

Klorheksidin Antimikrobiyal Etkisinin Farklı Maddelerle Önlenmesi¹

INHIBITION OF THE ANTIMICROBIAL EFFECTS OF CHLORHEXIDINE BY DIFFERENT AGENTS

Işıl FİDAN*, Sevgi YÜKSEL**, Turgut İMİR***, Semiha ÖZKAN****, Evrim DOĞAN*****

- * Uz.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
** Arş.Gör.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
*** Prof.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
** Yrd.Doç.Dr., Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji AD,
*** Arş.Gör.Dt., Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Protez Anabilim Dalı, ANKARA

Özet

Amaç: Endodontik tedavide kök kanal infeksiyonunun eradikasyonu önem taşımaktadır. Klorheksidin geniş antibakteriyel etkiye sahip bir antiseptiktir ve endodontik tedavide çok etkilidir. Bu çalışmada, yanlış negatif mikrobiyal kültür sonuçlarının önlenmesi için klorheksidin etkisini inaktive eden en etkili maddenin belirlenmesi amaçlandı.

Materyal-Metod: Çalışmada standart *Enterococcus faecalis* (E.faecalis) ATCC 29212 suşu kullanıldı. Klorheksidin etkisini önlemek için L- α lesitin, Tween 80, sodyum tiyosülfat kullanılarak altı inaktive edici solüsyon hazırlandı. İnaktive edici maddeler ayrı ayrı klorheksidinle 5 dakika bekletilip bakteri solüsyonu eklendi. 10 ve 60 dk.larda 100 μ l alınıp kanlı agar besiyerine ekim yapıldı. 72 saat sonra koloniler sayıldı.

Bulgular-Sonuç: %3 Tween 80 ve %0.3 lesitin kombinasyonunun klorheksidin etkisini önlemede en etkili maddeler olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Klorheksidin, İnaktive edici madde

T Klin Diş Hek Bil 2004, 10:1-4

Summary

Purpose: The eradication of the root canal infection is important in endodontic treatment. Chlorhexidine is an antiseptic with a wide antibacterial spectrum. Its bactericidal activity is very effective in endodontic treatment. The aim of this study was to find an effective inactivating agent against chlorhexidine, which may lead to false negative results in microbiological cultures.

Material-Methods: *Enterococcus faecalis* (E.faecalis) ATCC 29212 was used in the study. L- α lecithin, Tween 80, sodium thiosulfate were used to prepare six inactivating solutions. Each inactivating solution was mixed with chlorhexidine at 25°C for 5 minutes. Next, bacterial cell suspension was added to the mixture. At 10 and 60 minutes, 100 μ l suspension was spread over blood agar plates and incubated at 37°C for 72 hours. The number of colony was determined.

Result and conclusion: As a result, the combination of 3% Tween 80 and 0.3%L- α Lecithin was found to be the most effective inactivating agent against chlorhexidine.

Key Words: Chlorhexidine, Inactivating agents

T Klin J Dental Sci 2004, 10:1-4

Diş hekimliğinde pulpa ve periapikal dokuların infeksiyonu endodontinin önemli sorunlarından biridir. Bu bölgelerdeki mikroorganizmaların eradikasyonu endodontik tedavinin prognozu açısından çok önemlidir. Uygun antimikrobiyal tedavinin yapılmaması periapikal kemik lezyonlarının gelişimine neden olabilmektedir (1). Nekrotik pulpa ve apikal periodontitisli dişin endodontik tedavisinde amaç, dolgu yapılmadan önce kök kanal sisteminin mikroorganizmalardan arındırılmasıdır (2).

İnfekte kök kanallarından *Streptococcus*, *En-*

terococcus, *Acinetobacter* gibi aerob ve *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* gibi anaerob mikroorganizmalar izole edilebilir (1).

İnfekte kök kanallarında antibakteriyel tedaviye başlanmadan önce tüm nekrotik materyal ve artıkların temizlenmesi önemlidir. Klorheksidin, endodontik irrigasyon için çok sık kullanılan bir maddedir. Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili olmaktadır. Ayrıca toksisitesi düşüktür. Özellikle *Enterococcus faecalis* üzerine sodyum hipoklorit kadar etkilidir ve etkisi daha hızlı başlanmaktadır (3,4).

Pulpa ve periapikal doku infeksiyonlarından sorumlu mikroorganizmaların belirlenmesi için kök kanal kültürünün yapılması gerekmektedir. Kültür, endodontik tedavide aseptik tekniğin uygulanıp uygulanmadığının belirlenmesi, kanalın doldurulmaya hazır olup olmadığının tespiti, temizleme ve antibakteriyel tedaviye dirençli etkenlerin duyarlı olduğu antimikrobiyal ajanların belirlenmesinde önem taşımaktadır (1).

Kök kanal kültürü alınmadan önce bölgeye klorheksidin gibi antiseptik özelliği olan bir maddenin uygulanması mikrobiyal kültür sonucunun yanlış negatif olarak belirlenmesine neden olabilmektedir (2). Bu nedenle, kültür alımı esnasında kök kanallarında klorheksidinin rezidüel antimikrobiyal etkisinin bir inaktivasyon maddesi ile önlenmesi doğru kültür sonuçlarının elde edilmesini sağlayacaktır.

Sodyum tiyosülfat, Tween 80 (polyoxethylene-sorbiton monooleat), L- α Lesitin (L- α phosphatidylcholine) gibi pekçok madde antibakteriyel ajanların etkisini önlemek amacıyla uygulanmışlardır (4-6). Klorheksidinin antimikrobiyal etkisini nötralize etmek için de bu maddeler kullanılmaktadır. Endodontik tedavide klorheksidinin sık kullanımı nedeniyle, klorheksidinin etkisini önleyecek en uygun maddenin belirlenmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, mikrobiyal kültür sonuçlarının doğru olarak belirlenmesi için klorheksidinin antimikrobiyal etkisini ortadan kaldıracak en uygun maddenin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal-Metod

Bakteri süspansiyonu: Çalışmada standart *Enterococcus faecalis* (E.faecalis) ATCC 29212 suşu kullanıldı. E.faecalis suşunun kanlı agar besiyerindeki 24 saatlik saf kültüründen 0.5 Mc Farland standardına göre sıvı besiyerinde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Stok bakteri süspansiyonu son konsantrasyonda ml'de 2×10^4 canlı bakteri olacak şekilde sulandırıldı. Bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra 30 dakika içinde kullanıldı.

Klorheksidin: %4'lük klorheksidin solusyonu (DrogSan) deiyonize su ile 1:2 oranında sulandırılarak %2'lik konsantrasyon hazırlandı.

Klorheksidinin etkisini inaktive eden maddeler: Klorheksidinin antimikrobiyal etkisini inaktive etmek için 6 adet solusyon hazırlandı.

1. %5 Sodyum-tiyosülfat (Sigma)
2. %0.5 Sodyum-tiyosülfat
3. %3 Tween 80 (Sigma)
4. %3 Tween 80+ %0.3 L- α Lesitin (Sigma)
5. %3 Tween 80+ %0.5 Sodyum-tiyosülfat
6. %3 Tween 80+ L- α Lesitin+ %0.5 Sodyum-tiyosülfat

Deney: İnaktive edici maddenin her birinden 9 ml steril tüpe konuldu. Üzerine %2'lik klorheksidinden 1 ml eklenip 25°C'de 5 dk. bekletildi. Daha sonra 2×10^4 canlı bakteri içeren süspansiyondan 100 μ l karışıma eklenip 10 dk. ve 60 dk. sonra iki ayrı kanlı agar plağına 100 μ l alınarak pastör pipeti ile homojen ekim yapıldı. Her inaktive edici madde için aynı aşamalar tekrarlandı ve kanlı agar plakları 37°C'de 72 saat bekletildikten sonra plak üzerindeki koloniler sayılarak koloni oluşturan ünite (colony forming unit= CFU/ml) belirlendi.

Kontrol olarak her inaktive edici maddenin klorheksidin içermeyen klorheksidin kontrolü, inaktive edici madde kontrolü (serum fizyolojik+klorheksidin) ve inaktive edici madde-klorheksidin kontrolü (serum fizyolojik+ mikroorganizma) kullanıldı (2).

Bulgular

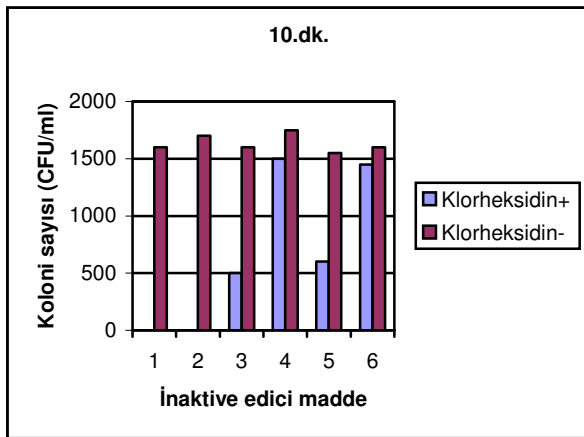
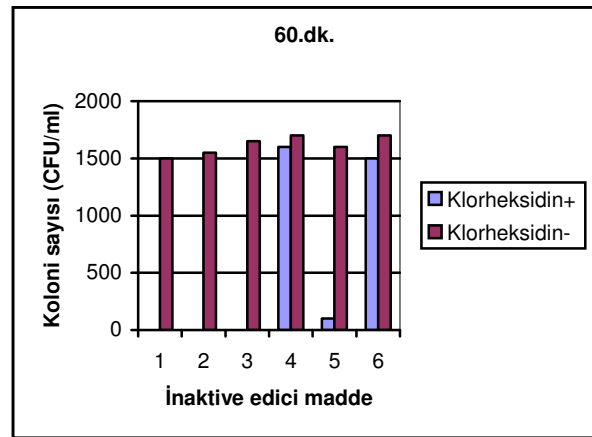
İnaktive edici maddelerin klorheksidinin antimikrobiyal etkilerini önlemesine ilişkin sonuçlar Tablo 1'de ve Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Sodyum-tiyosülfat %0.5 ve %5'lik konsantrasyonlarda klorheksidinin etkisini önleyememiş ve hem 10.dk. hem de 60. dk.da klorheksidin antibakteriyel etkisini göstererek E.faecalis'in üremesini inhibe etmiştir. % 3Tween 80 ve %3 Tween80+%0.5 Sodyum-tiyosülfat klorheksidinin etkisini önlemede çok etkili bulunmamıştır. %3 Tween 80+ %0.3 lesitin ve %3 Tween 80+ %0.3 L- α Lesitin+ %0.5 Sodyum-tiyosülfat kombinasyonları klorheksidinin etkisini önlemede en etkili inaktive edici maddeler olarak belirlenmiştir.

Tablo 1. İnaktive edici madde ile 10 ve 60.dk.lık temastan sonra oluşan koloni sayıları (CFU/ml)

İnaktive edici madde		10.dk.	60.dk.
%5 Sodyum tiosülfat	Klorheksidin+	Üreme yok	Üreme yok
	Klorheksidin-	1600	1500
%0.5 Sodyum tiosülfat	Klorheksidin+	Üreme yok	Üreme yok
	Klorheksidin-	1700	1550
%3 Tween 80	Klorheksidin+	500	Üreme yok
	Klorheksidin-	1600	1650
%3 Tween 80+ %0.3 Lesitin	Klorheksidin+	1500	1600
	Klorheksidin-	1750	1700
%3 Tween 80+ %0.5 Sodyum tiosülfat	Klorheksidin+	6000	1000
	Klorheksidin-	1550	1600
%3 Tween 80+ %0.3 lesitin+ %0.5 Sodyum tiosülfat	Klorheksidin+	1450	1500
	Klorheksidin-	1600	1700
İnaktive edici madde kontrolü	Klorheksidin+	Üreme yok	Üreme yok
İnaktive edici madde-Klorheksidin kontrolü	Klorheksidin-	1800	1750

İnaktive edici maddeler: 1.%5 Sodyum-tiosülfat ;2. %0.5 Sodyum-tiosülfat; 3. %3 Tween 80; 4. %3 Tween 80+ %0.3 L- α Lesitin; 5. %3 Tween 80+ %0.5 Sodyum-tiosülfat; 6. %3 Tween 80+ L- α Lesitin+ %0.5 Sodyum-tiosülfat.

**Şekil 1.** İnaktive edici madde ile 10 dk temasdan sonra oluşan koloni sayıları.**Şekil 2.** İnaktive edici madde ile 60 dk temasdan sonra oluşan koloni sayıları.

Tüm maddelerin 10. ve 60. dk'daki inaktivasyon özellikleri arasında herhangi bir fark belirlenmemiştir.

Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızda invitro koşullarda klorheksidin antibakteriyel etkisini önleyen en uygun madde belirlenmeye çalışılmıştır..

Endodontik tedavide kök kanallarının doldurulmaya hazır olup olmadığının en güvenilir şekilde belirlenmesi bakteriyolojik kültürle sağlanmaktadır (1). Negatif kültür sonucu, kanal tedavisinin prognozuna olumlu yönde önemli katkılar sağlamaktadır. Negatif kültür sonucu elde edilerek dol-

durulan dişlerin iyileşme oranlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (1,7).

Fenol, iyot, klorheksidin gibi pekçok ajan kök kanallarının dezenfeksiyonu için kullanılmaktadır (7). Klorheksidin, katyonik bir biguanid olup, bakterileri, hücre membran yapısını bozarak ve hücre içeriğinin presipitasyonunu sağlayarak öldürmektedir (8). Geniş antibakteriyel spektrumu nedeniyle özellikle endodontik uygulamalarda endodontik irrigan olarak sıklıkla kullanılmaktadır (3,9). Yapılan çalışmalarda, kök kanallarından kültür alımı esnasında klorheksidin rezidüel antibakteriyel etkisinin devam etmesi nedeniyle yanlış negatif kültür sonuçlarının elde edilebildiği belirtilmiştir

(2). Bu gibi yanlış sonuçların önlenmesi için kültür alımı esnasında klorheksidinin rezidüel antimikrobiyal etkisinin önlenmesi önemlidir.

Klorheksidinin antibakteriyel etkinliği çeşitli maddeler tarafından önlenmektedir. Antiseptiklerle ilgili yapılan çalışmalarda Tween80 gibi yüzey aktif ajanlar ve soyafasulyesinden elde edilen lesitin gibi maddeler klorheksidinin etkisini önlemek amacıyla kullanılmıştır (4-6).

Çalışmamızda klorheksidinin etkisini önleyen en uygun maddenin belirlenmesi için yapılan deneylerde mikroorganizma olarak E. faecalis kullanılmıştır. E.faecalis, persistan apikal periodontitise sıklıkla neden olabilen etkenlerden biridir ve kök kanallarından eliminasyonunda güçlükler olabilmektedir. Ayrıca kalsiyum hidroksit (Ca(OH)₂) gibi endodontik uygulamalara dirençlidir ve bu mikroorganizmanın laboratuvar koşullarında kültürü ve saklanması daha kolaydır (2,7).

Çalışmamızda, klorheksidinin antibakteriyel etkisini önlemek için altı adet inaktive edici madde kullanılmıştır. İnaktive edici madde olarak %0.5 ve %5 sodyum tiyosülfat nötralizan aktivite açısından etkisiz bulunmuş ve klorheksidinin etkisini önlemeyerek E.faecalis'in üremesinin inhibe olmasına neden olmuştur. %3 Tween80 tek başına klorheksidinin etkisini önlemede yetersiz kalmıştır. %3 Tween80+%0.5 sodyum tiyosülfat kombinasyonu ise çok etkili bulunmamıştır. Çalışmamıza göre klorheksidinin etkisini nötralize etmede en etkin maddelerin %3 Tween 80+ %0.3'lük lesitin kombinasyonu ile %3 Tween 80+ %0.3 L-α Lesitin+ %0.5 Sodyum-tiyosülfat kombinasyonu olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızın verilerine göre, sodyum tiyosülfat tek başına herhangi bir nötralizan etki göstermediği için, inaktivasyondan sorumlu maddelerin %3 Tween 80+ %0.3 lesitin kombinasyonu olduğu belirlenmiştir.

Zamany ve ark.'ı da çalışmamızdaki sonuçlara paralel olarak klorheksidinin antibakteriyel etkisini önlemede %3 Tween 80+ %0.3 lesitin kombinasyonunun daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (2).

Hooloway ve ark. %0.75 lesitin ve %5' Tween 80 kombinasyonunu klorheksidinin etkisini nötralize etmek için kullanmışlardır (4).

Sonuç olarak, endodontik tedaviyi yönlendirmek amacıyla yapılacak olan bakteriyel kültür esnasında daha önceden endodontik irrigasyon amacıyla bölgeye uygulanmış olan klorheksidinin rezidüel antibakteriyel etkisini önleyecek inaktive edici bir maddenin uygulanması gerektiği çalışmamızda gözlenmiştir. Klorheksidinin etkisini nötralize edecek bir madde ile birlikte kültür alınması klorheksidinin bölgedeki rezidüel etkisini inhibe ederek yanlış negatif kültür sonuçlarının önlenmesini sağlayacaktır. Endodontik uygulamalar esnasında kök kanallarından bakteriyel kültür alınırken bu noktanın da gözönünde bulundurulması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Alaçam T: Endodontik mikrobiyoloji ve immünoloji. Endodonti. ANKARA, Gazi Ün. Basın-Yayın Y.O.Basımevi, 387,1990
2. Zamany A, Spangberg LSW: An effective method of inactivating chlorhexidine. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 93:617,2002
3. McDonnell G, Russell AD: Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. Clin Microbiol Rev, 12:147,1999
4. Hooloway PM, Bucknall RA, Denton GW: The effects of sub-lethal concentrations of chlorhexidine on bacterial pathogenicity. J Hosp Infect, 8: 39,1986
5. Cookson BD, Bolton MC, Platt JH: Chlorhexidine resistance in Methicillin-resistant Staphylococcus aureus or just an elevated MIC? An In Vitro and In Vivo assessment. Antimicrob Agents Chemother, 35:1997,1991
6. Yosuda T, Yoshimura Y, Takada H, et al: Comparison of bactericidal effects of commonly used antiseptics against pathogens causing nosocomial infections. Dermatology, 195(Suppl 2):19,1997
7. Tanrıverdi F, Esener T, Erganis O, Belli S: An In Vitro test model for investigation of disinfection of dental tubules infected with Enterococcus faecalis. Braz Dent J, 8: 67,1997
8. Engin A, Kurukahvecioğlu O: Cerrahide deri antiseptisi. Hast İnfek Derg, 2: 131,1998
9. Köljalg S, Naaber P, Mikelsaar M: Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. J Hosp Infect, 51: 106,2002

Geliş Tarihi:11.09.2003

Yazışma Adresi: Dr.Işıl FİDAN

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, ANKARA
isilfidan@yahoo.com

[§]3.Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi,2-4 Ekim 2003, Samsun: Bildiri olarak sunulmuştur.