

Editorial convidado

Difusão em ágar: um método confiável?

O método de difusão em ágar, amplamente empregado em avaliações de potencial antimicrobiano de diferentes soluções, medicamentos ou cimentos utilizados em Odontologia, atualmente vem sendo rejeitado para publicação em revistas indexadas de alto impacto na Odontologia. Nos últimos dez anos, verifica-se uma diminuição expressiva do número de artigos que recorrem a essa metodologia em revistas indexadas, visto que trabalhos com esse modelo experimental costumam ser devolvidos aos autores sem passar pelo processo *peer review*. Apesar de parecer radical, tal decisão não é infundada, o que nos leva a refletir melhor a respeito desse modelo experimental [1].

A metodologia de difusão em ágar foi originalmente desenvolvida para avaliar a susceptibilidade bacteriana a antibióticos sistêmicos, em que a mensuração do efeito antimicrobiano sobre determinada cepa bacteriana se baseia na medição do halo de inibição formado no meio ágar após o contato com um disco contendo antibiótico. Considerando as diferenças no padrão de difusão dos materiais em teste e a possibilidade de interação química entre o material e os componentes químicos do meio ágar, dezenas de anos foram necessários para o desenvolvimento da metodologia a fim de definir e padronizar as substâncias químicas envolvidas no teste, tornando confiáveis os resultados. Para fazer a mensuração da susceptibilidade bacteriana, foi estabelecida uma curva de comparação a fim de que a zona de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos discos de antibióticos seja comparada às concentrações clínicas do antibiótico encontradas no soro humano, ajudando assim a estipular a efetividade clínica do antibiótico sobre determinada bactéria. Além disso, cepas de referência, de origem conhecida e com susceptibilidade previamente quantificada aos antibióticos, são usadas como controle em todos os testes. Graças a essa rigorosa padronização, a maioria das bactérias

Guest editorial

Agar diffusion: a reliable method?

The agar diffusion method, which is widely used in the assessments of the antimicrobial potential of various solutions, medicines or endodontic cements, is now being rejected for publication in indexed high-impact journals in Dentistry. Over the past ten years there was a considerable decrease in the number of articles that use this method in indexed journals, once studies with this experimental model are usually returned to authors before going through the peer review process. Although it appears radical, it is not a baseless decision, and this directs us to consider about this experimental model [1].

The agar diffusion methodology was originally developed to assess bacterial susceptibility to systemic antibiotics, in which the measurement of the antimicrobial effect on a given bacterial strain is based on the measurement of the zone of inhibition formed in the agar after contact with a disc containing antibiotic. Considering the differences in the pattern of diffusion of the materials being tested and the possibility of chemical interaction between the material and the chemical components of agar, decades were needed to develop the methodology in order to define and standardize the chemical substances involved in the test, thus making reliable results. To make the measurement of bacterial susceptibility a comparison curve was established so that the zone of inhibition of bacterial growth around the discs containing antibiotics was compared to the clinical concentrations of the antibiotic found in the human serum, thus helping to determine the clinical effectiveness of antibiotic in a given bacteria. Besides, reference strains of known origin and previously measured susceptibility to antibiotics are used as control in all tests. Thanks to this strict standardization, most aerobic and facultative bacteria can be reliably tested with regards to their susceptibility to

aeróbicas e facultativas pode ser testada de forma confiável quanto a sua susceptibilidade a antibióticos, no entanto ainda não se chegou a uma uniformização internacionalmente aceita para avaliar os microrganismos anaeróbios nesse aspecto [2].

Todavia, quando se analisa o potencial antimicrobiano de soluções ou medicamentos com suposta ação desinfetante utilizados em Odontologia, não há padronização do meio de cultura, tampouco das substâncias a serem testadas. Além disso, reações químicas entre meio ágar e materiais em teste são estudadas com pouca frequência e, portanto, são praticamente desconhecidas. De toda sorte, a ocorrência de qualquer interação química pode originar erros de interpretação dos resultados acerca do potencial antimicrobiano do material em teste. Materiais com comportamentos químicos distintos em relação ao meio de cultura podem provocar diferenças nos “halos de inibição” que reflitam essas interações químicas, de forma que a mensuração da ação antimicrobiana se torna indissociável dessas reações.

O meio de cultura às vezes apresenta, por exemplo, capacidade tampão. Ao testarmos materiais cuja ação antimicrobiana se dá em decorrência do seu alto pH, certamente sua atividade antimicrobiana será subestimada, pois em meio tamponado o alto pH do material é neutralizado, resultando em um pequeno halo de inibição.

Também é frequente um resultado falso positivo na avaliação da ação antimicrobiana de determinadas substâncias em meio ágar. O EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), substância usualmente utilizada para remoção de *smear layer* durante o preparo biomecânico de canais radiculares, apresenta grandes halos de inibição em testes em meio ágar. No entanto, quando aplicada a metodologia de contato direto ou de concentração inibitória mínima, o EDTA não tem nenhum poder antimicrobiano. O que ocorre é que o EDTA é capaz de remover íons cátions do meio ágar, tornando-o assim impróprio para o crescimento bacteriano. Portanto, o halo de inibição nesses casos não decorre de uma real atividade antimicrobiana, mas apenas da interação química entre o ácido e o meio ágar.

antibiotics, but an internationally accepted standardization for assessing the anaerobic microorganisms in this aspect has not been reached so far [2].

However, when analyzing the antimicrobial potential of solutions or medicines with assumed disinfectant action, there is no standardization of the culture medium, neither of the substances to be tested. Moreover, the chemical reactions between agar and materials being tested are studied with low frequency, and therefore they are practically unknown. Nevertheless, the occurrence of any chemical interaction may lead to misinterpretation of the results on the antimicrobial potential of the material being tested. Materials with different chemical behaviors in relation to the culture medium may cause differences in the “zones of inhibition” that reflect these chemical interactions, so that the measurement of the antimicrobial action becomes inseparable from these reactions.

The culture medium sometimes presents, for example, buffering capacity. When testing materials which antimicrobial action is due to their high pH, their antimicrobial activity will certainly be underestimated, because in buffering medium the high PH of the material is neutralized, thus resulting in a small zone of inhibition.

It is also common to have a false positive result in the assessment of the antimicrobial action of given substances in agar. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), a substance commonly used to remove smear layer during root canal biomechanical preparation, presents large zones of inhibition in agar tests. However, when the direct contact or minimal inhibitory concentration methodology is applied, EDTA has no antimicrobial power. That is, EDTA is capable of removing ions cations in agar, thus making it unsuitable for bacterial growth. Therefore, the zone of inhibition in these cases is not due to a real antimicrobial activity, but only to the chemical interaction between acid and agar.

É imperioso enfatizar que o objetivo de qualquer experimento *in vitro* é simular e estimar, dentro de determinadas limitações, o comportamento do material *in vivo*. Ou seja, o objetivo de um teste antimicrobiano realizado pelo método de difusão em ágar deve ser presumir o comportamento dos materiais em uma situação clínica. Porém as desconhecidas interações químicas entre material e meio ágar podem gerar um viés de interpretação dos resultados, levando a conclusões que tendem a superestimar ou subestimar o potencial antimicrobiano de algumas substâncias. Considerando que não há evidências de que a observação de um halo de inibição em placa de ágar seja capaz de prever o comportamento clínico de um material, concluímos que essa metodologia nada adiciona ao conhecimento e, além de tudo, pode gerar uma obliquidade na escolha clínica de diferentes materiais, nas mais diversas áreas da Odontologia.

A avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias usadas em Odontologia deve, portanto, ser realizada por outros métodos, entre eles o de contato direto. Nesse teste, a suspensão bacteriana é colocada em contato com as substâncias testadas pelos períodos de tempo predeterminados; decorridos esses tempos, alíquotas do material são retiradas. Se o objetivo for a avaliação pela presença de turbidez, indicativa do crescimento bacteriano, partes da mistura dos microrganismos com as soluções testadas são incubadas em meio líquido. Se a análise for quantitativa, o material deve ser diluído e alíquotas dessas diluições são levadas a placas de meio ágar, incubadas, e o número de UFC é calculado [3].

Ao digitar no campo de busca do PubMed o termo *agar diffusion test* tendo como foco revistas de Odontologia e periódicos de 2000 a 2010, encontram-se 106 títulos, dos quais 35 são de autores brasileiros. A alta prevalência de pesquisadores brasileiros que utilizam a difusão em ágar para avaliar a atividade antimicrobiana de antissépticos indica que ainda há falta de informação sobre as limitações do método e os riscos de gerar conclusões equivocadas. Dessa forma, seguindo a tendência dos periódicos de alto impacto na Odontologia, o conselho editorial da Revista Sul-Brasileira de Odontologia concorda que trabalhos desenhados

It is imperative to emphasize that the objective of any *in vitro* experiment is to simulate and estimate within certain limitations the behavior of the material *in vivo*. That is, the objective of an antimicrobial test performed through the agar diffusion method shall be to determine the behavior of materials in a clinical situation. But the unknown chemical interactions between material and agar may cause a bias in interpreting the results, thus leading to conclusions that tend to overestimate or underestimate the antimicrobial potential of some substances. Considering that there is no evidence that the observation of a zone of inhibition on agar plates is capable of determining the clinical behavior of a material, we conclude that this methodology adds nothing to knowledge and, most important, may cause a skew in the clinical selection of different materials in several areas of Dentistry.

The assessment of the antimicrobial activity of substances used in Dentistry must therefore be performed through other methods, including the direct contact one. In this test, the bacterial suspension is placed in contact with other substances being tested for predetermined periods of time, and after that aliquots of the material are removed. If the objective is the assessment by the presence of turbidity, indicating bacterial growth, parts of the mixture of microorganisms with the tested solutions are incubated in liquid medium. If the analysis is quantitative, the material shall be diluted and aliquots of these dilutions are put on agar plates, incubated, and the CFU number is calculated [3].

When searching for “agar diffusion test” in PubMed with focus on Dentistry journals and periodicals from 2000 to 2010, 106 titles are found, of which 35 are by Brazilian authors. The high prevalence of Brazilian researchers using agar diffusion to assess the antimicrobial activity of antiseptics indicates that there is still lack of information on the limitation of this method and the risks of misleading conclusions when using it. Therefore, following the trend of high-impact journals in Dentistry, the editorial board of the South Brazilian

com o objetivo de comparar a capacidade antimicrobiana de materiais ou soluções em meio ágar não serão aceitos para publicação neste periódico, sendo imediatamente retornados aos autores.

Referências

1. Editorial Board of the Journal of Endodontics. Wanted: a base of evidence. *J Endod.* 2007;33(12):1401-2.
2. Haapasalo M, Qian W. Irrigants and intracanal medicaments. In: Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC (ed). *Ingle's endodontics*. 6. ed. Hamilton: BC Decker; 2008. p. 992-1018.
3. Siqueira Jr JF, Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod.* 1998;24:663-5.

Fernanda Geraldés Pappen

Professora Doutora de Endodontia
Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Pelotas (UFPel)
Pelotas – RS

Erick Miranda Souza

Professor Doutor de Endodontia
Faculdade de Odontologia
Centro Universitário do Maranhão (Uniceuma)
São Luís – MA

Dentistry Journal agrees that studies developed with the objective to compare the antimicrobial capacity of materials or solutions in agar will not be accepted here, thus being immediately returned to authors.

References

1. Editorial Board of the Journal of Endodontics. Wanted: a base of evidence. *J Endod.* 2007;33(12):1401-2.
2. Haapasalo M, Qian W. Irrigants and intracanal medicaments. In: Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC (ed). *Ingle's endodontics*. 6. ed. Hamilton: BC Decker; 2008. p. 992-1018.
3. Siqueira Jr JF, Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod.* 1998;24:663-5.

Fernanda Geraldés Pappen

Professor, Doctor in Endodontics
Faculty of Dentistry
Federal University of Pelotas (UFPel)
Pelotas – RS

Erick Miranda Souza

Professor, Doctor in Endodontics
Faculty of Dentistry
University Center of Maranhão (Uniceuma)
São Luís – MA