de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0,05$) e apresentou 74% de sensibilidade e 82% de especificidade em relação a cultura bacteriana (Tabela 1). Comparando-se os métodos de detecção com a ocorrência de doença periodontal, ambas técnicas microbiológicas foram mais eficazes na detecção de sítios com gengivite comparados a sítios com periodontite (Tabelas 2 e 3). Houve superioridade da PCR (28%) em relação à cultura (16%) na detecção de sítios com periodontite ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística em relação aos valores preditivos positivos e negativos observados (Tabelas 2 e 3).



G – gengivite (n = 47); PC – periodontite crônica (n = 70); PA – periodontite agressiva (n = 19).

FIGURA 1 – Presença de *A. actinomycetemcomitans* nas amostras de placa bacteriana segundo método de detecção e condição periodontal. O número acima da barra representa o número de indivíduos.

Tabela 1 - Dados comparativos entre os resultados obtidos pelas duas técnicas microbiológicas

Técnica	PCR +	PCR -	Total
Padrão +	14	5	19
Padrão -	21	96	117
Total	35	101	136

$\chi^2 = 9,84$ e $p = 0,001$; padrão = cultura bacteriana

Tabela 2 - Avaliação da técnica de cultura bacteriana na identificação de indivíduos com periodontite ou sem periodontite (gingivite)

Cultura	Periodontite		Total
	+	-	
+	15	6	21
-	74	41	115
Total	89	47	136

sensibilidade = 0,16; especificidade = 0,87; valor preditivo positivo = 0,71; valor preditivo negativo = 0,35

Tabela 3 - Avaliação da técnica PCR na identificação de indivíduos com periodontite ou sem periodontite (gingivite)

PCR	Periodontite		Total
	+	-	
+	25	9	34
-	64	38	102
Total	89	47	136

sensibilidade = 0,28; especificidade = 0,80; valor preditivo positivo = 0,73; valor preditivo negativo = 0,37

DISCUSSÃO

Existe grande diversidade em relação aos dados prevalentes de *A. actinomycetemcomitans* parcialmente explicada por diferenças de metodologia. A cultura bacteriana é um método microbiológico sensível a variações técnicas já que requer microrganismos viáveis. Assim, deve haver um controle de fatores que possivelmente possam alterar os resultados obtidos. Apesar de procedimentos tecnicamente corretos, a análise dos componentes da placa bacteriana realizada através de ensaios imunológicos ou análise do DNA bacteriano revela proporções microbianas mais elevadas em função

da maior sensibilidade inerente a esses tipos de testes, que permitem a detecção de fragmentos bacterianos bem como microrganismos não mais viáveis ou, presentes em baixos números (BONTA et al.⁴, 1985; MELVIN et al.¹³, 1994).

Embora menos sensível, dentro da microbiologia médica, bucal e também periodontal, a cultura como método microbiológico é considerada referência. Assim, usualmente a aplicabilidade de um método microbiológico como auxiliar de diagnóstico, é estabelecida por certas propriedades quando comparada a cultura microbiana. Essas propriedades incluem a possibilidade de reprodução dos resultados e a determinação da sensibilidade e es-

pecificidade do método em questão. Nesse sentido, a sensibilidade descreve a coincidência de resultados positivos, e a especificidade, a coincidência de resultados negativos entre os testes. O teste a ser comparado, pode ter baixa sensibilidade pelo fato de apresentar limite de detecção inferior ao teste padrão representado pela cultura. O teste a ser comparado, pode adicionalmente ter baixa sensibilidade por apresentar menor número de reações cruzadas, como ocorre com a PCR, o que indica sua superioridade em relação ao teste referência (CHEN & SLOTS⁵, 1999). No presente estudo foram selecionados os *primers* para a leucotoxina uma vez que o ensaio identifica todas cepas de *A. actinomycetemcomitans* e as distingue de outras espécies bacterianas, sobretudo *Haemophilus aphrophilus* espécie com a qual *A. actinomycetemcomitans* apresenta inúmeras características comuns. Ao contrário, *A. actinomycetemcomitans* em geral exibe 30 a 39% de similaridade com *Haemophilus aphrophilus* quando da utilização de sondas de DNA genômico (OLSEN et al.¹⁶, 1999). Por consequência, a seleção dos *primers* utilizados no presente estudo pode favorecer uma discrepância entre os limites de detecção entre PCR e cultura. Contudo, outros fatores podem atuar de forma a reduzir a discrepância esperada. Neste contexto, deve-se considerar o limite de crescimento bacteriano no meio de cultura, que ao contrário de muitos microrganismos, no caso de *A. actinomycetemcomitans* em agar TSBV é bastante adequado. Além disso, o agar TSBV parece recuperar mais UFCs a partir das amostras bucais quando comparado ao agar MGB, fato que melhora ainda mais o limite de detecção da cultura. Mesmo assim, no presente estudo e conforme previamente relatado (CHEN & SLOTS⁵, 1999), o teste McNemar ($p < 0,05$) demonstrou superioridade da PCR em relação à cultura bacteriana, já que a primeira detectou mais amostras positivas de *A. actinomycetemcomitans*. E, considerando-se a cultura como padrão, foram encontradas 74% de sensibilidade e 82% de especificidade, valores ligeiramente acima dos usuais. Essa menor discrepância entre as técnicas pode refletir um controle adequado das variáveis que geralmente reduzem a detecção por cultura bacteriana. Ou, uma ocorrência mais freqüente de microrganismos viáveis em detrimento de fragmentos bacterianos isolados nas amostras subgingivais analisadas.

Apesar de na maior parte das situações, a PCR exibir limites de detecção excelentes, apenas uma

quantidade diminuta da amostra é empregada no processo típico de amplificação. Assim, a alíquota utilizada pode não conter o microrganismo alvo se esse estiver presente em baixas proporções. Por isso, atualmente, em determinadas situações tem sido utilizada a *Nested* PCR, técnica na qual o produto previamente amplificado é submetido a um novo ciclo de amplificação aumentando a chance de detecção do microrganismo pesquisado. Adicionalmente, as amostras clínicas podem conter enzimas, especialmente DNase, capazes de prejudicar o processo de amplificação (ZAMBON & HARASZTHY²⁵, 1995; CHEN & SLOTS⁵, 1999). Esses fatores podem explicar os quatro indivíduos que apresentaram amostras positivas para *A. actinomycetemcomitans* pela cultura, mas não pela PCR. Entretanto, deve-se lembrar que as amostras subgingivais após a semeadura nas placas de agar TSBV, foram mantidas a baixas temperaturas (-20°C) a fim de evitar a ação de enzimas sobre o genoma bacteriano. Assim, caso tenha havido ação enzimática deletéria essa provavelmente ocorreu em curtos intervalos de tempo, anteriormente ao congelamento. Uma análise microbiana quantitativa não foi realizada. Todavia, ao contrário do que se poderia esperar, os resultados observados não sugerem proporções bacterianas mais elevadas nos casos de periodontite agressiva, já que dos quatro casos positivos apenas para a cultura, método de detecção menos sensível, três foram de periodontite crônica e um de gengivite.

Além de fatores técnicos, a seleção dos sítios periodontais submetidos ao exame microbiológico também influencia de modo decisivo os resultados obtidos por técnicas microbiológicas, em especial aquelas que apresentam limites de detecção inferiores. O aumento da PS e o maior grau de inflamação gengival parecem estar associados não somente à presença mais freqüente de *A. actinomycetemcomitans*, como também a um aumento nas proporções observadas (SLOTS et al.²⁰, 1980; ZAMBON²⁴, 1994; TANNER et al.²³, 1996). No presente estudo, não foi observada associação entre os valores de PS encontrados e presença de *A. actinomycetemcomitans*. Entretanto, os resultados observados estão de acordo com outros estudos que apontam maior probabilidade de detecção do patógeno na presença de sinais clínicos de inflamação (ZAMBON et al.²⁴, 1994; MOMBELLI et al.¹⁴, 1995; TANNER et al.²³, 1996).

Quando se pensa no estabelecimento de medidas preventivas populacionais ou na realização de grandes levantamentos epidemiológicos a correlação entre técnicas microbiológicas e ocorrência real de doença torna-se importante. Neste estudo ambas técnicas apresentaram valores de sensibilidade similares e foram mais eficientes na detecção de sítios com gengivite do que sítios com periodontite. Em contrapartida, considerando-se especificidade como porcentagem de indivíduos doentes corretamente identificados, a PCR (28%) foi mais eficaz do que a cultura (16%) na detecção de indivíduos com periodontite. Além disso, os valores preditivos positivo e negativo demonstraram similaridade entre as técnicas em relação a ocorrência de resultados falsos positivos ou falsos negativos.

Deve-se salientar que a cultura em meio seletivo detecta bactérias presentes na placa bacteriana em concentração média de 10^3 células (ZAMBON & HARASZTHY²⁵, 1995) enquanto a PCR tem limite de detecção de 25 a cem células bacterianas (CHEN & SLOTS⁵, 1999). Assim, a detecção por cultura bacteriana pode em aspectos clínicos indicar maior dificuldade terapêutica. A PCR pode em pouco tempo se tornar o método de detecção ideal para patógenos periodontais por apresentar maior

facilidade de realização quando comparada a cultura associada a provas bioquímicas de identificação, além de demonstrar excelente limite de detecção com poucas reações cruzadas nas condições ideais. Entretanto, atualmente possibilita somente análise qualitativa e autores como Chen & Slots⁵ (1999) tem questionado o significado clínico real de sua aplicação pelo fato do método poder detectar microrganismos em níveis extremamente reduzidos. Esses pesquisadores salientam que, apenas a cultura determina os números relativos e absolutos de microrganismos além de possibilitar a obtenção de cepas padrão e realização de antibiogramas (ZAMBON & HARASZTHY²⁵, 1995).

CONCLUSÃO

Após a realização do presente estudo pode-se concluir que na população observada, a PCR foi superior à cultura na detecção subgengival de *A. actinomycetemcomitans* e na identificação de sítios com periodontite. Os dados observados estão de acordo com os achados de estudos prévios, nos quais, a PCR se mostrou superior a outras técnicas microbiológicas utilizadas com frequência na detecção de patógenos periodontais.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate two techniques, culture and PCR in detecting A. actinomycetemcomitans in subgingival plaque samples. A hundred and thirty six individuals, at least 14 years old, diagnosed with gingivitis (n=47), chronic (n=70) or aggressive periodontitis (n=19) according AAP³ (1999) were included in this study. Subgingival plaque samples were collected from 5 mesial periodontal pockets (>PD) for each subject. A. actinomycetemcomitans was cultured in TSBV plates and identified by morphology of colony, Gram stain and biochemical tests. A 1022-bp or a 492-bp stretch of the leukotoxin gene of A. actinomycetemcomitans was amplified by PCR. Chi-square and MacNemar were performed to evaluate the results. A. actinomycetemcomitans was detected from 19 individuals by culture technique and 35 individuals by PCR. With culture as standard technique the sensitivity of PCR was 0.74 and the specificity of PCR was 0.82. PCR showed positive correlation with bleeding on probing ($c^2 = 7.11$) and had the highest rate of A. actinomycetemcomitans detection ($p < 0.05$). PCR was found to be superior to culture with presumptive biochemical identification for the detection of A. actinomycetemcomitans in subgingival plaque.

UNITERMS

Actinobacillus actinomycetemcomitans; culture; Polymerase; chain reaction

REFERÊNCIAS

- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975 Dec.; 25 (4): 229-35.
- Albandar JM, Brown LJ, Løe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early onset periodontitis. *J Periodontol* 1997 Oct.; 68 (10): 973-81.
- American Academy of Periodontology. *Ann Periodontol* 1999 Dec.; 4 (1): 18-9.
- Bonta Y, Zambon JJ, Genco RJ, Neiders ME. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival plaque: comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* 1985 May; 64 (5): 793-8.
- Chen C, Slots J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000, Copenhagen, v.20, p. 53-64, June 1999.
- Dahlén G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O. Black-pigmented *Bacteroides species* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque of adults Kenyans. *J Clin Periodontol* 1989 May; 16 (5): 305-10.
- Flemmig TF, Rüdiger S, Hofmann U, Schmidt H, Plaschke B, Strätz A, et al. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. *J Clin Microbiol* 1995 Dec.; 33 (12): 3102-5.
- Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EMB, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, et al. Evidence for the role of highly leucotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early onset periodontitis. *J Periodontol* 2000 June; 71 (6): 912-22.
- Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol Res* 1995 Jan.; 30 (1): 66-72.
- Lin CY, Wong M-Y, Jeng, J-H, Chang W-K, Kuo MY-P. Rapid and specific detection of the leukotoxin sequences of *actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets by the polymerase chain reaction. *J Formos Med Assoc* 1994 Apr.; 93 (4): 289-93.
- Listgarten MA. Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. *J Periodontol* 1992 Apr.; 63 (4): 332-7.
- Mandell RL, Socransky SS. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence the organism in juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1981 Oct.; 52 (10): 593-8.
- 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 June; 65 (6): 576-2.
- Monbelli A, Rutar A, Lang NP. Correlation of the periodontal status 6 years after puberty with clinical and microbiological conditions during puberty. *J Clin Periodontol* 1995 May; 22 (5): 300-05.
- Newman MG, Nisengard RJ. Diagnostic microbiology and immunology. *In: _____ Oral microbiology and immunology*. 2.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1994. P. 435-49.
- Olsen I, Shah HN, Gharbia S. Taxonomy and biochemical characteristics of *A. actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000 1999 June; 20: 14-52.
- Renvert S, Dahlén G, Snyder B. Clinical and microbiological effects of subgingival antimicrobial irrigation with citric acid as evaluated by an enzyme immunoassay and culture analysis. *J Periodontol* 1997 Apr.; 68 (4): 346-52.
- Slots J. Salient biochemical characters of *A. actinomycetemcomitans*. *Archs Microbiol* 1982 Feb.; 131 (1): 60-7.
- Slots J. Selective medium for isolation of *A. actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1982 Apr.; 15 (4): 606-09.
- Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross sectional microbiological investigation. *Inf Immun* 1980 Sept.; 29 (3): 1013-20.
- Slots J, Bragd L, Wikström M, Dahlén G. The occurrence of *A. actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 1986 Aug.; 13 (8): 570-7.
- Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M, Ishikawa I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 1999 June; 70 (6): 574-80.
- Tanner A, Kent R, Maiden MFJ. Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *J Periodont Res* 1996 Mar.; 31 (3): 195-204.
- Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. *J Periodontol* 1994 Sept.; 65 (9): 892-3.
- Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontology* 2000 1995 Mar.; 7: 69-82.

Recebido em: 25/10/02
Aprovado em: 20/12/02

Sheila Cavalca Cortelli
Avenida Itália, 1200
Edifício Holanda apto 34
Jardim das Nações,
CEP: 12031-540 Taubaté - SP