

* Marco Capecchi
* Nicola Perrini

* Libero professionista

Corrispondenza:
Dott. Nicola Perrini
Via L. Signorelli, 15/17
51100 Pistoia
Tel. 0573.29068 - Fax 0573.25725

Microbiologia degli insuccessi endodontici. Analisi di 50 casi

Microbiology of endodontic failures. Analysis of 50 cases

RIASSUNTO

Obiettivi: la flora batterica presente nei canali dei denti con insuccesso endodontico differisce da quella dei denti non trattati a polpa necrotica. I canali dei denti necrotici presentano un'infezione polimicrobica in cui predominano i batteri anaerobi obbligati. Al contrario, nei denti già trattati endodonticamente con parodontite apicale persistente, sono presenti solamente una o due specie batteriche. Alcuni studi condotti in Scandinavia hanno osservato un'elevata prevalenza di *Enterococcus faecalis* nei denti con insuccesso endodontico. Questo studio ha lo scopo di determinare le caratteristiche della flora microbica presente nei denti con insuccesso endodontico in una popolazione italiana.

Materiali e metodi: cinquanta denti sono stati selezionati per il ritrattamento. Tutti i denti mostravano l'evidenza radiografica di una lesione periapicale ed erano stati sottoposti a trattamento endodontico almeno due anni prima. Dopo la rimozione del materiale da otturazione dai canali, sono stati eseguiti dei prelievi per la valutazione microbiologica. I prelievi sono stati incubati per quindici giorni in condizioni di anaerobiosi per osservare la crescita batterica e le colonie batteriche isolate sono state analizzate.

Risultati: su 50 denti, una crescita batterica è stata osservata in 35 casi (70%). Sono state isolate complessivamente 23 specie batteriche. Era presente una predominanza di batteri Gram positivi (74%) e di batteri anaerobi facoltativi (61%). Nei denti con coltura positiva, il numero medio di specie batteriche per canale è stato 1.5. Una singola specie batterica si è osservata in 29 casi. In cinque casi erano presenti due specie batteriche e tre specie batteriche sono state osservate in un caso. Nell'ambito dei denti con coltura batterica positiva, l'*Enterococcus fae-*

calis è stato osservato nel 48.5% dei casi.

Conclusioni: in accordo con studi precedenti, nei denti con insuccesso endodontico l'*Enterococcus faecalis* rappresenta la specie batterica di più frequente riscontro.

Parole chiave:

Insuccesso endodontico, ritrattamento, microbiologia.

ABSTRACT

Objective: microbial flora from canals of root filled teeth differs from that present in untreated necrotic dental pulps. Canals of necrotic dental pulp with periapical lesion show a polymicrobial infection in which anaerobic bacteria predominate. On the contrary, in previously root filled teeth with persistent apical periodontitis, only one or few bacteria species are present. Some studies conducted in Scandinavia show an high prevalence of *Enterococcus faecalis* in teeth with endodontic failure. The purpose of this study has been to determine the features of microbial flora present in teeth with endodontic failure in Italian population.

Materials and methods: fifty teeth were selected for re-treatment. All the teeth showed radiographic evidence of periapical lesions and had completed endodontic treatment more than 2 years before. After removal of the obturation material from the canals, samples have been taken for microbiological evaluation. Samples were grown under anaerobic conditions for 15 days to assess microbial growth and the bacterial isolate were analyzed.

Results: bacterial growth was detected from 35 of 50 teeth (70%). The total number of bacterial strain isolated was 23. There was a predominance of Gram positive (74%) and facultative anaerobes (61%). Bacterial species per root canal with bac-

teria were 1.5. A single bacterial species was present in 29 cases. In five cases there were two species and in one case there were three species. Among teeth with bacterial growth, *Enterococcus faecalis* was found in 48.5% of cases.

Conclusions: according to previous studies, in teeth with endodontic failure, the bacteria most commonly isolated was *Enterococcus faecalis*.

Key words:

Endodontic failure, retreatment, microbiology.

INTRODUZIONE

I primi studi sugli aspetti microbiologici degli insuccessi endodontici risalgono agli anni '60, ad opera di ricercatori di scuola scandinava. I classici lavori di Engström nel 1964 e di Möller nel 1966 evidenziarono che, nei canali radicolari dei denti con insuccesso endodontico, le specie batteriche anaerobiche facoltative predominavano rispetto alle forme anaerobiche obbligate (1, 2).

Nello stesso periodo, grazie al progresso nelle tecniche di isolamento batterico in anaerobiosi, aumentarono le conoscenze sulla microbiologia dei denti a polpa necrotica. In particolare, fu dimostrato che in questi denti l'infezione pulpale era causata da una flora batterica mista, in cui i batteri anaerobi obbligati rappresentavano circa il 90% di tutte le specie batteriche coltivabili (3). I dati relativi alle caratteristiche microbiologiche dei denti con insuccesso endodontico passarono in secondo piano, mentre numerosi lavori clinici dimostrarono che la percentuale di successo dei ritrattamenti ortogradi era significativamente inferiore a quella che si aveva nel trattamento endodontico dei denti a polpa necrotica (4, 5, 6, 7).

Classicamente, la minore percentuale di successo che si riscontra nei ritrattamenti è

sempre stata spiegata ricorrendo a giustificazioni di carattere tecnico. Non c'è dubbio che le calcificazioni del canale, la presenza di strumenti rotti, i gradini, le trasposizioni, sono tutti fattori che possono compromettere la buona riuscita dei ritrattamenti ortogradi. Tuttavia in molti studi pubblicati sull'argomento, la valutazione della percentuale di successo dei ritrattamenti era stata fatta su campioni di denti in cui non erano presenti ostacoli tecnici di sorta e in cui era stato possibile portare a termine, in modo apparentemente corretto, il ritrattamento stesso. Se si escludono condizioni cliniche del tutto particolari e piuttosto infrequenti, come le infezioni extraradicolari (8, 9) e le reazioni da corpo estraneo (10), il fallimento della terapia endodontica si associa sempre alla persistenza di batteri nel canale radicolare (11).

Quali sono le cause dell'elevata percentuale d'insuccesso che si osserva nel ritrattamento dei denti già trattati con lesione periapicale? Nel 1998, in un'indagine condotta su 55 casi di insuccesso endodontico sottoposti a ritrattamento, Sundqvist e coll. (7) osservarono che nella maggior parte dei casi l'infezione del canale radicolare, a differenza di quanto avviene nei denti necrotici, era sostenuta da un'unica specie batterica. Nell'ambito delle specie batteriche isolate l'*Enterococcus faecalis* rappresentava la specie batterica di più frequente riscontro, essendo presente nel 38% dei denti con insuccesso endodontico nei quali era stato possibile isolare batteri. È interessante notare che l'*Enterococcus faecalis* normalmente non è presente nei canali radicolari dei denti con polpa necrotica e che, nei ritrattamenti, la frequenza con cui viene isolato sembra essere particolarmente elevata nei denti lasciati aperti fra un appuntamento e l'altro, oppure in quei denti che sono stati trattati in 10 o più sedute. Queste osservazioni sembrano suggerire che l'*Enterococcus faecalis* penetri nel canale radicolare durante il trattamento endodontico quando non vengano osservate le regole dell'asepsi in endodonzia (12).

In ogni caso, una volta penetrato all'interno del canale, l'*Enterococcus faecalis* è in grado di sopravvivere e di moltiplicarsi senza avere il supporto di altre specie batteriche, in un ambiente povero di nutrienti quale è un canale trattato endodonticamente. L'eradicazione dell'*Enterococcus faecalis* dal canale è resa difficile dalla sua elevata resistenza alla preparazione chemio-meccanica del canale e alla medicazione intermedia con

idrossido di calcio (13, 14). Nei ritrattamenti, la persistenza dell'*Enterococcus faecalis* all'interno del canale al momento dell'otturazione con guttaperca si associa a un'elevata percentuale d'insuccesso. Pertanto è probabile che l'*Enterococcus faecalis*, con la sua elevata resistenza al trattamento endodontico convenzionale, sia responsabile della maggiore incidenza degli insuccessi che si osserva nei ritrattamenti (7).

Se questi dati venissero confermati da altri lavori, probabilmente sarebbe necessario sviluppare nuove strategie allo scopo di facilitare l'eradicazione dell'*Enterococcus faecalis* dal canale radicolare migliorando così la prognosi del ritrattamento ortogrado. Questo studio ha lo scopo di verificare le recenti acquisizioni sulla microbiologia degli insuccessi endodontici, tenendo presente che non esistono, nella letteratura in lingua italiana di nostra conoscenza, lavori di questo tipo.

MATERIALI E METODI

In questo studio è stata effettuata l'analisi microbiologica della flora batterica presente nei canali radicolari di 50 denti già trattati endodonticamente con presenza di lesione periapicale. Il campione da noi studiato era rappresentato da 47 denti monoradicolati con un solo canale, da un premolare superiore con due radici e due canali, dalla radice palatina di un molare superiore e dalla radice distale di un molare inferiore, anche questa con un solo canale. Complessivamente sono stati pertanto analizzati 51 canali radicolari. Il campione rappresentato dal premolare superiore a due canali è stato considerato come un campione unico, nel senso che i prelievi, effettuati su entrambi i canali radicolari, sono stati trasferiti in un unico flacone di tioglicollato. Per essere inclusi nello studio, i denti dovevano soddisfare dei requisiti ben precisi. Il primo requisito era ovviamente quello di essere denti già trattati endodonticamente, ma con presenza di una lesione radiotrasparente periapicale con scomparsa della lamina dura. La radiografia preoperatoria è stata eseguita in ogni caso con la tecnica parallela usando pellicole Kodak Ultraspeed montate su centratori di Rinn. Ogni radiografia è stata esaminata indipendentemente da ognuno di noi e il dente è stato incluso nel gruppo di studio solo nel caso in cui entrambi concordassimo nella diagnosi di le-

sione periapicale. Il secondo criterio utilizzato è stato quello di includere nello studio solo quei denti in cui l'otturazione era confinata all'interno del canale radicolare. In altre parole, sono stati esclusi tutti quei denti in cui vi era un'estrusione di materiale da otturazione oltre apice. Allo stesso modo sono stati esclusi tutti i denti con lesione periapicale in cui l'otturazione del canale era eccessivamente corta, essendo distante almeno 5 mm dall'apice radiografico (Fig. 1). Tutti i denti esaminati erano asintomatici, ad eccezione di un caso che è giunto alla nostra osservazione con un ascesso periapicale in atto. In un caso infine (premolare superiore) era presente una fistola.

Prelievo microbiologico

Prima di procedere all'isolamento con diga di gomma, i denti sono stati attentamente esaminati, sia clinicamente sia radiograficamente, allo scopo di stabilire l'integrità della corona clinica e del restauro presente. Le lesioni cariose, se presenti, così come eventuali restauri con scarso adattamento marginale, sono stati rimossi e la corona del dente è stata ricostruita in IRM o in resina composita. In un caso, allo scopo di consentire un perfetto isolamento del dente, si è stati costretti alla ricostruzione preliminare della corona mediante la tecnica dell'anello di rame cementato con ossifosfato di zinco.

Quando necessario, prima di procedere al prelievo microbiologico, il dente in questione è stato curettato allo scopo di rimuovere i depositi di tartaro sopra e sottogengivali. Successivamente la corona del dente è stata lucidata con pasta abrasiva, allo scopo di eliminare i depositi di placca. Anche i denti contigui sono stati sottoposti allo stesso trattamento, nel caso in cui fosse stato necessario includere questi denti nel campo operatorio. Una volta applicata la diga di gomma, la corona del dente, l'uncino e il campo operatorio circostante sono stati disinfettati applicando ripetutamente dei pellet di cotone sterili imbevuti con perossido di idrogeno al 30% per almeno 2 minuti. Successivamente è stata applicata della tintura di iodio al 10% sfregando accuratamente tutte le superfici per 2 minuti e lasciando asciugare la tintura di iodio presente in eccesso. Queste manovre sono state effettuate in accordo con quanto riportato da Möller nel 1966, poiché si sono dimostrate in grado di assicurare la sterilità del campo operatorio (2).

Il controllo del raggiungimento dell'effetti-

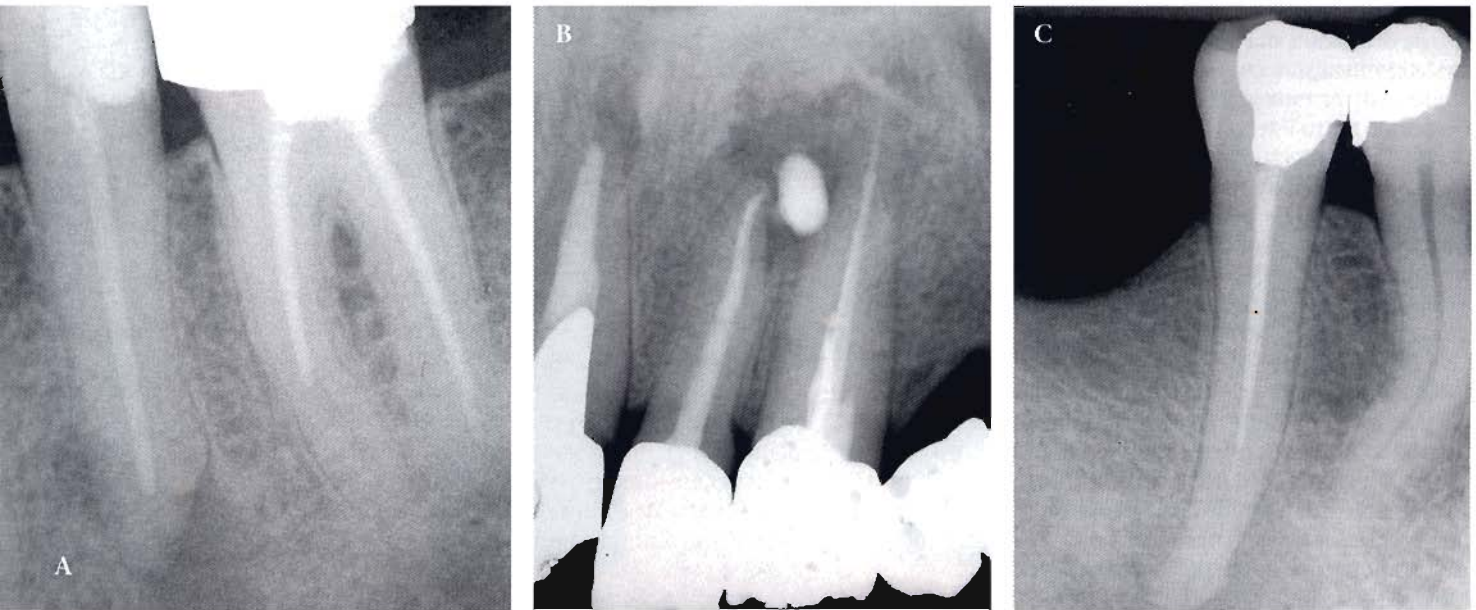


Fig. 1 - A. Esempio radiografico di denti con insuccesso endodontico da noi esaminati (Radice distale 3.6 e 3.5). B. Dente 2.2. Si noti l'ampia radiotrasparenza periapicale associata a estrusione di materiale da otturazione oltre apice. Denti come questi sono stati esclusi dallo studio. C. Dente 4.5. Esempio di insuccesso endodontico che non è stato incluso nello studio per la presenza di una otturazione canalare eccessivamente corta.

va sterilità è stato fatto con un tampone sterile (PBI International) dopo aver inattivato la tintura di iodio con tiosolfato di sodio al 5% per 1 minuto. Il tampone è stato trasferito in tioglicollato e incubato a 35 °C per 7 giorni, allo scopo di evidenziare un'eventuale crescita batterica. Tutti i denti il cui campo operatorio si è rivelato, a posteriori, non sterile, sono stati esclusi dallo studio. Dopo l'apertura della cavità d'accesso le viti o perni endocanalari eventualmente presenti sono stati rimossi avvalendosi, nel caso, di strumenti a ultrasuoni. Il materiale da otturazione canalare è stato eliminato con frese di Gates Glidden e con files di tipo Hedström (Girofiles), azionati manualmente o montati su micromotore (Giro-matic, MicroMega Besançon, Francia). Durante la rimozione del materiale da otturazione canalare si è evitato di utilizzare il cloroformio o qualsiasi altro solvente della guttaperca, poiché è noto che l'attività battericida di questi composti può alterare le caratteristiche della flora batterica presente all'interno del canale (12, 15). Una volta rimosso il materiale da otturazione, si è determinata radiograficamente la lunghezza di lavoro e il canale è stato strumentato all'apice radiologico usando K files (Flexo-file Maillefer, Ballaigues, Svizzera) fino allo strumento numero 30, senza eseguire alcuna irrigazione.

Primo prelievo

Dopo aver raggiunto la lunghezza di lavoro, il canale è stato riempito con soluzione di Ringer sterile (Oxoid S.p.A. Garbagnate, MI, Italia), avendo cura di non far defluire il liquido al di fuori della cavità d'accesso. La soluzione di Ringer è stata distribuita per tutta la lunghezza del canale, utilizzando uno strumento numero 30 portato ripetutamente alla lunghezza di lavoro. Il canale è stato successivamente asciugato con coni di carta sterili di dimensione fine o medium (Mynol), che sono stati trasferiti immediatamente in un primo flacone contenente 9 ml di tioglicollato (flacone 1.a). A questo punto, il canale è stato di nuovo riempito con soluzione di Ringer sterile ed è stata ripetuta l'intera procedura, ottenendo in questo modo un secondo prelievo (flacone 1.b). Complessivamente, per ciascun prelievo sono stati impiegati cinque coni di carta in successione. Una volta inserito all'interno del canale, al cono è stato impresso un leggero movimento di va e vieni allo scopo di favorire la diffusione della soluzione di Ringer all'interno del canale, e il suo completo assorbimento, in accordo con quanto riportato da Dahlén e Möller (16). I coni di carta sono stati inseriti nel canale, e da qui trasferiti in tioglicollato usando delle pinzette sterili.

Il tioglicollato è stato scelto perché è un mez-

zo di coltura liquido dotato di un elevato potere riducente, che lo rende idoneo a supportare la crescita anche di microrganismi anaerobi esigenti. L'agar è stato aggiunto allo scopo di ridurre la diffusione dell'ossigeno, migliorando in questo modo le caratteristiche anaerobiche del mezzo (17).

Al termine del prelievo, un pellet di cotone sterile è stato posizionato sull'imbocco del canale, mentre la cavità d'accesso è stata otturata con IRM (Dentsply Detrey, Konstanz, Germania). Il canale è stato lasciato vuoto, allo scopo di consentire ai batteri eventualmente presenti di moltiplicarsi. Dopo una settimana, il paziente è stato rivisto per effettuare il secondo prelievo.

Secondo prelievo

In occasione del secondo appuntamento, il dente è stato di nuovo isolato con la diga di gomma e il campo operatorio sterilizzato secondo le modalità già descritte in precedenza. Dopo la rimozione del materiale da otturazione provvisoria, il canale è stato di nuovo riempito con soluzione di Ringer sterile fino all'imbocco e strumentato delicatamente con un file numero 30 fino alla lunghezza di lavoro. È stato quindi effettuato un secondo prelievo (flacone 2.a). Anche in questo caso, la manovra è stata ripetuta ottenendo in questo modo un secondo flacone (flacone 2.b).

Esame culturale

I prelievi ottenuti dal canale radicolare sono stati immediatamente inviati al nostro laboratorio di microbiologia per la semina, che è avvenuta entro il tempo massimo di un'ora dalla loro raccolta. Dei quattro flaconi di tioglicollato ottenuti complessivamente da ciascun canale, il flacone 1.b e il flacone 2.b sono stati utilizzati come *backup* e sono stati incubati a 35 °C per almeno 10 giorni e ispezionati quotidianamente per evidenziare un'eventuale crescita batterica. I flaconi 1.a e 2.a sono stati invece utilizzati per la semina su piastre di agar sangue di Schaedler (Oxoid S.p.A). Tutte le procedure di semina sono state condotte all'interno di una cappa biologica Biohazard di classe II a flusso laminare (International PBI, Milano - Italia), a protezione dell'operatore e per evitare contaminazioni ambientali del campione. Prima della semina, i flaconi sono stati agitati meccanicamente con un vortex fino ad ottenere il completo dissolvimento dei coni di carta. Alle provette di tioglicollato destinate alla semina, sono state aggiunte delle sfere di vetro sterili per facilitare la completa miscelazione del campione durante il suo agitazione. Successivamente, diverse aliquote standard di tioglicollato (0.1 microL) sono state seminate su Schaedler agar e incubate in condizioni di anaerobiosi (AnaeroGen Compact, Oxoid) per 15 giorni. All'interno delle buste AnaeroGen Compact, un indicatore di anaerobiosi ha permesso di monitorare l'assenza dell'ossigeno nell'atmosfera d'incubazione.

A partire dal tioglicollato, sono state preparate delle diluizioni seriate di 10^{-2} e di 10^{-4} in PBS sterile (Oxoid). Aliquote di 0.1 microL delle diluizioni sono state seminate e incubate con le stesse modalità descritte precedentemente. I reperti microbiologici sono stati considerati negativi solo in caso di mancata crescita nei flaconi di *backup* di brodo tioglicollato e in agar Schaedler dopo un'incubazione di almeno 15 giorni (Fig. 2). Aliquote di 0.1 microL dei flaconi di tioglicollato non utilizzati per la semina e con presenza di crescita batterica sono stati colorati con il metodo di Gram per confermare la morfologia batterica rilevata nei corrispondenti campioni con crescita positiva su piastra. In caso di discordanza, aliquote standard di questi flaconi e le rispettive diluizioni seriate sono state seminate allo scopo di isolare le colonie batteriche non evidenziate nelle colture su piastra. Allo stesso modo, aliquote di 0.1 microL dei flaconi di *backup*, e le loro diluizioni seriate, sono sta-

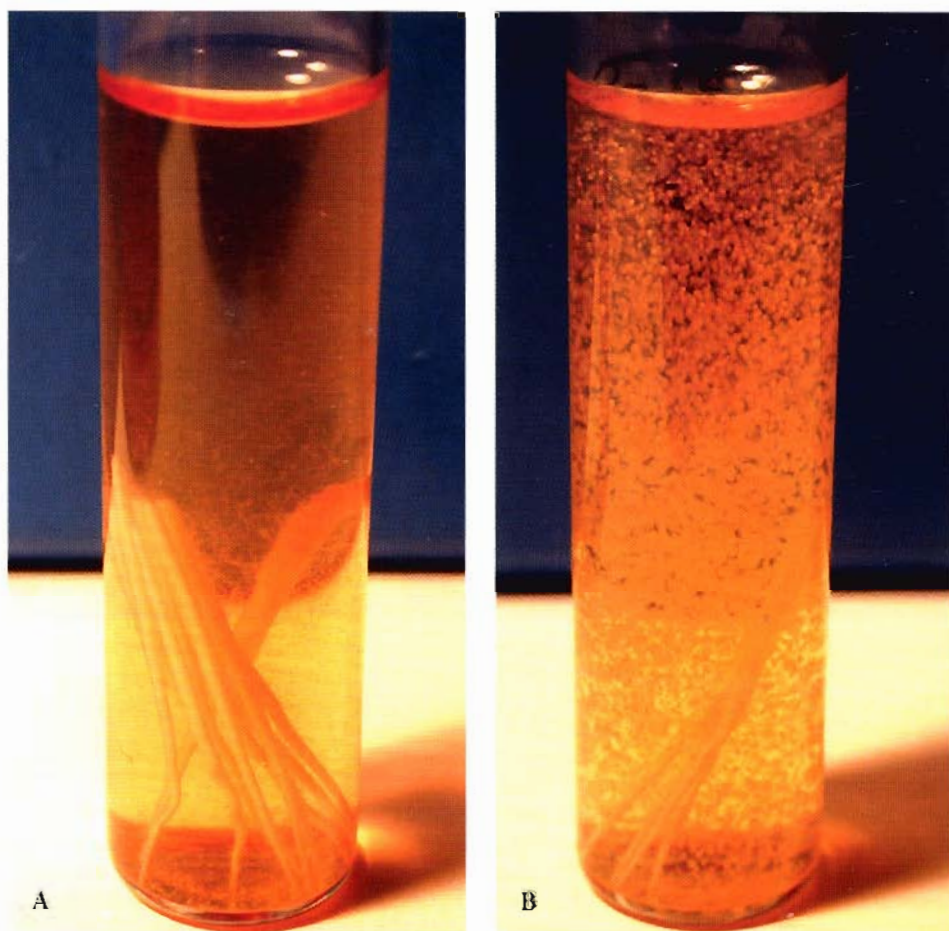


Fig. 2 - Prelievo in tioglicollato addizionato ad agar. Esempio di campione negativo (A) e di campione positivo (B) dopo incubazione per 15 giorni a 35°C.

te seminate su piastre di Schaedler agar nel caso in cui i corrispondenti campioni precedentemente seminati su piastra avessero dato una crescita negativa.

In ogni caso, dopo la crescita su piastra le colonie sono state isolate allo scopo di effettuare un'identificazione a livello di specie. L'identificazione presuntiva delle colonie batteriche è stata fatta in base alla loro morfologia, alla colorazione di Gram, al test della catalasi, dell'indolo, dell'ossidasi, dell'aerotolleranza e alla crescita su terreni selettivi. Tra questi sono stati impiegati lo Slanetz Bartley Agar per gli enterococchi, il MacConkey Agar per i batteri Gram negativi fermentanti e non fermentanti, il Mannitol Salt Agar per gli stafilococchi e lo Schaedler Selective Blood Agar (Oxoid) addizionato con kanamicina e vancomicina per i batteri anaerobi Gram negativi. Per l'identificazione presuntiva dei batteri anaerobi obbligati, sono stati utilizzati anche tre dischi impregnati, rispettivamente, con co-

listina 10 µg kanamicina 1000 µg e vancomicina 5 µg (Oxoid). Le aree d'inibizione superiori ai 10 mm indicano la sensibilità del ceppo all'antibiotico impiegato.

L'identificazione definitiva, invece, è stata ottenuta attraverso una serie di reazioni biochimiche condotte su un sistema miniaturizzato a base di substrati fluorogeni e cromogeni. In particolare, è stato impiegato il *Gram-Positive Identification System* (BBL Crystal) per i batteri Gram positivi, l'*Enteric/Non-fermenter Identification System* (BBL Crystal) per i batteri Gram negativi fermentanti e non fermentanti, e il *Anaerobe Identification System* (BBL Crystal) o il *RapID ANA II* per i batteri anaerobi obbligati (18).

RISULTATI

Su un totale di 50 denti studiati, 35 hanno

caso 1. <i>E. faecalis</i> (4.5)	caso 26. <i>E. faecalis</i> (4.4)
caso 2. <i>E. faecalis</i> (2.5)	caso 27. <i>S. gordonii</i> (1.1)
caso 3. <i>E. faecalis</i> (2.1)	caso 28. <i>E. faecalis</i> (4.6 radice distale)
caso 4. <i>S. epidermidis</i> (1.1)	caso 29. <i>E. faecalis</i> (3.2)
caso 5. NEGATIVO (3.4)	caso 30. <i>E. faecalis</i> (1.2)
caso 6. <i>P. magnus</i> + <i>P. intermedia</i> (3.1)	caso 31. <i>E. faecalis</i> (1.1)
caso 7. NEGATIVO (1.2)	caso 32. NEGATIVO (4.5)
caso 8. <i>S. oralis</i> (4.1)	caso 33. NEGATIVO (1.3)
caso 9. NEGATIVO (1.1)	caso 34. NEGATIVO (4.5)
caso 10. <i>E. faecalis</i> (2.3)	caso 35. NEGATIVO (2.1)
caso 11. <i>E. faecalis</i> (3.5)	caso 36. <i>E. faecalis</i> (2.3)
caso 12. NEGATIVO (3.1)	caso 37. <i>S. vestibularis</i> (3.2)
caso 13. NEGATIVO (4.4)	caso 38. <i>S. epidermidis</i> (3.4)
caso 14. NEGATIVO (1.1)	caso 39. <i>B. capellousos</i> (4.4)
caso 15. NEGATIVO (1.3)	caso 40. <i>S. agalactiae</i> (2.3)
caso 16. NEGATIVO (3.5)	caso 41. <i>E. faecalis</i> +
caso 17. NEGATIVO (3.5)	<i>L. lactis ssp cremoris</i> (1.1)
caso 18. <i>E. faecalis</i> (1.5)	caso 42. NEGATIVO (1.1)
caso 19. <i>E. faecalis</i> (2.2)	caso 43. NEGATIVO (1.2)
caso 20. <i>P. buccae</i> + <i>P. micros</i> +	caso 44. <i>A. viscosus</i> + <i>S. sanguis</i> (2.4)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (3.4)	caso 45. <i>C. gracilis</i> + <i>C. septicum</i> (3.3)
caso 21. <i>S. vestibularis</i> (4.1)	caso 46. <i>S. anginosus</i> (1.1)
caso 22. <i>E. faecalis</i> (4.1)	caso 47. <i>E. coli</i> + <i>P. pentosaceus</i> (3.5)
caso 23. <i>S. intermedius</i> (3.3)	caso 48. <i>E. faecalis</i> (1.2)
caso 24. <i>E. faecalis</i> (1.3)	caso 49. <i>E. faecium</i> (2.2)
caso 25. <i>S. constellatus</i> (3.2)	caso 50. <i>S. vestibularis</i> (2.2)

Tab. 1. Lista dei 50 casi studiati. (Tra parentesi il dente in esame).

Specie batteriche	Casi
<i>Enterococcus faecalis</i>	17
<i>Streptococcus vestibularis</i>	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Enterococcus faecium</i>	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1
<i>Streptococcus intermedius</i>	1
<i>Streptococcus constellatus</i>	1
<i>Streptococcus gordonii</i>	1
<i>Streptococcus oralis</i>	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	1
<i>Streptococcus sanguis</i>	1
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1
<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>	1
<i>Clostridium septicum</i>	1
<i>Actinomyces viscosus</i>	1
<i>Peptostreptococcus micros</i>	1
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1
<i>Prevotella intermedia</i>	1
<i>Prevotella buccae</i>	1
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1
<i>Campylobacter gracilis</i>	1
<i>Bacteroides capellousus</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1

Tab. 2 - Specie batteriche isolate in 35 denti con insuccesso endodontico dopo la rimozione del materiale da otturazione.

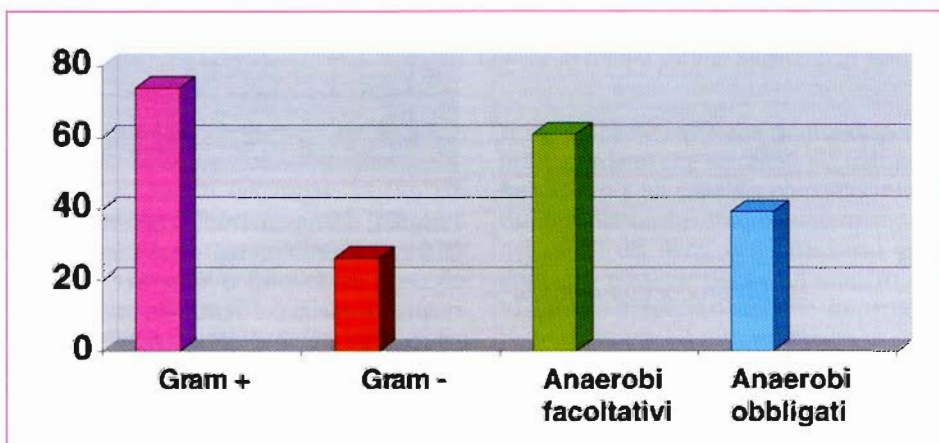


Fig. 3 - Isolamento in base alla colorazione di Gram e alla tolleranza dell'ossigeno.

dato una coltura positiva e 15 una coltura negativa (Tab. 1). Le specie batteriche identificate nei campioni positivi sono elencate nella Tabella 2 e compaiono in ordine di fre-

quenza decrescente iniziando dai batteri Gram positivi e finendo con quelli Gram negativi. Complessivamente, sono state isolate 23 specie batteriche diverse. Di queste, 14

erano rappresentate da batteri anaerobi facoltativi (61%) e 9 da batteri anaerobi obbligati (39%). I batteri Gram positivi rappresentavano il 74% e i Gram negativi il 26% delle specie batteriche isolate dai canali radicolari (Fig. 3).

Dei 35 denti in cui si è avuta una crescita batterica positiva, in ben 29 casi (83%) si trattava di una monoinfezione, essendo presente un'unica specie batterica. Nei 6 denti in cui sono state isolate più specie batteriche, in 5 casi vi erano due specie batteriche, mentre tre specie batteriche sono state isolate in un solo caso (Fig. 4).

In media, prendendo in considerazione i denti in cui è stato possibile evidenziare una crescita batterica, da ciascun canale sono state isolate 1.5 specie batteriche.

Complessivamente, dei 35 denti in cui è stato possibile evidenziare una crescita batterica positiva, ben 17 (48.5% dei casi) erano infettati con l'*Enterococcus faecalis*, mentre

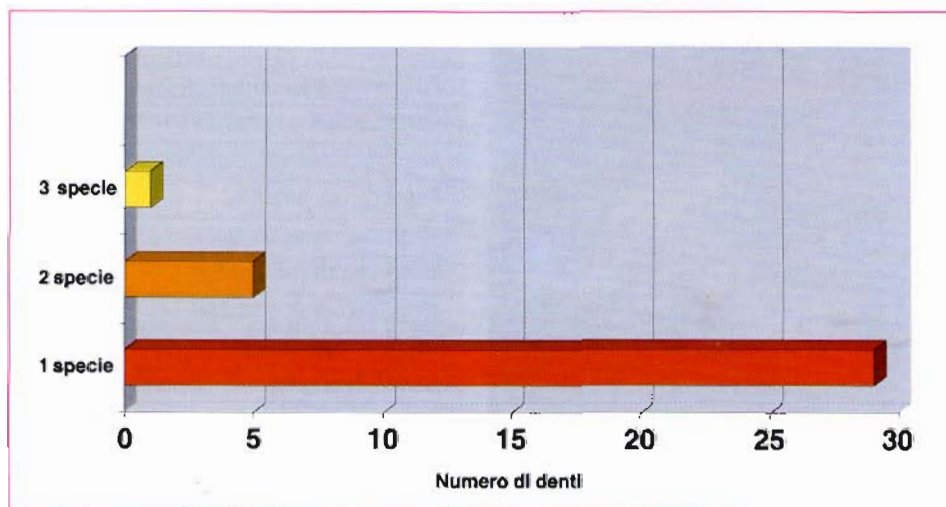


Fig. 4 - Numero di specie batteriche isolate da ciascun canale radicolare.

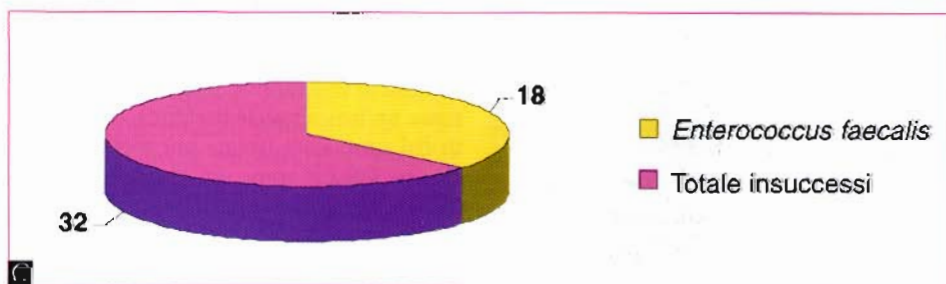
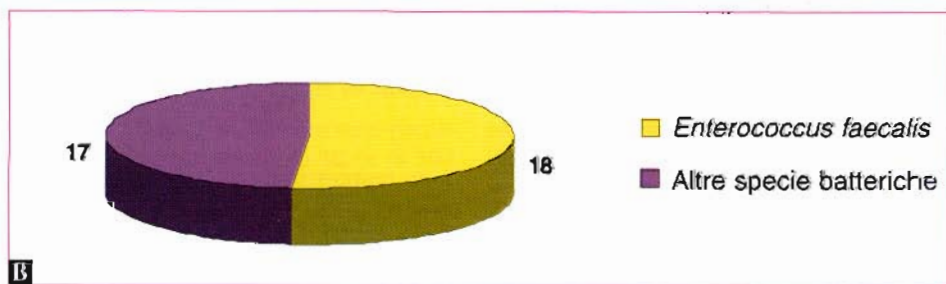
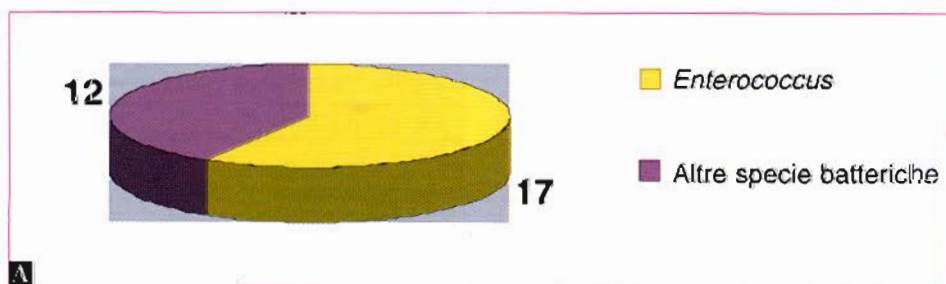


Fig. 5 - Specie batteriche isolate.

A. Numero di denti con infezione da *Enterococcus* (*E. faecalis* + *E. faecium*) rispetto al numero di denti con monoinfezione.

B. Denti con infezione da *Enterococcus faecalis* rispetto ai denti con coltura positiva.

C. Numero di denti con infezione da *Enterococcus* (*E. faecalis* + *E. faecium*) in relazione al numero complessivo degli insuccessi.

considerando il genere *Enterococcus* la percentuale arrivava a 51%. In 16 casi, l'*Enterococcus faecalis* era l'unica specie batterica presente nel canale radicolare, mentre in un caso dal canale radicolare è stato isolato anche il *Lactococcus lactis ssp cremoris*. Prendendo in considerazione anche i denti in cui è stata ottenuta una crescita negativa, batteri del genere *Enterococcus* (*E. faecalis* o *E. faecium*) sono stati isolati nel 36% dei denti con insuccesso endodontico. Nell'ambito dei denti con monoinfezione, nel 58.6% dei casi l'infezione era sostenuta dal genere *Enterococcus* (*E. faecalis* e *E. faecium*) (Fig. 5).

In due casi la crescita batterica è stata osservata nei flaconi ottenuti nel corso del primo prelievo, ma non in quelli del secondo prelievo. Al contrario, tre casi erano negativi al primo prelievo, ma diventavano positivi dopo una settimana in occasione del secondo prelievo. La carica batterica era comunque bassa, inferiore a 10^2 CFU/ml.

Un dente incluso nello studio presentava al momento del primo prelievo un ascesso periapicale. Dal canale di questo dente sono state isolate colonie di *Prevotella buccae*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium nucleatum*. In questo caso non sono disponibili i risultati del secondo prelievo, poiché il dente è stato lasciato aperto per qualche giorno allo scopo di consentire il drenaggio del pus. L'unico premolare superiore con due radici e due canali incluso in questo studio presentava una fistola. Dai due canali di questo dente sono state isolate colonie di *Actinomyces viscosus* e di *Streptococcus sanguis*.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati del nostro studio confermano che la flora batterica presente nei denti con insuccesso endodontico differisce marcatamente da quella dei denti necrotici. Un numero relativamente elevato di specie batteriche presenti nella cavità orale è in grado di colonizzare il canale dei denti con polpa necrotica, determinando in questo modo la comparsa di una lesione periapicale. Numerosi studi microbiologici hanno dimostrato che in un dente necrotico con lesione periapicale sono presenti in media da tre a sei specie batteriche diverse, la maggior parte delle quali è costituita da anaerobi obbligati. Spesso siamo di fronte a delle vere e

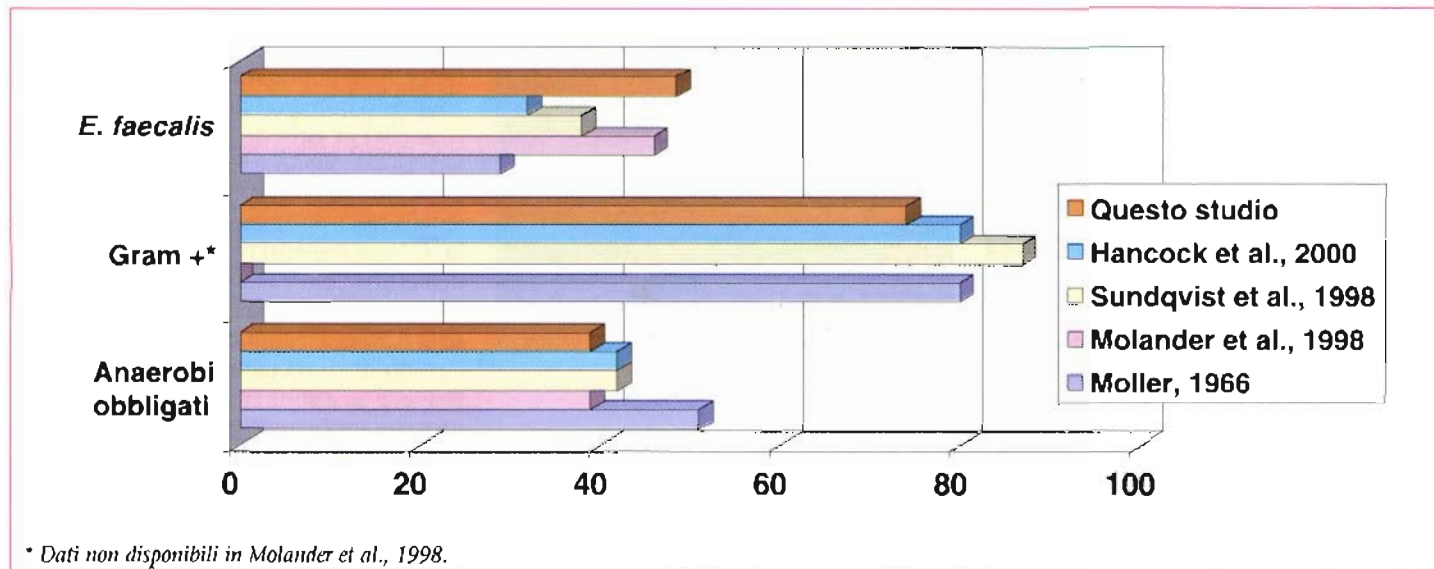


Fig. 6 - Analisi comparativa della flora batterica negli insuccessi endodontici.

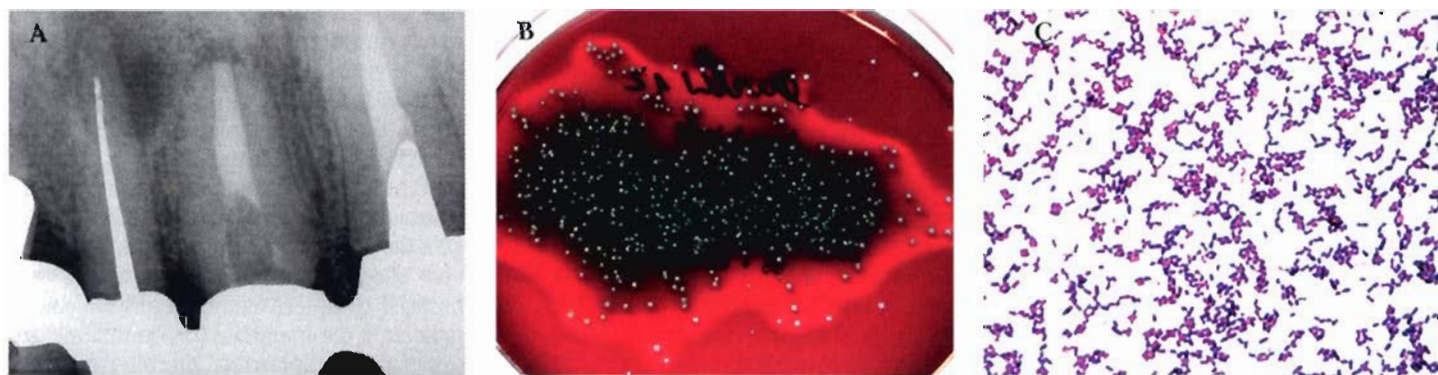


Fig. 7 - A. Caso numero 30 (dente 1.2) e caso numero 31 (dente 1.1). Nel dente 1.2 il canale era stato obturato con un cono d'argento, mentre il canale dell'1.1 era stato obturato con guttaperca. In entrambi i casi era presente una monoinfezione da *Enterococcus faecalis*. B. Caso numero 30 (dente 1.2). Schaedler agar incubato in anaerobiosi. Colonie in coltura pura di *Enterococcus faecalis*. C. *Enterococcus faecalis*. Colorazione di Gram.

proprie comunità batteriche che traggono un reciproco vantaggio dalla loro stessa coesistenza all'interno del canale (3,19). Un classico lavoro di Fabricius e coll. (20), condotto su denti di scimmia infettati selettivamente con colture batteriche pure, dimostra per esempio che quando il *Bacteroides oralis* (oggi denominato *Prevotella oralis*) viene immesso all'interno del canale come unica specie batterica, non è in grado da solo di colonizzare il canale radicolare e non può pertanto essere rilevato in un prelievo successivo. Lo stesso microorganismo, al contrario, diventa capace di colonizzare l'endodonto qualora venga inoculato in associazione ad altre specie batteriche. La situazione è notevolmente diversa nei denti con insuccesso endodontico in rela-

zione probabilmente alla ridotta disponibilità di nutrienti che un canale già trattato offre rispetto a un canale a polpa necrotica. I risultati del nostro studio confermano che nei canali dei denti con insuccesso endodontico è possibile isolare un numero molto limitato di specie batteriche. In particolare, in questi casi il numero medio di specie batteriche isolate in ogni canale varia da 1.5 del presente studio a 1.7 dello studio di Molander e coll. (12) e di Hancock e coll. (21). In accordo con quanto riportato in letteratura (7, 12, 21, 22), anche nel nostro studio è stata osservata una maggiore prevalenza di batteri Gram positivi e di batteri anaerobi facoltativi (Fig. 6). I risultati del nostro studio confermano che l'*Enterococcus faecalis* rappresenta la specie

batterica di più comune riscontro nei denti con insuccesso endodontico (Fig. 7). Nell'uomo questo microorganismo è un ospite abituale del tratto gastrointestinale e fa parte della normale flora batterica della cavità orale, ma raramente si osserva nei denti a polpa necrotica non trattati. Si ritiene che l'*Enterococcus faecalis* penetri nel canale radicolare durante le varie fasi del trattamento endodontico, qualora non vengano rispettate le regole dell'asepsi, oppure nel periodo che intercorre tra una seduta e la successiva in presenza di una chiusura temporanea non ermetica. Indubbiamente, il fatto che questo microorganismo sia particolarmente frequente in quei denti che sono stati trattati endodonticamente in un numero elevato di sedute successive (12), sembra av-

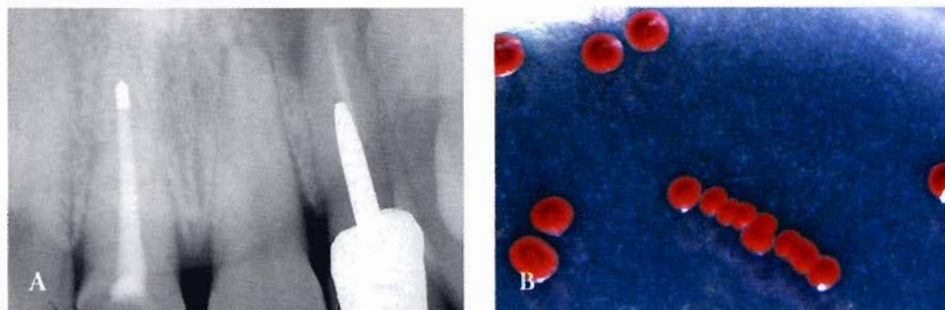


Fig. 8 - A. Caso numero 49 (dente 2.2). Monoinfezione da *Enterococcus faecium*. B. Colonie di *Enterococcus faecium* su Slanetz-Bartley Agar.

valorare questa ipotesi. Se così fosse, la maggiore frequenza di isolamento dell'*Enterococcus faecalis* osservata in questo studio, rispetto ad altri lavori condotti in Scandinavia, potrebbe essere giustificata dalla scarsa diffusione della diga di gomma nel nostro paese. In generale quando presente, l'*Enterococcus faecalis* rappresenta l'unica specie batterica che può essere isolata dal canale radicolare (7). I risultati del nostro studio confermano questa osservazione, tanto che l'associazione tra *Enterococcus faecalis* e un'altra specie batterica (*Lactococcus lactis* ssp *cremoris*) è stata osservata in un solo caso. I nostri dati differiscono in tal senso da quelli riportati da Peciulienė e coll. (22) i quali, in uno studio condotto su 25 casi di insuccesso endodontico, hanno riscontrato l'associazione tra *Enterococcus faecalis* ed altre specie batteriche in ben 9 casi.

Dal canale radicolare di un caso di insuccesso endodontico era presente una monoinfezione sostenuta dall'*Enterococcus faecium*. Per quanto è a nostra conoscenza è la prima volta che questo microrganismo viene isolato dai canali radicolari di denti con insuccesso endodontico (Fig. 8).

A differenza di quanto riportato da Molander e coll. (12), nel nostro studio l'incidenza di enterobatteri all'interno dei canali di denti con insuccesso endodontico è stata molto bassa. In particolare nella nostra casistica, la presenza di enterobatteri è stata osservata solo in un caso (Caso 47: *Escherichia coli* + *Pediococcus pentosaceus*), a differenza di quanto riportato da Molander e coll. dove, su un totale di 117 specie batteriche, gli enterobatteri sono stati isolati in 15 casi.

Per quanto è a nostra conoscenza, il *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* e il *Pediococcus pentosaceus* (isolati, rispettivamente, nel caso 41 e nel caso 47) non sono mai stati isolati in precedenza in analoghi lavori condotti su denti con insuccesso endodontico. Si tratta

di due batteri Gram positivi, anaerobi facoltativi, di comune riscontro nei campioni clinici in medicina generale, soprattutto a partire dagli anni Ottanta. Sebbene la loro importanza clinica non sia ancora stata del tutto chiarita, sia il *Pediococcus* sia il *Lactococcus* possono essere causa di setticemia e di endocardite (23).

Nell'unico dente con ascesso periapicale in atto da noi osservato, sono state isolate colonie di *Prevotella buccae*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium nucleatum*. La concomitante presenza di queste specie batteriche all'interno del canale radicolare sembra essere correlata positivamente alla presenza di segni e sintomi clinici come dolore, edema e raccolta di pus (24).

Da sottolineare che nel nostro studio, non in tutti i denti è stato possibile documentare una crescita batterica. In particolare, una coltura positiva è stata osservata nel 70% dei casi, mentre nel 30% dei casi la coltura è stata negativa, nonostante fosse presente una lesione periapicale. Le percentuali di positività osservate in questo lavoro sono perfettamente coincidenti con quelle riportate da Molander e coll. (12), ma superiori a quelle riportate da Sundqvist e coll. (7) (44.4%), da Engström (1) (38%), da Möller (2) (57%) e da Hancock e coll. (21) (61%).

Resta il fatto che nei denti con insuccesso endodontico la percentuale dei denti con coltura negativa è piuttosto alta, oscillando dal 30%, nel nostro studio, al 62% nel lavoro di Engström (1). È possibile che, almeno in parte, l'incidenza relativamente elevata di colture negative sia dovuta alla presenza di falsi negativi. Nel lavoro di Molander e coll. (12), per esempio, è stato osservato che nei denti in cui era stato impiegato del cloroformio durante la rimozione del materiale da otturazione, la percentuale di colture positive era sensibilmente inferiore rispetto ai denti in cui non era stato usato il clo-

roformio o altri solventi per il materiale da otturazione canalare. Del resto, il cloroformio è stato impiegato per molti anni come additivo a numerosi prodotti farmaceutici o cosmetici in virtù della sua azione antibatterica (15). Sebbene nel nostro lavoro non siano mai stati impiegati dei solventi della guttaperca, è possibile che la guttaperca stessa, o i vari cementi che sono stati utilizzati nell'otturazione canalare, abbiano interferito nei risultati del prelievo, inibendo la crescita batterica. Sappiamo, per esempio, che l'ossido di zinco presente nella guttaperca possiede un'azione antibatterica e, del resto, sostanze antibatteriche sono presenti anche in molti cementi canalari (25).

L'esposizione dei microrganismi a una sostanza antibatterica al momento del prelievo può alterare i risultati, determinando la comparsa di falsi negativi. Proprio per questo motivo, i test *in vitro* condotti per valutare l'attività di un disinfettante prevedono sempre, qualora sia disponibile, l'impiego di un inattivatore specifico prima di seminare i campioni nei terreni di coltura (26). Poiché non esistono inattivatori specifici della guttaperca, né tanto meno dei vari cementi radicolari, è possibile che in alcuni casi i residui di cemento e di guttaperca presenti nel canale al momento del prelievo abbiano inibito la crescita batterica, dando luogo a dei falsi negativi. D'altra parte è anche vero che se questo meccanismo fosse operante, il completo svuotamento del canale radicolare dal materiale da otturazione, insieme al fatto di lasciare vuoto il canale per una settimana prima di procedere al secondo prelievo, dovrebbe aumentare la sensibilità delle procedure culturali nel rilevamento di una carica batterica all'interno del canale. In effetti, in tre dei nostri campioni, il primo prelievo aveva dato un esito negativo, mentre una crescita batterica, sia pure modesta, è stata osservata in occasione del secondo prelievo.

Per spiegare la minore frequenza di colture positive nei denti con insuccesso endodontico rispetto ai necrotici non trattati, esistono anche altre possibilità. Per esempio è possibile che in alcuni insuccessi endodontici, la carica batterica presente nel canale sia talmente bassa da sfuggire alla nostra rilevazione. Inoltre, i batteri potrebbero in alcuni casi trovarsi in zone non raggiungibili dalle attuali tecniche di prelievo microbiologico, come per esempio i tubuli dentinali, oppure nelle complesse ramificazioni del sistema endodontico.

Recentemente è stato dimostrato che nu-

merose specie batteriche, e tra queste l'*Enterococcus faecalis*, possono in alcune circostanze perdere temporaneamente la capacità di proliferare, entrando in una condizione fisiologica definita con il termine di stato "dormiente". In genere, questa condizione metabolica si verifica in risposta a stimoli ambientali come gli stress sub-letali o la permanenza in un ambiente particolarmente povero, se non del tutto privo, di nutrienti. I batteri che entrano in stato dormiente, pur

rimanendo vitali, perdono completamente la capacità di proliferare nel terreno di coltura, a meno che non vengano sottoposti a una complessa fase preliminare di "resuscitazione" che prevede, per esempio, l'immersione per 7-10 giorni in siero umano fresco a 37°C e in continua agitazione (27,28). Esiste quindi la possibilità che i batteri presenti nei canali radicolari di alcuni insuccessi endodontici, a causa della ridotta disponibilità di nutrienti, entrino in uno stato dor-

mente sfuggendo in questo modo alle attuali tecniche di rilevamento batterico, che si basano sulla loro capacità proliferativa *in vitro*.

I risultati del nostro studio confermano in ogni caso la notevole diversità, sotto il profilo microbiologico, tra i denti infetti a polpa necrotica e i denti con insuccesso endodontico, e la stretta associazione tra fallimento endodontico e infezione da *Enterococcus faecalis*.

BIBLIOGRAFIA

- Engström B. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontologisk Revy* 1964; 15: 87-106.
- Möller AJR. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontologisk Tidskrift* 1966; 74 (special issue):1-380.
- Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. *Dissertation. Umea, Sweden: University of Umea*, 1976.
- Strindberg LZ. The dependence of the results of pulp therapy on certain factors. An analytical study based on radiographic and clinical follow-up examination. *Dissertation. Acta Odontologica Scandinavica* 1956; 14 (suppl. 21): 1-174.
- Engström B, Hard AF, Segerstad L, Ramström G, Frostell G. Correlation of positive cultures with the prognosis for root canal treatment. *Odontologisk Revy* 1964; 15: 257-270.
- Sjögren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990; 16: 498-504.
- 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.
- Sjögren U, Häppönen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G. Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. *Int Endod J* 1988; 21: 277-282.
- Nair PNR, Schroeder HE. Periapical actinomycosis. *J Endod* 1984; 10: 567-570.
- Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Sundqvist G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the apex of a root-filled human tooth. *J Endod* 1990; 16: 589-595.
- Nair PNR, Sjögren U, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990; 16: 580-88.
- Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31: 1-7.
- Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985; 1: 170-75.
- Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66: 1375-79.
- Lynch M, Lund W, Wilson DA. Chloroform as a preservative in aqueous system. Losses under "in-use" conditions and antimicrobial effectiveness. *Pharmaceutical Journal* 1977; 219: 507-10.
- Dahlén G, Möller AJR. Microbiology of endodontic infection." In Contemporary oral microbiology and immunology, Mosby Year Book, 1992.
- Carlsson J, Sundqvist G. Evaluation of methods of transportation and cultivation of bacterial specimens from infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1980; 49: 451-4.
- Cavallaro JJ, Wiggs LS, Miller JM. Evaluation of the BBL Crystal Anaerobe identification System 2. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3186-3191.
- Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 522-30.
- Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied time of closure. *Scand Dent Res* 1982; 90: 200-6.
- Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 579-86.
- 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: 593-5.
- Ruoff KL. *Leuconostoc, Pediococcus, Stomatococcus, and miscellaneous Gram positive cocci that grow aerobically*. In: Murray PR. Manual of clinical microbiology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. 1995; 315-23.
- Dahlén G, Haapasalo M. Microbiology of apical periodontitis. In: Ørstavik D. e Pitt Ford T.R. Essential Endodontology. Oxford: Blackwell Science. 1998: 106-130.
- Pascon EA, Spangberg LSW. In vitro cytotoxicity of root canal filling materials. *J Endod* 1990; 16: 429-33.
- Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Evaluation of antibacterial and antifungal efficacy. In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford: Blackwell Science. 1999: 124-167.
- Kell DB, Young M. Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Current Opinion in Microbiology* 2000; 3: 238-243.
- Del Mar Lleo M, Tafi MC, Canepari P. Non-culturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. *System Appl Microbiol* 1998; 21:333-339.