

Isolation of microorganisms involved in endodontic infection

Marcello Gatti, Maria Sofia Rini, Pasqua Schiavone, Tatiana Giulia Rizzati, Francesca Scandurra, Giovanna Costa

Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche, Sezione di Microbiologia, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

Key words: Periodontitis, PAA, PAE, PAC, Cultural, rRNA ibridization test

Isolamento di microrganismi nelle infezioni endodontiche

SUMMARY

In endodontic infections a lot of different microorganisms can be time inside dentinal tubules to support such infections. Most of these are Gram negative anaerobes bacteria able to induce an immune response that is the apparent cause of periapical lesion, but also Gram positive facultative aerobic species and fungi of the genus *Candida*. They play an important role in pain but also in bone periapical resorption. Therefore, the exact knowledge and the subsequent elimination of the microorganisms involved by the system of root canals, although difficult to achieve completely, is essential for the resolution of apical periodontitis.

Aims

The purpose of this study was to identify the presence of pathogenic microorganisms in patients with endodontic disease using two techniques: direct hybridization of rRNA of commerce and traditional culture. The results were compared.

INTRODUZIONE

Studi microbiologici recenti sulle infezioni endodontiche (1) hanno evidenziato che più microrganismi possono essere presenti contemporaneamente all'interno dei tubuli dentinali a sostenere tali infezioni. La maggior parte di questi sono batteri Gram negativi anaerobi (18, 19, 25), in grado di indurre una risposta immunitaria che è la causa apparente della lesione periapicale (9). Tra i batteri Gram negativi anaerobi quelli nigropigmentati sono stati isolati da ascessi acuti di origine endodontica, suggerendo un ruolo attivo nella patogenesi della sintomatologia acuta (8, 9, 26). Anche le spirochete sono presenti nelle lesioni periradicolarie di origine endodontica (5, 22) mentre altri ricercatori hanno ritrovato, nelle infezioni periapicali, la presenza anche di batteri Gram positivi aerobi-anaerobi facoltativi e miceti del genere *Candida* (6, 7). Inoltre batteri Gram negativi anaerobi che colonizzano lo spazio endodontico aumentano quando l'infezione permane per un periodo sufficientemente lungo (4, 16). L'eliminazione dei microorganismi dal sistema dei canali radicolari è fondamentale per la risoluzione della parodontite apicale (21), anche se di fatto è molto difficile ottenere una completa risoluzione. I microorganismi nel biofilm possiedono le caratteristiche che differiscono dalle loro forme planctoniche, compresa la resistenza alla fagocitosi cellulare ed ai medicamenti, con conseguente infezione persistente (3). Oggi si ritiene che l'infezione endodontica sia polimicrobica: ciò comporta un maggior rischio di riassorbimento osseo periapicale e di esacerbazione della sintomatologia dolorosa (24). I batteri possono trovarsi non solo a livello del lume canale, ma possono invadere anche i tubuli dentinali, i quali, con la loro struttura a nido d'ape, possono fungere da *reservoir* per future infezioni dentali e sistemiche, in quanto sfuggono ai normali trattamenti (12, 13, 15). Questi microrganismi giocano un ruolo importante nello sviluppo della sintomatologia dolorosa (10) ma anche del riassorbimento osseo periapicale (24). Per questo è importante definire sia la presenza di specifici patogeni orali a livello endodontico, sia il loro ruolo nella patologia endodontica e la loro capacità di sopravvivere e colonizzare la nicchia endodontica.

L'esame colturale tradizionale, con l'identificazione delle specie batteriche e la suscettibilità *in vitro* agli antimicrobici rimane il *gold standard* per evidenziare la presenza dei microrganismi all'interno del canale, anche se oggi è possibile utilizzare metodiche nuove come le tecniche di biologia molecolare, nei confronti di alcune specie batteriche di difficile coltivazione.

La rimozione di questi batteri, con trattamenti specifici, determina la guarigione.

Lo scopo di questo studio è stato quello di identificare la presenza di microrganismi patogeni nei pazienti con malattia endodontica con due tecniche: ibridazione diretta di rRNA del commercio e coltura tradizionale confrontando i risultati.

MATERIALI E METODI

Tipologia dei pazienti

Sono stati analizzati 180 prelievi (90 per il *test* molecolare e 90 per l'esame colturale) provenienti da 54 denti di 45 pazienti, in buono stato di salute generale, senza patologie sistemiche e senza terapia antibiotica da almeno 3 mesi, di età compresa tra i 22 e 65 anni (età media 43 anni), con documentazione radiografica. I pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi clinici: 16 pazienti sintomatici con parodontite apicale acuta (PAA), 15 pazienti sintomatici con parodontite apicale esacerbata (PAE) e 14 pazienti asintomatici con parodontite apicale cronica (PAC). I criteri di esclusione dallo studio sono stati: gravidanza, epatopatia, insufficienza renale acuta, mieloma, artrite, patologie del collagene, fibrosi polmonare, enfisema, tumori, osteoporosi, operazioni chirurgiche recenti (1 mese), patologie infiammatorie croniche, malattie infettive recenti, disordini neurologici, patologie del sangue e della tiroide, anoressia, abuso di alcool, allergie note e condizioni generali che richiedono terapia antibiotica profilattica prima del trattamento, età inferiore a 18 anni. Ad ogni paziente è stato chiesto il consenso informato.

Modalità di prelievo

Dopo anestesia appropriata, ogni elemento, sotto diga, è stato deterso e disinfettato per un minuto con perossido di idrogeno al 3% ed ipoclorito di sodio al 5% (Nicolor 5, Ognà). Le cavità di accesso sono state preparate con fresa sterile raffreddata da acqua. Dopo apertura della camera pulpare sono stati inseriti da 2 a 4 coni sterili (Mynol sterile *paper point*, USA) nel canale, per un minuto, dopodiché sono stati trasferiti in 2 provette eppendorf sterili, una con terreno di trasporto per l'esame colturale e l'altra, con soluzione tampone per il *test* molecolare.

Test molecolare

È stato utilizzato un *test* commerciale (PerioCheck Gum-Sunstar) basato sull'ibridazione diretta dell'rRNA per la quantificazione dei batteri vitali appartenenti alle specie patogenie parodontali e perimplantari: *A. actinomycetemcomitans* (*A.a.*), *P. gingivalis* (*P.g.*), *T. forsythensis* (*T.f.*), e *T. denticola* (*T.d.*). Il limite di rivelazione per ciascuna specie patogena è di 200 cellule batteriche.

I campioni per l'analisi molecolare sono stati inviati, all'istituto IAI (Institut für Angewandte Immunologie), presso Zuchwil, in Svizzera.

Corresponding author: Marcello Gatti

Università degli Studi di Bologna, Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche, Sezione di Microbiologia
Via San Vitale, 59 - 40125 Bologna - Tel.: 39 051 2088156 - Fax: 051 225208;
E-mail: marcello.gatti@unibo.it; marcello.gatti.bo@alice.it

Esame culturale

Per l'esame culturale i campioni sono stati osservati al microscopio a fresco per evidenziare batteri mobili, cocchi, bacilli filamentosi, blastospore di lievito, ecc... e in campo oscuro per evidenziare le spirochete con ingrandimento 400x. Successivamente i campioni sono stati seminati in piastre di: *Herellea* agar (Biolife), Mannitol salt agar (Biolife), Blood agar horse (Biolife), *Brucella* agar (Biolife), CNA agar (Biolife), agar blood Schaedler (Biolife), Gc-Lect agar (BD), Chromagar (Alfa - Wasserman) e/o altri terreni selettivi preparati in laboratorio. I terreni, per la crescita di batteri aerobici, venivano poi incubati a 37°C per 48 ore, mentre per i batteri anaerobici i terreni venivano incubati a 37°C per 5 giorni in anaerobiosi utilizzando il sistema GENbag anaer (bioMérieux) e per i lieviti l'incubazione a 37°C si protraeva per 4 giorni. Per la semina è stata utilizzata un'ansa calibrata monouso sterile da 0.10±1. L'ansa veniva strisciata sulle piastre in 4 settori diversi, per ottenere una conta semiquantitativa finale di $\geq 10^6$ cfu.

Le colonie sono state isolate utilizzando gli stessi terreni di crescita ed identificate con i sistemi Api (bioMérieux): Rapid ID 32, per bacilli anaerobici obbligati sia Gram negativi che Gram positivi, Rapid ANA II, per cocchi anaerobici obbligati Gram positivi, API Staph. per stafilococchi e micrococchi, Rapid ID32 Strep per streptococchi, Rapid NH per i generi *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Aggregatibacter* e API C Aux per i lieviti.

Per l'antibiogramma (ABG) sono state utilizzate piastre di *Brucella* agar e/o Mueller Hinton agar e la metodica di Kirby-Bauer. Gli antibiotici scelti per il saggio sono stati: amoxicillina (AMX), amoxicillina + ac. clavulanico (AMC), metronidazolo (MTZ), tetraciline (TE), clindamicina (CC), eritromicina (E), rifampicina (RD), ciprofloxacina (CIP) e ceftriaxone (CRO).

Tali antibiotici sono stati saggiati nei confronti dei ceppi ritenuti responsabili dell'infezione in atto di *F.n.*, *P.g.*, *P.i.*, *T.f.* ed *E.f.*

RISULTATI

Tutti i prelievi sono risultati positivi per più microrganismi con l'esame culturale. Le spirochete non sono state coltivate, ma la loro presenza è stata osservata al microscopio ottico in campo oscuro. Sono stati isolati 205 ceppi appartenenti a 29 specie batteriche e a 2 specie fungine nei pazienti studiati. Nella Figura I vengono indicati i microrganismi isolati dai 45 pazienti sia sintomatici che asintomatici e suddivisi per le loro caratteristiche: forma, colorazione di Gram e metabolismo. Prendendo in considerazione solo le specie microbiche isolate/osservate con una conta totale $>10^5$ cfu/ml e con una percentuale uguale o maggiore al 20% sul totale degli isolamenti, l'esame culturale ha evidenziato nel gruppo dei pazienti asintomatici (PAC) e nel gruppo di pazienti sintomatici (PAA e PAE) i seguenti microrganismi e le rispettive percentuali di isolamento: *C. albicans* (64% contro il 6,4%), *E. faecalis* (93% contro il 23%), *T. forsythensis* (21% contro il 19%), *F. nucleatum* (43% contro il 32%), *P. intermedia* (21% contro il 29%), *P. gingivalis* (21% contro 23%) e spirochete (43% contro 65%), come riportato nella Tabella 1.

L'ABG ha dimostrato resistenze varie nei confronti dei 67 ceppi batterici isolati nelle tre forme cliniche di parodontite: PAC, PAA e PAE., in particolare l'amoxicillina e l'eritromicina con il 45%, di resistenza verso *P. intermedia*, *T. forsythensis* e *P. gingivalis*, il ceftriaxone con il 34% verso *E. faecalis*, *P. intermedia* e *P. gingivalis*, le tetraciline sono risultate con minor resistenza, 13% come riportato nella Tabella 2.

L'indagine molecolare ha permesso di identificare batteri con una carica che oscillava tra 10^6 e 10^9 cfu/ml, evidenziando nel gruppo dei pazienti asintomatici (PAC) e nel gruppo di pazienti sintomatici (PAA e PAE) i seguenti microrganismi e le rispettive percentuali di isolamento: *P. gingivalis* (36% contro il 29%), *T. denticola* (57% contro il 71%), *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythensis* (0% contro il 10%).

Nella Tabella 3 sono riportati il numero e la percentuale dei batteri trovati nelle tre forme cliniche PAC, PAA e PAE, con il test molecolare.

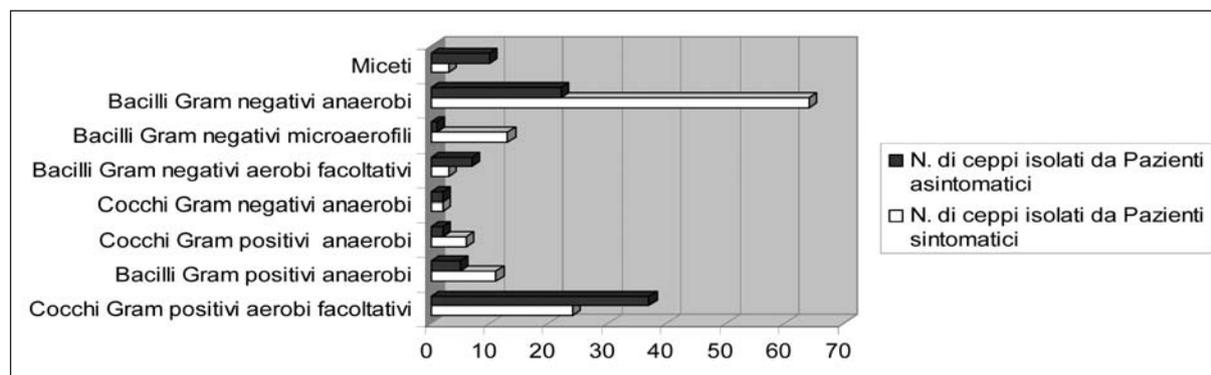


Figura I. Numero di ceppi isolati dai 45 pazienti studiati.

Tabella 1. Numero e percentuale dei ceppi isolati e/o osservati con l'esame culturale e conta totale $> 10^5$ cfu/ml, nei pazienti con le tre forme cliniche di parodontite: PAC, PAA e PAE.

	C.a.	E.f.	T.f.	F.n.	P.i.	P.g.	*Spirochete
PAC 14	9 (64%)	13 (93%)	3 (21%)	6 (43%)	3 (21%)	3 (21%)	6 (43%)
PAA 16	1 (6%)	4 (25%)	4 (25%)	2 (13%)	8 (50%)	5 (31%)	16 (100%)
PAE 15	1 (7%)	3 (20%)	2 (13%)	8 (53%)	1 (7%)	2 (13%)	4 (27%)

*Le spirochete sono state solo osservate al microscopio in campo oscuro ed identificate come *T. denticola* con la tecnica molecolare.

Tabella 2. Resistenze trovate nei 67 ceppi batterici isolati con l'esame culturale nei pazienti con le tre forme cliniche di parodontite nei confronti degli antimicrobici saggiati.

Batteri	N. ceppi	AMX	AMC	MTZ	TE	E	RD	CIP	CRO	CC	VA	TEC
E.f.	20	6	1	NS	NS	4	NS	NS	8	1	1	1
F.n.	16	4	2	2	0	0	3	0	2	0	NS	NS
P.i.	12	8	5	5	4	10	5	2	5	1	NS	NS
T.f.	9	5	4	5	3	8	3	2	3	1	NS	NS
P.g.	10	7	5	4	2	8	3	4	5	1	NS	NS
totale	67	30	17	16	9	30	20	8	23	4	1	1

Tabella 3. Numero e percentuale dei ceppi batterici trovati con il test molecolare nelle tre forme cliniche: PAC, PAA e PAE.

	A.a.	P.g.	T.d.	T.f.
PAC 14	0	5 (38%)	8 (57%)	0
PAA 16	2 (13%)	6 (38%)	16 (100%)	2 (13%)
PAE 15	1 (7%)	3 (20%)	6 (40%)	1 (7%)

DISCUSSIONE

I dati mostrano che il test molecolare ha una sensibilità maggiore rispetto all'esame colturale così come i tempi di risposta sono a suo favore e risulta particolarmente importante per *T. denticola*, microrganismo di difficile coltivazione la cui presenza si accompagna alle fasi di riesacerbazione della malattia parodontale.

Paragonando i risultati ottenuti con le due tecniche: isolamento colturale e test molecolare, vediamo che *T. denticola* è stato il batterio trovato con la percentuale più alta nei 45 pazienti studiati (rispettivamente 58% vs il 67%) dove mostra una maggior presenza nelle forme sintomatiche rispetto alle asintomatiche, *P. gingivalis* (22% vs il 31%), dimostrandosi anch'esso più presente nelle forme sintomatiche rispetto alle asintomatiche, *A. actinomycetemcomitans* (7% vs lo 0%) trovato solo nelle forme sintomatiche come *T. forsythensis* (7% vs il 20%).

L'esame colturale ha messo in evidenza la presenza anche di altri microrganismi, in particolare *E. faecalis* (93% nelle forme asintomatiche vs il 22% nelle forme sintomatiche), *C. albicans* (64% nelle forme asintomatiche vs il 6% nelle forme sintomatiche), *F. nucleatum* (43% nelle forme sintomatiche vs il 32% nelle forme asintomatiche), come anche *P. intermedia* (26% vs il 21%).

I risultati di questo studio dimostrano che, tra i microrganismi trovati, *T. denticola* è altamente associato a infezioni endodontiche sintomatiche in presenza di riassorbimento osseo periapicale, mentre *E. faecalis* era associato con parodontite apicale cronica e infezioni endodontiche secondarie con fallimento della terapia endodontica. Anche *C. albicans*, associato in tale studio a infezioni asintomatiche, potrebbe rivestire un ruolo importante nella patogenesi delle lesioni endodontiche (6, 7). La presenza di agenti fungini potrebbe anche costituire una complicità e una sovrainfezione ai tessuti pulpari ormai necrotici (post-pulpite) e con ridotta vascolarizzazione. Ulteriori studi dovranno valutare l'importanza clinica di *C. albicans* nell'indurre patologie endodontiche periapicali. Le tecniche di strumentazione e soprattutto d'irrigazione dovranno essere efficaci nel rimuovere completamente l'agente fungino e nel prevenire una eventuale sovrainfezione.

Siqueira, et al hanno dimostrato che *T. denticola* è associata alla presenza di ascessi di origine endodontica, con una positività del 79% (22). Jung, et al., invece non hanno trovato alcuna correlazione tra *T. denticola* e sintomi clinici (11). Studi precedenti hanno ipotizzato inoltre che *T. denticola* potrebbe essere coinvolto nella differenziazione degli osteoclasti durante le infezioni endodontiche, a causa dei fattori di virulenza di cui è dotata (2, 5). *E. faecalis* potrebbe essere presente a bassa concentrazione durante le infezioni endodontiche primarie, potrebbe sopravvivere alla terapia endodontica grazie ai suoi fattori di resistenza e causare una infezione endodontica secondaria (14, 19). Il ruolo di *T. forsythensis* come patogeno specifico della malattia endodontica è di recente dimostrazione (23). Questo batterio appartiene al "complesso rosso" ed è frequentemente isolato da tasche parodontali con profondità \geq di 6 mm (17).

In conclusione, i risultati del presente studio confermano che

determinate specie batteriche sono associate con sintomi e segni clinici specifici della malattia endodontica. *T. denticola* è associato alla presenza di sintomatologia clinica e riassorbimento osseo periapicale, mentre *E. faecalis* è correlato alla presenza di fallimenti della terapia endodontica. Tale studio deve essere di ausilio agli odontoiatri per sapere quali siano i patogeni che più frequentemente sono correlati alle infezioni endodontiche. Questi dati, unitamente a quelli che valutano i livelli delle resistenze per i principali organismi, devono indirizzare le scelte dell'antibiotico-terapia empirica.

BIBLIOGRAFIA

- Baumgartner JC. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. *Endod Topics*, 2004; 7: 35-51.
- Choi BK, Lee HJ, Kang JH, Jeon GJ, Min CK, Yoo YJ. Induction of osteoclastogenesis and matrix metalloproteinase expression by the lipopolysaccharide of *Treponema denticola*. *Infect Immun* 2003; 71: 226-33.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22.
- Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Moller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 134-44.
- Fenno JC, McBride BC. Virulence factors of oral treponemes. *anaerobe* 1998; 4: 1-17.
- Gatti M, Baroni C, Prati C. Isolamento di microrganismi nelle infezioni endodontiche. *Giorn Ital di Consev* 2004; II: 43-4.
- Gatti M, Baroni C, Marchionni S, Prati C. Isolamento di *Candida albicans* nelle patologie endodontiche periapicali. *Giorn Ital di Consev*, 2005; 4:43-44.
- Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endod* 1992; 18: 558-61.
- Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endod* 1987; 13: 24-8.
- Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical eriodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 285-92.
- Jung IY, Choi BK, Kum KY, et al. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod* 2000; 26: 599-604.
- Matsuo T, Shirakami T, Ozaki K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *Endod* 2003; 29: 194-200.
- Oguntebi BR. Dentine tubule infection and endodontic therapy implication. *Int Endod J* 1994; 27: 218-22.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, et al. Evaluation of root canal microorganism isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 100-3.
- Peters LB, Wesselink PR, Buijns JF, Van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001; 27: 76-81.
- Ricucci D, Bergenholtz G. Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries – a histological study of treated cases. *Int Endod J* 2003; 36: 787-802.
- Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assay for *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol Res* 2003; 38: 465-70.
- Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 281-93.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces* species, *Streptococci* and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infection. *J Endod* 2002; 28: 168-72.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN, Oliveira JC, Santos KR. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* 2001; 9: 563-6.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008; 34: 1291-301.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN, Sundquist G. *Treponema* species associated with abscess of endodontic origin. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 336-9.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN. *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. *J Endod* 2003; 29: 390-93.
- Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod* 1992; 18: 422-6.
- Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992; 18: 427-30.
- Van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect Immunol* 1985; 3: 494-7.