

# Patógenos Periodontais: Comparação entre Cultura Bacteriana e PCR em Tempo Real para Teste Diagnóstico

## Periodontal Pathogens: Comparison Between Culture and Real Time PCR for Diagnostic Assay

Telma B. L. BEDRAN<sup>1</sup>, Marianne N. M. NOGUEIRA<sup>1</sup>, Luis C. SPOLIDORIO<sup>2</sup>, Carlos ESTRELA<sup>3</sup>, Denise M. P. SPOLIDORIO<sup>2</sup>,

1- Pós-Graduanda em Diagnóstico e Cirurgia, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara.

2- Prof. Adjunto, Departamento de Fisiologia e Patologia, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara.

3- Doutor e Livre-Docente em Endodontia, Professor Titular de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás..

### RESUMO

A correta distinção dos microrganismos envolvidos na patogênese da doença periodontal, torna-se importante para o entendimento da sua progressão e adequado plano de tratamento. Métodos de identificação e quantificação foram desenvolvidos e são considerados extremamente sensíveis e precisos na caracterização das espécies bacterianas. Com isso a presente revisão mostra trabalhos existentes na literatura, os quais analisaram comparativamente os métodos de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) e cultura bacteriana com objetivo na identificação de periodontopatógenos. Através do método de cultura bacteriana é possível a identificação de novos microrganismos e realização de testes de sensibilidade a antibióticos. O qPCR é um teste microbiológico que identifica e quantifica espécies bacterianas, através da amplificação gênica de fragmentos de DNA pré-determinados, com alta sensibilidade, especificidade e dispendem menor tempo do operador quando comparados a cultura bacteriana. Assim para a escolha de um determinado teste diagnóstico deve-se levar em consideração não somente a sua precisão na identificação dos micro-organismos, mas também a relação custo-benefício.

PALAVRAS-CHAVE: Meios de cultura, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), periodontite.

### INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica que se caracteriza clinicamente pela destruição dos tecidos de suporte periodontais, podendo evoluir até a perda do elemento dentário, sendo resultado da interação entre bactérias presentes no biofilme subgengival e os tecidos do hospedeiro<sup>1</sup>. O microambiente subgengival da bolsa periodontal é constituído por grande diversidade microbiana, com mais de 700 espécies isoladas de diferentes indivíduos, entretanto, poucas espécies estão associadas com a periodontite<sup>2,3</sup>.

Devido à dificuldade na identificação de toda a microbiota e o entendimento de como eles interagem entre si e com o hospedeiro, estudo transversais e longitudinais foram e estão sendo realizados para tentar elucidar o papel etiológico de diferentes patógenos periodontais, e formaram evidências que *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*<sup>4,5,6</sup> estão envolvidos na periodontite. Evidências científicas sugerem ainda que outras bactérias isoladas da microbiota subgengival como *Campilobacter rectus*, *Porphyromonas endodontalis*, *Filifactor alocis*, *Prevotella tanneriae* são membros residentes da microbiota bucal e podem ser encontrados tanto em pacientes saudáveis como em maior quantidade em pacientes com a doença<sup>7</sup>.

Embora o papel etiológico dos periodontopatógenos esteja

sempre sendo investigado, o uso e utilidade dos testes diagnósticos na identificação e quantificação dessas bactérias na periodontite são controversos. Dessa forma, grande atenção tem sido dada ao desenvolvimento e aplicação de técnicas específicas, com o objetivo de contribuir na identificação e caracterização de periodontopatógenos, no conhecimento sobre as interações microbianas e a relação com os fatores clínicos da periodontite<sup>5,8,9</sup>. Historicamente o método de cultura é bastante utilizado em estudos de caracterização da composição da microbiota subgengival e até então considerado um método de referência clássico em microbiologia. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular com o objetivo de detecção de patógenos periodontais permitiu não somente adquirir conhecimento da genética microbiana, mas também fixou as bases para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas melhoradas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Este trabalho teve como objetivo comparar os métodos diagnósticos utilizados para identificar e quantificar patógenos periodontais, com ênfase na cultura bacteriana e qPCR.

### Razões para o diagnóstico microbiano em pacientes com periodontite

Com o progresso alcançado pelas ciências biológicas e impulsionado pelo desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular, observou-se grande e importante desenvolvimento nas diversas áreas de conhecimento, como, medicina, medici-

na veterinária, ciências farmacêuticas, odontologia entre outros. Entretanto, para o diagnóstico microbiano ter validade, é necessário ter um impacto no diagnóstico, planejamento e benefício para o paciente.

A utilização de métodos microbianos para diagnóstico de diferentes formas de periodontite permanece controversa. As limitações dos testes para a presença ou ausência de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* para distinguir pacientes com periodontite agressiva ou crônica foi descrito em revisão sistemática<sup>10</sup>. Entretanto, o diagnóstico de periodontite agressiva pode ser menos provável em pacientes sem a detecção de *A. actinomycetemcomitans*. Os relatos da prevalência deste patógeno em indivíduos jovens saudáveis e portadores de periodontite crônica são menores, principalmente em estudos realizados no Brasil<sup>11</sup>. Outros estudos isolaram *A. actinomycetemcomitans* em cerca de 75 a 100% de amostras de bolsas periodontais ativas na periodontite agressiva<sup>12,13</sup>, corroborando assim a relação existente entre este patógeno e a forma agressiva da doença periodontal. Embora *A. actinomycetemcomitans* seja indicado como principal patógeno na periodontite agressiva, existem controvérsias na literatura<sup>14</sup>.

A utilização de identificação microbiana como ajuda no planejamento do tratamento de paciente com periodontite tem sido avaliado em diferentes estudos<sup>15</sup>, direcionando uma terapia antimicrobiana baseada em dados microbiológicos, podendo estes serem utilizados como indicador de saúde ou progressão de doença.

#### Métodos diagnósticos microbiológicos

Enquanto as bases científicas proporcionadas pelas técnicas clássicas tiveram poucos acréscimos, os conhecimentos moleculares avançaram e continuam avançando rapidamente proporcionando de forma incontestável uma evolução na dinâmica da ciência e consequentemente nos benefícios das pesquisas científicas.

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

Na Odontologia, a cultura bacteriana é um método clássico de diagnóstico de periodontopatógenos residentes no biofilme subgingival, sendo capaz de identificar novas espécies, oferecer mensuração quantitativa das espécies viáveis e realização de teste de resistência antibiótica. O resultado disto é que a cultura bacteriana é considerada o padrão ouro no diagnóstico microbiológico periodontal e continua sendo um importante meio de diagnóstico de diversas doenças<sup>4</sup>.

No método de cultura, as amostras são cultivadas anaerobicamente utilizando meios seletivos ou não, juntamente com vários testes bioquímicos de identificação. Esta técnica é capaz de quantificar e identificar a presença ou ausência de determinado microrganismo. A principal vantagem deste método é a possibilidade para obter contagem absoluta ou relativa da espécie cultivada, como também é um método capaz de caracte-

rizar novas espécies e avaliar a susceptibilidade a antibióticos<sup>16</sup>. Dessa forma, ao permitir a quantificação de bactérias, a cultura bacteriana proporciona comparação com a condição clínica no estado de saúde e doença, bem como é capaz de determinar a proporção de cada microrganismo em diferentes fases do tratamento, e com isso esclarecer o potencial papel dos mesmos na etiologia complexa da doença periodontal<sup>17</sup>.

Apesar de apresentar-se como importante método diagnóstico, a cultura possui várias limitações e exigências, como a necessidade de preservar a viabilidade bacteriana, dificuldade de recuperar espécies cultiváveis quando estas são encontradas em número reduzido, incapacidade de detectar microrganismos em baixas proporções, necessidade de pessoal capacitado, tempo e custo relativamente altos, intensificação do trabalho, condições rigorosas de transporte das amostras e a necessidade de preparo de meios específicos para cada espécie<sup>6,16,18</sup>.

Além das limitações citadas acima, espécies importantes relacionadas à periodontite, como por exemplo, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, exigem condições rigorosas para seu crescimento e são difíceis de serem detectadas e quantificadas através de métodos convencionais de cultura bacteriana<sup>19,20</sup>. A sensibilidade do cultivo destas bactérias pode ser baixa, especialmente para meios não seletivos, com limite de detecção média de  $10^3 - 10^4$  células bacterianas, perfazendo dessa maneira, número baixo e não detecção de patógenos específicos em amostra subgingival.

Com o advento de técnicas de Biologia Molecular os conhecimentos sobre a etiopatogênese de várias doenças, avançaram de forma rápida, e consequentemente os diagnósticos ganharam notáveis reforços fundamentados nessas técnicas, permitindo traçar melhores protocolos de tratamentos para as mais variadas patologias<sup>20,21</sup>.

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular objetivando a detecção de periodontopatógenos permitiu não somente a aquisição de conhecimento em genética microbiana, mas também fixou as bases para o desenvolvimento melhorado de técnicas diagnósticas. Com isto, tornou-se uma ferramenta de grande valia para pesquisadores no intuito de detectar espécies de difícil cultivo ou não cultiváveis servindo de apoio para pesquisas epidemiológicas<sup>21</sup>.

Os testes diagnósticos por meio de técnicas de biologia molecular, como por exemplo, o PCR identifica o DNA bacteriano do microrganismo em análise, tornando assim fundamental a sua extração. Diferentes métodos químicos, enzimáticos ou físicos são utilizados para obter DNA suficiente com quantidade e qualidade para subsequente análise através de sondas ou por PCR. Os métodos químicos orgânicos ou detergentes são utilizados para destruir membranas e proteínas e assim evitar interferência com os testes utilizando o DNA. Como exemplo temos a lisozima utilizada para quebrar a parede bacteriana e a proteinase K para destruir componentes protéicos da parede. Já os métodos físicos como o calor é utilizado para ruptura da célula e desnaturação das proteínas. Após o DNA da amostra subgingival ter sido extraído e purificado, diferentes métodos diagnósticos foram desenvolvidos para detectar e quantificar

periodontopatógenos<sup>22</sup>.

A metodologia do PCR envolve a técnica de PCR<sup>20</sup> (PCR convencional ou PCR qualitativo) e a qPCR (PCR em tempo real ou PCR quantitativo)<sup>23</sup>. O PCR detecta espécies viáveis e não viáveis, possui boa especificidade o que lhe permite distinguir patógenos alvos de numerosas espécies presentes na cavidade bucal, o que não é possível pela técnica de cultura bacteriana. Entretanto a técnica de PCR somente detecta os microrganismos na fase de platô da reação e é incapaz de realizar quantificação precisa do número de bactérias presentes.

O PCR emergiu como o mais poderoso instrumento para amplificação de genes, permitindo obter grandes quantidades de DNA. O PCR consiste basicamente na amplificação gênica sequencial de fragmentos de DNA pré-determinados e específicos de determinada espécie. Esta técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores – “*primers*”, que delimitam a sequência de DNA de dupla fita alvo da amplificação. Estes “*primers*” são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo. Uma vez amplificado esta sequência de nucleotídeos poderá ser detectada por eletroforese em gel de agarose. Esta técnica oferece um tempo de detecção rápido e maior precisão quando comparados com culturas bacterianas<sup>21</sup>. Entretanto, a especificidade da reação é complexa e depende de fatores inter-relacionados, incluindo tamanho do primer, temperatura de anelamento e concentração do tampão. A maior limitação do PCR é a susceptibilidade do processo por contaminação.

Variações da técnica de PCR foram desenvolvidas. A técnica de qPCR monitora diretamente o aumento do produto de PCR através das amostras enzimáticas permitindo a detecção de um número muito pequeno de patógenos. O qPCR utiliza o sistema *Taq Man* ou *Sybr Green* para medir o acúmulo dos produtos de PCR com amostras fluorescentes e em tempo real rastreia com o uso de laser os produtos finais. O sistema *Sybr Green* utiliza corantes que se intercalam com qualquer dupla fita de DNA, ou seja, não possui alta especificidade quanto o *TaqMan*, porém possui custo mais baixo. O sistema *TaqMan* possui uma sonda que reconhece e se intercala especificamente entre a ligação primer com o DNA bacteriano<sup>24</sup>.

A quantidade de moléculas dos produtos de qPCR sintetizados depende diretamente da quantidade de moléculas padrão. Os dados para a quantificação são coletados na fase exponencial do qPCR, permitindo quantificação precisa do número de cópias do DNA alvo quando usados padrões internos e externos. O qPCR tem sido usado para identificar alguns dos principais patógenos periodontais como: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *T. forsythia* e alguns vírus<sup>21,22</sup>.

Este método de biologia molecular é atraente devido a sua facilidade de utilização, tempo de resposta rápida, bem como o potencial para ser totalmente automatizado. Pode multiplicar excessivamente pequena quantidade de DNA bacteriano além

de detectar baixas quantidades de bactérias. Entretanto, as técnicas de biologia molecular permitem somente a identificação de bactérias para o teste a qual é concebido. Nenhuma informação adicional pode ser adquirida, como por exemplo, a detecção de bactérias inesperadas, testes de suscetibilidade antibiótica, os quais podem ser realizados por técnicas de cultura bacteriana<sup>25</sup>.

Vários estudos compararam técnicas de cultura bacteriana e qPCR na detecção de patógenos periodontais, demonstrando que o qPCR permite detectar e quantificar espécies viáveis e também não viáveis, o qual mostrou ser uma técnica rápida e sensível na detecção de microrganismos presentes nos sítios periodontais, com alto grau de sensibilidade e especificidade quando comparados com o padrão ouro de cultura bacteriana, já que a cultura exige uma menor quantidade de patógenos para serem detectados como também pelas severas condições de crescimento e cultivo exigidas por esta técnica<sup>18,26</sup>.

Outro fato interessante se deve às diferentes quantidades de patógenos detectadas entre as técnicas. Para o qPCR a quantidade é de 10 enquanto para a cultura bacteriana varia de 10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup> resultando assim em maior sensibilidade do qPCR. As diferenças entre as quantidades de patógenos analisados são limitadas às condições específicas de crescimento e a recuperação de microrganismos de difícil cultivo no método de cultura<sup>18</sup>.

Em geral as diferenças entre cultura bacteriana e qPCR podem dar novas percepções do papel da patogênese periodontal e de bactérias periodontais não cultiváveis, que visam esclarecer através de estudos comparativos o papel dos diferentes tipos de microrganismos possibilitando o entendimento da etiologia complexa das doenças periodontais<sup>17</sup>.

Determinadas espécies de periodontopatógenos como *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* são de difícil diferenciação quando se utiliza testes fenotípicos como rotina e a identificação entre eles podem ser inequívocas através do perfil de DNA e cultura. Entretanto com a utilização da técnica de qPCR não ocorre resultados falso positivos, devido a maior sensibilidade da técnica.

Outra espécie de difícil detecção através do método clássico de cultura bacteriana é *Treponema denticola*. Este microrganismo não forma colônias e possui altas exigências de crescimento levando a resultados falsos negativos através do método de cultura<sup>27</sup>. Estudos comparando qPCR e cultura bacteriana observaram maior sensibilidade e especificidade para o qPCR em particular na detecção de *T. denticola*, sendo identificado em mais de 80% das amostras isoladas de periodontite. Para *P. intermedia* e *P. nigrescens* os meios utilizados através da cultura não conseguiram distinguir entre as duas espécies, levando a uma superestimação da quantidade real de *P. intermedia*. Entretanto, utilizando-se o qPCR foi possível diferenciar as duas espécies de microrganismo.

Estudos semelhantes foram realizados com o objetivo de comparar cultura bacteriana e qPCR, para os periodontopatógenos *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *Micromonas micros* e *Fusobacterium* spp. em sítios saudáveis e sítios com periodontite, resultando na eficiência de am-

bas as técnicas na detecção das bactérias em maior quantidade nos sítios doentes comparados aos controles saudáveis. Entretanto, o qPCR mostrou maior sensibilidade e especificidade quando comparada com a técnica de cultura bacteriana<sup>29,30</sup>.

## CONCLUSÃO

Uma precisa quantificação na detecção dos periodontopatógenos poderia facilitar o monitoramento da terapia periodontal e detectar novas espécies e com isso permitir um correto estudo epidemiológico da progressão da doença periodontal. O qPCR seria um método diagnóstico microbiológico promissor para a detecção e quantificação de periodontopatógenos, por apresentar maior sensibilidade e especificidade na detecção de pequenas quantidades de patógenos bucais, os quais não estão no limite de detecção da cultura bacteriana além de ser um método rápido, sensível e preciso.

Entretanto a escolha do teste microbiológico para avaliação clínica de indivíduos com periodontite deve levar em consideração outros fatores como precisão diagnóstica, custo e disponibilidade. Além disso, estudos clínicos controlados ainda são necessários para avaliar criteriosamente a técnica de qPCR no tratamento ou acompanhamento dos pacientes com periodontite.

## REFERÊNCIAS

- Holt S, Ebersole J. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex" a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000;38:72-122.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;12:3770-83.
- Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *P. gingivalis* and *T. denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:1-9.
- Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol* 2008;79:1620-9.
- Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004;31:1034-47.
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721-32.
- Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:6-11.
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:266-73.
- Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, Van Poperin N, Hujoel PP. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? *J Clin Microbiol* 1992;30:418-26.
- Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* 2002;29 Suppl 3:10-21.
- Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:860-6.
- Cortelli SC, Jorge AO, Cortelli JR, Jordan SF, Haraszthy VI. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. *Pesqui Odontol Bras* 2003;7:183-8.
- Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci* 2005;113:28-33.
- Gajardo M, Silva N, Gomez L, Leon R, Parra B, Contreras et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* 2005;76:289-94.
- Ishikawa I, Kawashima Y, Oda S, Iwata T, Arakawa S. Three case reports of aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. *J Periodontol Res* 2002;37:324-32.
- Lamster IB, Celenti RS, Jans HH, Fine JB, Grbic JT. Current status of tests for periodontal disease. *Adv Dent Res* 1993;7:182-90.
- Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J Periodontol* 2005;76:1542-9.
- Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2004;31:1061-9.
- Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assays for *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol Res* 2003;38:465-70.
- Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I & Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:841-9.
- Jervøe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dörfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2005;32:778-83.
- Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004;31:1034-47.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Bio-Technol* 1992;10:413-17.
- Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* 2000;38:2362-5.
- Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2002;29:638-44.
- Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Comparison of Real-Time PCR and Culture for Detection of *P. gingivalis* in Subgingival Plaque Samples *J Clinical Microbiol* 2003;41:4950-4.
- Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, et al. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:168-76.

28. Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giumelli B, Lakhssassi N, Sixou M. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiol Immunol* 2006;2:341-6.
29. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2006;33:427-33.
30. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, *et al.* Site-Specific Development of Periodontal Disease is Associated With Increased Levels of *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in Subgingival Plaque. *J Periodontol* 2008;79:670-76.

---

## ABSTRACT

The correct distinguishment of microorganisms involved in the periodontal disease pathogen, it is important in the understanding of its progression and adequate treatment planning. Considering this fact, some molecular methods of identification and quantification were developed and are extremely sensitive and precise in the characterization of different bacteria species. The present study aimed to realize a literature review, including studies that realized a comparative analysis between bacterial culture and real time PCR methods in the identification of pathogens. The bacterial culture method can possibly identify new microorganisms and realize antibiotics sensitivity tests. The real

time PCR is a microbiologic test that identifies and quantifies bacterial species, through gene amplification of predetermined DNA fragments, with high sensitivity and specificity, and need a shorter operation time of the operator when compared to the bacterial culture method. In this way, to determine a specific diagnostic test, should be considered not only its precision in the identification of microorganisms, but the cost-benefit relationship as well.

**KEYWORDS:** Culture media, Polymerase Chain Reaction (PCR), periodontitis.

---

## ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Telma Blanca Lombardo BEDRAN  
R. Expedicionários do Brasil, 2030, aptº 32 Centro,  
Araraquara-SP CEP: 14801-000  
Fone: (16) 9245-4733, (16) 3357-4733 ou (16) 3301-6480  
E-mail: telmabedran@hotmail.com