

Antimikrobni učinak Apexita *in vitro*

Sonja Pezelj-Ribarić¹
Ivana Brekalo¹
Ivana Miletić²
Maja Abram³
Zoran Karlović²
Ivica Anić²

¹Katedra za oralnu patologiju
Medicinski fakultet -
stomatološki studij
Sveučilišta u Rijeci
²Zavod za bolesti zuba
Stomatološkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu
³Zavod za mikrobiologiju
Medicinskog fakulteta
Sveučilišta u Rijeci

Sažetak

Svrha ovog rada bila je odrediti *in vitro* antimikrobni učinak Apexita temeljenog na kalcijevu hidroksidu u neposrednom dodiru s bakterijama: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* i *Staphylococcus aureus*.

Rabljen je *Direct contact test (DCT)* pri čemu je 10 µl bakterijske suspenzije (10⁶ bakterija) ostavljeno u neposrednom dodiru s punilom 1 sat na 37°C. Pošto je dodan BHI medij (250 µl), mjeren je rast pojedine bakterije nakon 1 sat, 6 sati, 20 sati i 24 sata.

Rezultati nakon jednog sata pokazali su da se broj *E. coli* i *P. aeruginosa* smanjio na 7-9 x 10³, *S. marcescens* na 7 x 10² bakterija, a broj *S. aureus* bio je 1,4 x 10⁵.

Šestosatni uzorci pokazali su da se broj *P. aeruginosa* smanjio na 10¹, a gram-pozitivne *S. aureus* na 7,5 x 10⁴. Nakon 20 sati preživjela je jedino *S. aureus* (10¹).

Dvadesetčetirisatni uzorci pokazali su potpunu inhibiciju rasta svih ispitivanih vrsta.

Ključne riječi: antimikrobni učinak, *Direct contact test*, Apexit.

Acta Stomat Croat
2001; 469-473

IZVORNI ZNANSTVENI
RAD
Primljeno: 19. travnja 2001.

Adresa za dopisivanje:

Sonja Pezelj-Ribarić
Katedra za oralnu patologiju
Medicinski fakultet -
stomatološki studij
Braće Branchetta 270
51000 Rijeka
Tel. 051 212 865
Faks: 051 651 177

Uvod

Bakterije i njihovi toksini glavni su etiološki čimbenici u nastanku endodontskih bolesti pulpe i periapiksa (1-3). Njihova se množina u korijenskome kanalu smanjuje instrumentacijom, ispiranjem vodenom otopinom natrij-hipoklorita i primjenom medikamentoznih uložaka. Dokazano je da

nakon biomehaničke obrade endodontskoga sustava zaostane određeni broj bakterija koje se brzo razmnožavaju u praznome korijenskome kanalu između posjeta (4, 5). Materijali za punjenje korijenskih kanala s antibakterijskim učinkom mogu djelovati na zaostale bakterije u korijenskome kanalu i time povećati uspješnost endodontskog liječenja (6, 7).

Kalcij-hidroksid široko se upotrebljava u stomatologiji (8, 9) i dodaje se u sastav pojedinih endodontskih punila kako bi se poboljšala biološka svojstva materijala i povećao njihov antibakterijski učinak (10). Antibakterijski učinak kalcijeva hidroksida pripisuje se njegovim ionskim sastavnicama - kalcij i hidroksi ionima i alkaličnosti koju ima pri difuziji kroz dentin (11).

U nekim se radovima za ispitivanje antibakterijskog učinka punila na temelju Ca(OH)_2 rabi kvalitativni Agar diffusion test (ADT) (12-14). Taj je test tehnički ograničen jer ovisi o difuziji čestica pa je prikladniji za testiranje topivih materijala ili para. Kako bi se prevladali ti nedostaci rabljen je kvantitativni Direct contact test (DCT) koji se temelji na mjerenju kinetike bakterijskoga rasta tijekom neposredna dodira s ispitivanim materijalom (15).

Svrha ovoga rada bila je odrediti *in vitro* antimikrobni učinak kalcij-hidroksid materijala za punjenje korijenskih kanala (Apexit) u neposrednom dodiru s gram-negativnim fermentirajućim bakterijama: *Escherichia coli* i *Serratia marcescens*; gram-negativnom nefermentirajućom bakterijom *Pseudomonas aeruginosa*, i s gram-pozitivnom *Staphylococcus aureus*.

Materijali i postupci

U radu je ispitivan Apexit (Vivadent, Schaan, Liechtenstein) temeljen na kalcijevu hidroksidu, a rabljene bakterijske vrste bile su: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Svi sojevi izolirani su iz kliničkih uzoraka iz usne šupljine i određivani uporabom standardnih biokemijskih sustava (API E; API NE; API Staph, bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) na Zavodu za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Broj mikroorganizama bio je u količini od 1×10^6 /ml (McFarland-ov Standard-bioMerieux, marcy-l'Etoile, France) i potvrđen brojenjem jedinica koje tvore kolonije (Colony forming units-CFU) na krvnom agaru nakon 24-satne inkubacije na 37°C .

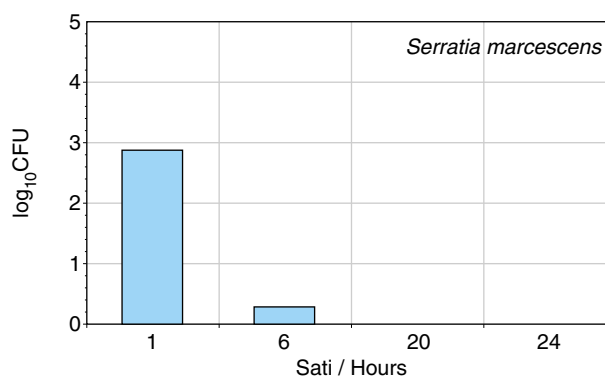
Za ispitivanje antimikrobnog učinka upotrebljen je Direct contact test (DCT). Apexit je zamiješan prema preporuci proizvođača i ispitivan 20 minuta

nakon završetka miješanja te je unesen na mikrotitracijske pločice s 96 bunarića. Pojedina bakterijska suspenzija (cca 10^6 bakterija) dodana je na ispitivani materijal i uzorci su inkubirani 1 sat na temperaturi od 37°C u termostatu. U svaki je uzorak dodano 250 μl moždano-srčanog bujona (Brain-heart infusion-BHI) i nježno miješano 2 minute. Nakon miješanja napravljena su desetostruka razrjeđenja bakterijskih suspenzija s BHI bujonom i nanesena na krvni agar. CFU su brojene nakon 1 sat, 6 sati, 20 sati i 24 sata. Prazni bunarići s istim bakterijskim suspenzijama bili su pozitivna kontrola, a bunarići s dodanim materijalom bez bakterijskog inokuluma bili su negativna kontrola. Pokus je ponovljen tri puta.

Rezultati su prikazani kao \log_{10} srednje vrijednosti CFU po mililitru. Obradeni su uporabom Student t-testa za nezavisne uzorke.

Rezultati

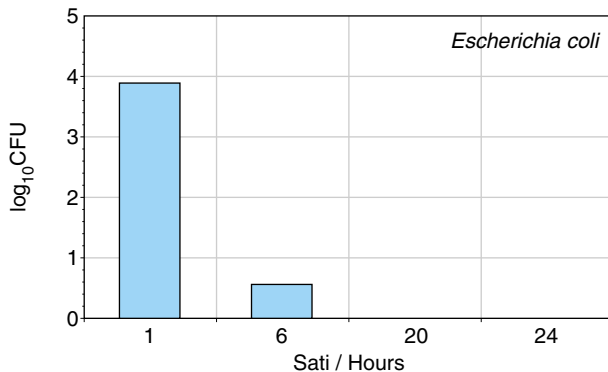
Rezultati DCT-a pokazuju da svježe zamiješani Apexit ima snažan antibakterijski učinak na gram-negativnu enterobakteriju *S. marcescens*. Nakon 1-satnog izravnog dodira s materijalom broj se *S. marcescens* smanjio s početnog inokuluma od 10^6 CFU na $6,9 - 7,1 \times 10^2$ CFU. Nakon 6 sati broj se i dalje smanjivao ($p \leq 0,001$) i *Serratia* je nađena u malom broju (5 do 10 kolonija) u samo 2 od 6 uzoraka, a nakon 20 sati više se nije mogla izolirati (Slika 1).



Slika 1. Antibakterijski učinak Apexita na *Serratia marcescens*

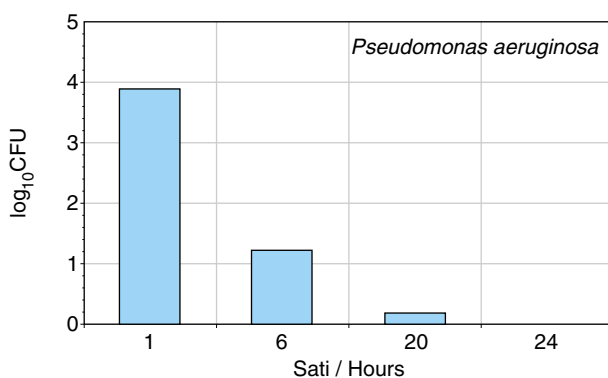
Figure 1. Antibacterial activity of Apexit on *Serratia marcescens*

Nakon 1-satne inkubacije *E. coli* je također pokazala osjetljivost na Apexit (Slika 2). U usporedbi s *S. marcescens* ($6,8 - 7,2 \times 10^3$ CFU; $p \leq 0,001$) razlika nije bila statistički znatna.



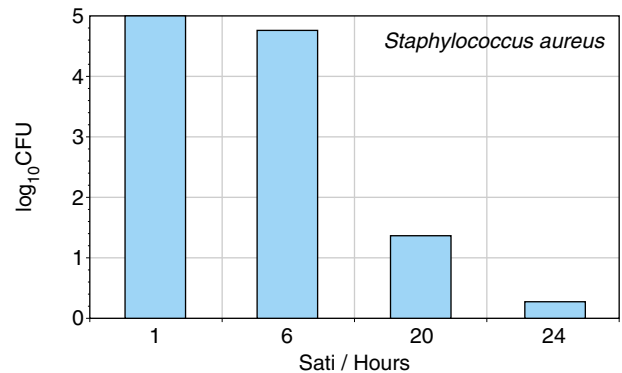
Slika 2. Antibakterijski učinak Apexita na Escherichiu coli
Figure 2. Antibacterial activity of Apexit on Escherichia coli

Nefermentirajuća *P. aeruginosa* pokazala je veću otpornost prema antibakterijskom učinku Apexita od ispitivanih fermentirajućih gram-negativnih bakterija (Slika 3). Nakon jednoga sata bakterijski rast bio je $3,9 \times 10^3$ CFU ($p \leq 0,001$). U razdoblju od 1 do 6 sati neposrednog dodira s materijalom znatno se je smanjio rast *P. aeruginosa* ($p \leq 0,001$) i dalje je opadao sve do 20-og sata inkubacije kada je pronađeno samo 5 CFU bakterija u jednom od šest uzoraka ($p \leq 0,001$).



Slika 3. Antibakterijski učinak Apexita na Pseudomonas aeruginosa
Figure 3. Antibacterial activity of Apexit on Pseudomonas aeruginosa

Osjetljivost *S. aureus* na dodir s materijalom bila je niska u prvih 6 sati (Slika 4). Nakon jednoga sata



Slika 4. Antibakterijski učinak Apexita na Staphylococcus aureus
Figure 4. Antibacterial activity of Apexit on Staphylococcus aureus

neposrednoga dodira s Apexitom nađeno je između 1 i $1,3 \times 10^5$ CFU bakterija, a nakon 6 sati broj se je smanjio na $6,8 - 7,2 \times 10^4$ CFU ($p \leq 0,001$). Daljnji znatan pad broja bakterija opažen je u razdoblju od 6 sati do 20 sati inkubacije s materijalom ($10-60$ CFU; $p \leq 0,001$). Nakon 24 sata izolirano je samo nekoliko kolonija u 2 uzorka ($p \leq 0,001$).

Rasprava

Važno svojstvo materijala za punjenje korijenjskih kanala jest antibakterijsko djelovanje na mikroorganizme unutar endodontskog prostora. Kalcijev hidroksid se nametnuo kao vrlo dobar izbor za intrakanalnu medikaciju (17) zbog svojeg antimikrobnog učinka (9, 18), protuupalnih svojstava (19), niske citotoksičnosti (20) i osteogenoga djelovanja (16).

U ovome radu ispitan je antimikrobni učinak Apexita temeljenog na kalcijevu hidroksidu na četiri bakterijske vrste izolirane iz usne šupljine. Rabljen je DCT test kako bi se izbjegli nedostaci ADT-a, koji ovisi o fizikalnim svojstvima ispitivanoga materijala te je prikladniji za topive materijale (13, 14).

Svježe zamiješani Apexit svojim je djelovanjem uspio odstraniti sve ispitivane bakterije unutar 24 sata. To je sukladno rezultatima Estrele i sur. (18) koji su *in vitro* dokazali antimikrobni učinak Apexita na anaerobne i aerobne bakterije. U radu je također rabljen DCT test, a ispitivane bakterije bile su: *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium nucleatum*,

Pseudomonas aeruginosa i *Escherichia coli*. Rezultati su pokazali potpuni antimikrobni učinak Apexita nakon 72 sata. Antimikrobno djelovanje Apexita utvrdili su i Sjögren i sur. (19) koji su stavljali intrakanalni uložak kalcijeva hidroksida u korijenske kanale zuba s periapikalnim procesom. Dokazali su nakon 7 dana nestanak *Actinobacillus actinomycescomitans*.

U radovima se navodi i brzo antimikrobno djelovanje $\text{Ca}(\text{OH})_2$ materijala. Naime, Fuss i sur. (20) su dokazali da svježe zamiješani materijal temeljen na $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ima sposobnost zaustaviti rast *Enterococcus faecalis* unutar 4 sata. Suprotno tomu, Heling i Chandler (21) su na eksperimentalnome modelu inficiranih dentinskih tubulusa pokazali da unošenje istoga materijala u korijenski kanal ne može odstraniti *E. faecalis* iz inficiranoga kanala.

U ovom se ispitivanju najotpornijom bakterijom pokazala gram-pozitivna *S. aureus* čije je smanjivanje broja kolonija bilo postupno i polagano. Optimalni pH za rast *S. aureus* je između 7 i 7,5 s odstupanjem od 4,2 do 9,3 (22). Zato alkaličnost kalcijeva hidroksida vjerojatno ne utječe na inhibiciju rasta *S. aureus*. Moguće je da druge sastavnice materijala djeluju antibakterijski jer je nakon 24-satnog dodira s Apexitom izolirano samo nekoliko kolonija.

Svježe zamiješani Apexit pokazao je jači antibakterijski učinak na gram-negativne fermentirajuće enterobakterije, osobito na *S. marcescens*. Broj CFU *Serratia* naglo se smanjivao unutar jednoga sata od inokulacije. U isto vrijeme, Apexit je imao mnogo manji inhibitori učinak na *E. coli* i *P. aeruginosa*. Nakon 6 sati razlika između tri gram-negativne bakterije nije bila statistički znatna.

Zaključak

Rezultati ovoga rada pokazali su da Apexit uporabom DCT testa za određeno razdoblje inhibira rast ispitivanih bakterijskih vrsta.

Literatura

- MICKEL AK, WRIGHT ER. Growth inhibition of *Streptococcus anginosus* (milleri) by three calcium hydroxide sealers and one zinc oxide-eugenol sealer. J Endodon 1999; 25: 34-7.
- KETTERING JD, TORABINEJAD M. Microbiology and Immunology. In: Cohen S, Burns RC, eds. Pathways of the Pulp. St. Louis: Mosby Year Book 1994; 363-71.
- REIT C, MOLANDER A, DAHLEN G. The diagnostic accuracy of microbiologic root canal sampling and the influence of antimicrobial dressing. Endod Dent Traumatol 1999; 15: 278-83.
- BYSTRÖM A, SUNDQUIST G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 1985; 18: 35-40.
- TENRIVERDI F, ESENER T, ERGANIS O, BELL S. An in vitro test model for investigation of disinfection of dentinal tubules infected with *Enterococcus faecalis*. Brazilian Dent J 1997; 8: 67-72.
- SAFAVI KE, SPANGBERG LSW, COSTA NS, SAPOUNAS G. An in vitro method for longitudinal evaluation of toxicity of endodontic sealers. J Endodon 1989; 15: 484-6.
- SUNDQUIST GK. Ecology of root canal flora. J Endodon 1992; 18: 427-30.
- LARSEN MJ, HÖRSTED-BINDSLEV P.A laboratory study evaluating the release of hydroxyl ions from various calcium hydroxide products in narrow root canal-like tubes. Int Endod J 2000; 33: 238-42.
- SIQUEIRA JF, LOPES HP. Mechanism of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. Int Endod J 1999; 32: 257-82.
- BARTHEL CR, LEVIN LG, REISNER HM, TROPE M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *E. coli* lipopolysaccharide. Int Endod J 1996; 29: 195-210.
- FOSTER KH, KULILD JC, WELLER RN. Effect of smear layer removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. J Endodon 1993; 19: 136-40.
- ABUDULKADER A, DUGNID R, SAUNDERS EM. The antimicrobial activity of endodontic sealers to anaerobic bacteria. Int Endod J 1996; 29: 280-3.
- AL-KATHIB Z, BAUM RH, MORSE DR, YESILSOY C, BHAMBHANI S, FURST ML. The antimicrobial effect of various endodontic sealers. Oral Surg, Med Oral Pathol 1990; 70: 784-90.
- PUMAROLA J, BERASTEGUI E, BRAU E, CANALDA C, JIMENEZ DE ANTA MT. Antimicrobial activity of seven root canal sealers. Oral Surg, Med Oral Pathol 1992; 74: 216-20.
- WEISS EI, SHALHAV M, FUSS Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. Endod Dent Traumatol 1996; 12: 179-84.
- CHONG BS, OWADALLY ID, PITT FORD TR, WILSON RF. Antibacterial activity of potential retrograde root filling materials. Endod Dent Traumatol 1994; 10: 66-70.
- FAVA LR, SAUNDERS WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. Int Endod J 1999; 32: 257-82.
- ESTRELA C, PIMENTA FC, YOKO I, BAMMANN LL. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. J Endodon 1998; 24: 15-7.

19. SJÖGREN U, FIGDOR D, SPANGBERG L, SUNDQUIST G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24: 119-25.
20. FUSS Z, WEISS EI, SHALHAV M. Antibacterial activity of calcium hydroxide-containing endodontic sealers on *Enterococcus faecalis in vitro*. *Int Endod J* 1997; 30: 397-402.
21. HELING I, CHANDLER NP. The antimicrobial effect within dentinal tubules of four root canal sealers. *J Endodon* 1996; 22: 257-9.
22. KAPLAN AE, PICCA M, GONZALEZ MI, MACCHI RL, MOLGATINI SL. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an *in vitro* evaluation. *Endod Dent Traumatol* 1999; 15: 42-5.