

Impact of diode laser irradiation on the size of *Enterococcus faecalis* population in the canals of bovine teeth – an *in vitro* study*

Wpływ promieniowania lasera diodowego na liczebność populacji *Enterococcus faecalis* w kanałach zębów bydłęcych*

Joanna Grącka-Mańkowska¹, Beata Zarzycka², Halina Pawlicka¹

¹ Zakład Endodoncji, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska
Department of Endodontics, Medical University of Lodz, Poland
Head: prof. dr hab. H. Pawlicka

² Zakład Laboratoryjnej Immunologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska
Department of Medical Laboratory Immunology, Medical University of Lodz, Poland
Head: dr hab. J.Ł. Grzegorzczak, prof. nadzw.

Abstract

Aim of the study. To evaluate the impact of laser diode irradiation on the size of *Enterococcus faecalis* population in the canals of bovine teeth and to determine the minimum effective diode laser irradiation dose. **Material and methods.** 1. Freshly extracted single-canal bovine teeth, 2. *Enterococcus faecalis* strain ATCC 11420 deriving from the Polish Microorganisms Collection of the Institute of Immunology and Experimental Therapy of the Polish Academy of Sciences in Wrocław, 3. Diode laser (Diode LX mini 980 nm, 10 W, Lasotronix). The prepared and sterilized bovine teeth were infected by *E. faecalis*, and then incubated in aerobic conditions for 24 hours. The teeth were divided into seven groups (1-7). The laser light was applied for the infected teeth from groups 1-5 in order to determine a narrow range for searching for minimum effective laser irradiation dose. The canals of the teeth from Group 6 were subjected to irrigation with 5.25% NaOCl solution. Group 7 served as an infection control unit. The material gathered from the interior of canals was cultured on the selective Enterococcosel Agar and CFU (Colony Forming Unit) per 1 mg of dentine was determined for each sample.

Streszczenie

Cel pracy. Ocena wpływu promieniowania lasera diodowego na liczebność populacji *Enterococcus faecalis* w zakażonych kanałach zębów bydłęcych. Określenie minimalnej skutecznej wartości mocy promieniowania. **Materiał i metody.** 1. Świeżo usunięte jednokanałowe zęby bydłce. 2. *Enterococcus faecalis* szczep ATCC 11420 pochodzący z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. 3. Laser diodowy (Diode LX mini 980 nm, 10 W, Lasotronix). Opracowane i wysterylizowane zęby bydłce zakażano *E. faecalis*, a następnie inkubowano w warunkach tlenowych przez 24 godz. Podzielono zęby na 7 grup (1-7). Zakażone zęby z grup 1-5 poddano aplikacji światła laserowego celem określenia wąskiego przedziału poszukiwanej minimalnej skutecznej wartości mocy promieniowania laserowego. Kanały zębów z grupy 6 poddano irygacji 5,25% roztworem NaOCl. Grupa 7 stanowiła kontrolę zakażenia. Materiał pobrany z wnętrza kanałów wysiewano na wybiórcze podłoże Enterococcosel Agar i określano CFU (z ang. Colony Forming Unit) dla każdej próbki w przeliczeniu na 1 mg zębiny.

KEYWORDS:

diode laser, *Enterococcus faecalis*, single effective dose

HASŁA INDEKSOWE:

dioda laserowa, *Enterococcus faecalis*, skuteczna dawka

* The study financed by the Medical University of Lodz from the research task n°: 502-03/2-044-02/502-24-025.

* Badania finansowane przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, nr programu 502-03/2-044-02/502-24-025.

Results. The differences in the obtained average CFU/mg values for each group were statistically significant ($p < 0.001$). The greatest average CFU/mg value was identified in Group 7 (infection control). The complete eradication of *E. faecalis* population was observed in Group 6 (5.25% NaOCl). The statistically significant reduction in population was obtained in Group 4 (1500 mW, CW – Continuous Wave, laser operating in a continuous wave mode), and the values for Group 3 and 5 (1250 mW – CW and 3000 mW, respectively, laser operating in pulsed mode) were similar. No statistically significant reduction in the size of pathogen population was identified in Group 1 and 2.

Conclusions. The conducted laboratory studies prove that diode laser can be a helpful tool in disinfection of root canal infected by *Enterococcus faecalis*.

Introduction

The main cause of chronic inflammations of periapical tissues after endodontic treatment (the so-called Post-treatment Endodontic Disease) is microorganisms remaining as a result of chemomechanical preparation of canals.^{1,2} During the revised root canal treatment, *Enterococcus faecalis* is the most frequently isolated microorganism.^{3,4} The bacteria are capable of forming biofilms inside and outside the canals, actively functioning mechanism of proton pump and numerous factors of virulence (e.g. Ace – collagen binding protein, LTA – lipoteichoic acid, EAS – enterococcus aggregation substance) which enable deep penetration of a network of dentinal tubules and also condition its resistance to conventionally used antiseptics.⁵⁻¹²

E. faecalis cells in biofilm, in comparison with planktonic forms, are less vulnerable to antibiotics and more resistant to host defence mechanisms.¹²⁻¹⁵ Due to deep colonization of dentinal tubules network by *E. faecalis* (even to 1100 μm deep from the canal lumen), traditional irrigants, penetrating only from 130 to 300 μm deep into tubules, are not very effective in eliminating bacterial cells in biofilm.¹⁶⁻¹⁹ The complicated anatomy of the canal system, the presence of anastomoses, lateral canals, isthmuses and apical deltas, hardly accessible during

Wyniki. Różnice w otrzymanych średnich wartościach CFU/mg dla poszczególnych grup okazały się istotne statystycznie ($p < 0,001$). Największą średnią wartość CFU/mg odnotowano w Grupie 7 (kontrola zakażenia). Całkowitą eliminację populacji *E. faecalis* zaobserwowano w Grupie 6 (5,25% NaOCl). Istotną statystycznie redukcję liczebności populacji uzyskano w Grupie 4 (1500 mW, CW – Continuous Wave, opcja pracy ciągłej lasera), a wartości dla Grup 3 i 5 (odpowiednio 1250 mW – CW i 3000 mW – opcja pracy impulsowej lasera) kształtowały się na podobnym poziomie. W Grupach 1 i 2 nie odnotowano istotnej statystycznie redukcji liczebności populacji patogenu.

Wnioski. Przeprowadzone badania laboratoryjne dowodzą, iż laser diodowy może być pomocnym narzędziem w dezynfekcji przestrzeni kanału korzeniowego zakażonego *Enterococcus faecalis*.

Wstęp

Główną przyczyną utrzymujących się procesów zapalnych tkanek okołowierzchołkowych po leczeniu endodontycznym (tzw. Post-treatment Endodontic Disease) są mikroorganizmy przetrwałe po chemomechanicznym opracowaniu kanału.^{1,2} Podczas powtórnego leczenia kanałowego najczęściej izolowanym mikroorganizmem jest *Enterococcus faecalis*.^{3,4} Bakteria posiada zdolność tworzenia wewnątrz- i zewnątrzkorzeniowych biofilmów, aktywnie działający mechanizm pompy protonowej oraz liczne czynniki wirulencji (np. Ace – collagen binding protein, LTA – lipoteichoic acid, EAS – enterococcus aggregation substance) umożliwiające głęboką penetrację sieci kanalików zębinowych, a także warunkujące jej oporność na tradycyjnie stosowane antyseptyki.⁵⁻¹² Komórki *E. faecalis* w biofilmie w porównaniu z formami planktonicznymi są mniej podatne na działanie antybiotyków i bardziej odporne na mechanizmy obrony gospodarza.¹²⁻¹⁵ Z uwagi na głęboką kolonizację sieci kanalików zębinowych przez *E. faecalis* (nawet do 1100 μm w głąb od światła kanału), tradycyjne środki płuczące, penetrujące tylko od 130 do 300 μm w głąb kanalików, nie są w stanie skutecznie oddziaływać na komórki bakteryjne w biofilmie.¹⁶⁻¹⁹ Skomplikowana anatomia systemu kanałowego, obecność anastomoz, kanałów bocznych, cieśni oraz delt korzenio-

preparation, prevents the complete elimination of microorganisms when only conventional methods are used.²⁰ The introduction of lasers to the disinfection procedures in traditional endodontic treatment, decreased the number of complications such as hard-to-heal lesions in the periapical tissues.^{18,19,21} The therapeutic success is assigned to specific conditions of laser light, which is capable of penetrating more than 1100 µm deep into the network of dentinal tubules serving as “additional optical fibers”.^{22,23}

Bactericidal effect of laserotherapy is based on the generation of thermal energy dependent on the radiation dose. Therefore, in order to decrease the risk of thermal damage to paradental tissues, the application of laser light operating in a pulsed mode is recommended.^{17,24-26}

Aim of the study

To evaluate the impact of diode laser on the size of *Enterococcus faecalis* population in the infected canals of bovine teeth. To determine minimum effective irradiation dose.

Material and methods

A total of sixty freshly extracted, one-canal bovine teeth were used in the study. After cutting off the coronal part with a flame shaped diamond drill fixed in high speed handpiece, the canals were prepared up to the size 45 with Largo #3 and #4 drills. Smear layer was removed by irrigating the root canals with 5.25% NaOCl solution and 17% EDTA solution. Next, the teeth were subjected to sterilization in the steam autoclave in the temperature of 121°C. For sterilization control, four randomly selected roots were placed in separate tubes filled with 10 ml of sterile BHI broth. The absence of broth clouding after 24 hours of incubation proved that the sterilization process had been successfully completed.

After reviving *E. faecalis* (ATCC 11420) strain, which was derived from the Polish Microorganisms Collection of the Institute of Immunology and Experimental Therapy of the Polish Academy of Sciences in Wrocław, the solution with optical density of 0.5 on the McFarland scale, which corresponds to 1.5×10^8 of bacterial cells in 1

wych, trudno dostępnych podczas opracowania, uniemożliwia całkowitą eliminację drobnoustrojów przy zastosowaniu jedynie konwencjonalnych metod postępowania.²⁰

Włączenie laserów do zabiegów dezynfekcji, w tradycyjnym leczeniu endodontycznym, zmniejszyło ilość powikłań w postaci trudno gojących się zmian w obrębie tkanek okołowierzchołkowych.^{18,19,21} Sukces terapeutyczny przypisuje się specyficznym właściwościom światła laserowego, które posiada zdolność penetracji powyżej 1100 µm w głąb sieci kanalików zębinowych, spełniających rolę „dodatkowych światłowodów”.^{22,23}

Efekt bakteriobójczy laseroterapii opiera się na generacji energii cieplnej zależnej od dawki promieniowania. Dlatego, aby zmniejszyć ryzyko uszkodzenia termicznego tkanek przyzębia, poleca się przeprowadzać aplikację światła laserowego w opcji pracy impulsowej.^{17,24-26}

Cel pracy

Ocena wpływu promieniowania lasera diodowego na liczebność populacji *Enterococcus faecalis* w zakażonych kanałach zębów bydłęcych. Określenie minimalnej skutecznej wartości mocy promieniowania.

Materiał i metody

Do badania wykorzystano 60 świeżo usuniętych, jednokanałowych zębów bydłęcych. Po odcięciu części koronowej wiertłem diamentowym typu płomyk osadzonym w turbinie, opracowano kanały do rozmiaru 45 wiertłami Largo #3 i #4. Warstwę mazistą usuwano płuczając jamy zębów 5,25% roztworem NaOCl oraz 17% roztworem EDTA. Następnie zęby poddano sterylizacji w autoklawie parowym w temperaturze 121°C. W celu kontroli sterylizacji, cztery losowo wybrane korzenie umieszczono w osobnych próbkach z 10 ml jałowego bulionu BHI. Brak zmętnienia bulionu po 24h inkubacji świadczył o prawidłowym przebiegu procesu sterylizacji.

Po ożywieniu szczepu *E. faecalis* (ATCC 11420), pochodzącego z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, przygotowano zawiesinę o gęstości optycznej 0,5 w ska-

ml, was prepared. The teeth were incubated in the prepared solution for 24h (in the temperature of 37°C, in aerobic conditions) with the purpose of infecting the samples. After the incubation, the material was divided into 7 groups, each containing 8 teeth.

Diode laser Diode LX mini (Lasotronix, Poland) was used in the examination, with the ending emitting light of the 980 nm wavelength, maximal power of 10 W. The optical fiber (diameter) of 200 µm was used. Output energy at the end of optical fiber was controlled with laser power meter Gentec UNO with the head UP19K-15S-H5 – 15 J (Gentec Electro-Optics, Quebec City, Canada).

The application of laser light

In Groups 1–4, the laser light was applied in a continuous wave mode of diode laser (Diode LX mini, Lasotronix). In Group 5, the laser light was applied in a pulsed mode. The time of pulse and interval was 300 ms each. The optical fiber was introduced to the canal at the distance of 1 mm from the apical region, and then withdrawn with helicoidal movement with the speed of approx. 2 mm/s.

Output energy, defined as energy at the end of optical fiber, was measured each time with the laser power detector Gentec UNO with the head UP19K-15S-H5 – 15 J (Gentec Electro-Optics, Quebec City, Canada). The procedure has been completed following Gutknecht's recommendations²⁷ (the president of the German Society for Laser in Dentistry). The measurement of *output energy* prior to the application of laser light guarantees the standardization of the procedure of light administration to every sample. In Group 6 (comparison group), the irrigation with 5.25% NaOCl solution was performed with the use of disposable syringe with endodontic needle with lateral opening. The irrigation of the sample lasted for 15 min. Group 7 served as an infection control group. The material was collected immediately after the samples had been infected.

Material collection and statistical analysis

The canals of all studied groups of bovine teeth were prepared with Largo #5 and #6 drills, and the

li McFarlanda, co odpowiada $1,5 \times 10^8$ komórek bakteryjnych w 1 ml. Celem zakażenia próbek, zęby inkubowano w przygotowanej zawieszynie przez 24 godz. (w temp. 37°C w warunkach tlenowych). Po okresie inkubacji materiał podzielono na 7 grup, po 8 zębów w każdej.

Do badań wykorzystano laser diodowy Diode LX mini (Lasotronix, Polska), z końcówką emitującą światło o długości fali 980 nm, mocy maksymalnej 10 W. Używano światłowodu o średnicy 200 µm. Kontrolę wielkości tzw. 'output energy' – energii na wyjściu światłowodu przeprowadzono przy użyciu miernika mocy laserowej Gentec UNO z głowicą UP19K-15S-H5 – 15 J (Gentec Electro-Optics, Quebec City, Canada).

Aplikacja światła laserowego

W grupach 1-4 aplikowano światło laserowe w opcji pracy ciągłej lasera diodowego (Diode LX mini, Lasotronix). W grupie 5 aplikowano światło laserowe w opcji pracy impulsowej. Czas impulsu i czas przerwy wynosiły po 300 ms. Światłowód wprowadzano do kanału na odległość 1 mm od wierzchołka korzenia, a następnie wycofywano ruchem helikoidalnym z prędkością ok. 2 mm/s. Każdorazowo mierzono tzw. 'output energy' – energię na wyjściu światłowodu, za pomocą miernika mocy laserowej Gentec UNO z głowicą UP19K-15S-H5 – 15 J (Gentec Electro-Optics, Quebec City, Canada). Zabieg przeprowadzono zgodnie z zaleceniami Gutknechta,²⁷ prezesa German Society for Laser in Dentistry. Pomiar *output energy* poprzedzający aplikację światła laserowego gwarantuje standaryzację schematów naświetlania każdej próbki.

W grupie 6 (porównawczej) przeprowadzono irygację 5,25% roztworem NaOCl za pomocą jednorazowych strzykawek z igłą endodontyczną z otworem bocznym. Czas płukania 1 próbki wynosił 15 min.

Grupa 7 stanowiła kontrolę zakażenia. Pobranie materiału nastąpiło bezpośrednio po zakażeniu próbek.

Pobranie materiału i analiza statystyczna

Kanały wszystkich badanych grup zębów bydlęcych opracowano za pomocą wiertel Largo #5

obtained dentine shreds were weighted and moved to sterile 0.85% NaCl solution. After disintegration of the material for 30 seconds (ultrasounds amplitude 5 μm) in ultrasonic disintegrator (MSE, Great Britain) and serial dilution (10^{-1} - 10^{-3}) in sterile physiological salt solution, 100 μl of bacterial suspension was cultured on the selective *Enterococcosel Agar*. After 24 hours of incubation in the temperature of 37°C, the colonies were counted on every plate (56 samples x 3 dissolutions = 168 plates). CFU per 1 mg of dentine was determined for each plate. The obtained results were subjected to statistical analysis. Due to the type of studied feature, and also considering its distribution, which significantly diverged from normal distribution, non-parametric tests were used for comparison of means: Mann-Whitney test was used for comparing two independent samples, and Kruskal-Wallis test for comparing several independent groups.

Results

The results of the studies are presented in Tables 1 and 2 and in Figure 1.

As demonstrated in Table 1, statistically significant difference ($p < 0.001$) can be identified when comparing all analysed groups. In the four studied groups (3, 4, 5, 6), minimal CFU/mg value was 0 – no growth of the colonies on the medium was observed. Both the highest maximal CFU/mg value and the highest arithmetical mean, calculated on the basis of all CFU/mg values in the particular group (x), were observed in Group 7 serving as an infection control group.

The mean CFU/mg values for particular groups are presented in Figure 1. As demonstrated in Diagram, the average value of CFU/mg was the highest for Group 7 (infection control) – 52.742×10^3 CFU/mg. Together with the increase in power of diode laser irradiation, the decrease in the size of *E. faecalis* population was observed. As shown in Table 2, a statistically significant reduction in the size of *E. faecalis* population was observed in the groups subjected to the application of laser light of 1250 mW (Group 3) and 1500 mW (Group 4) in a continuous wave laser mode. The most statistically significant reduction in population of pathogen

i #6, a uzyskane wiórki zębinowe ważono i przenoszono do jałowego 0,85% roztworu NaCl. Po rozseparowaniu materiału, trwającym 30 sekund (amplituda ultradźwięków 5 μm) w dezintegratorze ultradźwiękowym (MSE, Wielka Brytania) i seryjnym rozcieńczeniu (10^{-1} - 10^{-3}) w jałowym fizjologicznym roztworze soli, wysiewano na wybiórcze podłoże *Enterococcosel Agar* po 100 μl zawiesiny bakteryjnej. Po 24-godzinnej inkubacji w temp. 37°C liczono kolonie na wszystkich płytkach (56 próbek x 3 rozcieńczenia = 168 płytek). Dla każdej określono liczbę CFU (Colony Forming Units) w przeliczeniu na 1 mg zębiny. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Ze względu na rodzaj badanej cechy, a także na jej rozkład, który odbiegał istotnie od rozkładu normalnego, celem porównania średnich posłużono się testami nieparametrycznymi: dla porównania dwóch prób niezależnych zastosowano test Manna-Whitney'a, a w przypadku porównań kilku grup niezależnych zastosowano test Kruskala-Wallisa.

Wyniki

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabelach 1 i 2 oraz na rycinie 1.

Jak wynika z tabeli I, można stwierdzić istotną statystycznie różnicę ($p < 0,001$), porównując ze sobą wszystkie analizowane grupy. W czterech spośród badanych grup (3, 4, 5, 6) minimalna wartość CFU/mg zębiny wyniosła 0 – nie obserwowano wzrostu kolonii na podłożu.

Zarówno największą wartość maksymalną CFU/mg, jak i największą średnią arytmetyczną, wyliczoną na podstawie wszystkich wartości CFU/mg w danej grupie (x), obserwowano w grupie 7, która stanowiła kontrolę zakażenia.

Średnie wartości CFU/mg zębiny dla poszczególnych grup przedstawiono na rycinie 1. Jak wynika z wykresu, średnia wartość CFU/mg zębiny była najwyższa dla grupy 7 (kontrola zakażenia) – $52,742 \times 10^3$ CFU/mg. Wraz ze wzrostem wartości mocy promieniowania lasera diodowego, obserwowano spadek liczebności populacji *E. faecalis*.

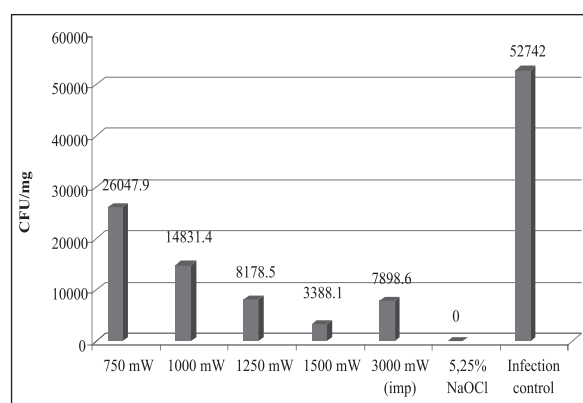
Jak wynika z tabeli 2, istotną statystycznie redukcję liczebności populacji *E. faecalis* obserwowano w grupach poddanych aplikacji światła lase-

Table 1. Statistical analysis of the results in individual groups. The values of arithmetical means (x), median (Me), standard deviations (SD) and coefficient of variation (v[%]).

Group	Calculated parameters [CFU/mg]					
	min	max	x	Me	SD	v[%]
1 (750 mW, CW)	180	80000	26047.9	15106.5	30378.9	116.6
2 (1000 mW, CW)	327	78260	14831.4	3275.5	26268.8	177.1
3 (1250 mW, CW)	0	42553	8178.5	3274.5	14195.0	173.6
4 (1500 mW, CW)	0	11764	3388.1	1554.0	3934.2	116.1
5 (3000 mW, pulse)	0	19764	7898.6	6632.0	7585.8	96.0
7 (infection control)	293	133330	52742.0	33009.0	52112.4	98.8
6 (5.25% NaOCl)	0	0	0	0	–	–
Comparison	H=23.516; p < 0,001					

Table 2. The comparison of effectiveness of disinfection in procedures used in every Group with Group 7, serving as an infection control group.

Compared Groups	Test vale with	Significance p
Group 1 (750 mW, CW) with Group 7 (infection control)	1.107	p > 0.05
Group 2 (1000 mW, CW) with Group 7 (infection control)	1.588	p > 0.05
Group 3 (1250 mW, CW) with Group 7 (infection control)	2.165	p < 0.05
Group 4 (1500 mW, CW) with Group 7 (infection control)	3.055	p < 0.01
Group 5 (3000 mW, pulse) with Group 7 (infection control)	1.919	p = 0.055
Group 6 (5.25% NaOCl) with Group 7 (infection control)	3.123	p < 0.01

**Fig. 1.** Mean values CFU/mg of dentine depending on the completed procedures.

Średnie wartości CFU/mg zębiny w zależności od przeprowadzonych procedur.

rowego o wartości mocy 1250 mW (Grupa 3) oraz 1500 mW (Grupa 4) w opcji pracy ciągłej lasera. Największą istotną statystycznie redukcję liczebności populacji patogenu odnotowano w grupie 6 (porównawczej), w której przeprowadzono irygację kanałów 5,25% roztworem NaOCl.

Omówienie wyników i dyskusja

Wysokoenergetyczny laser diodowy zaczęto wykorzystywać w endodoncji celem dezynfekcji systemu kanałowego już w latach 90 XX w.¹⁷ Aplikowano wtedy światło o wartościach mocy 2 W, 3 W i 4 W w opcji pracy impulsowej lasera (co 0,01 sekundy oraz co 0,02 sekundy), powta-

was identified in Group 6 (comparison group), where the canal was irrigated with 5.25% NaOCl solution.

Results overview and discussion

High-power diode laser was first applied to endodontics in order to disinfect canal system in the 1990s.¹⁷ At that time, the light of 2 W, 3 W and 4 W in a pulsed laser mode (every 0.01 second and every 0.02 second) was applied, and the procedure was repeated 5 times 5 seconds each. No growth of bacterial colonies of *E. faecalis* was observed in the group where the laser light (810 nm) of 4 W was used and applied every 0.01 second.¹⁷

The similar effectiveness of eradication was demonstrated for the light (830 nm) with the power of 3 W, applied four times for 5 seconds.⁴ In the available literature, there are no reports on detecting the minimum effective dose of diode laser radiation in a continuous wave mode (CW) of diode laser or the comparison of the effectiveness of disinfection with the light pulses applied without any intervals. In the reports concerning the impact of the application of diode laser light (808 nm) of 2.5 W (CW) on the canal walls of extracted human teeth, the researchers report high percentage of closed dentinal tubules in the apical region of the canals.²

In 2000, Gutknecht et al.²⁹ performed studies on the disinfecting effect of diode laser (810 nm) in elimination of *E. faecalis* in a continuous wave mode, with the use of 400 µm gradually tapering optical fiber. The application of laser light took place at an angle of 5° in relation to bovine dentine disc of the thickness 300 µm and 500 µm. The value dose of radiation power at the optical fiber output, measured prior to every application equalled 0.6 W. The irradiation of one sample lasted for 30 seconds. The reduction in the *E. faecalis* population on the level of 74% on average for the 500µm-thick discs was observed. Therefore, the disinfecting effect of diode laser in the deeper layers of dentine has been proved. However, no other radiation parameters were used and the obtained results were not compared with conventionally applied agents.

The assumptions of the present study were

rzając zabieg 5 razy po 5 sekund. Brak wzrostu kolonii bakteryjnych *E. faecalis* zaobserwowano w grupie poddanej działaniu światła laserowego (810 nm) o wartości mocy 4 W, aplikowanego co 0,01 sekundy.¹⁷ Podobną skuteczność eradykacji wykazano dla światła (830 nm) o wartości mocy 3 W, aplikowanego 4 razy przez 5 sekund.⁴ W dostępnym piśmiennictwie brak jest doniesień na temat poszukiwania minimalnej skutecznej wartości mocy promieniowania w opcji pracy ciągłej lasera diodowego (Continuous Wave – CW) lub porównania skuteczności dezynfekcji światłem aplikowanym impulsowo i bez przerw. W doniesieniu dotyczącym wpływu aplikacji światła lasera diodowego (808 nm) o wartości mocy 2,5 W (CW) na ściany kanałów usuniętych zębów ludzkich, badacze informują o wysokim odsetku zamkniętych kanalików zębinowych w rejonie przywierzchołkowym kanałów.²⁸

W 2000 r. Gutknecht i wsp.²⁹ przeprowadzili badania skuteczności dezynfekcyjnej lasera diodowego (810 nm) w eliminacji *E. faecalis* w opcji pracy ciągłej lasera, przy użyciu światłowodu o średnicy 400 µm ze zwężającą się końcówką. Aplikacja światła laserowego odbywała się pod kątem 5° względem krążków zębiny bydłowej o grubości 300 µm i 500 µm. Wartość mocy promieniowania na wyjściu światłowodu, mierzona przed każdą aplikacją, była równa 0,6 W. Naświetlanie jednej próbki trwało 30 sekund. Obserwowano redukcję liczebności populacji *E. faecalis* na poziomie średnio 74% dla krążków o grubości 500 µm. Dowiedziono zatem skuteczności dezynfekcyjnej lasera diodowego w głębszych warstwach zębiny, nie stosowano jednak innych parametrów naświetlania i nie porównywano otrzymanych wyników z tradycyjnie stosowanymi środkami.

Założenia obecnego badania oparto na wynikach badań przeprowadzonych w zakresie wartości mocy promieniowania od 100 mW do 1500 mW.³⁰ Badacze aplikując światło laserowe w opcji pracy ciągłej lasera diodowego (CW) dla wartości mocy 100 mW i 500 mW nie uzyskali istotnej redukcji liczebności populacji *Enterococcus faecalis*. Zgodnie z wysnutymi wnioskami, w obecnym eksperymencie minimalnej skutecznej wartości mocy w eliminacji *E. faecalis* poszukiwano w przedziale

based on the results of studies on the value of irradiation doses from 100 mW to 1500 mW.³⁰ The researchers, when applying the laser light in a continuous wave (CW) mode of the diode laser for irradiation doses 100 mW and 500 mW, did not obtain the significant reduction in *Enterococcus faecalis* population size. According to the results obtained in the present experiment, the minimum effective irradiation dose in elimination of *Enterococcus faecalis* was searched for in the range from 750 mW to 1500 mW (CW). One group that was subjected to pulse laser light application (Group 5) was also involved in the study in order to compare the therapeutic effect of the laser in two different working modes. All groups were subjected to single irradiation.

Effective disinfection with the laser was compared to the traditionally used irrigant such as sodium hypochlorite in the concentration of 5.25%.³¹⁻³⁵ In the group subjected to 15-minute irrigation with 5.25% NaOCl (Group 6), complete eradication of pathogen population was obtained. The results confirm the current reports of other researchers.^{36,37} The bactericidal effect described above is assigned to hypochlorite acid and active chlorine.^{7,38} The rinsing duration of 15 min is recommended by the researchers, which is the contact time with irrigant in case of chemomechanical preparation of the canal of the average difficulty level.³⁹

The method developed by Ørstavik and Haapasalo⁴⁰ involving mechanical removal of canal dentine, was selected from the various methods of microbiological material collection from the interior of the canals.^{17,25} Next, dentine shreds were disintegrated in ultrasonic disintegrator. This method is considered to be the most effective in quantitative studies.^{40,41}

Among the groups subjected to laserotherapy, the most statistically significant reduction in *E. faecalis* population was noted in Groups 3 and 4, which were exposed to laser light of 1250 mW and 1500 mW power values, respectively, and in a continuous wave mode.

It is in accordance with the results of pilot studies which lead to the conclusion about the validity of identifying the minimum effective diode

750 mW – 1500 mW (CW). Włączono także jedną grupę poddaną impulsowej aplikacji światła laserowego (Grupa 5), celem porównania skuteczności terapeutycznej dwóch odmiennych opcji pracy lasera. Wszystkie grupy były poddawane jednokrotnemu naświetlaniu.

Efektywność dezynfekcji laserem porównywano z tradycyjnie stosowanym środkiem płuczającym, jakim jest podchloryn sodu w stężeniu 5,25%.³¹⁻³⁵ W grupie poddanej 15-minutowej irygacji 5,25% NaOCl (Grupa 6) osiągnięto całkowitą eliminację populacji patogenu. Uzyskane wyniki potwierdzają aktualne doniesienia innych badaczy.^{36,37} Powyższy efekt bakteriobójczy przypisuje się działaniu kwasu podchlorawego i aktywnego chloru.^{7,38} Czas płukania – 15 minut jest zgodny z zaleceniami badaczy, gdyż tyle wynosi czas kontaktu ze środkiem płuczającym w przypadku chemomechanicznego opracowania kanału o średnim poziomie trudności.³⁹

Spośród różnych metod pobierania materiału mikrobiologicznego z wnętrza kanałów^{17,25} wybrano metodę opracowaną przez Ørstavik i Haapasalo⁴⁰ polegającą na mechanicznym usunięciu zębiny kanałowej. Następnie rozseparowano wiórki zębiny w dezintegratorze ultradźwiękowym. Sposób ten jest polecany jako najbardziej precyzyjny w badaniach ilościowych.^{40,41}

Spośród grup poddanych laseroterapii największe istotne statystycznie redukcje liczebności populacji *E. faecalis* odnotowano w Grupach 3 i 4, poddawanych aplikacji światła laserowego o wartościach mocy odpowiednio 1250 mW i 1500 mW w opcji pracy ciągłej lasera. Jest to zgodne z wynikami badań pilotażowych, na podstawie których wysnuto wniosek o zasadności poszukiwania minimalnej skutecznej wartości mocy promieniowania lasera diodowego koniecznej do eradykacji populacji *E. faecalis* z zakażonych korzeni zębów bydlęcych w przedziale 750-1500 mW.³⁰ Wyniki obecnego eksperymentu pozwalają zawęzić przedział wartości mocy od 1250 mW do 1500 mW.

W grupie 5, poddawanej aplikacji światła laserowego o wartości mocy 3000 mW w impulsach trwających 300 ms, osiągnięto poziom redukcji liczebności populacji patogenu bliski istotności statystycznej (Tab. 2). Powyższy wynik przypisuje

laser irradiation dose necessary for eradication of *E. faecalis* population from the infected roots of bovine teeth in the range of 750 – 1500 mW.³⁰ The results of the present study allow narrowing the searched minimum effective dose from 1250 mW to 1500 mW. In Group 5, subjected to the application of laser light of 3000 mW power value in pulses lasting 300 ms, the level of reduction in the size of pathogen population was close to the statistical significance (Tab. 2). The above result is attributed to radiation parameters. The reports on the effectiveness of laserotherapy in elimination of *E. faecalis* refer to the procedure of multiply application of laser light in pulses every 0.01 second, therefore, the contact of bacterial cells with radiation was each time longer and repeated four or five times.^{4,17} In the present study, the procedure was intentionally limited to a single application of laser light in all groups, consequently leading to the standardization of the results.

Conclusion

The performed laboratory studies prove that diode laser can be a useful tool in disinfection of the root canal system infected with *Enterococcus faecalis*.

się parametrom naświetlania. Doniesienia o skuteczności laseroterapii w eliminacji *E. faecalis* dotyczą procedury kilkukrotnej aplikacji światła lasera w impulsach co 0,01 sekundy, zatem kontakt komórek bakteryjnych z promieniowaniem był w przytoczonych badaniach każdorazowo dłuższy i powtarzany 4 lub 5 razy.^{4,17} W niniejszym badaniu celowo ograniczono procedurę do jednokrotnej aplikacji światła laserowego we wszystkich grupach, umożliwiając tym samym standaryzację wyników.

Wnioski

Przeprowadzone badania laboratoryjne dowodzą, iż laser diodowy może być pomocnym narzędziem w dezynfekcji przestrzeni kanału korzeniowego zakażonego *Enterococcus faecalis*.

References

1. Haapasalo M, Udnæs T, Endal U: Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod Topics* 2003; 6; 29-56.
2. 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.
3. Pinheiro ET, Anderson MJ, Gomes BP, Drucker DB: Phenotypic and genotypic identification of enterococci isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 137-144.
4. De Souza EB, Cai S, Simionato MRL, Lage-Marques JL: High-power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106: e68-72.
5. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K: An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001; 34; 300-307.
6. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ: Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; 28: 689-693.
7. Lima KC, Fava LR, Siqueira JF: Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* 2001; 27: 616-619.
8. Stuart CH, Schwartz S, Beeson TJ, Owatz CB:

- Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32: 93-98.
9. *Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB*: Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 95-101.
 10. *Haapasalo M, Shen YA, Ricucci D*: Reasons for persistent and emerging post-treatment endodontic disease. *Endod Topics* 2011; 18: 31-50.
 11. *Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D*: Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35: 221-228.
 12. *Nair PN*: On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006; 39: 249-281.
 13. *Lins RX, de Oliveira Andrade A, Hirata Junior R, Wilson MJ, Lewis M A Williams DW, et al.*: Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. *J Dent* 2013; 41: 779-786.
 14. *Fux C, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P*: Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005; 13: 34-40.
 15. *Stewart PS, Costerton JW*: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-138.
 16. *Kouchi Y, Ninomiya J, Yasuda H, Fukui K, Moriyama T, Okamoto H*: Location of *Streptococcus mutans* in the dentinal tubules of open infected root canals. *J Dent Res* 1980; 59: 2038-2046.
 17. *Gutknecht AMN, Schoop KGU*: In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: Results of microbiologie, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. 1997; 28: 205-210.
 18. *Berutti E, Marini R, Angeretti A*: Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod* 1997; 23: 725-727.
 19. *Klinke T, Klimm W, Gutknecht N*: Antibacterial effects of Nd: YAG laser irradiation within root canal dentin. *J Clin Laser Med Surg* 1997; 15: 29-31.
 20. *Diallo B, Diatta M*: Evaluation de la hauteur du delta apical des dents antérieures maxillaires. Intérêt chirurgical. *Odontostomatol Trop* 2002; 25: 33-36.
 21. *Martins MR, Carvalho MF, Vaz IP, Capelas J, Martins M, Gutknecht N*: Efficacy of Er, Cr: YSGG laser with endodontical radial firing tips on the outcome of endodontic treatment: blind randomized controlled clinical trial with six-month evaluation. *Lasers Med Sci* 2013; 28: 1049-1055.
 22. *Vaarkamp J, ten Bosch JJ, Verdonschot EH*: Propagation of light through human dental enamel and dentine. *Caries Res* 1995; 29: 8-13.
 23. *Odor TM, Chandler NP, Watson TF, Ford TR, McDonald F*: Laser light transmission in teeth: a study of the patterns in different species. *Int Endod J* 1999; 32: 296-302.
 24. *Da Costa Ribeiro A, Nogueira GEC, Antoniazzi JH, Moritz A, Zzell DM*: Effects of diode laser (810 nm) irradiation on root canal walls: thermographic and morphological studies. *J Endod* 2007; 33: 252-255.
 25. *Schoop U, Kluger W, Moritz A, Nedjelik N, Georgopoulos A, Sperr W*: Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers Surg Med*; 35: 111-116.
 26. *Gutknecht N, Alt T, Slauss G, Bottenberg P, Rosseel P, Lauwers S, et al.*: A clinical comparison of the bactericidal effect of the diode laser and 5% sodium hypochlorite in necrotic root canals. *J Oral Laser Applications* 2002; 2, 151-158.
 27. *Gutknecht N, Moritz A, Conrads G, Sievert T, Lampert F*: Bactericidal effect of the Nd: YAG laser in in vitro root canals. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14: 77-80.
 28. *Parirokh M, Eghbal MJ, Asgary S, Ghoddusi J, Stowe S, Forghani F, et al.*: Effect of 808nm diode laser irradiation on root canal walls after smear layer removal: A scanning electron microscope study. *Iran Endod J* 2007; 2: 37-42.
 29. *Gutknecht N, van Gogswaardt D, Conrads G, Apel C, Schubert C, Lampert F*: Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. *J Clin Laser Med Surg* 2000; 18: 57-60.
 30. *Grącka-Mańkowska J, Pawlicka H*: Badanie wpływu promieniowania laserowego na liczebność populacji *Enterococcus faecalis* w kanałach zębów. *Doniesienie wstępne. Mag Stomatol* 2013; 6: 82-85.
 31. *Vianna ME, Gomes BPF*: Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107: 585-589.
 32. *Sena NT, Gomes BPF, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al.*: In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006; 39: 878-885.
 33. *Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB,*

- Teixeira FB, Souza-Filho FJ:* In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34: 424-8.
34. *Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G:* In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J* 2006; 39: 484-492.
35. *Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, et al.:* Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 2006; 39: 10-17.
36. *Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, et al.:* Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004; 37: 438-446.
37. *Meire M, De Prijck K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJ:* Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *Int Endod J* 2009; 42: 351-359.
38. *Zehnder M:* Root canal irrigants. *J Endod* 2006; 32: 389-398.
39. *Eldeniz AU, Ozer F, Hadimli HH, Erganis O:* Bactericidal efficacy of Er,Cr: YSGG laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with NaOCl irrigation: an ex vivo pilot study. *Int Endod J* 2007; 40: 112-119.
40. *Orstavik D, Haapasalo M:* Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 142-149.
41. *Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ:* Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001; 27: 76-81.

Adres: 92-216 Łódź, ul. Pomorska 251
Tel.: +4842 6757418, Fax: +4842 6757418
e-mail: endo@csk.umed.lodz.pl

Received: 27th July 2014
Accepted: 1st January 2015