



UiT Norges arktiske universitet

UiT Norges arktiske universitet – institutt for klinisk odontologi

Resistensutvikling og resistensgener relatert til bruk av klorheksidin og natriumhypokloritt i odontologisk praksis

En litteraturstudie fra 2000 til 2020

Karoline Ingeborg Løkaas, Nikoline von Selchow Bie, Fredrik Paulsen
Masteroppgave i odontologi, ODO-3901, mai 2021

Innholdsfortegnelse

<i>Sammendrag</i>	3
<i>Forord</i>	4
<i>Ordliste</i>	5
<i>Introduksjon masteroppgave</i>	6
Klorheksidin	7
Klorheksidin i odontologisk praksis	8
Kjemisk oppbygging	8
Effekten av klorheksidin på bakterier	9
Generelt om klorheksidinresistens og resistensgener	9
Natriumhypokloritt	11
Natriumhypokloritt i odontologisk praksis	11
Kjemisk oppbygging	12
Effekt av natriumhypokloritt på bakterier	12
Generelt om natriumhypoklorittresistens og resistensgener	13
<i>Metode og materiale</i>	14
<i>Resultater</i>	16
Artiklene knyttet til klorheksidin	16
Analysis of Multidrug-Resistant Organism Susceptibility to Chlorhexidine Under Usual Clinical Care	16
Susceptibility of Some Oral Microorganisms to Chlorhexidine and Paramonochlorophenol	17
Decreased Susceptibility to Chlorhexidine and Distribution of qacA/B Genes Among Coagulase-negative Staphylococcus Clinical Samples	18
Recently Introduced qacA/B Genes in Staphylococcus Epidermis do not Increase Chlorhexidine MIC/MBC	19
Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine against Bacteria in Biofilms at Different Stages of Development	20
Reduced Susceptibility to Chlorhexidine in Staphylococci: is it Increasing and Does it Matter?.....	22
Biofilm Formation Capability of <i>Enterococcus faecalis</i> Cells in Starvation Phase and Its Susceptibility to Sodium Hypochlorite	23
Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dentinal Tubules to Disinfecting Solutions..	24
The Effect of Sodium Hypochlorite on <i>Enterococcus faecalis</i> When Grown on Dentine as a Single- and Multi-species Biofilm.....	26
Effect of the Source of Biofilm Bacteria, Level of Biofilm Maturation, and Type of Disinfecting Agent on the Susceptibility of Biofilm Bacteria to Antibacterial Agents	27
Investigation of rpoS and dps Genes in Sodium Hypochlorite Resistance of <i>Salmonella Enteritidis</i> SE86 Isolated from Foodborne Illness Outbreaks in Southern Brazil.....	28
Purification, Gene Cloning, Gene Expression, and Mutants of Dps from the Obligate Anaerobe <i>Porphyromonas gingivalis</i>	30
<i>Diskusjon og konklusjon</i>	32
<i>Referanser</i>	34

Sammendrag

Bakgrunn: Formålet med studien er å undersøke eksisterende resistens og risiko for videre resistensutvikling forbundet med bruk av klorheksidin og natriumhypokloritt. Dette i relasjon til bakterier i odontologisk praksis.

Metode: Vi har laget en systematisk oversikt over forskning som omhandler mikrobiell resistens knyttet til desinfeksjonsmidler relevante i odontologisk praksis. På bakgrunn av forhåndsbestemte kriterier ble det gjort systematiske søk innenfor tidsperioden 2000-2020, og en litteraturgjennomgang omhandlende resistensgener knyttet til natriumhypokloritt og klorheksidin. Søkeresultatene ga oss 518 unike treff, hvor 365 var knyttet til klorheksidin og 155 til natriumhypokloritt. To av disse artiklene omhandlet begge desinfeksjonsmidlene. Etter vurdering og nøye gjennomgang ble det plukket ut seks hovedartikler på bakgrunn av kriteriene for oppgaven.

Resultat: Studier viser at det i dag eksisterer resistensgener knyttet til både klorheksidin og natriumhypokloritt, men det er vanskelig å sammenligne resultater fra forskjellige studier da det ikke finnes en felles definisjon av resistens. Flere studier viser til at økt bruk gir økt sjanse for resistensutvikling og at det kreves mer forskning på området for å få tydeligere svar.

Konklusjon: En utfordring med denne studien er at det er manglende konsensus rundt grenseverdier og minste inhibitoriske konsentrasjon (MIC) til de spesifikke bakteriestammene. Det blir dermed vanskelig å benytte MIC for å sammenligne de forskjellige resultatene i hovedartiklene. For fremtidig forskning vil det være hensiktsmessig å utvikle standardiserte metoder og konsensus rundt definisjonen av resistens for å få sammenlignbare resultater og kunne bringe forskningen fremover.

Førord

Vi ønsker å øke bevisstheten og fokuset rundt resistensproblematikken med sikte på risiko for resistensutvikling mot antimikrobielle midler som benyttes i odontologisk praksis. Ettersom natriumhypokloritt og klorheksidin benyttes hyppig klinisk og i hjemmet er det viktig å følge med på utviklingen av mikrober med redusert følsomhet for desinfeksjonsmidlene (1). Videre ønsker vi å formidle hvor viktig det er å være oppmerksom på faren for kryssresistens mellom disse midlene og andre antimikrobielle preparater samt effekten av biocider på oral biofilm.

Veileder

Mohammed Al-Haroni, Instituttleder, Institutt for klinisk odontologi UiT.

Ordliste

BHI:	Brain-heart infusion	(NO: Hjerneinfusjon medium)
CFU:	Colony forming unit	(NO: Kolonidannende enhet)
CHG:	Chorhexidine gluconate	(NO: Klorheksidinglukonat)
CHX:	Chlorhexidine	(NO: Klorheksidin)
CoNS:	Koagulasenegativ Staphylococci	
DNA:	Deoksyribonukleinsyre	
HAI:	Helseassosierte infeksjoner / Nosokomielle infeksjoner	
HOCl:	Hypoklorsyre	
MBI:	Minste baktericide konsentrasjon	
MFS:	Major faciliator superfamily	
MIC:	Minste inhibitoriske konsentrasjon	
MRSA:	Meticillinresistent Staphylococcus aureus	(NO: Meticillinresistente gule stafylokokker)
FORGNB:	Fluorokinolon-resistente gramnegative bacilli	
NaOCl:	Natriumhypokloritt	
NaOH:	Natriumhydroksid	
PCM:	Paramonoklorfenol	
PCR:	Polymerase Chain Reaction,	(NO: Polymerasekjedereaksjon)
SEM:	Scanning electron microscopy	(NO: Skanningsmikroskopi)
CLSM:	Confocal laser scanning microscopy	(NO: Konfokal laserskanningsmikroskopi)

Introduksjon masteroppgave

Det er i dag stort fokus på å forhindre smittespredning innad i helsetjenesten. Innenfor tannhelsetjenesten er smittevernsrutiner viktige ettersom utstyr og overflater kontamineres av kroppsvæsker som blod og saliva. Det genereres også aerosoler når man arbeider med vannkjøling. Disse forholdene gjør tannklinikken til et utsatt område med tanke på smittespredning. Med gode basale smittevernsrutiner er formålet å forhindre spredning av patogene mikrober mellom pasientene og mellom personellet og pasientene (2).

Som en del av smittevernstiltakene er helsepersonell i Norge pålagt å følge smittevernloven, helsepersonelloven og internkontrollforskriften (3). I 2018 ble også «Faglige anbefalinger for smittevern i klinisk odontologisk praksis» utgitt etter ønske fra Folkehelseinstituttet. Dette for å lage en sammenfatning av infeksjonsprogram og prosedyrer knyttet til smittevern (4). Her trekkes det frem at det finnes tre sentrale metoder for å dekontaminere utstyr. Dette innebærer rengjøring med vaskemidler, bruk av desinfeksjonsmidler og sterilisering. Gullstandarden for å fullstendig eliminere mikrober er sterilisering. På tannklinikker benytter man en instrumentvaskemaskin for å desinfisere, etterfulgt av autoklaving som steriliserer instrumentene (4, 5). For overflater eller utstyr som ikke tåler behandling med fuktig varme og autoklaving kan man benytte kjemiske desinfeksjonsmidler (4). Disse midlene må brukes på riktig måte. Tilgrisede instrumenter med synlig kontaminering av organisk materiale må rengjøres først for å oppnå optimal effekt av desinfeksjonsmidlene. Virketid, konsentrasjon og produktets holdbarhetsdato vil også påvirke resultatet av bruk (6).

En utfordring med kjemisk sterilisering er mikroorganismenes evne til å kolonisere seg og danne næringsnett kalt biofilm. En slik biofilm kan inneholde bakterier, protozoer, sopp og bakteriofager. Ved å leve i slike nettverk ligger bakteriene bedre beskyttet, noe som gjør eliminering ved bruk av desinfeksjonsmidler vanskeligere. Biofilmen gir også mulighet for horisontal genoverføring, noe som vil si at genmateriale fra en organisme kan overføres til en annen (7).

Bakterier lever ikke naturlig enkeltvis, såkalt planktonisk, men nesten utelukkende som en del av et større nettverk i en biofilm. Å være en del av en biofilm endrer de fysiologiske egenskapene og gir bakteriene mange fordeler som øker levedyktigheten. Dette er viktig for

bakteriens toleranse ovenfor ulike antibakterielle midler (7, 8). I en biofilm ligger bakteriene i en viskøs ekstracellulær polymerisk matriks som består av polysakkarider, proteiner og nukleinsyrer (7). Biofilmens struktur, eksopolysakkarider og arkitektur vil påvirke stoffenes evne til å trenge inn i biofilmen (9). Variasjoner i tilgangen på næringsstoffer og mengden avfallsstoffer som finnes lokalt i biofilmen er med på å påvirke veksten og bakteriers motstandsdyktighet. Mangel på næringsstoffer kan nedjustere metabolismen til bakterier i biofilmen, og gi en større motstand mot midler som vanligvis påvirker denne (7). Alder på biofilmen har også innvirkning på hvor utsatt bakteriene er. Modne biofilmer har en mer kompleks struktur og er mer motstandsdyktige ovenfor antibakterielle midler sammenlignet med umodne biofilmer (10).

Klorheksidin

Klorheksidin er blant de mest brukte desinfeksjonsmidlene globalt, og hyppig brukt av pasienter innenfor odontologisk praksis (11, 12). Desinfeksjonsmiddelet er antimikrobielt bredspektret og har effekt på sopp, enkelte typer virus og både grampositive- og gramnegative bakterier. Middelet har også effekt på bakteriesporer ved temperaturer mellom 98-100 °C (13). Effekten beskrives som bakteriostatisk ved lave konsentrasjoner og baktericid ved høyere konsentrasjoner (14).

Klorheksidin har vært i bruk siden midten av 50-tallet (15). Det britiske laboratoriet for biologi og forskning, Imperial Chemical Industries, syntetiserte middelet først under navnet Hhibitane. Utviklerne av substansen beskrev i 1954 klorheksidin som et nytt potent antibakterielt middel med enestående bakteriostatisk egenskaper (1, 16). I tillegg til å virke effektivt mot mange typer mikroorganismer er forbindelsen godt tolerert av hud og har lav toksisitet hos mennesker (17). I 1957 ble det markedsført i Storbritannia som huddesinfeksjon, før middelet etter hvert har blitt brukt verden over i medisinsk praksis. Innenfor odontologien ble middelet først benyttet på operasjonsområder og som irrigasjonsmiddel under endodontiske prosedyrer. Det var ikke før 1969 klorheksidin ble sett på i sammenheng med oralt plakk og inhibisjon av kariesutvikling og tannkjøtt sykdom (18, 19). På starten av 70-tallet ble det gjort en studie som undersøkte effekten av klorheksidin på utviklingen av oralt plakk og gingivitt. Studien ble utført ved The Royal Dental College i Aarhus i Danmark. Forskerne konkluderte med at selv etter høy sukroseksponering vil bruk

av 0,2 % klorheksidinmunnskyll i kombinasjon med god oral hygiene føre til signifikant mindre plakkformasjon og dermed bidra til å hindre dannelse av gingivitt og karies (20).

På grunn av middelets antimikrobielle egenskaper brukes det i dag i stor grad som desinfeksjonsmiddel. Det regnes nå som et reseptfritt legemiddel innenfor medisinsk praksis og brukes til desinfeksjon av hud og slimhinne, samt overflatedesinfeksjon av instrumenter (21, 22).

Klorheksidin i odontologisk praksis

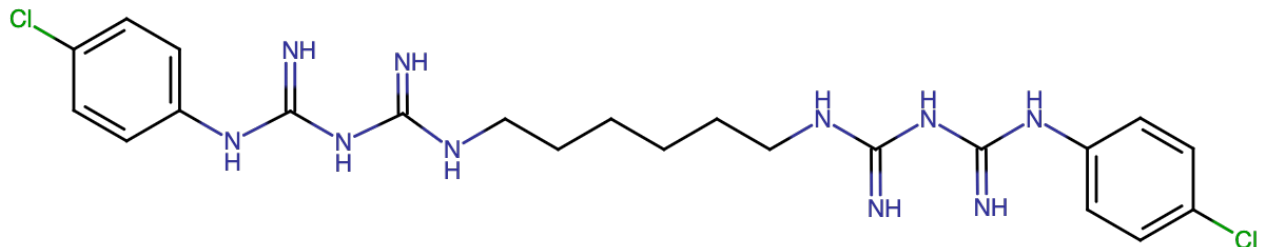
I odontologisk praksis brukes klorheksidin i ulike former, med flere bruksområder og ulike konsentrasjoner. Det benyttes blant annet til overflatedesinfeksjon og som preoperativ slimhinnedesinfeksjon. Desinfeksjonsmiddelet har vist seg å effektivt redusere oralt plakk ved en konsentrasjon på 0,2 % (23). Oral administrering av klorheksidin pre- og perioperativt ved oralkirurgiske inngrep har vist seg å senke risikoen for helsetjenesteassosierte infeksjoner (HAI) (24).

Klorheksidin er blant de antiseptiske midlene som foreskrives aller hyppigst til pasienter i odontologisk praksis (12). I orale produkter benyttes middelet stadig for å behandle gingivitt og orale infeksjoner (25, 26). Munnskyll og gel er eksempler på preparater som kan inneholde klorheksidin og som benyttes både i klinikken og i hjemmet. Det er også tilsatt i noen typer tannkremer. I kommersielle produkter er de vanligste konsentrasjonene 0,06 %, 0,12 % og 0,2 % (27). Det benyttes også som desinfeksjonsmiddel under endodontisk behandling (28).

Kjemisk oppbygging

Klorheksidin er et kationisk molekyl som inngår i den kjemiske gruppen bisbiguanider (26). Den kjemiske formelen til molekylet er $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ (29). Forbindelsen er symmetrisk oppbygd med en sentral heksametylenkjede hvor det utgår to klorguanidkjeder. Klorheksidin er i utgangspunktet en sterk base som grunnet heksametylenkjeden er uløselig i vann (26, 30). Ved tilsetning av syre omdannes molekylet til et salt, noe som gjør forbindelsen vannløselig. I dag benyttes forbindelsen mest i form av diglukonat-, hydroklorid eller diacetatsalter (26, 31).

Alle saltformene reagerer med negativt ladde bakterieceller og er mest effektiv mot bakterier ved pH 7 til 8 (13). I denne oppgaven brukes benevnelsen klorheksidin uavhengig av type salt.



Figur 1. Kjemisk struktur klorheksidin

Effekten av klorheksidin på bakterier

Når klorheksidinsalter løses opp frigis kationer som tiltrekkes de negativt ladde bakteriecellene. Middelets effekt kan deles inn i primære og sekundære virkningsmekanismer. Den primære mekanismen går ut på at middelet inhiberer bakteriens membranbundne enzymer. Dette medfører ødeleggelse i transportmekanismer og bakterien svekkes grunnet hull i cytoplasmamembranen. Bakteriostatisk effekt oppnås selv ved lave konsentrasjoner mellom 0,02-0,06 %. Sekundær, baktericid virkningseffekt oppnås ved høyere konsentrasjoner >0,12 %. Da trekkes klorheksidin inn i bakteriecellen, den indre cytoplasmamembranen brytes ned som igjen fører til utfelling av bakteriens cytoplasma og intracellulært materiale (1, 11, 32, 33). I tillegg til at klorheksidin har en umiddelbar antimikrobiell effekt, binder det til den orale slimhinnen, med forlenget virkning gjennom langsom frigjøring (27). Plakkretensjon, inflammasjon og blødning kan reduseres ved intraoral bruk av antiseptikumet (12).

Generelt om klorheksidinresistens og resistensgener

Den utbredte bruken av klorheksidin vekker spørsmål rundt fare for utvikling av ervervet resistens. Det har lenge vært rettet mye oppmerksomhet mot antibiotikaresistens, mens det har vært mindre fokus rundt resistens knyttet til andre antimikrobielle midler. Forskning viser til at all bruk av klorheksidin er med på å øke faren for utvikling av resistens. Nosokomielle

infeksjoner har også allerede blitt satt i sammenheng med resistensutvikling mot klorheksidin. Det viser seg at bruk av både antibiotika og klorheksidin henger sammen med utviklingen av resistens, inkludert kryssresistens og multiresistens (34, 35).

Qac er en gruppe gener som finnes på mobile genetiske elementer, og av disse genene har *qacA* og *qacB* vist seg å forårsake resistens mot enkelte antiseptiske midler, deriblant klorheksidin (21). De mobile genetiske elementene kan enten være plasmider eller integroner. De plasmidbårne genene *qacA* og *qacB* koder for effluksproteiner, og danner efflukspumper som har flere kationiske komponenter som substrater. Disse kan forårsake resistens mot flere typer antimikrobielle midler (33). Mekanismene bak klorheksidinresistens omfatter endringer i cellemembranens proteiner og lipopolysakkarider og effluksystemer (1). QacA/B efflukspumper er medlem av transportproteinfamilien «major facilitator superfamily» (MFS) og kan pumpe klorheksidin og andre biocider ut av bakteriecellene (17, 36). De to efflukspumpene er relativt like, men QacB efflukspumpen har dårligere affinitet til klorheksidin og har derfor mindre betydning for toleransen og virkningen av antiseptikumet. Det er kun syv til ni basepar som skiller de to resistensgenene, og flere studier differensierer ikke mellom disse genene når de påvises *in vitro*, men betegner de gjerne som *qacA/B* (37). Gener som er knyttet til økt toleranse for klorheksidin har blitt påvist i multiresistente bakterier som Meticillinresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA), og har vist seg å ha en sammenheng med potensiell økning i spredningen av noen MRSA-stammer (21, 36).

Det har blitt påvist kryssresistens i enkelte studier hvor plasmidene som genene sitter på kan inneholde flere gener som forårsaker resistens mot andre biocider (36). Det har blant annet blitt påvist resistensgener knyttet til antibiotika på samme plasmid som *qacA/B*. Forskningslitteraturen viser derfor til at bruk av klorheksidin vil kunne påvirke spredningen av flere typer resistensgener, også de som forårsaker antibiotikaresistens (37).

Tilstedeværelse av genene *qacA* og *qacB* er ikke ensbetydende med økt klorheksidintoleranse, fordi uttrykk av genene påvirkes av flere faktorer. Uttrykk av fenotypisk resistens avhenger blant annet av funksjon til ulike regulatorer for transkripsjon, type agens og mengden bakterien utsettes for, samt tidligere ekstern påvirkning (17). Siden det er mange faktorer som påvirker uttrykket av genene som er forbundet med resistens, er det vanskelig å fastsette en tydelig sammenheng og forhold mellom tilstedeværelse av genene og økt toleranse (36).

MIC brukes ofte når effekten av midler som brukes mot bakterier undersøkes, og sammenlignes med grenseverdier for å vurdere resistens (35). Det har ikke blitt satt noen absolutt grenseverdi for klorheksidinresistens, og ofte settes MIC og kliniske funn i sammenheng med resistensgenene (38).

Natriumhypokloritt

Natriumhypokloritt er en klorforbindelse med sterke oksiderende egenskaper. Forbindelsen korroderer de fleste former av metall, utenom titan. Bruksområdene varierer fra klorering av drikkevann og svømmebassenger til komponenter i klimaanlegg og kraftstasjoner. Formålet med bruk på de ulike områdene er å forhindre akkumulering av mikroorganismer.

Natriumhypokloritt er mest kjent for sine blekeegenskaper og som desinfeksjonsmiddel. Middelet ble først introdusert på markedet i 1915. Det ble da benyttet for infeksjonskontroll på sårskader, blant annet under første verdenskrig (39, 40).

Natriumhypokloritt i odontologisk praksis

I dag anvendes natriumhypokloritt globalt som et antiseptisk middel under endodontisk behandling. Det har vært på markedet som irrigasjonsmiddel i mer enn 90 år (39, 41). Hovedgrunnen til at det benyttes under rotkanalbehandling er løsningens evne til å fjerne debris fra kanalene (42). Løsningen fungerer som et kjemisk rensmiddel som sammen med mekanisk rensing av kanalen er effektivt for å løse opp og fjerne nekrotisk vev, organisk avfall og eksudat. Virkningen av natriumhypokloritt er både bakteriocid og virucidal. Løsningen finnes på markedet i ulike konsentrasjoner, samt med eller uten tilsatt natriumhydrogenkarbonat som buffer (39, 41).

Antibakteriell effekt, vevsoppløsende egenskaper og biologisk kompatibilitet avhenger av konsentrasjon til natriumhypokloritt. Det er kjent at økt konsentrasjon vil gi bedre antibakteriell effekt, men samtidig vil den biologiske kompatibiliteten bli dårligere. Med en økende konsentrasjon øker toksisiteten (43). Det er påvist at løsninger som inneholder 5,25 % natriumhypokloritt er signifikant mer effektiv når det gjelder å fjerne nekrotisk vev sammenlignet med svakere løsninger på 1-3 % (44). For å oppnå tilstrekkelig antibakteriell

effekt og minske vevstoksisitet er bruk av 0,5-1 % natriumhypoklorittløsninger tilsatt buffer det som viser seg å være ideelt (41).

Kjemisk oppbygging

Natriumhypokloritt er en uorganisk forbindelse som består av natrium, oksygen og klor. Løsningen er en sterk base med $\text{pH} > 11$ som kjennetegnes av klorlukt og sin svakt gule farge.



Figur 2. Kjemisk struktur natriumhypokloritt

Metoder som benyttes for fremstilling av natriumhypokloritt deles gjerne inn i kjemisk- og elektrokjemisk. Kjemisk utviklet natriumhypokloritt dannes ved at klorlukt slippes igjennom en løsning av natriumhydroksid hvor disse reagerer med hverandre. I reaksjonen dannes vann, natriumklorid og natriumhypokloritt som produkter (45, 46). En alternativ metode benytter natrium og kloridioner fra en mettet saltløsning ved hjelp av elektrolyse. Natriumioner vandrer gjennom en membran, reagerer med vann og danner natriumhydroksid. Kloridioner danner klorlukt som oppløses i natriumhydroksid, og man får natriumhypokloritt, salt og vann (39, 46).

Effekt av natriumhypokloritt på bakterier

Hypokloritt er en sterkt oksiderende forbindelse, som i kombinasjon med natrium også får hydrolyserende egenskaper (39). Den antimikrobielle effekten skyldes at klorionet inhiberer enzymer hos bakteriene. Dette skjer ved irreversibel oksidering av sulfhydrylgrupper på essensielle enzymer i bakteriecellen (45). Natriumhypokloritt kan bindes til organisk materiale, og selv om middelet er veldig aktivt synker den baktericide effekten når organisk materiale er til stede. I nærvær av syre danner natriumhypokloritt en toksisk klorlukt, og man oppnår da ikke god effekt av desinfeksjonsmiddelet (47). Natriumhypokloritt er veldig reaktivt med sine oksiderende egenskaper. Når stoffet reagerer med vann dannes reaktiv

hypoklorsyre og mindre aktive hypoklorittioner. Konsentrasjonen av disse stoffene i løsningen bestemmes av pH-verdien, og påvirker dermed aktiviteten og stabiliteten. En lav pH vil gjøre at mengden hypoklorsyre øker og gir dermed et oppsving i oksidasjonsreduksjonspotensialet, noe som igjen gjør at løsningens stabilitet vil bli dårligere (46).

Natriumhypokloritt er godt egnet til å løse opp organisk materiale. Middelet degraderer fettsyrer til fettsyresalter og glyserol. I tillegg nøytraliseres aminosyrer og det dannes salt og vann. Reduksjon i pH kommer av frigjøring av hydroksylioner. Når hypoklorsyre i natriumhypokloritt kommer i kontakt med organisk vev, frigis klor som reagerer med aminogrupper og danner kloraminer. Dette påvirker cellemetabolismen.

Aminosyredegenerasjon og hydrolyse forekommer videre under påvirkning av hypoklorsyre og hypoklorittioner. Antimikrobiell virkning kommer også av at enzymer inhiberes, og irreversibel oksidering av sulfhydrylgrupper fordi essensielle bakterieenzymer inhiberes (45).

Generelt om natriumhypoklorittresistens og resistensgener

I 2007 publiserte Tannlegetidende en artikkel knyttet til anbefalinger og praktisk bruk av natriumhypokloritt i odontologisk praksis. Artikkelen tar opp at det finnes en økende bekymring rundt resistens knyttet til bruk av desinfeksjonsmiddelet, men at det ikke er påvist kjent resistensutvikling (41).

Bakterier som besitter genene *rpoS* og *dps* har vist seg å ha økt toleranse mot natriumhypokloritt. Stammer av *Salmonella*, *Escherichia coli* (*E. coli*) og *Porphyrmonas gingivalis* (*P. gingivalis*) har fått påvist en eller begge disse resistensgenene (48-50). Genet *rpoS* koder for SigmaS faktor, som igjen kontrollerer mange genuttrykk (48). Disse inngår i et system som påvirker deoksyribonukleinsyre (DNA) reparasjon. Lokale forhold i biofilmen, slik som begrenset næringstilgang og oksidativt stress, er eksempler på faktorer som påvirker aktiviteten til *rpoS* og *SigmaS* og får denne til å øke. *RpoS* virker inn på reguleringen av proteiner i familien Dps (50). Dps enzymet er et uspesifikt DNA-bindende protein som har en antioksidierende effekt og beskytter bakterier mot skader fra oksidering og inngår dermed i DNA reparasjon (48, 49).

Metode og materiale

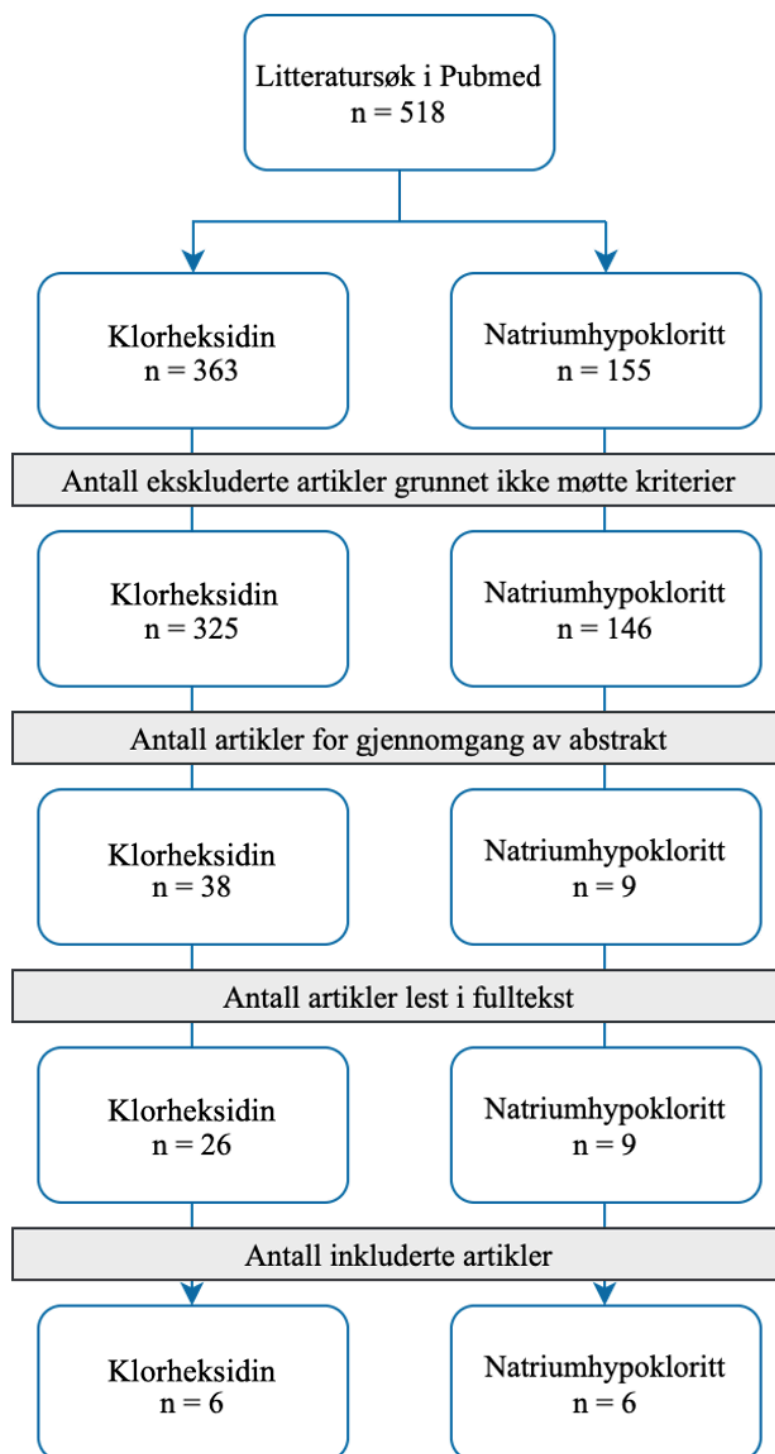
I denne masteroppgaven fremstiller vi en systematisk oversikt over forskningen knyttet til mikrobiell resistensutvikling ved bruk av desinfeksjonsmidler relevant for odontologisk praksis. Vi har benyttet PubMed som database for litteratursøkene.

Kriterier satt for søk og valg av artikler i PubMed

- Forskning publisert fra januar 2000 til september 2020
- Språk satt til engelsk, norsk, dansk og svensk
- "Human" som art
- Tidsskifter fra Dental journal og MEDLINE
- Forskning relevant for fagfeltene odontologi og medisin
- Inkluderer bakteriell resistens eller resistensgener

Videre ble det gjort en rekke søk knyttet til desinfeksjonsmidlene klorheksidin og natriumhypokloritt. I søkene ble navn på resistensgener, bakterier og desinfeksjonsmidler kombinert. Andre søkeord som «oral» og «dental» ble også inkludert i søkene for å undersøke hva som finnes av forskning knyttet til det odontologiske fagfeltet. Søkeresultatene gav 518 unike treff, hvor 365 var knyttet til klorheksidin og 155 til natriumhypokloritt. To av artiklene inngikk i begge kategoriene.

Materialet ble vurdert individuelt i mastergruppen hvor vi ekskluderte artikler som ikke var relevante for masteroppgaven. I felleskap diskuterte vi artiklene vurdert som relevante for masteroppgaven. Videre ble 35 artikler lest i fulltekst, 26 knyttet til klorheksidin og 9 knyttet til natriumhypokloritt. Etter nøye gjennomlesning kom vi frem til 6 hovedartikler for hver av desinfeksjonsmidlene.



Figur 3. Flytdiagram som viser seleksjon av artikler

Resultater

Artiklene knyttet til klorheksidin

Artikkel 1:

Analysis of Multidrug-Resistant Organism Susceptibility to Chlorhexidine Under Usual Clinical Care (51)

Hva var formålet med studien?

Formålet med denne studien var å se om vask med klorheksidinglukonat (CHG) som forebygging av sykehusinfeksjoner kan føre til redusert bakteriefølsomhet for desinfeksjonsmiddelet. Studien så på hvilken effekt dette har på MRSA og fluorokinolon-resistente gramnegative bacilli (FQRGNB).

Hvilken metode ble brukt?

MIC ble bestemt ved hjelp av «broth microdilution test». Studien gikk over ni og en halv måned og ble utført ved 24 sengeposter ved medisinsk senter i Wiscosin. En pasientgruppe benyttet prefabrikkerte 2 % CHG-impregnerte servietter, mens en gruppe ikke benyttet disse. Det ble samlet inn prøver fra nese, hud, munnhule og avføringsprøver. Det ble totalt testet 137 bakterieisolater.

Hva var resultatet av studien?

MRSA var identifisert i hovedsak nasalt og FQRGNB fra munnhulen og huden. Resultatene viste at MIC for både MRSA og FQRGNB varierte lite fra pre- og postimplenteringsfasen. Det var ingen signifikant forskjell i MIC som viste til redusert mottakelighet av CHG.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

I denne studien ble det ikke påvist redusert mottakelighet for CHG for i MRSA eller FQRGNB. Forfatterne konkluderer med at resultatet samsvarer med liknende studier som er utført tidligere.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

Artikkelen viser ikke til assosiasjon mellom bruk av CHG og bakterieresistens hos MRSA og FQRGNB.

Artikkel 2:

Susceptibility of Some Oral Microorganisms to Chlorhexidine and Paramonochlorophenol (52)

Hva var formålet med studien?

Målet med studien var å bestemme MIC for bruk av klorheksidindiglukonat og paramonoklorfenol (PMC) mot mikroorganismer som ofte er assosiert med endodontiske infeksjoner. De ønsker å komme frem til konsentrasjoner som var vevskompatible, og samtidig antiseptiske mot *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Porphyromonas endodontalis* (*P. endodontalis*), *Prevotella denticola* (*P. denticola*) og *Prevotella melaninogenica* (*P. melaninogenica*).

Hvilken metode ble brukt?

Mikroorganismene ble hentet fra nedfryste isolater. MIC ble bestemt ved «agar dilution test». Seks agarplater ble benyttet for hver test. Plater uten antimikrobielle agens ble også benyttet som positiv kontroll. MIC ble bestemt ut fra laveste konsentrasjon av desinfeksjonsmiddelet som forhindret synlig bakterievekst.

Hva var resultatet av studien?

Det var store variasjoner i MIC for de forskjellige stoffene mot de ulike bakteriene. For bruk av PMC varierte MIC mellom 46,67-213,33 µg/ml. Verdiene ved testing av klorheksidindiglukonat varierte fra 2,69-80 µg/ml. Medianen for MIC ved bruk av klorheksidinpreparatet var 3,40 µm/ml. Alle mikroorganismene utenom *P. aeruginosa* ble inhibert av konsentrasjoner mellom 2,67 til 4,00 µm/ml. *P. aeruginosa* viste lavest mottakelighet ovenfor desinfeksjonsmiddelet med MIC på 80,00 µm/ml.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

Det ble ikke påvist ny resistens eller resistensgener i studien. Artikkelforfatterne viser til at andre studier også har påvist lav mottakelighet hos *P. aeruginosa* ved bruk av klorheksidin.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

Studien ser ikke på hvorvidt langvarig bruk av klorheksidinglukonat og PMC påvirker resistens hos bakteriene.

Artikkel 3:

Decreased Susceptibility to Chlorhexidine and Distribution of *qacA/B* Genes Among Coagulase-negative Staphylococcus Clinical Samples (36)

Hva var formålet med studien?

Studiens formål var å undersøke mottakeligheten av klorheksidin og fordelingen av *qacA/B* gener hos prøver av koagulasenegativ Staphylococci (CoNS).

Hvilken metode ble brukt?

I perioden 2010 til 2015 ble det samlet inn 211 isolater av CoNS fra tolv sykehus i Brasil. Kliniske prøver ble hentet fra blod, avføring, kateter og andre biologiske væsker. For å bestemme MIC ved bruk av klorheksidin ble «agar dilution» brukt som metode, og isolatene ble regnet som resistente dersom verdien var ≥ 4 mg/L. Under deteksjon av *qacA/B* ble 32 tilfeldig valgte prøver med høy MIC (4-8 mg/L) valgt og sammenliknet med 32 tilfeldige prøver med lav MIC (0,125-2 mg/L). DNA ble uthentet og PCR benyttet for å detektere tilstedeværelse av resistensgenene. Produktene av PCR ble analysert ved hjelp av agarose gelelektroforese. En stamme av *S. aureus* ble brukt som positiv kontroll, og væske uten nuklease ble benyttet som negativ kontroll.

Hva var resultatet av studien?

Via de 211 kliniske prøvene ble det totalt identifisert 14 ulike arter av CoNS. Blant disse ble *Staphylococcus epidermis* (*S. Epidermis*), *Staphylococcus hominis hominis* (*S. hominis hominis*), *Staphylococcus auricularis* (*S. Auricularis*) og *Staphylococcus haemolyticus* (*S. Haemolyticus*) detektert oftest. Det var 28 prøver som ikke kunne identifiseres spesifikt. MIC varierte mellom 4-8 mg/L hos de totalt 65 prøvene som viste minsket mottakelighet for klorheksidin. Alle resistente prøver var positive for *qacA/B*. Disse genene ble også funnet i 17 stammer som ikke var resistente mot klorheksidin. Det viste seg at 82 % av stammene som inneholdt *qacA/B* også var resistente mot enkelte typer antibiotika.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

Studien viste at bakterier med lav mottakelighet for klorheksidin ofte er bærere av *qacA/B*. De viser til at andre studier også har påvist denne sammenhengen. I denne studien ble det også påvist at bakterier kan være bærere av disse resistensgenene uten å uttrykke økt grad av resistens mot klorheksidin. Ifølge artikkelforfatterne skyldes dette at andre faktorer som transkripsjonsregulatorer, grad av eksponering og tidligere kontakt med kationiske midler også spiller inn.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

Artikkelforfatterne konkluderer med at enkelte stammer av CoNS uttrykker koresistens mot klorheksidin og enkelte typer antibiotika. Det antas derfor at spredning av resistensgener knyttet til antibiotika kan skyldes det selektive trykket bakteriene utsettes for ved hyppig bruk av klorheksidin.

Artikkel 4:

Recently Introduced *qacA/B* Genes in *Staphylococcus Epidermis* do not Increase Chlorhexidine MIC/MBC (37)

Hva var formålet med studien?

Målet med studien var å evaluere om bruk av klorheksidin på danske sykehus har bidratt til resistensutvikling hos *S. epidermis*. Forskergruppen ønsket å finne ut om bakterien har økt toleranse mot desinfeksjonsmiddelet og om de kunne påvise tilstedeværelse av *qacA/B* gener. Videre ønsket de å undersøke konsekvensene av langvarig klorheksidineksponering.

Hvilken metode ble brukt?

Det ble benyttet isolater med *S. epidermis* som ble samlet inn på 60-tallet. Disse prøvene ble samlet inn før klorheksidin ble introdusert for det danske markedet. Videre tok forskerne prøver av to grupper med ulikt forbruk av klorheksidin. Den ene gruppen besto av operasjonssykepleiere som er hyppige brukere av desinfeksjonsmiddelet, mens den andre gruppen var pasienter som normalt ikke bruker klorheksidin. Prøvene ble samlet fra dominant hånd og begge nesebor hos gruppene. Prøvene ble inokulert på en agarplate og inkubert. Undersøkelse ble gjort etter 24- og 48 timer. De som hadde gjennomgått endringer ble isolert og identifisert. Prøvene ble identifisert ved hjelp av massespektrometri. MIC ble satt til å være den laveste konsentrasjonen som inhiberte synlig bakterievekst etter 24 timer, mens minste

baktericide konsentrasjon (MBC) ble satt som laveste konsentrasjon uten bakterievekst etter 48 timer. *QacA/B* geners tilstedeværelse ble bestemt ved PCR og elektroforese.

Hva var resultatet av studien?

Bruk av klorheksidin hos operasjonssykepleiere og tilstedeværelse av resistensgenene *qacA/B* hadde ingen påvist sammenheng. Det ble heller ikke påvist økning i MIC eller MBC. I prøvene tatt på 60-tallet ble *qacA/B* ikke påvist. I de nye prøvene var 55 % av blodisolatene *qacA/B*-positive. Dette kan indikere at langvarig bruk av klorheksidin eller lignende forbindelser kan bidra til økt tilstedeværelse av resistensgenene.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

Artikkelforfatterne påviste ingen økt resistens hos *S. epidermis* knyttet til bruk av klorheksidin.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

Studien klarte ikke å finne korrelasjon mellom bruk av klorheksidin hos operasjonssykepleiere og kolonisering av *S. epidermis*-isolater som var resistente mot desinfeksjonsmiddelet. Det ble ikke påvist korrelasjon mellom sykepleierne og identifiserte *qacA/B* gener. Studien konkluderer med at bruk av klorheksidin i sykehussettinger i Danmark ikke har påført målbar endring i toleranse hos *S. epidermis* eller innholdet av *qacA/B* gener når bakterieisolater fra gruppen sammenlignes med isolater fra andre deler av samfunnet.

Artikkel 5:

Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine against Bacteria in Biofilms at Different Stages of Development (53)

Hva var formålet med studien?

Hovedmålet med studien var å undersøke hvordan biofilmer bestående av mange bakteriearter responderer på bruk av klorheksidin som irrigasjonsmiddel ved rotkanalbehandling. De ønsket å få en detaljert oversikt over hvordan biofilmer utvikler seg og hva som må til for å eliminere sykdomstilstander under endodontisk behandling.

Hvilken metode ble brukt?

Forskerne hentet subgingivalt plakk fra en frivillig person. Bakterier fra plakket ble brukt for å dyrke frem biofilm på sterile plater med hydroksylapatitt dekket med kollagen i «brain-heart infusion» (BHI). Platene ble inkubert ved 37 °C under anaerobe tilstander. I løpet av de første tre ukene ble det tilført næring ukentlig. Etter dette fulgte en deprivasjonsfase hvor bakteriene fikk BHI kun en gang i måneden. Etter to dager, samt etter en, to, tre, seks og tolv uker av biofilmvekst ble prøver av biofilmen eksponert for klorheksidin i ett-, tre- og ti minutter. Tre plater med biofilm ble undersøkt for å beregne antall døde bakterier via konfokalmikroskopi. Ved hvert tidsintervall ble også tykkelsen på biofilmen målt. Dette ble gjort via elektronmikroskopi. Antall drepte bakterier ble også målt etter eksponering av desinfeksjonsmiddelet. Det ble benyttet to ulike klorheksidinprodukter, klorheksidinglukonat fra Sigma Chemical Co og CHX-plus fra Vista Dental Products. Begge inneholdt 2 % klorheksidin.

Hva var resultatet av studien?

Resultatene viser at tykkelsen på biofilmen vokste fra 57µm etter to dager til 155µm etter tre uker med inkubasjon. I deprivasjonsfasen gikk biofilmen over til et stabilt stadium hvor tykkelsen av biofilmen var 190µm etter seks uker og 201µm etter tolv uker.

Andelen drepte bakterier var avhengig av irrigasjonsvæske, eksponeringstid av desinfeksjonsmiddel, alder og næringstilførsel til biofilmen. Det var signifikante forskjeller i "killing ratio" mellom irrigasjonsmiddel ved ulik alder på biofilmen. Antall drepte bakterier lå på et relativt konstant nivå fra dag to til andre og tredje uke. Etter tre uker ble biofilmen mye mer resistent mot klorheksidin, og andelen drepte bakterier sank betraktelig. CHX-plus (Vista Dental products) hadde større baktericid virkning enn 2 % klorheksidinglukonat (Sigma Chemical Co) ved alle eksponeringsintervaller. CHX-plus var mye mer effektiv mot bakterier i moden biofilm og biofilm i næringsfattige faser enn klorheksidinglukonatløsningen den ble sammenliknet med.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

Studien tar ikke for seg tilstedeværelse av resistensgener. Forskerne har valgt å fokusere på hvordan modenhetsgrad og ulike faser i biofilmen påvirker mottakeligheten av klorheksidin. De konkluderer med at moden biofilm samt biofilm som har begrenset tilgang på næring viser

større grad av resistens mot klorheksidin enn yngre biofilmer, og biofilm som har normal tilgang på næring.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

I denne artikkelen blir det ikke undersøkt om desinfeksjonsmiddelet over tid kan føre til økt resistens grunnet resistensutvikling. Resistensforskningen baserer seg på hvorvidt bakterier i biofilm blir mer resistente på grunn av det beskyttende miljøet biofilmen skaper.

Artikkel 6:

Reduced Susceptibility to Chlorhexidine in Staphylococci: is it Increasing and Does it Matter?
(17)

Hva var formålet med studien?

Artikkelforfatterne ønsket å undersøke hva forskning viser knyttet til bakteriell mottakelighet ved bruk av klorheksidin på *Staphylococci*. De ønsket også å undersøke tilstedeværelse av effluksmedierte resistensgener. Formålet med studien var å kartlegge den kliniske signifikansen av denne utviklingen.

Hvilken metode ble brukt?

Dette er en oversiktsstudie.

Hva var resultatet av studien?

Det legges frem at vi allerede kjenner til at bakteriesporer og *Mycobacterium* har iboende resistens mot klorheksidin da disse har en ikke-permeabel membran for desinfeksjonsmiddelet. Arter av *Providencia* og *Proteus* viser også resistens mot klorheksidin innenfor normale brukskonsentrasjoner. Studien sier videre at effluks er den mest kjente mekanismen ved redusert mottakelighet for klorheksidin hos *S. aureus*. Det er også vist at både grampositive- og gramnegative bakterier kan tilegne seg gener som gir bakterien efflukssegenskaper da disse genenes tilstedeværelse ofte finnes på mobile genelementer.

Forskning viser at det finnes over elleve kjente gener som koder for effluksmediert resistens hos klorheksidin. Disse genene er *qacA*, *qacB*, *qacE*, *qacEΔ1*, *qacF*, *qacG*, *qacH*, *qacJ*, *qacZ*, *smr* og *norA*. Av dem er *qacA* det genet som oftest ses i sammenheng med redusert

mottakelighet av klorheksidin hos *Staphylococci*. Assosiasjon mellom resistensgener mot klorheksidin og antibiotikaresistens er også funnet.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

Artikkelen oppsummerer hva som finnes av kjent resistens og resistensgener i litteraturen frem til 2012.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

Artikkelforfatterne skriver at det kreves mer forskning knyttet til bruk, og type bruk av klorheksidin for å kunne si om dette har ført til økt bakterietoleranse av desinfeksjonsmiddelet.

Artikler knyttet til natriumhypokloritt

Artikkel 1:

Biofilm Formation Capability of *Enterococcus faecalis* Cells in Starvation Phase and Its Susceptibility to Sodium Hypochlorite (9)

Hva var formålet med studien?

I denne studien ønsket man å undersøke næringsfattige bakterier av arten *Enterococcus faecalis* sin evne til å danne biofilmer på dentin og bakterienes mottakelighet for 5,25 % natriumhypokloritt.

Hvilken metode ble brukt?

Det ble benyttet *E. faecalis* i tre forskjellige faser, eksponentiell, stasjonær og næringsdeprivert. Bakteriene ble blandet med BHI og lagret i anaerobe forhold ved 37 °C i 48 timer. Det ble framstilt dentinsnitt av ekstraherte visdomstenner fra friske individer i en alder av 19-25 år. *E. faecalis* i de forskjellige fasene ble lagt på dentinsnitt og tilsatt en ny løsning av 5,25 % natriumhypokloritt. Eksponeringstidene var 30 sekunder, 10 minutter og 30 minutter. Etter fullført behandling ble dentinsnittene skannet med elektronmikroskop på tre tilfeldige områder for å kontrollere mengden gjenværende bakterier.

Hva var resultatet av studien?

Vekst av cellenivået økte de første 6 timene og holdt seg stabil mellom 6- og 24 timer, men sank noe fra 24 timer til 48 timer og stabiliserte seg så igjen. *E. faecalis* i næringsdeprivasjonsfase viste progresjon gjennom alle de forskjellige fasene (6-, 24- og 48 timer) og dannet en biofilm med kompleks arkitektur etter 24 timer. *E. faecalis* i den eksponentielle og stasjonære fasen kunne først danne en biofilm etter 24 timer. Det viste seg at over en periode på 30 minutter var det en signifikant forskjell i mengde tilgjengelige celler fra den stasjonære fasen, men ingen signifikant forskjell fra de gjenstående to fasene etter eksponering for 5,25 % natriumhypokloritt.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

Det ble ikke påvist noen ny resistens, men studien viste at en mer moden biofilm utviklet fra næringsdepriverte celler av *E. faecalis* hadde redusert mottakelighet for 5,25 % natriumhypokloritt, og den reduserte mottakeligheten økte med biofilmmodningen.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

Denne studien viser ikke til dette, men den forklarer at det er mulig at redusert mottakelighet for natriumhypokloritt skyldes det fysiologiske stadiet til cellene og grad av modenhet til biofilmen.

Artikkel 2:

Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dentinal Tubules to Disinfecting Solutions (10)

Hva var formålet med studien?

Forskerne ønsket å vurdere hvilken betydning lokalisasjon av biofilmen har for effekten av desinfeksjonsmiddel på bakterier som sentrifugeres ned i dentinkanalene.

Hvilken metode ble brukt?

Det ble samlet inn 30 ekstraherte tenner. Alle tennene var intakte, kariesfrie og med en rot. Av disse tennene ble det laget 60 dentinsnitt som ble infisert av innhøstet *E. faecalis* fra persisterende apikal periodontitt eller sub- og supragingival plakk fra 3 frivillige voksne individer. Både innhøstet plakk og *E. faecalis* ble dyrket på BHI. De forskjellige prøvene ble tilfeldig fordelt og inkubert i en eller tre uker. Når preparatene var ferdig inkubert ble de

fordelt i tilfeldige grupper og tilsatt enten 2 % klorheksidin eller 2 % natriumhypokloritt samt en kontrollgruppe med sterilt vann. For å kontrollere effekten av de antibakterielle midlene ble det benyttet konfokal laserskanningsmikroskopi.

Hva var resultatet av studien?

Det var ingen signifikant forskjell i bakterier drept i ensartet- og flerartet biofilm. Det var heller ingen forskjell i modenhet på biofilmene. I eksperimentgruppene var det derimot variasjoner, hvor variasjonene i antall drepte bakterier var avhengig av hvor moden, den ensartede- og flerartede biofilmen var og hvilket antibakterielt middel som ble benyttet.

Det var signifikant lavere antall bakterier drept i tre uker gamle biofilmer sammenlignet med de som var modnet en uke. *E. faecalis* VP3-81 var mer sensitiv ovenfor CHX og natriumhypokloritt sammenlignet med *E. faecalis* Gel 31 og plakk-biofilmer. Det var ingen forskjell på antall bakterier drept med natriumhypokloritt i *E. faecalis* Gel 31 og de forskjellige gruppene med plakk. Effektiviteten av 2 % natriumhypokloritt var mye bedre enn 2 % klorheksidin mot flerartede biofilmer i dentin.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

Det ble i denne studien ikke påvist resistensgener eller utviklet resistens.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

Det kommer ikke frem i denne studien at det er sammenheng mellom bruk av desinfeksjonsmidlene og økt resistens eller redusert mottakelighet. Derimot viser studien at bakteriene ikke kan bli totalt fjernet fra dentinkanalene i løpet av en periode på tre minutter ved bruk av 2 % klorheksidin eller 2 % natriumhypokloritt, uavhengig av modenhet på biofilmen. Etter en periode på tre minutter ble den antimikrobielle effekten mot bakteriene redusert, og etter ti minutter var effekten nesten ikke-eksisterende.

Forskerne opplyser om at de ikke har sammenlignet nok stammer av *E. faecalis* til å konkludere noe helt sikkert, men resultatene av studien indikerer at økt modning av biofilmen reduserer mottakeligheten for ytre påkjenninger.

Artikkel 3:

The Effect of Sodium Hypochlorite on *Enterococcus faecalis* When Grown on Dentine as a Single- and Multi-species Biofilm (7)

Hva var formålet med studien?

Formålet var å undersøke om bakterien *E. faecalis* i en biofilm bestående av flere arter hadde økt resistens mot natriumhypokloritt, og deretter kontrollere om organismen har økt resistens for natriumhypokloritt sammenlignet med en aksenisk biofilm.

Hvilken metode ble brukt?

Det ble laget prøveplater av dentin fra friske ekstraherte tenner innsamlet fra mennesker. Bakteriene som ble brukt var *E. faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) og *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*). Biofilmen ble dyrket over 28 dager, både for den flerkulturelle biofilmen og den akseniske biofilmen.

Det ble i alt utført tre eksperimenter og det ble benyttet kontroller av dentinsnitt med saltvann, dentinsnitt med biofilm og ett dentinsnitt uten saltvann eller natriumhypokloritt. Det ble så sammenlignet vekst av biofilm over 28 dager i alle tre eksperimentene. I alt ble det valgt ut åtte kontrollsnitt som ble tilsatt saltvann og lagret i romtemperatur. Åtte plater ble tatt bort og tilsatt 0,9 % natriumhypokloritt og lagret i romtemperatur tilsatt sterilt saltvann. En plate ble valgt ut for å kontrollere tilstedeværelsen av bakteriene. Prøvene med saltvann og natriumhypokloritt ble fordelt i to ulike grupper og analysert av enten skanningelektronmikroskop eller konfokalmikroskopi.

Hva var resultatet av studien?

Resultatet av studien viste at *E. faecalis* ikke har en fordel av å være del av en flerartet biofilm når det gjelder økt natriumhypoklorittresistens, sammenlignet med en aksenisk biofilm.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

Studien nevner ikke noe om resistensgener eller MIC. Den tar kun opp påvirkningen av type biofilm og forholdene i biofilmen hos *E. faecalis*.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

Det blir ikke påvist assosiasjon mellom bruk av natriumhypokloritt og bakterieresistens i denne studien.

Artikkel 4:

Effect of the Source of Biofilm Bacteria, Level of Biofilm Maturation, and Type of Disinfecting Agent on the Susceptibility of Biofilm Bacteria to Antibacterial Agents (8)

Hva var formålet med studien?

Formålet med studien var å undersøke om modenheten, biofilmens bakteriekilde og ulike agens som bakterien utsettes for påvirker sensitiviteten for desinfeksjonsmidler. Forskerne ønsket å vurdere effekten av 1 % natriumhypokloritt, 2 % klorheksidin, 0,2 og 0,4 % jodkaliumjodid.

Hvilken metode ble brukt?

Biofilm bestående av flere typer bakterier som inngår i oral plakk ble hentet fra seks individer. Biofilmen fikk vokse i inntil åtte uker i kollagendeekte hydroksylapatittskiver. Etter en, to, tre, fire og åtte uker med vekst og modning ble biofilmen eksponert for 1 % natriumhypokloritt og 2 % klorheksidin i ett og tre minutter. Mengden døde bakterier i biofilmen ble bestemt ved hjelp av konfokal laserskanningsmikroskopi.

Hva var resultatet av studien?

Resultatet viste at biofilmen gikk fra sensitiv til mindre mottakelig mot desinfeksjonsmidler etter to til tre uker av modning. Denne utviklingen skjedde samtidig i alle biofilmene som ble høstet fra seks donorer og var uavhengig av hvilken type desinfeksjonsmiddel som ble benyttet.

Resultatene fra denne studien viste at dersom man bruker en ny, umoden biofilm til å måle effektiviteten av irrigasjonsmidler får man feilaktige resultater, da den vil virke bedre enn det som er tilfellet *in vivo*. Bakterier i moden biofilm er mer tolerant mot desinfeksjonsmidler enn planktoniske bakterier. Dette er på grunn av den fysiske barrieren til biofilmmatrisen, fysiologisk stadium i sulfase samt subpopulasjoner av persisterende bakterier. Etter to uker

eliminerte 2 % natriumhypokloritt ca. 100 % bakteriene i biofilmene, mens etter tre uker hadde effektiviteten sunket til ca. 10-30 %.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

Studien viser at biofilmens modenhet spiller en stor rolle når det gjelder effektiviteten av irrigasjonsmiddelet. Denne studien viser at i umoden biofilm elimineres 20-100 % av bakteriene, avhengig av konsentrasjon og eksponeringstid. Etter tre uker var resultatet signifikant dårligere og kun 10-30 % av bakteriene ble drept.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

Bakteriene i en til to uker gammel biofilm var svært følsomme for natriumhypokloritt 1 %. Etter tre uker viste biofilmen redusert mottakelighet til desinfeksjonsmiddelet. Forskningen viser at dette skyldes det fordelaktige miljøet biofilmen skaper. Denne artikkelen tar ikke for seg om ervervet resistens kan bidra til effekten.

Artikkel 5:

Investigation of *rpoS* and *dps* Genes in Sodium Hypochlorite Resistance of *Salmonella* Enteritidis SE86 Isolated from Foodborne Illness Outbreaks in Southern Brazil (48)

Hva var formålet med studien?

Målet med studien var å sammenligne utviklingen av resistens knyttet til bruk av natriumhypokloritt mot *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*). De ønsket også å finne ut hvordan tilstedeværelse av *rpoS*- og *dps* gener påvirker bakteriens resistens mot desinfeksjonsmiddelet. *S. enteritidis* har vært knyttet opp til flere utbrudd av matforgiftning i Brasil, hvor den spesifikke stammen *S. enteritidis* SE86 i flere tilfeller har vist seg å være årsaken. Forskerne ønsket å sammenligne SE86 med andre klonegrupper av salmonella fra andre steder i verden, for å undersøke om denne bakteriestammen hadde høyere grad av toleranse mot natriumhypokloritt.

Hvilken metode ble brukt?

Forskergruppen benyttet stammer av villtypen *S. enteritidis* fra Albania, Pakistan, Marokko og Zimbabwe. Felles for disse er at alle har forårsaket matforgiftning i de ulike landene. Disse fem stammene av salmonella ble sammenlignet med to muterte stammer av *S. enteritidis* SE86 og to taggede (3XFLAG) stammer av SE86. Bakteriestammens toleranse ovenfor 200

ppm natriumhypokloritt ble målt. Grad av overlevelse blant bakteriene ble bestemt ved hjelp av bakterietellinger og de taggedede proteinene Dps og RpoS ble detektert ved hjelp av natrium dodecyl sulfat-polyakrylamid gel elektroforese og immunoblotting med anti-FLAG antistoffer.

Hva var resultatet av studien?

Etter 20 minutter var det ingen av bakteriestammene som var fullstendig inaktiverte etter eksponering med 200 ppm natriumhypokloritt. Mengden mikroorganismer var omtrent på 10⁵ «colony forming unit» (CFU) hos alle stammer da eksponeringen startet. I løpet av det første minuttet med natriumhypokloritteksponering ble alle redusert med ca. 1 log CFU. Likevel holdt antallet levende organismer seg nesten uendret under eksponeringen. *S. enteritidis* SE86 uten *dps* var mer sensitiv for natriumhypokloritt ($P < 0,05$) enn villtypen SE86. *RpoS* og *dps* viste seg derfor å være viktige for bakteriens overlevelse når den utsettes for natriumhypokloritt. Aktiveringen av disse genene beskytter bakterien mot oksidativt stress.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

Denne studien refererer til tidligere forskning gjort av Malheiros et al. hvor SE86-stammen av *S. enteritidis* har vist seg å være mer resistent mot natriumhypokloritt enn andre stammer av bakterien. I denne studien viste ikke SE86-stammen høyere grad av resistens enn stammene hentet fra andre land. Andre studier har pekt på at *S. enteritidis* er en bakterie hvor det foreligger lav grad av genetisk ulikhet mellom stammene. Forskning har vist at en klon av *S. enteritidis* har spredt seg over hele verden og forårsaket salmonellose i flere land. Forskergruppen tror at dette kan være en av årsakene til at de ulike bakteriestammene hadde så lik grad av resistens.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

Studien sier ikke noe om det finnes en direkte assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og resistensutvikling. Den påviser likevel at dersom resistensgenene *rpoS* og *dps* er fraværende, har bakteriene signifikant lavere toleranse for natriumhypokloritt, og tilstedeværelsen påvirker resistens mot desinfeksjonsmiddelet.

Artikkel 6:

Purification, Gene Cloning, Gene Expression, and Mutants of Dps from the Obligate Anaerobe *Porphyromonas gingivalis* (50)

Hva var formålet med studien?

Studiens formål var å demonstrere at *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) er bærer av resistensgenet *dps* som gir bakterien høyere toleranse for oksidativt stress, samt avdekke struktur ved hjelp av kloning og sekvensering for å sammenligne strukturen av genet med samme gen i andre bakteriearter.

Hvilken metode ble brukt?

Forskerne så på syv ulike stammer av *P. gingivalis* og tre stammer med *E. coli*. De benyttet seg av t-test som en del av den statistiske metoden for å sammenlignede CFU tall mellom bakteriestammene. De isolerte en *dps*-homolog fra *P. gingivalis* og klonet genet i *P. gingivalis*. Genmateriale fra *P. gingivalis*, som beskytter mot peroksid, ble satt inn i *oxyR* positive *E. coli*-bakterier ved konstruksjon og rekombinasjon. Et derivat av genet ble konstruert for å bekrefte om *dps* førte til beskyttelse mot oksidering. For å finne mer ut om uttrykket av *dps*, ble et plasmid med en promoter for *dps* konstruert. Plasmidet ble deretter satt inn i en villtype *P. gingivalis*-stamme.

For å se på betydningen av *dps* i *P. gingivalis* for overlevelse, ble det framstilt en mutant med manglende eller forstyrret *dps*. Egenskapene til denne *P. gingivalis*-mutanten ble undersøkt på flere måter. Her ble vekstkarakteristikken ved lite jerntilgang undersøkt for å se om genet bidrar til lagring av jern. Mutanten ble også undersøkt for påvirkningen av blant annet hydrogenperoksid. I tillegg ble følsomheten for oksygen i lufta undersøkt, både med og uten hydrogenperoksideksponering. Til slutt ble *dps* i *P. gingivalis* som invaderer endotelceller og overlevelsen av disse cellene undersøkt. Dette ved å se på den intracellulære overlevelsessevnen til *P. gingivalis dps* mutanten, sammenlignet med villtypen av *P. Gingivalis*.

Hva var resultatet av studien?

Det blir lagt frem flere resultater i studien. Et er at Dps i *P. gingivalis* hadde store likheter med aminosyresekvensene til Dps i andre arter. *Dps* fra *P. gingivalis* synes videre å kunne gi resistens mot peroksid i *E. Coli*-mutanter med *OxyR*, og uttrykket av *dps* reguleres blant annet

av *oxyR*. Dps viste seg ikke å ha noen innvirkning på lagring av jern intracellulært, men det ser ut til å beskytte mot peroksid i *P. gingivalis* og har en viktig rolle i beskyttelsen mot hydrogenperoksid. Til slutt indikerer studiens resultater at tilstedeværelse av Dps fører til at *P. gingivalis* lettere overlever i en type endotelceller.

Ble det påvist ny eller kjent resistens og/eller resistensgener i studien?

Dette er den første studien som har funnet bevis som indikerer tilstedeværelse av en Dps homolog i *P. gingivalis*. Det ble også laget nye mutasjoner av bakterien som ikke inneholdt Dps for å analysere funksjonen til dette proteinet hos organismen. Forskerne fant ut at *P. gingivalis* inneholdt ferritinlignende partikler. Det er også første gang det blir påvist at *dps* hos *P. gingivalis* har evnen til å gi resistens hos *E. coli*.

Finnes det assosiasjon mellom bruk av desinfeksjonsmiddelet og økt bakterieresistens?

Det beskrives en assosiasjon mellom økt uttrykk av *dps*, som ofte forårsaker økt beskyttelse mot oksidativt stress etter eksponering for hydrogenperoksid. Natriumhypokloritt er i likhet med hydrogenperoksid et oksiderende middel, og toleranse mot dette kan også settes i sammenheng med resistensfunnene i studien.

Diskusjon og konklusjon

Det primære målet med studien var å undersøke resistensgener og antimikrobiell resistens mot antimikrobielle agens relatert til odontologisk praksis. Under planlegging av prosjektet og i utformingen av prosjektbeskrivelsen ble det tatt sikte på å gjøre en systematisk gjennomgang av litteratur innenfor temaet fra de siste ti år. Vi ønsket i utgangspunktet å vurdere risiko og grunn til bekymring rundt antimikrobiell resistens i Skandinavia. Grunnet lite litteratur publisert innen dette emnet i løpet av forrige desennium, få studier og funn i Skandinavia, ble det besluttet å utvide søket med hensyn til tidsperiode og geografisk utstrekning.

Vi satte noen kriterier basert på publikasjonsår, språk, art og typer tidsskrifter på treff i søkemotoren PubMed. Dette er en viktig kilde til forskningsartikler knyttet til helsevitenskap, som stiller strenge krav til tidsskriftene som inkluderes. I løpet av de siste årene har PubMed inkludert artikler fra PubMed Central, som er et arkiv med åpen tilgang, uten de samme strenge kravene som PubMed har. Dette åpner opp for at artikler fra mindre seriøse tidsskrifter kan dukke opp i PubMed via PubMed Central.

Av hovedartiklene benyttet er første, tredje og femte artikkel på klorheksidin og sjette artikkel på natriumhypokloritt tilgjengelig gratis i PubMed Central. Alle artiklene inkludert som hovedartikler og tilhørende tidsskrift er vurdert og kvalitetskontrollert da de aktuelle tidsskriftene er inkludert i PubMed, og tatt med i MEDLINE. Artiklene er dermed fagfelleurdert, og samtlige tidsskrifter som artiklene er hentet fra har jevnlig publikasjoner. Som følge av oppgavens metodologi og søkemotoren benyttet i litteratursøket, vil endel litteratur og vitenskapelige artikler automatisk kunne bli ekskludert. Samme litteratursøk kan gi forskjellige treff dersom andre søkemotorer benyttes. Bruken av PubMed alene vil derfor tenkes å kunne begrense antallet resultater i litteratursøket.

I litteraturen og forskningen som er gjennomgått i denne oppgaven fremkommer det svakheter. Det finnes blant annet store variasjoner i konsentrasjonen av antimikrobielle agens som benyttes i forskningen. Videre er det ulikheter i hvordan resistens undersøkes, og om resistensgener involveres i studiene. En utfordring er manglende konsensus, samt internasjonal og nasjonal enighet om grenseverdier. Dette gjør at bruk av MIC for å si noe om resistens mot desinfeksjonsmidler ikke er velegnet, da resultatene blir vanskelig å sammenligne. Signifikansen er vanskelig å tolke fordi det varierer hvordan resistens defineres

(17). Videre arbeid for å utvikle standardiserte metoder og konsensus rundt definisjon av resistens vil være viktig for å kunne bringe forskningen fremover.

Geografiske variasjoner i prevalensen av resistens forekommer, og kan påvirkes av mange faktorer som spredning av kloner, bakteriepopulasjonen som studeres, forskjeller i infeksjonskontrollprosedyrer, og mengden biocider som benyttes i samfunnet. Geografisk distribusjon av gener er ikke godt kartlagt i litteraturen. Andre faktorer som påvirker genuttrykk av resistensgener vil være nyttig for å forstå resistens og bedre kunne forebygge nosokomielle infeksjoner.

Det er kjent at kommersielle produkter som inneholder varierende konsentrasjoner av antiseptiske midler vil utøve selektivt trykk på bakterier som inneholder resistensgener. Det kreves mer forskning på faktorer som selekterer for resistensgener, sammenhengen mellom disse og flere undersøkelser på om enkeltgener kan gi resistens mot flere ulike biocider (37).

Mye er fremdeles ukjent når det gjelder risikoen og utviklingen av resistens mot desinfeksjonsmidler i orale bakterier, mekanismene og kryssresistens mot andre antimikrobielle midler. For å få en bedre forståelse av temaet trengs tydelige retningslinjer samt videre forskning på området (37).

Referanser

1. Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A. Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern? *Front Microbiol.* 2019;10:587.
2. Vevelstad MB, Husøy L, Jensen R, Langeland M, Thengs L, Slinde I, et al. Rent Nok? 2016 [cited 2020 27.09.2020]; 126:280-5. Available from: <https://www.tannlegetidende.no/i/2016/4/d2e90>.
3. Stortinget. Forskrift om smittevern i helse- og omsorgstjenesten Norge: Lovdata, ; 2020.
4. Helsedirektoratet. Faglige anbefalinger for smittevern i klinisk odontologisk praksis. Helsedirektoratet 2018.
5. Laneve E, Raddato B, Dioguardi M, Di Gioia G, Troiano G, Lo Muzio L. Sterilisation in Dentistry: A Review of the Literature. *Int J Dent.* 2019;2019:6507286.
6. Helse- og omsorgsdepartementet. Veiledning i bruk av kjemiske desinfeksjonsmidler til teknisk bruk i helse- og sykepleie Statens Legemiddelverk: Statens legemiddelverk; 2015 [updated 06.2015; cited 2020 25.09.2020]. Available from: <https://legemiddelverket.no/Documents/Bivirkninger%20og%20sikkerhet/R%c3%a5d%20til%20helsepersonell/Desinfeksjonsmidler/Veiledning%20desinfeksjon%20og%20valg%20av%20middel%20korriger%20august%202017.pdf>.
7. Yap B, Zilm PS, Briggs N, Rogers AH, Cathro PC. The effect of sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* when grown on dentine as a single- and multi-species biofilm. *Aust Endod J.* 2014;40(3):101-10.
8. Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. *J Endod.* 2013;39(4):473-7.
9. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod.* 2010;36(4):630-5.
10. Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J, et al. Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dentinal Tubules to Disinfecting Solutions. *J Endod.* 2016;42(8):1246-50.
11. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):147-79.
12. Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol.* 2012;61(9):399-419.
13. Sturla Pilskog. L1.9.2.5 Klorheksidin. *Norsk Legemiddelhåndbok Nors Legemiddelhåndbok*; 2018.
14. Hamdan-Nassar T, Bellot-Arcís C, Paredes-Gallardo V, García-Sanz V, Pascual-Moscardó A, Almerich-Silla JM, et al. Effect of 2% Chlorhexidine Following Acid Etching on Microtensile Bond Strength of Resin Restorations: A Meta-Analysis. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(12).
15. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(8):4770-6.
16. Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother.* 1954;9(2):192-6.

17. Horner C, Mawer D, Wilcox M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2547-59.
18. Lakhani, Laxman Na, Vandana. Chlorhexidine - An Insight *International Journal of Advanced research.* 2016;4(7):1321-8.
19. Løe H, Von der Fehr FR, Schiött CR. Inhibition of experimental caries by plaque prevention. The effect of chlorhexidine mouthrinses. *Scand J Dent Res.* 1972;80(1):1-9.
20. Løe H, Rindom Schiött C. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *Journal of Periodontal Research.* 1970;5(2):79-83.
21. Sheng WH, Wang JT, Lauderdale TL, Weng CM, Chen D, Chang SC. Epidemiology and susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: emphasis on chlorhexidine susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;63(3):309-13.
22. Felleskatalogen. OSLO: Felleskatalogen AS [Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/klorhexidinsprit-fresenius-kabi-klorhexidinsprit-farget-fresenius-kabi-fresenius-kabi-560639>].
23. Abouassi T, Hannig C, Mahncke K, Karygianni L, Wolkewitz M, Hellwig E, et al. Does human saliva decrease the antimicrobial activity of chlorhexidine against oral bacteria? *BMC Res Notes.* 2014;7:711.
24. Spreadborough P, Lort S, Pasquali S, Popplewell M, Owen A, Kreis I, et al. A systematic review and meta-analysis of perioperative oral decontamination in patients undergoing major elective surgery. *Perioper Med (Lond).* 2016;5:6.
25. Milstone AM, Passaretti CL, Perl TM. Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):274-81.
26. Lim KS, Kam PC. Chlorhexidine--pharmacology and clinical applications. *Anaesth Intensive Care.* 2008;36(4):502-12.
27. Haydari M, Bardakci AG, Koldslund OC, Aass AM, Sandvik L, Preus HR. Comparing the effect of 0.06% -, 0.12% and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial. *BMC Oral Health.* 2017;17(1):118.
28. Gomes BPFA, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR. Chlorhexidine in Endodontics. *Brazilian Dental Journal.* 2013;24:89-102.
29. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 9552079: Chlorhexidine [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9552079>].
30. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology.* 2005;99(4):703-15.
31. (US) PBMNLoM. National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 9571016; Chlorhexidine hydrochloride. [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorhexidine-hydrochloride>].
32. Chlorhexidine [Oppslagsverk for legemiddel]. Drugbank: Drugbank; 2005 [updated 11.11.2020; cited 2020 02.11.2020]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00878>.
33. Seier-Petersen MA. Development of bacterial resistance to biocides and antimicrobial agents as a consequence of biocide usage. 2013:151.
34. Venter H, Henningsen ML, Begg SL. Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: the biochemistry behind the headlines. *Essays Biochem.* 2017;61(1):1-10.
35. Kampf G. Acquired resistance to chlorhexidine - is it time to establish an 'antiseptic stewardship' initiative? *J Hosp Infect.* 2016;94(3):213-27.

36. do Vale BCM, Nogueira AG, Cidral TA, Lopes MCS, de Melo MCN. Decreased susceptibility to chlorhexidine and distribution of qacA/B genes among coagulase-negative Staphylococcus clinical samples. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):199.
37. Skovgaard S, Larsen MH, Nielsen LN, Skov RL, Wong C, Westh H, et al. Recently introduced qacA/B genes in Staphylococcus epidermidis do not increase chlorhexidine MIC/MBC. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(10):2226-33.
38. Johnson RC, Schlett CD, Crawford K, Lanier JB, Merrell DS, Ellis MW. Recurrent Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Cutaneous Abscesses and Selection of Reduced Chlorhexidine Susceptibility during Chlorhexidine Use. *J Clin Microbiol.* 2015;53(11):3677-82.
39. Clarkson RM, Moule AJ. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Aust Dent J.* 1998;43(4):250-6.
40. Dakin HD. On the Use of Certain Antiseptic Substances in the Treatment of Infected Wounds. *Br Med J.* 1915;2(2852):318-20.
41. Kristoffersen Ø, Fristad I. Natriumhypokloritt – anbefalinger og praktisk bruk. 2007.
42. Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics.* 1978;4(2):60-4.
43. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal.* 2002;13:113-7.
44. Rosenfeld EF, James GA, Burch BS. Vital pulp tissue response to sodium hypochlorite. *J Endod.* 1978;4(5):140-6.
45. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2008;58(6):329-41.
46. Ponzano GP. Sodium hypochlorite: history, properties, electrochemical production. *Contrib Nephrol.* 2007;154:7-23.
47. Ghezzi PM, Bonello M, Ronco C. Disinfection of dialysis monitors. *Contrib Nephrol.* 2007;154:39-60.
48. Ritter AC, Bacciu D, Santi L, Silva WO, Vainstein MH, Rubino S, et al. Investigation of rpoS and dps genes in sodium hypochlorite resistance of Salmonella Enteritidis SE86 isolated from foodborne illness outbreaks in southern Brazil. *J Food Prot.* 2012;75(3):437-42.
49. Cariri ML, de Melo ANF, Mizzi L, Ritter AC, Tondo E, de Souza EL, et al. Quantitative assessment of tolerance response to stress after exposure to oregano and rosemary essential oils, carvacrol and 1,8-cineole in Salmonella Enteritidis 86 and its isogenic deletion mutants Δ dps, Δ rpoS and Δ ompR. *Food Res Int.* 2019;122:679-87.
50. Ueshima J, Shoji M, Ratnayake DB, Abe K, Yoshida S, Yamamoto K, et al. Purification, gene cloning, gene expression, and mutants of Dps from the obligate anaerobe Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun.* 2003;71(3):1170-8.
51. Musuuza JS, Sethi AK, Roberts TJ, Safdar N. Analysis of Multidrug-Resistant Organism Susceptibility to Chlorhexidine Under Usual Clinical Care. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2017;38(6):729-31.
52. do Amorim CV, Aun CE, Mayer MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Braz Oral Res.* 2004;18(3):242-6.
53. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod.* 2011;37(5):657-61.

