

ВЛИЈАНИЕ НА BENZALKONIUM CHLORID-ОТ ВРЗ КАРИОГЕНИТЕ БАКТЕРИИ И ВРЗ ВКУПНИОТ БРОЈ МИКРООРГАНИЗМИ ВО ПЛУНКАТА

Димков А.¹, Пановски Н.², С. Иљовска С.¹, Павлевска М.¹
М. Јовановска¹

¹ Клиника за детска и превентивна стоматологија, Стоматолошки факултет – Скопје;

² Институт за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет – Скопје

Апстракт

Една од групите средства за превенција на кариесот, кои ги апсорбира современата превентива, се хемиски средства. Во неа сфаќаат голем број препарати поделени во повеќе групи. Целта на овој труд е да се согледа влианието на benzalkonium chlorid-от, кватерново амониумово соединение од првата генерација, врз кариогените бактерии, како и врз вкупниот број микроорганизми во плунката. За реализирање на поставената цел беа земени испитаниите „Septolete“ од Крка, Ново Место – Словенија, во коишто активната суштинација со антимикробно дејство е benzalkonium chloride. Групата беше составена од 12 испитаници на возраст од 9-13 години од двата пола, пациенти на Клиниката за детска и превентивна стоматологија. Заради поголема прецизност и точност, испитаничката група беше и контролна. Испитаничките беа со добро општо и орално здравје и со приближно еднаков КЕП-индекс. Примероциите од плунка беа земани пред, и 20 минути по лижењето на испитанието односно парфиној, во претходните часови, без

претходно сprovedена утринска орална хигиена. Микробиолошките анализи се изведуваа на Институтот за микробиологија и паразитологија при Медицинскиот факултет во Скопје. Квантитативната застапеност на *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus* беше одредена со комерцијално набавени стириви, а вкупниот број микроорганизми беше одреден со стандардни микробиолошки методи. Кај сите испитаници постигоше значајно намалување во бројот на кариогените микроорганизми, вкупниот број аеробни и анаеробни микроорганизми, како и забички од типот на *Candida albicans*.

Клучни зборови: benzalconium chloride, Septolete, антимикробни средства, кариогени микроорганизми

Вовед

Современите механички и хемотерапевтски пристапи кон оралната хигиена имаат за цел да ја променат оралната микрофлора и да придонесат за здраво дентално и периодонтално ткиво. Во литературата се среќаваат различни поделби на антимикроб-

ните средства. Една од нив е поделбата во групи според хемиските карактеристики. Првата група е групата на **КАТЈОНИ** – позитивно наелектризирани јони со способност да ја нарушуваат мембранската функција на бактериите, нивната адхезија и користењето на гликоза.

Во оваа група на супстанции спаѓаат: **chlorhexidin**, **метални јони** (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Sn^{2+}), **aleksidin** (bisbiguanide, како што е и хлорхексидинот), **cetilpyridiniumchlorid** и **benzalkonium chlorid** (кватернови амониумски соединенија), **heksetidin** (синтетички hexahydroxygindin) и екстракти од **sanguinaria** (природен хербален екстракт).

Поради својот позитивен полнеж катјоните се привлечени од клеточниот бактериски ѕид, кој е со негативен полнеж. Грам+ бактериите се почувствителни на катјоните бидејќи тие се со поголем негативен полнеж. Мутанс стрептококите се грам+ бактерии и поради тоа се многу чувствителни. (3) Траењето на ефектот зависи од концентрацијата и од *суистантивносѝа* на средството, но исто така и од селективноста на полнителот (растворачот).

„*Суистантивносѝа*“ е фармаколошки термин кој значи способност на лекот или антимикробното средство да останат во контакт со целиот организам доволно долго за да го убијат или да го ослабнат. (1, 2, 5) *Суистантивносѝа* може да се процени со мерење на износот и времетраењето на опаѓањето на саливарните бактерии по едно плакнење со антимикробни средства. (4)

Официјалната фармакопеја на Соединетите Американски Држави го прифаќа *benzalkonium chloride* - кватерново амониумово соединение од првата генерација, како помошно антимикробно средство (7). Тој е активна супстанција што се наоѓа во одреден број плакначи и пасти за заби. Кај нас, меѓу другото, се наоѓа како активна суп-

станција во пастилите Septolete – Krka, Ново Место.

Целѝа на ова исуѝување е:

1. Да се утврди квантитативната застапеност на *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus species* во плунката пред и по употребата на пастилите Septolete – Krka, Ново Место;
2. Да се направи споредба на квантитативната застапеност на вкупната микробиолошка флора во устата на пациентот преку анализа на плунката пред и по употреба на пастилите Septolete – Krka, Ново Место;

Материјал и метод

Испитаничката група ја сочинуваа 12 деца од обата пола на возраст од 8 до 13 години. Заради поголема прецизност и точност во испитувањето, оваа група беше и контролна, што значи дека материјалот за анализа (плунка) е земен пред и по употребата на пастилите. Испитаниците беа со добро општо и орално здравје, со сличен хигиенски режим и начин на исхрана и со приближно еднаков КЕП-индекс (кариес/ екстракција/пломба индекс) што беше претходно констатирано од специјално подготвените анкетни листи. Изборот на испитаниците се изврши на Клиниката за детска и превентивна стоматологија при Стоматолошкиот клинички центар во Скопје, а микробиолошките анализи се работеа на Институтот за микробиологија и паразитологија при Медицинскиот факултет во Скопје.

Препаратот кој беше употребен во оваа студија се пастилите Septolete – Krka, Ново Место. Тие претставуваат комбинација од широкоспектрален антисептик и активни состојки од природно потекло, што го зголе-

муваат антисептичното дејство на препаратот и го подобруваат вкусот. Една пастила содржи:

- 1 mg бензалкониум хлорид (*Benzalkonii chloridum*)
- 1,2 mg ментол (*Mentholum*)
- 1 mg етерично масло од нане (*Aeth. Menthae pip.*)
- 0,6 mg етерично масло од евкалиптус (*Aeth. Eucalypti*)
- 0,6 mg тимол (*Thymolum*)

Редослед на испитувањето за одредување на антимикробниот ефект:

1. Отсуство на орална хигиена најмалку 12 часа пред отпочнување на постапката.
2. Земање на прв примерок плунка без претходно конзумирање храна, плакнење на устата и стимулирање на секретацијата.
3. Смукање на пастила Septolete – приближно 5 минути;
4. По упогребата на средството, плакнење на устата со 200 мл вода – приближно 15 секунди.
5. По пауза од 20 минути, земање втор примерок нестимулирана плунка.

МЕТОДИ ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА КВАНТИТАТИВНАТА ЗАСТАПЕНОСТ НА *STREPTOCOCCUS MUTANS* I *LACTOBACILLUS SPECIES* И ОДРЕДУВАЊЕ НА ВКУПНИОТ БРОЈ МИКРООРГАНИЗМИ ВО ПЛУНКАТА

За одредување на вкупниот број микроорганизми, плунката беше земена во посеб-

но за таа цел наменети стерилни шишенца со исплукување на 3-5 мл плунка пред и по лижењето на една пастила Septolete – Krka, Ново Место.

Примероците за одредување на квантитативната застапеност на *S. mutans* и *Lactobacillus* се земаат со CRT bacteria – комерцијално набавени стрипови, производство на Ivoclar-Vivadent, Schaan, Liechtenstein, со микробиолошки медиуми за селективна изолација на *Streptococcus mutans* на едната и за изолација на *Lactobacillus species* на другата страна на стрипот. Постапката се изведува на тој начин што најпрво се вади носачот на агарот од тест-шишенцето, потоа се става таблета NaHCO₃ на дното на шишенцето и се вадат заштитните фолии од двете страни на агарните површини. Користејќи ја пипетата од сетот, се врши целосно навлажнување на двете агарни површини со плунка. Со држење на носачот на агар малку накосо, се врши исцедување на вишокот плунка. Потоа носачот се враќа во шишенцето, се затвора и се испраќа на Институтот за микробиологија и паразитологија при Медицинскиот факултет во Скопје.

МИКРОБИОЛОШКА ОБРАБОТКА НА ПРИМЕРОЦИТЕ

Одредување на квантитативната застапеност на *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus species* во плунката

Со самото земање на примерокот фактички се изведува и засадувањето. По инкубација од 48 часа на 35-37° C, се бројат пораснатите колонии (colony forming units – CFU) доколку се во помал број, а доколку се повеќе, се споредуваат со стандардот даден на упатството на производителот и се интерпретираат како 10.000, 10.000-100.000, 100.000-1.000.000 и >1.000.000 CFU. Колониите на *Streptococcus mutans* се просирни на сина подлога, а колониите на *Lactobacillus species*

се со сивкасто-бела боја на зелена подлога. Со броењето на колониите се одредува приближниот број клетки на бактериите, бидејќи се смета дека од една клетка пораснува една колонија и затоа се означува како [единица што формира колонија – colony forming unit (CFU)“. По исушувањето, стриповите се складираат во фрижидер на 2-8°C, заштитени од светлина и траат со години, со можност за нивно читање во секое време.

Полуквантитативно одредување на вкушниот број микроорганизми во плунката

Полуквантитативното одредување на вкупниот број микроорганизми се изврши со калибрирана еза од 4 мм во пречник, при што се засадија по 50 микролитри плунка на секоја од трите погоре споменати подлоги на вообичаен начин (рутинска обработка). За добивање на изолирани колонии со разредување, на три сектори од Петриевата плочка, беше расадуван материјалот до половина на Петриевата плочка (сектор 1). Потоа, езата беше стерилизирана со жарење и од последните две линии од сектор 1 материјалот се расадуваше на четвртината од долниот дел на Петриевата плочка (сектор 2). На крајот, езата повторно беше стерилизирана и од последните две линии од сектор 2 материјалот беше расадуван на последната четвртина од Петриевата плочка (сектор 3). (6)

Резултатите беа читани полуквантитативно, односно густината на растот беше означувана со големи латински букви: А, В, и С. Со буквата А се означува густината на растот во првиот сектор, со В во вториот, а со С во третиот сектор. Секторот со буквата А претставува густ раст на колонии кој не може да се изброи (А>100 колонии во секторот), В – раст од 20 до 100 колонии, С – од 5 до 20, а 0 од 0 до 5 колонии. (6)

Резултати

Табела 1. - Број на пациенти со CFU (colony forming units) на *Streptococcus mutans* во 1 мл плунка

Str. mutans CFU/ml	Број на пациенти	
	пред употреба на средството	по употреба на средството
Нема раст	1	4
10 ²⁻³	/	/
10 ³⁻⁴	2	3
10 ⁴⁻⁵	1	2
10 ⁵⁻⁶	1	3
10 ⁶⁻⁷	7	/

Табела 2. - Број на пациенти со CFU (colony forming units) на *Lactobacillus species* во 1 мл плунка

Lactobacillus species CFU/ml	Број на пациенти	
	пред употреба на средството	по употреба на средството
Нема раст	1	1
10 ²⁻³	/	/
10 ³⁻⁴	/	2
10 ⁴⁻⁵	4	4
10 ⁵⁻⁶	1	5
10 ⁶⁻⁷	6	/

Табела 3. - Ефект на *Septolete* – Krka, Ново Место, врз редуцијата на бројот на кариогени-те бактерии во плунката (број на пациенти со логаритамски фактор на редуција – $\log R.F$)

$\log R.F^*$	Број на пациенти со	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lactobacillus species</i>
0	1**	4**
1	4	7
2	2	/
3	4	1
4	2	/

* $\log R.F = \log CFU$ пред – $\log CFU$ по употреба на средството

** Кај еден испитаник не се изолирани кариогени бактерии пред употребата на средството

Табела 4. - Густина на раст на **аеробни** бактерии во плунката пред и по употреба на пастилите *Septolete* – Krka, Ново Место

Густина на раст	Број на пациенти	
	пред употреба на средството	по употреба на средството
AAA	4	1
AAB	5	1
AAC	/	1
ABB	/	/
ABC	3	5
ABO	/	1
ACO	/	2
BBO	/	/
BCO	/	/
OOO	/	1

Табела 5. - Густина на раст на **анаеробни** бактерии во плунката пред и по употреба на пастилите *Septolete* – Krka, Ново Место

Густина на раст	Број на пациенти	
	пред употреба на средството	по употреба на средството
AAA	6	1
AAB	2	2
AAC	2	3
ABB	/	1
ABC	/	2
ABO	1	/
ACO	1	1
BBO	/	/
BCO	/	1
OOO	/	1

Табела 6. - CFU кај 4 пациенти со изолирана *Candida albicans* пред и по употреба на пастилите *Septolete* – Krka, Ново Место (кај 8 пациенти воопшто не се изолирани габички)

Пациент	Број на колонии	
	пред употреба на средството	по употреба на средството
I	4	1
II	2	0
III	8	0
IV	13	4

Дискусија

Досегашните студии работени со препаратот *Septolete - Krka*, Ново Место говорат за неговиот позитивен ефект во отстранувањето на благите инфекции во устата и грлото, во олеснувањето на воспалителните симптоми на горните дишни патишта, како и во спречувањето на секундарните инфекции предизвикани од бактерии и од *Candida albicans*. Испитувањата биле насочени кон амбулантно лекувани болни со симптоми на акутен фарингитис, фаринготрахеитис, ринофарингитис, ларингитис, бронхитис, акутен респираторен катар и тонзилофарингитис. Лечењето се состоело во повеќекратно (6 до 8 пати) дневно лижење на пастила *Septolete* во период од 5 до 10 дена. Резултатите покажале дека кај 35% болни, симптомите значително се подобриле, кај 56% болни тие исчезнале пред крајот на лекувањето (петтиот ден), додека кај само 9% болни, состојбата останала непроменета. Нашата студија претставува прв обид да се испита дејството на овој препарат и врз кариогената микрофлора во устата на пациентите, пред сè на децата, со оглед дека таа претставува еден од основните фактори за понатамошен развој на кариесот. Од табелите 1 и 2 може да се види сигнификантно намалување на бројот на *Streptococcus mutans* и на *Lactobacillus species* кај оние субјекти кај кои е потврден нивниот раст пред лижењето на пастилата. (Кај еден испитаник не се изолирани кариогени бактерии пред употреба на средството). Степенот на намалување кај одделни пациенти може да се види на табела 3 со логаритамскиот фактор на редуција, кој се движи од 10 до 10.000 пати за *Streptococcus mutans*. Кај 8 пациенти е детектирано намалување на бројот на *Lactobacillus species* и тоа кај 7 од нив за 10, а кај 1 за 1000 пати. Логаритамскиот фактор на редуција - Log R.F - претставува вредност на логаритамот на Colony Forming Units (CFU) пред минус логаритамот на Colony Forming Units (CFU) по употреба на средството. Густината на растот на аеробните бактерии во плунката пред и по употреба на

средството односно на пастилите *Septolete - Krka*, Ново Место се прикажани на табела 4. Девет испитаници имале густ раст на колонии ($A > 100$ колонии во сектор и B - раст од 20 до 100 колонии во сектор) пред употреба на средството. Три испитаника имале релативно густ раст на колонии во сектор пред употреба на средството. Од добиените резултати по употреба на средството очигледно е поместувањето на густината на растот на колониите кон оние сектори со мал (C - од 5 до 20), односно без (0) раст на колонии. Слична е состојбата и со густината на растот на анаеробните бактерии што најдобро може да се види од табела 5, односно секторот AAA каде што од 6 испитаника со густина на раст поголема од 100 колонии останал само еден испитаник со таква густина. Од ова може да заклучиме дека пастилите *Septolete - Krka*, Ново Место, го намалуваат вкупниот број на аеробни и анаеробни микроорганизми притоа не предизвикувајќи стерилизација на усната празнина. Резултатите добиени за редуција на *Candida albicans* кај четирите испитаника пред и по употребата на средството, што се гледа на табела 6, го потврдуваат фунгицидното дејство на пастилите *Septolete - Krka*, Ново Место.

INFLUENCE OF BENZALKONIUM CHLORIDE ON CARIOGENIC MICROORGANISMS AND TOTAL SALIVARY FLORA

Dimkov A., Panovski N., Iljovska S., Pavlevska M., Jovanovska M.

Abstract

One of the groups of antimicrobial agents for caries prevention that have been cited by contemporary preventive dentistry is the group of chemical means. This group consists of a number of preparations divided into several subgroups. The aim of

this study was to find out the influence of benzalconium chloride, a quaternary ammonium compound of the first generation, on cariogenic microorganisms and on overall salivary flora. In order to accomplish this goal, "Septolete" pastilles, produced by Krka from Novo Mesto - Slovenia, were used that have benzalconium chloride as their active antimicrobial compound. The group consisted of 12 healthy schoolchildren between 9 and 13 years of age of both sexes, patients at the Department for Pediatric Dentistry of the Faculty of Dental Medicine in Skopje. In order to obtain higher precision and accuracy, the same group was used as a control group as well. The investigated patients had good oral health, similar hygiene habits, normal dietary regimens, and similar DMF indexes. Saliva samples were taken before and 20 minutes after a pastille had been licked, early in the morning, following a period of at least 12 hours with no oral hygiene. The microbiological analyses were carried out at the Institute of Microbiology and Parasitology of the Medical Faculty in Skopje. The counts of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species were determined with the use of commercial CRT bacteria strips produced by Ivoclar-Vivadent, Liechtenstein, while the total count of saliva microbials was determined by standard microbiological methods. A significant reduction in salivary MS and LB levels was observed in all samples along with a decrease in the total count of aerobic and anaerobic bacteria and yeast.

Key words: Benzalconium chloride, Septolete, antimicrobial agents, cariogenic microorganisms

Литература

1. Adams D., Addy M. Mouthrinses. *Adv Dent Res* 1994; 8 (2):291-301
2. Anderson M.H., Bratthall D., Einwag J., Elderton R.J., Ernst C.P., Levin R.P., Tynelius-Bratthall G., Willershausen-Zönnchen B. *Professional Prevention in Dentistry Williams & Wilkins* Baltimore, Philadelphia, Hong Kong, London, Munich, Sydney, Tokyo *A Waverly Company* 1994
3. Anti-microbial agents and treatments with special reference to dental caries. Postal address: Faculty of Odontology, Carl Gustafs Väg 34, SE - 214 21 Malmö, Sweden.
4. Jenkins S., Addy M., Wade W., Newcombe R.G. The magnitude and duration of the effects of some mouth rinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1994 Jul;21(6):397-401
5. Mandel I.D. Antimicrobial mouth rinse: overview and update. *J Am Dent Assoc.* 1994 Aug; 125 Suppl 2:2S-10S
6. Пановски Н. Испитување на факторите одговорни за опстанокот на медицински значајните соеви на неспорогените анаеробни бактерии „in vitro“ - докторска дисертација. Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Медицински факултет, Скопје 1990.
7. Seymour S.B. *Disinfecting, Sterilization and Preservation* Fourth edition Lea & Febiger Philadelphia - London 1991