



*Valutazione comparativa dell'attività battericida
di formulazioni disinfettanti di collutori a base di
clorexidina.*

Prof. Massimo Clementi

Università Vita-Salute San Raffaele di Milano



**Università
Vita-Salute
San Raffaele**

Giugno 2003

**VALUTAZIONE COMPARATIVA DELL'ATTIVITÀ BATTERICIDA DI
FORMULAZIONI DISINFETTANTI DI COLLUTORI A BASE DI
CLOREXIDINA**

(Giugno 2003)

Coordinatore dello studio:

PROF. MASSIMO CLEMENTI
CATTEDRA DI MICROBIOLOGIA
UNIVERSITA' VITA-SALUTE SAN RAFFAELE
MILANO

Introduzione e finalità dello studio

Il presente studio ha valutato in modo comparativo l'efficacia microbica di due formulazioni a base di clorexidina per l'antisepsi del cavo orale. In passato, l'efficacia della clorexidina in odontoiatria è stata ampiamente valutata¹. La clorexidina, antisettico di sintesi, è un composto formato da due anelli 4-fenolici e due gruppi biguanidici connessi ad una catena centrale esametilénica; il composto è idrosolubile, fortemente basico e viene stabilizzato come sale digluconato². La clorexidina ha dimostrato un ampio spettro d'azione disinfettante³. Le formulazioni di clorexidina proposte in odontostomatologia hanno concentrazioni variabili tra 0,05% e 0,30% di prodotto attivo. La clorexidina esplica la sua azione antisettica in due momenti, attraverso un'azione battericida immediata (denaturazione dei componenti citoplasmatici batterici) e attraverso un'azione protratta, di tipo batteriostatico (attività residua). Va considerato inoltre che un ruolo non irrilevante nella efficacia della disinfezione può essere giocato anche dagli eccipienti contenuti nella formulazione⁴. L'azione immediata, in particolare, sembra essere correlata alla concentrazione del composto⁵. In tale contesto, il presente studio è stato programmato per valutare la dinamica e l'entità dell'attività battericida di due formulazioni a base di clorexidina, alla rispettiva concentrazione di prodotto attivo dello 0,20% e dello 0,30%. Nello studio è stata seguita (modificata per la particolare applicazione ad uno studio comparativo) la metodologia prevista dallo standard EN 12054, luglio 1995 (fase 2, step 1)⁶. Esso descrive un metodo per valutare formulazioni disinfettanti liquide e indica i requisiti minimi per definire tale attività battericida. In tale standard, una formulazione disinfettante deve dimostrare d'indurre una riduzione nei conteggi vitali degli organismi test *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae* da $1.0-3.0 \times 10^7$, a non più di 3.0×10^2 , nei tempi considerati.

¹ Nonato, M et al., Min. Stom. 5, 547-556, 1989.

² Fardal, O & Turnbull, R.S., JADA 112, 863-869, 1989.

³ Tonelli, PM et al., J Western Soc. Periodontol. 31, 5-18, 1983.

⁴ Cerroni, L. et al., Dent. Mod. 7, 41-50, 1998.

⁵ Benetti F. et al. Dent. Mod. 9, 55-61, 2000.

⁶ Chemical disinfectants and antiseptics –Products for hygienic and surgical handrub and handwash - Bactericidal activity – Test Method and requirement, draft prEN 12054, July 1995. Phase 2 /Step 1.

Il test per la valutazione dell'attività battericida si basa sul trattamento di sospensioni batteriche in sospensione con il prodotto disinfettante per tempi predeterminati in base alle finalità di applicazione e alla tipologia della formulazione disinfettante. Al termine dell'incubazione, l'azione battericida della formulazione disinfettante viene neutralizzata con un metodo precedentemente validato (si utilizza normalmente una procedura di diluizione-neutralizzazione, mentre nei casi in cui non sia disponibile un valido neutralizzante, si può ricorrere al metodo di filtrazione su membrana). Al termine della neutralizzazione, viene determinato il numero dei batteri ancora vitali e viene calcolata la riduzione indotta dall'azione della formulazione disinfettante.

Materiali e metodi

Formulazioni disinfettanti e preparazioni della soluzione del prodotto da saggiare

Il presente studio ha valutato le formulazioni disinfettanti denominate MENTADENT PROFESSIONAL CHLORHEXIDINE 0,2% e MENTADENT PROFESSIONAL CHLORHEXIDINE 0,3%.

In base alle informazioni fornite dal produttore, 100,0 g. della formulazione MENTADENT PROFESSIONAL CHLORHEXIDINE 0,2% contengono: sorbitol 70% 4,0 g., xyllitol 43,3% 8,0 g., propilen glycol 1,0 g., peg-40 2,5 g., poloxamer 407 0,5 g., chlorhexidine digluconate 20% 1,08 g., sodium benzoate 0,3 g., sodium saccharin 0,1 g., citric acid 0,02 g., mentha piperita 0,05 g., menthol 0,05 g., anethole 0,05 g., C.I. 42090 1% 0,1 g., C.I. 19140 1% 0,1 g., acqua depurata q.b. a g. 100,0. La formulazione MENTADENT PROFESSIONAL CHLORHEXIDINE 0,3% contiene in 100,0 g: sorbitol 70% 4,0 g., xyllitol 43,3% 8,0 g., propilen glycol 1,0 g., peg-40 2,5 g., poloxamer 407 0,5 g., chlorhexidine digluconate 20% 1,6 g., sodium benzoate 0,3 g., sodium saccharin 0,1 g., citric acid 0,02 g., mentha piperita 0,05 g., menthol 0,05 g., anethole 0,05 g., C.I. 42090 1% 0,1 g., C.I. 19140 1% 0,1 g., acqua depurata q.b. a g. 100,0. Le formulazioni in esame (lotto:030603) sono state saggiate indiluite, come fornite dal produttore.

Terreni di coltura e reagenti

Agar di triptone di soia (TSA) (Merk). Questo terreno è stato utilizzato, nel presente studio, per l'esecuzione dei conteggi vitali. Composizione: triptone (digestione di caseina) 15,0 g., peptone di soia (digestione di farina di soia) 5,0 g., NaCl 5,0 g., agar 15,0 g., acqua bidistillata sterile q.b.a 1000 ml (il terreno è stato sterilizzato in autoclave prima dell'aggiustamento del pH a 7,2).

Brodo di coltura di triptone di soia (TSB) (Merk). Questo terreno è stato utilizzato, nel presente studio, per la preparazione delle sospensioni batteriche.

Composizione: triptone (digestione di caseina) 15.0 g., peptone di soia (digestione di farina di soia) 5,0 g., NaCl 5,0 g., acqua bidistillata sterile q.b.a 1000 ml (il terreno è stato sterilizzato in autoclave prima dell'aggiustamento del pH a 7,2).

Neutralizzante. E' stato utilizzato il seguente neutralizzante: Lecitina 3 g., TWEEN 80 30 g. Sodio Tiosolfato 5 g. L-istidina 1 g. Saponina 30g. in 1000 ml di tampone fosfato (PBS). Il metodo di diluizione-neutralizzazione è stato validato secondo il seguente schema. Dopo aver equilibrato i reagenti a 20°C in bagnomaria, sono stati aggiunti 9.0 ml di formulazione disinfettante a 1.0 ml di acqua bidistillata sterile. La provetta è stata incubata 1 minuto a 20°C. Successivamente, 1.0 ml della miscela è stato trasferito in una provetta contenete 8.0 ml di neutralizzante, incubando di nuovo per 1 minuto a 20°C. Al termine dell'incubazione, è stato aggiunto 1.0 ml di una sospensione batterica ($2,0 \times 10^3$ ufc/ml; vedere avanti, "preparazione delle sospensioni batteriche"), incubando ancora per 1 minuto. Infine, 1.0 ml della sospensione neutralizzata è stato aggiunto a 12.0 ml di TSA fuso (raffreddato a 45°C) in piastra di Petri. Le piastre sono state incubate a 37°C per 48 ore, sono state eseguite le conte vitali ed è stato, infine, calcolato il numero medio di ufc/ml. Parallelamente è stata valutata la tossicità intrinseca del neutralizzante, nel seguente modo. Si è miscelato 1.0 ml della sospensione batterica insieme con 9.0 ml di neutralizzante. Dopo una incubazione in bagnomaria (20°C) per 5 minuti e sospensione tramite vortex, 1.0 ml della mistura è stato seminato in TSA come indicato sopra. Dopo incubazione per 48 ore a 37°C, sono state contate le colonie, verificando la corrispondenza con la diluizione eseguita.

Diluente. Nel presente studio è stato utilizzato un diluente a base di triptone-sodio cloruro. Composizione: triptone (digestione di caseina) 1.0 g., NaCl 8.5 g., acqua bidistillata sterile q.b.a 1000 ml.

Ceppi batterici e preparazione delle sospensioni batteriche

L'attività battericida delle formulazioni è stata valutata utilizzando:

- *Escherichia coli* K12 (NCTC 10538)
- *Enterococcus hirae* (ATCC 10541)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442).

Per la preparazione delle sospensioni batteriche si è proceduto come segue. Gli stock batterici sono stati subcoltivati due volte. Le sospensioni batteriche sono state infine aggiustate in diluente alla concentrazione di circa 3.0×10^3 ufc/ml e una diluizione 10^{-1} di tale sospensione è stata seminata in piastre di Petri (TSA) al fine di valutare con esattezza la concentrazione dei batteri vitali. Sulla base dei risultati, le sospensioni batteriche iniziali sono state infine portate alla concentrazione di 2.0×10^7 ufc/ml.

Esecuzione del saggio vero e proprio e valutazione dei dati

Tutti i reagenti sono stati equilibrati a 20°C in bagnomaria. Un ml (1.0 ml) di sospensione batterica è stato aggiunto a 8.0 ml della formulazione indiluita e 1.0 ml di acqua bidistillata sterile. L'attività della formulazione è stata saggiata ai tempi di 30 secondi, 1 minuto, 3 minuti e 5 minuti. Allo scadere del tempo d'incubazione, 1.0 ml della miscela è stato aggiunto a 9.0 ml di neutralizzante, incubando per 5 minuti. Sono state, quindi, allestite le diluizioni 10^{-1} , 10^{-2} (eventualmente 10^{-3}) della miscela e 1.0 ml di ciascuna diluizione è stato aggiunto in triplicato a 12.0 ml di terreno TSA fuso, raffreddato a 45°C. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore. Al termine sono state contate le unità formanti colonia (ufc) e le piastre sono state di nuovo incubate per ulteriori 24 ore al fine di valutare eventuali colonie a crescita tardiva.

I risultati sono stati espressi in ufc/ml per ciascun microrganismo testato e per ciascun tempo di contatto. Qualora tutti i valori delle diverse diluizioni siano risultati inferiori a 300 ufc per piastra, per calcolare il valore delle ufc/ml nella miscela sono stati considerati i valori del campione indiluito. Quando le conte vitali hanno fornito valori inferiori a 3.0×10^2 ufc per ml, il dato è stato riportato come $< 3.0 \times 10^2$ ufc/ml.

Risultati

A) Saggio preliminare

La procedura di neutralizzazione-diluizione dell'attività della formulazione disinfettante allo studio è stata validata come segue. Sono state allestite diluizioni delle sospensioni batteriche contenenti da $1,0 \times 10^2$ a $3,0 \times 10^2$ ufc/ml (**N**). Dopo aver equilibrato i reagenti a 20°C in bagnomaria, 1,0 ml di acqua bidistillata sterile è stato aggiunto a 9,0 ml di formulazione disinfettante. La provetta è stata incubata 1 minuto a 20°C. Successivamente, 1,0 ml della miscela è stato trasferito in una provetta contenente 8,0 ml di neutralizzante, incubando di nuovo per 1 minuto a 20°C. Al termine dell'incubazione, è stato aggiunto 1,0 ml della sospensione batterica, incubando ancora per 1 minuto. Infine, 1,0 ml della sospensione neutralizzata è stato aggiunto a 12,0 ml di TSA fuso (raffreddato a 45°C) in piastra di Petri. Le piastre sono state incubate a 37°C per 48 ore, sono state eseguite le conte vitali ed è stato, infine, calcolato il numero medio di ufc/ml. In parallelo sono stati eseguiti i controlli della sospensione batterica in neutralizzante (vedi sotto) e in diluente. Le piastre sono state incubate a 37°C per 48 ore, sono state eseguite le conte vitali ed è stato calcolato il numero medio di ufc/ml (**n'**).

Parallelamente, è stata anche valutata la tossicità intrinseca del neutralizzante, nel seguente modo. A 9,0 ml di neutralizzante è stato aggiunto 1,0 ml della sospensione batterica alla concentrazione di $2,0 \times 10^3$ ufc/ml. Dopo una incubazione in bagnomaria (20°C) per 5 minuti e sospensione tramite vortex, 1,0 ml della miscela è stato seminato in piastre TSA. Dopo incubazione per 48 ore a 37°C, è stato contato il numero di colonie, verificando la corrispondenza con la diluizione eseguita (**N'**).

I risultati ottenuti nel saggio preliminare di validazione dei reagenti e della procedura di neutralizzazione sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Saggio preliminare: validazione della procedura di diluizione-neutralizzazione.

Microrganismi test	N	N'	n'
<i>E. coli</i>	$2,6 \times 10^2$	$1,68 \times 10^2$	$1,22 \times 10^2$
<i>E. hirae</i>	$2,4 \times 10^2$	$1,94 \times 10^2$	$1,34 \times 10^2$
<i>S. aureus</i>	$2,3 \times 10^2$	$1,86 \times 10^2$	$1,40 \times 10^2$
<i>P. aeruginosa</i>	$2,6 \times 10^2$	$1,82 \times 10^2$	$1,22 \times 10^2$

N= numero di ufc/ml delle sospensioni batteriche iniziali; N'= numero di ufc/ml del controllo della tossicità del neutralizzante; n'= numero di ufc/ml del controllo della procedura di diluizione-neutralizzazione.

I criteri di validità del saggio prevedono che i valori di N e N' siano compresi tra $1,0 \times 10^2$ e $3,0 \times 10^2$, N' sia più grande di $0,5 \times N$ e n' sia più grande di $0,5 \times N'$. I saggi di validazione della procedura di neutralizzazione e di valutazione di tossicità del neutralizzante hanno, pertanto, soddisfatto i requisiti di validità.

B) Saggio vero e proprio e valutazione dell'attività battericida.

Nel saggio vero e proprio le formulazioni disinfettanti in esame sono state valutate per la loro attività battericida ai tempi: 15 secondi, 30 secondi, 1 minuto, e 5 minuti. I dati ottenuti nel saggio vero e proprio dell'attività battericida sono mostrati nelle Tabelle 2 e 3.

Tabella 2. Saggio vero e proprio. MENTADENT PROFESSIONAL CHLORHEXIDINE 0,2%

Specie batteriche	15 secondi	30 secondi	1 minuto	5 minuti
<i>E. coli</i> (10^{-5} :140, 180, 192) $N=1.86 \times 10^7$	(10^{-1} : 36, 42, 48) $>3.0 \times 10^2$	(10^{-1} :16,10,14) $<3.0 \times 10^2$	(ind: 12,10,10) (10^{-1} :2,2,1) $<3.0 \times 10^2$	(ind:0,1,0) $<3.0 \times 10^2$
<i>E. hirae</i> (10^{-5} :188,190,190) $N=1.90 \times 10^7$	(10^{-1} :52,82,48) $>3.0 \times 10^2$	(10^{-1} :12,6,18) $<3.0 \times 10^2$	(ind: 22,14,12) (10^{-1} :2,3,2) $<3.0 \times 10^2$	(ind:0,1,0) $<3.0 \times 10^2$
<i>S. aureus</i> (10^{-5} :182, 216,200) $N=1.99 \times 10^7$	(10^{-1} :70,70,60) $>3.0 \times 10^2$	(10^{-1} :14,12,10) $<3.0 \times 10^2$	(ind: 26,14,22) (10^{-1} :2,1,1) $<3.0 \times 10^2$	(ind:0,0,2) $<3.0 \times 10^2$
<i>P. aeruginosa</i> (10^{-5} :180, 210,205) $N=1.98 \times 10^7$	(10^{-1} :82,78,82) $>3.0 \times 10^2$	(10^{-1} :10,16,16) $<3.0 \times 10^2$	(ind: 12,20,20) (10^{-1} :3,2,3) $<3.0 \times 10^2$	(ind:1,1,0) $<3.0 \times 10^2$

Tra parentesi il numero di microrganismi per piastra rilevati nei tre replicati. I valori in ufc/ml (media aritmetica dei tre replicati, considerato il fattore di diluizione) sono indicati come numero assoluto per le sospensioni batteriche madri utilizzate nel test (N) e con la dizione superiore o

inferiore $3,0 \times 10^2$ per le valutazioni della vitalità residua delle sospensioni dopo trattamento. In grassetto le valutazioni che hanno fornito un valore inferiore a $3,0 \times 10^2$.

Tabella 3. Saggio vero e proprio. MENTADENT PROFESSIONAL CHLORHEXIDINE 0,3%

Specie batteriche	15 secondi	30 secondi	1 minuto	5 minuti
<i>E. coli</i> (10^{-5} :140, 180, 192) <i>N=1.86 x 10⁷</i>	(10^{-1} : 10,10,6) <3.0 x 10²	(10^{-1} :8,10,6) <3.0 x 10²	(ind: 10,12,12) (10^{-1} :1,2,1) <3.0 x 10²	(ind:0,1,0) <3.0 x 10²
<i>E. hirae</i> (10^{-5} :188,190,190) <i>N=1.90 x 10⁷</i>	(10^{-1} :2,8,10) <3.0 x 10²	(10^{-1} :6,4,8) <3.0 x 10²	(ind: 14,10,10) (10^{-1} :2,1,2) <3.0 x 10²	(ind:1,1,0) <3.0 x 10²
<i>S. aureus</i> (10^{-5} :182, 216,200) <i>N=1.99 x 10⁷</i>	(10^{-1} :10,4,4) <3.0 x 10²	(10^{-1} :10,12,6) <3.0 x 10²	(ind: 12,14,10) (10^{-1} :2,1,1) <3.0 x 10²	(ind:1,0,2) <3.0 x 10²
<i>P. aeruginosa</i> (10^{-5} :180, 210,205) <i>N=1.98 x 10⁷</i>	(10^{-1} :4,6,4) <3.0 x 10²	(10^{-1} :6,6,10) <3.0 x 10²	(ind: 10,14,12) (10^{-1} :1,2,2) <3.0 x 10²	(ind:1,1,0) <3.0 x 10²

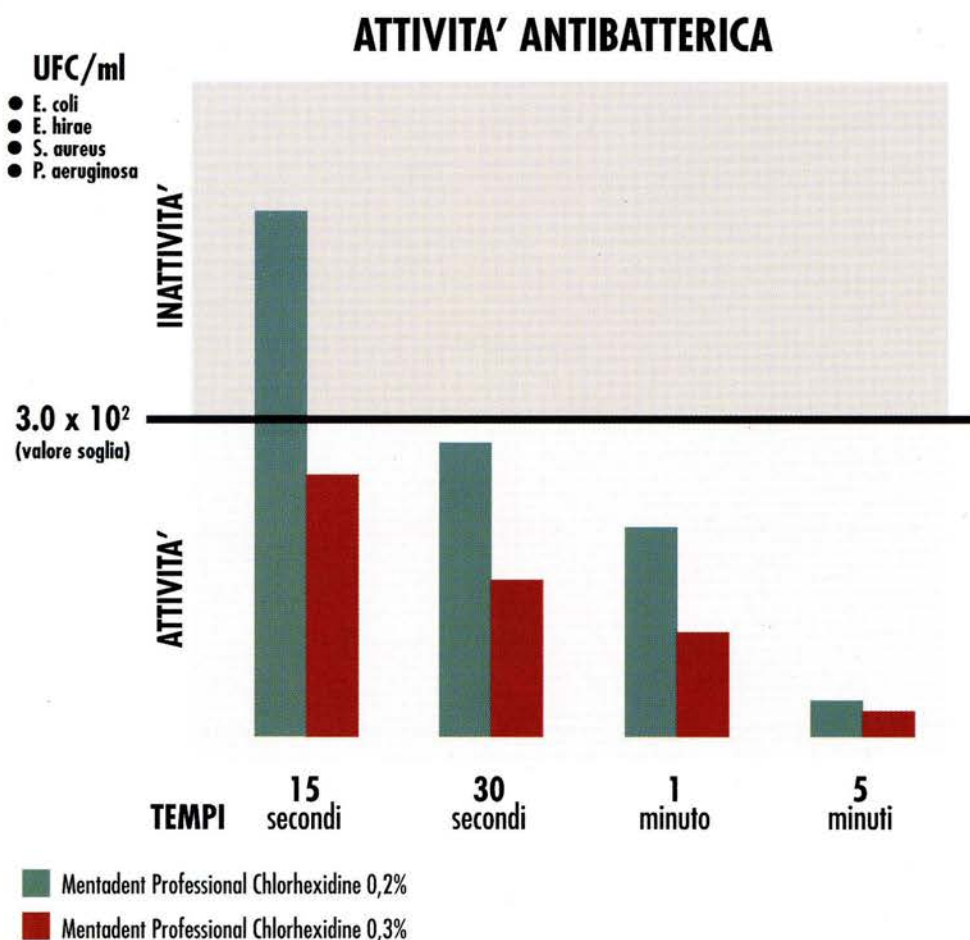
Tra parentesi il numero di microrganismi per piastra rilevati nei tre replicati. I valori in ufc/ml (media aritmetica dei tre replicati, considerato il fattore di diluizione) sono indicati come numero assoluto per le sospensioni batteriche madri utilizzate nel test (N) e con la dizione superiore o inferiore $3,0 \times 10^2$ per le valutazioni della vitalità residua delle sospensioni dopo trattamento. In grassetto le valutazioni che hanno fornito un valore inferiore a $3,0 \times 10^2$.

Al tempo d'incubazione di 15 secondi, la formulazione MENTADENT PROFESSIONAL CHLORHEXIDINE 0,3%, ma non la formulazione allo 0,2% di principio attivo, raggiunge un'efficacia battericida per *E. coli*, *E. hirae*, *S. aureus*, e *P. aeruginosa* sulla base dei parametri dello standard seguito nel presente studio, ancorché si possa osservare come la stessa formulazione allo 0,2% realizzi comunque -al più breve tempo d'incubazione- una buona riduzione dell'infettività dell'inoculo. Al tempo di 30 secondi, entrambe le formulazioni hanno mostrato una efficacia battericida in linea con i parametri richiesti dallo studio, ma utilizzando la concentrazione allo 0,30% di clorexidina si è realizzata una caduta dell'infettività dei quattro batteri testati in media del 40% più elevata rispetto alla formulazione contenente lo 0,20% di principio attivo.

Conclusioni

Il presente report descrive lo studio comparativo condotto sull'attività battericida delle formulazioni disinfettanti MENTADENT PROFESSIONAL CHLORHEXIDINE 0,2% e 0,3%, rispettivamente. Lo studio è stato programmato sulla base della procedura descritta dallo standard prEN 12054:1995, con modificazioni per le peculiarità degli obiettivi (valutazione comparativa tra due prodotti a diversa concentrazione di principio attivo). Nel report sono stati inizialmente descritti i metodi e i criteri che hanno consentito di validare il saggio e i risultati ottenuti nel saggio vero e proprio della formulazione disinfettante.

Lo standard prEN 12054:1995 prevede che una formulazione disinfettante dimostri una riduzione delle conte vitali da $1,0-3,0 \times 10^7$ a non oltre $3,0 \times 10^2$ ufc per ml per *E. coli*, *E. hirae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. I risultati ottenuti hanno indicato che le formulazioni in esame, MENTADENT PROFESSIONAL CHLORHEXIDINE 0,2% e 0,3% possiedono attività battericida nei confronti dei microrganismi utilizzati al tempo di contatto di 30 secondi; MENTADENT PROFESSIONAL CHLORHEXIDINE 0,3% è risultato efficace, nelle stesse condizioni sperimentali, al tempo d'incubazione di 15 secondi. Al tempo di 30 secondi la formulazione allo 0,3% di principio attivo ha dimostrato un potere battericida superiore di circa il 40% rispetto a quella allo 0,20% di clorexidina. I risultati sono in linea con l'indicazione all'uso della concentrazione allo 0,30% quando si desidera, oltre ad un maggiore potere battericida, anche un'azione più rapida.



A confronto l'attività antibatterica di Mentadent Professional Chlorhexidine 0,3% e di Mentadent Professional Chlorhexidine 0,2% su 4 ceppi batterici: a 15 secondi di contatto solo la concentrazione 0,3% abbatta la carica batterica oltre il limite soglia, mentre a 30 secondi la sua attività è superiore del 40% rispetto alla concentrazione 0,2%.