



Bem-vindo Revista Periodontia Junho-2001

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO ATRAVÉS DA SONDA DE DNA

Sinopse

Ariovaldo STEFANI *

Antonio Wilson Sallum**

Abstract

Antonio Fernando Martorelli de Lima***

SINOPSE

Para diagnosticar precisamente os microrganismos envolvidos na etiologia da doença periodontal, várias técnicas laboratoriais têm sido utilizadas. Entre estas podemos citar a sonda de DNA, meios de cultura, métodos de imunofluorescência e de ELISA. O objetivo desta revisão foi avaliar a eficiência destes métodos comparando-os com a sonda de DNA, que mostrou ser mais eficiente que os demais.

UNITERMOS

Microbiologia, doença, sonda de DNA.

INTRODUÇÃO

Diferentes microrganismos estão associadas com a saúde e a doença periodontal ⁹. Na década de 80 a análise microbiológica foi proposta para diagnosticar e monitorar a evolução da doença periodontal em humanos. Estudos realizados avaliaram desde a morfologia e movimentação das bactérias, até a cultura de placa subgengival, usada para determinar a composição da flora bacteriana ^{4, 5, 6, 13, 14}. A doença periodontal é uma infecção possível de ser tratada quando o microrganismo infectante é identificado e eliminado. Partindo desta identificação o clínico pode traçar um diagnóstico ou avaliar a eficácia do tratamento, baseado na etiologia microbiana e não apenas nos aspectos clínicos.

A doença periodontal clinicamente é caracterizada por edema, alteração de cor, sangramento à sondagem, perda de inserção clínica e presença de exudato. Entretanto existem infecções periodontais nas quais o dano tecidual é muito grande em comparação à pequena quantidade de placa visível, e bolsas profundas podem ficar "ocultas" por tecido gengival com aparência clínica sadia ². Embora se destaque há muito tempo a importância do controle da placa bacteriana no tratamento da doença periodontal, é relativamente recente a identificação de espécies microbianas específicas na placa dental. Identificar precisamente os microrganismos presentes em cada forma de doença periodontal pode ser a forma ideal para o controle dessas patologias ⁹. Estudos tem mostrado que algumas bactérias periodontopatogênicas podem ser caracterizadas pela sua ação enzimática e esta identificação ser útil para o diagnóstico da doença ^{4, 5, 8, 12}.

Estudo realizado por SOCRANSKY ¹³ em 1987 considerou as limitações para medir o estágio clínico e identificar os sítios periodontais ativos e diferenciá-los dos sítios não ativos. A teoria de especificidade da placa bacteriana está relacionada com a doença periodontal destrutiva, e sugere que níveis elevados de *Actinobacilos actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, e *Bacteroides intermedius* são indicadores da atividade da doença.

Espécimes Subgengivais

Em crianças não foi demonstrada a relação entre raça, sexo, idade e os microrganismos *A. actinomycetemcomitans*, *B. intermedius*, e *B. gingivalis* ¹. Entretanto, a associação entre o *A. actinomycetemcomitans* e a periodontite juvenil localizada foi descrita por ZAMBON et al. ¹⁶. O *A. actinomycetemcomitans* foi caracterizado como o único produtor de leucotoxina nos casos de periodontite juvenil. Pacientes com periodontite juvenil localizada mostraram alta toxicidade no filtrado, diferente dos

pacientes com saúde ou doença periodontal do adulto, portanto, este microrganismo parece estar associado à patogênese de tipos específicos da doença com caráter destrutivo rápido ^{3, 16}.

Outros fatores da virulência deste microrganismo foram descritos por TAYLOR ¹⁵. Entre eles podem ser citados o fator de inibição quimiotática, imunossupressor, citotóxico, união de proteínas e lipopolissacarídeos, determinantes de resistência à antibióticos, adesinas e invasinas.

Sonda de DNA

O teste é realizado a partir da purificação do DNA bacteriano de uma espécie alvo, ou seja, o DNA é fragmentado e purificado em partículas menores. Os fragmentos são marcados, geralmente com um elemento radioativo, e ligado ou hibridizado com o DNA bacteriano isolado da mesma espécie. As amostras são enviadas ao laboratório e colocadas em filtro. O DNA marcado é levado às condições de hibridização, que poderá evidenciar o material em filme fotográfico. Quanto mais pontos escuros estiverem sensibilizando o filme, maior será a quantidade de DNA marcado e maior também será a quantidade de espécie alvo presente na amostra ¹⁶.

Comparação entre sonda de DNA e outros métodos de diagnóstico

MELVIN et al. ¹⁰ compararam a sonda de DNA e o método ELISA, para identificar e correlacionar os microrganismos presentes em pacientes com doença periodontal. A sonda de DNA foi utilizada para identificar *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *T. denticola* e *C. rectus* e o método ELISA para identificar *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *T. denticola*, e *C. rectus*. A comparação entre os dois métodos revelou que o método ELISA identificou *P. gingivalis*, e *C. rectus* significativamente com mais frequência que a sonda de DNA e que o *T. denticola* foi identificado com mais frequência na sonda de DNA.

SAVIT et al. ¹¹ demonstraram em estudo realizado que a sonda de DNA mostrou 100% de eficiência para detectar *A. actinomycetemcomitans* e *B. intermedius* e 91% de eficiência para detectar *B. gingivalis*, em amostras cultura negativa. A análise feita com a sonda revelou uma correlação entre a presença destes patógenos e a evidência clínica da doença. As amostras obtidas de pacientes saudáveis não mostraram nenhum nível dos três patógenos, tanto em cultura como com a sonda de DNA. Esses resultados sugerem que a sonda de DNA é mais eficiente que a cultura para detectar *A. actinomycetemcomitans*, *B. gingivalis*, e *B. intermedius*.

em amostras de placa subgingival em humanos.

LISTGARTEN et al. ⁷ compararam a sensibilidade relativa da imunofluorescência, da cultura e da sonda de DNA para a detecção de patógenos periodontais. A imunofluorescência e a sonda de DNA permitiram a detecção de *A. actinomicetemcomitans* mais eficientemente que a cultura. Estes dois testes também se mostraram superiores à cultura para a detecção de *P. gingivalis* e *B. forsythus*. Na cultura estas duas espécies não mostraram crescimento confiável quando permaneciam por longo período de tempo no meio de transporte. Neste estudo, a sonda de DNA mostrou-se menos efetiva que a imunofluorescência para a detecção de *P. gingivalis* e *B. Forsythus*, contudo, muitos dos níveis relatados foram baixos e, se existem níveis críticos necessários para o início da doença, a cultura ou a sonda de DNA são sensíveis o suficiente para detectar as espécies alvo, portanto, a maior sensibilidade da imunofluorescência pode não ser necessária. Porém até que estes níveis críticos estejam bem definidos, a maior sensibilidade da imunofluorescência pode ser uma vantagem.

DI RIENZO et al. ³ mostraram que o *A. actinomicetemcomitans* tem sido reconhecido como agente etiológico primário na periodontite juvenil localizada, entretanto, persistem questões quanto à origem da infecção, processo de transmissão e virulência, e o caráter hereditário. Análise de fragmento de um clone cromossômico de DNA escolhido ao acaso, revelou que a linhagem do *A. actinomicetemcomitans* previamente caracterizado mostrava menor heterogenicidade quando isolada de indivíduos com caráter hereditário ou variantes determinadas da periodontite juvenil localizada. A sonda de DNA permite determinar tipos ou variantes associadas com sítios de destruição periodontal.

DISCUSSÃO

Segundo SAVIT et al. 11 as sondas de DNA são mais sensíveis para a detecção de patógenos periodontais que a técnica de cultura. LOESCH 8 comparou a cultura, sonda de DNA, imunofluorescência e ELISA, exames microscópicos e teste de BANA para detectar e quantificar *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *B. forsythus* nas mesmas amostras de placa. Um total de 204 amostras de placa foram coletadas de 67 pacientes, cujos sítios sangravam e apresentavam profundidade de sondagem de $6,4 + 1,8$ mm. Os métodos freqüentemente concordaram em resultados verdadeiro-positivo e verdadeiro-negativo. A sonda de DNA foi precisa entre 88% e 96% dos sítios para detectar os microrganismos alvos. A cultura foi menos precisa na detecção de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* e, como já era previsível, não pode ser usada rotineiramente com espiroquetas como *T. denticola*. Neste estudo os dados indicaram que a sonda de DNA e o método imunológico são mais confiáveis como referência padrão que a cultura. Como a sonda de DNA é específica para cada microrganismo e pode ser produzida comercialmente de modo padronizado, ela parece ser a melhor escolha para a referência primária ou para a detecção e quantificação de periodontopatógenos. Como já descrito, embora muitos estudos demonstrem a eficiência dos testes microbiológicos, deve-se considerar que inúmeros problemas podem ser levantados com relação ao uso dos mesmos na clínica odontológica. Como exemplo pode-se citar: existem aproximadamente 20 espécies bacterianas que causam infecção periodontal, portanto um teste microbiológico que identifique somente uma espécie, pode não detectar infecções que se iniciem por outras espécies; existem certas combinações de espécies que são necessárias para causar a doença, ou seja, a doença periodontal é uma infecção mista; existe uma discordância na identificação dos principais periodontopatógenos, que resultam das diferenças nos métodos de cultura e do procedimento de coleta das amostras; a maioria dos microrganismos podem estar associados com a doença periodontal somente quando seus níveis estão altos, este limiar não é conhecido, então não se pode distinguir níveis de doença de níveis carregados pelo portador, o que implica que a detecção mesmo confiável de um organismo pode não traduzir na detecção da doença; os métodos estatísticos usados para analisar os dados microbiológicos nem sempre são apropriados. Outro problema relacionado ao uso de testes biológicos é a necessidade de que ele seja objetivo para o diagnóstico da doença periodontal. As análises iniciais de mercado para o desenvolvimento comercial de testes de diagnóstico mostra a falta de interesse dos profissionais por tais produtos. Para que a classe odontológica faça uso de tais testes, estes deveriam ser simples, de rápida execução, baratos e capazes de fornecer informações realmente úteis para o tratamento 8.

CONCLUSÃO

A sonda de DNA é o método mais sensível para a detecção de patógenos periodontais. Entretanto, a utilização clínica da sonda de DNA é questionável, pois a identificação de um patógeno não implica em diagnóstico preciso, já que muitas vezes é necessária a associação entre várias espécies para causar os sintomas clínicos da doença periodontal. O alto custo, dificuldade na fase laboratorial e tempo interferem na indicação para a realização clínica do teste.

ABSTRACT

The fact of microorganism population being present in the oral flora and the intimate relation with the periodontal disease guide researchers to study and evaluate how it affects periodontal health. As well known periodontal disease is an infectious disease and should be evaluated and treated as one. Taking advantage of improved techniques in studying bacteria that cause periodontitis will lead us in a close future to point out our research toward a better and easy method to determine exactly with is the best treatment to eliminate or control the microorganism population that cause this disease. One of these methods is able to identify DNA bacteria and quantify the amount of bacteria present in subgingival plaque and it is called the DNA probe. Being capable of quantifying and identifying bacteria permitting us to reach a better diagnostic and a more successful treatment plan is our goal in periodontics. The purpose of this review was to demonstrate that the DNA probe is the most efficient method when compared with other techniques.

KEY WORDS

Microbiology , disease, DNA probe

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abraham, J, Stiles, H.M, Kmmerman, L.A, Forrester, D. Assessing periodontal pathogens in children with varying levels of oral hygiene. J Dent Child, v.3, p. 189-193. 1990.
2. Armitage GC. Exame clínico periodontal. In: Periodontia Contemporânea, São Paulo: Livraria - Editora Santos, 1996. p. 339-347.
3. Di Rienzo, J.M, Slots, J. Probe - specific DNA fingerprinting applied to the epidemiology of localized juvenile periodontitis. Oral Microbiol Immunol. , v. 2, p. 49-56. 1990.
4. Dzink, J.L, Smith, C. e Socransky, S.S. Semiautomated technique for identification of subgingival isolates. J Clin Microbiol., v.19, p. 599-605. 1984.
5. Hofstad, T. Evaluation of the API-ZYM System for identification of Bacteroides and Fusobacterium species. Medical Microbiol and Immunol, v. 168, p. 173-177. 1980.
6. Laughon, B.E, Syed, A.S, Loesche, W.J. API ZYM

system for identification of *Bacteroides* spp.,
Capnocytophaga ssp. and spirochetes of oral origin. *J Clin Microbiol*, v. 15, p. 97-102. 1982.

7. Listgarten, M.A, Wong, M.Y. Detection of *A. actinomycetemcomitans*, *P. Gingivalis* and *B. Forsythus* in positive patient population. *J Periodontol*, v. 66, p. 158-164. 1995.
8. Loesche, W.J. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *J Periodontol*, v. 63, p. 1102-1109. 1992.
9. Loesche, W.J. The bacterial etiology of dental decay and periodontal disease: The specific plaque hypothesis. *Clin Dent*, v. 2, p. 1-13. 1982. Loesche, W. J. The bacterial etiology of dental decay and periodontal disease: The specific plaque hypothesis. *Clin Dent*, v. 2, p. 1-13. 1982.
10. Melvin, W.L, Assad, D.A, Miller, G.A, Gher, M.E, Simonson, L., York, A.K. Comparison of DNA probe and ELISA microbiol analysis methods and their association with adult periodontitis. *J Periodontol*, v. 64, p. 576-582. 1994.
11. Savit, E.D, Strzempko, M.W, Vaccaro, K.K, Peros, W.J, French, C.K. Comparison of cultural methods and probe analyses for the detection of *A. actinomycetemcomitans*, *B. gingivalis* and *B. intermedius* in subgingival plaque samples. *J Periodontol*, v. 59, p. 431-438. 1988.
12. Slots, J. Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram-negative bacteria with the API ZYM sistem. *J Clin Microbiol*, v. 14, p. 288-294. 1981.
13. Socransky, S.S. Microbiology of periodontal disease - present status and future considerations. *J Periodontol*, v. 48, p. 497. 1987.
14. Syed, S.A, Gusbert, F.A, Loesche, W.J, Lang, N.P. Diagnostic potential of chromogenic substrates for rapid detection of bacterial enzymatic activity in health and disease associated periodontal plaques. *J*

Periodontol Res, v. 19, p. 497. 1984.

15. Taylor, P.F, Meyer, D, Mintz,, K. Virulence factors of the periodontopathogen *A. actinomicetemcomitans*. J Periodontol, v. 67, p. 291-297. [1996](#).
16. Zambon, J.J, Haraszthy, V.I, Hariharan, G, Lally, E.T, Demuth, R.D. The microbiology of Early-Onset Periodontitis: association of highly toxic *A. Actinomicetemcomitans* strains with localized juvenile periodontitis. J periodontol, v. 67, p. 282-290. 1996.

*** Especialista em Periodontia pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.**

**** Professor Titular da área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.**

***** Professor Livre Docente da área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.**

