

„Różnice w działaniu przeciwbakteryjnym czterech handlowych preparatów do płukania jamy ustnej zawierających 0,12% chlorheksydyny: kontaktowy test in vitro i badanie liczby bakterii w ślinie”

Autorzy:

Herrera D, Rolda'n S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M

Opublikowano:

Journal of Clinical Periodontology 2003; 30: 307–314. R Copyright (2003) Blackwell Munksgaard

Różnice w działaniu przeciwbakteryjnym czterech handlowych preparatów do płukania jamy ustnej zawierających 0,12% chlorheksydyny: kontaktowy test *in vitro* i badanie liczby bakterii w ślinie

Isabel Santacruz¹, Sagrario Santos¹, Mireia Masdevall³ and Mariano Sanz^{1,2} David Herrera^{1,2}, Silvia Roldan,

¹Section of Graduate Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain;

²Laboratory of Microbiology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain;

³Department of Microbiology, Dentaids, SL, Sant Cugat del Valle's, Barcelona, S

Herrera D, Roldan S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M: Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study. J Clin Periodontol 2003; 30: 307–314. © Blackwell Munksgaard 2003.

Streszczenie

Cel: Ocenic aktywność przeciwbakteryjną w testach *in vitro* oraz *in vivo* czterech komercyjnych płynów do płukania jamy ustnej z 0,12% zawartością chlorheksydyny.

Materiał i metody: Test aktywności przeciwbakteryjnej *in vitro* składał się z modyfikowanego testu kontaktowego, gdzie testowano 20 wybranych gatunków bakterii przez 1 min z każdym produktem testowym. Po badaniu, hodowano inokulum, a wyniki wyrażono w odniesieniu do przeżycia/odporności i procentu przeżycia w porównaniu z próbą kontrolną z solą fizjologiczną. Badanie *in vivo* składało się z podwójnie ślepego, randomizowanego skrzyżowanego badania liczby bakterii ślinowych. 10 ochotników płukało jamę ustną każdym z testowanych produktów w ciągu 1 minuty. Próbkę śliny uzyskiwano przed płukaniem, po 5 minutach oraz po 1, 3, 5 i 7 godzinie. Próbkę te były hodowane zarówno w warunkach tlenowych i beztlenowych. Procent przeżycia w stosunku do wartości początkowej był obliczany dla każdego punktu czasowego. Porównania między produktami były badane za pomocą testu ANOVA i testu T-studenta dla prób zależnych.

Wyniki: Kontaktowe badania *in vitro* nie wykazały przeżycia każdego z badanych gatunków w produkcie zawierającym CHX + CPC, podczas gdy trzy gatunki (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus mitis* i *Peptostreptococcus Micros*) były odporne na pozostałe trzy produkty. CHX i CHX + NaF wykazały dodatkowe odporne gatunki (odpowiednio trzy i cztery gatunki). Badanie *in vivo* dla liczby bakterii ślinowych wykazało wyższą redukcję dla CHX + CPC i CHX + ALC dla bakterii tlenowych i beztlenowych, trwającą 5 godzin. Znaczące różnice zostały stwierdzone w wielokrotnych punktach czasowych, kiedy te dwa produkty zostały porównane zarówno z próbami kontrolnymi i innymi testowanymi produktami.

Wnioski: Istotne różnice w działaniu, między produktami zawierającymi 0,12% CHX, zostały wykryte zarówno w badaniach *in vitro* jak i w *in vivo*. Preparat zawierający alkohol był bardziej aktywny niż ten bez alkoholu, z wyjątkiem preparatu z CHX + CPC, w którym zmiana składu i dodatek CPC nie tylko wyrównał, a nawet zwiększył aktywność przeciwbakteryjną.

Chlorheksydyna (CHX), poza wszelkimi wątpliwościami, jest najbardziej zbadanym i skutecznym środkiem przeciwbakteryjnym w chemicznej kontroli płytki nazębnej i jest uważana za kontrolę pozytywną (złoty standard), do którego wszystkie inne środki przeciwbiofilmowe powinny być porównywane (Jones 1997). Są to dwie katjonowe grupy biguanidowe, o szerokim działaniu przeciwbakteryjnym,

niskiej toksyczności w komórkach ssaków i wysokim powinowactwie do przyczepienia do skóry i błony śluzowej. Jej mechanizm działania obejmuje bezpośrednie zniszczenia w wewnętrznej błonie cytoplazmatycznej, będącej bakteriostatyczną w niskich dawkach i bakterioobójczą w dużych stężeniach. Jej zalety nie opierają się tylko na jej przeciwbakteryjnych właściwościach, lecz także na jej powinowactwie do łączenia

się z szeroką gamą substratów. Ta właściwość, znana jako substatywność, pozwala chlorheksydynie uzyskać efektywny poziom antybakteryjny, przy użyciu rozsądnej dawki (dwa razy dziennie co pozwala pacjentom zastosować się do jej używania (Addy & Moran 1997a)). W związku z wykazaną skutecznością chlorheksydyna została zawarta w różnych nośnikach do użytku wewnątrzustnego, takich jak płyny

do płukania jamy ustnej, żele, środki do czyszczenia zębów, spreje, gumy do żucia, itp.; w różnych stężeniach i w różnych preparatach, w połączeniu z innymi produktami aktywnymi lub celem uzyskania bardziej stabilnego preparatu albo zmniejszenia skutków ubocznych. Te różne produkty oparte na CHX zostały przetestowane w licznych badaniach w ciągu ostatnich dwóch dekad (Addy & Renton-Harper 1997) zapewniając podstawy dla wielu wskaźników klinicznych, gdzie chlorheksydyna jest obecnie używana. (Addy & Moran 1997b).

Jednakże, modyfikacje w preparatach zawierających chlorheksydynę mogą wpływać na jej sprawdzoną skuteczność, zatem każde z tych zmian powinno być odpowiednio przebadane. Jedną z najbardziej kontrowersyjnych zmian jest dodatek alkoholu. Dla niektórych autorów, jego obecność może być związana ze wzrostem szeregu zagrożeń takich jak nowotwór jamy ustnej (Elmore & Horwitz, 1995, Shapiro i in. 1996) i może być to przeciwwskazane u niektórych pacjentów np. tych z zapaleniem błony śluzowej, doznających naświetlania głowy i szyi, z obniżoną odpornością czy alkoholizmem (Eldridge i in. 1998). Z drugiej strony, alkohol może być istotny dla uzyskania stabilności i aktywności produktu, ponieważ może zapobiegać jego zanieczyszczeniu (Vigant i in. 1998). Ponadto, preparat zaakceptowany przez ADA (Związek Dentystów Amerykańskich - *American Dental Association*) i FDA (Agencja Żywności i Leków - *Food and Drug Administration*) zawiera 11,6% alkoholu (Mandel 1994). Zatem, nie jest obecnie jasny, ani szkodliwy, ani ochronny skutek działania alkoholu w preparatach zawierających chlorheksydynę. Dodatek innych składników aktywnych do preparatów zawierających chlorheksydynę, w celu dodatkowego bądź synergistycznego efektu, powinien być dokładnie oszacowany, ponieważ chlorheksydyna

jest wysoce kationową molekułą, a zatem reaguje z dowolną chemicznie anionową cząsteczką, powodując jej inaktywację.

Aby zbadać działanie przeciwbakteryjne produktów antyseptycznych i poznać ich możliwy zakres działania, zostały zastosowane różne testy *in vitro*. Mimo to, że wniosków z tego rodzaju badań nie można wyciągnąć dla warunków *in vivo*, to są one uważane za potężne narzędzia do celów porównawczych. Kontaktowe badania *in vitro* zostały użyte do oceny różnych środków antyseptycznych (Goldenheim 1993, D'Arcangelo & Varvara 1998). Jedną modyfikacją, Krótkoterminowy Test Unie-ruchomienia (SIKT) został opracowany przez Dentaids' Product Research Area (Sant Cugat del Valle's, Barcelona, Hiszpania), aby ocenić skuteczność *in vitro* dla substancji czynnych i różnych preparatów.

W odniesieniu do badań *in vivo*, są dostępne różne znormalizowane protokoły, aby badać skuteczność przeciw płytce nazębnej i skuteczność antybakteryjną środków antyseptycznych. Jednym z najbardziej akceptowanych modeli jest ocena liczby bakterii ślinowych po jednorazowym użyciu badanego produktu, w schemacie grup naprzemiennych (Elworthy i in. 1996, Addy i in. 1997). Metoda ta pozwala na ocenę działania przeciwbakteryjnego *in vivo* (Addy i Moran 1997a), i jest uważana za użyteczny prognostyk substancyjności (Roberts i Addy 1981a) oraz aktywności przeciw płytce nazębnej (Schiott i in. 1970).

Naszą pierwszą działającą hipotezą było to, że obecność 0.12% CHX w prawnie zastrzeżonych pły-

nach do płukania ust nie zapewnia podobnej skuteczności antybakteryjnej, ponieważ modyfikacje w preparacie mogły wpłynąć na działanie. (Addy i in. 1991, Harper i in. 1995). Obecność lub brak alkoholu może być głównym czynnikiem dla działania tych produktów. Naszą drugą hipotezą było to, że jeśli alkohol jest eliminowany z preparatu, to powinny być wykonane główne modyfikacje, takie jak wprowadzenie dodatkowego środka czynnego, aby uzyskać wysoką aktywność antybakteryjną.

Celem niniejszego badania była ocena działania antybakteryjnego, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, komercyjnych produktów do płukania jamy ustnej, które zawierają 0.12% CHX w ich składzie i również inne modyfikacje, takie jak zawartość alkoholu lub dodanie innych składników, takich jak fluorek sodu (NaF) lub chlorek cetylopirydynowy (CPC).

Materiał i metody

Omówienie: testowane produkty i negatywna kontrola

W obu badaniach, zostały przetestowane trzy komercyjne płyny do płukania jamy ustnej, zawierające 0.12% CHX, i jeden zawierający 0,12% CHX i 0,05% CPC. Sterylny roztwór soli został zastosowany jako próba kontrolna. Główne różnice w preparatach zostały pokazane w Tabeli 1.

Tabela 1. Szczegółowe dane na temat płynów do płukania jamy ustnej

Product	Formulation	Commercial name	Acronym
1	CHX 0.12%+5% alcohol	PerioAid® (Dentaids, Spain)	CHX +ALC
2	CHX 0.12%+0.05% CPC No alcohol	Perio-Aid Sin Alcohol® (Dentaids, Spain)	CHX+CPC
3	CHX 0.12%+NaF No alcohol	Cariax Gingival® (Kin SA, Spain)	CHX+NaF
4	CHX 0.12% No alcohol	Clorhexidina Lacer® (Lacer SA, Spain)	CHX

Tabela 2. Gatunki bakteryjne użyte w Krótkoterminowym Teście Unieruchomienia

Species	Source	Atmosphere	Media	Gram
<i>Streptococcus mutans</i>	NCTC-25175	aerobe	BA	GP
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC-25975	aerobe	BA	GP
<i>Streptococcus sanguis</i>	NCTC-10904	aerobe	BA	GP
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC-9811	aerobe	BA	GP
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Laboratory isolate	aerobe	TSA	GN
<i>Escherichia coli</i>	ATCC-10536	aerobe	TSA	GN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC-9027	aerobe	TSA	GN
<i>Candida albicans</i>	ATCC-10231	aerobe	TSA	GP
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	ATCC-33612	capnophilic	BA + cysteine	GN
<i>Eikenella corrodens</i>	ATCC-23834	capnophilic	BA	GN
<i>Actinobacillus actinomycetem</i>	ATCC-33384	capnophilic	BA	GN
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC-33277	anaerobe	BA	GN
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC-25611	anaerobe	BA	GN
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC-393	anaerobe	BA	GP
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC-27337	anaerobe	BA	GP
<i>Veillonella parvula</i>	NCTC-11810	anaerobe	BA	GN
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC-10953	anaerobe	BA	GN
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC-19039	anaerobe	BA	GP
<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC-33238	anaerobe	BA	GN
<i>Peptostreptococcus micros</i>	ATCC-33270	anaerobe	BA	GP

TSA: trypticase soy agar; BA: blood agar plus haemin and vitamin K; BA+cysteine: blood agar plus haemin and vitamin K, and cysteine (0.5 g/l).

Kontaktowy test *in vitro*: Krótkoterminowy Test Unieruchomienia

Gatunki bakterii

Do oceny wyselekcjonowano 20 gatunków bakterii. Bakterie te zostały wybrane mając na celu reprezentowanie różnorodnych gatunków obecnych w biofilmie. Niektóre z tych bakterii wiążą się z zapaleniem dziąseł, zapaleniem ozębnej lub próchnicą; inne są komensalne, oportunistyczne, i przypuszczalnie patogenne. Wszystkie z różnych morfotypów oraz warunki wzrostu są reprezentatywne i większość z nich należy do znanych zbiorów szczepów (patrz Tabela 2).

Test kontaktowy

Każdy szczep był niezależnie poddany działaniu. Szczepy zostały odzyskane przez hodowlę pochodną, i użyte do testu z 24-72 h hodowli. Roztwór o mętności około 10 w skali McFarlanda został przygotowany wraz z koloniami w 5 ml

roztworze jałowej soli fizjologicznej. Sto mikrolitrów tego roztworu

zostało wszczepionych do 10 ml każdego produktu testowego (cztery produkty testowe i negatywna kontrola), z czasem kontaktu równym dokładnie 1 min. W tym czasie, 1 ml każdego roztworu uległ dezaktywacji przez rozcieńczenie w 9ml uniwersalnego środka rozcieńczającego z letycyną. Następnie, zostały przeprowadzone 10-krotne rozcieńczenia, biorąc 1 ml pierwszej próbówki i mieszając to w nowej próbówce z 9 ml środka inaktywującego. 20 minutowy okres zubożniania został dozwolony do tych rozcieńczeń, przed zaszczepieniem (bulion z owczą krwią, heminą i witaminą K). Każdy szczep bakteryjny później inkubowano pod odpowiednią atmosferą i czasem. Po inkubacji, kolonie bakteryjne zliczono z najodpowiedniejszych płytek (między 30 a 300 kolonii), a rozcieńczenia serii badano na zbieżność.

Analiza danych

Liczenie bakterii dla każdego bakteryjnego szczepu i testowanego produktu zostało uzyskane w duplikacie, z dwóch zaszczepionych płytek agarowych. Z całkowitych zliczeń, liczba mikroorganizmów (CFU) i procent przeżycia bakterii w stosunku do negatywnej kontroli został obliczony.

Porównania badano stosując test jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA) dla zarówno przekształconej logarytmicznie CFU (cztery produkty testowe i negatywna kontrolna) i procentu przeżycia (cztery produkty testowe). Istotne różnice zostały zidentyfikowane za pomocą testu wielokrotnego porównania rang.

Badania *in vivo*: liczba bakterii w ślinie.

Obiekty

Dziesięciu osobników, doktoranci Szkoły Stomatologii, zgłosiło się na ochotnika do uczestniczenia w tym badaniu. Zakres ich wieku wynosił 25-40 lat, wszyscy wykazali ogólny zdrowy stan jamy ustnej i zostali wybrani po spełnieniu dwóch typów wymagań.

Wstępne kryteria badania:

- Niespożywanie antybiotyku miesiąc przed pierwszym dniem testu. Nie używanie antyseptycznego płynu do płukania ust tydzień przed i podczas badania.
- Unikanie jakichkolwiek środków zachowania higieny jamy ustnej w godzinach porannych w okresie badania.

Ochotnicy zgodzili się wykonywać następujące wskazówki podczas okresu badania:

- Unikać spożywania pokarmu i płynów (poza wodą) podczas okresu prowadzenia próby, pozwolono mieć normalne śniadanie (przed próbkowaniem bazowym) i lunch (między pobraniem próbek w 5 i 7 h).
- Unikać jakichkolwiek środków zachowania higieny jamy ustnej w okresie badań.
- Unikać spożywania gumy do żucia lub słodczy w okresie badań.

Schemat badania

Badanie było randomizowane, z podwójnie ślełą próbą (pacjenci, kierownik i pracownicy laboratoryjni), w schemacie grup naprzemiennych. Okres eliminacji pomiędzy ocenami, wynosił najmniej 1 tydzień. Każdy badany wykorzystał wszystkie testowanie produkty i negatywną kontrolę, w kolejności randomizowanej, zgodnie z listą generowaną komputerowo. Wszystkie produkty zostały ujednolicone przez czynnik zewnętrzny, w identycznych 15 ml butelkach. W czasie przeprowadzania badań, próbki śliny były uzyskiwane rano (w około 08:25). Badani zostali poproszeni o przepłukanie jamy ustnej ich przypisanym produktem, pod nadzorem, przez 1 min. Dodatkowe próbki śliny zebrano po 5 minutach, 1, 3, 5 i 7 godzinach.

Pobieranie próbek śliny

Niestymulowane próbki śliny uzyskano prosząc pacjenta o wyplucie około 1 ml śliny do cylindra miarowego. Próbkę poddano obróbce w laboratorium w ciągu 30 minut, zgodnie z powszechnymi procedurami bakteriologicznymi (wirowanie, 30 s), seryjne rozcieńczenia w PBS oraz szczepienie na dwóch seriach nieselektywnych płytkach agarowych 5% krwi końskiej (Oxoid nr 2, Oxoid Ltd., Basingstoke, Wielka Brytania) uzupełnionej o heminę (5 mg/l) i menadion (1 mg/l). Jedną serią inkubowano w powietrzu w temperaturze 37°C przez 24 h, a

Tabela 3. CFU, oceniony przez Krótkoterminowy Test Unieruchomienia, dla 20 gatunków bakterii i czterech preparatów CHX; zliczenia niższe niż 30 kolonii w pierwszym rozcieńczeniu lub próbki nie zliczane uznano za <100 CFU

Species	Source	Atmosphere	Media	Gram
<i>Streptococcus mutans</i>	NCTC-25175	aerobe	BA	GP
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC-25975	aerobe	BA	GP
<i>Streptococcus sanguis</i>	NCTC-10904	aerobe	BA	GP
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC-9811	aerobe	BA	GP
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Laboratory isolate	aerobe	TSA	GN
<i>Escherichia coli</i>	ATCC-10536	aerobe	TSA	GN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC-9027	aerobe	TSA	GN
<i>Candida albicans</i>	ATCC-10231	aerobe	TSA	GP
<i>Campylobacter sputigena</i>	ATCC-33612	capnophilic	BA+cysteine	GN
<i>Eikenella corrodens</i>	ATCC-23834	capnophilic	BA	GN
<i>Actinobacillus actinomycetem</i>	ATCC-33384	capnophilic	BA	GN
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC-33277	anaerobe	BA	GN
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC-25611	anaerobe	BA	GN
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC-393	anaerobe	BA	GP
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC-27337	anaerobe	BA	GP
<i>Veillonella parvula</i>	NCTC-11810	anaerobe	BA	GN
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC-10953	anaerobe	BA	GN
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC-19039	anaerobe	BA	GP
<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC-33238	anaerobe	BA	GN
<i>Peptostreptococcus micros</i>	ATCC-33270	anaerobe	BA	GP

TSA: trypticase soy agar; BA: blood agar plus haemin and vitamin K; BA+cysteine: blood agar plus haemin and vitamin K, and cysteine (0.5 g/l).

Tabela 4. Procent przeżycia bakterii w porównaniu z próbą kontrolną, oceniane przez Krótkoterminowy Test Unieruchomienia do opornych szczepów bakterii w 4 preparatów z CHX. Unieruchomienia zdefiniowano jako $\geq 99,9\%$ spadku CFU

	CHX+ALC (%)	CHX+NaF (%)	CHX+CPC (%)	CHX (%)
<i>S. mutans</i>	0.00	0.02	0.00	0.01
<i>S. mitis</i>	0.74	7.32	0.00	27.37
<i>E. coli</i>	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>E. corrodens</i>	0.00	0.11	0.00	0.00
<i>C. sputigena</i>	0.00	6.84	0.00	0.00
<i>A. naeslundii</i>	0.00	0.00	0.00	9.00
<i>L. casei</i>	0.59	84.11	0.00	18.36
<i>V. parvula</i>	0.00	10.08	0.00	0.09
<i>P. micros</i>	24.55	81.37	0.00	73.70

drugą w warunkach beztlenowych przez 48 godzin. Po upływie czasu inkubacji, zliczanie prowadzono w najbardziej odpowiednich płytek (te z 30-300 kolonii).

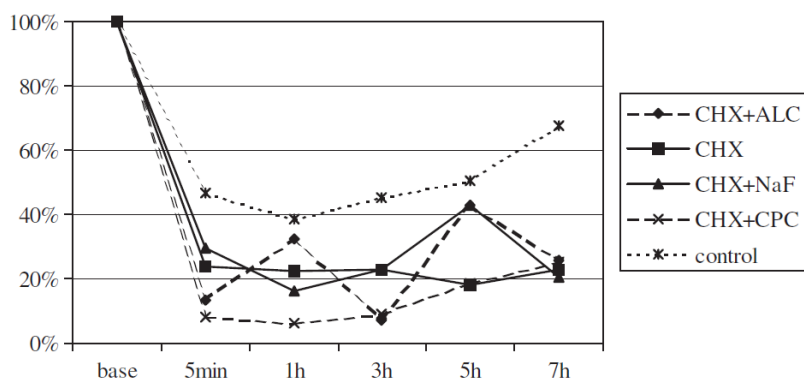
Analiza danych

Całkowita liczba bakterii, dla każdej próbki zależnej od czasu i produktu, jest dostępna dla tlenowych i beztlenowych zliczeń od 10 pacjentów. Transformowane logarytmicznie CFU były obliczane w celu uzyskania rozkładu normalnego. Procent przeżycia obliczono przez podzielenie wartości CFU w każdym czasie próbkowania poprzez CFU na początku badania.

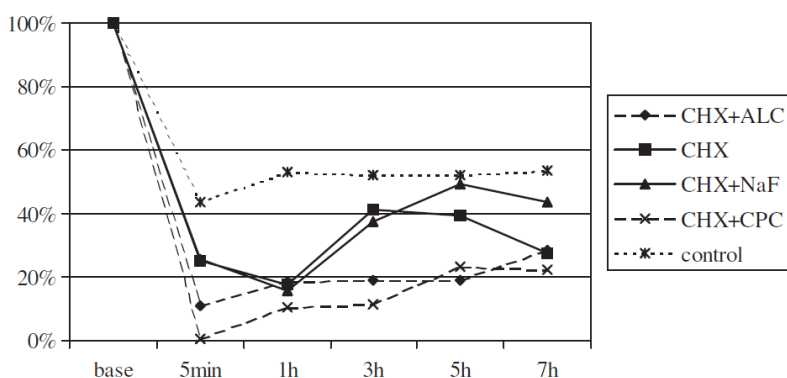
Jednokierunkowy test ANOVA został przeprowadzony w każdym czasie pobierania próbek dla okre-

ślenia, czy istnieją istotne różnice między odsetkiem przetrwania dla różnych testowanych produktów. Test wielokrotnego porównania rang był używany do identyfikacji różnic wykrytych przez poprzedni test.

Dodatkowo, test T-studenta dla prób zależnych zastosowano do porównania każdego produktu z próbą kontrolną (cztery porównania) oraz porównania dwóch najlepszych preparatów z dwoma najgorszymi (cztery porównania). Wybrane poziomy istotności, $p < 0,01$ i $p < 0,05$, zostały skorygowane dla wielokrotnych porównań (korekcji Bonferroni).



Rys. 1 Średni odsetek przeżywalności beztlenowych bakterii ślinowych w każdym czasie pobierania próbek i dla każdego ocenianego produktu



Rys. 2 Średni odsetek przeżywalności beztlenowych bakterii ślinowych w każdym czasie pobierania próbek i dla każdego ocenianego produktu

Wyniki

Kontaktowy test *in vitro*: Krótko-terminowy Test Unieruchomienia

Kontrola jakości w tym teście *in vitro* wykazana przez ocenę liczby bakterii znalezionych w płytkach kontrolnych (ponad 106, z wyjątkiem *E. coli*, która była zbliżona do tej wartości); oraz stopień zgodności pomiędzy dwoma analogicznymi próbkami (nie wykryto statystycznie istotnych różnic, zarówno dla CFU czy odsetkiem przeżycia pomiędzy próbkami).

CFU dla każdego gatunku bakterii i każdego produktu przedstawiono w Tabeli 3. Istotne różnice w liczbie bakterii zostały wykryte ($F=34.49$, $p<0.001$). Te różnice zostały zidentyfikowane pomiędzy kontrolą i czterema testowanymi produktami, oraz pomiędzy preparatem zawierającym CHX + CPC oraz tym z CHX + NaF i z chlorhek-

sydyną. Jednakże, nie zostały wykryte żadne istotne różnice odnośnie odsetku przeżycia dla czterech testowanych produktów ($F=1.62$, $p=0.191$) (patrz Tabela 4). Produkt CHX + CPC wykazał brak oporności bakterii. Żaden z badanych gatunków nie przetrwał (0/20 do 0%).

Produkt CHX + ALC (03/20, 15%) wykazał pewien poziom oporności dla trzech gatunków bakterii: *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mitis* i *Micros Peptostreptococcus*. Dla pierwszych dwóch gatunków poziom przeżycia był niski (mniej niż 1%), podczas gdy *P. Micros* wykazał około 25% przeżycia.

Preparat zawierający CHX bez dodatku alkoholu (6/20; 30%) nie był również w stanie powstrzymać wzrostu trzech wspomnianych gatunków; jednakże, procent przeżycia był znacznie wyższy. Dodatkowo trzy nowe gatunki (*Strepto-*

coccus mutans, *Veillonella parvula* i *Actinomyces naeslundii*) były odporne na ten produkt.

Na koniec, preparat z CHX + NaF (7/20, 35%) uzyskał podobny poziom oporności jak CHX bez alkoholu, chociaż został zaobserwowany wzrost procentu przeżycia dla większości opornych gatunków. Jednakże nie stwierdzono oporności na *A. naeslundii* i dwa gatunki bakterii wymagających większego stężenia dwutlenku węgla (*Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens*).

Badania *in vivo*: Liczba bakterii ślinowych

Wyniki były dostępne zarówno dla bakterii tlenowych i beztlenowych w ślinie.

Dla bakterii tlenowych (patrz Rys. 1), odsetek przeżycia w 5 minucie wykazał znaczące różnice pomiędzy pięcioma testowanymi produktami ($F=3.45$, $p=0.01$). Różnice te odpowiadają znacznie niższemu poziomowi przeżycia bakterii w CHX + CPC i CHX + ALC w porównaniu z próbą kontrolną.

Różnice w odsetku przeżycia w 1 h nie osiągnęły poziomu istotności ($F=2.34$, $p=0.07$), chociaż test wykrył istotnie niższy odsetek przeżycia dla CHX + CPC porównaniu do próby kontrolnej i CHX + ALC. W 3 godziny, znaczące różnice ponownie zostały obserwowane ($F=3.72$, $p=0.01$), a różnice te były związane z niższym procentem CHX + ALC, CHX + CPC i CHX + NaF w porównaniu z próbą kontrolną. W 5 h, znaczące różnice były wciąż wykrywane ($F=3.06$, $p=0.03$), odpowiadając niższemu procentowi przeżycia z CHX + CPC i CHX + ALC w porównaniu z próbą kontrolną. W czasie tego pobierania próbek, znaczące różnice zaobserwowano również między CHX + CPC w porównaniu do CHX + NaF i CHX. W ostatnim pobraniu, w 7 h, wszystkie cztery badane produkty wykazały znaczą-

ce różnice ($F=4.89$, $p=0.003$) w porównaniu z próbą kontrolną.

Odnosnie do sparowanych porównań z próbą kontrolną CHX + CPC wykazał znaczące zmniejszenia w każdym czasie pobierania próbek (5 min i 3 h, $p<0.05$; 1, 5 i 7 h, $p<0.01$). Jednak pozostałe trzy badane produkty osiągnęły tylko poziom istotności w jednym czasie próbkowania (CHX + ALC w 7 h, $p<0.05$; CHX + NaF w 1 h, $p=0.01$; CHX w 5 h, $p<0.01$). Gdy porównania przeprowadzono pomiędzy produktami, jedyną istotną różnicę stwierdzono po 1 godzinie, gdy CHX + CPC porównano z CHX + NaF i CHX + ALC ($p<0.05$).

Dla bakterii beztlenowych (Rys. 2), w czasie pobierania próbek w 5 min nie wykryto istotnych różnic ($F=5.85$, $p=0.0008$), wskazując, że CHX + CPC był lepszy niż CHX + NaF, CHX i próba kontrolna. CHX + ALC tylko wykazał istotne różnice w porównaniu z próbą kontrolną.

W 1 h, znaczące różnice zostały ponownie wykazane ($F=7.06$, $p<0.0002$), związane z mniejszym procentem przeżycia dla czterech badanych produktów w porównaniu z próbą kontrolną. W 3 h, CHX + CPC wykazał znacząco mniejszy procent przeżycia niż CHX + NaF, CHX i próba kontrolna. CHX + ALC wykazał również znacznie niższy odsetek przeżycia w porównaniu z CHX i próbą kontrolną ($F=4.40$, $p<0.005$). Podobne wyniki zaobserwowano w 5 h ($F=3.42$, $p=0.01$), co odpowiada znacznie niższej wartości dla CHX + CPC i CHX + ALC, w porównaniu z CHX + NaF i próbą kontrolną. Wreszcie, w 7 h nie wykryto żadnych różnic wśród badanych produktów ($F=1.19$, $p=0.33$).

Sparowane porównania z próbą kontrolną wykazały istotne różnice dla CHX + CPC i CHX + ALC do 5 h (CHX + CPC, $p\leq 0.01$; CHX + ALC, $p\leq 0.01$, z wyjątkiem w 5 min, $p<0.05$). CHX ($p<0.05$) i CHX + NaF ($p=0.01$) wykazały tylko istotne różnice w porównaniu z próbą kontrolną w 1 h. W odniesieniu do sparowanego porównania pomię-

dzy testowanymi produktami CHX + CPC był lepszy niż CHX + NaF dla 5 min ($p<0.01$) i dla 5 h ($p<0.05$) i lepszy niż CHX dla 5 min ($p<0.01$) i 3 h ($p=0.05$). CHX + ALC był lepszy niż CHX + NaF w 5 min ($p<0.05$).

Dyskusja

Wyniki tego badania wyraźnie wskazują, że różne produkty do płukania jamy ustnej zawierające tę samą substancję czynną (0,12% CHX), ale o innym składzie, wykazały znaczne różnice w ich działaniu przeciwko drobnoustrojom, zarówno w testach *in vitro* jak i *in vivo*, z preferencją dla preparatu CHX z dodatkiem alkoholu. Ponadto wykluczenie alkoholu wraz z zmianą składu obejmującą dodanie innego środka antyseptycznego, CPC, w znacznym stopniu wynagrodziła zmiany, proponując jeszcze bardziej aktywny preparat (CHX + CPC). Chociaż wpływ innych składników preparatu nie może zostać odrzucony, to logiczne jest, aby wierzyć, że dodanie lub likwidacja alkoholu, fluorku sodu lub chlorku cetylopi-rydyniowego powinno być w dużej mierze odpowiedzialne za zaobserwowane różnice w aktywności przeciwbakteryjnej. Wykazanie tych różnic było wspomagane przez dwa różne badania: jedno *in vitro*, nowo opracowany Krótkoterminowy Test Unieruchomienia, a inne badania oparte na *in vivo*, oceniające wpływ badanego produktu na liczbę bakterii w ślinie, postępowały według znanego projektu badań.

Kontaktowy test *in vitro*: Krótkoterminowy Test Unieruchomienia

Zastosowany Krótkoterminowy Test Unieruchomienia jest modyfikacją standardowych testów kontaktowych, które zostały wykorzystane do określenia czasu unieruchomienia chlorheksydyny, w środkach płuczających do kanałów korzeniowych (D'Arcangelo & Varvara, 1998), w postaci roztworów lub kremów do miejscowym czyszcze-

niu (takich jak w leczeniu ran lub w środkach antyseptycznych) (Goldenheim 1993), lub w płynach do płukania jamy ustnej (Wilson i in. 1990). Jednak, czas kontaktu powinien być krótszy dla płynów do płukania jamy ustnej, ponieważ zwykle czas kontaktu tych produktów w jamie ustnej wynosi około 1 min.

Ten test *in vitro* został zatwierdzony do powtarzania i reproduktywności przez Wydziały Mikrobiologiczne Dentaïd SL (Sant Cugat del Valle's, Hiszpania) i Uniwersytet autonomiczny w Barcelonie (Barcelona, Hiszpania). W czasie niniejszego badania ważność każdego testu *in vitro* opierała się na wykorzystanych kontrolach jakości: obecności reprezentatywnej części inokulum na płytkach kontrolnych; logicznemu rozmieszczeniu liczby bakterii w każdej próbce rozcieńczenia; i podobieństwu wyników dla dwóch serii płytek stosowanych w każdym teście. Jeśli którykolwiek z tych kryteriów nie został osiągnięty, test był wtedy powtarzany.

Z 20 ocenianych gatunków bakteryjnych osiem wykazało oporność na chlorheksydynę w testach *in vitro*, w co najmniej jednym z tych produktów. Żaden gatunek nie był odporny na działanie produktu z CHX + CPC. Z ośmiu odpornych gatunków, trzy były również odporne na pozostałe trzy testowane produkty, *L. casei*-, *S. mitis* i *P. Micros*. *L. casei* została zgłoszona jako gatunek najbardziej odporny na chlorheksydynę w modelu hodowli przepływowej (chemostat) w porównaniu z ośmioma innymi gatunkami bakterii (McDermid i in. 1987). *S. mitis* również podaje się jako jedną z najmniej wrażliwych bakterii w badaniu w rozcieńczonym agarze w Corsodyls® (0.2% chlorheksydyny) (Wade i Addy 1989). Jeśli chodzi o *P. Micros*, badania wrażliwości *in vitro* wykazały wartość MIC równą 62 µg/ml, jednakże, nie jest on jednym z najbardziej odpornych szczepów (Stanley i in. 1989). Można wysnuć hipotezę, że chlorheksy-

dyna nie jest bardzo skuteczna wobec tych gatunków bakteryjnych, a dodatek CPC może rozszerzyć jej spektrum działania, ponieważ produkt CHX + CPC był jedynym, który działa całkowicie przeciwko tym bakteriom.

S. mutans i *V. parvula* również wykazały oporność na dwa badane produkty, podczas gdy *A. naeslundii*, *C. sputigena* i *E. corrodens* wykazały pewien stopień oporności na jeden z produktów. Znalezienie *C. sputigena* nie jest zaskakujące, ponieważ badania w rozcieńczonym agarze uznały *Capnocytophaga spp.* jako jedną z najmniej wrażliwych na chlorheksydynę (Stanley i in., 1989, Wade i Addy 1989). Oporności te mogą być związane z brakiem alkoholu w preparatach (niewzbogacone poprzez dodanie innych składników aktywnych takich jak CPC), obecność anionowych fluorków, które mogą wpływać na działanie chlorheksydyny, takie jak fluorek sodu, lub inne mniej odpowiednie lub nieznanne zmiany w preparatach.

Test in vivo: Liczba bakterii ślinowych

W teście *in vivo*, użytym w obecnym badaniu, zastosowano znaną konstrukcję, użytą po raz pierwszy na początku 1970 roku przez Schiottiego i in. (1970) w płynach do płukania jamy ustnej zawierających chlorheksydynę. Projekt tego badania pozwala, aby porównania były wykonane z wielkości aktywności antybakteryjnej w ślinie dowolnego preparatu do płukania jamy ustnej. Mierzy to zarówno działanie przeciwbakteryjne *in vivo* i trwałość tego efektu (Jenkins i in. 1994). Dlatego jest on uważany za użyteczny test do oceny substancyjności (Schiott i in. 1970) i hamowania właściwości płytki nazębnej (Roberts & Addy 1981a).

Szczególnie Addy i in. szeroko korzystali w literaturze z tego projektu badań, chociaż można znaleźć niewielkie modyfikacje w różnych publikacjach. Pierwsza próbka płu-

kania jest zazwyczaj zebrana po 30 min (Addy i in. 1991, Jenkins i in. 1991, Harper i in., 1995, Moran i in., 1995, Elworthy i in., 1996, Addy i in. 1997); jednakże, w tym badaniu wybraliśmy już okres 5 min, aby ocenić natychmiastowy efekt płukania. Metodologia bakteriologiczna również może się różnić i to też może mieć wpływ na wyniki. W większości badań ocenia się wyłącznie bakterie beztlenowe (Addy i in. 1991, Jenkins i in. 1991, Harper i in., 1995, Moran i in., 1995, Elworthy i in., 1996, Addy i in. 1997); jednakże dodanie bakterii tlenowych może dostarczyć cennych informacji do wyników, jak przedstawiono w niniejszym i w innych badaniach (Moran i in. 1988). Czas inkubacji wykazuje również pewną zmienność. W jednym badaniu stosuje się okres 12 h beztlenowej inkubacji (Addy i in., 1997), podczas gdy inne wydłużają ten okres do 72 godzin (Elworthy i in., 1996, Harper i in., 1995). Najczęstszy okresu inkubacji, i także stosowany w tym badaniu to: 48 h (Moran i in. 1988, Jenkins i in. 1990, Addy i in. 1991, Moran i in. 1995). Dla inkubacji tlenowej, użyto okresu 24 h (Moran i in. 1988).

Pomimo, że może się wydawać niewystarczające wykorzystanie 10 pacjentów dla próbki, to użycie schematu grup naprzemiennych pozwala na wielokrotne porównania produktów wykorzystujących tych samych pacjentów. W konstrukcji tego typu badań, dwukrotna (Addy i in. 1991, Elworthy i in. 1996) lub trzykrotna (Harper i in. 1995, Addy i in. 1997) liczba zabiegów daje niezbędną liczbę osób. Podobne badania obejmują również 10 osób, jedna do oceny dzielnictwa grup badanych (Moran et al. 1988) i pozostałe cztery grupy badane chlorheksydyną oraz grupa kontrolna (Addy i in., 1991).

Porównując różne preparaty z CHX i oszacowując ich antybakteryjną skuteczność, jeden z preparatów z 0,1% CHX (Eludril®) wykazał bardzo ograniczony skutek w 1 h, podobny do próby kontrolnej (Ad-

dyet i in., 1991). Inne badanie, zawierało cztery preparaty z CHX, oceniające różne handlowe płyny do płukania we Francji (Harper i in., 1995). Okazało się, że dwa spośród tych produktów o zawartości 0,2% CHX (Hibidents®) i 0,12% CHX (Prexidine®), osiągnęły najlepsze wyniki, w porównaniu z 0,12% CHX (Parodex®). Czwarte płukanie 0,1% CHX, wykazało bardzo ograniczony wpływ porównywalny z preparatami o zawartości 0,2% chlorheksydyny lub 0,005% CPC. Wyniki te zostały wyjaśnione przez różnice w składzie, a nie przez różnice w stężeniu CHX, ponieważ zmiana składu produktu przy użyciu tego samego stężenia wyraźnie poprawiła wyniki (Addy i in., 1991). Wyniki tych badań doprowadziły do jednoznacznego wniosku: " że jest niebezpiecznym przyjąć skuteczność jedynie na podstawie obecności znanego środka w preparacie " (Harper i in. 1995). To stwierdzenie jest całkowicie zgodne z wynikami niniejszego badania.

Skład płynów do płukania jamy ustnej

Obecność alkoholu w preparacie do płukania jamy ustnej jest tematem oznaczonym, jako kontrowersyjny. Z jednej strony, ich obecność może być związana z pewnymi problemami, takich jak hipotetyczny wzrost ryzyka nowotworu jamy ustnej (Elmore & Horwitz 1995, Shapiro i in. 1996); jednak, jeśli ryzyko rzeczywiście istnieje, to byłoby związane ze stężeniami powyżej 25% i przy długotrwałym, codziennym stosowaniu (Winn i in. 1991). Również został zgłoszony związek z bezpośrednim bólem w jamie ustnej, jednak tylko w produktach, których stężenie alkoholu jest wyższe niż 10% (Bolanowski i in. 1995). Dodatkowo, liczba uwag wskazań do wykorzystania płynów do płukania jamy ustnej zawierających alkohol, takich jak pacjentów z obniżoną odpornością, naświetlanych pacjentów chorych

na nowotwór głowy bądź szyi, pacjentów z zapaleniem błon śluzowych lub uczulonych na alkohol, jak i rodzin z małymi dziećmi (Eldridge i in., 1998). Etanol może również przyczynić się do zmiękczenia powierzchni i zwiększenia zużycia żywic oraz wypełnień kompozytowych (Eldridge i in., 1998). Z drugiej strony, alkohol jest wykorzystywany jako nośnik do rozpuszczania i stabilizacji innych składników czynnych, oraz jako sam środek antyseptyczny. Może to być ważne dla stabilności preparatu, i zapobiegania zanieczyszczenia krzyżowego. To doprowadziło niektórych autorów do stwierdzenia: "chlorheksydyna bez zawartości alkoholu nie powinna być stosowana jako środek antyseptyczny" (Vigeant i in., 1998).

Eldridge i in. (1998) podali, że płyn do płukania jamy ustnej o 0,12% CHX nie zawierający alkoholu był tak samo skuteczny jak handlowy preparat o 0,12% CHX z zawartością alkoholu (Peridex®). Projektem badania był projekt eksperymentalnego zapalenia dziąseł w ciągu 21 dni bez higieny mechanicznej w trzech równoległych grupach, w każdej po siedmiu pacjentów (druga grupa stosowała olejek eteryczny do płukania ust; nie zastosowano negatywnej grupy kontrolnej). Różnice między CHX, a olejkiem eterycznym zostały wykryte w odniesieniu do wskaźnika płytki nazębnej i poziomie *S. mutans* na języku (test paskowy), ale nie stwierdzono różnic między dwoma produktami CHX. Z innych badań (Arweiler i in., 2001) wynioskowano, że 0,1% CHX bez dodatku alkoholu był bardziej skuteczny w zmniejszaniu ilości kamienia nazębnego i jego żywotności w 4-dniowym odrastania płytki nazębnej, ale wniosek należy interpretować ostrożnie, ponieważ wymieniony produkt był pozytywną próbą kontrolną w badaniu z innym celem, i żaden inny produkt CHX nie został uwzględniony w projekcie, aby umożliwić właściwe porównania. W niniejszym badaniu,

preparaty bez alkoholu były mniej skuteczne, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, z wyjątkiem produktu ze zmienionym składem, w który dodano do preparatu CPC.

CPC jest czwartorzędomy związek amoniowy, opracowanym w produktach handlowych, jako jedyny składnik aktywny w stężeniu 0,05% lub 0,1% (Mandel 1994). Jest mniej aktywny niż CHX i wykazuje mniejszą substancyjność pomiędzy 180 i 300 min. (Roberts i Addy 1981b). Jego skład wydaje się wpływać w mniejszym stopniu poprzez obecność alkoholu lub innych substancji, takich jak fluorek sodu (Elworthy i in. 1996). Jego kombinacja z CHX może umożliwiać efekt synergistyczny, poprzez rozszerzenie spektrum działania chlorheksydyny, albo poprzez zwiększenie jej aktywności przeciwbakteryjnej, jak wykazano w tej pracy.

Podsumowując, biorąc pod uwagę wyniki, zarówno w testach *in vitro* i *in vivo*, okazuje się, że produkt CHX + ALC wykazywał wyższą aktywność przeciwbakteryjną w porównaniu z preparatami z CHX + NaF i CHX bez alkoholu. Jeśli alkohol jest wykluczony z preparatu, to zmiana składu i dodanie dodatkowego środka antyseptycznego, takiego jak CPC, może nie tylko wyrównywać lecz raczej zwiększać aktywność przeciwbakteryjną produktu.

Pomimo niewielkiej liczby badanych szczepów w innych testach kontaktowych, użycie 20 wybranych gatunków bakterii wydaje się być konieczne, aby odpowiednio ocenić antybakteryjne działanie preparatów w trakcie ich opracowywania i w handlowo dostępnych produktach. Wyniki uzyskane w całkowitych zaliczeniach ślinowych w teście *in vivo* używane w niniejszym badaniu, nie dają żadnej informacji o przeżyciu poszczególnych gatunków bakterii, ale zaskakująco wysoki stopień przeżywalności zaobserwowano w przypadku gatunku *P. Micros* w trzech z czterech testowanych produktów w testach *in vitro*, dla-

tego wymaga się dalszych szczegółowych prac przed ekstrapolacją na warunkach *in vivo*, które mogą być wykonane. Wyniki obu testów zgadzają się, czyniąc Test krótko-terminowego Unieruchomienia dobrym narzędziem do rozwoju i porównania produktów do higieny jamy ustnej.

W ograniczeniach badań *in vitro* i *in vivo*, można stwierdzić, że różne preparaty do płukania jamy ustnej, oparte na substancji czynnej o dobrze udokumentowanym działaniu przeciwbakteryjnym (takie jak zawartość 0,12% chlorheksydyny) nie wykazują podobnego stopnia aktywności. Różnice te mogą być związane z brakiem alkoholu bądź z innymi różnicami w składzie (takie jak wtrącenie fluorku sodu, który może kolidować z aktywnością chlorheksydyny; bądź przeciwnie, dodatek CPC, który może zapewnić synergistyczny efekt z chlorheksydyną) lub innych nieznanymi czynnikami związanymi z całym składem tych produktów handlowych.

Bibliografia

- Addy, M., Greenman, J., Renton-Harper, P., Newcombe, R. & Doherty, F. M. (1997) Studies on stannous fluoride toothpaste and gel. (2). Effects on salivary bacterial counts and plaque regrowth *in vivo*. *Journal of Clinical Periodontology* 24, 86–91.
- Addy, M., Jenkins, S. & Newcombe, R. (1991) The effect of some chlorhexidine-containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *Journal of Clinical Periodontology* 18, 90–93.
- Addy, M. & Moran, J. (1997a) Evaluation of oral hygiene products: science is true; don't be misled by the facts. *Periodontology* 20015, 40–51.
- Addy, M. & Moran, J. (1997b) Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. *Periodontology* 2000 15, 52–54.
- Addy, M. & Renton-Harper, P. (1997) The role of antiseptic in secondary prevention. In: *Proceedings of the 2nd European Workshop on Periodontology. Chemicals in Periodontics*, eds. Lang, N. P., Karring, T. & Lindhe, J., pp 152–173. Berlin: Quintessence Books.
- Arweiler, N. B., Netuschil, L. & Reich, E. (2001) Alcohol-free mouthrinse solutions reduce supragingival plaque regrowth and vitality. A controlled clinical study. *Journal of Clinical Periodontology* 28, 168–174.
- Bolanowski, S. J., Gescheider, G. A. & Sutton, S. V. (1995) Relationship between oral pain and ethanol concentration in mouthrinses. *Journal of Periodontal Research* 30, 192–197.
- D'Arcangelo, C. & Varvara, G. (1998) A comparative *in-vitro* study of the bactericidal efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexi-

- dine gluconate plus cetrimide on root canal anaerobic bacterial flora. *Minerva Stomatologica* 47, 381–386.
- Eldridge, K. R., Finnie, S. F., Stephens, J. A., Mauad, A. M., Munoz, C. A. & Kettering, J. D. (1998) Efficacy of an alcohol-free chlorhexidine mouthrinse as an antimicrobial agent. *Journal of Prosthetic Dentistry* 80, 685–690.
- Elmore, J. G. & Horwitz, R. I. (1995) Oral cancer and mouthwash use: evaluation of the epidemiologic evidence. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery* 113, 253–261.
- Elworthy, A., Greenman, J., Doherty, F. M., Newcombe, R. G. & Addy, M. (1996) The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *Journal of Periodontology* 67, 572–576.
- Goldenheim, P. D. (1993) In vitro efficacy of povidone-iodine solution and cream against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Postgraduate Medical Journal* 69 (Suppl 3), S62–S65.
- Harper, P. R., Milsom, S., Wade, W., Addy, M., Moran, J. & Newcombe, R. G. (1995) An approach to efficacy screening of mouthrinses: studies on a group of French products (II). Inhibition of salivary bacteria and plaque in vivo. *Journal of Clinical Periodontology* 22, 723–727.
- Jenkins, S., Addy, M. & Newcombe, R. (1990) The effect of triclosan, stannous fluoride and chlorhexidine products on: (II) salivary bacterial counts. *Journal of Clinical Periodontology* 17, 698–701.
- Jenkins, S., Addy, M. & Newcombe, R. (1991) Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthwashes (I). Effects on salivary bacterial counts. *Journal of Clinical Periodontology* 18, 140–144.
- Jenkins, S., Addy, M., Wade, W. & Newcombe, R. G. (1994) The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *Journal of Clinical Periodontology* 21, 397–401.
- Jones, C. G. (1997) Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology* 2000 15, 55–62.
- Mandel, I. D. (1994) Antimicrobial mouthrinses: overview and update. *Journal of the American Dental Association* 125 (Suppl 2), 2S–10S.
- McDermid, A. S., McKee, A. S. & Marsh, P. D. (1987) A mixed-culture chemostat system to predict the effect of anti-microbial agents on the oral flora: preliminary studies using chlorhexidine. *Journal of Dental Research* 66, 1315–1320.
- Moran, J., Addy, M. & Newcombe, R. (1988) The antibacterial effect of toothpastes on the salivary flora. *Journal of Clinical Periodontology* 15, 193–199.
- Moran, J., Addy, M., Wade, W., Milson, S., McAndrew, R. & Newcombe, R. G. (1995) The effect of oxidising mouthrinses compared with chlorhexidine on salivary bacterial counts and plaque regrowth. *Journal of Clinical Periodontology* 22, 750–755.
- Roberts, W. R. & Addy, M. (1981a) Comparison of in vitro and in vivo antibacterial properties of antiseptic mouth rinses containing chlorhexidine, alexidine, CPC and hexetidine. Relevance to mode of action. *Journal of Clinical Periodontology* 8, 295–310.
- Roberts, W. R. & Addy, M. (1981b) Comparison of the bisbiguanide antiseptic alexidine and chlorhexidine. I. Effect on plaque accumulation and salivary bacteria. *Journal of Clinical Periodontology* 8, 213–219.
- Schiotte, C., Loe, H., Jensen, S. B., Kilian, M., Davies, K. M. & Glavind, K. (1970) The effect of chlorhexidine mouthrinse on the human oral flora. *Journal of Periodontal Research* 5, 84–89.
- Shapiro, S., Castellana, J. V. & Sprafka, J. M. (1996) Alcohol-containing mouthwashes and oropharyngeal cancer: a spurious association due to underascertainment of confounders? *American Journal of Epidemiology* 144, 1091–1095.
- Stanley, A., Wilson, M. & Newman, H. N. (1989) The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *Journal of Clinical Periodontology* 16, 259–264.
- Vigeant, P., Loo, V. G., Bertrand, C., Dixon, C., Hollis, R., Pfaller, M. A., McLean, A. P., Briedis, D. J., Perl, T. M. & Robson, H. G. (1998) An outbreak of *Serratia marcescens* infections related to contaminated chlorhexidine. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 19, 791–794.
- Wade, W. G. & Addy, M. (1989) In vitro activity of a chlorhexidine-containing mouthwash against subgingival bacteria. *Journal of Periodontology* 60, 521–525.
- Wilson, M., Bansal, G., Stanley, A. & Newman, H. N. (1990) Susceptibility of oral bacteria to phenoxyethanol and phenoxyethanol/chlorhexidine combinations. *Journal of Periodontology* 61, 536–541.
- Winn, D. M., Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Preston-Martin, S., Schoenberg, J. B. & Fraumeni, J. F., Jr. (1991) Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research* 51, 3044–3047.

Address:
Mariano Sanz (Att. David Herrera)
Faculty of Odontology
Universidad Complutense
Plaza. Ramo'n y Cajal, s/n
28040 Madrid
Spain
Fax: 34-91-394-19-10
e-mail: dhg2587@teleline.es

Tłumaczenie:
Dentaid Polska

Wyłączny dystrybutor:

Bałtycki Instytut Stomatologii Sp. z o.o. SK
Ul. Jaśkowa Dolina 57
80-286 Gdańsk
Tel.: +48 58 345 39 71



Bałtycki Instytut Stomatologii Sp. z o.o. SK
Ul. Jaškowa Dolina 57
80-286 Gdańsk
Tel.: +48 58 345 39 71

wyłączny dystrybutor:



www.dentaidpolska.pl
www.sklep.dentaidpolska.pl
www.facebook.com/DentaidPolska