



Reducción bacteriana del agua ozonizada sobre *actinomyces israelii*

Actinomyces israelii bacterial reduction using ozonated water

Redução bacteriana de actinomyces israelii com agua ozonizada

Andrea Nataly Torres Cueva¹, Raquel Emeraldalda Guillén Guillén²

RECIBIDO: octubre / 2016 **CORREGIDO:** noviembre / 2016 **APROBADO:** diciembre / 2016

1 Odontóloga, Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador, Quito; andrea.natalytorres@gmail.com
2 PhD en Formación, Especialista en Endodoncia, Docente Investigador, Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador, Quito; rguillen@uce.edu.ec

RESUMEN

El *Actinomyces israelii* es considerado un microorganismo patógeno de los tejidos periapicales del diente, es difícil de erradicar por los pocos nutrientes y oxígeno que necesita para subsistir originando así una periodontitis apical. **Objetivo:** Comparar el efecto bactericida sobre *Actinomyces israelii* del agua ozonizada al 5%, hipoclorito de sodio al 5.25% y clorhexidina al 2%. **Materiales y métodos:** Fueron inoculados con *Actinomyces israelii* en 40 conductos uniradulares humanos, se midió la reducción bacteriana luego de su aplicación a través de conteo de UFC/placa, posterior a la irrigación y recambio constante de las presentes soluciones, fueron divididos los 40 dientes en 4 grupos: G1: Suero fisiológico, G2: Agua ozonizada 5%, G3: Clorhexidina 2% G4: Hipoclorito de sodio 5.25%, la significancia estadística fue a través del Test de Tukey con un nivel de significancia de 5%. **Resultados:** Se evidenció con el Test de Tukey valores de media para Hipoclorito de sodio 5.25% de 0, para clorhexidina 2% de 0 y para Agua ozonizada una media de 0.3 por tanto esta prueba determinó que NaOCl al 5.25% es el tratamiento de primera elección seguido por clorhexidina 2% y se ubicó en tercer lugar la capacidad antibacteriana de agua ozonizada 5%. No se encontró diferencias significativas sobre la acción del agua ozonizada y las otras soluciones (< 0.15). **Conclusiones:** El agua ozonizada al 5% se mostró efectiva en la reducción bacteriana de *A. israelii* así como el NaOCl al 5.25%, sin presentar diferencias estadísticas significativas.

Palabras clave: Agua ozonizada; hipoclorito de sodio; *Actinomyces israelii*; periodontitis apical.

ABSTRACT

Actinomyces israelii, a pathogenic microorganism of periapical tissues, is difficult to eradicate due to its need of few nutrients and oxygen to subsist, thus developing an apical periodontitis. **Objective:** Compare 5% ozonated water, 5.25% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine bactericidal effect on *Actinomyces israelii*. **Materials and methods:** 40 human uniradicular root canals were inoculated with *Actinomyces israelii*. After irrigation with the different solutions, bacterial reduction was measured through a UFC/Plaque count. The 40 teeth were divided into 4 groups: G1: Physiological serum, G2: 5% ozonated water, G3: 2% Chlorhexidine G4: 5.25% Sodium hypochlorite. The Tukey statistical test significance level was 5%. **Results:** The Tukey test evidenced 0 average values for 5.25% sodium hypochlorite, 0 for 2% chlorhexidine and 0.3 for ozonated water. This test determined that 5.25% NaOCl is the first choice treatment followed by 2% chlorhexidine, and 5% ozonated water. No significant differences were found on the ozonated water action and other solutions (< 0.15). **Conclusions:** 5% ozonized water was effective in the bacterial reduction of *A. israelii* as well as 5.25% NaOCl, without significant statistical differences.

Keywords: Ozonated water; sodium hypochlorite; *Actinomyces israelii*; apical periodontitis.

RESUMO

O *Actinomyces israelii* é considerado um agente patogênico dos tecidos periapicais do dente, que é difícil de erradicar por os poucos nutrientes e oxigênio que precisa para sobreviver, e que origina uma periodontite apical. **Objetivo:** Comparar o efeito bactericida sobre *Actinomyces israelii* da água ozonizada 5%, hipoclorito de sódio 5,25% e clorexidina 2%. **Materiais e Métodos:** 40 canais radiculares humanos foram inoculados com *Actinomyces israelii*, avaliou-se a redução bacteriana após da aplicação utilizando contagem de UFC/placa; depois da irrigação e do recambio constante das soluções, os dentes foram divididos em 4 grupos: G1: soro fisiológico, G2: água ozonizada 5%, G3: clorexidina 2% e G4: hipoclorito de sódio 5,25%; a diferença estatística foi obtida utilizando o teste de Tukey com significância de 5%. **Resultados:** Observaram-se, a través do teste de Tukey, as seguintes medias: para hipoclorito de sódio 5,25% de 0, para a clorexidina 2% de 0 e para água ozonizada 5% de 0,3. É assim que este estudo determinou que o hipoclorito de sódio 5,25% é o tratamento de primeira eleição seguido pela clorexidina 2% e no terceiro lugar a água ozonizada 5%. Não se encontraram diferenças significativas sobre a ação de água ozonificada e as outras soluções ($p < 0,15$). **Conclusões:** A água ozonizada mostrou-se efetiva na redução bacteriana de *Actinomyces israelii* assim como o hipoclorito de sódio 5,25%, sem apresentar diferenças significativas.

Palavras chave: Água ozonizada; hipoclorito de sódio; *Actinomyces israelii*; periodontite apical.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis apical es una inflamación de los tejidos del periápice principalmente por causa microbiológica, se trata de una infección multi-bacterial puesto que se encuentran colonizando el espacio del tejido vasculonervioso del diente bacterias gram positivas, gram negativas, aerobias, anaerobias facultativas dependiendo de la fase de la infección en la que se encuentre el diente, también han sido aislados microorganismos que producen patologías periapicales desde los alrededores del ápice dental¹.

Los *Actinomyces* colonizan los tejidos periapicales del diente y han sido encontrados en infecciones de dientes obturados con periodontitis apical crónica; de estos microorganismos el más relevante es *Actinomyces israelii*², también ha sido evidenciado en lesiones periapicales de dientes tratados endodóncicamente, los cuales afectan al diente desde afuera de su estructura³.

Los *Actinomyces* producen lesiones periapicales cuando la cantidad de biofilm producido por estos microorganismos es mayor que las células de defensa de nuestro organismo, la agregación del *Actinomyces* al diente se debe a varios factores como el pH, las fuerzas iónicas y concentración celular. No se conoce a ciencia cierta cómo ingresan *Actinomyces* al canal radicular; pero ciertos autores manifiestan que podría suceder al perforar el periápice con la lima durante la instrumentación o por la presencia de conductos laterales accesorios⁴.

El hipoclorito de sodio en la comunidad endodónica ha venido siendo objeto de estudio por sus propiedades consideradas altamente antibacterianas, pero entre sus desventajas se ha evidenciado que al no ser selectivo cuando se extravasa a los tejidos periapicales puede ocasionar serias lesiones como quemaduras, inflamación periapical y necrosis tisular, pese a esto es la solución que más se acerca a las condiciones de una irrigante ideal por lo cual es considerado padrón oro mundial, en el estudio realizado por Radcliffe et al. 2004⁵, NaOCl a diferentes concentraciones eliminó en pocos segundos al *Actinomyces israelii*.

El *Actinomyces israelii* ha evidenciado que al igual que *Enterococo faecalis* y *Candida* tiene la capacidad de refugiarse fuera del canal radicular, y alojarse dentro de los túbulos dentinarios viviendo con nutrientes limitados y poca cantidad de oxígeno, por lo cual se considera altamente patógeno y resistente a las soluciones bactericidas, es así que puede no ser eliminado al aplicar hipoclorito de sodio por los motivos citados, causando de esta manera las reinfecciones luego del tratamiento endodóncico².

El ozono médico presenta propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, utilizado a concentraciones adecuadas el ozono presenta niveles de toxicidad bajos o nulos siendo un desinfectante amigable con nuestro organismo. Este gas cada día gana más popularidad en la odontología siendo utilizado en las diferentes áreas de la misma como periodoncia, cirugía, operatoria dental y endodoncia; el cual es administrado por diferentes vehículos como agua y aceite⁶.

Por lo cual el objetivo del presente estudio es comparar la reducción bacteriana del agua ozonizada al 5% versus Hipoclorito de sodio al 5.25% sobre *Actinomyces israelii*

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio in vitro comparativo, para lo cual se recolectaron 40 dientes, los cuales fueron seleccionados bajo los siguientes criterios de inclusión: Premolares superiores o inferiores sin presencia de enfermedad cariosa, uniradiculares, sin tratamiento de conducto previo, sin fractura radicular y con ápice completamente formado.

Los dientes seleccionados fueron divididos en grupos de 10 para aplicar cada solución química, se realizó la apertura cameral de los dientes, luego se seccionó la corona dental a nivel de la unión cemento-esmalte con un disco de corte y así obtener bloques radiculares de 12 a 15mm de longitud, se preparó los conductos radiculares utilizando limas K-File con técnica convencional y se combinó con la técnica Protaper manual para dar conicidad al conducto, se irrigó con hipoclori-

to de sodio al 5.25% y una irrigación final con El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 17% para permeabilizar los conductos, posterior a esto se selló el ápice dental con resina para evitar la microfiliación y contaminación del conducto radicular, los dientes se sometieron a un proceso de esterilización en autoclave a una temperatura de 121°C, durante 30 minutos, se comprobó la esterilidad de los dientes hisopando uno de ellos y colocando la muestra en una placa de Agar Sangre la cual se incubó durante 24 horas⁷.

Para la obtención de la cepa de *A. israelii* se tomaron muestras de abscesos dentarios de 5 pacientes de diferentes consultorios privados de la ciudad de Quito, se realizó una disminución de carga bacteriana de la cavidad bucal mediante enjuagues con clorhexidina al 0.12% durante 30 segundos, luego se procedió a tomar la muestra ingresando un cono de papel estéril (figura 1) por la fístula empapándolo de esta manera con el contenido purulento del absceso las muestras fueron colocadas en agua de Peptona en tubos BD Vacutainer, las cuales se mantuvieron refrigeradas hasta la ejecución del trabajo.



Figura N° 1. Toma de muestra.

Con un asa y un hisopo se tomó la muestra de los tubos BD Vacutainer y se realizó la siembra en placas de Agar Sangre, todo dentro de la cabina de bioseguridad, fueron incubados durante 15 días a 37°C; luego se procedió a la identificación del microorganismo *A. israelii*, (**Figura N° 2**) se realizaron Tinción Gram y pruebas bioquímicas específicas para *A. israelii*, observando esta bacteria en las placas 2,3 y 5, (**Figura N° 3**) las cuales fueron utilizadas en la inoculación de los bloques radiculares los cuales se colocaron en 100ml de Caldo de Tioglicolato.

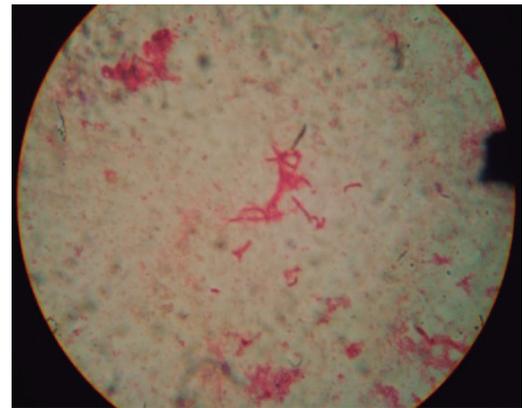


Figura N° 2. Bacilo Gram positivo ramificado en placa de muestra # 2.

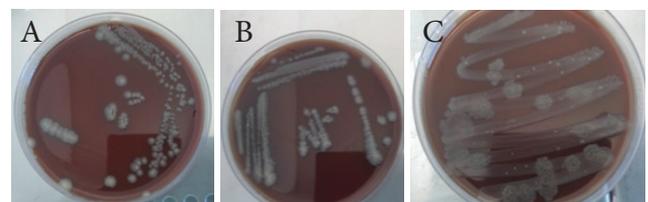


Figura N° 3. A: muestra # 2, B: muestra #3, C: muestra #5.

Se tomó 1cm de la cepa de *Actinomyces israelii* de la placa de Agar Sangre con un asa de siembra estéril y se inoculó dentro del frasco para que los dientes se encuentren expuestos a la misma cantidad de microorganismos, (**Figura N° 4**) dentro de la cabina de bioseguridad. Se incubó por 15 días a 37°C; luego de la incubación se tomó una muestra de los conductos radiculares antes del tratamiento para verificar si la bacteria se adhirió dentro de los mismos⁸.



Figura N° 4. Inoculación de especímenes dentales.

Con las raíces debidamente contaminadas se procedió a realizar el tratamiento previsto, para lo cual se dividió a los dientes en 4 grupos:

- Grupo 1: aplicación de Suero fisiológico (control positivo)
- Grupo 2: aplicación de agua ozonizada al 5%
- Grupo 3: aplicación de Hipoclorito de sodio al 5.25%
- Grupo 4: aplicación de Clorhexidina al 2% (control negativo)

Para todos los grupos se utilizó la misma secuencia clínica:

Se irrigó durante 1 minuto y medio con las soluciones químicas respectivas para cada grupo con jeringa de 3ml con punta Navi-tip utilizando micro succión, luego se instrumentó a la longitud de trabajo con lima LK # 40 con movimientos oscilatorios dejando las paredes del conducto lisas, y por último se reanudó la irrigación 1 minuto y medio más. (**Figura N° 5**)

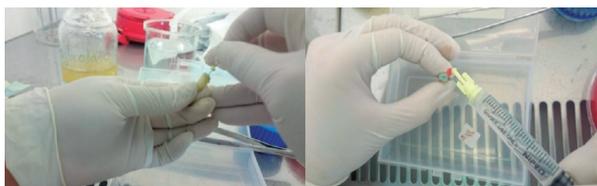


Figura N° 5. Secuencia clínica.

Luego de la desinfección química se procedió a introducir un cono de papel estéril hasta el ápice radicular para tomar una muestra de este sitio, (**Figura N° 6**) se realizó la siembra en placas de Agar Sangre y se incubó a 37°C por 15 días. Las raíces fueron colocadas en alcohol antiséptico luego de la toma de muestras⁸.



Figura N° 6. Toma de muestra y conteo final de UFC/placa.

Se realizó un Diseño Completamente al Azar con igual número de repeticiones (DCA) donde se contabilizó las colonias de *Actinomyces israelii* que luego de ser atacadas por Agua ozonizada

al 5% e Hipoclorito de sodio al 5.25% dentro de los conductos radiculares humanos aún permanezcan y proliferen en los cultivos.

Los datos obtenidos del recuento de UFC en el análisis microbiológico fueron plasmados en una tabla en Microsoft Excel 2010, permitiéndonos ingresar estos datos al programa *InfoStat* donde se realizó la prueba *ANOVA* y *Tukey* con un nivel de significancia de 5%.

RESULTADOS

Todos los grupos se investigaron bajo las mismas condiciones, igual número de repeticiones, y todos los especímenes estuvieron expuestos a la misma cantidad de bacterias al iniciar la investigación.

Luego de la inoculación se procedió a la aplicación de los tratamientos para cada grupo y posterior conteo de UFC/placa (**Tabla N° 1**).

GRUPOS				
REPETICIONES	Suero Fisiológico (C. P.)	Agua Ozonizada 5% G2	Hipoclorito de Na 5,25% G3	Clorhexidina 2% G4 (C. N.)
1	13	0	0	0
2	5	0	0	0
3	8	0	0	0
4	7	0	0	0
5	8	0	0	0
6	3	0	0	0
7	2	0	0	0
8	7	0	0	0
9	15	1	0	0
10	4	2	0	0

Tabla N° 1. Conteo de CFU/placa final.

El *Test de Tukey* muestra una media post-tratamiento de 0.0 para los grupos 3 y 4, 0.3 para el grupo 2 y 7.2 para el suero fisiológico, por lo que indica que existe diferencia estadísticamente significativa de los grupos 4, 3 y 2 comparados con el suero fisiológico (**Tabla N° 2**).

	Grupos	Media	p
Suero	4	0	< 0.001
Fisiológico	3	0	< 0.001
	2	0,3	< 0.001

Tabla N° 2. Test de Tukey para los diferentes grupos comparados con el control negativo

Al comparar los grupos 4 (Clorexhidina al 2%), 3 (Hipoclorito de sodio al 5.25%) y 2 (agua ozonizada 5%) con el Test de Tukey, se evidenció una eficacia bactericida similar contra *Actinomyces israelii*, al no presentar diferencia estadística significativa (Tabla N° 3).

	Grupos	Media	p
(G4) NaOCl 5.25%	(G2) Agua ozonizada 5%	0,3	0,15
	(G3) Clor- hexidina 2%	0	0,15

Tabla N° 3. Test de Tukey de los grupos G2 y G3 comparados con el control positivo.

DISCUSIÓN

La periodontitis apical es una inflamación de los tejidos del periápice principalmente por causa microbiológica, también han sido aislados microorganismos que producen patologías periapicales desde los alrededores del ápice dental¹. Los *Actinomyces* colonizan los tejidos periapicales del diente y han sido encontrados en infecciones de dientes obturados con periodontitis apical crónica; de estos microorganismos el más relevante es *Actinomyces israelii*², los cuales afectan al diente desde afuera de su estructura, provocando Actinomicosis y periodontitis apical, llevándonos así al fracaso endodónico si no se elige un buen protocolo de irrigación y una sustancia antibacteriana ideal.

La toxicidad que presenta NaOCl ha tomado más importancia en el ámbito endodónico por las complicaciones que puedan presentarse durante el lapso de tratamiento, y los protocolos de irrigación actuales se preocupan por complementar la desinfección del sistema de conductos radiculares asociados a irrigantes con efecto bactericida y poder de disolución tisular, es así que se ha buscado

una sustancia noble para nuestro organismo que al igual que el hipoclorito de sodio se acerque a las condiciones ideales de un buen irrigante, en este caso se ha considerado al agua ozonizada, al que se comparó con hipoclorito de sodio, obteniendo como resultado que hipoclorito de sodio al 5.25% eliminó totalmente la cepa de *A. israelii* mientras que el agua ozonizada disminuyó la carga bacteriana en menor proporción, pero estadísticamente no existen diferencias significativas entre estas dos soluciones irrigantes, por tanto ambas sustancias podrían ser usadas en la desinfección de conductos radiculares⁸.

Ochoa J. et al. 2016⁹, investigaron la concentración mínima necesaria de hipoclorito de sodio y ozono acuoso para la erradicación de biopelículas de *E. fecalis* mediante diluciones, realizaron comparaciones entre diferentes porcentajes de ozono (5%, 1,25%, 0.25%, 0.062%) e hipoclorito de sodio (5.25%, 1.25%, 2.5%, 0.625%), encontrando que el ozono al 5% resultó 100% efectivo, las concentraciones de ozono acuoso 1.25% y 0.25% fueron significativamente menores que las de hipoclorito de sodio y la concentración de ozono al 0.062% fue la menos eficaz, de una manera global los resultados de actividad antimicrobiana del ozono se presentaron estadísticamente menores a los obtenidos por hipoclorito de sodio contra biopelículas de *E. fecalis*, obteniendo en este escrito, resultados estadísticamente no significativos, entre hipoclorito de sodio al 5.25% y ozono acuoso al 5% frente a cepa de *A. israelii*, por tanto se puede evidenciar las propiedades bactericidas de ozono a una concentración del 5%; pese a la diferencia de metodología y microorganismo estudiado.

Al no existir suficientes estudios de actividad antibacteriana de agua ozonizada contra *A. israelii* a los cuales recurrir, pese a las patologías que puede producir por la capacidad de sobrevivir a ambientes extremos es decir poco oxígeno y nutrientes, pudiendo de esta manera provocar el fracaso endodónico, por lo cual hemos visto la necesidad de tomar diversos estudios del ozono acuoso frente a diferentes bacterias, es así que Cardoso M. 2008¹⁰, en su investigación comprobaron mediante estudio in vitro el efecto bactericida de agua ozonizada al 5% sobre *Candida albicans* y

Enterococo fecalis, observaron que esta sustancia redujo significativamente la cantidad de colonias bacterianas, aunque en esta investigación se aplicó ozono acuoso 5% directamente contra *A. israelii*, se evidenció una reducción bacteriana significativa, por tanto se evidencia un buen efecto bactericida de la presente solución, ante las bacterias colonizadoras del canal radicular.

Cardoso M. 2008¹⁰, pudieron evidenciar mediante estudio in vitro que irrigar los conductos radiculares infectados, con agua ozonizada al 5% durante 10 minutos no fue eficiente en la desintegración de lipopolisacáridos de *Echerichia Coli*, a diferencia de la presente investigación en la cual se observó una eficaz acción bactericida al irrigar con agua ozonizada 5% sobre *A. israelii* durante 3 minutos, estos resultados pueden darse por la mayor resistencia que presenta *E. coli* en comparación de *A. israelii*.

Huth K. et al. 2009¹¹, comprobaron que ozono acuoso a altas cantidades (20 ug mL-1) fue capaz de disminuir significativamente la cantidad de células bacterianas de Biofilm cariogénico, pero al comparar su efectividad antibacteriana con hipoclorito de sodio concluyeron que éste actúa de mejor manera puesto que eliminó en su totalidad las bacterias de Biofilm cariogénico, la presente investigación observó que el ozono acuoso presentó menor efecto antibacteriano que hipoclorito de sodio, esto puede ser por la diferente concentración del ozono, pero se evidencia que el ozono acuoso presenta actividad antimicrobiana a diversas bacterias, con diferentes concentraciones.

Recai Z. et al. 2015⁸, estudiaron la eficacia antibacteriana de hipoclorito de sodio 5.25% y agua ozonizada sobre *S. aureus*, utilizando irrigación activa durante 3 minutos en premolares extraídos por motivos ortodóncicos, tomaron la muestra con cono de papel absorbente estéril y realizaron la siembra en placas de agar sangre, después del tiempo de incubación observaron una disminución de UFC/placa estadísticamente no significativa entre ambas soluciones, siendo similar a los resultados encontrados en la presente investigación siguiendo una metodología similar, por lo que se podría llegar a considerar ozono como sustancia irrigadora en endodoncia, pues ha de-

mostrado propiedades bactericidas ante varios microorganismos patógenos.

Como descrito, existen varios estudios en la literatura sobre la acción bactericida del ozono, pese a no existir estudios sobre *Actinomyces israelii*, la presente investigación muestra una acción antibacteriana estadísticamente similar al hipoclorito de sodio, por lo que se permitiría recomendar su uso por el beneficio de no ser tóxico como el hipoclorito de sodio en la desinfección de conductos radiculares.

CONCLUSIÓN

- El agua ozonizada al 5% presentó efecto bactericida similar al hipoclorito de sodio al 5.25%, sobre *A. israelii*, por lo cual ambas sustancias podrían ser utilizadas en los protocolos de irrigación, puesto que el agua ozonizada al 5% presentó propiedades antimicrobianas que se acercan a las condiciones para ser un irrigante ideal como NaOCl que es considerado padrón oro mundial en la comunidad endodóncica; para lo cual se sugiere realizar más investigación sobre ozono y *A. israelii*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Siqueira JF, Rocas IN. Microbiología endodóncica. In Torabinejad M. Endodoncia, Principios y Práctica. España: Elsevier; 2010. p. 38 - 44.
2. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. Endodontic Topics. 2003; 6(1). 3-28.
3. Piovano S. Microbiología de las enfermedades gingivoperiodontales, de la periimplantitis, de los conductos radiculares y de los procesos perirradiculares. In Negroni N. Microbiología Estomatológica: Fundamentos y Guía Práctica. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. p. 319-324.
4. Jhajharia K, Parolia A, Vikram SK. Biofilm in endodontics: A review. Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry. 2015; 5(1). 1-12.

5. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*. 2004; 37(7). 438-46.
6. Tessier J. El ozono en odontología. *Dental Tribune*. 2014; 2(1). 21-2.
7. Monzavi AE. In vitro and ex vivo antimicrobial efficacy of nano-MgO in the elimination of endodontic pathogens. *Clin Oral Investing*. 2014; 19(2). 56.
8. Recai Z, Gizem K, Ihsan H, Zeynep S, Tutku T, Zuhail M. Bactericidal effects of various irrigation solutions against *Staphylococcus Aureus* in human root canal. *Journal Istanbul Univ. Fac. Dent*. 2015; 49(1). 19-24.
9. Ochoa JD, Rendon JA, Morales S, Ferrer ME. RediCES. [Online].; 2016 [cited 2016 abril 13. Available from: <http://hdl.handle.net/10946/4091>.
10. Cardoso M, Dias L, Yumi C, Cardoso AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. 2008; 105(3). 85-91.
11. Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *International Endodontic Journal*. 2009; 42(1). 3-13.