Prevalencia de *Enterococcus faecalis* de pacientes que asisten a consulta de endodoncia.

María Soledad Álvarez Rodríguez, Anjuly Sujey Sanabria Velásquez, Diana Sofia Sierra, Mary Elizabeth Godoy Godoy, Jonathan David Cueva Delgado, Adriana Rodríguez Ciodaro, Hugo Diez Ortega, Catalina Méndez de la Espriella
Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia.
masoledad.alvarez16@gmail.com

INTRODUCCIÓN

En cavidad oral se han identificado cerca de 700 especies bacterianas transitorias, pero en raras ocasiones se ha detectado *Enterococcus* como parte de la flora normal [1,2]. Sin embargo, se ha comprobado su presencia en procesos infecciosos como necrosis, conductos expuestos a cavidad oral y periodontitis apicales primarias y persistentes.[3,4] Diversos estudios han revelado que la microbiota de dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico difiere de la encontrada en los dientes no tratados endodónticamente. [8-11] En dientes con fracaso endodóntico predominan los anaerobios facultativos Gram +, siendo *E. faecalis,* la especie que se aísla con mayor frecuencia. [12] Se ha demostrado que puede sobrevivir y multiplicarse en microambientes tóxicos como el Hidróxido de Calcio, así como a la instrumentación químico-mecánica de los conductos radiculares, colonizando y/o reinfectando los túbulos dentinarios en conductos obturados. [13]

La calidad de obturación se relaciona con el éxito del tratamiento endodóntico; la limpieza y conformación adecuada, disminuye la capacidad de supervivencia y crecimiento de *E. faecalis*. [12] Por el contrario, una limpieza y conformación inadecuada, permiten que este microorganismo pueda sobrevivir dentro de las pequeñas ramificaciones apicales, conductos accesorios o en el espacio del material de obturación. [15] *E. faecalis* tiene capacidad para desarrollar una biopelícula lo que aumenta su resistencia, que se ve reflejada en el desarrollo de lesiones periapicales persistentes. [14]

La frecuencia de *E. faecalis* en infecciones endodónticas primarias es del 4%, mientras que en lesiones secundarias varía entre 24 y 77% según el método de identificación del microorganismo. Hasta la fecha no se considera como parte de la microflora oral, [6,16] ni se conoce la fuente de origen de colonización de los conductos radiculares. [7]

El objetivo de este estudio fue establecer la prevalencia de *Enterococcus faecalis* en muestras relacionadas con el tratamiento endodóntico, de pacientes que asistieron a la clínica del Posgrado de Endodoncia en la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se realizó un estudio observacional descriptivo, que incluyó a todos los pacientes mayores de edad que asistieron a consulta de la Clínica del Posgrado de endodoncia de la Pontificia Universidad Javeriana entre Febrero de 2016 y Mayo de 2017. Como criterios de exclusión se establecieron: pacientes con algún grado de discapacidad mental y pacientes con antibioticoterapia en los últimos 3 meses. Antes de la recolección de las muestras, a cada paciente se le solicitó firma del consentimiento informado.

Los pacientes fueron divididos en grupos según el tipo de tratamiento a realizar:

Grupo 1: Pacientes que no requirieron tratamiento endodóntico. Se tomó muestra de mucosa oral y lengua.

Grupo 2: Pacientes para tratamiento endodóntico sin diagnóstico de periodontitis apical. Se tomó muestra de mucosa oral, lengua y eyectores de endodoncia.

Grupo 3: Pacientes para tratamiento endodóntico con diagnóstico de periodontitis apical (lesión primaria). Se recolectaron muestras de mucosa oral, lengua, eyectores endodónticos, limas manuales y conos de papel.

Grupo 4: Pacientes para retratamiento endodóntico con diagnóstico de periodontitis apical (lesión secundaria). Se recolectaron muestras de mucosa oral, eyectores endodónticos, limas manuales, conos de papel y material de obturación del tratamiento endodóntico previo.

Las muestras de mucosa oral, fueron recolectadas por barrido de surco yugal, encías, mejillas, paladar y lengua. Para la toma de muestras del material de obturación, la remoción se hizo con instrumental manual (Dentsply Maillefer®) y/o rotatorio convencional (Fresa Peeso Dentsply Maillefer®), con la menor cantidad posible de solvente orgánico. Los remanentes fueron llevados a un tubo con caldo BHI. Las muestras del conducto se tomaron con limas manuales que alcanzaron la longitud del conducto radicular y las de la lesión periapical con conos de papel a longitud de trabajo por un minuto.

Las muestras de limas manuales fueron tomadas en tres tiempos: posterior al proceso de esterilización, al introducirla en el conducto radicular a nivel de ápice y posterior al lavado químico en jabón enzimático por un tiempo de 35-45 minutos. Las muestras de los eyectores endodónticos se recolectaron: previo al tratamiento, posterior al mismo y después del lavado químico.

Métodos para el análisis microbiológico.

Las muestras biológicas (mucosa, paladar y encías) e inertes (limas manuales, eyector endodóntico, gutapercha y conos de papel) fueron previamente enriquecidas por siembra directa en caldo BHI (Infusión cerebro corazón) y posterior incubación a 37ºC por 24 horas. A partir de los caldos que presentaron crecimiento bacteriano se realizó coloración de Gram y cultivo en Agar Chromocult Enterococci a 37ºC por 24 horas. De los cultivos que presentaron colonias compatibles con *E. faecalis,* se realizó una segunda siembra en el agar Agar Chromocult Enterococci. La identificación se realizó con el sistema MALDI-TOF.

Análisis de similitud de cepas.

Se realizó una comparación de las glucoproteínas de pared de cada *E. faecalis* (Bioexplorer 1.0) con una biblioteca de espectros para la identificación de los microorganismos. La asociación filogenética se estableció mediante el programa de alineamiento múltiple (Clustal- Multiple Sequence Alignments). El árbol

filogenético se construyó a partir de las distancias evolutivas usado la metodología UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). [22]

RESULTADOS.

Se incluyeron en total 101 pacientes distribuidos así: grupo 1: 34, grupo 2: 26, grupo 3: 22 y grupo 4: 21 pacientes.

Tabla 1: Origen de la muestra de estudio.

	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Pacientes	4	28	6	20	5	19	12	9
Muestras	0	18	13	91	9	167	41	148
Mucosa	0	18	6	20	2	20	7	14
Eyector endodóntico	N.A	N.A	5	77	3	63	6	57
Lima	N.A	N.A	N.A	N.A	2	64	10	53
Cono de papel	N.A	N.A	N.A	N.A	2	19	9	12
Gutapercha	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	9	12

+: Positivo para *E. faecalis*

- : Negativo para *E. faecalis*

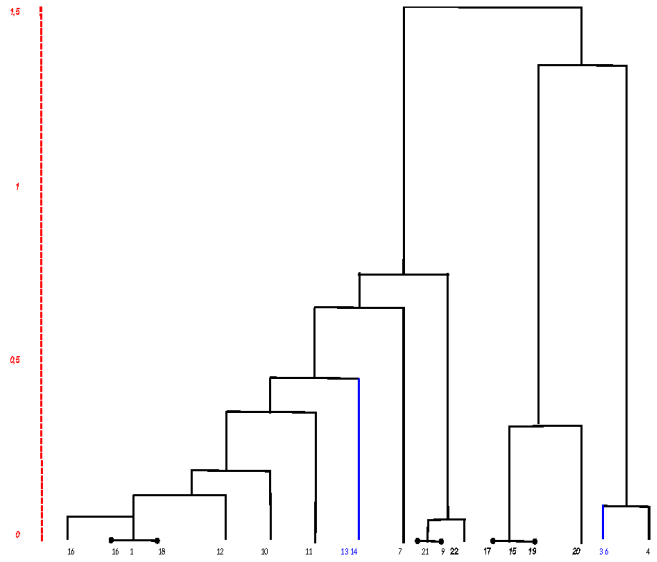
N.A: No aplica la toma de la muestra

Cumpliendo el objetivo general de la presente investigación, la prevalencia de aislamiento de *E. faecalis* fue del 26% (27 pacientes), siendo mayor el número en el grupo 4 (12 pacientes, 12%). Con respecto a la prevalencia de *E. faecalis* en todas las muestras, se aisló en el 13%, siendo mayor en las muestras de lesiones secundarias obtenidas del grupo 4 (41 muestras, 62%). Los resultados por tipo de muestra mostraron que *E. faecalis* fue aislado en 20% de las muestras de mucosa, en 7% de eyectores endodónticos, 10% de limas manuales, 26% de conos de papel y 43% de gutapercha. **(Tabla 1).**

El análisis por paciente mostró que 2 pacientes presentaron 2 aislamientos, 1 paciente 3 aislamientos y 3 pacientes 4 aislamientos. En 2 de los pacientes positivos para *E. faecalis,* se encontró una alta homología entre las cepas aisladas

de eyector y mucosa (paciente 081) y entre las cepas aisladas de mucosa y gutapercha (paciente 005), los cuales pertenecían al grupo 4. (Figura 1)

Figura 1. Dendograma para glucoproteínas de pared de las cepas de *E. faecalis* aisladas. Dos pacientes (línea azul) presentaron cepas con alta similitud. Los otros pacientes presentan cepas con una alta diversidad.



DISCUSIÓN.

A pesar de los estudios realizados, se desconoce el mecanismo exacto de *E. faecalis* para ingresar al sistema de conductos radiculares. [7,15,18,19] Adicionalmente a la toma de muestras biológicas, en este estudio se realizó una búsqueda de posibles fuentes exógenas en materiales empleados durante la terapia endodóntica.

Los resultados de la prevalencia de aislamiento de *E. faecalis* en muestras de mucosa oral de la población que acudió a consulta, independientemente del diagnóstico endodóntico, son similares a los obtenidos por Carrero y colaboradores (5%)[16] lo que confirma la baja frecuencia de *E. faecalis* en muestras de mucosa oral. Esta frecuencia aumenta en pacientes con lesión primaria o secundaria. [7,21,22] Este fenómeno pudo ser confirmado en el presente

estudio donde se encontró una frecuencia de *E. faecalis* del 23% en pacientes con lesión primaria y del 57% en pacientes con lesión secundaria, sugiriendo la asociación del microorganismo con la presencia de patologías periapicales. El fracaso endodóntico es atribuido a la capacidad de resistencia ambiental, química y factores de virulencia que posee el microorganismo.[23,24,25,26,27]

La prevalencia de aislamiento a partir de lesiones secundarias o persistentes en este estudio es similar a lo encontrado en una población Sueca (54%) [9]. Estudios como el de Vytaute Peciuliene *y cols*, muestran claramente que *E. faecalis* es la especie dominante en los casos de retratamiento con diagnóstico de periodontitis apical o lesión secundaria en una población de Lituania, con una prevalencia del 70%.[10] A pesar de las diferencias en la metodología utilizada, estos tres estudios reportan las frecuencias de asilamiento de *E. faecalis* más altas en infecciones endodónticas persistentes.

Como ya se mencionó, la fuente de contaminación de *E. faecalis* aún no ha sido clarificada. Algunos autores como Portenier y colaboradores [19] y Pardi y colaboradores, [20] postulan que la contaminación ocurre antes del tratamiento; otros como Kaufman y colaboradores [17] y Zoletti y colaboradores,[18] que no necesariamente es después del tratamiento. Dentro de las posibles fuentes de contaminación esta la invasión del sistema de conductos radiculares durante el procedimiento endodóntico cuando no se utiliza aislamiento absoluto lo que permite la entrada del microorganismo a través de la saliva; otra vía de contaminación se puede presentar cuando no se realiza una correcta esterilización del instrumental, llevando al sistema de conductos microorganismos presentes en los instrumentos como en el caso de los eyectores endodónticos. Por otra parte se puede dar la colonización cuando se hace el tratamiento en dos citas por el posible desalojo o fisura de la restauración coronal temporal permitiendo la entrada de microorganismos. [5,28]

Determinar las posibles fuentes de contaminación es el primer paso para

establecer la vía de entrada del microorganismo en el conducto radicular. Se considera que la presencia de *E. faecalis* en cavidad oral implica que transita en la microflora oral como microorganismo oportunista y puede ser eliminado por la limpieza oral mientras se mantenga intacta la barrera de colonización. El microorganismo no causa daño en cavidad oral mientras no exprese sus mecanismos de virulencia y se mantenga en un estado de latencia metabólica. [5] Cuando se hace un tratamiento de endodoncia hay un desbalance de la microflora del diente involucrado en comparación con el resto de la cavidad oral, por lo que en los individuos con tratamiento de endodoncia los dientes son más susceptibles a la colonización. [5]

El estudio de Melton y colaboradores, reportó la penetración de bacterias a través de la interfase existente entre restauraciones y la cavidad de acceso de endodoncia, al igual que entre las restauraciones existentes y el remanente dentario. [29] Posteriormente, Abbott y colaboradores, mostraron la presencia de bacterias en la superficie de ajuste o adaptación de las restauraciones consideradas clínicamente satisfactorias en dientes con periodontitis apical secundaria. [28] Esto se relaciona con los resultados obtenidos en nuestro estudio, siendo más prevalente en los pacientes con fracaso endodóntico, en donde las restauraciones previas se encontraban desadaptadas o ausentes, permitiendo la colonización y penetración de los microorganismos en el sistema de conductos radiculares. Es por ello que la hipótesis de la colonización por fuentes exógenas que incluyen la mucosa oral y el instrumental, aunque no está completamente comprobada, parece ser la más acertada.

El análisis de similitud sugiere que un individuo puede tener más de una cepa de *E. faecalis* en cavidad oral y por lo tanto la fuente de contaminación puede ser múltiple. Zoletti y colaboradores, mostraron que existe una diversidad clonal en las cepas de *E. faecalis* y que hay una alta variabilidad interindividual sugiriendo que la virulencia del microorganismo y expresión de sus factores depende más del nicho ambiental y la interacción con otros microorganismos. [7]

Conclusión

Se presenta una baja prevalencia de *E. faecalis* en pacientes sin patología periapical y alta en pacientes con periodontitis apical primaria o secundaria, siendo mayor en ésta última. Se encontró una gran diversidad de cepas aisladas del mismo individuo. Solo dos pacientes presentan la misma cepa en dos muestras diferentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aas J, Paster B, Stokes L, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiology 2005; 43 (11):5721-5732.

2. He X, Shi W. Oral microbiology: past, present and future. Int J Oral Science Sci. 2009;1(2): 47-58.

3. Love R, Jenkinson H. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med. 2002; 13(2):171-183.

4. Siqueira J, Rôsas I, Ricucci D. Biofilms in endodontic infection. Endod Topics. 2010; 22(1):33-49.

5. Vidana, R., Sullivan, Å., Billström, H., Ahlquist, M., & Lund, B. *Enterococcus faecalis* infection in root canals–host derived or exogenous source?. Lett Appl Microbiol. 2011;52(2):109-115.

6. Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. *Enterococcus faecalis:* its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006;32(2):93-98.

7. Zoletti G, Pereira E, Schuenck R. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. Res Microbiology. 2011;162(2)151-158.

8. Causse M, Solís F, Rodríguez F, Casal M Investigación de las resistencias a antimicrobianos en *Enterococcus faecalis*. Rev Esp Quimioter. 2009;22(3):117-119.

9. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1998;31:1-7.

10. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. J Endod. 2000;26(10):593-5.

11. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. Int Endod J. 2001; 34(6):429-34.

12. Sundqvist G, Fidgor D, Persson S, Sjögren U. Microbiology 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(1):86-93.

13. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Sousa-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. Oral Microbiol Immunol 2003;18(2):100-103.

14. Wang, Q. Q., Zhang, C, Chu, C, Zhu, X. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. Int J Oral Sci. 2010;4(1):19-23.

15. Haapasalo, M., Udnæs, T, Endal, U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post treatment. Endod Topics. 2003;6(1):29-56.

16. Carrero C, González M, Martinez M, Serna F, Ortega H, Rodríguez A, Baja Frecuencia de *Enterococcus faecalis* en mucosa oral de sujetos que acuden a consulta odontológica. Rev Fac Odontol Univ Antioq. 2015;26(2):261-270.

17. Kaufman, B., Spangberg, L., Barry, J., Fouad, A.F. *Enterococcus spp*. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. J. Endod. 2005;31:851-856.

18. Zoletti, G, Siqueira Jr, Santos K. Identification of *Enterococcus faecalis* in root filled teeth with or without periradicular lesions by culture dependent and independent approaches. J. Endod. 2006;32:722-726.

19. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enteroccus faecalis* the root canal survivor or “star” in post-treatment disease. Endod Topics 2003;6:135-59

20. Pardi G, Guilarte C, Cardozo E, Briceño. Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. Acta odontol venez, 2009:47(1):110-121.

21. Roˆc ̧as, I.N., Siqueira Jr., J.F., Santos, K.R.N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J. Endod, 2004;30:315-320

22. Siqueira Jr., J.F., Roˆc ̧as, I.N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod, 2004;97:85-94.

23. Evans M, Davies J.K, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J. 2002;35(3):221-228.

24. 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(5):283-288

25. Jahromi M, Toubayani H, Rezaei M. Propolis: a new alternative for root canal disinfection. Iran Endod J, 2012;7(3):127-133.

26. Rodríguez-Niklitschek C, Oporto G. Clinical implications of *Enterococcus faecalis* microbial contamination in root canals of devitalized teeth: Literature review. Revista Odontol Mexic, 2015;19(3):177-182.

27. Eaton, T.J., Gasson, M.J. Molecular screening of *Entercoccus* virulence determinants and potential for genetic exchanges between food and medical isolates. Appl. Environ. Microbiol. 2001;67:1628-1635

28. Kwang, S., & Abbott, P. V. Bacterial contamination of the fitting surfaces of restorations in teeth with pulp and periapical disease: a scanning electron microscopy study. Aust dent j, 2012;57(4):421-428.

29. Melton DS, Cobb S, Krell KV. A comparison of two temporary restorations: light-cured resin versus a self-polymerizing temporary restoration. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1990;70:221–225.