

Fernanda Pappen¹
Erick Souza¹
Luciano Giardino²
Renato Leonardo¹
Mario Roberto Leonardo¹
Izabel Yoko Ito¹

¹ Department of Restorative Dentistry,
University of the State of Sao Paulo,
Araraquara/SP Brazil
² Department of Periodontology,
Dental School, University of Brescia, Italy

Correspondence:
Dott. Luciano Giardino
Via Marinella, 12
88900 Crotone
Tel./fax: 0962 21249
E-mail: lucianogiardino@tiscali.it

Pervenuto in Redazione l'8 giugno 2006
Accettato per la pubblicazione il 28 luglio 2006

Antimicrobial activity of new solutions used in endodontic therapy

ABSTRACT

Aim: the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of three endodontic irrigating solutions used during root canal preparation (MTAD, Tetraclean and DG6).

Methodology: the tested irrigating solutions were evaluated in eight different strains: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Candida albicans* ATCC 10231; *Escherichia coli* ATCC 25933; *Micrococcus luteus* ATCC 9341; *Staphylococcus aureus* ATCC 25938; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. As control, saline and 2% chlorhexidine were used. Antimicrobial activity was evaluated using the agar diffusion method. Irrigant solutions and controls were placed directly into 4.0 mm diameter wells. Dishes were maintained at room temperature for 2 h for prediffusion of the solutions and then incubated at 37°C for 24 hrs. The tests were performed in triplicate. The plates were optimized with 1% triphenyltetrazolium chlorate and inhibition halos were measured.

Results: all strains were inhibited by 2% chlorhexidine, MTAD and DG6. Tetraclean was not effective in inhibit *Candida albicans*, and saline allowed the growing of all strains. The inhibition halos were greater for MTAD and Tetraclean solutions.

Conclusions: DG6 and 2% chlorhexidine inhibited all the strains; MTAD and Tetraclean showed higher halos of inhibition than the other solutions; Tetraclean was not active against *Candida albicans*.

Key words:

Antimicrobial activity, agar diffusion method, irrigants.

INTRODUCTION

Total elimination of bacteria is the main purpose of the root canal therapy in infected teeth. Complete chemomechanical preparation remains the most important step in root canal disinfection. However, even after cleaning, shaping and irrigation with disinfectants, total elimination of bacteria is likely to be difficult to achieve (Bystrom & Sundqvist, 1985). Pataky et al., (2002) infected the root canals of extracted teeth and examined the number of remaining bacteria after mechanical preparation. There was just a reduction in bacteria number after chemomechanical preparation. Current regimens in chemomechanical debridement using instrumentation and irrigation are not predictably effective in root canal disinfection (Bystrom & Sundqvist, 1985).

The infected and necrotic root canal system acts as a selective habitat for the causative organisms that grow mostly in biofilms (Nair, 1997). The disruption of biofilms and reduction of microorganisms are achieved by a combination of mechanical instrumentation, irrigation with various tissue lytic and microbicidal solutions and application of antimicrobial medicaments in the root canal as a root canal dressing. It is generally believed that remaining bacteria can be eliminated or be prevented from repopulating the root canal space by placing

an interappointment dressing such as calcium hydroxide in the prepared canal (Bystrom & Sundqvist, 1985; Chong & Pitt Ford, 1992).

However, it has been demonstrated that calcium hydroxide does not consistently produce bacteria-free root canals (Orstavik & Haapasalo, 1990; Orstavik et al., 1991; Peters et al., 2002). An ideal intracanal irrigant or medication should be able to disinfect the dentin and the tubules in one visit. In addition, it should have sustained antimicrobial effect after use. It also must be biocompatible, with live host tissues (Torabinejad et al., 2002). MTAD is a mixture of a tetracycline isomer, an acid, and a detergent. When used as a final rinse, MTAD is capable of removing the smear layer with minimal erosive changes on the surface of dentin (Beltz et al., 2003; Torabinejad et al., 2003). MTAD also presents superior bactericidal activity compared to sodium hypochlorite and EDTA, when tested against *Enterococcus faecalis*. Tetraclean is also a mixture of a tetracycline isomer, an acid and a detergent, and as MTAD, it is used as a final rinse during the root canal preparation (Giardino et al.). It is advocated by both of these substances that they can achieve total elimination of bacteria from the root canal system when used as a final irrigation. Currently, the DG6 is another product commercially available in Latin America to be used as a root canal irrigant. It is a salt of quaternary ammonium hydroxide that present antibacterial activity and used as a disinfectant. It acts against the plasma membrane of different microorganisms including encapsulated virus. Although the substances related above

have antimicrobial activity, all of them present different properties. To better understand how these solutions could act in an infected root canal, it is necessary to observe prior their activity against microorganisms with different structural characteristics.

The purpose of this investigation was to compare *in vitro* the antimicrobial activity of MTAD, Tetraclean, DG6 and 2% Chlorhexidine against one yeast, facultative aerobic Gram-positive coccus and facultative aerobic Gram-negative rods by the method of agar diffusion.

MATERIALS AND METHODS

Antimicrobial activity of the solutions, DG6 (Piridonio cloruro 10g/100mL) (Inti S/A, La Paz, Bolívia), MTAD (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN USA) and Tetraclean (Ogna Laboratori Farmaceutici, Milano, Italy) was evaluated by the agar diffusion method.

Saline and 2% chlorhexidine gluconate (FCFRP, USP; Ribeirão Preto, Brazil) were used as negative and positive controls, respectively. As indicator of antimicrobial activity eight ATCC reference strains were used (Tab. 1).

The inoculum was obtained by seeding the strains in Mueller Hinton Broth (MHb Difco™), depending on physiological characteristics of the inoculum, and incubated at 37°C for 24 h. The test was performed using the two-layer technique, with Mueller Hinton Medium (MHm Difco™) which was cooled to about 50°C, inoculated, and poured into 20x100 mm sterilized Petri dishes. After solidification a seed layer of 5.0 ml obtained from a suspension of microorganisms corresponding to 2 McFarland scale for the *Candida albicans*, and 0.5 to the other microorganisms was added on the base layer, and cooled to about 50°C. (Leonardo et al. 1999). Wells were made by removing the agar using sterilized glass sticks of 4 mm diameter in size at 15 mm from the dish edge and at equidistant points.

Each well was completely filled with a different tested solution. Dishes were maintained at room temperature for 2

h for prediffusion of the solutions and then incubated at 37°C for 24 h.

The tests were performed in triplicate. After incubation, plates were optimized by the addition of 1.0% triphenyltetrazolium chlorate (Sigma, St. Louis, MO) in 1.0% agar and incubated at 37°C for 30 min. The greatest diameter formed by the halos of inhibition were measured by means of a millimeter ruler in a blue background to contrast with the pink optimized plate.

RESULTS

Table 1 shows the average values of the diameters of the halos of inhibition of microbial growth (in millimeters). All strains were inhibited by 2% chlorhexidine, MTAD and DG6. Tetraclean was not effective to inhibit *Candida albicans*, and saline allowed the growing of all strains. The inhibition halos were the greatest for MTAD and Tetraclean solutions.

DISCUSSION

Biofilm has been observed on dental walls of the root canal system, as well as the extraradicular surface of teeth with pulpal necrosis and apical periodontitis (Leonardo et al., 2002) and resistant lesions (Tronstad et al., 1990). It is important to remember that biofilm acts as a community in which microorganisms have a nutritional relationship. Disruption may lead the entire community to the death (Leonardo et al., 2001). An ideal irrigant solution should kill the microorganisms and disorganize this biological community.

Others characteristics beyond antimicrobial effect must also be considered before the final choice of an endodontic irrigant solution for clinical use, such as tissue dissolution capacity, minimum inhibitory concentration, detoxification of endotoxin (lipid A) and acceptable biologic compatibility (Estrela et al., 1999).

A disadvantage of determining the an-

timicrobial effect of a solution by measuring the zone of inhibition is that this technique does not account for the variation in the diffusion rate of the medication through the agar (Torabinejad et al., 2003), as well as the difficulty in observing the zones of inhibition of microbial growth (Leonardo et al., 2001). For this reason we used preincubation and optimization of the plates with 0.05% triphenyltetrazolium chlorate in 1.0% agar gel. Preincubation for a period of 2 h permits substances to diffuse in the agar gel, producing zones of inhibition for microbial growth (Leonardo et al., 1999). Triphenyltetrazolium chloride added to the culture medium acts as an indicator of the metabolic reaction of oxidation-reduction in growing microorganisms.

Therefore, only viable microorganisms or those growing in the culture medium change to a red color (Begue & Kline, 1972). It permits an easy observation of the zones of inhibition.

The microorganisms used in this study as indicators of antimicrobial activity (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, and *Candida albicans*) are associated with cases of persistent endodontic infections or resistant to treatment. Sundqvist et al. (1998) found *Enterococcus faecalis* as a monoinfection in 34% of teeth with endodontic treatment and persistent apical periodontitis. It has been identified as one of the most difficult microorganism to eradicate from infected root canals (Siqueira et al., 1997). The persistence of *Enterococcus faecalis* may be attributed to the ineffectiveness of currently used chemicals such as sodium hypochlorite (Siqueira et al., 1997), or calcium hydroxide (Estrela et al., 1999) in inhibits this microorganism. According to Walimo et al. (1997), yeast, particularly *Candida albicans*, was associated with 7% of resistant apical periodontitis.

A new generation of auxiliary solution used in endodontic therapy can be represented by MTAD and Tetraclean, two mixtures based on the synergic action of an antibiotic (antibacterial activity), citric acid (smear layer removing) and a detergent that should permit deep penetration of drugs into the depths of the tubules. MTAD is a mixed of 3% doxi-

Microorganisms	CHX 2%	MTAD	Tetraclean	DG6	Saline
Staphylococcus aureus ATCC 25938	29,5	44	44	24,5	0
Staphylococcus aureus ATCC 6538	28,5	44	42	23,5	0
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	29,5	47	45	21,5	0
Micrococcus luteus ATCC 9341	34	50	50	25	0
Enterococcus faecalis ATCC 29212	25,5	40	35	20	0
Escherichia coli ATCC 25933	25	37	32	16	0
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	25,5	31	28,5	15	0
Candida albicans ATCC 10231	31	24	-	22,5	0

Tab. 1 - Medium values (mm) of halos of the diameters of inhibition of microbial growth formed by five irrigating solutions.

Valore medio in mm del diametro degli aloni di inibizione di crescita batterica dei cinque irriganti studiati.

cicline, 4.25% citric acid and 0.5% tween-80. Doxycycline is a hydroxide derivative of tetracycline. Its antibacterial properties and its ability in removing the smear layer from the root canal walls are well known (Barkordar et al., 1997). Tetraclean is compound of a mixture similar to MTAD with different concentrations: 1% doxycycline and 10% citric acid. The detergent is polypropylene glycol. These substances have shown very low surface tension (Giardino et al. in press, 2006) and antibacterial activity (Giardino et al., 2005).

From the results of the present study, it is possible to observe that MTAD and Tetraclean were similar, and both showed higher antimicrobial activity than 2% chlorhexidine. However, Tetraclean did not show any activity against *Candida albicans*. This outcome must probably be explained by the concentration of doxycycline in the Tetraclean formula. Observing the halos of inhibition produced by MTAD, the activity against *Candida albicans* was the shortest one.

It probably supports the idea that doxycycline presents poor antimicrobial effect against *Candida albicans* even in

a concentration of 3%. However, to better address this behavior a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) study must be done.

DG6 and 2% chlorhexidine showed similar results for all the tested microorganisms. Chlorhexidine is a well-known endodontic irrigant. Both DG6 and Chlorhexidine are cationic agents, which exhibits antibacterial activity. The cationic nature of the compound is capable of altering the bacterial integrity by promoting connection with anionic compound at the bacterial surface (phosphate groups from teichoic acid at Gram-positive and lipopolysaccharide at Gram-negative bacteria). After the cytoplasmic membrane damage, the potassium ion, a small entity, is the first substance to appear. By the alteration of the cytoplasmic membrane permeability a precipitation of cytoplasmic proteins occur that alter cellular osmotic balance, interferes with metabolism, growth, cell division, inhibits the membrane ATPase and inhibits the anaerobic process (Denton, 1991; Jenkins et al., 1988; Rizo & Enriquez, 2002). DG6 is derived from a group of antiseptic substances highly used for instruments and preoperative disinfection (Rizo & Enriquez, 2002).

Recently it has been indicated as a root canal irrigant, especially in Latin America. In despite of presenting antimicrobial activity to all the strains evaluated, neither 2% chlorhexidine nor DG6 presents any ability to remove smear layer which demand the use of EDTA as a final rinse.

In the search for new irrigant solutions that could provide microorganisms elimination, the smear layer removing, the biofilm disorganization, with tissue dissolution and detoxification of Lipid A, MTAD and Tetraclean showed promising results. However many other *in vivo* studies should be done before indicating these substances for clinical use.

CONCLUSION

DG6 and 2% chlorhexidine inhibited all the strains.

MTAD and Tetraclean showed higher halos of inhibition than the other solutions.

Tetraclean was not active against *Candida albicans*.

BIBLIOGRAFIA

1. Barkordar RA, Watanabe LG, Marshall GW, Hussain MZ. Removal of intracanal smear layer by doxycycline *in vitro*. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* 1997;84:420-423.
2. Begue WJ, Kline RM. The use of tetrazolium salts in bioautographic procedures. *Journal of Chromatography* 1972;64: 82-184.
3. Beltz RE, Torabinejad M, Poursmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *Journal of Endodontics* 2003;29:334-337.
4. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and ED-

- TA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal* 1985;18:35-40.
5. Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *International Endodontic Journal* 1992; 25:97-106.
6. Denton GW. Chlorhexidine. In: Block, SS. *Disinfection, sterilization and preservation*. 4th ed; pp. 274-289. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991.
7. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *Journal of Endodontics* 1999;25:416-418.
8. Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *Journal of Endodontics* (in press).
9. Giardino L, Pecora G, Ambu E, Savoldi E. A new irrigant in the treatment of apical periodontitis: from research to clinic. 12th Biennial Congress European Society of Endodontology, 15-17, 2005.
10. Giardino L, Ambu E, Generali L, Savoldi E. Effetto antimicrobico di due nuovi irriganti nei confronti dell'*Enterococcus faecalis*: studio comparativo in vitro. *G It Endo* 2006;20(2):91-94.
11. Jenkins S, Addy M, Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. *Journal of Clinic Periodontology* 1988;15:415-424.
12. Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifacio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *Journal of Endodontics* 2002;28:815-818.
13. Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Bonifacio K, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *Journal of Endodontics* 2001;27:717-719.
14. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva, LAB Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *Journal of Endodontics* 1999; 25: 167-171.
15. Nair, PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontology* 2000 1997;13:121-48.
16. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endodontic Dental Traumatology* 1990;6:142-149.
17. Orstavik D, Kerekes K, Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *International Endodontic Journal* 1991;24:1-7.
18. Pataky L, Ivanyi I, Grigar A, Fazekas A. Antimicrobial efficacy of various root canal preparation techniques: an in vitro comparative study. *Journal of Endodontics* 2002;28: 603-605.
19. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *International Endodontic Journal* 2002; 35: 698-702.
20. Rizo AAA, Enríquez EAS. *Diagnóstico microbiológico en las unidades dentales de la clínica odontológica de la universidad americana*. (Thesis) Nicaragua: UAM, 2002.
21. Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *International Endodontic Journal* 1997;30:279-282.
22. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 1998; 85: 86-93.
23. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2002;94:658-666.
24. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, Kim J, Shabahang S. A new solution for the removal of the smear layer. *Journal of Endodontics* 2003;29:170-5.
25. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *Journal of Endodontics* 2003;29:400-403.
26. Tronstad L, Kreshtod D, Barnett F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. *Endodontic Dental Traumatology* 1990;6:129-136.
26. Waltimo TMT, Sirén EK, Torkko HLK, Olsen I, Haapasalo MPP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *International Endodontic J* 1997;30:96-101.

Attività antibatterica di nuove soluzioni usate nella terapia endodontica

Traduzione dell'articolo:

Antimicrobial activity of new solutions used in endodontic therapy

RIASSUNTO

Scopo: lo scopo del presente studio è valutare l'attività antibatterica di tre soluzioni irriganti usate nella preparazione canalare (MTAD, Tetraclean e DG6).

Metodologia: le soluzioni in esame erano valutate su 8 ceppi batterici differenti: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25933, *Micrococcus luteus* ATCC 9341; *Staphylococcus aureus* ATCC 25938; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Come controllo erano usate soluzione salina sterile e clorexidina al 2%. L'attività antibatterica era valutata tramite il metodo di diffusione su agar. Le soluzioni irriganti ed i controlli erano messi in pozzetti di 4 mm di diametro. Le piastre erano mantenute a temperatura ambiente per 2 ore per la prediffusione delle soluzioni e quindi incubate a 37°C aerobicamente per 24 ore. I test erano effettuati in triplicato. Le piastre erano ottimizzate con clorato di trifeniltetrazolio e gli aloni di inibizione erano misurati.

Risultati: tutti i ceppi erano inibiti dalla clorexidina 2%, MTAD e DG6. Tetraclean era incapace di inibire la *Candida albicans*, mentre la soluzione salina sterile permetteva la crescita di tutti i ceppi. Gli aloni di inibizione erano maggiori per le soluzioni MTAD e Tetraclean.

Conclusioni: DG6 e clorexidina al 2% inibivano la crescita di tutti i ceppi; MTAD e Tetraclean mostravano i maggiori aloni di inibizione rispetto agli altri irriganti; Tetraclean era inattivo con-

tro *Candida albicans*.

Parole chiave:

Azione antibatterica, metodo di diffusione su agar, irriganti.

INTRODUZIONE

Lo scopo primario della terapia canalare è l'eliminazione dei batteri dai canali radicolari. La preparazione chemiomeccanica rimane il punto più importante nella disinfezione dell'endodonto. Dopo sagomatura e detersione con irriganti e dinfettanti, è difficile ottenere la completa eliminazione dei batteri (Bystrom & Sundqvist, 1985). Pataky et al. (2002), in un modello sperimentale su denti estratti e contaminati, hanno esaminato il numero di batteri sopravvissuti dopo preparazione meccanica. I risultati evidenziavano una riduzione ma non una totale eliminazione dei batteri dopo preparazione chemiomeccanica. I presidi di strumentazione ed irrigazione attualmente utilizzati non sono efficaci nella disinfezione dei canali radicolari (Bystrom & Sundqvist, 1985). Il canale radicolare infetto agisce come habitat selettivo per i batteri che crescono soprattutto aggregati in biofilm (Nair, 1997). La distruzione del biofilm e la riduzione dei microrganismi è ottenuta grazie alla combinazione della strumentazione meccanica, irrigazione con soluzioni ad azione litica tissutale e battericida ed applicazione di medicazioni endocanalari. Si ritiene che applicando una medicazione intermedia di idrossido di calcio nel canale preparato si pos-

sano eliminare i batteri sopravvissuti prevenendo il ripopolamento dello spazio endodontico (Bystrom & Sundqvist, 1985; Chong & Pitt Ford, 1992). È stato però dimostrato che l'idrossido di calcio non rende i canali sterili (Orstavik & Haapasalo, 1990; Orstavik et al., 1991; Peters et al., 2002).

Un medicamento o irrigante ideale dovrebbe essere capace di disinfettare la dentina ed i tubuli dentinali in una seduta, mantenere l'effetto antibatterico dopo l'uso, ed essere biocompatibile per i tessuti vitali (Torabinejad et al., 2002). MTAD è costituito da doxiciclina, un acido ed un detergente.

Usato come irrigante finale, MTAD è capace di rimuovere lo *smear layer* con minima erosione della superficie dentinale (Beltz et al., 2003; Torabinejad et al., 2003). MTAD ha dimostrato un'azione antibatterica superiore comparato all'ipoclorito di sodio ed all'EDTA (Torabinejad et al., 2003b).

Similmente a MTAD, Tetraclean è costituito da doxiciclina, un acido ed un detergente ed è usato quale irrigante finale durante la preparazione canalare (Giardino et al., 2005). L'insieme di queste sostanze, presenti nel Tetraclean, consente di ottenere la totale eliminazione dei batteri dal sistema dei canali radicolari quando usati come irrigazione finale. Attualmente, DG6 è un prodotto commercialmente disponibile in America Latina da utilizzare come irrigante canalare. DG6 è un sale di ammonio quaternario che presenta attività antibatterica ed è usato come disinfettante.

Esso agisce contro la parete plasmatica di differenti microrganismi, inclusi virus capsulati (Rizo & Enriquez, 2002). Le sostanze prese in esame in questo stu-

dio hanno un'azione antibatterica ma con differenti proprietà. Per meglio comprendere come queste soluzioni potrebbero agire nei canali radicolari infetti è necessario osservare prima la loro attività verso batteri con differenti caratteristiche strutturali. Scopo di questo studio era comparare *in vitro* l'attività antimicrobica di MTAD, Tetraclean, DG6 e clorexidina 2% contro un fungo, cocci gram-positivi aerobi facoltativi e bastoncini gram-positivi aerobi facoltativi.

MATERIALI E METODI

L'attività antimicrobica delle soluzioni DG6 (Piridonio cloruro 10g/100mL) (Inti S/A, La Paz, Bolivia), MTAD (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN USA) e Tetraclean (Ogna Laboratori Farmaceutici, Milano, Italy) era valutata mediante il test di diffusione su agar. Soluzione salina sterile e clorexidina 2% (FCFRP, USP; Ribeirão Preto, Brazil) erano usati come controlli negativo e positivo. Per il test erano utilizzati 8 ceppi di riferimento ATCC (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25933, *Micrococcus luteus* ATCC 9341; *Staphylococcus aureus* ATCC 25938; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538). L'inoculo era ottenuto seminando i ceppi in brodo Mueller Hinton (MHb Difco™), ed incubati a 37°C per 24 h. Il test era realizzato usando la tecnica due-strati; il medium Mueller Hinton (MHm Difco™) era raffreddato a circa 50°C, inoculato, e versato in capsule di Petri 20x100 mm. Dopo solidificazione, uno strato di semina di 5 ml ottenuto da una sospensione di batteri pari al valore 2 della scala McFarland per la *Candida albicans*, e 0.5 per gli altri microrganismi era aggiunto allo strato base e raffreddato a circa 50°C (Leonardo et al., 1999). Dei pozzetti erano fatti rimuovendo l'agar con lame di vetro di 4 mm di diametro a 15 mm dal margine della capsula ed a punti equidistanti. Ogni pozzetto era riempito completamente con le diverse soluzioni. Le capsule erano

mantenute a temperatura ambiente per 2 h per la predifusione delle soluzioni ed incubate a 37°C per 24 h. I test erano realizzati in triplicato.

Dopo incubazione le piastre erano ottimizzate aggiungendo lo 0,1% di clorato di trifeniltetrazolio (Sigma, St. Louis, MO) in 1% di agar ed incubate a 37°C per 30 minuti. Il diametro degli aloni di inibizione era misurato mediante righello millimetrato in sfondo scuro per contrastare le piastre colorate di rosa per effetto del clorato di trifeniltetrazolio.

RISULTATI

Nella Tabella 1 sono riportati i valori medi dei diametri degli aloni di inibizione della crescita batterica espressa in mm. Tutti i ceppi erano inibiti dalla clorexidina 2%, MTAD e DG6. Tetraclean era inefficace ad inibire la crescita di *Candida albicans*, la soluzione salina sterile permetteva la crescita di tutti i ceppi batterici. MTAD e Tetraclean mostravano i maggiori aloni di inibizione.

DISCUSSIONE

I batteri organizzati in biofilm sono stati osservati sulle pareti dentinali dei canali radicolari, così come sulla superficie extraradiculare di denti affetti da necrosi pulpare e periodontite apicale (Leonardo et al., 2002) e lesioni resistenti (Tronstad et al., 1990). È importante ricordare che il biofilm agisce come una comunità in cui i batteri hanno una relazione nutrizionale. La distruzione del biofilm induce la morte della comunità batterica (Leonardo et al., 2001). Una soluzione irrigante ideale dovrebbe distruggere i microrganismi e disorganizzare questa comunità biologica. Altre caratteristiche, oltre l'effetto antimicrobico, devono essere considerate e prima della scelta finale di un irrigante endodontico per uso clinico, ad esempio la capacità di dissoluzione tissutale, la minima concentrazione inibente, la detossificazione di endotossine quali il lipide A, la compatibilità biologica accetta-

bile (Estrela et al., 1999). Uno svantaggio nella determinazione dell'effetto antibatterico di una soluzione misurando la zona di inibizione è che questa tecnica non considera la variazione del grado di diffusione dei medicamenti attraverso l'agar (Torabinejad et al., 2003), così come la difficoltà nell'osservare le zone di inibizione di crescita batterica (Leonardo et al., 2001).

Per questo motivo nel presente studio, le piastre erano preincubate ed ottimizzate con clorato di trifeniltetrazolio allo 0.05% in agar allo 1.0%. Infatti, la preincubazione delle piastre per un periodo di 2 ore permette alle soluzioni di diffondere nell'agar, producendo zone di inibizione per la crescita batterica (Leonardo et al., 1999). Il clorato di trifeniltetrazolio aggiunto al medium di coltura agisce come indicatore della reazione di ossido-riduzione nella crescita batterica. Solo i batteri vitali o in crescita virano ad un colore rosso (Begue & Kline, 1972). Questo metodo permette una facile osservazione delle zone di inibizione. I batteri utilizzati in questo studio come indicatori di attività antibatterica (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*) sono associati a casi di infezione endodontica persistente o resistente al trattamento. Sundqvist et al. (1998) hanno dimostrato la presenza di *Enterococcus faecalis* come monoinfezione nel 34% dei denti con trattamento endodontico pregresso e periodontite apicale persistente. L'*Enterococcus faecalis* è uno dei microrganismi più difficili da eradicare dai canali radicolari infetti (Siqueira et al., 1997).

La sua persistenza può essere attribuita all'inefficacia di soluzioni chimiche, quali l'ipoclorito di sodio (Siqueira et al. 1997), o medicamenti quali l'idrossido di calcio (Estrela et al., 1999), attualmente utilizzati. In accordo con Waltimo et al. (1997), i funghi, specialmente la *Candida albicans*, sono associati al 7% di casi con periodontite apicale persistente. MTAD e Tetraclean rappresentano una nuova generazione di irriganti endodontici basati sull'azione sinergica di un antibiotico (attività antibatterica), acido citrico (azione sullo *smear layer*) ed un detergente che dovrebbe permettere una maggiore penetrazione

dei componenti nella profondità dei tubuli dentinali. MTAD è costituito da doxiciclina al 3%, acido citrico al 4,25% e Tween 80 allo 0.5%.

La doxiciclina è un derivato idrossilico della tetraciclina. La sua proprietà antibatterica unita alla sua abilità nel rimuovere lo *smear layer* dalle pareti canalari è conosciuta da tempo (Barkordar et al., 1997). Diversamente dal MTAD, il Tetraclean mostra una differente concentrazione di doxiciclina e acido citrico (rispettivamente l'1% ed il 10%), invece il detergente è il glicole propilenico. Questo irrigante ha mostrato una tensione superficiale molto bassa (Giardino et al., *in press*, 2006) unita ad una maggiore attività antibatterica rispetto a MTAD (Giardino et al., 2006).

Dai risultati del presente studio si evidenzia che MTAD e Tetraclean mostravano un'attività simile ed entrambi mostravano una maggiore attività antimicrobica rispetto alla clorexidina 2%. Tetraclean non ha evidenziato alcuna attività antimicotica verso la *Candida albicans*.

Questo risultato può essere probabilmente dovuto ad una più bassa concentrazione di doxiciclina presente nel Tetraclean. Comunque gli aloni di inibizione prodotti da MTAD su *Candida albicans* erano più bassi confrontati con clorexidina 2%. Questo supporta l'idea che

la doxiciclina al 3% presenta scarsa attività antimicotica su *Candida albicans*. Per meglio comprendere questo comportamento bisognerebbe indirizzare dei lavori sulla determinazione della concentrazione minima inibente (MIC). DG6 e clorexidina 2% mostravano risultati simili su tutti i batteri testati.

Sia la clorexidina che DG6 sono agenti cationici con proprietà antibatteriche. La natura cationica dei composti è capace di alterare l'integrità batterica promuovendo un legame con la componente anionica della superficie batterica (i gruppi fosfati dell'acido teicoico per i Gram-positivi e il lipopolisaccaride per i Gram-negativi). Dopo il danneggiamento della membrana cellulare, gli ioni potassio, una piccola entità, sono le prime sostanze ad apparire. Una volta alterata la permeabilità della membrana cellulare avviene una precipitazione di proteine citoplasmatiche che altera il bilancio osmotico cellulare che interferisce con la crescita, il metabolismo e la divisione cellulare, inibendo inoltre la membrana ATPase ed i processi anaerobici (Denton, 1991; Jenkins et al., 1988; Rizo & Enriquez, 2002). DG6 è un derivato di un gruppo di disinfettanti maggiormente utilizzati per la disinfezione di strumenti e per la disinfezione preoperatoria (Rizo & Enriquez, 2002). Recentemente DG6 è stato proposto co-

me irrigante canalare, soprattutto in America Latina.

Nonostante la capacità di inibire la crescita di tutti i ceppi valutati, né DG6 né la clorexidina 2% dimostrano la capacità di rimuovere lo *smear layer*, richiedendo un uso aggiuntivo di EDTA quale lavaggio finale. Nella ricerca di nuove soluzioni irriganti, capaci di eliminare i batteri, rimuovere lo *smear layer*, disorganizzare il biofilm con detossificazione del Lipide A, MTAD e Tetraclean hanno dimostrato risultati promettenti. Molti altri studi *in vivo* dovrebbero essere condotti per confermare il loro uso clinico.

CONCLUSIONI

DG6 e clorexidina 2% hanno inibito tutti i ceppi.

MTAD e Tetraclean hanno mostrato i maggiori aloni di inibizione se confrontati con le altre soluzioni.

Tetraclean era inattivo per la *Candida albicans*.

Traduzione a cura
del Dott. Cristiano Fabiani