

## Comparison of Total Anaerobic Microbiota in Periodontitis Before and After the Subgingival Irrigation with Chlorhexidine at 0.12 %

Comparación de la Microbiota Anaerobia Total en Periodontitis antes y Después de la Irrigación Subgingival con Clorhexidina al 0,12 %

Lorena Mejías<sup>1</sup>; Diego Iriarte<sup>1</sup>; Rodolfo Sánchez<sup>1</sup>; Iván Neira<sup>2</sup> & Joel Bravo<sup>1</sup>

MEJÍAS, L.; IRIARTE, D.; SÁNCHEZ, R.; NEIRA, I. & BRAVO, J. Comparison of total anaerobic microbiota in periodontitis before and after the subgingival irrigation with chlorhexidine at 0.12 %. *Int. J. Odontostomat.*, 13(4):442-445, 2019.

**RESUMEN:** El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la irrigación subgingival de la clorhexidina 0,12 % sobre la microbiota anaeróbica total. Se tomaron muestras microbiológicas a 30 sujetos con periodontitis estadio II grado B, en sacos periodontales con una profundidad de sondaje > 4 mm. Se realizó la irrigación subgingival con 5 mL de clorhexidina en el grupo test y con 5 mL de agua destilada en el grupo control. 24 horas después del procedimiento se obtuvo una segunda muestra a comparar. Se detectó que la irrigación subgingival con clorhexidina al 0,12 % logra disminuir en forma estadísticamente significativa la microbiota anaeróbica total ( $p < 0,05$ ).

**PALABRAS CLAVE:** clorhexidina, irrigación terapéutica, periodontitis

### INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad infecciosa (Albandar, 2002) que se caracteriza por producir la pérdida de los tejidos duros y blandos que rodean al diente (Flemmig, 1999). Es una enfermedad altamente prevalente a nivel mundial (Dye, 2012) y la segunda causa de pérdida dentaria (Gamonal *et al.*, 1998). Su factor de riesgo más importante es la presencia de biofilm subgingival, el que está compuesto por anaerobios Gram negativos, entre ellos *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* (Feres *et al.*, 2004).

El tratamiento periodontal consiste en la implementación de hábitos de higiene oral por parte del paciente y la eliminación mecánica profesional de la biopelícula microbiana subgingival, lo que se realiza a través de procedimientos mecánicos de destartraje y pulido radicular de los dientes afectados (Haffajee *et al.*, 2003). El éxito de los procedimientos de pulido y destartraje radicular es

inversamente proporcional a la profundidad de sondaje periodontal del sitio, mientras más profundo es el sondaje periodontal más difícil conseguir éxito en la terapia (Apatzidou & Kinane, 2010). El uso de irrigación subgingival podría mejorar los resultados del tratamiento, produciendo un efecto antiséptico, de arrastre y/o dilución de las bacterias subgingivales (Walker *et al.*, 2004).

Existen múltiples estudios que han intentado determinar el efecto de la irrigación subgingival en la enfermedad periodontal, se han probado distintos antisépticos como povidona iodada (Sahrmann *et al.*, 2015), clorhexidina (Cosyn *et al.*, 2006; Van der Sluijs *et al.*, 2016), fluoruro de estaño (Schmid *et al.*, 1985), peróxido de hidrógeno (Wikesjö *et al.*, 1989), entre otros. Se desconoce si la mejora lograda se debe al efecto antiséptico propiamente tal o al efecto de arrastre mecánico y/o dilutorio producido durante el proceso de aplicación.

<sup>1</sup> Departamento de Odontología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile.

<sup>2</sup> Departamento de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile.

Proyecto Financiado por "Fondo para el desarrollo de la investigación científica y/o tecnológica de actividades de titulación de pre-grado 2018. Universidad de Antofagasta". CC N° 4459.

Se propone determinar la microbiota anaeróbica total en pacientes con periodontitis antes y después de la irrigación subgingival con clorhexidina al 0,12 % versus agua destilada, la hipótesis es que la microbiota anaeróbica total disminuirá en forma estadísticamente significativa después de la irrigación subgingival con clorhexidina.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Diseño del estudio y consideraciones éticas.** Se realizó un ensayo clínico de naturaleza experimental que comenzó en marzo 2017 y terminó en diciembre 2017, fue conducido de acuerdo a la Declaración de Helsinki de 1975, que fue revisada el año 2013. Se inició una vez que fue aprobado el protocolo por el Comité de ética en Investigación Científica de la Universidad de Antofagasta. Después de explicar a los pacientes, el propósito del estudio, su naturaleza, sus posibles reacciones adversas y sus beneficios, se procedió a la firma de un Consentimiento informado.

**Universo.** El Universo estuvo conformado por sujetos que cumplieron con los criterios de inclusión, sin diferencias de género, racial o étnica. Fueron reclutados desde la clínica de Periodoncia del Departamento de Odontología de la Universidad de Antofagasta (Antofagasta, Chile).

**Criterios de inclusión.** Adultos con diagnóstico de periodontitis estadio II grado B. La periodontitis fue definida con la presencia de pérdida de inserción clínica mayor o igual a 2 mm en al menos dos dientes no adyacentes (Papapanou *et al.*, 2018) y la presencia de saco periodontal (profundidad de sondaje > 4 mm asociado a pérdida de inserción clínica) en > 30 % de los sitios examinados.

**Criterios de exclusión.** Pacientes en tratamiento periodontal (últimos 3 meses), presencia de alguna enfermedad o condición sistémica que genere alteraciones a nivel gingival, en tratamiento con antibióticos y/o antiinflamatorios o algún medicamento que interfiera con la respuesta gingival (mínimo 3 meses antes); historia de hipersensibilidad o alergia a cualquier componente utilizado en el estudio.

**Cálculo del tamaño de la muestra.** El tamaño muestra fue calculado considerando una diferencia (d) de 0,5 en la microbiota anaeróbica total, una desviación estándar (S) de 0,23, un  $\alpha = 0,05$  y un poder estadístico  $(1 - \beta) = 80$  %, lo que determinó que se necesita un mínimo de 15 sujetos por grupo a comparar.

**Procedimiento clínico.** La muestra microbiológica se recolectó utilizando dos conos de papel (Nº40) estériles los que se introdujeron en sacos periodontales con una profundidad de sondaje periodontal > 4 mm. Previo al procedimiento se eliminó la placa microbiana supragingival con cureta estéril, se secó la zona con un chorro de aire y tómulas de algodón. Los conos se introdujeron hasta el fondo del saco periodontal, se mantuvieron por 20 segundos para luego depositarse en vial con 1 mL de medio de transporte (RTF). Inmediatamente después de la toma de la muestra, se realizó la irrigación subgingival del sitio con 5 mL de clorhexidina en el grupo test o con 5 mL, de agua destilada en el grupo control. Se citó al paciente 24 horas después del procedimiento para tomar la segunda muestra microbiológica de los mismos sitios.

**Procedimiento en el laboratorio.** Las muestras de placa subgingival fueron dispersadas y mezcladas por 45 segundos agitando en un vórtex-mixer, seguido de diluciones seriadas en PBS (buffer fosfato pH 7,4) de la suspensión bacteriana mantenida en el RTF. Un volumen de 100 mL de la dilución adecuada (10-3), se sembró en Agar Sangre Hemina Menadiona. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis a 35 °C por 14 días, en jarra con generador de atmósfera anaerobia (Anaerogen). Posteriormente se efectuó un análisis macroscópico bajo lupa estereoscópica, para contabilizar las colonias pigmentadas de negro. La microbiota total cultivable se expresó como el porcentaje de unidades formadoras de colonia (UFC) por mL de medio de transporte (RTF) del total de la muestra, se calculó mediante una fórmula aritmética (Fig. 1).

$$\frac{\text{UFC total de la muestra}}{100\%} = \frac{\text{UFC}}{X\%}$$

Fig. 1. Fórmula aritmética utilizada para calcular el porcentaje de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en las placas cultivadas de las muestras obtenidas desde el saco periodontal.

**Variable de resultado.** La variable de resultado fue la microbiota anaeróbica total cultivable (%), la cual se determinó en el basal (antes de la irrigación) y 24 a 48 horas después de la irrigación subgingival.

**Análisis estadístico.** En el análisis estadístico el sitio fue considerado como unidad de medición. Se aplicó test t de Student para la comparación de la variable numérica microbiota anaeróbica total. La significancia estadística fue calculada con un  $p < 0,05$ . Se utilizó software SPSS v.22.

## RESULTADOS

**Características Sociodemográficas.** De un total de 30 sujetos analizados, 14 fueron de sexo femenino (41,2 %) y 16 de sexo masculino (58,8 %). La edad promedio fue de 47,76 ( $\pm$  10,8) años. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en el tiempo basal ( $p < 0,05$ ).

**Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) antes y después de la irrigación subgingival.** En la Tabla I se presenta el recuento del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) antes y después de la irrigación subgingival. Se detectó diferencias estadísticamente significativas solo en el grupo test ( $p = 0,001$ ).

## DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue determinar la efectividad antimicrobiana de la irrigación subgingival con clorhexidina al 0,12 % en sujetos con periodontitis. Para ello se comparó la microbiota total anaeróbica, determinada a través del número de unidades formadoras de colonias (UFC), antes y después de la irrigación subgingival del antiséptico, utilizando agua destilada como control.

Fue posible detectar una disminución estadísticamente significativa en el recuento de las UFC después de la irrigación subgingival con clorhexidina ( $p = 0,016$ ). Estos resultados son similares a los obtenidos por Blanc *et al.* (2014), Herrera *et al.* (2003) y Stanley *et al.* (1989), quienes encontraron que la clorhexidina producía una disminución en la carga bacteriana tanto in vitro como in vivo. El efecto producido, puede ser explicado debido a su comportamiento como molécula catiónica, la cual produce una acción bacteriostática en bajas concentraciones (Puig Silla *et al.*, 2008) y bactericida en altas concentraciones (Jenkins *et al.*, 1988; Puig Silla *et al.*), además presenta sustantividad elevada, lo que permite que la molécula permanezca unida a los tejidos y tenga una acción antimicrobiana de

entre 8 a 12 horas (Bonesvoll, 1977) ausencia de toxicidad sistémica y no presenta resistencia bacteriana (Teles & Teles, 2009; Gunsolley, 2010; Varoni *et al.*, 2012).

La naturaleza catiónica de la clorhexidina implica que se inactive rápidamente en presencia de productos aniónicos, principalmente los que se encuentran en algunos dentífricos (Addy *et al.*, 1989; Barkvoll *et al.*, 1989; Jones, 1997), como son el Lauril Sulfato Sódico y el Monofluorofosfato Sódico (Barkvoll *et al.*, 1988). El Lauril Sulfato de Sodio es un detergente aniónico, se emplea regularmente en productos de higiene, como en pastas de dientes y jabones.

De todos los agentes químicos utilizados para el control de la placa microbiana, el Digluconato de Clorhexidina ha demostrado ser el más efectivo y seguro (Matthijs & Adriaens, 2002). De acuerdo a lo reportado por Schiott *et al.* (1970), el enjuague de 2 veces por día con Clorhexidina al 0,2 % produce una disminución de hasta un 95 % en el número de bacterias por milímetro de saliva. En referencia al desequilibrio en la microbiota oral por incremento en el crecimiento de otros microorganismos, los sujetos tratados con Clorhexidina experimentaron un aumento en los niveles de *S. sanguis* (Emilson & Fornell, 1976; Sandham *et al.*, 1991) y una pequeña disminución en levaduras (Sandham *et al.*). La disminución de los hongos es útil y el incremento de *S. sanguis* no es dañino, de hecho, Hillman & Socransky (1982) reportaron que producía factores que inhibían el crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. En referencia al desarrollo de cepas resistentes a la Clorhexidina por uso prolongado, fue reportado por Gjermo & Eriksen (1974) que no perdía su efectividad por su uso durante largos periodos (2 veces al día durante 2 años). Su naturaleza catiónica es la que minimiza su absorción a través de la piel y las mucosas (incluida la vía gastrointestinal) (Case, 1977).

La disminución en el recuento de las UFC en la irrigación con agua destilada, se explica probablemente por una acción mecánica generada por el arrastre en la irrigación, lo que generaría un efecto dilutorio desorganizando temporalmente el biofilm microbiano subgingival (Eakle *et al.*, 1986).

	Test		Control	
	Antes	Después	Antes	Después
Media	*55,88	*20,75	35,50	32,63
Error estándar de la media	16,31	9,55	11,50	16,49
IC 95% L. inferior	23,90	2,02	12,96	0,31
IC 95% L. superior	87,85	39,48	58,04	64,95

\*Comparación intra-grupos; \*\* Comparación inter-grupos; Valores estadísticamente significativos en formato negrita.

Tabla I. Determinación del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) entre los grupos test (clorhexidina) y control (agua destilada) antes y después de la intervención. Se presentan los valores de la media (promedio), el error estándar de la media y los intervalos de confianza al 95%.

**MEJÍAS, L.; IRIARTE, D.; SÁNCHEZ, R.; NEIRA, I. & BRAVO, J.** Comparación de la microbiota anaerobia total en periodontitis antes y después de la irrigación subgingival con clorhexidina al 0,12 %. *Int. J. Odontostomat.*, 13(4):442-445, 2019.

**ABSTRACT:** The objective of this study was to determine the effect of the subgingival irrigation of chlorhexidine 0.12 % of the total anaerobic microbiota. Microbial sampling to 30 subjects with periodontitis stage II Grade B, in pockets with a periodontal probing depth > 4 mm. The subgingival irrigation was made with 5 mL of chlorhexidine in the test group and with 5 mL of distilled water in the control group. 24 hours after the procedure was obtained a second sample to compare. It was found that the subgingival irrigation with chlorhexidine at 0.12 % achieved a statistically significant decrease in anaerobic microbiota ( $p < 0.05$ )

**KEY WORDS:** chlorhexidina, therapeutic irrigation, periodontitis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addy, M.; Jenkins, S. & Newcombe, R. Studies on the effect of toothpaste rinses on plaque regrowth. (I). Influence of surfactants on chlorhexidine efficacy. *J. Clin. Periodontol.*, 16(6):380-4, 1989.
- Albandar, J. M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol. 2000*, 29:177-206, 2002.
- Apatzidou, D. A. & Kinane, D. F. Nonsurgical mechanical treatment strategies for periodontal disease. *Dent. Clin. North Am.*, 54(1):1-12, 2010.
- Barkvold, P.; Rolla, G. & Bellagamba, S. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium monofluorophosphate *in vitro*. *Scand. J. Dent. Res.*, 96(1):30-3, 1988.
- Barkvold, P.; Rølla, G. & Svendsen, A. K. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate *in vivo*. *J. Clin. Periodontol.*, 16(9):593-5, 1989.
- Blanc, V.; Isabal, S.; Sánchez, M. C.; Llama-Palacios, A.; Herrera, D.; Sanz, M. & León, R. Characterization and application of a flow system for *in vitro* multispecies oral biofilm formation. *J. Periodontol. Res.*, 49(3):323-32, 2014.
- Bonesvold, P. Oral pharmacology of chlorhexidine. *J. Clin. Periodontol.*, 4(5):49-65, 1977.
- Case, D. E. Safety of Hibitane I. Laboratory experiments. *J. Clin. Periodontol.*, 4(5):66-72, 1977.
- Cosyn, J.; Wyn, I.; De Rouck, T. & Sabzevar, M. M. Long-term clinical effects of a chlorhexidine varnish implemented treatment strategy for chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, 77(3):406-15, 2006.
- Dye, B. A. *Global periodontal disease epidemiology. Periodontol. 2000*, 58(1):10-25, 2012.
- Eakle, W. S.; Ford, C. & Boyd, R. L. Depth of penetration in periodontal pockets with oral irrigation. *J. Clin. Periodontol.*, 13(1):39-44, 1986.
- Emilson, C. G. & Fornell, J. Effect of toothbrushing with chlorhexidine gel on salivary microflora, oral hygiene, and caries. *Scand. J. Dent. Res.*, 84(5):308-19, 1976.
- Feres, M.; Cortelli, S. C.; Figueiredo, L. C.; Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. Microbiological basis for periodontal therapy. *J. Appl. Oral Sci.*, 12(4):256-66, 2004.
- Flemmig, T. F. Periodontitis. *Ann. Periodontol.*, 4(1):32-8, 1999.
- Gamonal, J. A.; Lopez, N. J. & Aranda, W. Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 year-old population in Santiago, Chile. *Int. Dent. J.*, 48(2):96-103, 1998.
- Gjerme, P. & Eriksen, H. M. Unchanged plaque inhibiting effect of chlorhexidine in human subjects after two years of continuous use. *Arch. Oral Biol.*, 19(4):317-9, 1974.
- Gunsolley, J. C. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J. Dent.*, 38 Suppl. 1:S6-10, 2010.
- Haffajee, A. D.; Arguello, E. I.; Ximenez-Fyvie, L. A. & Socransky, S. S. Controlling the plaque biofilm. *Int. Dent. J.*, 53 Suppl. 3:191-9, 2003.
- Herrera, D.; Roldán, S.; Santacruz, I.; Santos, S.; Masdevall, M. & Sanz, M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12 % chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study. *J. Clin. Periodontol.*, 30(4):307-14, 2003.
- Hillman, J. D. & Socransky, S. S. Bacterial interference in the oral ecology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and its relationship to human periodontitis. *Arch. Oral Biol.*, 27(1):75-7, 1982.
- Jenkins, S.; Addy, M. & Wade, W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts *in vivo*. *J. Clin. Periodontol.*, 15(7):415-24, 1988.
- Jones, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol. 2000*, 15:55-62, 1997.
- Matthijs, S. & Adriaens, P. A. Chlorhexidine varnishes: a review. *J. Clin. Periodontol.*, 29(1):1-8, 2002.
- Papapanou, P. N.; Sanz, M.; Buduneli, N.; Dietrich, T.; Feres, M.; Fine, D. H.; Flemmig, T. F.; Garcia, R.; Giannobile, W. V.; Graziani, F.; *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Clin. Periodontol.*, 89 Suppl. 1:S173-82, 2018.
- Puig Silla, M.; Montiel Company, J. M. & Almerich Silla, J. M. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, 13(4):E257-60, 2008.
- Sahrmann, P.; Manz, A.; Attin, T.; Zbinden, R. & Schmidlin, P. R. Effect of application of a PVP-iodine solution before and during subgingival ultrasonic instrumentation on post-treatment bacteraemia: a randomized single-centre placebo-controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.*, 42(7):632-9, 2015.
- Sandham, H. J.; Brown, J.; Chan, K. H.; Phillips, H. I.; Burgess, R. C. & Stokl, A. J. Clinical trial in adults of an antimicrobial varnish for reducing mutans streptococci. *J. Dent. Res.*, 70(11):1401-8, 1991.
- Schiott, C. R.; Løe, H.; Jensen, S. B.; Kilian, M.; Davies, R. M. & Glavind, K. The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J. Periodontol. Res.*, 5(2):84-9, 1970.
- Schmid, E.; Kornman, K. S. & Tinanoff, N. Changes of subgingival total colony forming units and black pigmented bacteroides after a single irrigation of periodontal pockets with 1.64 % SnF2. *J. Periodontol.*, 56(6):330-3, 1985.
- Stanley, A.; Wilson, M. & Newman, H. N. The *in vitro* effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *J. Clin. Periodontol.*, 16(4):259-64, 1989.
- Teles, R. P. & Teles, F. R. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Braz. Oral Res.*, 23 Suppl. 1:39-48, 2009.
- Van der Sluijs, M.; Van der Sluijs, E.; Van der Weijden, F. & Slot, D. E. The effect on clinical parameters of periodontal inflammation following non-surgical periodontal therapy with ultrasonics and chemotherapeutic cooling solutions: a systematic review. *J. Clin. Periodontol.*, 43(12):1074-85, 2016.
- Varoni, E.; Tarce, M.; Lodi, G. & Carrassi, A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol.*, 61(9):399-419, 2012.
- Walker, C. B.; Karpinia, K. & Baehni, P. Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. *Periodontol. 2000*, 36:146-65, 2004.
- Wikesjö, U. M.; Reynolds, H. S.; Christerson, L. A.; Zambon, J. J. & Genco, R. J. Effects of subgingival irrigation on *A. actinomycetemcomitans*. *J. Clin. Periodontol.*, 16(2):116-9, 1989.

Dirección para correspondencia:

Joel Bravo Bown

Departamento de Odontología- Universidad de Antofagasta

Avenida Universidad de Antofagasta 02800

Antofagasta

CHILE

Recibido : 09-04-2019

Aceptado: 12-07-2019

Email: joel.bravo@uantof.cl