

Concentración mínima de erradicación del ozono versus hipoclorito de sodio contra biopelículas de *Enterococcus faecalis*.

Eradication concentration of ozone versus sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms.

Investigadores:

*Jaime Rendón . Especialista en Endodoncia . Magister microbiología y bioanálisis
Profesor postgrado de Endodoncia Universidad de Antioquia- jaime0978@gmail.com*

Melissa Ferrer . Estudiante de postgrado en Endodoncia Universidad CES

*Juan David Ochoa . Especialista en Endodoncia - Profesor postgrado de Endodoncia
Universidad CES*

Sandra Morales Uchima . Microbióloga Universidad de Antioquia

Grupo de investigación:

Universidad CES

Investigación básica y clínica en odontología . CBO

Universidad de Antioquia

POPCAD

Facultad de Odontología Æ Postgrado en Endodoncia

Resumen:

Introducción y objetivos: los microorganismos son el principal factor asociado a fracaso en endodoncia y *Enterococcus faecalis* es la bacteria más frecuentemente aislada en infecciones endodónticas secundarias o persistentes, además la habilidad de crecer en biopelículas, permite evitar la acción de los irrigantes. El objetivo de este estudio fue evaluar la Concentración Mínima de Erradicación de Biopelículas (CMEB) del ozono versus Hipoclorito de sodio sobre biopelículas de *E. faecalis* (ATCC 29212).

Metodología: el crecimiento de biopelículas de *E. faecalis* se realizó utilizando el dispositivo MBEC™, incubándolo durante 24 horas a 37°C, posteriormente las biopelículas fueron expuestas a los irrigantes durante 20 minutos. La concentración fue considerada efectiva cuando produjo una reducción 5 unidades logarítmicas. Para comparar la eficacia de los antimicrobianos se utilizó la prueba ANOVA y se complementó con la prueba de diferencia significativa mínima (DSM) de Fisher utilizando el programa StatgraphicsCenturion XVI.

Resultados: ambos irrigantes fueron efectivos contra biopelículas de *E. faecalis*. El ozono fue 100% efectivo a una concentración del 0.5%. Al 0,25% y 0,125% fue estadísticamente similar pero significativamente menor a los obtenidos con el NaOCl.

Conclusión: el ozono mostró actividad antibacteriana estadísticamente significativa contra biopelículas de *E. faecalis* en una concentración del 0.5%, lo cual indica que podría ser útil para la terapia endodóntica considerando la alta toxicidad del hipoclorito de sodio.

Palabras clave: desinfección, irrigación, ozono, hipoclorito de sodio, biopelícula

Introduction and objectives: microorganisms are the main factor associated with failure in endodontics and *Enterococcus faecalis* is the most frequently isolated bacteria in secondary or persistent endodontic infections, it has the ability to grow in biofilm and to avoid the action of irrigants. The aim of this study was to evaluate the Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) of ozone versus sodium hypochlorite on biofilms of *E. faecalis* (ATCC 29212).

Material and methods: biofilms grown in the MBEC device for 24 hours at 37°C were exposed to irrigating solutions for 20 minutes. The concentration was considered effective when there was a reduction of 5 log units. The statistical analysis was carried out using the ANOVA test and complemented with the Fisher's least significant difference (LSD) test using the Statgraphics Centurion XVI software.

Results: both irrigants were effective against *E. faecalis* biofilms. Ozone was 100% effective at a 0.5% concentration and at 0.25% and 0.125% it was statistically similar but significantly lower to the ones obtained with NaOCl.

Conclusion: 0.5% ozone demonstrated statistically significant antimicrobial activity against *E. faecalis* biofilms, which demonstrates it might be useful in endodontic therapy, considering sodium hypochlorite's high toxicity.

Key words: disinfection, irrigation, ozone, sodium hypochlorite, biofilm

INTRODUCCIÓN:

Una de las principales metas de la endodoncia es eliminar los microorganismos presentes en el conducto radicular (1-3). Para esto se utilizan irrigantes en conjunto con una instrumentación mecánica y activación ultrasónica. Muchos irrigantes tienen actividad antimicrobiana y son capaces de eliminar bacterias, hongos y virus al tener contacto directo con ellos (24).

El hipoclorito de sodio es el agente irrigante más investigado, el cual ha sido aceptado como el *gold standard* para la irrigación del conducto radicular debido a su eficacia clínica en la terapia endodóntica (1). Es una solución altamente alcalina, con un pH de 10-11 (17), liberadora de clorina, cuya actividad germicida está relacionada con la formación de ácido hipocloroso con la liberación de gas clorino de la solución (4).

Sin embargo, tiene como desventajas, que presenta un mal olor y sabor (3,18), potencial corrosivo, puede presentar reacciones alérgicas (17) y que debilita la dentina al reducir su fuerza y resistencia flexural (19). Es de particular preocupación la probabilidad de que ocurra un accidente con hipoclorito, debido a su potencial para generar inflamación aguda al entrar en contacto con los tejidos blandos causando una destrucción celular y necrosis de los tejidos (5).

El ozono (O_3) es una molécula con tres átomos de oxígeno y de peso molecular de 47.98 g / mol (6). Es considerado un poderoso agente oxidante (16,19), que causa peroxidación lipídica y altera la permeabilidad y función de la membrana (7). Es irritante, tóxico, inestable y muy reactivo (8).

El ozono se produce naturalmente por disociación de oxígeno molecular (O_2) en átomos de oxígeno activados, que reaccionan con otras moléculas de oxígeno. Este anión radical transitorio se convierte rápidamente, generando trióxido de hidrógeno (HO_3), que, a su vez, se descompone en un oxidante más potente, el radical hidroxilo (OH). Las propiedades *bactericidas* y *virucidas* del ozono son bien reconocidas y han demostrado reducir los niveles de *E. faecalis* en los túbulos dentinarios(7).

Enterococcus faecalis es un coco Grampositivo anaerobio facultativo, frecuentemente aislado de dientes tratados endodónticamente que presentan periodontitis apical persistente (9-11) y tiene el potencial de formar biopelículas en las paredes del conducto radicular (10). Las biopelículas se definen como una comunidad microbiana sésil multicelular caracterizada por células que están firmemente adheridas a una superficie y embebidas en una matriz auto producida y formada por sustancia extracelular polimérica (EPS), usualmente polisacáridos(12). Son difíciles de erradicar y pueden ser una fuente de muchas infecciones crónicas(13).

El conducto radicular representa un ambiente extraordinario para que varias especies bacterianas se adhieran a la superficie dentinal y faciliten la formación de biopelículas (14). Las bacterias presentes en biopelículas son más resistentes que las bacterias correspondientes en forma planctónica (15). Una probabilidad de la alta proporción de *E. faecalis* en conductos radiculares obturados es la habilidad de esta bacteria de sobrevivir a las preparaciones químico mecánicas durante el tratamiento de endodoncia y retratamiento o de penetrar después de la obturación del conducto.

Posee diferentes factores de virulencia asociados que les permite adherirse a la dentina e invadir túbulos dentinarios (16,17), incluyendo adherencia a las células del huésped, expresión de proteínas para asegurar la supervivencia de la célula como resultado de un ambiente de aporte nutricional alterado, la habilidad para competir con otras células bacterianas y la

habilidad para alterar el ambiente y la respuesta del huésped (17), causan inmunomodulación y produce daños mediados por toxinas (16).

Una característica distinguible de *E. faecalis* es su habilidad para crecer en un pH alcalino de 9.6, el cual normalmente inhibe otras bacterias. Tolerancia ambientes altamente alcalinos, hasta pH de 11.3 (9). El propósito de estudio in vitro es comparar la actividad antimicrobiana del hipoclorito de sodio versus ozono contra biopelículas de *E. faecalis*.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Los irrigantes evaluados para la eliminación de biopelículas de *E. faecalis* fueron NaOCl (Clorox®) a diferentes concentraciones (5.25%-2.5%-1.25%-0.625%) y ozono (Cero-Q) (0.5% - 0.25%-0.125%-0.0625%)

Crecimiento de biopelícula:

El ozono y el hipoclorito de sodio fueron evaluados sobre cultivos de biopelículas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) para determinar la concentración mínima de erradicación de biopelículas formadas en el dispositivo MBEC- high-throughput(HTP) (Innovatech Inc, Edmonton, Alberta Canadá), el cual fue descrito inicialmente por Ceri(18). Este dispositivo consta de dos partes: una parte superior la cual contiene 96 dedos donde crecerá la biopelícula y una parte inferior donde se encontrará el medio de crecimiento donde los dedos estarán sumergidos(19). Este dispositivo Permite crecer 96 biopelículas estadísticamente bioequivalentes y permite evaluar sustancias antimicrobianas a diversas concentraciones,(18 20).

La cepa de *E. faecalis* fue tomada de un stock a -80°C y se llevó a caldo Trypticase Soya para luego ser almacenado a 4°C en Agar Trypticase Soya (ATS)(Oxoid) y posteriormente se realizaron 2 subcultivos a los cuales se les verificó la pureza observando la morfología de las colonias y por tinción de Gram. Las colonias del segundo subcultivo fueron suspendidas en Caldo Trypticase Soya (CTS) hasta ajustarlo al estándar 1 de McFarland. Esta suspensión de *E. faecalis* fue diluida 1 en 30 en caldo BHI (Merck, Darmstadt, Alemania), y se utilizaron 22 mL de esta dilución (1×10^7 ufc/mL) para inocular el dispositivo.

El dispositivo MBEC-HTP fue incubado a 37°C durante 24 horas en un agitador de balanceo con 95% de humedad relativa (Unimax 1010, Heidolph®) a 110 rpm para obtener una densidad de inóculo de aproximadamente 10^4 - 10^6 UFC / ml . Transcurridas 24 horas se procedió a realizar el control de crecimiento. La biopelícula formada en el dispositivo MBEC-HTP (Fig 1) fue lavada usando un plato de microtitulación de 96 pozos con 200µL de solución salina al 0.9% durante 2 minutos para remover las bacterias planctónicas pobremente adheridas. Se removieron 4 dedos que fueron colocadas en solución salina y sonicados (Modelo M 150 Soniclean; MIDMARK) durante 10 minutos para realizar el control de la biopelícula que se verificó realizando diluciones seriadas y siembra en agar tripticase soya enriquecido con sangre de cordero con la técnica Spot para confirmar la densidad celular.

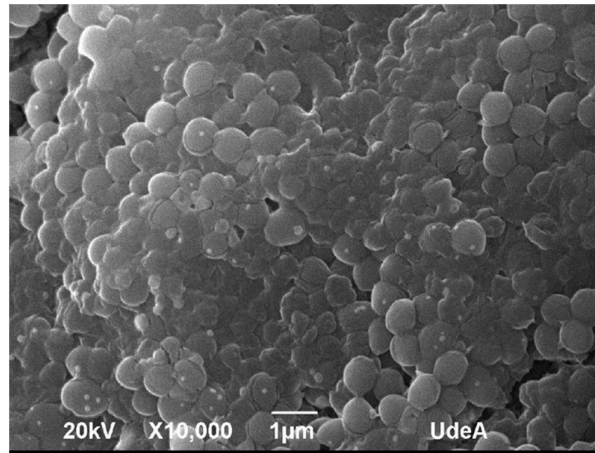
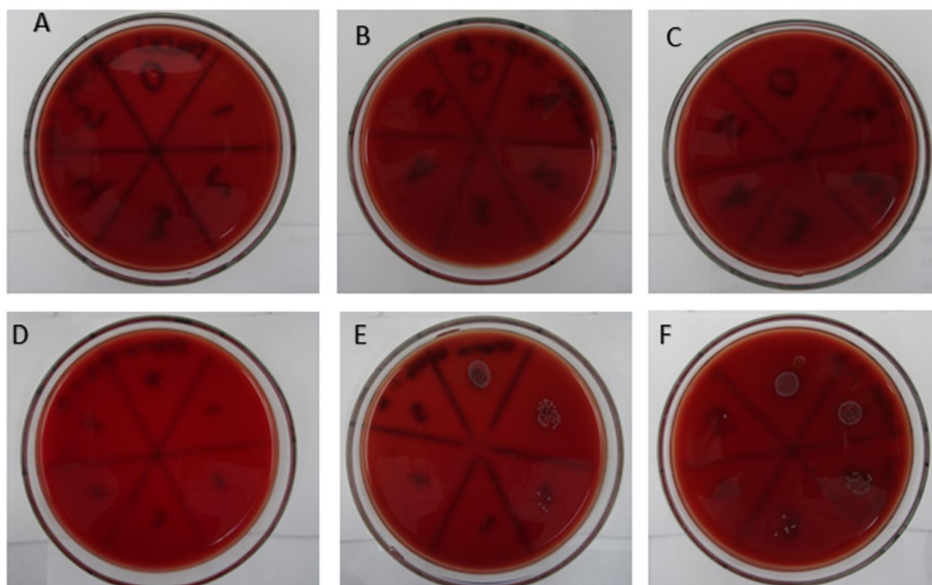


Fig 1. Microscopia electrónica de barrido de biopelícula de *E. faecalis* de 24 horas. Capa celular bacteriana agrupada a magnificación X 10,000

Preparación de los antimicrobianos y exposición de la biopelícula:

En un plato de microtitulación de 96 pozos llamado plato reto, se realizaron 4 diluciones de ambos irrigantes: NaOCl 5%-2.5%-1.25%-0.68% y Ozono 0.5% - 0.25%-0.125%-0.06%, en caldo BHI (Merck, Darmstadt, Alemania) además se incluyeron controles de esterilidad y crecimiento. Las pruebas de susceptibilidad se realizaron en platos de microtitulación de 96 pozos (plato reto) con un volumen final de 200µL. La parte superior del dispositivo con las biopelículas fue sumergida en el plato reto durante 20 minutos a 37°C. Luego de la exposición a los antimicrobianos, las biopelículas fueron lavadas en dos platos de microtitulación con 200µL de 0.9% de solución salina durante 2 minutos cada uno para eliminar bacterias planctónicas, después fueron llevadas a un plato de recuperación con 200µL de 0.9% de solución salina y sometido a sonicación (Modelo M 150 Soniclean; MIDMARK) durante 10 minutos. La biopelícula desagregada fue diluida en solución salina estéril y posteriormente inoculado en agar tripticasa soya (Merck, Darmstadt, Alemania) enriquecido con sangre de cordero con la técnica spot para realizar el conteo de células viables y determinar la concentración mínima de erradicación de biopelículas (Fig. 2). Cada análisis se realizó por duplicado. La medida de los recuentos de células viables se convirtieron en Log^{10} y se considero el antimicrobiano como efectivo cuando este produjo una reducción de 5 unidades logarítmicas.



A: Control de esterilidad; B: NaOCl 5.25%; C: NaOCl 0.62%; D: Ozono 0.5%; E: Ozono 0.062%; F: control de crecimiento.

Análisis estadístico: se realizó un estudio multifactorial univariado para las unidades experimentales: hipoclorito de sodio y ozono a diferentes concentraciones, para cada uno de los cuales se realizaron 5 replicas. Una vez se determinó la concentración de erradicación de biopelículas, se realizó un análisis de varianza de dos factores (ANOVA multifactorial) para comparar la variable de respuesta (supervivencia bacteriana) en cada una de las sustancias en sus diferentes concentraciones, este análisis se complementó con una prueba de múltiples rangos (*prueba de diferencia significativa mínima DSM de Fisher*) para identificar diferencias estadísticas entre los resultados de la variable respuesta.

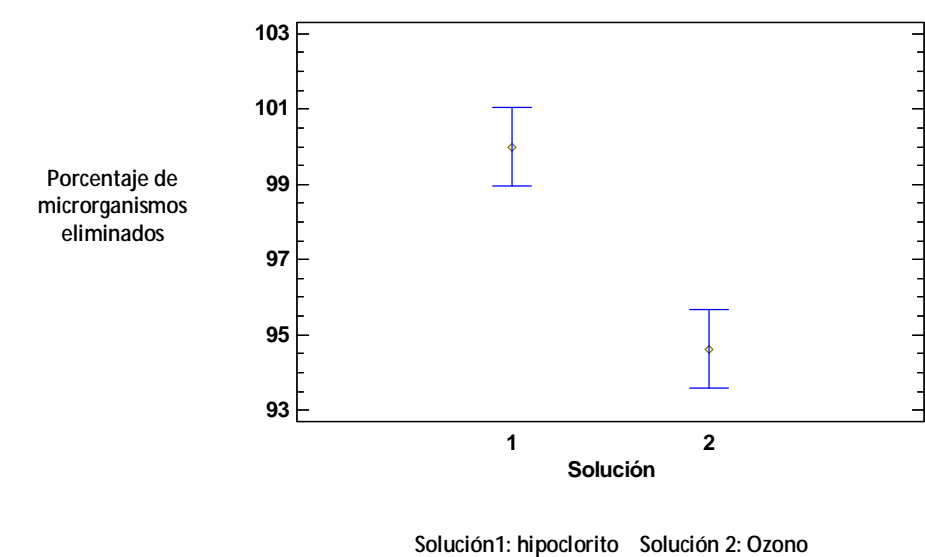
La elección de ANOVA se basó en el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad, este último evaluado con el estadístico de Levene. Los análisis se realizaron en Statgraphics Centurion XVI con una significancia estadística de $p < 0,05$

RESULTADOS: globalmente los resultados de actividad antimicrobiana del ozono fueron estadísticamente menores a los obtenidos con el hipoclorito de sodio contra biopelículas de *E. faecalis*. (Gráfico 1).

El ozono demostró una efectividad del 100% a una concentración del 0.5%. El análisis de comparación múltiple (LSD de Fisher) evidenció que los resultados de actividad antimicrobiana del ozono al 0,25% y 0,125% fueron estadísticamente similares pero significativamente menores a los obtenidos para las concentraciones del NaOCl y del ozono al 0,5%, a su vez la actividad antimicrobiana del ozono al 0,06% fue significativamente menor que la del resto de concentraciones valoradas (Gráfico 2).

La *tabla 1* muestra las medias de porcentaje de microorganismos muertos para cada solución y en función de su concentración, además del intervalo de confianza alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Gráfico 1: actividad antimicrobiana según irrigante



Gráfica 2: actividad anitmicrobiana de los irrigantes según su concentración.

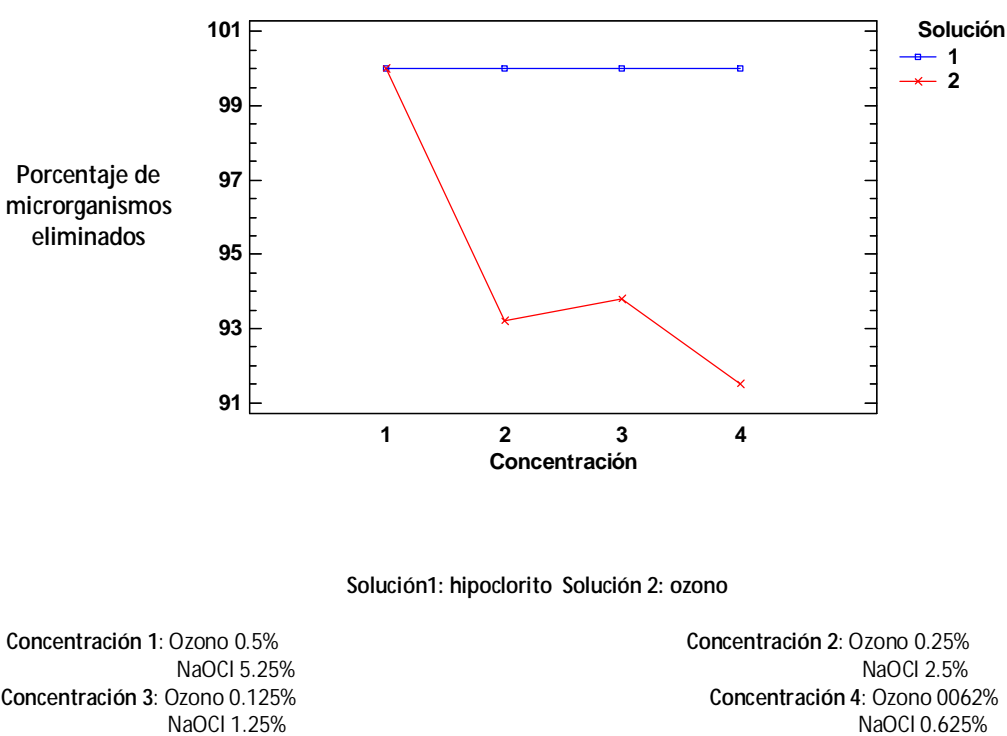


Tabla 1:

			IC 95%		Valor P
	Casos	Media	Límite Inferior	Límite Superior	
Solución					
NaCL	20	100,0	98,5272	101,473	0,0000
Ozono	20	94,625	93,1522	96,0978	
Solución por Concentración					
NaCL 5.25%	5	100,0	97,0544	102,946	0,0328
NaCL 2.5%	5	100,0	97,0544	102,946	
NaCL 1.25%	5	100,0	97,0544	102,946	
NaCL 0.625%	5	100,0	97,0544	102,946	
Ozono 0.5%	5	100,0	97,0544	102,946	
Ozono 0.25%	5	93,2	90,2544	96,1456	
Ozono 0.125%	5	93,8	90,8544	96,7456	
Ozono 0.062%	5	91,5	88,5544	94,4456a	

DISCUSIÓN:

Los resultados de este estudio in vitro demuestran que tanto el NaOCL como el Ozono son efectivos contra biopelículas de *E.faecalis*. Nagayoshi y cols. estudiaron el efecto de agua ozonificada contra infecciones de *E. faecalis* y *S.mutans* invadiendo los túbulos dentianales de dientes de bovino, obteniendo como resultado que el agua ozonificada presentó una actividad antimicrobiana similar al NaOCL al 2.5%. y concluyeron que su aplicación podría ser útil para la terapia endodóntica (21) . Otro estudio realizado por Hems y cols (22) evaluó la capacidad del ozono para erradicar cepas de *E.faecalis* , y concluyeron que el ozono era eficaz contra células plasmáticas de *E.faecalis*, pero presentó un mínimo efecto cuando estaban embebidas en biopelículas, lo cual contradice los resultados del presente estudio, donde se demostró que el ozono fue capaz de eliminar biopelículas de *E.faecalis* en una concentración del 0.5%. En el estudio realizado por Hems y cols (22), la concentración de ozono utilizado fue de 0.68ppm (0.00068%), el cual fue mucho menor que la concentración utilizada de NaOCl (2.5%) , y que la concentración para ozono utilizada en el presente estudio. Por otra parte, Huth y cols(23), realizaron un estudio in vitro en el cual evaluaron la efectividad del ozono contra microorganismos odontopatógenos en biopelículas presentes en un modelo de conducto radicular. Utilizaron dientes humanos extraídos y llegaron a la conclusión de que el ozono acuoso en una concentración de 5 µg mL⁻¹ , eliminó completamente los microorganismos suspendidos y para el modelo de biopelícula la más alta concentración de ozono acuoso (20µmL⁻¹) eliminó en un 96% las UFC.

Peter y cols.(7) , llegaron a la conclusión de que el ozono gaseoso llevado a fluidos irrigantes en el conducto radicular, podría ser útil como un coadyuvante en la desinfección endodóntica. Ellos utilizaron un tiempo de aplicación de 2 minutos para el ozono, y observaron que al aplicar agitación ultrasónica se mejoraba su acción antimicrobiana.

En otro estudio, realizado por Estrela y cols. (8) se evaluó la eficacia antimicrobiana contra *E. faecalis* del ozono gaseoso, agua ozonizada, NaOCl 2.5% y CHX 2%, aplicada en conductos radiculares humanos infectados y determinaron que ninguno fue eficaz para inactivar *E. faecalis*, sus resultados son contradictorios con los encontrados en este estudio, ya que ambos

irrigantes evaluados, NaOCl 5% y ozono 0.5%, fueron capaces de erradicar biopelículas de *E. faecalis*, en ese estudio no se especificó la concentración utilizada de Ozono, el cual podría haber sido menor de 0.5%, por otra parte los resultados fueron negativos para todos los irrigantes, contradiciendo los resultados de este y otros estudios que evalúan NaOCl, el cual presenta resultados positivos en la mayoría de los casos.

Conclusión:

Este estudio *in vitro* demuestra que ambos antimicrobianos fueron eficaces para erradicar biopelículas de *E.faecalis*. El ozono fue 100% efectivo en una concentración del 0.5%, y no evidenció diferencias estadísticas significativas con los resultados de las diferentes concentraciones ensayadas para el hipoclorito lo cual indica que podría ser útil para la terapia endodóntica, considerando la alta toxicidad del hipoclorito de sodio, sin embargo se requieren posteriores estudios en conductos radiculares humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tirali R-E, Bodur H, Ece G. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine gluconate and octenidine dihydrochloride in elimination of microorganisms within dentinal tubules of primary and permanent teeth. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. mayo de 2012;17(3):e517-22.
2. Leonardo MR, Leal JM, Lorenzo I. Endodoncia: tratamiento de los conductos radiculares. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1994.
3. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. Dent Clin North Am. abril de 2010;54(2):291-312.
4. Gordon TM, Damato D, Christner P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. J Endod. octubre de 1981;7(10):466-9.
5. Behrents KT, Speer ML, Noujeim M. Sodium hypochlorite accident with evaluation by cone beam computed tomography. Int Endod J. mayo de 2012;45(5):492-8.
6. Mohammadi Z, Shalavi S, Soltani MK, Asgary S. A review of the properties and applications of ozone in endodontics: an update. Iran Endod J. 2013;8(2):40-3.
7. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. J Endod. abril de 2012;38(4):523-6.
8. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. Int Endod J. febrero de 2007;40(2):85-93.
9. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. J Endod. abril de 2004;30(4):218-9.
10. Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D. Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Sodium Hypochlorite Irrigation on *Enterococcus*

faecalis Biofilm Colonization in Young and Old Human Root Canal Dentin: In Vitro Study. J Endod. mayo de 2010;36(5):842-6.

11. Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, et al. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. Oral Microbiol Immunol. 2006;21:283-8.
12. Siqueira JF, Rôcas IN, Lopes HP. Treatment of endodontic infections. London; Chicago: Quintessence Pub.; 2011.
13. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. J Med Microbiol. diciembre de 2007;56(Pt 12):1581-8.
14. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CR de A. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. J Appl Oral Sci Rev FOB. abril de 2009;17(2):87-91.
15. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis* Biofilms Eradication by Root Canal Irrigants. J Endod. mayo de 2009;35(5):711-4.
16. Kishen A, Sum C, Mathew S, Lim C. Influence of Irrigation Regimens on the Adherence of *Enterococcus faecalis* to Root Canal Dentin. J Endod. julio de 2008;34(7):850-4.
17. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. julio de 2001;34(5):399-405.
18. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol. junio de 1999;37(6):1771-6.
19. Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. BMC Microbiol. 2005;5:53.
20. Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R, et al. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. Biol Proced Online. 2006;8:194-215.
21. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. J Endod. noviembre de 2004;30(11):778-81.
22. Hems RS, Gulabivala K, Ng Y-L, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. enero de 2005;38(1):22-9.
23. Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. Int Endod J. enero de 2009;42(1):3-13.

