

# Métodos para detecção de patógenos periodontais

SHEILA CAVALCA CORTELLI\* ; JOSÉ ROBERTO CORTELLI\*\* ; ROBERTO MATUCK AUAD\* ; ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE\*\*\*

## RESUMO

O desenvolvimento de exames laboratoriais capazes de detectar os microrganismos no sulco gengival ocorreu em decorrência do conceito de especificidade da placa bacteriana, da necessidade de identificação de indivíduos de risco, assim como de um diagnóstico mais preciso da doença periodontal. O objetivo deste trabalho foi analisar através de revista de literatura, os principais ensaios microbiológicos empregados em periodontia para análise dos componentes da microbiota subgengival. Técnicas de cultura bacteriana, ensaios imunológicos e enzimáticos, provas de DNA, microscopia de campo escuro e contraste de fase bem como a utilização de marcadores bioquímicos têm sido utilizadas com esta finalidade. As pesquisas encontradas indicam a necessidade de análise criteriosa para seleção adequada do teste a ser empregado e que a presença de patógenos subgengivais está relacionada a fator de risco para a instalação ou progressão da doença periodontal.

## UNITERMOS

Microrganismos, diagnóstico; doença periodontal.

CORTELLI, S.C., CORTELLI, J. R., AUAD, M. R., JORGE, A.O.C. Assessment of periodontal pathogens. *Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos*, v.3, n.1, p. , jan./jun. 2000.

## ABSTRACT

*Laboratory exams to detect microorganisms in gingival sulcus have been developed for different reasons, such as dental plaque specificity, identification of risk of the disease and assess the diagnosis of periodontal disease. The aim of this paper was to study through dental literature review the most important microbiological assays used in periodontology to target subgingival pathogens. Bacterial media, immunology and enzymatic assays, analysis of DNA, dark-field and phase contrast microscopy and biochemical markers have been used for this purpose. The surveys showed that criterious analysis to select the best exam is necessary and there is a relationship between the presence of subgingival pathogens and the risk of development of periodontal disease.*

## UNITERMS

*Microorganisms, diagnosis; periodontal disease.*

\* Aluno do Curso de Pós Graduação em Odontologia - Área de concentração em Periodontia (Nível Mestrado), Faculdade de Odontologia de Taubaté - UNITAU - 12020-330 - SP

\*\* Aluno do Curso de Pós Graduação em Odontologia - Área de concentração em Biologia e Patologia Bucodental (Nível Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/UNICAMP - SP

Professor Adjunto de Periodontia - Faculdade de Odontologia de Taubaté - UNITAU - 12020-330 - SP

\*\*\* Departamento de Biopatologia e Diagnóstico - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP - 12245-000 - SP  
Professor Titular de Microbiologia e Imunologia - Faculdade de Odontologia de Taubaté - UNITAU - 12020-330 - SP

## INTRODUÇÃO

Muitos microrganismos habitam a cavidade bucal estimando-se que cerca de trezentas espécies bacterianas distintas podem ser isoladas do sulco periodontal (Zambon & Haraszthy<sup>41</sup>, 1995). Um dos mais importantes avanços no campo da microbiologia associada a doença periodontal é o conceito de especificidade, o qual atribui a cada entidade clínica um grupo específico de patógenos (Newman & Nisengard<sup>27</sup>, 1994). Para alguns microrganismos, tais como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas gingivalis* as evidências são amplas quanto a sua especificidade e por isso eles são considerados agentes etiológicos das periodontites (Zambon<sup>39</sup>, 1996). Assim, a determinação das espécies presentes bem como o entendimento das possíveis interações entre os microrganismos vem se tornando fundamental dentro da periodontia permitindo um diagnóstico e uma conduta terapêutica mais adequados (Nieminen et al.<sup>29</sup>, 1996).

Baseado nas evidências que implicam certas espécies microbianas como patógenos periodontais, vários ensaios (Albandar et al.<sup>1</sup>, 1997) laboratoriais têm sido desenvolvidos para detecção e quantificação relativa das bactérias presentes nas amostras de placa bacteriana dos pacientes<sup>41</sup>. Estes testes incluem técnicas simples como a análise direta dos microrganismos da placa bacteriana ao microscópio até ensaios mais recentes e sofisticados como análise dos ácidos nucleicos dos microrganismos (Melvin et al.<sup>24</sup>, 1994).

De acordo com Zambon<sup>38</sup> (1994), os testes para diagnóstico de patógenos periodontais podem ser indicados: para diagnóstico inicial e plano de tratamento; para monitorar a eficácia do tratamento; selecionar intervalos apropriados entre as consultas de manutenção; determinar sítios ativos de doença periodontal; determinar pacientes de risco; e, para aplicação mais freqüente de métodos preventivos.

Um ensaio ideal para uso clínico deveria ser rápido o suficiente para fornecer os resultados enquanto o paciente se encontra no consultório, simples o suficiente para ser realizado pelo pessoal odontológico com pouco treino ou experiência, e de custo relativamente baixo (Nisengard et al.<sup>30</sup>, 1992). Assim, a partir do exposto, o objetivo do

presente trabalho é discutir as principais técnicas laboratoriais que podem ser utilizadas em periodontia para verificar presença e quantidade de patógenos periodontais. A seguir estão descritos resumidamente, os principais testes utilizados.

## MICROSCOPIA DE CAMPO ESCURO E CONTRASTE DE FASE

O exame microscópico de amostras de placa bacteriana coletadas dos pacientes é capaz de detectar forma, tamanho e motilidade dos microrganismos sem no entanto diferenciar espécie. A microscopia de campo escuro e contraste de fase determinam a porcentagem relativa de microrganismos presentes e têm a capacidade de avaliar bactérias móveis e espiroquetas, mas grande parte dos patógenos da doença periodontal são bastonetes imóveis e por isso tais técnicas tem seu uso limitado na periodontia<sup>27, 28, 39, 41</sup>.

## CULTURA BACTERIANA

Técnica que elucida a maior parte dos microrganismos presentes<sup>27</sup>. Nesta técnica as amostras de placa bacteriana obtidas do paciente são homogeneizadas e semeadas em vários tipos de meios de cultura e incubadas em condições de aerobiose e anaerobiose. Após um adequado período de incubação as placas são examinadas e as colônias isoladas subcultivadas, sendo então as culturas bacterianas isoladas identificadas através de múltiplos testes microbiológicos. Este teste é o único capaz de fornecer informações a respeito da susceptibilidade dos microrganismos aos antibióticos, permitindo assim a seleção da droga mais apropriada<sup>38</sup>. Todavia, esta técnica é dispendiosa e utiliza muito tempo, necessitando de pessoal especializado (Lisgarten<sup>15</sup>, 1992). Fatores limitantes associados a esta técnica como incluem a dificuldade no crescimento de espiroquetas e alguns bacilos móveis em meio de cultura, a perda de viabilidade dos microrganismos durante o transporte e o cultivo e identificação apenas de espécies (Zambon<sup>40</sup>, 1997).

## ENSAIO ENZIMÁTICO - BANA

Técnica rápida e pouco dispendiosa que detecta grupos bacterianos através de informações refe-

rentes aos perfis enzimáticos dos microrganismos da placa bacteriana. Segundo Loesche et al.<sup>19</sup>, (1990) *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides fosythus* e *Treponema denticola* contém em comum uma enzima semelhante a tripsina (trypsin-like) cuja atividade pode ser avaliada pela hidrólise do substrato N-Benzoil-dL-Arginina-2-Naftilamina (BANA). Assim, com uso deste teste pode-se pesquisar esta enzima e confirmar a presença de uma ou mais bactérias acima descritas .

## MARCADORES BIOQUÍMICOS

As alterações que ocorrem nos tecidos periodontais com lesão podem ser detectadas bioquimicamente, antes do diagnóstico clínico das lesões (American Academy of Periodontology<sup>2</sup>, 1994) Assim a detecção de fatores derivados do hospedeiro podem auxiliar a identificação de sítios periodontais com risco de progressão futura. É possível analisar amostras da saliva, fluido do sulco gengival , soro e células sanguíneas e urina<sup>28</sup>, embora o material obtido a partir do fluido gengival seja o indicador mais preciso já que os outros meios fornecem informações escassas<sup>3</sup>. Vários componentes existem no sulco gengival e entre eles pode-se citar enzimas liberadas pelo hospedeiro tais como colagenase, elastase e glucoronidase além dos mediadores da inflamação (Meyer et al.<sup>25</sup>, 1994). Estas enzimas lisam componentes da matriz extracelular e parecem ter uma relação distinta na progressão das periodontites (Chambers et al.<sup>6</sup>, 1991, Goldman<sup>10</sup>, 1997). No que refere-se aos mediadores químicos merecem destaque as interleucinas (IL<sub>1</sub>, IL<sub>6</sub> e IL<sub>8</sub>) e fator de necrose tumoral (TNF) que alteram a atividade fibroblástica e induzem reabsorção óssea sendo em sua maioria produzidos pelos macrófagos. Nos sítios doentes, a concentração de interleucinas no fluido gengival parece exercer importante papel na patogênese da periodontite (American Academy of Periodontology<sup>3</sup>, 1996). A IL<sub>1</sub> e TNF favorecem a quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e linfócitos e podem induzir a síntese de colágeno (Rossomando et al.<sup>32</sup>, 1990).

## TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS

Incluem reações que se utilizam de anti-soros policlonais ou anticorpos monoclonais específicos para antígenos bacterianos ou para fatores de viru-

lência dos microrganismos. São úteis na identificação de microrganismos presentes nas amostras de placa bacteriana subgengival dos pacientes que apresentam quadro de periodontite <sup>40</sup>. Nesta categoria enquadram-se as técnicas a seguir.

## IMUNOFLUORESCÊNCIA

Utiliza-se anticorpos específicos marcados para determinados patógenos periodontais. A reação dos anticorpos com os antígenos bacterianos pode ser detectada pela marcação direta do anticorpo com substância fluorescente (Imunofluorescência direta) ou através da utilização de um segundo anticorpo marcado (Imunofluorescência indireta)<sup>15</sup>. A imunofluorescência associa a sensibilidade e a especificidade de um ensaio imunológico com a visualização ao microscópio permitindo assim a identificação de certos microrganismos presentes em estratos como ocorre na placa bacteriana <sup>27</sup>. No desenvolvimento desta técnica a especificidade é em geral determinada para um grande número de bactérias o que permite a ocorrência de reação cruzada com outros microrganismos que habitam o interior das bolsas periodontais.

## REAÇÃO ELISA

A reação ELISA detecta antígenos ou anticorpos e permite a aplicação de técnicas direta e indireta. Esta reação é sensível, relativamente econômica e tem sido desenvolvida para utilização em consultórios<sup>27</sup>. As amostras do paciente são incubadas em recipientes específicos para que haja a formação de complexos antígeno-anticorpo. A adição do anti-soro conjugado a uma enzima <sup>27</sup> catalisa a reação colorimétrica que permite a detecção do primeiro anticorpo <sup>17</sup>. A quantificação de antígenos bacterianos é determinada através de espectrofotometria da amostra de placa bacteriana <sup>24</sup>.

## AGLUTINAÇÃO DE LÁTEX

Este ensaio imunológico utiliza-se de microesferas de látex cobertas com anticorpos específicos para determinados patógenos periodontais. Existem dois tipos de teste : a técnica direta e a inibição de aglutinação. A técnica direta é a mais co-

mumente empregada ocorrendo a aglutinação, que equivale a um resultado positivo, quando do contato das microesferas cobertas de anticorpos com os antígenos bacterianos. A aglutinação é visível em períodos de dois a cinco minutos<sup>28</sup>. Em contrapartida, o teste de inibição da aglutinação exibe como resultado positivo a não aglutinação quando do contato entre antígeno e anticorpo<sup>27</sup>. Devido a sua fácil realização e rapidez na obtenção dos resultados estes testes exibem um grande potencial para uso rotineiro em consultórios na detecção de patógenos periodontais<sup>28</sup>.

## CITOMETRIA DE FLUXO

Esta técnica, em geral utilizada na análise de células eucarióticas, vem sendo aplicada na identificação de microrganismos bucais. O procedimento envolve a reação de bactérias da placa com anticorpos específicos marcados com fluoresceína. Utiliza-se do citômetro de fluxo que incide um feixe de raios laser na suspensão obtida pela placa bacteriana e anticorpos específicos para as bactérias da placa. As células dispersam a luz em diferentes ângulos que são medidos por detectores apropriados. Como cada tipo celular possui um padrão e volume de reflexão característicos, pode-se identificar os microrganismos<sup>2, 27, 40</sup>.

## ANÁLISES DE DNA E RNA

Estas técnicas se baseiam na capacidade de hibridização do DNA com seqüências complementares de DNA ou RNA. Devido a alta sensibilidade e especificidade estas técnicas são importantes na detecção de patógenos de difícil cultivo, microrganismos que compõem uma microbiota mista ou ainda aqueles presentes em números reduzidos<sup>28</sup>.

## SONDAS DE DNA

Sondas são fragmentos selecionados de DNA que contém seqüências específicas de genes e são usadas para detectar a presença de um gene particular ou uma seqüência de DNA<sup>24</sup>. Os segmentos de DNA podem ser derivadas do DNA bacteriano total e neste caso são chamadas de sondas genômicas ou de pequenos fragmentos de DNA

quando são denominadas sondas de oligonucleotídeos. Por sua vez, estas últimas sondas podem ser obtidas a partir de seqüências de DNA específicas a uma dada espécie ou ainda a partir de pequenas seqüências de RNA ribossômico. As sondas de RNA ribossômico são usadas para estudar as regiões de hipervariabilidade do RNA 16S que são características a cada uma das diferentes espécies bacterianas da placa dental (Loesche<sup>20</sup>, 1992). A visualização da sonda é possível pela marcação desta com elementos radioativos ou enzimáticos. Nas análises que utilizam sondas, o DNA obtido a partir do sulco gengival é denaturado enzimaticamente em fitas simples e então combinado com as sondas obtidas a partir de um microrganismo conhecido. Se a amostra de placa dental do paciente contém tal microrganismo, seu DNA se hibridizará com a sonda e esta reação pode ser identificada através da impressão de películas radiográficas pelos isótopos radioativos. A intensidade da reação aumenta proporcionalmente ao número de microrganismos, permitindo assim sua quantificação na amostra<sup>24</sup>.

## ANÁLISE DE ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO

Endonucleases são enzimas capazes de reconhecer e clivar o DNA de fita dupla em seqüências específicas de genes. Estes fragmentos são separados por eletroforese, corados e visualizados em luz ultra-violeta. Os padrões dos fragmentos são específicos a cada amostra microbiana (Armitage<sup>4</sup>, 1996). Assim, a comparação do padrão eletroforético dos fragmentos de DNA revelam uma homogeneidade ou ao contrário uma heterogeneidade genética com a amostra estudada<sup>28</sup>.

## REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Baseia-se na análise dos ácidos nucleicos, sendo o mais sensível de todos os testes microbiológicos, capaz de detectar um único microorganismo. O ponto fundamental desta técnica é a seleção de dois *primers*, geralmente representados por pequenas seqüências de oligonucleotídeos sintéticos, baseada na região do DNA a ser amplificada. O DNA bacteriano denaturado hibridiza-se com os *primers* que regulam a extensão do mesmo, originando seqüências de DNA idênticas ao segmento padrão. A

amplificação do segmento padrão de DNA possibilita a detecção de microrganismos por métodos menos sensíveis como as sondas de DNA<sup>41</sup>.

## DISCUSSÃO

Ampla variedade de testes diagnósticos vêm apresentando aplicação crescente na periodontia, incluindo tecnologias simples como a análise direta dos microrganismos da placa bacteriana ao microscópio até técnicas mais recentes como as que envolvem a análise dos ácidos nucleicos.

Um teste mais sensível é capaz de detectar bactérias em menores proporções o que pode superestimar dados epidemiológicos já que com frequência os microrganismos em questão serão também detectados nos sítios saudáveis. No entanto, como salienta Di Murro et al.<sup>9</sup> (1997), a concentração microbiana é o ponto chave no início e progressão da doença periodontal. Por isso quando da seleção do teste a análise de sua sensibilidade deve ser em dois aspectos<sup>20</sup>, o primeiro relacionado ao número de microrganismos detectados na amostra e o segundo ao conceito epidemiológico dos resultados fornecidos pelo ensaio. Uma análise semelhante é proposta ao conceito de especificidade devido a possibilidade de se subestimar os dados epidemiológicos. Isto pode ocorrer por exemplo, quando do emprego dos testes enzimáticos onde um resultado positivo pode ser atribuído a mais de uma bactéria.

Atualmente a cultura bacteriana ainda é vista como o padrão ouro em relação aos demais testes pelo fato de fornecer informações a respeito da susceptibilidade dos microrganismos aos antibióticos<sup>38</sup> e também por elucidar a maior parte das espécies presentes<sup>27</sup>. Estudos recentes como o de Nakou et al.<sup>26</sup> (1998) e MacDonald et al.<sup>21</sup> (1998) obtiveram resultados bastante satisfatórios utilizando-se cultivo bacteriano, apesar desta técnica depender também do tipo de meio de cultura empregado e do próprio microrganismo, visto que muitos não são cultiváveis em laboratório e muitos são desconhecidos<sup>40</sup>. O fato da técnica incluir inúmeros passos aumenta a probabilidade de erros que podem afetar os resultados finais gerando uma variação dos mesmos. Inconvenientes como custo elevado, tempo e pessoal especializado ne-

cessários também devem ser considerados<sup>15,41</sup>. Listgarten et al.<sup>18</sup> (1995) compararam o método de cultura bacteriana com imunofluorescência para pesquisa de *A. actinomycetemcomitans* e obtiveram melhores resultados no teste imunológico, com diferença de 41.8% na sensibilidade entre os dois testes. Outro estudo que comparou cultura bacteriana com PCR também apontou uma menor sensibilidade para o primeiro ensaio (Chen et al.<sup>7</sup>, 1997). Por outro lado uma maior sensibilidade para a cultura em relação às técnicas de aglutinação de látex tem sido observado<sup>30</sup>. Renvert et al.<sup>31</sup> (1997) ao compararem cultura com reação ELISA obtiveram maior porcentagem de sítios positivos para *A. actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia* e menor para *P.gingivalis* em relação a reação ELISA.

Além dos aspectos de sensibilidade e especificidade devem ser considerados ainda os fatores que possibilitam a aplicação destes testes na clínica odontológica diária. Neste sentido os que apresentam maior probabilidade de uso em consultório como meios auxiliares de diagnóstico são os ensaios imunológicos. Isto se deve a fácil realização pelo periodontista, rápida obtenção dos resultados e identificação não só das células bacterianas como de seus fragmentos ou ainda fatores de virulência<sup>27,40</sup>. Por outro lado, devido ao custo, tais exames continuam tendo sua maior aplicação em trabalhos de pesquisa. Sioux et al.<sup>34</sup> (1995) pesquisaram a presença de anticorpos para *P.gingivalis* através de reação ELISA e imunofluorescência. IgG foi detectada em 100% dos casos e IgM em 95%, quando do emprego da técnica ELISA, comparado a um nível de detecção de 41.4% para a imunofluorescência.

Apesar da possibilidade de reações cruzadas, quando comparamos um teste imunológico (imunofluorescência por exemplo) em relação às sondas de ácidos nucleicos, encontramos uma vantagem que é a possibilidade de confirmação dos resultados através de exame visual<sup>40,41</sup>. Este fato foi confirmado no estudo de Listgarten et al. (1995) na qual os autores relataram uma superioridade da imunofluorescência em relação a sonda de DNA na pesquisa de *P.gingivalis*<sup>18</sup>.

O uso da citometria de fluxo para amostras de placa bacteriana ainda precisa ser estudada

e questões técnicas devem ser elucidadas<sup>2,27,40</sup>. A necessidade de obtenção de uma suspensão de células únicas a partir dos aglomerados microbianos que constituem a placa na prática representa uma grande limitação<sup>28</sup>. Existem trabalhos (Kamiya et al.<sup>14</sup> 1994) que apontam resultados promissores em relação a citometria de fluxo já que a mesma identificou adequadamente anticorpos específicos monoclonais anti - *P. gingivalis*.

Outro teste que se mostrou bastante promissor como auxiliar no diagnóstico periodontal foi o BANA que apresentou alto índice de reações positivas (80 a 90%) na presença de bolsas  $\geq 7$ mm de profundidade<sup>19</sup>. Segundo Beck et al.<sup>5</sup> (1990) o teste BANA pode ser usado como indicador de risco para perda de inserção periodontal. Deve-se lembrar no entanto, que o resultado positivo deve ser atribuído a presença de mais de uma espécie.

A microscopia de campo escuro, apesar de exibir facilidades técnicas sua aplicação dentro da periodontia apresenta pequeno valor por sua baixa especificidade<sup>27,28,40,41</sup>. Estudos como os de Listgarten et al.<sup>16</sup> (1982), Listgarten et al.<sup>17</sup> (1983) e Magnusson et al.<sup>23</sup> (1985) não apontam correlação positiva entre os resultados obtidos na microscopia de campo escuro com a presença de doença periodontal. Por outro lado trabalhos como o de Macphée & Muir<sup>22</sup> (1986) indicam diferenças entre as proporções bacterianas de sítios saudáveis ou periodontalmente afetados.

A sensibilidade elevada torna as sondas de DNA capazes de detectar bactérias presentes em proporções muito baixas ( $10^2$  a  $10^4$ ) células. Resultados obtidos por Shiloah et al.<sup>33</sup> (1997) na análise de diferentes modalidades terapêuticas apresentaram redução de modo significativo nas proporções microbianas. Com uso de sondas de DNA os autores foram capazes de detectar a presença dos patógenos pesquisados num período pós-operatório de até três meses. A sensibilidade deste método também foi evidenciada no estudo onde embora em menores proporções quando comparado aos sítios doentes, as sete espécies avaliadas foram encontradas nos sítios inativos<sup>1</sup>.

Além de estudos epidemiológicos e verificação da efetividade da terapia periodontal a análise do

DNA bacteriano tem sido aplicada nas pesquisas de transmissão intra-familiar de patógenos periodontais. Merece destaque, devido a eficácia na tipagem de diferentes espécies bacterianas, a análise de DNA por endonuclease de restrição (Van Steenberg<sup>37</sup>, 1991, Greestein & Lamster<sup>11</sup>, 1997) cuja maior contribuição no campo da microbiologia bucal foi detectar a grande variabilidade genética entre as espécies<sup>4,28</sup>.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é empregada tanto na obtenção de dados epidemiológicos como no traçado das possíveis rotas de transmissão intra-familiar de microrganismos<sup>4</sup>, mostrando-se também eficaz na caracterização de genótipos bacterianos (HeTao et al.<sup>12</sup>, 1998). Em uma pesquisa de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, e *C. rectus* em saliva total realizada por Umeda et al.<sup>36</sup> (1998), a técnica acima descrita mostrou sensibilidade inferior em relação a cultura em meio seletivo que é capaz de detectar vinte células viáveis / mL.

Na tentativa de identificar sítios com risco futuro de progressão da doença, os fatores derivados do hospedeiro também tem sido analisados. Enzimas<sup>10,25</sup> e mediadores químicos<sup>3,32</sup> presentes no sulco gengival podem retratar a patologia periodontal<sup>2</sup> uma vez que reações metabólicas e bioquímicas antecedem a lesão clinicamente diagnosticável. Neste tipo de análise, os resultados apresentam forte correlação com a presença de diferentes formas de doença periodontal. Tuula et al.<sup>35</sup> (1994) concluíram que o nível de atividade da elastase era maior nos pacientes com periodontite juvenil e periodontite do adulto quando comparado com o grupo controle. Jean-Meyer et al.<sup>13</sup> (1997) demonstraram níveis mais elevados de elastase no fluido do sulco gengival de pacientes com periodontite de adulto e de progressão rápida em relação ao grupo controle. Dagmar et al.<sup>8</sup> (1994) encontraram níveis elevados de IL<sub>1</sub> no fluido do sulco gengival dos pacientes com periodontite quando comparados com pacientes periodontalmente saudáveis. Testes com marcadores bioquímicos mostram-se promissores mas não se conhece bem seu potencial como base para testes diagnósticos, estudos clínicos adicionais são necessários para melhor avaliar seu valor diagnóstico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o presente momento a ausência de patógenos periodontais é o indicativo mais preciso de sítios periodontais que não progridem enquanto presença dos patógenos indicam progressão da doença. Na verdade a presença de uma microbiota subgingival patogênica está relacionada ao risco aumentado de instalação ou progressão da doença periodontal. Espera-se que no futuro, pesquisas

forneçam testes capazes de distinguir as bactérias virulentas das não virulentas, e de diferenciar microrganismos endógenos e exógenos do sulco gengival, caracterizando indivíduos susceptíveis ou resistentes à doença periodontal. Além disso é necessário estabelecer o número de patógenos necessário para induzir doença, pois só assim o clínico será capaz de interferir no curso da doença, reduzindo o início da patologia periodontal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBANDAR, J.M. et al. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J. Periodontol.*, v. 68, n. 10, p.973-81, 1997.
2. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Host response in periodontal disease. In: *Periodontal disease management*. Chicago, 1994. p. 127-47.
3. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Disease activity. In: *Periodontal literature reviews: a summary of current knowledge*. Chicago, 1996. p. 46-62, 97-102.
4. ARMITAGE, G.C. Periodontal diseases : diagnosis. In : American Academy of Periodontology. *Ann. Periodontology*, 1996. p. 37-215.
5. BECK, J.D. et al . Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community – dwelling blacks and whites. *J. Periodontol.*, v.61, n. 8, p.521-30, 1990.
6. CHAMBERS, D.A.et al. A longitudinal study of aspartate aminotransferase in human gingival crevicular fluid. *J. Periodontol. Res.*, v. 26, n. 1, p. 65-9, 1991.
7. CHEN, C. et al. Oral food consumption and subgingival microorganisms : subgingival microbiota of gastronomy tube-fed children and healthy controls. *J. Periodontol.*, v. 68, n. 12, p. 1163-8, 1997.
8. DAGMAR, S. et al. Interleukin -1b concentration of gingival crevicular fluid. *J. Periodontol.*, v.65, n. 5, p.423-28 ,1994 .
9. DI MURRO, C. et al. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in periodontally healthy and diseased subjects as determined by an ELISA technique. *J. Periodontol.*, v. 68, n. 1, p. 18-23, 1997.
10. GOLDMAN, H.M. Patologia periodontal. In : *Periodontologia clínica*. 2. ed. revisada. São Paulo : Livraria editora Santos, 1997. p.449-58.
11. GREESNTEIN, G., LAMSTER, I. Bacterial transmission in periodontal diseases : a critical review. *J. Periodontol.*, v. 68, n. 5, p. 421-31, 1997.
12. HE TAO et al. Genotypic characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from periodontitis patients by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. Periodontol.*, v.69, n. 1, p. 69-75, 1998.
13. JEAN-MEYER, M. et al. Elastase levels in crevicular fluid from patients with periodontal diseases . *J. Periodontol.* , v.68, n. 3. p. 256-61, 1997 .
14. KAMIYA, I. et al. Flow-cytometric identification and detection of *Porphyromonas gingivalis* by a LPS specific monoclonal antibody. *J. Periodontol.*, v. 65, n. 4, p. 309-15, 1994.
15. LISTGARTEN, M.A. Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. *J. Periodontol.*, v. 63, n. 4, p. 332-7, 1992.
16. LISTGARTEN , M.A., SCHIFTER, C . Differential dark field microscopy of subgingival bacteria as an aid in selecting recall intervals : results after 18 months. *J. Clin. Periodontol.*, v.9, n. 5, p.305-16 ,1982.
17. LISTGARTEN, M.A. et al. Comparative differential dark-field microscopy of subgingival bacteria. *J. Periodontol.* v. 54, n. 1, p. 92-107, 1983.
18. LISTGARTEN, M.A et al. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in an *Actinobacillus actinomycetemcomitans* – positive patient population. *J. Periodontol.*, v. 66, n. 2, p. 158-64, 1995.
19. LOESCHE, W.J. et al. Mult-center clinical evaluation of a chairside method for detecting certain periodontopathic bacteria in periodontal disease. *J. Periodontol.*, v.61 , n. 3, p.189-96, 1990.
20. LOESCHE, W.J. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *J. Periodontol.*, v. 63, n. 11, p. 1102-9, 1992.
21. MacDONALD, E. S. et al. Clinical and microbiological evaluation of a bioassorbable barrier membrane in the treatment of periodontal intraosseous lesions. *J. Periodontol.*, n. 4, v. 69, p.445-53, 1998.
22. MACPHEE, I.T., MUIR K.F. Dark ground microscopy in relation to 3 clinical parameters of chronic inflammatory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, n. 12, v.13 ,p.900-4, 1986.
23. MAGNUSSON ,I. et al. Sampling of subgingival microbiota for dark-field microscopy. *J. Clin. Periodontol.*, v. 12 , n. 3, p.209-15 ,1985.
24. MELVIN, W.L. et al. Comparison of DNA probe and ELISA microbial analysis methods and their association with adult periodontitis. *J. Periodontol.*, v.65, n. 6, p. 576-82, 1994.
25. MEYER, J. et al . Active and a-1 proteinase inhibitor complexed leukocyte. *J. Periodontol.*, v. 65, n. 5, p. 423-8 ,1994 .
26. NAKOU, M. et al. Subgingival microflora associated with nifedipine-induced gingival overgrowth. *J. Periodontol.*, v. 69, n. 6, p. 664-9, 1998.
27. NEWMAN, M.G., NISENGARD, R.J. Diagnostic microbiology and immunology. In : NISENGARD, R.J., NEWMAN, M.G. *Oral microbiology and immunology*. 2 ed. Philadelphia : W.B. Saunders , 1994. cap. 34. p. 435-49.

28. NEWMAN, M.G., SANZ, M. Diagnóstico por técnicas avançadas. In: CARRANZA JÚNIOR., F.A., NEWMAN, M.G. *Periodontia clínica*. 8. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1997. p. 399-414.
29. NIEMINEN, A. et al. Value of some laboratory and clinical measurements in the treatment plan for advanced periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v.23, n. 6, p.572-81, 1996.
30. NISENGARD, R.J. et al. Development of a rapid latex agglutination test for periodontal pathogens. *J. Periodontol.*, v. 63, n. 7, p. 611-7, 1992.
31. RENVERT, S. et al. Clinical and microbiological irrigation with citric acid as evaluated by an enzyme immunoassay and culture analysis. *J. Periodontol.*, v. 68, n. 4, p. 346-52, 1997.
32. ROSSOMANDO, E.F., KENNEDY, J.E., HADJIMICHAEL, J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Arch. Oral. Biol.*, v. 35, n. 5, p. 431-4, 1990.
33. SHILOAH, J. et al. The survival rate of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* following 4 randomized treatment modalities. *J. Periodontol.*, v.68, n. 8, p. 720-8, 1997.
34. SIOUX, J-L et al. Serum antibodies to *Porphyromonas gingivalis* in children. *J. Periodontol.*, v. 66, n. 5, p. 369-76, 1995.
35. TUULA, I. et al. Elastase and a - 1 - proteinase inhibitor in gingival crevicular fluid and gingival tissue in adult and juvenile periodontitis. *J. Periodontol.*, v.65, n. 7, p.702-9, 1994.
36. UMEDA, M. et al. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. *J. Periodontol.*, v. 69, n. 7, p. 828-33, 1998.
37. VAN STEENBERGEN, T.J.M. et al. Microflora and bacterial DNA restriction enzyme analysis in young adults with periodontitis. *J. Periodontol.*, v 62, n. 3, p. 235-41, 1991.
38. ZAMBON, J.J. The adjunctive use of clinical microbiology in periodontal diagnosis and treatment. In : AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. *Periodontal disease management*. Chicago, 1994. p. 115-125.
39. ZAMBON, J.J. Periodontal diseases : microbial factors. In : American Academy of Periodontology. *Ann. Periodontology*. Chicago, 1996. p. 879-925.
40. ZAMBON, J.J. Diagnóstico microbiano na terapia periodontal. In: GENCO, R.J., COHEN, D.W.GOLDMAN, H.M. *Periodontia contemporânea*. 2 ed. rev. São Paulo : Ed. Santos, 1997. cap. 37. p. 449-58.
41. ZAMBON, J.J., HARASZTHY, V.I. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontology 2000*, v. 7, n.1, p. 69-82, 1995.