



# Comparación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de AhPlus, RSA y Ledermix contra *Enterococcus faecalis*

## *In vitro* comparison of anti-microbial activity of AH Plus, RSA and Ledermix against *Enterococcus faecalis*

Gisela García Ávila,\* Raúl Luis García Aranda,<sup>§</sup> Luis Manuel Perea Mejía<sup>||</sup>

### RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de dos selladores endodónticos RSA, AH Plus y de la pasta LedermixN sobre *Enterococcus faecalis* con tres diferentes técnicas. **Método:** Prueba de contacto directo. En una superficie de acrílico se colocó el sellador y se inoculó una suspensión de *E. faecalis*, se dejó en un microtubo con 1 mL de caldo BHI, se realizaron diluciones logarítmicas sembrándose en placas de agar sangre para cuantificar las unidades formadoras de colonia. Prueba de dilución. Los selladores y la pasta se colocaron en un cilindro de plástico, la bacteria se inoculó en el caldo de cultivo y se realizó el mismo procedimiento de cuantificación. Prueba de dilución en agar. Se realizaron tres pozos en una placa de agar sangre y se rellenaron con los dos cementos, la pasta de LedermixN se inoculó una suspensión de *E. faecalis* en la superficie, para evaluar zonas de inhibición de crecimiento. **Resultados:** La pasta de Ledermix N tuvo mayor porcentaje de actividad antimicrobiana en la prueba de contacto directo. Ningún cemento ni la pasta presentó actividad antimicrobiana en la prueba de dilución y en la prueba de dilución en agar; en ésta el sellador AH plus y la pasta LedermixN presentaron un halo de hemólisis en las placas de agar sangre. **Conclusiones:** La técnica de contacto directo es la más adecuada para evaluar el efecto antimicrobiano de los cementos.

**Palabras clave:** *Enterococcus faecalis*, ADT (prueba en agar difusión), CDT (prueba de contacto directo), cemento sellador, actividad antimicrobiana, LedermixN.

**Key words:** *Enterococcus faecalis*, ADT (agar diffusion test), DCT (direct contact test), sealer cement, antimicrobial activity, LedermixN.

### ABSTRACT

**Aim:** *In vitro* assessment of antimicrobial activity sustained by two root canal sealers: RSA<sup>®</sup>, AH Plus<sup>®</sup> as well as LedermixN<sup>®</sup> paste upon *Enterococcus faecalis* using three different techniques. **Method:** Direct contact test (DCT). Sealers were placed on an acrylic surface. A *E. faecalis* suspension was inoculated and left in a microtube with 1 mL of BHI broth. Logarithmic dilutions were conducted spreading them in blood agar plates so as to quantify CFU's (colony forming units). Dilution test (DT). Sealers and paste were placed in a plastic cylinder. Bacteriae were inoculated in the culture broth and the same quantification procedure was undertaken. Agar dilution test (ADT). On a blood agar plate three wells were manufactured: they were filled with both cements. On the LedermixN paste surface a *E. faecalis* suspension was inoculated so as to assess growth inhibition areas. **Results:** In the Direct contact test, LedermixN paste showed higher antimicrobial activity percentage. Neither of both cements nor the paste presented antimicrobial activity in dilution and Agar dilution test. In the Agar dilution test, AH Plus sealer and LedermixN paste exhibited a hemolysis halo in the blood agar plates. **Conclusions:** Direct contact test technique was considered the most appropriate to assess antimicrobial effects of cements.

### INTRODUCCIÓN

La principal causa del fracaso en el tratamiento de conductos radiculares se debe a la supervivencia de microorganismos.

En una pulpa necrótica las condiciones son inciertas especialmente si todo el espacio pulpar ha sido infectado.

Las lesiones periapicales contienen una variedad de formas bacterianas, incluyendo bacilos anaerobios Gram negativos, cocos anaerobios Gram positivos y

\* Egresada de la Especialidad del Área de Endodoncia DEPEI, Facultad de Odontología de la UNAM.

§ Dr. en C. Profesor Asociado tipo C. Especialidad del Área de Endodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

|| Mtro. en C. Profesor Asociado tipo C. Departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina, UNAM.

estreptococos anaerobios facultativos.<sup>1,2</sup> Las bacterias no sólo están presentes en lesiones periapicales agudizadas, se han encontrado también en lesiones periapicales silenciosas y bien equilibradas.<sup>3</sup>

Dahlén y Bergenholtz<sup>4</sup> confirman una fuerte asociación entre los niveles de LPS y la prevalencia de bacterias Gram negativas en pulpas necróticas. Algunos experimentos en animales han demostrado que las endotoxinas colocadas en conductos radiculares vacíos y estériles producen lesiones periapicales. Schonfeld y colaboradores<sup>5</sup> correlacionan la presencia de endotoxinas a la inflamación en la región periapical; sin embargo Yamasaki y asociados<sup>6</sup> han demostrado que la lesión apical inflamatoria se desarrolla mucho antes de que la pulpa esté totalmente necrótica. Estos hallazgos brindan un gran soporte al concepto que los metabolitos bacterianos y los productos de degradación juegan un papel relevante en la patogénesis de la periodontitis apical.

El *Enterococcus faecalis* es el microorganismo que con más frecuencia es aislado de los dientes con fracaso endodóntico (80 a 90%), lo que sugiere que es un patógeno cuya persistencia en el conducto radicular representa un problema terapéutico importante.<sup>7</sup>

*E. faecalis* está asociado con diferentes enfermedades periapicales incluyendo la infección primaria e infecciones persistentes. Dentro de la infección primaria está asociado más frecuentemente con lesiones periapicales crónicas asintomáticas que en periodontitis apical aguda o en absceso periapical agudo. Se encuentra en el 40% de las infecciones primarias endodónticas y su frecuencia en lesiones periapicales persistentes es más alta. De hecho, se ha encontrado hasta nueve veces más *E. faecalis* en los tratamientos de conductos fracasados que en la infección primaria.<sup>8</sup>

Para eliminar la infección del sistema de conductos radiculares es necesario limpiar y conformarlos así como sellar tridimensionalmente eliminando espacios vacíos, que pueden tener un potencial para ser infectados o reinfectados.

El cemento sellador es importante dentro del sellado de conductos, pues permite ocupar espacios donde la gutapercha y los irrigantes no alcanzan a penetrar debido a que en su fórmula, los cementos poseen componentes con propiedades antimicrobianas para actuar contra las bacterias que persisten después de la preparación del conducto radicular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó en este estudio dos cementos AH Plus Cemento a base de resina epóxica, (Dentsply-Maillefer, USA), RSA-Roeko Seal Automix, cemento base de silicón (Whaledent International, USA).

La pasta LN-Ledermix N, es una pasta medicada con corticosteroides y antibiótico de amplio espectro (Lerder, Germany). Los cementos selladores y la pasta fueron mezclados de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Se utilizó la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, proporcionado por el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.

## PRUEBA DE CONTACTO DIRECTO (CDT)<sup>9</sup>

Se realizaron cuadros de acrílico autopolimerizable de 1x1 cm y de 0.5 cm de espesor. Se emplearon cinco cuadros por cada muestra evaluada, mismo que se aplicó sobre la superficie del acrílico. Una vez fraguado se inoculó una alícuota 10 µl de una suspensión de *E. faecalis* (1x10<sup>8</sup> UFC/mL) sobre la superficie las muestras. Los cuadros fueron colocados en microtubos (ependorf) individuales, con 1mL de caldo BHI (Bioxon) con NaCl al 6.5%.

Se tomaron 10µl de cada muestra y se realizaron cinco diluciones logarítmicas para evaluar el número de bacterias remanentes en cada tubo.

Una alícuota de 10µl de cada dilución se sembró (sembrado directo) en placas de agar sangre, determinándose las unidades formadoras de colonia (UFC/mL).

Se utilizó otra técnica adicional para evaluar el crecimiento bacteriano, denominado aquí como «plaqueado», la cual consistió en inocular 10µl de cada una de las diluciones sobre la superficie de la placa de agar sangre para extenderla inmediatamente con una varilla de vidrio y cuantificar las unidades formadoras de colonia desarrolladas.

Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas y cuantificadas las colonias de *E. faecalis*.

Los microtubos se incubaron 24 horas a 37°C. Al día siguiente se realizó el mismo procedimiento para evaluar nuevamente la cantidad de unidades formadoras de colonia en cada tubo.

## PRUEBA DE DILUCIÓN

Los dos cementos selladores y la pasta se colocaron dentro de un cilindro de plástico de 0.8 cm de diámetro y 0.5 cm de espesor.

El cilindro se colocó en un microtubo con 1 mL de caldo BHI con NaCl al 6.5%.

Se inocularon 20 µl de *E. faecalis* (1x10<sup>8</sup> UFC/mL) y se agitó. Después de cuatro horas, se realizaron 8 diluciones logarítmicas, se tomó una alícuota de 10µl de cada una para ser sembrada en una placa de agar sangre que se incubó 24 horas a 37°C para cuantificar las UFC/mL de *E. faecalis*.

Los microtubos fueron conservados en una incubadora a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente se realizó el mismo procedimiento para evaluar la cantidad de UFC en cada tubo.

### PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR (ADT)<sup>10</sup>

En una placa de agar sangre se realizaron 3 pozos de 0.7 cm de diámetro y 0.5 cm de profundidad. Cada pozo fue rellenado con los cementos selladores y la pasta permitiendo el fraguado del mismo.

Una alícuota de 10µl *E. faecalis* (1x10<sup>8</sup> UFC/mL) fue inoculada sobre la superficie de la placa y se extendió homogéneamente.

El efecto antimicrobiano de cada material fue determinado midiendo la zona de inhibición.

## RESULTADOS

### CONTACTO DIRECTO (CDT)

El *cuadro I* muestra la comparación de los porcentajes de bacterias sobrevivientes al contacto directo a las cero horas evaluada por dos técnicas diferentes.

La columna de sembrado directo nos muestra LN sin crecimiento bacteriano, AH plus con un porcentaje < 1% y en el caso de RSA sobrevive el 20% de las bacterias con respecto al control.

**Cuadro I.** Comparación de los porcentajes de bacterias sobrevivientes en la prueba de contacto directo evaluada por dos técnicas de sembrado a las cero horas.

Material	Porcentaje de bacterias sobrevivientes	
	sembrado directo	plaqueado
LN	0%	0%
AH PLUS	< 1%	1.7%
RSA	20%	33%
Control	100%	100%

**Cuadro II.** Bacterias sobrevivientes en la prueba de contacto directo a cero horas y 24 horas.

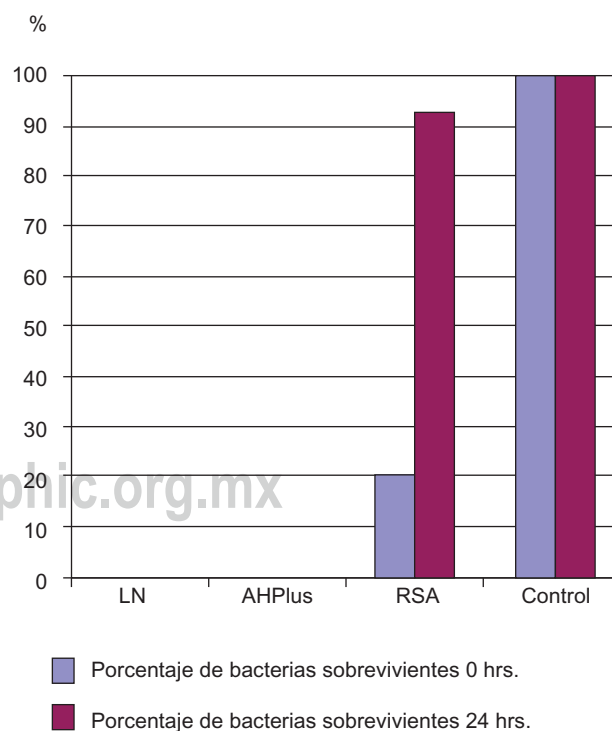
Material	Porcentaje de bacterias sobrevivientes	
	0 hrs	24 hrs
LN	0	0
AH PLUS	< 1	< 1
RSA	20	92
CONTROL	100	100

Con el método de sembrado por plaqueado los resultados fueron similares, a saber: LN se mantiene sin desarrollo bacteriano, el AH plus mantiene una elevada actividad antimicrobiana con 1.7% y el sellador RSA sobrevive un 33%, resultando con un menor grado de actividad antimicrobiana contra *E. faecalis*.

El *cuadro II* y la *figura 1*, muestra las bacterias sobrevivientes en la placa de contacto directo ante el reto bactericida 0 horas y 24 horas en donde la pasta LN y el cemento AH plus presentaron mayor actividad antimicrobiana con respecto al cemento de RSA y con respecto al control. Sin embargo, con la incubación de 24 horas, confirmamos que el LN eliminó a todas las bacterias, (manteniendo un 0%) mientras que para AH plus observamos un crecimiento de menor a 1% indicando que las bacterias que sobrevivieron al contacto directo al tiempo de 0 horas crecieron y se multiplicaron, pero con RSA la cantidad de bacterias se incrementó a un 92%, lo cual podría hablar de un efecto bacteriostático.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos de UFC al tiempo 0 fueron utilizados para realizar una prueba de T para pruebas independientes siendo la  $p = 0.130153$ , por lo tanto,  $p > 0.05$ .



**Figura 1.** Bacterias sobrevivientes en la prueba de contacto directo a 0 horas y 24 horas.

**Cuadro III.** Prueba de dilución.

Material	Bacterias sobrevivientes UFC/ml	
	4hrs	24hrs
LN	7 X 10 <sup>6</sup>	4.4 X 10 <sup>8</sup>
AH PLUS	7 X 10 <sup>6</sup>	1.3 X 10 <sup>8</sup>
RSA	8 X 10 <sup>6</sup>	4.8 X 10 <sup>8</sup>
CONTROL	8 X 10 <sup>6</sup>	4.9 X 10 <sup>8</sup>

### PRUEBA DE DILUCIÓN

En esta prueba se observa el crecimiento bacteriano de *E. faecalis* en los cementos selladores y en la pasta; como resultado vemos el crecimiento de las UFC similar al del control, lo cual muestra que no hay actividad antimicrobiana (*Cuadro III*).

### PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR (ADT)

En esta prueba ninguno de los dos cementos selladores ni la pasta presentó algún efecto antimicrobiano debido a que no se observó halo de inhibición en la superficie del agar. Sin embargo, se observó un halo de hemólisis de 20 mm de diámetro con LN y AH plus.

### DISCUSIÓN

El propósito de este estudio fue evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de dos cementos selladores contra *E. faecalis*, utilizando las pruebas de contacto directo (CDT) agar difusión (ADT) y dilución.

La prueba de contacto directo evaluó el efecto antimicrobiano del cemento cuando la bacteria entra en contacto con la superficie del mismo. Los selladores examinados en este estudio mostraron diferentes efectos contra *E. faecalis*, LN mostró actividad antimicrobiana, seguida de AH plus y por último el cemento sellador RSA, que contrastado con los resultados obtenidos con la técnica de ADT, no muestran dicho efecto. Sin embargo RSA tiene un menor efecto bajo estas condiciones experimentales; se sugiere que debido a su rápida polimerización las sustancias de liberación secundaria son mínimas y que su excelente sellado se debe a la expansión que sufre, minimizando su dilución.<sup>11,12</sup>

Funda y colaboradores<sup>10</sup> también realizaron prueba de CDT con AH plus y RSA contra *E. faecalis*; en este estudio AH plus si mostró actividad antimicrobiana y RSA no mostró ninguna, lo que concuerda con nuestros datos, sin embargo, ellos miden turbidez y no viabilidad, ya que en la turbidez puede ser reflejo del

material desprendido, no necesariamente bacterias o si las hay, éstas pueden no ser viables. En nuestro estudio evaluamos viabilidad en los tubos de prueba demostrando con ello, mayor certeza del efecto antimicrobiano del sellador.

En esta prueba observamos también que el cemento RSA muestra un crecimiento bacteriano a las 24 horas aumentando su porcentaje de 20 a 92%, lo cual nos hace pensar que dicho sellador podría tener un efecto bacteriostático, haciendo que las bacterias remanentes puedan crecer y aumentar dándonos dicho resultado.

La prueba de difusión en agar (ADT) es la técnica comúnmente utilizada para evaluar la actividad antimicrobiana de los materiales dentales, esta técnica no depende sólo de la toxicidad del material sobre el microorganismo, sino también de la alta influencia de su difusión en el medio, la concentración del sellador a examinar, así como el tamaño y forma del agente antimicrobiano. Sin embargo, Funda y colaboradores<sup>10</sup> evaluaron con esta técnica al cemento sellador RSA y AHplus, donde AHplus mostró inhibición al crecimiento de *E. faecalis*; no se menciona el tamaño del halo de inhibición observado. En nuestro estudio ninguno de los dos cementos y la pasta evaluada mostró un halo de inhibición.

Mickel AK y asociados<sup>13</sup> realizaron un estudio similar concordando con las observaciones realizadas en este estudio donde AHplus no muestra ninguna zona de inhibición para *E. faecalis*.

Aunque ninguno de los dos cementos y la pasta provocaron halo de inhibición, en este estudio, se observa en las placas de agar sangre con LN y AH plus una zona de hemólisis.

Esto nos permite señalar estudios como el de Leonardo, y colaboradores,<sup>14</sup> Koulaouzidou y asociados,<sup>15</sup> Peralta y su equipo,<sup>16</sup> encontraron que AH plus si contiene formaldehído durante el proceso de polimerización, además de la citotoxicidad que se observó en cultivos de fibroblastos murinos donde existe la muerte de estos demostrando así una elevada citotoxicidad.

Con estos estudios podemos señalar que la presencia de esta sustancia en el medio puede ocasionar la destrucción de los eritrocitos en las placas de agar sangre, esto mismo sucede con Ledermix, el cual ha sido reportado como una pasta con efecto antiinflamatorio por Pierce y colaboradores<sup>17</sup> y como un buen material con efecto para aliviar el dolor por Chance y asociados<sup>18</sup> y Lindskog<sup>19</sup> indican que Ledermix actúa como un buen agente antimicrobiano. Abbott<sup>20</sup> así ha indicado que lesiones asociadas al tratamiento con Ledermix aparecen con reparación.

Al realizar la prueba de dilución, observamos que los componentes de los cementos selladores no se pueden diluir fácilmente y así provocar un efecto antimicrobiano, por lo cual no se observó efecto medible comparado con el control.

Se observa que existen características diferentes entre cada técnica, lo cual hace que una sea más sensible que otra. Aunque en la mayoría de estudios utilizamos estas técnicas existen otras aún más sensibles para la detección de *E. faecalis* como la PCR reacción en cadena de la polimerasa, donde se ha encontrado un alto porcentaje de este microorganismo, alrededor del 67-77%, comparado con un 24 a 70% por cultivo.<sup>21,22</sup>

### CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio, podemos concluir:

- De los dos cementos evaluados y la pasta en DCT, LN es el que presenta mayor actividad antimicrobiana, RSA tiene la menor actividad y AH plus fue el que tuvo menor capacidad antimicrobiana que LN pero mayor que RSA.
- Ningún cemento sellador ni la pasta de LN presenta actividad antimicrobiana en la prueba de ADT. AH plus presenta una halo de hemólisis.
- La técnica de contacto directo es la más adecuada para evaluar el efecto antimicrobiano de cementos selladores.
- La actividad antimicrobiana no debe de ser el único parámetro de importancia para decidir la aplicación de un sellador de conductos radiculares sino también el efecto citotóxico asociado que pueda presentar.

### REFERENCIAS

1. Williams BL, Mc Cann GF, Schoenknecht FD. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. *J Clin Microbiol.* 1983; 18: 770-774.
2. Lewis MAO, Mac Farlane TW, Mc Gowan DA. Quantitative bacteriology of acute dento-alveolar abscesses. *J Med Microbiol.* 1986; 21: 101-104.
3. Trope M, Bergenholtz G. Microbiological basis for endodontic treatment: can a maximal outcome be achieved in one visit? *Endodontic Topics.* 2002.
4. Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxin activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res.* 1980; 59: 1033-1040.
5. Schonfeld SE, Greening AB, Glick DH, Frank AL, Simon JH, Herles SM. Endotoxic activity in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982; 53: 82-87.
6. Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H, Kameyama Y. Pulpal and perapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. *J Endodon.* 1994; 20: 13-17.
7. Molander A, Dahlén G. Microbiological status of root filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31: 1-7.
8. Phineiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 100-103.
9. Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by contact direct test. *Endod Dent Traumatol.* 1996; 12: 179-184.
10. Cobankara FK, Altinoz HC, Ergani O, Kav K. *In vitro* antibacterial activities root canal sealers by using two different methods. *J Endodon.* 2004; 30: 57-60.
11. Dartar M, Yilmaz, Kalacy A, Zaimoglu L. A comparison of the *in vitro* cytotoxicity of two root canal sealers. *J Oral Rehab.* 2003; 30: 426-429.
12. Min Kai W, Tigos E, Wesselink PR. An 18 month longitudinal study on a new silicon-based sealer RSA Roeko Seal: a leakage study in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2002; 94: 499-502.
13. Mickel AK, Nguyen TH, Chogles. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endodon.* 2003; 29: 257-258.
14. Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Tanomaru M. *In Vitro* Evaluation of Antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endodon.* 2000; 26: 391-394.
15. Koulaouzidou KT, Papazisis P. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. *Endod Dent Traumatol.* 1998; 14: 182-185.
16. García Aranda, Peralta Perez M et al. Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de tres selladores endodóncicos sobre fibroblastos de ratón de la línea celular L929. *Revista Odontológica Mexicana.* 2006;10: 63-68.
17. Pierce A, Heithersay G, Lindsog S. Evidence for direct inhibition of dentinoclasts by a corticosteroid-antibiotic endodontic paste. *Endod Dent Traumatol.* 1988; 4: 44-45.
18. Chance K, Lin L, Shovlin FE, Skribner. Clinical trial of intracanal corticosteroid in root canal therapy. *J Endodon.* 1987; 13: 466-468.
19. Pierce A, Lindsog S. The effect of an antibiotic-corticosteroid paste on inflammatory root resorption in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987; 64: 216-220.
20. Abbot PV. Systemic release of corticosteroids following intradental use. *Int Endod J.* 1992; 25:189-191.
21. Molander A, Lundqvist P, Papapanou PN, Dahlen G. A protocol for polymerase chain reaction detection of *Enterococcus faecium* from the root canal. *Int Endod J.* 2002; 35: 1-6.
22. Gomes BPFA, Phineiro ET, Gade-Neto CR. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19: 71-76.

Dirección para correspondencia:

**Raúl Luis García Aranda**

E-mail: rlg@unam.mx