

Estudio de medidas de control de la colonización microbiana de la cámara interna del implante y del sistema implante-pilar por medio de un estudio *in vitro*

Pablo Julio Pebé¹

Luis Eduardo Guzzetti²

Virginia Papone³

¹Cátedra Rehabilitación Prostodoncia Fija y TTM. Director Departamento Implantología Oral y Maxilofacial, Director de Carreras de Especialización en Implantología Oral y en Prostodoncia. Facultad de Odontología. Universidad de la República. Uruguay. pablojuliopebe@gmail.com

²Cátedra Rehabilitación Prostodoncia Fija y TTM. Integrante del Departamento de Implantología Oral. Docente Carrera de Especialización en Implantología Oral. Facultad de Odontología. Universidad de la República. Uruguay.

³Cátedra de Microbiología General y Bucodental, Directora Carreras de Asistente e Higienista en Odontología. Facultad de Odontología. Universidad de la República. Uruguay.

Resumen: Objetivo: Determinar mediante un ensayo *in vitro*, medidas de control del biofilm en la cámara interna del implante. **Método:** Se seleccionaron diferentes agentes antimicrobianos que se colocaron en las cámaras de 3 grupos de implantes. Luego de 7 días de inmersos en una suspensión microbiana e incubados, realizamos la toma, cultivo e incubación de las muestras de las cámaras de cada grupo de estudio. **Resultados:** Se constató una filtración de microorganismos hacia la cámara interna en todos los grupos de implantes estudiados, obteniéndose un mayor recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en el grupo control, mientras que en los grupos experimentales se identificó una reducción significativa en el recuento de UFC. **Conclusiones:** Se observó una disminución significativa en la cantidad de UFC en los grupos experimentales respecto al grupo control, lo que determina la ventaja de utilizar este tipo de antimicrobianos.

Palabras clave: Flora microbiana, implantes dentales, cámara interna, control de la infección.

Fecha de recibido: 23/03/2017

Fecha de aceptado: 06.07.2017

Introducción

La práctica implantológica ha contribuido de manera decisiva al logro de la rehabilitación funcional y estética del edentulismo total y parcial. Tratamientos muy exitosos han sido diseñados y protocolizados en cada situación con altas tasas de éxito y de supervivencia de los implantes y de las prótesis cualquiera sea el tipo y modalidad de tratamiento⁽¹⁾. Sin embargo, la colonización microbiana en el sistema implante-pilar-restauración con prevalencia de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre otras, han mostrado ser capaces de producir enfermedad peri-implantaria, caracterizada como mucositis en su estado inflamatorio marginal y como perimplantitis cuando la interfase hueso-implante es invadida y colonizada por la acción bacteriana desarrollando una infección peri implantaria¹. Esto ocurre desde el momento de la colocación del implante, atribuido a la flora presente en la cavidad bucal, así como también durante la cirugía de segunda fase y a la filtración en el espacio o “gap” entre pilar-implante y entre pilar-restauración, una vez colocada la prótesis. Este “gap” generalmente se encuentra a nivel de la cresta alveolar siendo susceptible a la colonización bacteriana y representando un reservorio de microorganismos^(2,3). Este fenómeno ampliamente estudiado ha dado origen a diferentes propuestas de medidas preventivas y terapéuticas orientadas al control del biofilm en el entorno de la restauración implantoasistida⁽³⁾. Se le agrega a este proceso, otra área crítica como ser la cámara interna del implante y del sistema implante-pilar-restauración. La contaminación de estos sitios durante la cirugía de segunda fase o la ejecución de los procedimientos protésicos, incluso durante la instalación de la prótesis definitiva, origina una colonización en un ambiente cerrado, no accesible a los elementos de higiene oral (mecánica y química)⁽⁴⁾. En un estudio realizado tras 14 días de la instalación de la prótesis, el recuento de microorganismos fue mayor en pilares

colados respecto a los maquinados, confirmando la microfiltración en el espacio comprendido entre el pilar y el implante⁽⁵⁾. Este intercambio se da en ambos sentidos: bacterias ingresando a la cámara así como emergiendo de la misma^(2,6). De esta forma la cámara interna y la conexión pilar-implante se constituyen en un reservorio de actividad microbiana capaz de afectar el entorno del implante⁽⁷⁾. La contaminación interna es frecuente y capaz de persistir un largo período de tiempo, constatándose filtración microbiana en todos los sistemas de implantes y pilares analizados^(8,11).

Justificación

Los protocolos tradicionales no han resuelto la problemática planteada y en consecuencia no se han desarrollado medidas específicas para el control de la colonización interna. Con el propósito de reducir la microfiltración se han desarrollado pilares en nitinol (metal con memoria de forma) que en estudios in vitro ha disminuido el micro-gap a 1 micra. Otro camino experimentado es la utilización de agentes antimicrobianos; la clorhexidina ha sido estudiada colocándola en el interior del implante estableciendo la posibilidad de reducir a corto plazo la población microbiana a ese nivel^(1,13). Groenendijk y col.⁽¹⁴⁾, ensayaron el efecto de la clorhexidina al 2%, consiguiendo un resultado inicial alentador con una reducción significativa de UFC (48% grupo control-suero vs. 17% en el grupo experimental-clorhexidina al 2%). Los indicadores periodontales tal como el flujo de fluido gingival, índice de placa e índice gingival, no variaron significativamente en ambos grupos. Un efecto positivo se establece en el tejido peri implantario ya que la clorhexidina puede permear desde el interior a través del “microgap” y reducir la colonización en el surco gingival. Se cuestiona el efecto a largo plazo de este procedimiento por la escasa vida media del producto una vez utilizado. En el estudio realizado por Groenendijk E. y col. no se observaron resultados concluyentes acerca de un control efectivo de la contaminación microbiana interna del implante utilizando la clorhexidina⁽¹⁴⁾. La microflora oral juega un papel importante en la iniciación y perpetuidad del proceso infeccioso a nivel de la cavidad bucal. Es por ello, que la investigación de los mismos, y su identificación contribuye con la selección y la aplicación de medidas preventivas, definiendo la etiología e instaurando el tratamiento adecuado¹⁵. La aplicación de métodos moleculares en la identificación de patógenos orales, posibilita un mejor manejo y seguimiento de los pacientes, como el *multiplex-PCR* que permite

la detección simultánea de los microorganismos colonizadores de la cámara interna del implante y del sistema implante–pilar⁽¹⁶⁾.

El objetivo general del presente estudio, in vitro, fue desarrollar diferentes medidas de control del biofilm en la cámara interna del implante, por medio de la detección de las especies bacterianas presentes y el posible efecto de los agentes antimicrobianos utilizados sobre la superficie del implante. Los objetivos específicos fueron: 1) determinar la acción de diferentes agentes antimicrobianos (hidróxido de calcio, yodoformo y combinados) para combatir la flora del biofilm, 2) cuantificar la microbiota, 3) obtener conclusiones de aplicación clínica en el control de la colonización microbiana de la cámara interna del implante y del sistema implante-pilar.

Materiales y métodos

Se describe como un estudio in vitro de tipo experimental.

1. Selección de medidas antimicrobianas – La selección de los agentes antimicrobianos tuvo en cuenta el cumplimiento de los siguientes criterios:

Ser específicos en relación a la flora prevalente

No afectar la integridad de los componentes del sistema implante-pilar-restauración.

No actuar en ningún caso como material cementante

Ser económico, de sabor agradable y de fácil manipulación.

No agredir a los tejidos gingivales.

Se seleccionaron como agentes antimicrobianos: yodoformo, hidróxido de calcio y una combinación de ambos en un 50% cada uno, (Hidróxido de Calcio en polvo, Leduc®), Yodoformo en polvo, Leduc®). En todos los casos se utilizó como vehículo Metilcelulosa (Leduc®)

2. Cepas bacterianas- Se utilizaron las siguientes cepas: *Porphyromonas gingivalis* (BAA-308), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Tannerella forsythia* (ATCC 43037) y *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586).

3. Grupos de estudio –

1.1. Se utilizaron 80 implantes de titanio, cilíndricos, de conexión externa de 8,5 mm de largo x 3,75 mm de diámetro (3i FI-USA®), con tornillos de tapa respectivos y se conformaron cuatro grupos:

a) Grupo control (GC): 20 implantes sin colocar nada en la cámara interna del implante

b) Grupo experimental 1(GE1): 20 implantes pinceladas con hidróxido de calcio y metilcelulosa en la cámara interna del implante.

c) Grupo experimental 2(GE2): 20 implantes pincelados con yodoformo y metilcelulosa en la cámara interna del implante.

d) Grupo experimental 3(GE3): 20 implantes pinceladas con hidróxido de calcio, yodoformo y metilcelulosa en la cámara interna del implante.

Para introducir los agentes químicos se utilizaron agujas y jeringas estériles descartables y para la toma de la muestra puntas de papel estériles N°25. Los implantes del GC fueron colocados en un frasco estéril con tioglicolato^(17,18) y una suspensión de bacterias fue introducida en dicho medio de cultivo.

Al grupo experimental 1 (GE1) constituido por 20 implantes se le colocó hidróxido de calcio en las cámaras correspondientes (Fig.1). Para ello se pesó 1gr. de este compuesto en balanza electrónica y con técnica aséptica. Se volcó sobre un vidrio estéril y se colocaron dos gotas de metilcelulosa sobre el mismo, procediendo luego a la mezcla. Abrimos un implante, le quitamos la tapa y con una jeringa y aguja descartables tomamos la suspensión e introducimos una gota dentro de la cámara.

Fig. 1. Colocación de hidróxido de calcio en la cámara interna del implante



Procedimos luego a colocar el tornillo de tapa y con una gasa estéril limpiamos el excedente. Una vez limpio, mediante una pinza estéril lo colocamos en un frasco estéril el medio de tioglicolato y la suspensión de bacterias.

Al Grupo experimental 2(GE2) se le colocó yodoformo con metilcelulosa en las cámaras correspondientes. Para ello pesamos 1gr. de este compuesto, con balanza electrónica y con técnica aséptica lo volcamos sobre un vidrio estéril y colocamos dos gotas de metilcelulosa sobre el mismo, procediendo luego a la mezcla. Abrimos un implante, quitamos el tornillo de tapa y con una jeringa y aguja descartables se tomó una muestra de la suspensión e introducimos una gota de la misma dentro de la cámara. Procedimos luego a colocar el tornillo de tapa limpiando con una gasa estéril el excedente. Una vez limpio, mediante una pinza estéril lo colocamos en el cultivo en medio de tioglicolato. El mismo procedimiento fue realizado en los diecinueve restantes.

Al grupo experimental 3 (GE3) se le colocó hidróxido de calcio y yodoformo con metilcelulosa en las cámaras correspondientes. Para ello pesamos 1gr. de este hidróxido de calcio y 1 gr. de yodoformo con balanza electrónica y con técnica aséptica. Lo volcamos sobre un vidrio estéril y colocamos dos gotas de metilcelulosa sobre el mismo, procediendo luego a la mezcla. Abrimos un implante, quitamos el tornillo de tapa y con jeringa y aguja descartables tomamos una muestra de la suspensión e introducimos una gota de la misma dentro de la cámara. Procedimos luego a colocar el tornillo de tapa y se limpió con una gasa estéril todo el excedente. Una vez limpio, mediante una pinza estéril lo colocamos en el cultivo con el medio de tioglicolato. Se repitió el procedimiento con los diecinueve implantes restantes. El contenido del frasco consistió en un medio de cultivo tioglicolato con una suspensión de 10^7 - 8×10^8 UFC de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* y *Fusobacterium nucleatum*. Estas bacterias se encuentran entre las más prevalentes en la enfermedad peri-implantaria ^(17,21) (Fig. 2).

Fig. 2. Tioglicolato con suspensión microbiana



Se incubaron los frascos a 37°C durante 7 días (Fig.3). Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a retirar a los implantes del cultivo de tioglicolato mediante una pinza estéril y se limpiaron y se secaron con gasa estéril. Retirados los tornillos de cierre, se introdujeron puntas de papel estériles N°25 (Fig.4) en cada cámara interna de cada uno de los implantes de los 4 grupos. Cada una de las 80 tomas se introdujeron en 80 tubos con una solución de 1,5 ml de RTF (Reduced Trasport Fluid)⁽²²⁾. Toda la manipulación de los implantes (tornillado y destornillado de los tronillos de cierre) fue realizada por el mismo operador.

Fig. 3. Desarrollo en tioglicolato



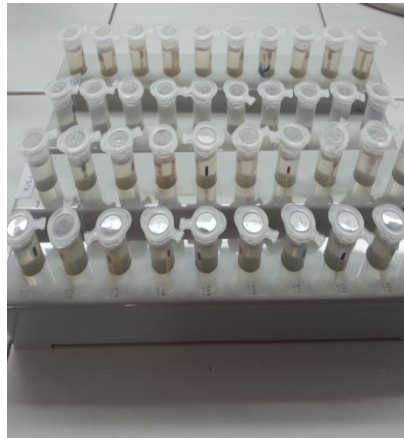
Fig. 4. Toma de la muestra con punta de papel



Posteriormente se prepararon las diluciones. En una gradilla por muestra utilizamos: un tubo eppendorf con 1,5 ml de RTF con las correspondientes 2

puntas de papel N°25 y 2 tubos eppendorf con 900 µl de RTF. Se procedió a diluir la muestra para su cuantificación (Fig.5). En cada muestra había 1,5 ml de RTF con las correspondientes 2 puntas de papel N°25. Se tomaron 100 µl de la muestra y se colocaron en un eppendorf con 900 µl de RTF. (1ª dilución: 1:10). Luego se tomaron 100 µl de la primera dilución y se colocaron en otro tubo con 900 µl de RTF (2ª dilución: 1:100). Se tomaron 100 µl de la primera y 100 µl de la segunda dilución y se sembraron en placas con medio agar base con sangre, con menadiona y hemina, se expandieron con varilla de extensión de vidrio y se incubaron las placas durante 14 días a 37°C en anaerobiosis estricta⁽²³⁻²⁴⁾.

Fig. 5. Diluciones de las muestras



Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la lectura de las placas, realizando el recuento de UFC (unidades formadoras de colonias) de cada grupo de estudio, mediante lupa estereoscópica.

Resultados

Transcurridos 14 días se abrieron las placas. (Figs.6 y 7)

Grupo control- *Muestras obtenidas de las cámaras de implantes sin compuestos químicos.* Todas las placas sembradas con las dos diluciones mostraron desarrollo de colonias. Las muestras sembradas de la primera dilución mostraron: 2 placas con más de 3.000 UFC, 2 placas con 6 UFC, 8 placas con 4 UFC, 6 placas con 3 UFC, 2 con 1 UFC. Las muestras sembradas

de la segunda dilución: 2 placas con más de 100 UFC, 2 placas con 5 UFC, 2 placas con 3 UFC, 2 con 4 UFC, 6 con 2 UFC, 4 con 1 UFC y 2 placas sin crecimiento.

GE1- Muestras obtenidas de las cámaras de implantes con hidróxido de calcio y metilcelulosa. De las placas sembradas de la primera dilución en una placa desarrollaron 2 UFC, las segundas diluciones no mostraron desarrollo de microorganismos.

Fig. 6. Placas incubadas en anaerobiosis



Fig. 7. Desarrollo de muestra con yodoformo



GE2- Muestras obtenidas de las cámaras de implantes con yodoformo y metilcelulosa. Dos placas sembradas de la primera dilución de las muestras

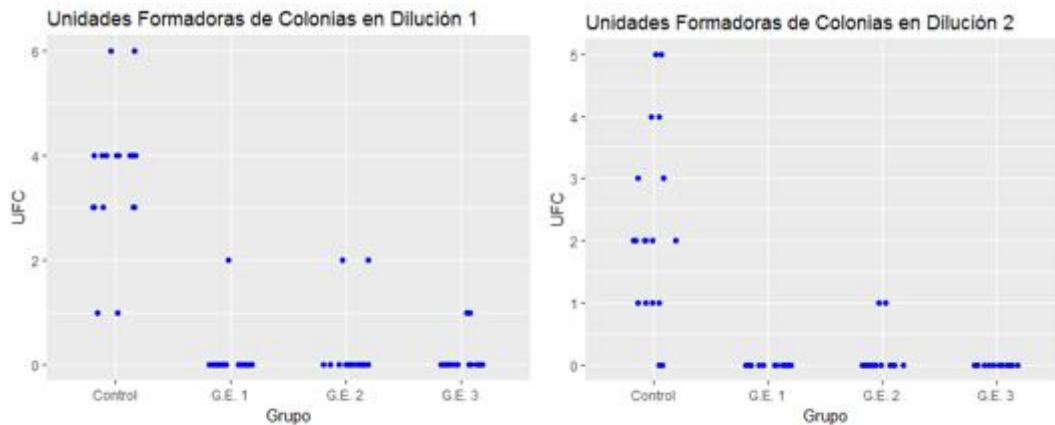
tuvieron desarrollo con 2 UFC. Dos placas sembradas de la segunda dilución de las muestras tuvieron desarrollo con 1 UFC.

GE3- *Muestras obtenidas de las cámaras de implantes con mezcla de hidróxido de calcio, yodoformo y metilcelulosa.* Dos placas sembradas de la primera dilución tuvieron desarrollo con 1 UFC. Las muestras sembradas de la segunda dilución no tuvieron desarrollo.

Los resultados de este estudio demuestran que existió una filtración de microorganismos hacia la cámara interna del implante. Se desarrollaron colonias en todas las placas sembradas con tomas sin agentes químicos (100%). La colocación de los agentes químicos introducidos en las cámaras de los implantes resultó favorable ya que disminuyeron el número de unidades formadoras de colonias de todas las muestras, tanto en la primeras diluciones (95%- GC1 y 90%- GC2 y GC3) como en las segundas diluciones (90%-GC2 y 100% -GC1 y GC3) obteniéndose los resultados más exitosos con la utilización de la mezcla de hidróxido de calcio y metilcelulosa y en combinación con el yodoformo y metilcelulosa.

El análisis descriptivo de los resultados, identificó una diferencia considerable en el crecimiento de las UFC en el grupo "sin agente" (grupo control) en relación con los otros grupos experimentales, con una disminución en la segunda dilución, pero no se identificó una reducción significativa del recuento de UFC entre ellos (Fig.8). El uso de hidróxido de calcio ya sea utilizándolo solo o en combinación con el yodoformo, mostró el menor recuento de las UFC de los grupos estudiados. El tiempo de duración del efecto de este agente en este estudio no se pudo determinar.

Fig. 8. El promedio de UFC en el grupo control fue de 3,56, en el grupo experimental 1 de 0,1, en el G.E. 2 de 0,2 y en el G.E. 3 de 0,1. Se puede observar una disminución significativa en la cantidad de UFC en los grupos tratados con algún agentemicrobiano respecto al grupo control. Al comparar los distintos grupos experimentales no se observa una diferencia significativa entre ellos. Al analizar los resultados en la segunda dilución, se obtienen los mismos resultados.



Discusión

El presente estudio permitió comparar la eficacia de dos agentes antimicrobianos y la combinación de ambos, en relación a la microflora que coloniza la cámara interna del implante. Los agentes antimicrobianos permitieron determinar cuál de ellos presentaba una mejor eficacia para combatir la flora en la cámara interna del implante. Trabajos que han estudiado este fenómeno de la contaminación del sistema implante-pilar-restauración^(1,2,4,7,12-14,21), han utilizado a la clorhexidina como agente antimicrobiano, observándose resultados variables y mencionando como característica común, una corta vida útil del mismo. La selección del hidróxido de calcio y del yodoformo, surge como una alternativa a la clorhexidina, tratando de lograr una efectividad mayor para combatir la contaminación. En la revisión de la literatura previa al presente trabajo, no se encontraron estudios que utilizaran a los antimicrobianos empleados en este ensayo. Estos son los utilizados en la práctica odontológica diaria con la misma concentración, lo que garantiza la biocompatibilidad del producto. Posteriormente a la lectura de los cultivos, se pudo establecer, con muestras de 20 implantes cada una, que el hidróxido de calcio solo o en combinación con el yodoformo, mostró el mejor desempeño ya que se observó un mínimo desarrollo de Unidades Formadoras de Colonias en los cultivos que se utilizó este producto, aunque no se puede establecer una diferencia de significación con el grupo que utilizó solamente al yodoformo como antimicrobiano (GE2).

Para este trabajo se utilizaron cepas bacterianas que habitualmente pueden colonizar en esas zonas anaerobias estrictas, se considera de importancia realizar un estudio In Vivo, para evaluar la eficacia a mediano y largo plazo.

Conclusiones

En el presente trabajo se concluye que existió una disminución significativa en el crecimiento de UFC en los Grupos Experimentales respecto al Grupo Control, lo que determina la ventaja de la utilización del Hidróxido de calcio y el yodoformo como agentes antimicrobianos para controlar el crecimiento de microorganismos dentro de la cámara interna de los implantes dentales. Estos resultados abren una puerta para profundizar los trabajos para combatir la contaminación de la cámara del implante, ya sea ampliando la muestra en trabajos in vitro, como con la realización de un estudio clínico prospectivo (próximo a iniciarse) que permitirá corroborar los resultados obtenidos en el laboratorio.

Referencias

1. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Anchorage of titanium implant with different surface characteristics: an experimental study in rabbits. Clin Implant Dent Relat. Res. 2000; 2(3): 120-128
2. Quirynen M, van Steenberghe D. Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study. Clin Oral Implant Res. 1993; 4: 158-161.
3. Brogгинi N, McManus LM, Herman JS, Medina RU, Oates TW, Schenk RK, Buser D, Mellonig JT, Cochran DL. Persistent Acute Inflammation at the Implant-Abutment Interface. J Dent Res. 2003; 82(3): 232-237.

4. Besimo C, Guindy J, Lewetag D, Meyer J. Prevention of bacterial leakage into and from prefabricated screw-retained crowns on implants in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14:654-660.
5. Persson L G, Lekholm U, Leonhardt A, Dahlén G, Lindhe J. Bacterial colonization on internal surfaces of Branemark system implant components. *Clin Oral Impl Res*. 1996; 7:90-95.
6. Do Nascimento C, Barboza RE, Issa JPM, Watanabe E, Ito IY, Albuquerque Jr RF. Bacterial leakage along the implant-abutment interface of premachined or cast components. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008; 37: 177-180
7. Quirynen M, Bollen CML, Eyssen H, van Steenberghe D. Microbial penetration along the implant components of the Branemark system, an in vitro study. *Clin Oral Implant Res*. 1994; 5: 239-244.
8. Assenza B, Tripoldi D, Scarano A, Perrotti V, Piatelli A, Iezzi G, D'Ercole S. Bacterial Leakage in Implants with Different Implant-Abutment Connections: An In Vitro Study. *J. Periodontol*. 2012;83:491-497.
9. Koutouzis T, Wallet S, Calderon N, Lundgren T. Bacterial Colonization of the Implant-Abutment Interface Using an In Vitro Dynamic Loading Model. *J. Periodontol*. 2011;82:613-618.
10. Ricolmini A, Fernández FS, Straioto FG, Silva WJ, Del Bel Cury AA, Preload loss and bacterial penetration on different Implant-Abutment connection systems. *Braz. Dent J*. 2010;21(2)123-129.
11. Steinebrunner L, Wolfart S, Bobmann K, Kern M, In Vitro Evaluation of bacterial leakage along the Implant-Abutment interface of different Implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:875-881.
12. Cortizo MC, Oberti TG, Cortizo MS, Cortizo AM, Fernandez Lorenzo de Mele M. Chlorhexidine delivery system from titanium/polybenzyl acrylate coating: Evaluation of cytotoxicity and early bacterial adhesion. *J Dent*. 2012; 40: 329-337
13. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Impl. Res*. 2002; 13: 1-19.
14. Groenendijk E, Dominicus J, Moorer W, Van Waas M. Microbiological and clinical effects of chlorhexidine enclosed in fixtures of 3i-Titamed implants. *Clin Oral Impl Res*. 2004; 15: 175-179

15. Santos Barboza RE, do Nascimento C, Mardegan JP, Watanabe E, Yoko I, de Albuquerque RF, Bacterial cultura and DNA checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants. *J Prosthodontol*. 2009; 18:376-381.
16. Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16 S rRNA gene clone library. *J Oral Microbiol*. 2010; 24(2). Doi: 10.3402/jom.v2i0.5104.
17. Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schawartz F, Handel G. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2010; 21(2):156-64. Epub 2009, Nov, 13.
18. Duarte PM, Reis AF, de Freitas PM, Ota-Tsukuki C. Bacterial adhesion on smooth and rough titanium surfaces after treatment with different instruments. *J Periodontol*. 2009; 80(11):1824-32.
19. Lee A, Wang HL. Biofilm related to dental implants. *Implant Dent*. 2010; 19(5):387-93.
20. Pye AD, Lockhart DE, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ. A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect*. 2009; 72(2):104-10. Epub 2009, Mar 28.
21. Kern M, Harder S. Antimicrobial filling of implant cavities. *J Prosthet Dent*. 2010; 103: 321-322.
22. Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology* 1972; 24(4): 638-644
23. Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A, Gamonal J. Prevalence of Periodontopathic: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Bacteria in Aggressive Periodontitis Patients in a Chilean Population. *J Periodontol*. 2005; 76: 289-294.
24. Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero J, León R. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol*. 2008; 35: 106-113.

In vitro study of measures to control microbial colonization in the internal chamber of the implant and the implant-abutment system

Abstract. Objective: To determine biofilm control measures in the internal chamber of the implant through an in vitro test. **Method:** Different antimicrobial agents were selected and placed in the chambers of three groups of implants. After seven days, we immersed them in a microbial suspension for incubation. We collected, cultured and incubated the samples from the chambers of each study group. **Results:** We detected a filtration of microorganisms into the internal chamber in all the groups of implants studied. This resulted in a higher count of colony-forming units (CFU) in the control group, whereas in the experimental groups we identified a significant reduction in the CFU count. **Conclusions:** We observed a significant decrease in the number of CFU in the experimental groups in relation to the control group, which determines the advantage of using this type of antimicrobials.

Keywords: microbial flora, dental implants, internal chamber, infection control.

Received on: 20 March 2017

Accepted on: 16 Jun 2017

Introduction

The implant practice has made critical contributions to the functional and aesthetic rehabilitation of full and partial edentulism. Very successful treatments have been designed and protocolized in each situation with high implant and prosthesis survival and success rates, whatever the type and modality of treatment⁽¹⁾. However, it has been shown that microbial colonization in the implant-abutment-restoration system with a prevalence of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, among others, can cause peri-implant disease, characterized as mucositis in the marginal inflammation stage, and as peri-implantitis when the bone-implant interface is invaded and colonized by bacterial activity causing a peri-implant infection⁽¹⁾. This can occur from the time when the implant is placed, attributed to the flora present in the oral cavity, and also during the second-stage surgery, when it is attributed to the infiltration in the gap between the abutment and the implant, and between the abutment and the restoration, once the prosthesis has

been placed. This gap is generally found at the level of the alveolar crest, is susceptible to bacterial colonization and represents a reservoir of microorganisms^(2,3). Different preventive and therapeutic measures aimed at controlling biofilm in the area surrounding the implant-supported restoration have been proposed to deal with this widely studied phenomenon⁽³⁾. Another critical area, the internal chamber of the implant and the implant-abutment-restoration system, is added to this process. Contamination of these sites during second-stage surgery or the execution of prosthetic procedures, or even during the placement of the final prosthesis, results in colonization inside a closed environment that is inaccessible to oral hygiene products (mechanical and chemical)⁽⁴⁾. In a study conducted 14 days after placing the prosthesis, the count of microorganisms was higher in cast abutments versus machined abutments, which confirms microfiltration in the gap between the abutment and the implant⁽⁵⁾. This exchange goes both ways: there is bacteria entering the chamber and coming out of it^(2,6). Hence, the internal chamber and the abutment-implant connection represent a reservoir of microbial activity that can affect the area surrounding the implant⁽⁷⁾. Internal contamination is frequent and can persist for long periods of time. Microbial leakage is observed in all the implant and abutment systems analyzed^(8,11).

Rationale

Traditional protocols have not solved the problem presented above and, consequently, no specific measures have been developed to control internal colonization. To reduce microleakage, abutments are developed using nitinol (shape memory metal), which in in vitro studies reduces the microgap to 1 micron. Another path tested is using antimicrobial agents. Tests have been conducted placing chlorhexidine inside implants, which raises the possibility of reducing the microbial population at that level^(1,13). Groenendijk et al.⁽¹⁴⁾ tested the effects of 2% chlorhexidine and obtained an initial promising result with a significant CFU reduction (48% in the control-saline group vs. 17% in the test-2% chlorhexidine group). Periodontal indicators, such as gingival fluid flow, plaque index and gingival index, do not vary significantly in neither group. There is a positive effect on the peri-implant tissue, since chlorhexidine can permeate from the inside through the microgap and reduce colonization in the gingival sulcus. The long-term effects of this procedure are questioned because of the short half-life of the product once it has been applied. No conclusive results are observed in the study conducted by Groenendijk E. et al. regarding the effective

control of the internal microbial contamination of the implant using chlorhexidine⁽¹⁴⁾. Oral microflora plays an important role in the beginning and perpetuation of the infectious process in the oral cavity. This is why investigating and identifying it contributes to the selection and application of preventive measures, defining the etiology of the infection and applying the appropriate treatment⁽¹⁵⁾. The application of molecular methods to identify oral pathogens makes it possible to better manage and follow-up patients, an example of which is *multiplex-PCR*, which enables the simultaneous detection of colonizing microorganisms in the internal chamber of the implant and in the implant-abutment system⁽¹⁶⁾.

The general objective of this in vitro study was to develop different biofilm control measures in the internal chamber of the implant by detecting the bacterial species present, as well as the possible effect of antimicrobial agents used on implant surfaces. The specific objectives were: 1) to determine the action of different antimicrobial agents (calcium hydroxide, iodoform and combinations) against the biofilm flora, 2) to quantify the microbiota, 3) to draw conclusions for clinical application in the control of the microbial colonization of the internal chamber of the implant and the implant-abutment system.

Materials and methods

This is described as an experimental, in vitro study.

1. Selection of antimicrobial measures – The following criteria were considered when selecting antimicrobial agents:

- Is specific regarding the prevalent flora
- Does not affect the integrity of the components of the implant-abutment-restoration system
- Does not act in any case as a cementing material
- Is economical, has a pleasant taste and is easily handled
- Does not attack gingival tissues.

The antimicrobial agents selected were: iodoform, calcium hydroxide and a 50/50 combination of both (calcium hydroxide powder, Leduc®, iodoform powder, Leduc ®). Methylcellulose (Leduc ®) was used as medium in all cases.

2. Bacterial strains- The following strains were used: *Porphyromonas gingivalis* (BAA-308), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Tannerella forsythia* (ATCC 43037) and *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586).

3. Study groups:

1.1. We used 80 cylindrical titanium implants with external connections measuring 8.5 mm in length and 3.75 in diameter (3i FI-USA®), with their corresponding cover screws, and formed four groups:

- a) Control group (CG):** 20 implants with nothing placed inside the internal chamber of the implant.
- b) Experimental group 1 (EG1):** 20 implants with the internal chamber of the implant coated with calcium hydroxide and methylcellulose.
- c) Experimental group 2 (EG2):** 20 implants with the internal chamber of the implant coated with iodoform and methylcellulose.
- d) Experimental group 3 (EG3):** 20 implants with the internal chamber of the implant coated with calcium hydroxide, iodoform and methylcellulose.

Disposable sterile needles and syringes were used to introduce the chemical agents, and sterile No. 25 paper points were used to collect samples. The implants of the CG were placed in a sterile bottle with thioglycolate^(17,18) and a suspension of bacteria was introduced in the culture medium.

In the experimental group 1 (EG1), consisting of 20 implants, we applied calcium hydroxide in the corresponding chambers (Fig.1). To that end, 1 g of this compound was weighed on an electronic scale using an aseptic technique. It was poured on sterile glass, two drops of methylcellulose were dropped on it, and then it was combined. We opened an implant, removed the cover and, using a disposable needle and syringe, took the suspension and introduced a drop into the chamber.

Fig. 1: Placement of calcium hydroxide in the internal chamber of an implant



We proceeded to place the cover screw and wipe off the excess using sterile gauze. Once clean, we placed the implant in a sterile bottle with the thioglycolate medium and the bacteria suspension using sterile pliers.

In the experimental group 2 (EG2), we applied iodoform with methylcellulose in the corresponding chambers. To that end, 1g of this compound was weighed on an electronic scale using an aseptic technique. It was poured on sterile glass, two drops of methylcellulose were dropped on it, and then it was combined. We opened an implant, removed the cover screw and, using a disposable needle and syringe, took the suspension and introduced a drop of it into the chamber. We proceeded to place the cover screw and wipe off the excess using sterile gauze. Once clean, we placed the implant in the culture in a thioglycolate medium using sterile pliers. The same procedure was carried out with the remaining 19 implants.

In the experimental group 3 (EG3), we placed calcium hydroxide and iodoform with methylcellulose in the corresponding chambers. To that end, 1 g of calcium hydroxide and 1 g of iodoform were weighed on an electronic scale applying an aseptic technique. We poured it on sterile glass, dropped two drops of methylcellulose on it, and then combined the mixture. We opened an implant, removed the cover screw and, using a disposable needle and syringe, took a sample from the suspension and introduced a drop of it into the chamber. We then placed the cover screw and wiped off all the excess material with sterile gauze. Once clean, the implant was placed in the culture with the thioglycolate medium using sterile pliers. The procedure was repeated with the remaining 19 implants. The bottle contained a thioglycolate culture medium with a suspension containing 10^7 - 8×10^8 CFU of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum*. These bacteria are among the most prevalent in peri-implant disease^(17,21) (Fig. 2).

Fig. 2. Thioglycolate with microbial suspension



Bottles were incubated at 37°C for 7 days (Fig. 3). After that time had elapsed, the implants were removed from the thioglycolate culture using sterile pliers, and then they were cleaned and dried with sterile gauze. After removing the cover screws, sterile No. 25 paper points were introduced (Fig. 4) inside each internal chamber of each of the implants of the four groups. Each of the 80 samples was introduced in one of 80 tubes containing a solution of 1.5 ml of RTF (Reduced Transport Fluid)⁽²²⁾. All implant handling (screwing and unscrewing of cover screws) was performed by the same operator.

Fig. 3: Development in thioglycolate collection using paper points



Fig. 4. Sample collection using paper points



Dilutions were then prepared. One rack was used per sample with: one eppendorf tube with 1.5 ml of RTF with the corresponding two No. 25 paper points and two eppendorf tubes with 900 μ l of RTF. Then the sample was diluted for quantification (Fig. 5). In each sample there was 1.5 ml of RTF with the corresponding two No. 25 paper points. 100 μ l was taken from the sample and placed in an eppendorf tube with 900 μ l of RTF. (First dilution: 1:10). Then, 100 μ l was taken from the first dilution and placed in another tube with 900 μ l of RTF (second dilution: 1:100). 100 μ l was taken from the first and 100 μ l from the second and streaked in base agar medium with blood, menadione and hemin, expanded with a glass spreader, and the plates were incubated for 14 days at 37°C in absolute anaerobiosis⁽²³⁻²⁴⁾.

Fig. 5: Sample dilutions



After the incubation period, the plates were read by performing the CFU (colony-forming units) count for each study group, using a stereoscopic magnifying glass.

Results

Plates were opened after 14 days. (Figs. 6 and 7)

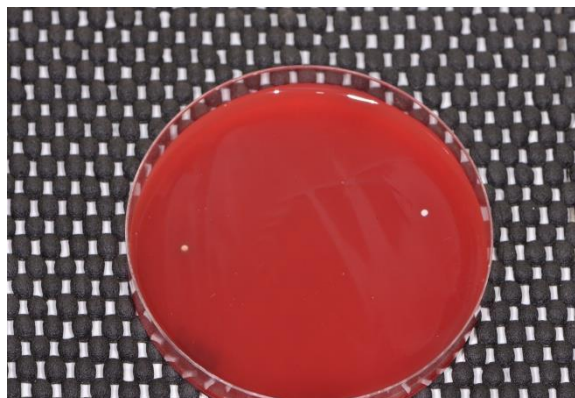
Control group- *Samples obtained from the implant chambers without chemical compounds.* All of the plates streaked with the two dilutions showed colony growth. The samples streaked from the first dilution showed: 2 plates with more than 3,000 CFU, 2 plates with 6 CFU, 8 plates with 4 CFU, 6 plates with 3 CFU, 2 with 1 CFU. The samples streaked from the second dilution showed: 2 plates with more than 100 CFU, 2 plates with 5 CFU, 2 plates with 3 CFU, 2 plates with 4 CFU, 6 with 2 CFU, 4 with 1 CFU and 2 plates without growth.

EG1- *Samples obtained from the implant chambers with calcium hydroxide and methylcellulose.* Of the plates streaked with the first dilution, one showed 2 CFU, second dilutions did not show growth of microorganisms.

Fig. 6: Plates incubated in anaerobiosis iodoform



Fig. 7: Growth of sample with iodoform



EG2- *Samples obtained from the implant chambers with iodoform and*

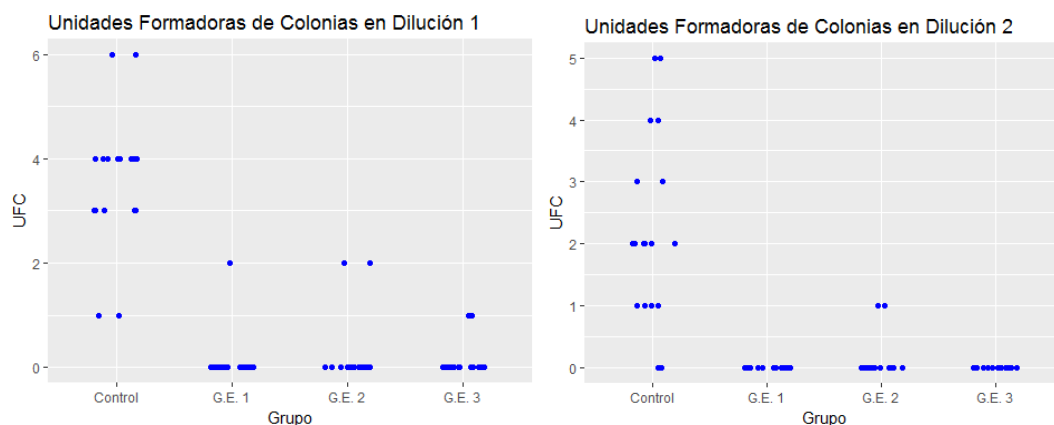
methylcellulose. Two of the plates streaked from the first dilution of the samples showed growth with 2 CFU. Two of the plates streaked from the second dilution of the samples showed growth with 1 CFU.

EG3- *Samples obtained from the implant chambers with the mixture of calcium hydroxide, iodoform and methylcellulose*. Two of the plates streaked from the first dilution showed growth with 1 CFU. The samples streaked from the second dilution showed no growth.

The results of this study show that there was a leakage of microorganisms into the internal chamber of the implant. There was colony growth in all the plates streaked with the samples without chemical agents (100%). The use of the chemical agents introduced in the chambers of implants was favorable because they reduced the number of colony-forming units in all samples, both in the first dilutions (95% in EG1 and 90% in EG2 and EG3) and in the second dilutions (90% in EG2 and 100% in EG1 and EG3), with the most successful result being those obtained using the mixture of calcium hydroxide and methylcellulose, and the combination with iodoform and methylcellulose.

The descriptive analysis of the results identified a substantial difference in CFU growth in the group “without agent” (control group) in relation to the other experimental groups, with a reduction in the second dilution, but no significant reduction in the CFU count was found between them (Fig. 8). The use of calcium hydroxide, whether alone or in combination with iodoform, showed the lowest CFU count among the groups studied. It was not possible to determine the duration of the effect of this agent.

Fig. 8: The average CFU in the control group was 3.56, in the experimental group 1, 0.1, in the GE2,0.2 and in the GE3,0.1. A significant decrease in the number of CFU in the groups treated with some antimicrobial agent in relation to the control group was observed. No significant difference was observed when comparing the different experimental groups. The same results were obtained when analyzing the results of the second dilution.



Discussion

This study enabled the comparison of two antimicrobial agents, and a combination of both, in relation to the microflora which colonizes the internal chamber of the implant. We could determine which antimicrobial agent was more effective against the flora in the internal chamber of the implant. Works which study this phenomenon of contamination in the implant-abutment-restoration system^(1,2,4,7,12-14,21) use chlorhexidine as an antimicrobial agent with varying results and note its short life as a common characteristic. The selection of calcium hydroxide and iodoform appears as an alternative to chlorhexidine in trying to achieve a higher effectiveness against contamination. No studies using the antimicrobials used in this work were found in the review of the literature conducted. These are the antimicrobials used in the daily dentistry practice with the same concentration, which guarantees product biocompatibility. After reading the cultures, it was possible to establish, with samples from 20 implants each, that calcium hydroxide alone or in combination with iodoform showed the best performance, since the growth of colony-forming units observed in the cultures in which this product was used was minimal, although we cannot determine a significant difference with the group where only iodoform was used as an antimicrobial (GE2).

Bacterial strains which can regularly colonize these completely anaerobic zones were used in this research. It is important to conduct an in vivo study to assess the mid and long-term effectiveness of these measures.

Conclusions

We found a significant decrease in the growth of CFU in the experimental groups in relation to the control group, which determines the advantage of using calcium hydroxide and iodoform as antimicrobial agents to control the growth of microorganisms inside the internal chamber of dental implants. These results open the door for further research on the fight against contamination in the implant chamber, whether by expanding the sample in in vitro studies or by conducting a prospective clinical study (upcoming) which will make it possible to confirm the results obtained in the laboratory.