

Endodontik İrigasyon Solüsyonlarının *Enterococcus Faecalis* Üzerine Etkisinin Vital/Devital Floresan Boyalarla Saptanması

Determination of the Effect of Irrigation Solutions on Enterococcus Faecalis Using Vital/Devital Fluorescent Dyes

Özge GÜLMEZ

Necdet ERDİLEK

Bilge Hakan ŞEN

Berdan AYDIN

Ege Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi, Diş Hastalıkları ve Tedavisi AD, Endodonti BD, İZMİR

Özet

Amaç: Sodyum hipoklorit (NaOCl), doymuş kalsiyum hidroksit (KH), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve klorheksidin (KHS) solüsyonlarının, dirençli bir mikroorganizma olan *Enterococcus faecalis* (ATTC 29212) üzerindeki etkilerinin makrodilüsyon yöntemi ve floresan mikroskopi kullanılarak araştırılmasıdır.

Yöntem: NaOCl, doymuş KH, EDTA ve KHS solüsyonlarının pH değerleri 20°C'de saptandı. Makrodilüsyon yöntemi ile her bir irigasyon solüsyonunun minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) *E. faecalis* için belirlendi. 10.000xg ivme ve 10 dakika süre boyunca santrifüj işlemi uygulandı. Boya üreticisi firmanın önerilerine uygun olarak yapılan floresan boyama işlemi ve karanlıkta 15 dakikalık inkübasyon sonrasında floresan mikroskopunda örnekler incelendi. Her dezenfektan için toplam 45 fotoğraf alındı.

Bulgular: Çalışmamızda en etkili irigasyon solüsyonu KHS olarak bulundu. Bunu NaOCl ve EDTA izledi. Doymuş KH solüsyonu ise *E. faecalis* üzerinde etkisizdi.

Sonuç: Kanal tedavisi başarısızlıklarında büyük rolü olan *E. faecalis*'in eliminasyonunda irigasyon solüsyonu olarak KHS kullanılması büyük yarar sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: *E. faecalis*, klorheksidin, floresan mikroskopi, makrodilüsyon

Abstract

Objective: *Enterococcus faecalis* is a resistant microorganism and has an important role on the recurrence of endodontic infections. The aim of this study was to evaluate the effect of sodium hypochlorite (NaOCl), saturated calcium hydroxide (KH), ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) and chlorhexidine (KHS) solutions on *Enterococcus faecalis* (ATTC 29212) using fluorescent microscopy and macrodilution method.

Materials and Methods: The pH values of NaOCl, saturated KH, EDTA and KHS solutions were determined at 20°C. The minimum inhibition concentration (MIC) values of the each solution were determined against to *E. faecalis* using macrodilution method. The tubes were centrifuged at 10,000xg acceleration for 10 min. Fluorescent dye was used according to manufacturer's instructions and the samples were incubated for 15 min in the dark. The samples were examined with fluorescent microscopy and 45 photos were taken for each irrigation solution.

Results: KHS was the most effective irrigation solution, followed by NaOCl and EDTA, respectively. Saturated KH solution could not eliminate *E. faecalis*.

Conclusion: Using KHS as an irrigation solution may provide a great advantage to eliminate *E. faecalis*.

Keywords: *E. faecalis*, chlorhexidine, fluorescent microscopy, macrodilution

Giriş

Sundqvist (1976) mikroorganizmalar ve mikroorganizma-periradiküler lezyon arasındaki ilişkiyi araştır-

mış ve periapikal bölgenin akut enflamasyonunu çeşitli bakteri türlerinin birlikte başlattığını göstermiştir.¹

Endodontik tedavilerin uzun dönemde başarısız olmasında en önemli etkenin dişlerin kök kanal sisteminde kalan dirençli mikroorganizmalar olduğu anlaşılmıştır.² Kök kanal sistemindeki dirençli mikroorganizma cinslerinden biri de enterokoklardır. Enterokoklar, zor çevresel koşullarda hayatta kalmaya ve çoğalmaya uygun, insan vücudunda komensal yaşam süren bakterilerdir. Kronik periapikal patoloji gösteren, ancak endodontik tedavisi tamamlanmış dişlerin yaklaşık üçte birinde tedavinin başarısız olmasında, dirençli bir enterokok türü olan *Enterococcus faecalis* rol oynamaktadır. Kanalda diğer bakterilere gereksinim duymadan canlı kalabilmekte ve enfekte kök kanallarından sıklıkla izole edilmektedir. *E. faecalis*, Gr(+) ve fakültatif anaerob bir bakteridir. İnsan enterokok enfeksiyonlarının %80-90'ından sorumlu ve baskın mikroorganizma türü olduğu tespit edilmiştir.^{3,4} Fırsatçı patojen bir mikroorganizmadır. Genelde doldurulmuş diş kök kanallarından izole edilen tek enterokok cinsidir.^{5,6} Enterokokların vital olgularda bulunması, kök kanalına çürük lezyonundan ya da gingival sulkustan geçmiş olabileceklerini düşündürmektedir. *E. faecalis*'in kanal içine endodontik tedavi sırasında geçtiği de düşünülmektedir.⁷

E. faecalis, kök kanal tedavisinde ara seanslarda kullanılan yüksek pH'lı kalsiyum hidroksit'in antibakteriyel etkisine direnç göstermektedir. *E. faecalis*'in hayatta kalma mekanizması hakkında çok az şey bilinmektedir. Bakterinin, KH'den salınan hidroksil (OH⁻) iyonlarının letal etkisinden dentinin tamponlama kapasitesi yoluyla korunduğu düşünülmektedir. Bunun dışında küçük koloniler halinde bulunmaları nedeniyle dentin kanallarının en dışındaki bakteriler dezenfektandan etkilenirken merkezdekiler canlı kalabilmektedir.^{8,9}

Shih ve ark. (1970) NaOCl'nin farklı dilüsyonlarının *E. faecalis*'i tamamen yok ettiği tüp dilüsyon çalışmasında 1:10.000'lik dilüsyonun etkisiz olduğunu ve çekilmiş tek köklü insan dişlerinde deney tekrarlandığında ise *E. faecalis*'in inatçı kalabildiğini belirlemiştir.⁹

Siqueira ve ark. (1997) bakteriyel inhibisyon zonlarının belirlendiği çalışmada %0,12'lik KHS'nin *E. faecalis*'in inhibisyonuna neden olduğunu gözlemiştir.¹⁰

Heling ve ark. (1992) çekilmiş sığır dişlerinde yaptıkları çalışmada kanal içi geçici dolgu maddesi (%2) olarak ve solüsyon (%0,2) halinde kullanılan KHS'nin *E. faecalis*'i inhibe ettiğini bildirmiştir.¹¹ Yine Heling ve ark. (1998) sığır dişlerinde etilen diamin tetraasetikasit (EDTA) solüsyonunun tek başına kullanıldığında *E. faecalis*'e karşı çok etkili olmadığını gözlemiştir.¹² Agar difüzyon testini kullanan Siqueira ve ark. (1998) ise EDTA'nın *E. faecalis*'i inhibe edici etkisini belirlemiştir.¹²

E. faecalis, yüksek tuz yoğunluğu, safra tuzları, asit, ısı, glikoz açlığı, yüksek pH, sodyum hipoklorit, yetersiz besin ortamı gibi kötü ortam şartlarına maruz kaldığında direncini artırmasını sağlayan çeşitli stres proteinleri üretmektedir.^{13,14} Eğer yetersiz besin ortamı, sodyum hipokloritle temas ya da KH difüzyonu *E. faecalis*'i stres yanıtı oluşturmak için indüklerse, KH ile tekrar temas ettiğinde bu yanıt direnç kazanmasını sağlayabilir.¹⁵ *E. faecalis*'in bu özellikleri nedeniyle kök kanal tedavisinde kullanılan dezenfektan solüsyonlarının irdelenmesi önem kazanmaktadır.

Yeni geliştirilen floresan boyalardan *Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit* (Molecular Probes, ABD) ile bakterileri boyama işlemi basitleşmiş, güvenilir ve kantitatif olarak canlı ve ölü bakterileri dakikalar içinde, çok çeşitli bakteri türleri varlığında bile, birbirinden ayırt edilebilir hale gelmiştir. Hücre duvarı zarar görmüş bakteriler kırmızı, zarar görmemiş olanlar yeşil boyanır. Zemin floresan özellik göstermez. Ayrıca bu kit ile geniş bir yelpazedeki bakteri tipleri ile çalışılabilmekte ve bu boyaların oranları ayarlanarak farklı çevresel şartlardaki bakterilerin optimal boyanması sağlanabilmektedir. Bu çalışmada da Vital/devital floresan boya ile floresan mikroskopi tekniği ve tüp dilüsyon testi kullanılarak NaOCl, doymuş KH, EDTA ve KHS solüsyonlarının, dirençli bir mikroorganizma olan ve endodontik enfeksiyonların tekrarlamasında büyük payı olduğu düşünülen *Enterococcus faecalis* üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Tablo 1'de görülen dezenfektan maddelerin *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) üzerine etkileri araştırıldı. Etken maddelerin minimal inhibisyon

konsantrasyonunu (MİK = Mikroorganizmaları inhibe eden en düşük madde yoğunluğu) belirlemede kullanılan makrodilüsyon yöntemi ve floresan boya (Live/Dead BacLight Viability Kit, L-7007, Molecular Probes, ABD) kullanılarak floresan mikroskopi yöntemi ile incelendi.

Tablo 1. Dezenfektan solüsyonlar

Dezenfektan	Üretici
Sodyum hipoklorit (NaOCl)	ACE, Procter & Gamble, İstanbul
Doymuş kalsiyum hidroksit (KH)	Toz, Merck, Darmstadt, Almanya
Etlen diamin tetra asetik asit (EDTA)	Toz, Merck, Darmstadt, Almanya
Klorheksidin diğlukonat (KHS)	Drogsan, Ankara

Solüsyonların Hazırlanması

NaOCl Solüsyonunun Hazırlanması

%5,25'lik NaOCl stok solüsyonu piyasada bulunduğu şekli ile alındı ve steril dH₂O ile seyreltilerek kullanıldı.

Doymuş KH Solüsyonunun Hazırlanması

Doymuş KH solüsyonu hazırlanırken 3,785 lt distile suya 11,5 g KH tozu (Merck, Darmstadt, Almanya) eklendi. Ultrasonik banyoda (Ultrasonic LC 30 H, ELMA, Darmstadt, Almanya) çözünmesi ve daha sonra 12 saat bekletilip fazla tozun çökmesi sağlandı. Daha sonra kağıt filtreden ve solüsyonun steril olması için 0,2 µm'lik milipor filtreden (FP 30/0,2 CA-S, Schleicher & Schuell, Almanya) geçirildi.

EDTA Solüsyonunun Hazırlanması

%17'lik EDTA stok solüsyonu; 17 gram EDTA tozu (Merck) üzerine 5 N NaOH solüsyonu (9,25 ml.) eklenerek ve dH₂O ile 100 ml.'ye tamamlanarak hazırlandı. Manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Ultrasonik banyoda tamamının çözünmesi sağlandı. Solüsyonun steril olması için 0,2 µm'lik milipor filtreden geçirildi.

Klorheksidin Solüsyonunun Hazırlanması

%4'lük klorheksidin diğlukonat solüsyonu (Drogsan, Ankara) stok solüsyon olarak kullanıldı. Distile su ile seyreltmeler yapıldı. Solüsyonun steril olması için 0,2 µm'lik milipor filtreden geçirildi.

Çalışmamızda kullandığımız dezenfektanlar her seferinde taze olarak hazırlandı. Her dezenfektanın pH'ı 20°C sıcaklıkta ölçüldü (Tablo 2).

Tablo 2. Kullanılan dezenfektanların pH değerleri

Dezenfektan	pH
EDTA (%17)	7,23
KHS (%4)	6,88
KH (doymuş solüsyon)	11,04
NaOCl (%5,25)	12,10

Bakterinin Besiyerine Ekilmesi ve Dezenfektanlarla İşlem

Çalışmamızda 2 ml.'lik beyin-kalp infüzyon sıvı besiyeri (*brain heart infusion broth*= BHI, Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, İngiltere) içeren tüpler hazırlandı. Dezenfektanların stok çözeltilerinden BHI besiyerinde seri dilüsyonları yapıldı. -80°C'de stoklanan *E. faecalis* kökeni kanlı agar (Merck) besiyerine ekildi ve 24 saat 35°C'de enkübe edildi. Bir gecelik kanlı agar kültürlerindeki kolonilerden McFarland 0,5'e göre (~10⁸ cfu/ml.) bakteri süspansiyonu hazırlandı.

2 ml. dezenfektanlı besiyeri içeren tüplere 10'ar µl. (5x10⁵ cfu/ml.) *E. faecalis* inoküle edildi. Plaklar 35°C'de 24 saat enkübe edildi. 24 saatlik enkübasyondan sonra üremenin görülmediği en düşük konsantrasyon "minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK)" olarak belirlendi.

Boyama İşlemi

MİK'in bir alt dilüsyonu [MİK(-)], MİK ve MİK'in bir üst dilüsyonundan [MİK(+)] 1000'er µl. mikropipetle alındı. 1,5 ml.'lik üç ayrı Eppendorf tüpüne kondu. Bakteri ve besiyerini ayırtmak amacıyla 10 dakika boyunca 10.000xg ivme ile santrifüje (Hettich, EBA12, D-78532, Tuttlingen, Almanya) edildi. Bu süre sonunda Eppendorf tüplerinde oluşan süpematın döküldü. Santrifüj işlemi biten her üç Eppendorf tüpüne bakteriyi besiyeri artıklarından arındırmak amacıyla 1,5 ml. steril dH₂O kondu. Tüplerin dibine çökmüş olan bakteri, 1,5 ml.'lik steril dH₂O ile iyice karışması amacıyla, mikropipetler ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. Tüplere tekrar 10 dakika boyunca 10.000xg ivme ile

santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant döküldü. Tüpte kalan bakteri üzerine boya üreticisi firmanın önerilerine uygun olarak 200 µl. dH₂O ve 10 µl. Live/Dead BacLight Viability Kit, L-7007'nin **A** [SYTO9 boyası, DMSO (dimetil sülfoksit) içinde 1,67 mM/pröpidyum iyodür, 1,67 mM, 300 µl. solüsyon] ve **B** [SYTO9 boyası, DMSO (dimetil sülfoksit) içinde 1,67 mM/pröpidyum iyodür, 1,83 mM, 300 µl. solüsyon] komponentleri karıştırılarak eklendi. Firmanın önerilerine uygun olarak boya eklenen her üç tüp 15 dakika karanlıkta enkübe edildi. Her tüpten üçer örnek olacak şekilde mikropipetle 5 µl.lik boya-bakteri karışımı alınarak lama damlatıldı. Örnekler floresan mikroskopta (Olympus, BX50, Japonya), 100x objektif (UplanApo, 100x /1,35 Oil Iris, Japonya) ve floresan filtre ile (Olympus, U-MWB) incelendi. Her örneğin 5 alanından toplam 45 alanın fotoğrafı çekildi (Fotoğraf makinesi: Olympus, PM-20, Explore Control Unit, Japonya; Film: FUJIFILM SUPERIA, ISO1600/33", Fuji Photo Film, Tokyo, Japonya). Fotoğraflarda canlı bakteriler yeşil, ölü bakteriler kırmızı renkteydi. Üretici firmanın verdiği bilgilere dayanarak sarı ve pas rengi olan bakteriler de ölü kabul edildi.

Bulgular

Çalışmamızda NaOCl, KH, EDTA, KHS, dezenfektan solüsyonlarının makrodilüsyon yöntemi ile hazırlanan bakteri, besiyeri ve dezenfektan bir arada bulunan tüplerde belirlenen MİK(-), MİK ve MİK(+) değerleri Tablo 3'de görülmektedir.

Tablo 3. Dezenfektanların *E. faecalis* için MİK(-), MİK ve MİK(+) değerleri (cfu/ml)

DEZENFEKTAN	MİK(-)	MİK	MİK (+)
NaOCl	$1,6 \times 10^{-1}$	8×10^{-2}	4×10^{-2}
KH	E T K İ S İ Z		
EDTA	$2,656 \times 10^{-1}$	$1,328 \times 10^{-1}$	$6,6 \times 10^{-2}$
KHS	$4,88 \times 10^{-4}$	$2,44 \times 10^{-3}$	$1,22 \times 10^{-4}$

Çalışmamızda KHS'nin MİK değeri diğer dezenfektanlara göre çarpıcı biçimde düşük bulundu; yani çok daha düşük yoğunlukta etkiliydi. KHS'e göre sırasıyla EDTA ve NaOCl'nin MİK değerleri daha yüksekti. Yani KHS'e göre daha yüksek yoğunlukta kullanıldıklarında

etkili olabildiler. Doymuş KH solüsyonu ise *E. faecalis*'e karşı etkisiz kaldı ve tüm tüplerde bakteri üredüğünden herhangi bir MİK değeri belirlenemedi.

NaOCl Görüntüleri

MİK(-) tüpünden alınan örneklerde alanın birkaç bakterisi dışında bakterilerden temizlendiği görülmektedir. Bu bakterilerin de ölü (kırmızı, sarı, pas rengi) olduğu izlendi. Fotoğraf çekimi sırasında karşılaştığımız diğer bir olgu canlı kalan bakterilerin ultraviyole ışık altında renk değiştirerek (yeşilden sarıya ve sonra da kırmızı renge) hızla canlılığını yitirmesi oldu. Resim 1a'da ölü bakteriler görülmektedir. MİK tüpünden alınan örneklerde ise alan MİK(-)'deki gibi birkaç bakteri içermesi dışında temizdir. Bu bakterilerin de tamamının ölü olduğu görülmektedir (Resim 1b). MİK(+) tüpü örneklerinde bol miktarda canlı bakteri gözlemlendi. Bazı alanlarda daha yüksek oranda ölü bakteri gözlemlendi (Resim 1c).

KH Görüntüleri

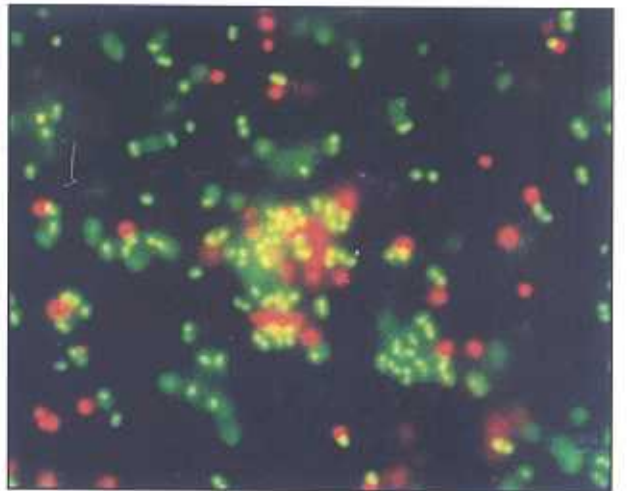
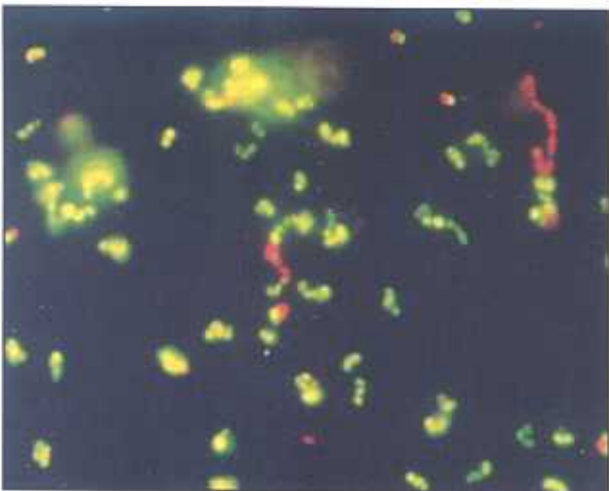
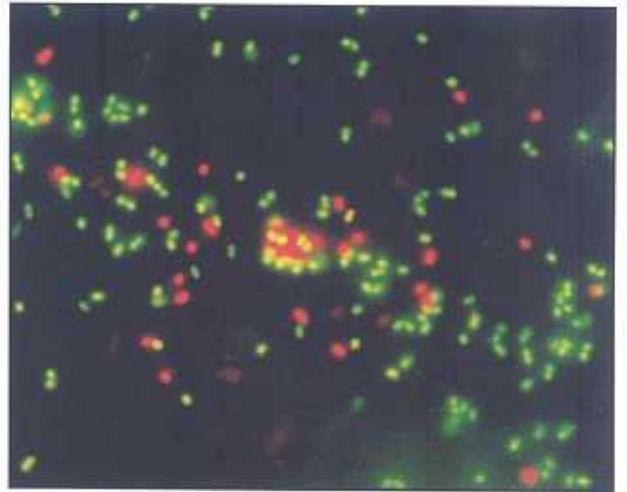
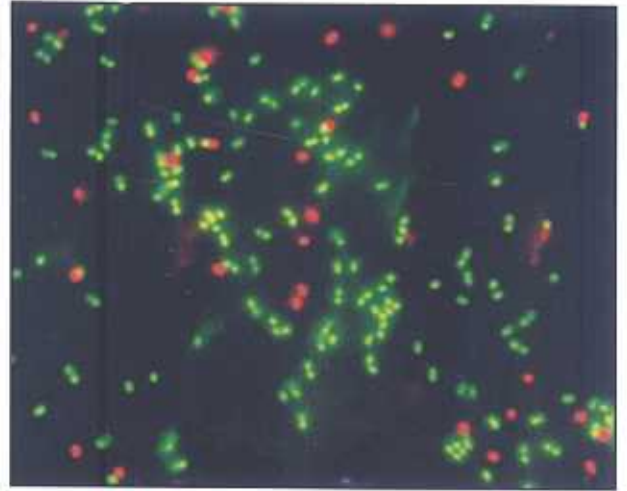
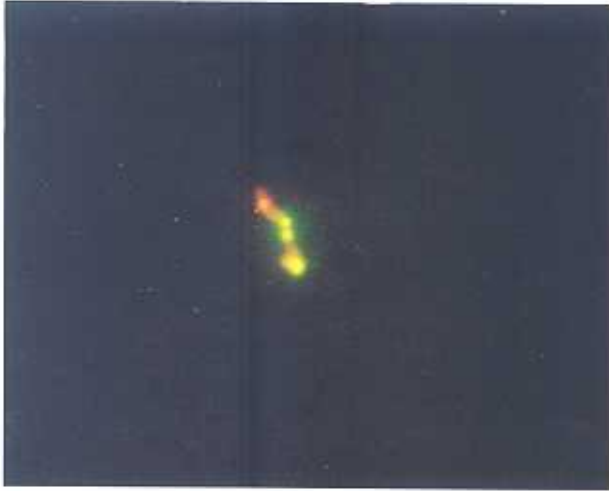
Tüm KH tüplerinde bakteri üredüğünden bol miktarda canlı bakteri bulunmaktadır (Resim 2a, 2b, 2c). Bu bulgu, bakterilerin doymuş KH solüsyonundan hiç etkilenmediğini göstermektedir.

EDTA Görüntüleri

MİK(-) örneklerinde birkaç canlı bakteri gözlenmektedir. Canlı olarak gözlenen bakteriler fotoğraf çekimi sırasında ultraviyole ışık etkisiyle bir süre sonra hızla kırmızı renk alarak canlılığını yitirmiştir (Resim 3a). MİK örneklerinde de birkaç bakteri gözlenmektedir. Ölü bakteriler sarı, kırmızı ve pas renginde görülmektedir (Resim 3b). MİK(+) örneklerinde canlı bakteri miktarı ölü bakterilerden daha fazladır (Resim 3c).

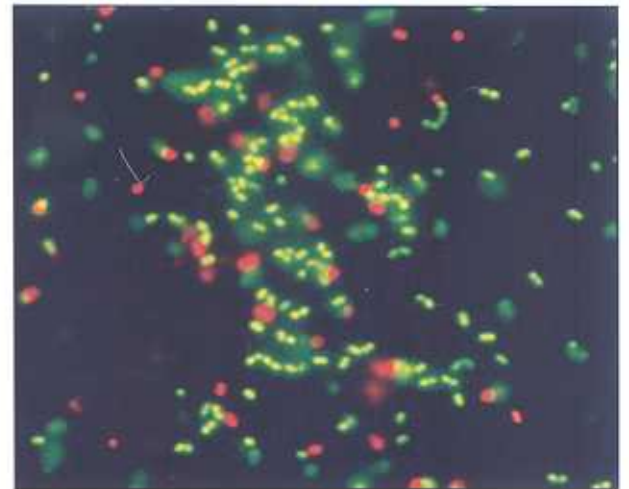
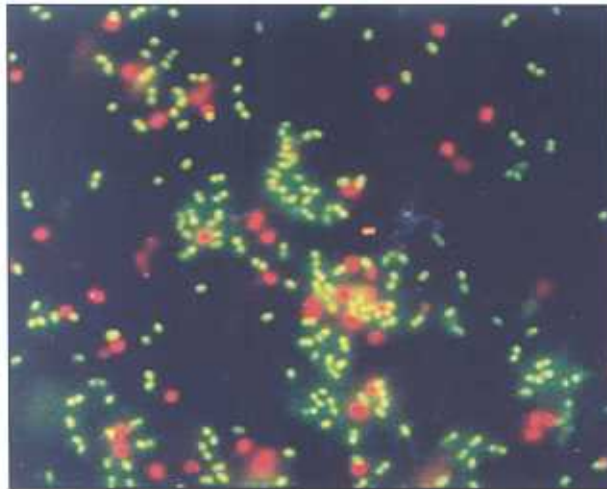
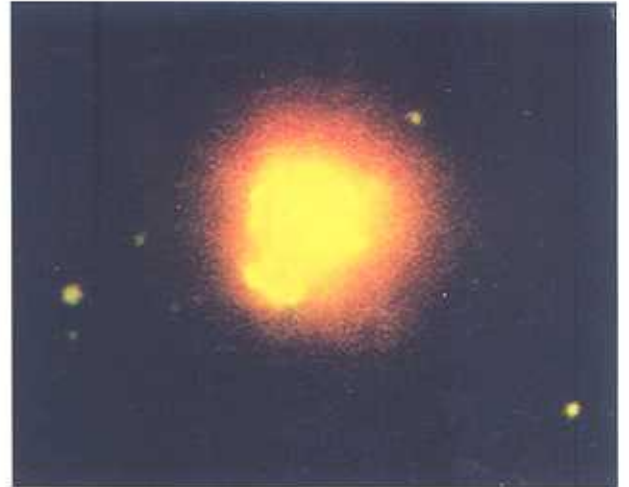
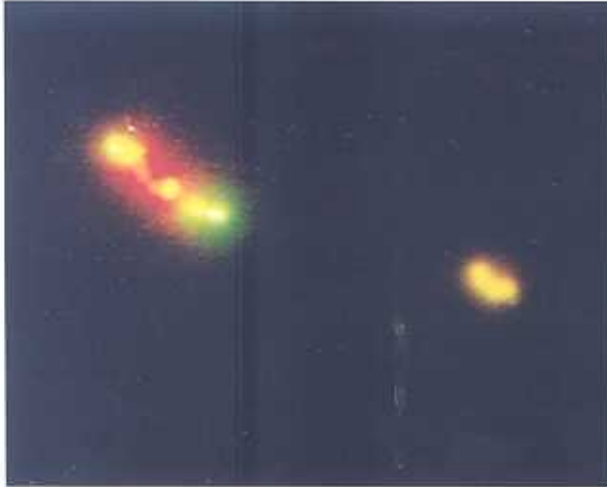
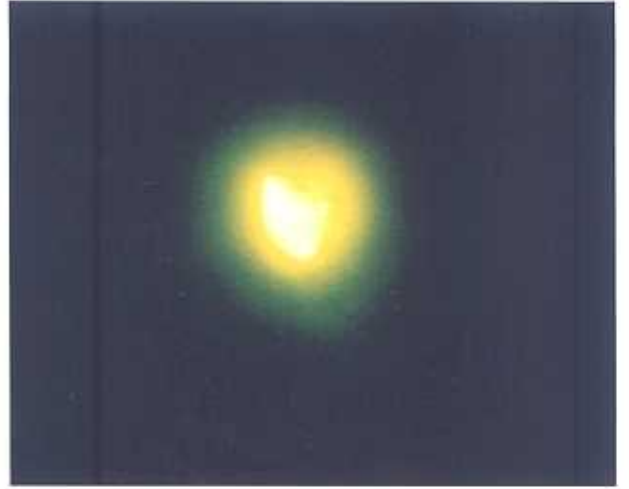
KHS Görüntüleri

KHS MİK(-) ve KHS MİK içeren tüplerden alınan örneklerde hiç bakteri kalmadığı görüldü (Resim 4a, 4b). KHS MİK(+) içeren tüpten alınan görüntüde bol miktarda canlı bakteri (yeşil renk), az miktarda ölü (kırmızı renk) ve ölmekte olan (sarı renk, pas rengi) bakteri görülmektedir (Resim 4c).



Resim 1 a, b, c

Resim 2 a, b, c



Resim 3 a, b, c

Resim 4 a, b, c

Tartışma

Enterococcus faecalis'in endodontik tedavisi tamamlanmış, inatçı periapikal lezyonlu dişlerin yaklaşık üçte birinde tedavinin başarısızlığına neden olduğu bilinmektedir. Enfekte kök kanallarından elde edilmesi, *in vitro* şartlarda kolay üretilmesi, kanal irigasyonunda kullanılan dezenfektanlara direnci ve kök kanal enfeksiyonlarının tekrarlamasına neden olduğundan çalışmamızda bu bakterinin kullanılması tercih edildi.^{5,6} Endodontik tedavide günümüzde sıklıkla kullanılan NaOCl, KH, EDTA ve KHS solüsyonları seçildi.

Bakteri canlılığını tespit eden geleneksel 'doğrudan sayma' yöntemleri hücre zarı bütünlüğünün metabolik özelliklerine dayanmaktadır. Metabolik özelliklere dayanan yöntemler sadece sınırlı bir bakteri grubu için kullanabilmektedir. Bakterilerin morfolojik, sitolojik ve fizyolojik özelliklerinin birbirinden farklı olması nedeniyle tüm bakterilere uygulanabilecek canlılığı doğrudan tespit edebilen bir yöntem geliştirmek güç olmaktadır. Yeni geliştirilen floresan boyalardan *Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit* ile boyama işlemi basitleşmiş, güvenilir ve kantitatif olarak canlı ve ölü bakterileri dakikalar içinde (çok çeşitli bakteri türleri varlığında bile) birbirinden ayırt edilebilir hale gelmiştir.

NaOCl, bir yüzyıldan uzun zamandır kullanılan geniş spektrumlu bir dezenfektan maddedir. Bakterilere, virüslere, funguslara etkili olduğu bildirilmiştir. Endodontide kullanımı önerildiğinden beri en yaygın kullanım alanı bulan irigasyon solüsyonudur.⁹

Araştırmacılar endodontik tedavide ara seanslarda geçici dolgu maddesi olarak kullanılan KH'nin pat formunun *E. faecalis* üzerinde, sulu solüsyon ve doymuş solüsyon formlarından daha etkili olduğunu gözlemişlerdir.^{16,17} Bu çalışmada ise doymuş KH solüsyonu, *E. faecalis*'e doğrudan temasta etkisini belirlemek amacıyla kullanıldı. Daha çok kanal içi smear tabakasını kaldırmada kullanılan ve antibakteriyel etkinliğinin düşük olduğu bildirilen EDTA'nın *E. faecalis*'e etkisi belirlenmek istendi.

KHS, antimikrobiyal etki spektrumunun geniş olması, diş dokusu ve muköz membranlar tarafından absorbe edilmesi ve bu dokulardan tedavi edici dozlarda tek-

rar uzun süreli salımı ve biyouyumu ile klinik olarak tercih edilen bir madde olduğu için çalışmamızda kullanıldı.¹⁸

Bu çalışmadaki tüp dilüsyon testinde, MİK(-), MİK ve MİK(+) değerleri belirlenen tüplerden alınan örnekler, vital/devital floresan boyalarla floresan mikroskopta incelendiğinde paralel sonuçlar elde edildi. MİK değeri açısından *E. faecalis*'e en etkili dezenfektan solüsyon KHS olarak belirlendi. KHS'nin MİK(-) ve MİK değerlerinin tüp dilüsyon testi ve floresan boyama yöntemlerinde *E. faecalis*'i tamamen yok ettiği görüldü. Daha sonra sırasıyla NaOCl ve EDTA solüsyonları etkili bulunurken doymuş KH solüsyonunun *E. faecalis* üzerinde etkisi olmadığı gözlemlendi. Tüm tüplerde bakteri üredüğünden doymuş KH solüsyonu için MİK değeri belirlenemedi.

Shih ve ark.⁹ tüp dilüsyon testi kullanarak yaptıkları çalışmada NaOCl'in 1:10.000'lik (%5,25x10⁻³'lük NaOCl) sulandırma *E. faecalis* üzerinde antimikrobiyal etki göstermediğini bildirmiştir. Bu sonuç elde ettiğimiz NaOCl MİK değerinden (%8x10⁻³) daha düşük olması ile çalışmamızla uyumludur.

Ohara ve ark.¹⁸ eş etkili dezenfektan solüsyon KHS olarak belirlemişler, doymuş KH solüsyonunun ise herhangi bir antibakteriyel etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca EDTA'nın sadece 1/10'luk sulandırmasının *P. gingivalis*'e 1, 15, 30 ve 60 dakika ve 1 haftalık sürelerde etkili olduğunu gözlemiştir. Çalışmamızda ise EDTA, KHS ve NaOCl'den sonra *E. faecalis*'e etkili oldu. Bakteri türleri farklı olsa da çalışmamızın sonuçları dezenfektan solüsyonların etkinliklerinin sıralaması açısından Ohara ve ark.¹⁸'nin sonuçları ile uyumludur.

Jeanson ve White²⁰ çekilmiş dişler ve koloni sayım yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada %2'lik KHS'nin antimikrobiyal etkinlik açısından %5,25'lik NaOCl kadar etkili olduğunu, ancak KHS'nin etkinliğinin daha uzun süreli olduğunu belirlemiştir. KHS, NaOCl'ye göre daha düşük yoğunlukta antibakteriyel etkinlik göstermesi açısından çalışmamızın sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Siqueira ve ark.¹⁰ agar difüzyon testi kullanarak yaptıkları çalışmada KH'nin distile su, kafurlu paramonoklorfenol ve gliserinli karışımlarının, %0,12'lik KHS

jelinin, %10'luk metronidazol jelinin aralarında *E. faecalis*'in (ATCC 29212) de bulunduğu çeşitli fakültatif ve anaerobik bakterilere etkilerini araştırmıştır. *E. faecalis*'e en etkili dezenfektanın KHS olduğunu, KH'nin kafurlu paramonoklorfenol ile karışımının bunu takip ettiğini, ancak distile su ve gliserin ile karışımının etkili olmadığını bildirmiştir. Bu araştırmacılar agar difüzyon testinde dezenfektanların etkinliğinin, dezenfektanın çalışmada kullanılan bakteri üzerindeki toksik etkisine, dezenfektanın agar içinde difüze olabileme yeteneğine bağlı olduğunu ve agar içinde asit ya da alkali etkilerinin değişebileceğini belirtmiştir. Bu şekilde KH'nin hem difüze olamaması hem de alkali etkisinin değişmesi nedeniyle etkili olmadığını düşünmektedir. Kafurlu karışımın etkisinin daha çok kafurdan kaynaklandığı bildirilmiştir. Farklı bir yöntem kullanılmış olmasına ve saydığımız bu dezavantajlara karşın KHS'nin en etkili dezenfektan olarak belirlenmiş olması çalışmamız sonuçları ile uyumludur.

Siqueira ve ark.¹³ %2'lik KHS (10 mm inhibisyon zonu) ve %2,5'luk NaOCl'nin (9 mm inhibisyon zonu) *E. faecalis*'e etkisini yaklaşık olarak birbirine eşit olarak gözlemiştir. Bu çalışmada inhibisyon zonlarının dezenfektanların agar içinde difüze olabileme yeteneklerine bağlı olabileceğini ve agar besi yerinin dezenfektanların antibakteriyel etkilerini azaltabileceğini belirtmiştir. Çalışmamızda sıvı besiyeri kullanmamızın, solüsyonların bakteri ile doğrudan temasının MİK değerini belirleyebilmemiz ve antibakteriyel etkinliklerini saptamamız açısından etkili olduğu sonucuna varıldı. Solüsyonların etkinliklerinin farklı sıralama göstermesinin kullanılan yöntemin, çalışma süresinin, enkübasyon süresi ve şartlarının farklı olmasıyla açıklanabileceği düşüncesindeyiz.

Waltimo ve ark.²¹ *E. faecalis*'in (ATCC 29212) doymuş KH solüsyonu ile ilk 20 dakika içinde canlılığını yitirdiğini, ancak sonraki 1 saatlik enkübasyonda birkaç bakteri hücrelerinin canlı kaldığını gözlemiştir. Bu çalışmada doymuş KH solüsyonunun hazırlanmasında solüsyonun filtre ile süzülüp süzülmediği hakkında bilgi olmadığından sonuçların farklılığının çözünmeden kalmış partiküllerin kalmasından kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Haapasalo ve ark.²² doymuş KH solüsyonu, %1'lik NaOCl ve %0,5-%0,05'lik KHS ve %2, %4, %0,2,

%0,4'lük iyodin potasyum iyodür solüsyonlarının *E. faecalis*'in (A197A) farklı bir standart kökeni üzerindeki antibakteriyel etkinliklerinin, insan dişinden *in vitro* şartlarda elde ettikleri steril dentin talaşı varlığında azaldığını, dentin talaşı eklenmediğinde tüm solüsyonların *E. faecalis*'i etkin bir şekilde yok ettiğini bildirmiştir. Bu çalışma sonuçları göz önüne alındığında çekilmiş dişlerde yapılan çalışmalarla tüp dilüsyon yöntemi ile yaptığımız çalışma arasındaki fark dentin varlığında solüsyonların etkinliklerinin azalması açısından açıklanabilir. Diğer bir yönden kök kanal irigasyonu sırasında mekanik temizleme ile erişilemeyen yerlerde kalan doku artıkları irigasyon solüsyonlarını nötralize edebilir ve bu da dezenfektan etkisini düşürebilmektedir. Tüp dilüsyon çalışmalarında dezenfektan maddeler mikroorganizma ile kök kanal irigasyonunda olduğundan daha yüksek oranda temas ettiğinden antimikrobiyal etkilerinin daha yüksek olduğu düşüncesine katılmaktayız.⁹

Weiger ve ark.²³ kanal genişletmesinden sonra sterilize ettikleri çekilmiş insan dişleri *E. faecalis* (ATCC 29212) ile enfekte ettikleri çalışmada vital/devital floresan boya (*Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit*) ve koloni sayım yöntemini karşılaştırmalı olarak kullanmıştır. Her iki yöntemin pat formundaki KH'nin geçici kanal patı olarak 4 hafta süreyle kullanılmasının *E. faecalis*'e etkili olmadığını gösterdiğini bildirmiştir. Tüp dilüsyon yöntemi ve Weiger ve ark. ile aynı floresan boyayı kullanarak doymuş KH solüsyonunun *E. faecalis*'e etkisiz olduğunu gözlediğimiz çalışmamızın sonucu bu çalışma ile paraleldir.

Evans ve ark.¹⁵ %0,0001'lik ve %0,005'lik NaOCl ve doymuş KH solüsyonu ile yaptıkları *in vitro* çalışmada 0, 15 ve 30 dakikalık temas sürelerinde *E. faecalis*'e (JH2-2) etkisini seri dilüsyon testi ve koloni sayım yöntemi kullanarak incelemiştir. *E. faecalis*'in %0,0001'lik ve %0,005'lik NaOCl ve doymuş KH solüsyonu ile 15 ve 30 dakikalık temas süreleri sonunda canlı kaldığını gözlemiştir. Ayrıca süre arttıkça solüsyonların etkinliğinin azaldığını ve daha fazla canlı bakteri gözlendiğini bildirmiştir. Bu çalışmanın dentin varlığında yapılmış olmasına karşın doymuş KH solüsyonunun etkisinin olmaması sonucu çalışmamız sonucuyla paraleldir. NaOCl'nin düşük yoğunluklarda etkisiz kalmasını yine dentinin tamponlama kapasitesine bağlayabiliriz. NaOCl için elde ettiğimiz

MİK değerinin (%0,08) bu çalışmada kullanılan yoğunluklardan daha yüksek olması açısından sonuçlar benzerdir.

Floresan vital boyama yöntemi ile bakterilerin canlı ya da ölü olduğunu belirlemede vital boyaların kalitatif ve kantitatif çalışmalarda kullanılabilmesi ileri sürülebilir. Çalışmamızın sonuçlarını dikkate alarak, floresan tekniğin diğer kültür tekniklerine gerek kalmadan daha etkili ve hızlı sonuç alınabilen bir teknik olduğunu söyleyebiliriz. Endodontik tedavide kök kanalının doldurulmasından önce kanal temizliğinin mikrobiyal kültür yoluyla belirlenmesi yerine daha hızlı ve güvenilir olan vital boyama ile floresan tekniğin kullanılmasının hataları önleyeceğine ve zamandan tasarruf edileceğine inanıyoruz.

Sonuç

Sonuç olarak KHS, NaOCl'den daha üstün ya da NaOCl ile eşit antimikrobiyal etki gösterirken, KH ve EDTA'dan çok daha etkili bir dezenfektan olarak ortaya çıktı. Özellikle dirençli bir mikroorganizma olan ve kanal tedavisi başarısızlıklarında büyük rolü olan *E. faecalis*'in kök kanalından eliminasyonunda KHS'nin irigasyon solüsyonu olarak kullanılmasının büyük yarar sağlayacağını söyleyebiliriz.

Klorheksidinin antibakteriyel etkinliğinin yüksek olması, dokular tarafından absorbe edilerek daha sonra ortama uzun süreli salımı, düşük toksisitesi nedeniyle endodontik tedavide kullanımı tavsiye edilmektedir. EDTA'nın kanal irigasyonunda kullanılması, antibakteriyel etkinliği, smear tabakasını kaldırarak diğer irigasyon solüsyonlarının daha etkin olmasını sağlaması özellikleri nedeniyle yararlı olacaktır. Ayrıca doymuş KH solüsyonu ile kanalın irigasyonu yerine pat formunun kullanılması önerilmektedir.

Endodontik tedavide kök kanalının doldurulmasından önce kanal temizliğinin mikrobiyal kültür yoluyla belirlenmesi yerine daha hızlı ve güvenilir olan vital boyama ile floresan tekniğin kullanılması hataları önleyecek ve zamandan tasarruf edilmesini sağlayacaktır. Vital floresan boyama tekniği endodontik çalışmalarda canlı ve ölü bakterileri aynı anda ve hızla tespit etmek için kullanılabilir.

Kaynaklar

1. Sugita EI. Microbiology of Endodontics. In: Ingle JI, Bakland LU. Endodontics. 4th Ed., Williams & Wilkins, Malvern, ABD; 1994.
2. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30: 297-306.
3. Love RM. *Enterococcus faecalis*-a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34: 399-405.
4. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31: 1-7.
5. Dahlen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of *enterococci* isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 309-314.
6. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998; 85: 86-93.
7. Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24: 119-125.
8. Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987; 13: 29-39.
9. Shih M, Marshall J, Rosen S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surg* 1970; 29: 613-619.
10. Siqueira JF, Uzeda M. Intracanal medicaments: Evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod* 1997; 23: 167-169.
11. Helling I, Sommer M, Steinberg D, Friedman M, Sela MN. Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in a sustained-release device for dentin sterilization. *Int Endod J* 1992; 25: 15-19.
12. Helling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* 1998; 31: 8-14.
13. Siqueira JF, Batista MMD, Fraga RC, Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998; 24: 414-416.
14. Hartke A, Giard JC, Laplace JM, Auffray Y. Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance and analysis of protein synthesis. *Appl Environ Mic* 1998; 64: 4238-4245.

15. Laplace JM, Thuault M, Hartke A, Boutibonnes P, Auffray Y. Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: influence of antecedent growth conditions and induced proteins. *Curr Microbiol* 1997; 34: 284-289.
16. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *E. faecalis* to $\text{Ca}(\text{OH})_2$. *Int Endodon J* 2002; 35: 221-225.
17. Helling I et al. Efficacy of sustained-release device containing chlorhexidine and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J* 1992; 25: 20-24.
18. Parsons G et al. Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surg* 1980; 49: 455-59.
19. Ohara PK, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9: 95-100.
20. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994; 20: 276-278.
21. Waltimo TMT, Siren EK, Ørstavik D, Haapasalo MPP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide *in vitro*. *Int Endod J* 1999; 32: 94-98.
22. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *Int Endod J* 2000; 33: 126-131.
23. Weiger R, Lucena J, Decker HE, Löst C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Int Endod J* 2002; 35: 166-171.

Yazışma Adresi:

Prof. Dr. Necdet ERDİLEK
Ege Üniversitesi,
Dişhekimliği Fakültesi,
Diş Hastalıkları ve Tedavisi AD,
Endodonti BD
35100 Bornova/İZMİR
Tel : 0232 388 03 28
Faks : 0232 388 03 25
E-posta : necdet.erdilek@ege.edu.tr