

Luciano Giardino¹
Emanuele Ambu²
Luigi Generali²
Enrico Savoldi¹

¹ Università di Brescia, CLSOPD
Direttore: Prof. Pier Luigi Sapelli
Insegnamento di Parodontologia,
Titolare: Prof. Enrico Savoldi
² Università di Modena Reggio Emilia,
Insegnamento di Endodonzia, Dipartimento di
Neuroscienze, Testa-Collo e Riabilitazione
Unità Operativa di Odontoiatria e Chirurgia
Maxillo-Facciale
Direttore: Prof. Ugo Consolo

Corrispondenza:
Dott. Luciano Giardino
Via Marinella 12
88800 Crotona (Kr)
0962-21249
lucianogiardino@libero.it

Pervenuto in redazione 31 gennaio 2006
Accettato per la pubblicazione il 20 marzo 2006

Effetto antimicrobico di due nuovi irriganti nei confronti dell'*Enterococcus faecalis*: studio comparativo *in vitro*

Antimicrobial activity of two new irrigants against *Enterococcus faecalis*:
an *in vitro* comparative study

RIASSUNTO

Introduzione: molte variabili sono in grado di limitare l'attività antibatterica degli irriganti all'interno del sistema canalare. Tra queste, un ruolo fondamentale è giocato dalla presenza di batteri resistenti all'azione di irriganti e medicazioni intermedie, quali l'*Enterococcus faecalis*, responsabile della maggior parte dei fallimenti endodontici. Per risolvere questo problema sono stati proposti nuovi irriganti a base antibiotica, quali il Bio Pure MTAD e, più recentemente, il Tetraclean.

Scopo di questa ricerca è quello di comparare *in vitro* l'attività antibatterica di questi due nuovi irriganti.

Metodologia: in accordo con le linee guida NCCLS, si è misurata la MIC dei due irriganti in esame utilizzando ceppi di *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e diluizioni progressive dei 2 composti da 1:2 fino a 1:2048 volte.

Risultati: il Bio Pure MTAD è risultato efficace fino ad una diluizione di 1:256 volte, mentre l'attività antibatterica del Tetraclean è risultata maggiore, fino ad una diluizione di 1:1024 volte.

Conclusioni: in questo studio entrambi gli irriganti hanno mostrato un'elevata attività antibatterica nei confronti del ceppo di *Enterococcus faecalis* preso in esame, attività che è risultata essere maggiore per il Tetraclean rispetto al Bio Pure MTAD. Dati i limiti connessi con la metodica usata, ulteriori studi dovranno essere predisposti per confermare questi dati.

Parole chiave:

Irriganti canalari, trattamento endodontico.

ABSTRACT

Introduction: the antibacteric action of irrigants in the endodontic therapy could be inhibited by many factors. The most important one is the presence of bacterial strain (e.g. *Enterococcus faecalis*) resistant to irrigants and intracanal dressing action. Two new irrigants, based on antibiotics, Tetraclean and Bio Pure MTAD have been recently proposed to face this problem. The aim of this study is to compare the antibiotic action of these new irrigants.

Methodology: according to NCCLS guidelines the MIC of Tetraclean and MTAD against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 strain were determined, using dilutions from 1:2 to 1:2048.

Results: Bio Pure MTAD killed all bacteria until a dilution of 1:256; Tetraclean has shown better results, until 1:1024.

Conclusions: both Bio Pure MTAD and Tetraclean proved effective antibacteric action as compared to the *Enterococcus faecalis* strain examined. Tetraclean was better than MTAD. Other *in vitro* and *in vivo* studies should be performed to confirm these data.

Key words:

Endodontic irrigants, endodontic treatment.

INTRODUZIONE

I microrganismi rappresentano il fattore principale dello sviluppo delle lesioni periradicolari e rappresentano il principale elemento quale causa del fallimento del trattamento endodontico (1). Tra le varie procedure utilizzate per il controllo dell'infezione dell'endodonto, l'irrigazione può giocare un ruolo fondamentale per l'eliminazione dei microrganismi dal sistema dei canali radicolari. Gli irriganti vengono utilizzati per rimuovere frustoli di dentina, per lubrificare le pareti canalari, per dissolvere la matrice organica nei canali e per l'effetto antimicrobico (2). L'ipoclorito di sodio a diverse concentrazioni è stato proposto negli ultimi 70 anni come irrigante canalare, per le note azioni antimicrobiche e per la sua attività di dissoluzione dei tessuti (3). I vantaggi principali del NaOCl sono rappresentati dalla sua capacità di dissolvere i tessuti necrotici e dalle proprietà antibatteriche contro la maggior parte dei microrganismi (4), mentre i suoi principali svantaggi sono legati al cattivo sapore, all'elevata tossicità (5), alla sua incapacità di rimuovere il fango dentinale (6) ed all'incapacità di eliminare la totalità delle specie batteriche presenti nel canale radicolare (7, 8). Diversi studi hanno dimostrato che l'uso combinato di strumenti ed irriganti con effetto antibatterico, come l'ipoclorito di sodio, può ridurre la presenza dei batteri nel 50-75% dei canali infetti, mentre i rimanenti canali possono rimanere contaminati (9, 10). Per risolvere questa possibile contaminazione residua dei canali dopo l'irrigazione con ipo-

clorito di sodio, è stato proposto l'utilizzo di medicazioni intermedie quali l'idrossido di calcio (11). Tuttavia, alcune specie di batteri anaerobi facoltativi si sono dimostrate resistenti a questo medicamento (12) e per questo motivo la ricerca di irriganti sempre più efficienti è rimasta un'esigenza sempre viva e presente. Un nuovo irrigante, l'MTAD (DENTSPLY Tulsa Dental, Johnson City, TN, USA), è stato proposto per l'irrigazione finale allo scopo di disinfettare il sistema dei canali radicolari (13). Torabinejad et al. hanno evidenziato che l'MTAD è in grado di rimuovere il fango dentinale ed inoltre è efficace nell'eliminazione dell'*Enterococcus faecalis* (13, 14), sia *in vitro* sia nei canali di denti umani infettati con saliva (15). Di recente è stato messo a punto un altro irrigante, il Tetraclean (Ogna Laboratori Farmaceutici, Muggiò, MI), costituito da acido citrico, da doxiciclina iclato (ridotta ad un terzo di quella contenuta nell'MTAD), mentre come detergente è stato utilizzato, al posto del Tween 80, il glicole polipropilenico. Indagini preliminari hanno evidenziato la capacità di questo irrigante nella rimozione del fango dentinale e nell'eliminazione dei microrganismi dal sistema dei canali radicolari infetti, quando viene utilizzato per un'irrigazione di 4 minuti al termine della sagomatura. Scopo di questo lavoro è quello di comparare gli effetti antimicrobici dell'MTAD e del Tetraclean nei confronti dell'*Enterococcus faecalis*.

MATERIALI E METODI

Per questo studio sono stati utilizzati ceppi di *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). La scelta dell'enterococco come microrganismo test nella quasi totalità degli studi microbiologici è dovuta al fatto che questo è, nella maggior parte dei casi, il solo batterio rinvenibile nei fallimenti endodontici ed inoltre risulta essere resistente all'azione dell'idrossido di calcio e dell'ipoclorito di sodio (16). Si è scelto di utilizzare la concentrazione minima inibente (MIC) come test di comparazione dell'attività antibatterica dei due irriganti, come suggerito dalle linee guida del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (17).

Un ceppo di *E. faecalis* (ATCC 29212) è stato sottoposto a coltivazione *overnight* e la concentrazione è stata portata a 1×10^8 CFU/ml, pari ad uno standard McFarland 0,5.

Le soluzioni testate sono state diluite con soluzione fisiologica sterile da 1:2 a 1:2048 volte. Un millilitro di brodo *Brain Heart Infusion* (BHI) e la stessa quantità di soluzione test sono state mescolate in diverse provette. Cento microlitri di soluzione contenente la carica infettante sono stati inseriti in ogni campione e questi sono stati incubati *overnight* a 37°. Il giorno successivo si è rilevata la presenza o l'assenza di torbidità del liquido.

RISULTATI

La MIC rilevata in questo studio dimostra gradi diversi di azione dei due irriganti nei confronti del microrganismo in esame (Tab. 1). L'MTAD elimina totalmente la carica batterica fino alla diluizione di 1:256 volte, mentre l'attività del Tetraclean è completa fino alla diluizione di 1:1024 volte (Fig. 1).

DISCUSSIONE

Sono stati individuati molti fattori che rendono estremamente difficoltosa la completa detersione del sistema dei canali radicolari infetti da parte degli irriganti. Tra questi, una particolare importanza è legata alla complessità dell'anatomia endodontica, alla presenza di una flora polibatterica ed organizzata in biofilm e all'intasamento dei tubuli, dovuto al fango dentinale formato dagli strumenti nella fase di sagomatura (18).

Il più comune tra gli irriganti utilizzati in endodonzia, l'ipoclorito di sodio, non appare in grado di rimuovere il fango dentinale, mentre mostra una buona efficacia nella rimozione dei residui organici. Tuttavia, è stato dimostrato che la presenza di fango dentinale riduce in modo significativo la penetrazione degli irriganti all'interno dei tubuli dentina-

li, riducendo così la possibilità di detersione del sistema scanalare; pertanto, è necessario affiancare all'ipoclorito di sodio un agente, quale un chelante come l'EDTA o un acido debole come l'acido citrico, allo scopo di consentire un'azione di rimozione sulla componente inorganica dello *smear layer*. A questi problemi, si deve aggiungere la particolare difficoltà imposta agli irriganti dal particolare ambiente endodontico. Studi recenti hanno evidenziato che la dentina o i suoi componenti sono in grado di disattivare l'azione antibatterica di irriganti e medicamenti comunemente usati in endodonzia (19, 20). Un nuovo irrigante, il Bio Pure MTAD, è stato recentemente proposto da Torabinejad ed è formato da una miscela di doxiciclina, acido citrico e un detergente (Tween 80). La doxiciclina è un derivato della tetraciclina, del quale sono ben note, da tempo, le proprietà antibatteriche (21) e l'azione nella rimozione del fango dentinale dalle pareti canalari (22).

L'MTAD è risultato molto efficace nella rimozione del fango dentinale (13), probabilmente per l'effetto sinergico della doxiciclina e dell'acido citrico. Questo irrigante, inoltre, mostra un'ottima azione di disinfezione del sistema dei canali radicolari infetti (15) e si è dimostrato molto più efficiente dell'ipoclorito di sodio e dell'EDTA nell'eliminazione dell'*Enterococcus faecalis* (14). Il Tetraclean® è formato da una soluzione simile a quella dell'MTAD, dal quale differisce per la concentrazione della doxiciclina, ridotta ad un terzo (50 mg/5 ml vs. 150mg/5 mm of MTAD) e per un differente tipo di detergente (Polipropilenglicole vs. Tween 80). Questo irrigante ha mostrato, negli studi preliminari pubblicati al 12° Congresso Biennale della *European Society of Endodontology*, un'eccellente azione sia nella rimozione del fango dentinale, sia nell'eliminazione della carica batterica nei canali infetti (23). Analogamente a quanto stabilito in analoghi studi, si è preferito utilizzare, nella comparazione dell'azione degli irriganti, dei test *in vitro* nei quali fos-

Irrigante	1:1024	1:2048
MTAD (Non diluito, diluito 1:2-1:2048)	Crescita > 1:256	Crescita
Tetraclean (Non diluito, diluito 1:2-1:2048)	Non crescita 1:1024	Crescita

Tab. 1 - Efficacia dell'attività antimicrobica di MTAD e Tetraclean espressa come MIC a varie diluizioni.

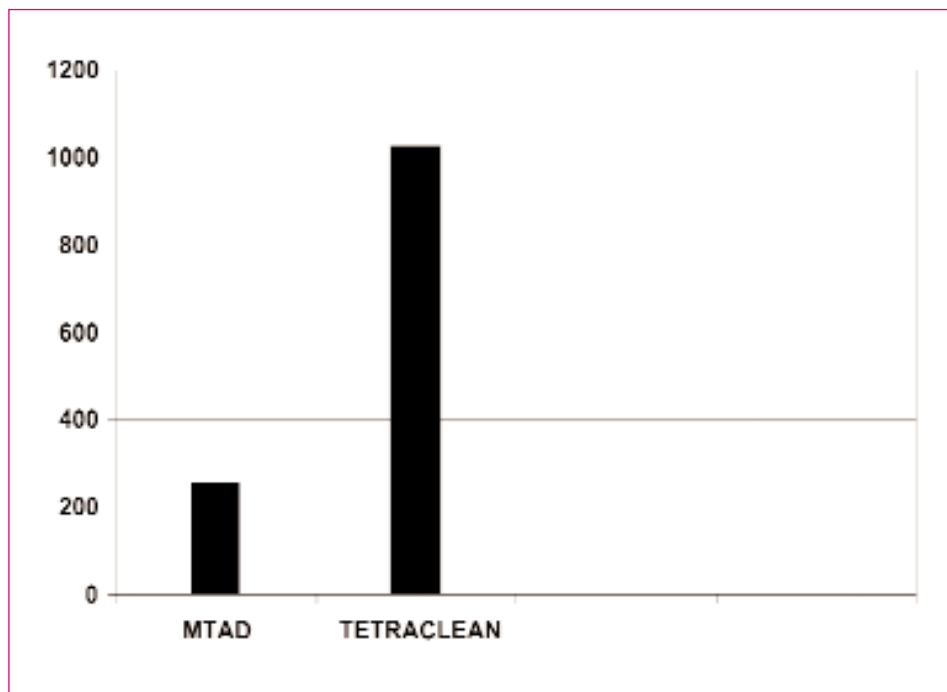


Fig. 1 - Concentrazione Minima Inibente (MIC) di *E. faecalis* esposto a MTAD e TETRACLEAN.

sero state eliminate le variabili connesse all'utilizzo di un modello "su dente" (14). Abbiamo usato a tale scopo un metodo batteriologico standard, scegliendo come microrganismo l'*Enterococcus faecalis* per la sua già ricordata resistenza nei confronti dell'azione degli irriganti e delle medicazioni comunemente utilizzate, usando la *Minimal Inhibition Concentration* (MIC); un test che mira ad evidenziare a quale diluizione l'irrigante mostri ancora la sua azione, eliminando completamente la carica batterica utilizzata come test. Questo studio ha confermato i dati relativi all'azione dell'MTAD sull'*Enterococcus fae-*

calis già presentati da Torabinejad et al. (14), ovvero che questo irrigante continua ad avere attività antibatterica anche quanto viene diluito fino a 256 volte. Il Tetraclean, tuttavia, ha dimostrato un'attività antibatterica significativamente maggiore rispetto all'MTAD, risultando efficace fino a 1.024 volte; questo probabilmente perché una maggiore quantità di acido citrico contenuto nel Tetraclean ha una maggiore attività battericida (24).

Questo dato è particolarmente significativo, soprattutto in considerazione del fatto che nel Tetraclean la quantità di doxiciclina è ridotta ad un terzo rispetto a quella del Bio Pure

MTAD. Abbott et al. (25) hanno riportato che gli agenti antisettici sono molto efficaci come azione antimicrobica, ma possono essere tossici nei confronti delle cellule animali a concentrazioni simili a quelle alle quali sono efficaci come antibatterici. Gli stessi Autori hanno inoltre evidenziato come gli antibiotici siano meno tossici sulle cellule animali, quando utilizzati a concentrazioni efficaci. Indubbiamente, alla luce di questi lavori, la riduzione della concentrazione di antibiotico, se sortisce gli stessi effetti antibatterici, dovrebbe essere auspicata. Secondo Abbott, gli irriganti a base di tetracicline possono essere utilizzati a basso dosaggio e per un tempo ridotto nell'irrigazione finale del sistema dei canali radicolari (25). Il Tetraclean ha dimostrato, in questo studio, di essere altamente efficace contro l'*Enterococcus faecalis* anche se diluito oltre 1.000 volte rispetto alle concentrazioni di utilizzo clinico, risultando più efficace rispetto all'MTAD, pur utilizzando una quantità di antibiotico decisamente minore e riducendone, in tal modo, la potenziale tossicità. Questo studio presenta un limite evidente nel fatto che la comparazione si è verificata in un ambiente non condizionato dalle variabili presenti, utilizzando come ambiente il canale radicolare. Secondo la nostra opinione, suffragata da dati preliminari precedentemente pubblicati (26), il Tetraclean dovrebbe avere un'attività antibatterica pari o addirittura superiore rispetto al Bio Pure MTAD, ma altri studi, sia *in vitro* che *in vivo*, dovranno essere predisposti per valutare in modo più completo questi dati.

BIBLIOGRAFIA

1. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(6): 348-381.
2. Siqueira JF, Rôças IN, Santos SRLD, Lima KC, Magalhães FAC, de Uzeda M. Efficacy of Instrumentation Techniques and Irrigation Regimens in Reducing the Bacterial Population within Root Canals. *J Endod* 2002; 28: 181-4.
3. Walker A. Definitive and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Dent Assoc*, 1936 23(8), 1418-1425.
4. Harrison JW. Irrigation of the root canal system. *Dent Clin N Am* 1984: 797-808.
5. Spångberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1973; 36: 856-7.
6. McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod* 1975; 1: 238-42.
7. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30: 297-306.
8. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 86-93.
9. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1983; 55: 307-12.
10. Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Weselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J* 2002; 35: 13-21.
11. Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24: 119-25.
12. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed Oral endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 1998; 85: 86-93.
13. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, et al. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod* 2003; 29: 170-5.
14. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio R, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: An *in vitro* investigation. *J Endod* 2003; 29: 400-3.
15. Shabahang S, Pouresmail M, Torabinejad M. *In Vitro* antimicrobial efficacy of MTAD and sodium hypochlorite. *J Endod* 2003; 29: 450-2.
16. Chavez De Paz LE, Dahlen G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J* 2003; 36: 500-8.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* - Fifth Edition. Approved Standard NCCLS Document M7-A5, Vol. 20, No. 2, NCCLS, Wayne, PA, January, 2000.
18. Radcliff CE et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms: *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004; 37: 438-46.
19. Haapasalo H, Siren E, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Inactivation of local root canal medicaments by dentin: *in vitro* study. *Int Endod J* 2000; 32: 94-8.
20. Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *J Endod* 2002; 28: 634-7.
21. Biorvatn K, Kaug N, Selvig KA. Inhibition of bacterial growth by tetracycline impregnated enamel and dentin. *Scand J Dent Res* 1984 Dec; 92(6): 508-16.
22. Barkordar RA, Watanabe LG, Marshall GW, Hussain MZ. Removal of intracanal smear layer by doxycycline *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 84: 420-23.
23. Giardino L, Pecora G, Ambu E, Savoldi E. A new irrigant in treatment of apical periodontitis: from research to clinic. *12th ESE Biennial Congress, Dublin 16 September 2005*.
24. Siqueira Jr JF, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998; 24: 414-6.
25. Abbott PV, Hume WR, Pearman JW. Antibiotics and endodontics. *Australian Dental J* 1990; 35: 50-60.
26. Giardino L, Neglia R, Blasi E, Ambu E. Studio pilota sull'efficacia antimicrobica di un nuovo irrigante endodontico. *26° Congresso Nazionale SIE, Roma 25 Novembre 2005*.