

## Компаративна анализа на ефикасноста на две антимиڪробни средства во редуڪцијата на кариогените микроорганизми во плунката

Александар Димков\* д-р сци., научен соработник [dimkovaleksandar@gmail.com](mailto:dimkovaleksandar@gmail.com); Никола Пановски\*\* д-р сци., професор, [pannovskin@yahoo.com](mailto:pannovskin@yahoo.com); Елизабета Ѓоргиевска\* д-р сци., професор, [elizabetag2000@yahoo.com](mailto:elizabetag2000@yahoo.com); Марија Стевановиќ\* д-р сци., професор, [majastevanovic@hotmail.com](mailto:majastevanovic@hotmail.com)

\*Катедра за детска и превентивна стоматологија, Стоматолошки факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје

\*\*Институт за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје

**Автор за кореспонденција:** Александар Димков, [dimkovaleksandar@gmail.com](mailto:dimkovaleksandar@gmail.com), 070341551

### Апстракт

Целта на овој труд е да се утврди квантитативната застапеност на *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus species* во плунката пред и по плакнењето на устата со плакначот за уста кој содржи активна антимиڪробна супстанција - cetylpyridinium chloride, и со 3% водородпероксид; одредување на степенот на разлики во редуڪцијата на кариогените микроорганизми во плунката; како и меѓусебна споредба на двете средства во однос на нивната ефикасност. За реализирање на поставената цел користевме плакнач за уста со антимиڪробно соединение СРС и 3% официнално приготвен водородпероксид. Анализите беа спроведени врз група од 24 испитаници на возраст од 9-13 години од двата пола. Примероците од плунка беа земани пред, и 20 минути по плакнењето на устата, во утринските часови, без претходно спроведена орална хигиена најмалку 12 часа. Квантитативната застапеност на *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus species* беше одредена со комерцијално набавени стрипови CRT bacteria, Ivoclar-Vivadent, Schaan – Liechtenstein. За одредување на степенот на разлики во редуڪцијата на кариогените микроорганизми во плунката беа користени стандардните статистички методи, а резултатите од меѓусебната споредба на испитаните средства во однос на нивната ефикасност во редуڪцијата на кариогените бактерии беше направена со Вилкоксоновиот тест на еквивалентни парови со ниво на значајност од  $p = 0,05$ . Кај сите испитаници постоеше сигнификантно намалување на бројот на кариогените микроорганизми. Статистичката анализа на разликите на вредностите за *Streptococcus mutans* и за *Lactobacillus species* покажа сигнификантно многу поголема ефикасност на цетилпиридиумхлоридот во однос на 3% водородпероксид. Од добиените резултати се заклучува дека дејството на двете средства е посилено изразено врз бактеријата *Streptococcus mutans* отколку врз бактеријата *Lactobacillus species*.

**Клучни зборови:** дентален кариес, антимиڪробни средства, водородпероксид, цетилпиридиумхлорид, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus species*

## Увод

Без микроорганизми нема дентален кариес. Ова е општо прифатено мислење коешто се темели врз голем број научно докажани факти. Одредени микроорганизми од усната празнина можат да предизвикаат експериментален дентален кариес во *in vitro* услови; експериментални животни одгледани во стерилни услови, и покрај кариогената диета, не заболуваат од кариес; од кариозната лезија можат да се изолираат одредени бактерии кои хистолошки и микробиолошки можат да се докажат во кариозниот емајл, дентинот и во дентинските каналчиња.

Фактот дека микроорганизмите претставуваат еден од најбитните фактори во етиологијата на денталниот кариес, го наметнува прашањето на нивна елиминација или сведување на минимални вредности. Притоа, важен предуслов е типолошката и бројната верификација на микроорганизмите, а главен фактор во борбата со нив е одржувањето на оралната хигиена.

Современите механички и хемотерапевтски пристапи за оралната хигиена имаат за цел да ја променат оралната микрофлора и да придонесат за здраво дентално и периодонтално ткиво.<sup>1</sup>

Во литературата се среќаваат различни поделби на антимикробните средства. Една од нив е поделбата во групи според хемиските карактеристики. Според таа поделба можеби најголемо значење се придава на катјонските антимикробни агенси.

Катјоните се позитивно наелектризирани јони со способност да ја нарушуваат мембранската функција на бактериите, нивната адхезија и користењето на гликозата.

Од групата на катјонски антимикробни средства се издвојува посебна подгрупа - кварталните амониумови соединенија, составена од *Cetylpyridinium Chloride* и *Benzalkonium Chloride*. Овие соединенија се составен дел на голем број продукти за широка употреба како што се плакнатите за уста и пастите за заби.

Цетилпиридиниумхлоридот (CPC), како активна состојка на оралните антисептици, има широк антимикробен спектар со силен бактерициден ефект врз Грам<sup>+</sup> патогеници и со фунгициден ефект врз габите. Неговата ефикасност против Грам<sup>-</sup> патогеници и микобактериите е дискутабилна. Апликацијата на CPC во концентрација од 0,05% во плакнатите резултира со непосредна редукција на бактериските броеви. Употребата на CPC во оваа концентрација не го менува составот на нормалната орална флора и не резултира со појава на неорални и потенцијално патогени бактерии во устата.<sup>2</sup> Со оглед на тоа што ова соединение има позитивен полнеж, тоа е привлечено од клеточниот бактериски сид кој е со негативен полнеж. Грам<sup>+</sup> бактерии, во кои се вбројува и *Streptococcus mutans*, се поосетливи на катјоните бидејќи тие се со негативен полнеж.<sup>2</sup>

<sup>11</sup> Во споредба со хлорхексидинот, CPC има помалку резидуални ефекти, но резултат на тоа е послабото дејство против плакот и гингивитисот. Комбинацијата на CPC со хлорхексидин и цинклактат дава најголема редукција и на анаеробните и на аеробните микроорганизми спречувајќи ја појавата на лош здив.<sup>12</sup> Исто така, потврдена е и ефикасноста на CPC против орофарингеалната кандидијаза.<sup>11</sup>

Водородпероксид или *Hydrogenium peroxdatum* е бистра течност која веќе над 80 години се користи во форма на воден раствор или во комбинација со соли.<sup>13</sup> Наоѓа широка примена во кариологијата, ендодонцијата, како и во лечењето на

пародонтопатиите.<sup>14</sup> Како официнален Hydrogenii peroxydi solutio diluta, содржи 2,8 до 3,2 % водородпероксид, а како Hydrogenii peroxydi solutio concentrata, содржи 28-31 % водородпероксид.<sup>3,13-16</sup>

Најбитната терапевска особина на водородпероксидот е бактерицидното дејство. Тој врши оксидирање на органските материи, т.е. на аминокислотни, амидо и другите протеински групи, кои всушност се бактериските токсини, до нивна потполна деградација. Благодарение на ослободениот насцентен кислород, хидрогенот ги уништува анаеробните микроорганизми. Дејствува и врз намалувањето на бактериската атхеренција.<sup>16</sup> Како 3% раствор, водородпероксидот има благо бактерицидно дејство и ги намалува индексите на гингивитисот и на плакот.<sup>13</sup> Со зголемување на концентрацијата, се зголемува и бактерицидното дејство. Комбинацијата на  $H_2O_2$  и натриумбикарбонат ( $NaHCO_3$ ) дејствува против селектирани факултативни Грам<sup>-</sup> бактерии.<sup>15</sup> Со претходно отстранување на меките наслаги, терапевскиот ефект на хидрогенот се зголемува, доаѓа до негово побавно разлагање и негово постепено дејствување. Покрај бактерицидно дејство, тој има и хемостатичко, механичко, деколорантно и дезодорантно дејство. Што се однесува, пак, до несаканите дејства на водородпероксидот, истражувањата покажаа дека при дневна употреба на 3 %  $H_2O_2$  во време од 6 години, се јавуваат повремени минливи иритирачки ефекти само кај мал број испитаници со претходно постоење на улцерација, или пак кога истовремено се даваат високи нивоа на солни раствори.<sup>13</sup> Некои истражувања спроведени на експериментални животни покажаа дека 30%  $H_2O_2$  има кокарциногено дејство, за разлика од 3% или помалку, каде што ваквото дејство не е забележано.<sup>13</sup>

Целта на оваа студија е анализа на микробиолошките карактеристики на плакнач за уста со активна антимикробна компонента цетилпиридиниумхлорид и официнално подготвен 3% водороден пероксид, меѓусебна споредба на нивната ефикасност во редукација на кариогените микроорганизми како и статистичка анализа на добиените резултати.

## **Материјал и методи**

### *Испитаници*

Во испитувањето беа вклучени 24 деца од обата пола на возраст од 8 до 13 години. Заради поголема прецизност и точност во испитувањето, секоја од испитуваните групи беше и контролна група, што значи дека материјалот за анализа (плунка) беше земен пред и по употребата на одреденото средство. Испитаниците беа со добро општо и орално здравје, со сличен хигиенски режим и начин на исхрана и со приближно еднаков КЕП-индекс. Изборот на испитаниците беше извршен на Клиниката за детска и превентивна стоматологија при Стоматолошкиот клинички центар во Скопје.

## **Средства за орална хигиена**

За реализирање на поставените цели, ги проследивме антимикробните аспекти на две средства за орална хигиена со чисто хемиско дејство врз бактериите:

- *Aqua fresh®* плакнач за уста – SmithKline Beecham, Велика Британија (содржи активна антимикробна супстанција – Cetylpyridinium Chloride). Покрај активната супстанција содржи и: вода, коригенс за вкус и мирис, Cocosamidopropyl Betaine, натриумсахарин, натриумфлуорид, натриумбикарбонат.
- 3% официнално приготвен Hydrogenii peroxydi solutio diluta (водородпероксид).

#### *План и постапки за испитување на средствата за орална хигиена*

Испитувањето се одвиваше во две етапи. Во секоја етапа децата беа поделени во 2 групи од по 12 испитаници. Истовремено се испитуваше ефектот на секое од средствата врз флората на 12 деца. На овој начин, во секоја етапа испитаниците беа испитани со секое од испитуваните средства. Со вакво испитување се добиваат поточни резултати, бидејќи се работи со похомогена група на испитаници и сите индивидуални разлики, во смисла на навиките во хигиената на устата и во исхраната, а со тоа и резидентната и транзиторната флора на испитаниците, максимално се редуцирани. Примероците од плунка беа земани пред, и 20 минути по плакнењето на устата со плакнач и хидроген, во утринските часови, без претходно спроведена орална хигиена најмалку 12 часа и без антибиотска терапија најмалку 30 дена пред почетокот на испитувањето како и во тек на третманот.

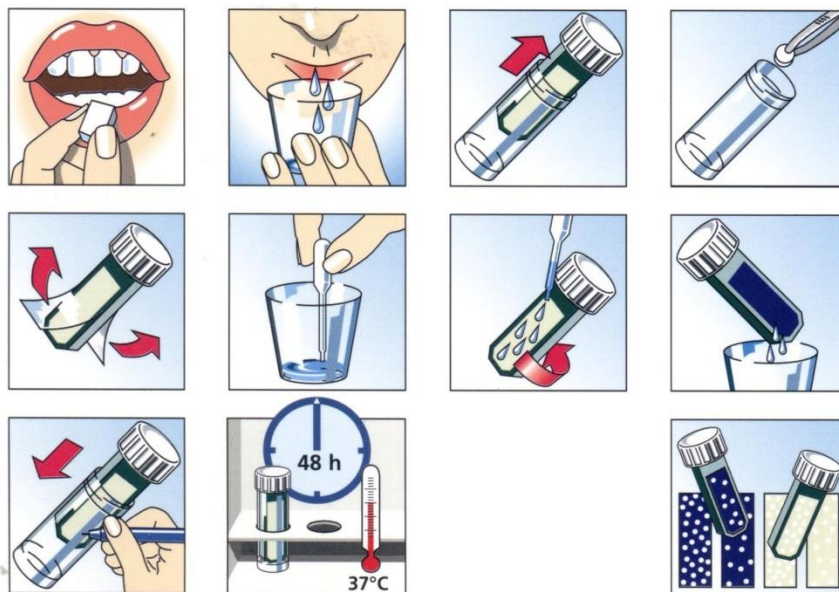
#### *Редослед на постапките за одредување на антимикробниот ефект:*

1. Земање на прв примерок плунка без претходно стимулирање на секрецијата.
2. Употреба на средството со следново времетраење:
  - жабуркање со орален плакнач – приближно 30 секунди;
  - плакнење со 3% хидроген – 15 секунди;
3. По употребата на средството, устата се плакнеше со 200 мл вода – приближно 15 секунди.
4. По пауза од 10 минути, се земаше втор примерок нестимулирана плунка.

#### *Методи за одредување на квантитативната застапеност на Streptococcus mutans и Lactobacillus species*

Примероците за одредување на квантитативната застапеност на *S. mutans* и *Lactobacillus* беа земани со CRT bacteria – комерцијално набавени стрипови, производство на Vivadent, Schaan, Лихтенштајн, со микробиолошки медиуми за селективна изолација на *Streptococcus mutans* на едната и за изолација на *Lactobacillus species* од другата страна на стрипот.

Постапката се изведува на тој начин што најпрво се вади носачот на агарот од тест-пишенцето, потоа се става таблета  $\text{NaHCO}_3$  на дното на пишенцето и се вадат заштитните фолии од двете страни на агарните површини. Користејќи ја пипетата од сетот, се врши целосно навлажнување на двете агарни површини со плунка. Со држење на носачот на агар малку накосо, се врши исцедување на вишокот плунка. Потоа носачот се враќа во пишенцето, се затвора и се испраќа за микробиолошка анализа.



**Слика 1.** Постапка за одредување на квантитативната застапеност на *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus species*

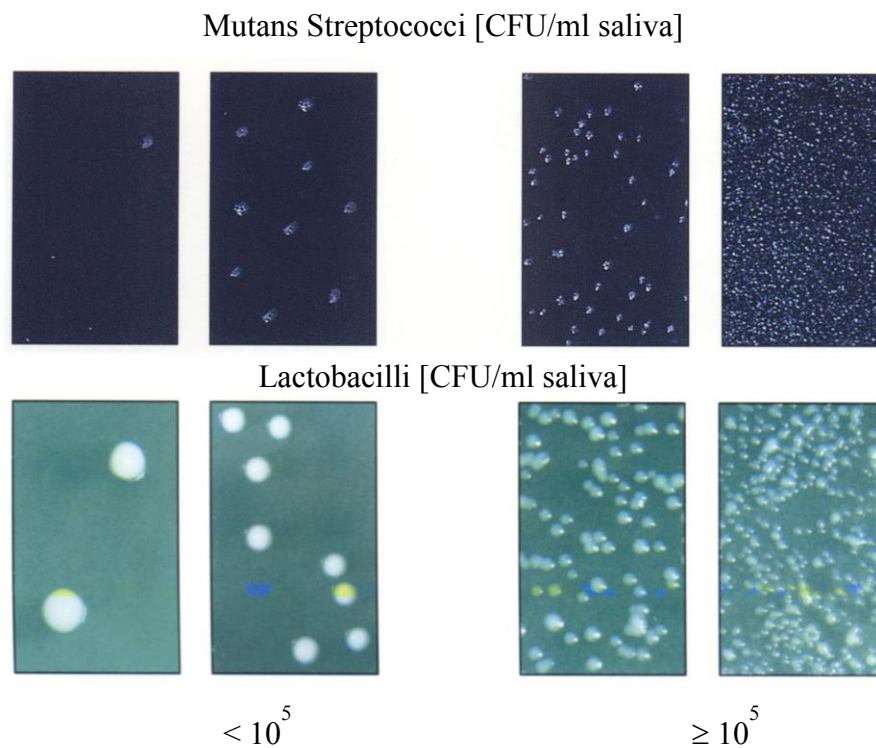
### Микробиолошка обработка на примероците

Микробиолошките анализи се изведуваа на Институтот за микробиологија и паразитологија при Медицинскиот факултет во Скопје.

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

Со самото земање на примерокот фактички се изведува и засадувањето. По инкубација од 48 часа на 37° C, се бројат пораснатите колонии (colony forming units – CFU) доколку се во помал број, а доколку се повеќе, се споредуваат со стандардот даден на упатството на производителот и се интерпретираат како 10.000, 10.000-100.000, 100.000-1.000.000 и >1.000.000 CFU. Колониите на *Streptococcus mutans* се просирни на сина подлога, а колониите на *Lactobacillus species* се со сивкасто-бела боја на зелена подлога. Со броењето на колониите, се одредува приближниот број клетки на бактериите, бидејќи се смета дека од една клетка пораснува една колонија и затоа се означува како “единица која формира колонија – colony forming unit (CFU)”. По исушувањето, стриповите се складираат во фрижидер на 2-8°C, заштитени од светлина и траат со години, со можност за нивно читање во секое време.





**Слика 2.** Единици кои формираат колонии за мутанс стрептококи и за лактобацили (стандард од упатството на производителот)



**Слика 3.** Добиени колонии од лактобацили во текот на испитувањето, пред и по спроведувањето на одредена постапка

За анализа на податоците ги користевме: Хи-квадрат тестот ( $\chi^2$ ), Fisher Exact тестот и Вилкоксоновиот тест на еквивалентни парови (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test).

## Резултати

*Утврдување на квантитативната застапеност на Streptococcus mutans и Lactobacillus species пред и по употребата на средствата*

Квантитативната застапеност на кариогените микроорганизми одредена преку CFU/ml, пред и по употребата на одреденото средство, е прикажана на следните табели. Притоа, бројот на испитаници кај кои не се изолирани микроорганизми пред употреба на средството е ставен во загради и не е земен предвид во резултатите добиени по употреба на средството.

|                         | <b><i>Streptococcus mutans</i> CFU/ml</b> |           | <b><i>Lactobacillus species</i> CFU/ml</b> |           |
|-------------------------|-------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------|-----------|
|                         | <b>пред</b>                               | <b>по</b> | <b>пред</b>                                | <b>по</b> |
| <b>Нема раст</b>        | /                                         | 16        | (1)                                        | 16        |
| <b>10<sup>2-3</sup></b> | /                                         | 3         | 1                                          | 2         |
| <b>10<sup>3-4</sup></b> | 2                                         | 2         | 3                                          | 1         |
| <b>10<sup>4-5</sup></b> | 3                                         | 1         | 3                                          | 2         |
| <b>10<sup>5-6</sup></b> | 5                                         | 1         | 4                                          | /         |
| <b>10<sup>6-7</sup></b> | 14                                        | 1         | 12                                         | 2         |
| <b>N</b>                | 24                                        | 24        | 23                                         | 23        |

**Табела 1.** Број на испитаници со CFU (colony forming units) на *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus species* во 1 мл плунка пред и по употребата на плакначот за уста

|                         | <b><i>Streptococcus mutans</i> CFU/ml</b> |           | <b><i>Lactobacillus species</i> CFU/ml</b> |           |
|-------------------------|-------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------|-----------|
|                         | <b>пред</b>                               | <b>по</b> | <b>пред</b>                                | <b>по</b> |
| <b>Нема раст</b>        | /                                         | 6         | (2)                                        | 4         |
| <b>10<sup>2-3</sup></b> | 3                                         | 10        | 4                                          | 3         |
| <b>10<sup>3-4</sup></b> | 1                                         | 6         | 2                                          | 5         |
| <b>10<sup>4-5</sup></b> | 2                                         | 1         | 2                                          | 10        |
| <b>10<sup>5-6</sup></b> | 8                                         | 1         | 1                                          | /         |
| <b>10<sup>6-7</sup></b> | 10                                        | /         | 13                                         | /         |
| <b>N</b>                | 24                                        | 24        | 22                                         | 22        |

**Табела 2.** Број на испитаници со CFU (colony forming units) на *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus species* во 1 мл плунка пред и по употребата на 3% водородпероксид

По употребата и на двете средства, постои статистички сигнификантна разлика во добиените резултати и за *Streptococcus mutans* и за *Lactobacillus species*:  $p < 0,05$ .

Поради големите разлики добиени со утврдувањето на квантитативната застапеност на кариогените микроорганизми пред и по употребата на одреденото средство/метод, коишто се движат од 0 до преку 1.000.000, во понатамошните табеларни прегледи вредностите ќе бидат прикажани логаритамски. За да се согледа точниот број испитаници кај кои настанала редукција на кариогените микроорганизми, во табелите 3 и 4 даден е сумарен приказ на бројот на испитаниците кај кои се изолирани колонии, изразен преку логаритамски фактор на редукција ( $\log RF$ ) од 0 до  $\geq 4$ , посебно за секое средство и посебно за *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus species*, при што  $\log RF = \log CFU$  пред –  $\log CFU$  по употреба на средството. Оние испитаници кај кои не се изолирани колонии, не се земени предвид и вкупниот број ( $N$ ) го дава фактичкиот број на испитаници влезени во анализите.

| <b><i>log RF</i></b>       | <b><i>Streptococcus mutans</i></b> | <b><i>Lactobacillus species</i></b> |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>0</b>                   | 1                                  | 2                                   |
| <b>1</b>                   | 2                                  | /                                   |
| <b>2</b>                   | /                                  | 3                                   |
| <b>3</b>                   | 4                                  | 4                                   |
| <b><math>\geq 4</math></b> | 17                                 | 14                                  |
| <b><i>N</i></b>            | <b>24</b>                          | <b>23</b>                           |

**Табела 3.** Број на испитаници со логаритамски фактор на редукција за плакначот за уста

| <b><i>log RF</i></b>       | <b><i>Streptococcus mutans</i></b> | <b><i>Lactobacillus species</i></b> |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>0</b>                   | /                                  | /                                   |
| <b>1</b>                   | 2                                  | 3                                   |
| <b>2</b>                   | 5                                  | 16                                  |
| <b>3</b>                   | 11                                 | 3                                   |
| <b><math>\geq 4</math></b> | 6                                  | /                                   |
| <b><i>N</i></b>            | <b>24</b>                          | <b>22</b>                           |

**Табела 4.** Број на испитаници со логаритамски фактор на редукција за 3% водородпероксид

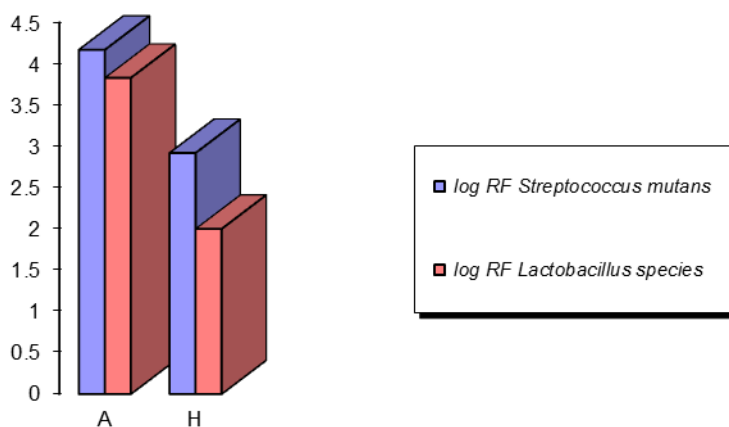


*Одредување на степенот на разликите во редукцијата на кариогените микроорганизми во плунката меѓу хемиските средства*

Ефектот од дејството на одреденото средство во редукцијата на кариогените микроорганизми во плунката е прикажан со сумарен приказ на средните вредности од логаритамски фактори на редукција на двете средства – табели 5 и графикон 1. Во пресметувањето на овие параметри, случаите кај кои вредноста на CFU пред е 0, т.е оние кај кои не се изолирани бактерии, не се земени предвид и вкупниот број ( $N$ ) го дава фактичкиот број на испитаници влезени во анализите.

| Средство        | $\bar{X}$ log RF<br><i>Streptococcus mutans</i> | $\bar{X}$ log RF<br><i>Lactobacillus species</i> |
|-----------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Aqua fresh®     | 4,17                                            | 3,83                                             |
| Водородпероксид | 2,92                                            | 2,00                                             |

**Табела 5.** Сумарен приказ на фактори на редукција на користените средства



**A** – Aqua fresh®

**H** – Hydrogen

**Графикон 1.** Сумарен приказ на фактори на редукција на користените средства и методи

Резултатите од меѓусебната споредба на испитаните средства во однос на нивната ефикасност во редукцијата на кариогените бактерии се прикажани во табела 6. Анализата е направена со Вилкоксоновиот тест на еквивалентни парови со ниво на значајност од  $p = 0,05$ .

|  | <i>Streptococcus mutans</i> | <i>Lactobacillus species</i> |
|--|-----------------------------|------------------------------|
|  | Aquafresh/hidrogen          | Aquafresh/hidrogen           |

|                        |     |       |
|------------------------|-----|-------|
| збир на позитивни низи | 146 | 202,5 |
| збир на негативни низи | -25 | -20,5 |

**Табела 6.** Вилкоксонов тест за статистичка сигнификантност за плакначот за уста и 3% водородпероксид

Статистичката анализа на разликите на вредностите за *Streptococcus mutans* и за *Lactobacillus species* покажа статистички сигнификантно многу поголема ефикасност на средството Aqua fresh® во однос на 3% водородпероксид –  $p < 0,05$ .

### Дискусија

Позитивниот ефект на плакначите пред сè врз кариогената орална флора, врз плакот и гингивитисот е прикажан во голем број научни студии.<sup>2,11,12,17,18</sup> Анализирајќи ги резултатите од ефектите на плакначот Aqua fresh® врз редукцијата на кариогените бактерии во плунката, констатиравме дека најголем број испитаници имаат редукција од 10.000 пати и повеќе (17 за *Streptococcus mutans* и 14 за *Lactobacillus species*), а бројот на испитаници кај кои не е забележана никаква редукција е многу мал и изнесува еден за *Streptococcus mutans* и двајца за *Lactobacillus species*. Овие резултати се во согласност со резултатите добиени од Radford et al.,<sup>2</sup> Pitten & Kramer,<sup>11</sup> Van Steenberghe et al.<sup>12</sup> Jenkins et al.,<sup>17</sup> и Mandel,<sup>18</sup> за дејството на цетилпиридиниумхлоридот врз бројот на кариогените микроорганизми.

Во антимикробните средства вклучени во нашето испитување спаѓа и водородпероксидот. Ова соединение има силно изразена бактерицидност и има широка примена во кариологијата, ендодонцијата и пародонтологијата. Во стоматолошките ординации најмногу се користи 3% водородпероксид со бактерицидно дејство и позитивен ефект во намалувањето на индексите на гингивитисот и плакот. Како таков, ретко се користи за домашна употреба, но може да се сретне како составен дел на некои плакначи.<sup>13,14,16,19</sup>

Што се однесува до ефектот на 3% водородпероксид врз редукцијата на бројот на кариогените микроорганизми во плунката, анализиран преку логаритамскиот фактор на редукција, најголем број испитаници имаат фактор на редукција 3, односно намалување на бројот на *Streptococcus mutans* за 1000 пати, и фактор на редукција 2, односно намалување на бројот на *Lactobacillus species* за 100 пати. Подобриот ефект на ова средство врз *Streptococcus mutans* се потврди и со бројот на испитаници кои имаат фактор на редукција 4 и поголем од 4. Во оваа група спаѓаат 6 испитаници, за разлика од ниту еден испитаник со ваков фактор за бактеријата *Lactobacillus species*. Во литературата речиси и да не постојат студии кои го разгледуваат ефектот на водородниот пероксид врз кариогените микроорганизми во плунката. Тоа е донекаде и разбирливо затоа што неговата главна антимикробна улога е дејството на уништување на анаеробните

микроорганизми со помош на ослободениот насцентен кислород.<sup>20-22</sup> Покрај бактерицидно, водородпероксидот дејствува и хемостатично, механички, деколорантно и дезодорантно.<sup>20-22</sup>

Анализите на резултатите добиени од средните вредности на логаритамските фактори на редукција на испитуваните средства говорат дека поголем редукционен фактор, односно посилено дејство кон двете испитани кариогени бактерии има плакначот за уста Aqua fresh®, чија редукција е за повеќе од 10.000 пати ( $\log RF = 4,17$ ) за *Str. mutans* и речиси 10.000 пати ( $\log RF = 3,83$ ) за *Lactobacillus spp.* 3% водородпероксид чија редукција е речиси 1.000 пати ( $\log RF = 2,92$ ) за *Str. mutans* и точно 100 пати ( $\log RF = 2,00$ ) за *Lactobacillus spp.*

Со цел меѓусебно да ги споредиме испитаните средства во однос на нивната ефикасност во редукцијата на кариогените бактерии, се послужиравме со Вилкоксоновиот тест на еквивалентни парови. Од добиените резултати на споредбата на средствата можеме да констатираме дека плакначот за уста Aqua fresh® покажа статистички високо-сигнификантна разлика во однос на 3% водородпероксид  $p < 0,05$ , што подразбира и поголема ефикасност во редукцијата и на *Streptococcus mutans* и на *Lactobacillus spp.*

И покрај тоа што во последно време во трговската и фармацевтската мрежа се застапени повеќе видови плакначи за уста со различен состав и од различни производители, плакначите за уста во нашата средина речиси и не се употребуваат. Сепак, неконтролираното користење на плакначите за уста и на другите средства кои имаат антимикробно дејство може да доведе и до други проблеми. Еден од тие проблеми е уништувањето на нормалната флора што може да биде опасно поради тоа што во “стерилизираната” усна празнина се населуваат резистентни микроорганизми и квасници, а особено *Candida albicans*. Затоа, се наметнува прашањето на “идеално” антимикробно средство, кое би дејствувало само на патогените микроорганизми, или уште поконкретно, врз онаа орална микрофлора за која точно се знае дека игра голема улога во предизвикувањето на денталниот кариес.

## Заклучок

Дејството на плакначот за уста со активна антимикробна компонента е статистички високо сигнификантно во редукција на вкупната саливарна флора, додека пак дејството на 3% водородпероксид е статистички сигнификантно во редукција на аеробните микроорганизми, а високо сигнификантно во редукција на анаеробните саливарни микроорганизми. По употреба и на двете средства се утврди значајна редукција во бројот на кариогените саливарни микроорганизми *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus species*. Двете анализирани средства имаат изразено дејство во редукција на *Streptococcus mutans* отколку во редукција на *Lactobacillus species*. Во спроведувањето на антикариогената програма се препорачува активно вклучување на плакначите за уста со активни антимикробни компоненти.

## A comparative analysis of the efficacy of two antimicrobial agents in the reduction of cariogenic microorganisms in the saliva

Aleksandar Dimkov\* PhD, Research Associate [dimkovaleksandar@gmail.com](mailto:dimkovaleksandar@gmail.com) 070341551

Nikola Panovski\*\* PhD, Professor, [pannovskin@yahoo.com](mailto:pannovskin@yahoo.com)

Elizabeta Gjorgievska\* PhD, Professor, [elizabetag2000@yahoo.com](mailto:elizabetag2000@yahoo.com)

Marija Stevanovic\* PhD, Professor, [majastevanovic@hotmail.com](mailto:majastevanovic@hotmail.com)

\*Department for Pediatric and Preventive Dentistry, Faculty of Dental Medicine, University “Ss Cyril and Methodius” - Skopje

\*\*Institute for Microbiology and Parasitology, Medical Faculty, University “Ss Cyril and Methodius” - Skopje

Corresponding author: Aleksandar Dimkov\* PhD, Research Associate, Department for Pediatric and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, University “Ss Cyril and Methodius” - Skopje; [dimkovaleksandar@gmail.com](mailto:dimkovaleksandar@gmail.com); 070341551

### Abstract

The aim of this study is to determine the quantitative presence of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus species* in the saliva before and after rinsing the mouth with a mouthwash containing an active antimicrobial substance - cetylpyridinium chloride – and with hydrogen peroxide 3%; to find the degree of differences in the reduction of cariogenic microorganisms in the saliva; and to make a comparison of both agents as regards their efficacy. To achieve the set aim we used a commercial mouth rinse with the CPC antimicrobial compound and an official hydrogen peroxide 3% rinse. The analyses were carried out on a group of 24 children at the age between 9 and 13 of both sexes. Saliva samples were taken in the morning hours, before and 20 minutes after mouth rinsing, thus ensuring the absence of any oral hygiene in the course of the previous 12 hours at least. The quantitative presence of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus species* was determined using commercially available CRT bacteria strips, Ivoclar-Vivadent, Schaan – Liechtenstein. In order to determine the degree of differences in the reduction of salivary cariogenic microorganisms, standard statistical methods were used and the results of the comparison of the tested agents regarding their efficacy in the reduction of cariogenic bacteria were obtained by Wilcoxon matched-pairs test with a level of significance of  $p = 0,05$ . A significant reduction in the count of cariogenic microorganisms in all tested children was found. The statistical analysis of the differences in the values for *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus species* showed a significantly higher efficacy of cetylpyridinium chloride over hydrogen peroxide 3%. One can conclude from the obtained results that the effect of both agents against *Streptococcus mutans* was more pronounced than against *Lactobacillus species*.

**Keywords:** dental caries, antimicrobial agents, hydrogen peroxide, cetylpyridinium chloride, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus species*

## Introduction

There is no caries without microorganisms. This is a generally accepted opinion founded on numerous scientifically proven facts. Certain oral cavity microorganisms can cause experimental dental caries in vitro; experimental animals, bred in sterile conditions, do not lead to caries despite cariogenic diet; from a carious lesion certain bacteria can be isolated, which can be proven, both histologically and microbiologically, in the carious enamel, the dentine and the dentinal tubules.

The fact that microorganisms are among the most elemental factors in the etiology of dental caries imposes the question regarding their elimination or their reduction to minimal values. An important prerequisite in this respect is the typological and the numerical verification of the microorganisms, while the oral hygiene maintenance is the major factor in the struggle against them.

Modern mechanical and chemotherapeutical approaches to oral hygiene aim to alter the oral microflora and to contribute to a healthy dental and periodontal tissue.<sup>1</sup>

Various classifications of antimicrobial agents can be found in the literature. One of these is the classification into groups according chemical characteristics. According to this classification the greatest importance seems to be given to cationic antimicrobial agents.

Cations are positively charged ions capable to disturb the membrane function of the bacteria, their adhesion and their use of glucosis.

One separate subgroup within the group of antimicrobial agents consists of the quarternary ammonium compounds, which include cetylpyridinium chloride and benzalkonium chloride. These compounds are the ingredients of numerous wide consumption products like mouth rinses and toothpastes.

As the active ingredient of oral antiseptics, cetylpyridinium chloride (CPC) has a wide antimicrobial spectrum with a strong bactericidal effect on Gram<sup>+</sup> pathogenic bacteria and a fungicidal effect on yeasts. Its efficacy against Gram<sup>-</sup> pathogenic bacteria and microbacteria is questionable. The use of a 0,05%-concentration of CPC in rinses results in a direct reduction of bacterial counts. The use of this concentration of CPC does not alter the normal oral flora and does not result in any occurrence of non-oral potentially pathogenic bacteria in the mouth<sup>2</sup>. Having in mind that this compound has a positive charge, it is being attracted by the bacterial cell's wall, which has a negative charge. The Gram<sup>+</sup> bacteria, such as *Streptococcus mutans*, are more sensitive to the cations because their charge is negative.<sup>2-11</sup> In comparison to chlorhexidine, CPC has fewer residual effects and this results in its effect against plaque and gingivitis being weaker. The combination of CPC with chlorhexidine and zinc lactate results in the highest reduction both of anaerobic and aerobic microorganisms, preventing the occurrence of halitosis.<sup>12</sup> The efficacy of CPC against oropharyngeal candidiasis has also been proven.

Hydrogen peroxide or hydrogenium peroxidatum is a clear liquid, which is being used for over 80 years in the form of a water solution or in combination with salts.<sup>13</sup> It is widely used in cariology, endodontology, and also in the treatment of parodontopathies.<sup>14</sup> In the form of officinal hydrogenii peroxidum solutio diluta it contains a 2.8 to 3.2% concentration of hydrogen peroxide, while in the form of hydrogenii peroxidum solutio concentrate it contains 28-31% of hydrogen peroxide.<sup>3,13-16</sup>



The most essential characteristic of hydrogen peroxide is its bactericidal effect. It oxidises organic matters, i.e. the amino, amido and other protein groups, which are in fact bacterial toxins, to their complete degradation. Thanks to the released nascent oxygen, hydrogen destroys anaerobic microorganisms. It has also an effect in the reduction of bacterial adherence.<sup>16</sup> In the form of a 3% solution, hydrogen peroxide has a mild bactericidal effect and reduces the indexes of gingivitis and plaque.<sup>13</sup> The bactericidal effect increases with increased concentration. The combination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with sodium carbonate (NaHCO<sub>3</sub>) has an effect against selected facultative Gram<sup>-</sup> bacteria.<sup>15</sup> When the soft deposits are removed in advance, the therapeutical effect is increased, its dissolution becomes slower and its effect becomes more gradual. In addition to the bactericidal effect, it also has chemostatic, mechanical, decolorising and deodorising effects. As regards the unwanted effects of hydrogen peroxide, research works have shown that through a daily use of 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for a period of 6 years occasional transient annoying effects occur in just a small number of tested patients that had had a previous existence of ulceration, or in cases when high levels of saline solutions had been administered simultaneously.<sup>13</sup> Some reaserch conducted on experimental animals have shown that the 30% concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has a co-carcinogenic effect, in contrast to the concentration of 3% or less, in which case such an effect has not been noticed.<sup>13</sup>

The aim of this study is to analyse the microbiological characteristics of a mouth rinse that uses cetilpyridinium chloride as an active antimicrobial component and with officinal hydrogen peroxide 3%, to compare their efficacy in the reduction of cariogenic microorganisms, and to perform a statistical analysis of the obtained results.

## Material and methods

### Tested patients

The research included 24 children of both sexes at the age between 8 and 13. In order to obtain a greater precision and accuracy of the research, each of the tested groups was also used as a control group, which means that the material for the analysis (saliva) was taken before and after the use of the given agent. The tested participants had good general and oral health, manifested similar hygienic behaviour and diet and had approximately equal DMF indices. The selection of the tested participants was done at the Clinic for Pediatric and Preventive Dentistry in Dental Clinic Skopje.

### *Agents for oral hygiene*

To accomplish the set aims, we monitored the antimicrobial aspects of two agents for oral hygiene, which has a clear chemical effect against bacteria:

- *Aqua fresh*<sup>®</sup> mouthwash – SmithKline Beecham, United Kingdom (contains an active antimicrobial substance – cetylpyridinium chloride). In addition to the active substance it also contains: water, a corrector for taste and odour, Cocamidopropyl Betaine, sodium saccharin, sodium fluoride, sodium bicarbonate.
- officinal hydrogenii peroxidum solutio diluta 3% (hydrogen peroxide).

*Plan and procedures for the examination of the agents for oral hygiene*

The research was carried out in two stages. In each stage the children were divided into 2 groups of 12 participants each. The effect of each of the agents on the flora was examined in 12 children simultaneously. In this manner, the participants were examined with each of the tested agents in each stage. In this kind of research one can obtain more accurate results because the work is performed with a more homogenous group of participants and thus all individual differences regarding the mouth cavity hygienic habits and regarding the diet, and in this sense also the differences in the resident and transitory flora of the participants, are maximally reduced. Samples of saliva were taken in the morning hours, before and 20 minutes after mouth rinsing with the mouthwash and the hydrogen, with no oral hygiene within the previous 12 hours at least and with no antibiotic therapy 30 days before the start of the research at least and during the treatment.

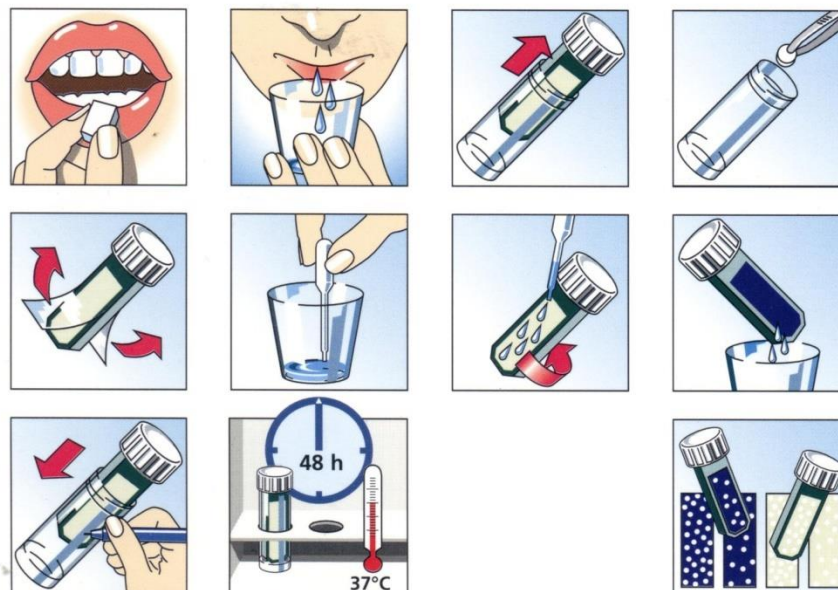
*The sequence of the procedures for determining the antimicrobial effect:*

1. The first sample of saliva is taken with no previous salivary secretion stimulation.
2. The agent is used observing the following time periods:
  - Gargling with the oral rinse – approximately 30 seconds;
  - Rinsing with hydrogen 3% – 15 seconds;
3. After the use of the agent, the mouth is rinsed with 200 ml of water – approximately 15 seconds.
4. After a pause of 10 minutes, a second sample of unstimulated saliva is taken.

*Methods for determining the quantitative presence of Streptococcus mutans and Lactobacillus species*

The samples for the determination of the quantitative presence of *S. mutans* and *Lactobacillus* were taken with CRT bacteria – commercially available strips, manufactured by Vivadent, Schaan, Lichtenstein, which have microbiological media for the selective isolation of *Streptococcus mutans* on one side of the strip and for isolation of *Lactobacillus species* on the other side.

The procedure was carried out in the following manner: as a first step the agar holder was removed from the test bottle, then a NaHCO<sub>3</sub> tablet was put on the bottom of the bottle and the protective foils were removed from both sides of the agar surfaces. Using the pipette from the kit, both agar surfaces were completely moistened with saliva. While holding the agar holder slightly aslant, the excess saliva was drained away. Then the holder was put back in the bottle, the bottle was closed and then sent for microbiological analysis.



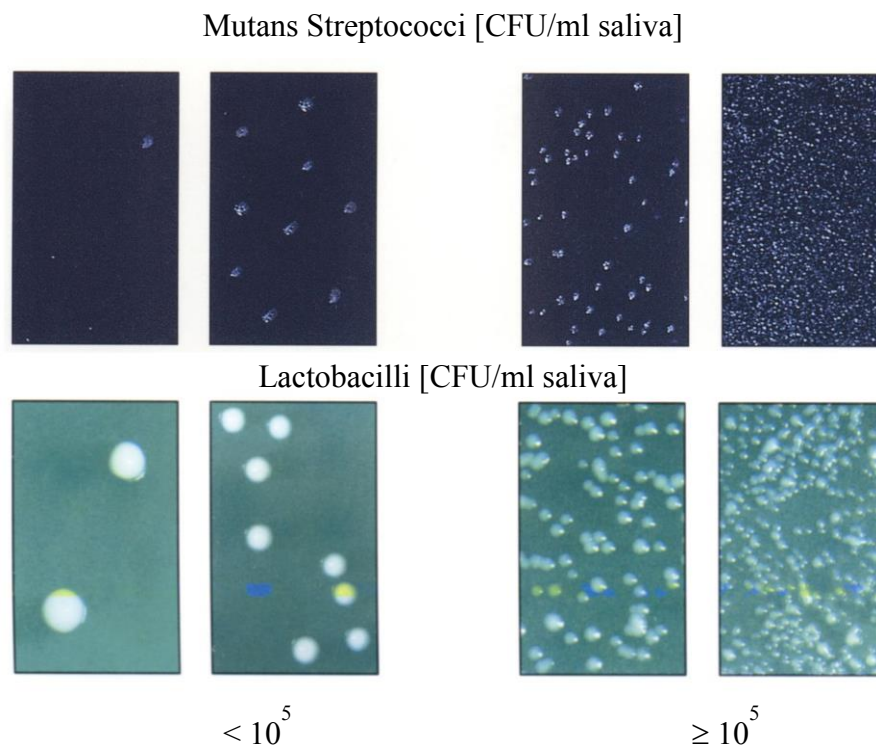
**Figure 1.** Procedure for determining the quantitative presence of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species

#### Microbiological processing of the samples

The microbiological analyses were carried out at the Institute for Microbiology and Parasitology, Medical Faculty in Skopje.

#### *Determination of the quantitative presence of Streptococcus mutans and Lactobacillus species in the saliva*

Planting is actually done while taking the sample. After an incubation of 48 hours at 37° C, the formed colonies (colony forming units – CFU) are counted if there are few of them, and they are compared with the standard given in the manufacturer’s manual and interpreted as 10 000, 10 000 – 100 000, 100 000 – 1 000 000 and >1 000 000 CFUs if there are plentiful. The *Streptococcus mutans* colonies are transparent on a blue agar background, while the *Lactobacillus species* colonies have a greyish-white colour on a green agar background. The approximate count of bacterial cells is determined by counting colonies because it is considered that one cell forms one colony and that is why the corresponding measure is named a “colony forming unit (CFU)”. After being dried, the strips are stored at 2-8°C in a refrigerator, light protected at the same time, where they can endure for years, so that it is possible to read them at any time.



**Figure 2.** Colony forming units for *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species (standard from the manufacturer's manual)



**Figure 3.** Colonies of *Lactobacillus* species obtained in the course of the research, before and after the given procedure has been carried out

For the data analysis we used: the  $\chi^2$ -test, the Fisher exact test and the Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test.

## Results

*Determination of the quantitative presence of Streptococcus mutans and Lactobacillus species before and after the use of the agents*

The quantitative presence of cariogenic microorganisms, expressed in CFU/ml, before and after the use of the given agent, is shown in the following tables. The number of participants in which no microorganisms were isolated before the use of the agent is given in brackets and was not taken into account in the results obtained after the use of the agent.

|                         | <b><i>Streptococcus mutans</i> CFU/ml</b> |           | <b><i>Lactobacillus species</i> CFU/ml</b> |           |
|-------------------------|-------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------|-----------|
|                         | <b>пред</b>                               | <b>по</b> | <b>пред</b>                                | <b>по</b> |
| <b>Нема раст</b>        | /                                         | 16        | (1)                                        | 16        |
| <b>10<sup>2-3</sup></b> | /                                         | 3         | 1                                          | 2         |
| <b>10<sup>3-4</sup></b> | 2                                         | 2         | 3                                          | 1         |
| <b>10<sup>4-5</sup></b> | 3                                         | 1         | 3                                          | 2         |
| <b>10<sup>5-6</sup></b> | 5                                         | 1         | 4                                          | /         |
| <b>10<sup>6-7</sup></b> | 14                                        | 1         | 12                                         | 2         |
| <b>N</b>                | 24                                        | 24        | 23                                         | 23        |

**Table 1.** Number of participants with CFUs (colony forming units) of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus species* found in 1 ml of saliva before and after the use of the mouth rinse

|                         | <b><i>Streptococcus mutans</i> CFU/ml</b> |           | <b><i>Lactobacillus species</i> CFU/ml</b> |           |
|-------------------------|-------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------|-----------|
|                         | <b>пред</b>                               | <b>по</b> | <b>пред</b>                                | <b>по</b> |
| <b>Нема раст</b>        | /                                         | 6         | (2)                                        | 4         |
| <b>10<sup>2-3</sup></b> | 3                                         | 10        | 4                                          | 3         |
| <b>10<sup>3-4</sup></b> | 1                                         | 6         | 2                                          | 5         |
| <b>10<sup>4-5</sup></b> | 2                                         | 1         | 2                                          | 10        |
| <b>10<sup>5-6</sup></b> | 8                                         | 1         | 1                                          | /         |
| <b>10<sup>6-7</sup></b> | 10                                        | /         | 13                                         | /         |
| <b>N</b>                | 24                                        | 24        | 22                                         | 22        |

**Table 2.** Number of test patients with CFUs (colony forming units) of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus species* found in 1 ml of saliva before and after the use of hydrogen peroxide 3%



After the use of both agents there is a statistically significant difference in the results obtained both for *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus species*:  $p < 0,05$ .

Due to the large differences obtained after the determination of the quantitative presence of cariogenic microorganisms before and after the use of the given agent/method, which range from 0 to more than 1 000 000, the values in the subsequent tabular summaries will be shown logarithmically. In order to see the number of participants in which a reduction of cariogenic microorganisms occurred, Tables 3 and 4 give a summary of the number of participants in which colonies were isolated, expressed as the logarithmic reduction factor (log RF) with a range from 0 to  $\geq 4$ , for each agent separately and for *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus species* separately, where  $\log RF = \log CFU_b - \log CFU_a$  ( $CFU_b$ ,  $CFU_a$  are the CFU values before and after the use of the agent, respectively). The participants with no isolated colonies were not taken into account and the total number ( $N$ ) denotes the actual number of participants included in the analyses.

| <b><i>log RF</i></b>       | <b><i>Streptococcus mutans</i></b> | <b><i>Lactobacillus species</i></b> |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>0</b>                   | 1                                  | 2                                   |
| <b>1</b>                   | 2                                  | /                                   |
| <b>2</b>                   | /                                  | 3                                   |
| <b>3</b>                   | 4                                  | 4                                   |
| <b><math>\geq 4</math></b> | 17                                 | 14                                  |
| <b><i>N</i></b>            | 24                                 | 23                                  |

**Table 3.** Number of participants with a logarithmic reduction factor for the mouth rinse

| <b><i>log RF</i></b>       | <b><i>Streptococcus mutans</i></b> | <b><i>Lactobacillus species</i></b> |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>0</b>                   | /                                  | /                                   |
| <b>1</b>                   | 2                                  | 3                                   |
| <b>2</b>                   | 5                                  | 16                                  |
| <b>3</b>                   | 11                                 | 3                                   |
| <b><math>\geq 4</math></b> | 6                                  | /                                   |
| <b><i>N</i></b>            | 24                                 | 22                                  |

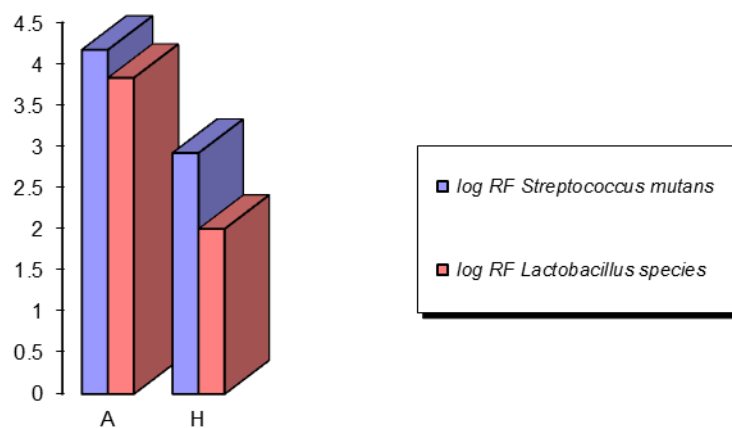
**Table 4.** Number of participants with a logarithmic reduction factor for hydrogen peroxide 3%

*Determination of the degree of differences in the reduction of the cariogenic microorganisms in the saliva between the chemical agents*

The effect of the action of given agent in the reduction of salivary cariogenic microorganisms is shown through a summary of the average values of the logarithmic reduction factors of both agents – Table 5 and Chart 1. When calculating these parameters, the cases with  $CFU_b = 0$ , i.e. the cases in which no bacteria had been isolated, were discarded and the total number ( $N$ ) is the actual number of participants included in the analyses.

| Средство        | $\bar{X}$ log RF<br><i>Streptococcus mutans</i> | $\bar{X}$ log RF<br><i>Lactobacillus species</i> |
|-----------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Aqua fresh®     | 4,17                                            | 3,83                                             |
| Водородпероксид | 2,92                                            | 2,00                                             |

**Table 5.** Summary representation of the reduction factors of the used agents



**A** – Aqua fresh®      **H** – Hydrogen

**Chart 1.** Summary representation of the reduction factors of the used agents

The results of the comparison of the examined agents regarding their efficacy in the reduction of cariogenic bacteria are shown in Table 6. The analysis was done with the Wilcoxon matched-pairs test with a level of significance  $p = 0,05$ .

|                        | <i>Streptococcus mutans</i><br><i>Aquafresh/hydrogen</i> | <i>Lactobacillus species</i><br><i>Aquafresh/hydrogen</i> |
|------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| збир на позитивни низи | 146                                                      | 202,5                                                     |
| збир на негативни низи | -25                                                      | -20,5                                                     |

**Table 6.** Wilcoxon test on statistical significance for the mouth rinse and the hydrogen 3%

The statistical analysis of the differences in the value for *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus species* showed, with a statistical significance of  $p < 0,05$ , a much higher efficacy of the Aqua fresh® agent than of hydrogen peroxide 3%.

## Discussion

The positive effect of mouth rinses on cariogenic oral flora above all, plaque and gingivitis, has been shown in numerous scientific studies.<sup>2,11,12,17,18</sup> By analysing the results of the effects of the Aqua fresh® mouthwash in the reduction of salivary cariogenic bacteria we concluded that the highest number of participants have a reduction of 10 000 and more (17 for *Streptococcus mutans* and 14 for *Lactobacillus species*), while the number of participants in which no reduction was noticed is very low and amounts to one participant for *Streptococcus mutans* and two for *Lactobacillus species*. These results are in accordance with the results obtained by Radford et al.,<sup>2</sup> Pitten & Kramer,<sup>11</sup> Van Steenberghe et al.<sup>12</sup> Jenkins et al.,<sup>17</sup> and Mandel<sup>18</sup> regarding the action of cetylpyridinium chloride on the count of cariogenic microorganisms.

Hydrogen peroxide was also one of the antimicrobial agents included in our study. This compound has a strongly pronounced bactericidal effect and has been widely applied in cariology, endodontology and parodontology. Dentists use most frequently the 3%-concentration of hydrogen peroxide, which acts in a bactericidal way and which has a positive effect regarding the reduction of the indices of gingivitis and plaque. In this percentage people rarely use it at their homes, but it can be found as the ingredient of some mouth rinses.<sup>13,14,16,19</sup>

When the effect of hydrogen peroxide 3% in the reduction of the count of salivary cariogenic microorganisms is presented through the logarithmic reduction factor, the highest number of participants have a logarithmic reduction factor of 3, i.e. a reduction factor of 1 000 of the count of *Streptococcus mutans*, and a logarithmic reduction factor of 2, i.e. a reduction factor of 100 of the count of *Lactobacillus species*. The better effect of this agent against *Streptococcus mutans* was also confirmed by the number of participants who have a logarithmic reduction factor greater of or equal to 4. There are 6 participants in this group, in contrast to no patients with such a factor for the *Lactobacillus species*. There are very few studies in the literature which deal with the effect of hydrogen peroxide on salivary cariogenic microorganisms. To a certain extent this is to be expected because the main antimicrobial role of

hydrogen peroxide is its destructive action against anaerobic microorganisms by the released nascent oxygen.<sup>20-22</sup> In addition to its bactericidal action, hydrogen peroxide has also chemostatical, mechanical, decolorisin and deodorising effects.<sup>20-22</sup>

The analyses of the results obtained in the form of the average values of the logarithmic reduction factors of the examined agents speak of a greater reduction factor, i.e. a stonger action against the two examined cariogenic bacteria, of the Aqua fresh® mouth rinse, which reduces the count of *Str. mutans* by a factor of more than 10 000 (log RF = 4,17) and the count of *Lactobacillus spp.* by a factor of almost 10 000 (log RF = 3,83), which i better than the action of hydrogen peroxid 3%, which reduces the count of *Str. mutans* by a factor of almost 1 000 (log RF = 2,92) and the count of *Lactobacillus spp.* by a factor of exactly 100 (log RF = 2,00).

In order to compare the examined agents regarding their efficacy in the reduction of cariogenic bacteria, we performed the Wilcoxon matched-pairs test. From the results obtained from the comparison of the agents we can conclude that the Aqua fresh® mouth rinse showed, a statistically highly significant difference in respect to the 3%-concentration of hydrogen peroxide,  $p < 0,05$ , which implies also a higher efficacy in the reduction of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus spp.* as well.

Although a number of mouth rinses having different ingredients and made by different manufacturers are available in many shops and pharmacies, mouth rinses are scarcely used in our country. However, the uncontrolled use of mouth rinses and the uncontrolled use of other agents with antimicrobial effects may also lead to other problems. One of these problems is the destruction of the normal flora, which may be dangerous because resistant microorganisms and yeasts, especially *Candida albicans*, can “inhabit” the “sterilised” mouth cavity. Thus, the question arises regarding the “ideal” antimicrobial agent, which would act only against the pathogenic microorganisms, or more specifically, only against the oral microflora whose important role in causing dental caries is definitely known.

## Conclusion

The effect of the mouth rinse with an antimicrobial component is statistically highly significant in the reduction of the total salivary flora, whereas the action of hydrogen peroxide 3% is statistically significant regarding the reduction of aerobic microorganisms, and statistically highly significant regarding the reduction of anaerobic salivary microorganisms. After the use of both agents a significant reduction was found of the count of the cariogenic salivary microorganisms *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus species*. Both analised agents have a more pronounced action in the reduction of *Streptococcus mutans* than in the reduction of *Lactobacillus species*. Therefore, the active inclusion of mouth rinses with active antimicrobial components is recommended in the implementation of the anticariogenic programme.

**Литература / References**

1. Choo A, Delac DM, Messer LB. Oral hygiene measures and promotion: review and considerations. Aust Dent J 2001; 46(3): 166-73.
2. Radford JR, Beighton D, Nugent Z, Jackson RJ. Effect of use of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthwash on normal oral flora. J Dent 1997; 25(1): 35-40.
3. Block SS. Disinfection, Sterilization and Preservation. Fourth Edition. Philadelphia – London: Lea & Febiger, 1991.
4. DePaola LG, Minah GE, Overholser CD, Meiller TF, Charles CH, Harper DS, McAlary M. Effect of an antiseptic mouthrinse on salivary microbiota. Am J Dent 1996; 9(3): 93-5.
5. Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects of salivary bacteria. J Periodontol 1996; 67(6): 572-6.
6. Embery G, Rölla G. Clinical and Biological Aspects of Dentifrices. Oxford. Oxford University Press, 1992.
7. Fine D. Evaluation of antimicrobial mouthrinses and their bactericidal effectiveness. J Am Dent Assoc 1994; 125 Suppl 2: 11S-19S.
8. Fine DH, Furgang D, Lieb R, Korik I, Vincent JW, Barnett ML. Effects of sublethal exposure to an antiseptic mouthrinse on representative plaque bacteria. J Clin Periodontol 1996; 23(5): 444-51.
9. Giertsen E, Bowen WH, Pearson SK. Combined effects of Zn(2+)-chlorhexidine and Zn(2+)-cetylpyridinium chloride on caries incidence in partially desalivated rats. Scand J Dent Res 1991; 99(4): 301-9.
10. Jenkins S, Addy M, Newcombe RG. A comparison of cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque regrowth. J Clin Periodontol 1994; 21(6): 441-4.
11. Pitten FA, Kramer A. Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. Arzneimittelforschung 2001; 51(7): 588-95.
12. Van Steenberghe D, Avontroodt P, Peeters W, Pauwels M, Coucke W, Lijnen A, Quirynen M. Effect of different mouthrinses on morning breath. J Periodontol 2001; 72(9): 1183-91.
13. Marshall MV, Cancro LP, Fischman SL. Hydrogen peroxide: a review of use in dentistry. J Periodontol 1995; 66(9): 786.
14. Jones CM, Blinkhorn AS, White E. Hydrogen peroxide: the effect on plaque and gingivitis when used in an oral irrigator. Clin Prev Dent 1990; 12(5): 15-18.
15. Miyasaki KT, Genco RJ, Wilson ME. Antimicrobial properties of hydrogen peroxide and sodium bicarbonate individually and in combination against selected oral gram-negative facultative bacteria. J Dent Res 1986; 65(9): 1142-8.
16. Tombes MB, Gallucci B. The effects of hydrogen peroxide rinses on the normal oral mucosa. Nurs Res 1993; 42(6): 332-7.
17. Jenkins S, Addy M, Wade W, Newcombe RG. The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. J Clin Periodontol 1994; 21(6): 397-401.



18. Mandel ID. Antimicrobial mouthrinse: overview and update. J Am Dent Assoc 1994; 125 Suppl 2: 2S-10S.
19. Fischman SL, Truelove RB, Hart R, Cancro LP. The laboratory and clinical safety evaluation of a dentifrice containing hydrogen peroxide and baking soda. J Clin Dent 1992; 3(4): 104.
20. Dimkov A, Iljovska S, Pavlevska M, Stefanov R, Jovanovska M. Antibaktersiko dejstvo na  $\text{SnF}_2$  vo plunkata. XV kongres na lekarite na Makedonija. Kniga na apstrakti. Ohrid, 1999:51.
21. Dimkov A, Panovski N, Iljovska S, Pavlevska M, Jovanovska M. Vlijanie na benzalkoniumhloridot vrz kariogenite bakterii i vkupniot broj na mikroorganizmi vo plunkata. III kongres na stomatolozi od Makedonija. Kniga na apstrakti. Ohrid, 2002:139.
22. Sutalo J. i suradnici Patologija i terapija tvrdih zubnih tkiva. Zagreb: naklada Zadro, 1994.