

GELENEKSEL ENDODONTİK DEZENFEKTANLARIN *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ÜZERİNDE ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITIES ON *ENTEROCOCCUS FAECALIS* OF CONVENTIONAL ENDODONTIC DISINFECTANTS

Güven KAYAOĞLU¹

Gülçin AKCA²

Hülya ERTEN³

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, iki endodontik dezenfektanın (kalsiyum hidroksit ve klorheksidin) ve bunların kombinasyonunun *Enterococcus faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin herhangi bir konakçı faktörünün katılmadığı saf *in vitro* deney şartları altında test etmektir.

Gereç ve Yöntem: *Enterococcus faecalis* A197A kökeni tripton soya besiyerinde çoğaltıldı ve süspansiyon standardize edildi. Dört mm çapında filtre kağıdı diskleri, hazırlanan bakteri süspansiyonu içerisinde kontamine edilerek teflon gözlemlere yerleştirildi. Kalsiyum hidroksitin doymuş sulu çözeltisi [Ca(OH)₂-su], kalsiyum hidroksitin % 0.5'lik klorheksidin içerisindeki doymuş çözeltisi [Ca(OH)₂-CHX], % 0.5'lik klorheksidin diglukonat (CHX) veya pozitif kontrol olarak fosfat-tamponlu salin (PBS) 75 µL hacimlerde pipetlenerek gözlemlere alındı. Diskler 37°C'de 1 veya 24 saat enkübe edildi. Diskler gözlemlerden çıkartılarak 2 mL PBS içerisine atıldı ve cam boncuk eşliğinde vortekslendi. Seri dilüsyon ardından 25 µL damlalar halinde tripton soya agar üzerine ekim yapıldı. Plaklar 37°C'de bir gün enkübe edildi ve koloni sayıları incelendi.

Bulgular: Dezenfektanlara 1 ve 24 saat maruz bırakılan örnekler için plakların hiçbirinde bakteri üremesi görülmedi. Kontrol olarak PBS uygulanan kağıt disklerde bakteri üremesi görüldü; 1 ve 24 saatlik örnekler arasında bakteri sayısı bakımından anlamlı fark bulunmadı (6.45±0.09 ve 6.40±0.14 log₁₀CFU/mL, sırasıyla; p>0.05).

Sonuç: Dentin faktörünün katılmadığı *in vitro* şartlarda Ca(OH)₂-su, CHX ve Ca(OH)₂-CHX kombinasyonu çok iyi antibakteriyel etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal, bakteri, dezenfeksiyon, endodonti, *Enterococcus faecalis*

SUMMARY

Objective: To investigate the antibacterial activity of two endodontic disinfectants (calcium hydroxide and chlorhexidine) and their combination on *Enterococcus faecalis* in pure *in vitro* conditions.

Material and Method: *Enterococcus faecalis* A197A was grown in tryptone soy broth and the bacterial suspension was standardized. Filter paper discs with 4 mm diameter were dipped into the bacterial suspension and placed in teflon wells. Saturated solution of calcium hydroxide in water [Ca(OH)₂-water] or in chlorhexidine 0.5 % [Ca(OH)₂-CHX], chlorhexidine digluconate 0.5 % or phosphate-buffered saline (PBS; control) were added to wells at a volume of 75 µL. The discs were treated either for 1 or 24 hours, removed from wells, added into tubes containing 2 mL of PBS and glass beads and vortexed. Following serial dilution, 25 µL droplets were seeded onto tryptone soy agar plates. The plates were incubated at 37°C for one day and colonies were counted.

Results: No bacterial growth was observed for samples exposed 1 or 24 h to disinfectants. Bacterial growth was observed in the control group; no significant difference was found between the 1 and 24 h groups (6.45±0.09 and 6.40±0.14 log₁₀CFU/mL, respectively; p>0.05).

Conclusion: In *in vitro* conditions, Ca(OH)₂-water, CHX and Ca(OH)₂-CHX combination exhibited very strong antibacterial activity

Key Words: Antimicrobial, bacteria, disinfection, endodontics, *Enterococcus faecalis*

Makale Gönderiliş Tarihi : 31.03.2010

Yayına Kabul Tarihi : 23.05.2010

¹Gazi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti Anabilim Dalı, Dr.

²Gazi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Dr.

³Gazi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti Anabilim Dalı, Prof. Dr.

GİRİŞ

Bakteriler, pulpal ve periradiküler iltihabi hastalıkların meydana gelmesinde ana etkenlerdendir^{10,19}. Bu nedenle, endodontik tedavinin başlıca amacı kök kanal sistemini bakterilerden arındırmak ve yeniden bakteri çoğalmasına izin vermemek üzere sızdırmaz bir şekilde doldurmaktır.

Enterococcus faecalis Gram-pozitif, fakültatif anaerobik, hareketsiz, spor oluşturmeyen, kok şeklinde bakteridir. Hastane kaynaklı (nozokomiyal) enfeksiyonlarda rol oynayan başlıca bakterilerden biri olup, bağışıklık sistemi zayıf hastalarda ölümcül enfeksiyonlara yol açabilmektedir⁹. Bunun yanı sıra endodontik enfeksiyonlarda da rol oynamaktadır; kanal tedavisine rağmen iyileşmeyen inatçı periradiküler lezyonlu dişlerin kanal örneklerinin büyük kısmında *Enterococcus faecalis* bulunmaktadır^{16,17}. Bunun en önemli nedenlerinden biri bakterinin günümüzde en sık kullanılan endodontik dezenfektanlarla etkin bir şekilde yok edilememesidir^{15,20}. Kimyasallara karşı bu direnç kısmen bakterinin gelişmiş stres-cevap mekanizmaları ve hücre membranı kaynaklı proton-transport sistemi ile açıklanmaktadır^{1,3,5,14}. Bunun yanı sıra dentin, kollajen ve serum gibi konakçı faktörlerinin de deney ortamında bulunması bakterinin hayatta kalmasını çoğunlukla bakteri lehinde etkilemektedir^{8,12}. Dentin varlığında *Enterococcus faecalis*, kalsiyum hidroksit-su karışımından çok az etkilenirken, kalsiyum hidroksit-klorheksidin kombinasyonu veya yalnızca klorheksidin bakteri üzerinde daha iyi antibakteriyel etki göstermektedir^{2,6,15}.

Bu çalışmanın amacı, iki endodontik dezenfektanın (kalsiyum hidroksit ve klorheksidin) ve bunların kombinasyonunun *Enterococcus faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin herhangi bir konakçı faktörünün katılmadığı *in vitro* deney şartları altında test etmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri kültürü

Bu deneyde *Enterococcus faecalis* A197A kökeni¹⁸ kullanıldı. Buzdolabında +4°C'de agar plaklarında muhafaza edilen bakteri kültüründen tek koloni seçilerek 50 mL tripton soya besiyerine (TSB, Oxoid Ltd., İngiltere) inoküle edildi ve bir gece 37°C'de en-

kübe edildi. Bakteri süspansiyonu yoğunluğu OD₅₄₀ = 0.4'e ayarlandı.

Dezenfektanlar

Kalsiyum hidroksitin doymuş sulu çözeltisi [Ca(OH)₂-su]: 100 mL steril distile suda 2 g kalsiyum hidroksit tozunun (Merck, Almanya) iki gün çözülmesiyle elde edildi. Kullanımdan önce süpernatant pipetle alınarak 0.2 µm por-çaplı filtreden geçirildi. Kalsiyum hidroksitin klorheksidin içerisindeki doymuş çözeltisi [Ca(OH)₂-CHX]: 100 mL % 0.5'lik klorheksidin diglukonat (Sigma, Amerika) içerisinde 2 g kalsiyum hidroksit tozunun (Merck, Almanya) iki gün çözülmesiyle elde edildi. Çözelti kullanımdan önce yukarıda bahsedilen şekilde filtre edildi. Ayrıca % 0.5'lik klorheksidin diglukonat çözeltisi (CHX) test edildi. Pozitif kontrol olarak fosfat-tamponlu salin (PBS) çözeltisi kullanıldı.

Deney düzeni

Bu deneyde Waltimo ve arkadaşları^{21,22} tarafından geliştirilen filtre kağıdı yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. Bu yöntem, standart filtre kağıdı disklerine mikroorganizma süspansiyonu emdirilmesini ve böylelikle taşınabilir ve birbirine denk test hedefleri oluşturulmasını içerir. Çalışmamızda modifiye edilmiş başlıca unsurlar: test edilen mikroorganizma türü/kökeni, emdirme süresi ve uygulanan dezenfektan miktarıdır. Çalışmada 4 mm çapında filtre kağıdı diskleri (n=8; Whatman no.3: Whatman, İngiltere), hazırlanan bakteri süspansiyonu içerisinde 1 dakika bekletildi ve sıvının fazlası süzdürülerek diskler 5 mm çapında, 3 mm derinliğinde steril teflon gözlerle yerleştirildi. Herbir dezenfektandan gözlerin alabileceği 75 µL hacim pipetle çekilerek disk üzerine alındı. Teflon kalıp, tabanı su dolu, kapaklı bir kutuya konularak 37°C'de 1 veya 24 saat enkübe edildi. Bu süre sonunda diskler gözlerden çıkartıldı, dezenfektanın fazlası süzdürülerek diskler 2 mL PBS içerisine atıldı. Herhangi bir nötralizasyon işlemi yapılmadı; deneyden önce yapılan bir metodolojik çalışmada, kağıt filtre üzerinde taşınan az miktarda dezenfektanın 2 mL'lik PBS içerisinde sulanmasının ardından belirgin bir antimikrobiyal etkisinin kalmadığı tespit edilmişti. PBS içerisinde cam boncuklarla beraber 30 sn vorteksleme ve seri dilüsyon ardından 25 µL damlalar halinde TSA üzerine ekim yapıldı. TSA plakları

37°C'de bir gün enkübe edildi ve koloni oluşumu incelendi. Deneysel 8 paralel şekilde yürütüldü. Deneysel bakteri saptama limiti 40 CFU/mL'ydı. Bakteri sayıları log₁₀ değerlerine dönüştürüldükten sonra, veri t-testi ile % 5 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak analiz edildi.

BULGULAR

Dezenfektanlara 1 ve 24 saat maruz bırakılan örnekler için plakların hiçbirinde bakteri üremesi görülmedi. Dezenfektan yerine kontrol olarak PBS uygulanan kağıt disklerde bakteri üremesi görüldü; 1 saat PBS'ye maruz bırakılan örneklerde 6.45±0.09 (ortalama±standart sapma) Log₁₀CFU/mL ve 24 saat PBS'ye maruz bırakılan örneklerde 6.40±0.14 Log₁₀CFU/mL kulture-edilir bakteri bulundu. Bu iki değer arasında anlamlı fark bulunmadı (p>0.05). Deneysel sonuçları Şekil 1'de gösterilmektedir.

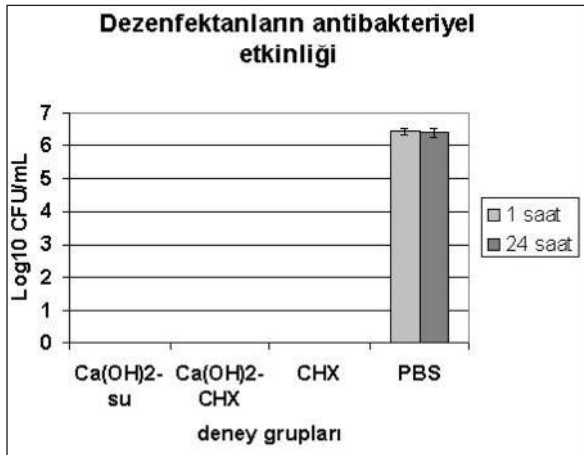
TARTIŞMA

Endodontik tedavinin başlıca amaçlarından biri kök kanal sistemindeki mikroorganizmaların yok edilmesidir. Kök kanal enstrümantasyonu ile mikroorganizmaların tamamı uzaklaştırılmamakta ve bu nedenle dezenfektan etkinliği bulunan irrigasyon çözeltileri ve pansuman maddeleri kullanılmaktadır. Kalsiyum hidroksit, klorheksidin ve bunların kombinasyonu endodontik tedavide sık kullanılan dezenfektanlardır. Bu çalışmanın ana bulgusu *in vitro* şartlarda Ca(OH)₂, CHX, ve Ca(OH)₂-CHX kombinasyonunun çok iyi antibakteriyel etki gösterdiğiidir.

Bu çalışmada kullanılan filtre kağıdı yöntemi, kolay ve hızlı olması ve örnekler arasında düşük standart sapma göstermesi gibi avantajlara sahiptir. Diğer taraftan, bulgular yorumlanırken bu yöntemin kısıtlamaları göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, serum, kan, kollajen gibi konakçı faktörlerinin deney düzeninde bulunmayışı bu yöntem ile elde edilen sonuçların *in vivo* paralellliğini kısıtlamaktadır. Benzer şekilde, bakteri için korunma sağlayan dentin tübülünün bu yöntemde bulunmayışı, sonuçların dezenfektan lehine gözükmesine yol açabilmektedir. Ancak yine de bu deney düzeninde ortam her test maddesi için aynıydı ve bu deneyde amaç konakçı faktörlerinin olmadığı bir ortamda bakterinin yalnızca kendi korunma mekanizmalarıyla ne derece dayanabildiğini incelemektir.

Filtre kağıdı yöntemi ile daha önce endodontik dezenfektanların *Candida albicans* ve *Enterococcus faecalis*'e karşı antimikrobiyal etkinlikleri incelenmiştir^{21,22}. Bu çalışmaların birinde, dirençli bir kanal patojeni olan *C. albicans* % 0.5'lik CHX asetat ile çok kısa sürede elimine edilirken, Ca(OH)₂'nin doymuş sulu çözeltisi 1 ve 24 saatte etkili olmamış, Ca(OH)₂-CHX doymuş çözeltisi ise 1 saatte kısmen, 24 saatte ise tamamen etkili olmuştur²². *Enterococcus faecalis* ise 1 saat süresince Ca(OH)₂'nin doymuş sulu çözeltisine maruz bırakıldığında, hayatta kalan bakteri sayısı % 0.007'ye kadar azalmış, ancak tamamen yok edilememiştir²¹. Bu noktada, burada sunulan çalışmayla Waltimo ve arkadaşları²¹ çalışması sonuçları arasında bir ayrılık vardır. Bu da test edilen bakteri kökenlerinin, bakteri süspansiyonlarının hazırlanışlarının ve ekim yapılan katı besiyeri ortamlarının farklılığı gibi metodolojik farklılıklarla açıklanabilir. Filtre kağıdı yöntemi, dezenfektanların test edilmesinde kullanılabilirliği gibi yeni karıştırılmış kanal patlarının antibakteriyel etkinliğinin test edilmesinde de kullanılmıştır¹¹.

Enterococcus faecalis süspansiyonlarının konakçı faktörleri dahil edilmeden dezenfektanlara karşı test edildiği çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bunlardan biri esasen metodolojik bir çalışma olup *Enterococcus faecalis* süspansiyonları % 2'lik CHX ile 1 saat, Ca(OH)₂ ile 1 hafta süresince muamele edilmiş ve sonucunda her iki grupta da negatif kültür elde edilmiştir⁴. Bir diğer çalışmada ise 'doğrudan temas' testi



Şekil 1. Dezenfektanlara veya PBS'ye (kontrol) 1 veya 24 saat süreyle maruz bırakılan bakteri-empirilmiş filtre kağıdı disklerine ait kültür sonuçları (n= 8)

yoluyla *Enterococcus faecalis* süspansiyonları Ca(OH)₂-su patı, Ca(OH)₂-% 2 CHX patı ve % 2 CHX jeli ile 24-gözlü hücre kültür plağı gözlerinde muamele edilmiştir⁷. Bunun sonucunda, bakterinin Ca(OH)₂-su patı ile en erken 24 saatte, Ca(OH)₂-% 2 CHX patı ile en erken 1 saatte, % 2 CHX jeli ile 1 dakikada elimine edildiği bulunmuştur⁷. Bahsedilen çalışmada Ca(OH)₂-su patının bizim çalışmamızın bulgusuna kıyasla daha geç bakteri eliminasyonu yapmasının nedeni, pat halindeki materyalin etkisini gösterebilmesi için öncelikle çözünmesi ve reaktif hidroksil iyonlarını (OH⁻) açığa çıkarması gerekliliğidir. Halbuki, bizim çalışmamızda zaten çözünmüş Ca(OH)₂ kullanılmıştı; dolayısıyla antibakteriyel etki daha çabuk gözlemlendi. Gomes ve arkadaşları⁷ çalışmasının CHX ve Ca(OH)₂-CHX kombinasyonu ile ilgili kısımları, test edilen CHX dozunun bizim çalışmamızda test edilenkinden daha yüksek olması ile beraber, bizim bulgularımıza benzerlik göstermektedir.

Ca(OH)₂ ve CHX'in burada sunulan çalışmada gösterilen yüksek etkinliğinin dentin silindiri veya kök kanalı enfeksiyon modellerinde tekrar edilemediği görülmektedir^{15,20}. Bunun nedenleri arasında dentinin dezenfektanlar üzerindeki nötrale edici etkisi⁸ ve reaktif iyonların dentin tübüleri boyunca difüzyon göstererek tübül derinliğindeki bakteriye ulaşabilmeleri gerekliliği başta gelmektedir. Planktonik (serbest-yüzer) bakteri üzerinde öldürücü olabilecek doz bu engelleri aşarak bakteriye ulaşsa bile biofilm organizasyonu içerisindeki veya dentin organik komponentine bağlanmış bakteri etkili doza direnç gösterebilmektedir^{12,13}. Bunun yanısıra bakterinin olumsuz koşullara yüksek adaptasyon yeteneği onun öldürücü dozlardan korunmasını sağlamaktadır^{1,3,5,14}.

Dentin faktörünün katılmadığı bu çalışmanın sonucunda: dezenfektanların aslında bakteri üzerinde çok etkili olduğu anlaşılmış, bakterinin bahsedilen adaptasyon mekanizmalarının bu kadar yüksek dezenfektan konsantrasyonlarında bakteriyi koruyamadığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Appelbe OK, Sedgley CM. Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. *Oral Microbiol Immunol* 22: 169-174, 2007.

2. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 96: 618-624, 2003.
3. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 35: 221-228, 2002.
4. Fouad AF, Barry J. The effect of antibiotics and endodontic antimicrobials on the polymerase chain reaction. *J Endod* 31: 510-513, 2005.
5. Giard JC, Laplace JM, Rincé A, Pichereau V, Benachour A, Leboeuf C, Flahaut S, Auffray Y, Hartke A. The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis* 22: 2947-2954, 2001.
6. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 36: 267-275, 2003.
7. Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102: 544-550, 2006.
8. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod* 33: 917-925, 2007.
9. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 7: 462-478, 1994.
10. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20: 340-349, 1965.
11. Kayaoglu G, Erten H, Alaçam T, Ørstavik D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 38: 483-488, 2005.
12. Kayaoglu G, Erten H, Bodrumlu E, Ørstavik D. The resistance of collagen-associated, planktonic cells of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *J Endod* 35: 46-49, 2009.
13. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod* 36: 630-635, 2010.
14. Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, Takahashi N. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol* 21: 283-288, 2006.
15. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 6: 142-149, 1990.
16. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 32: 173-177, 2006.
17. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97: 85-94, 2004.
18. Sirén EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 30: 91-95, 1997.

19. Sundqvist G. Bacterial studies of necrotic dental pulps. Doktora tezi. Umeå, İsveç: Umeå Üniversitesi, 1976.
20. Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. *Int Endod J* 38: 697-704, 2005.
21. Waltimo TM, Sirén EK, Orstavik D, Haapasalo MP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* 32: 94-98, 1999.
22. Waltimo TM, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 32: 421-429, 1999.

Yazışma Adresi

Dr. Güven KAYAOĞLU
Gazi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi,
Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı,
Ankara
e-posta: guvenk@gazi.edu.tr

boş