

Сравнительное исследование *In Vitro* (лат., в пробирке – прим. пер.) по определению бактерицидной активности стабилизированного диоксида хлора и других ополаскивателей для рта

David Drake, MS, PhD Alissa L. Villhauer, BS
Dows Institute for Dental Research

College of Dentistry, University of Iowa
Iowa City, IA, USA

Аннотация

- **Задача:** Исследование было проведено с целью определения бактерицидной активности перорального полоскания со стабилизированным диоксидом хлора (ClōSYS® Oral Rinse) по сравнению с продуктами, доступными в настоящее время на рынке.
- **Методы:** Оральные бактерии, связанные с гингивитом и периодонтитом, подвергались полосканию в течение одной минуты и пяти минут. Количество колониеобразующих единиц на миллилитр (КОЕ / мл) измеряли до и после воздействия для определения бактерицидной активности.
- **Результаты:** Как и ожидалось, Listerine® и Crest® Pro-Health™ продемонстрировали полное уничтожение всех бактерий, подвергшихся воздействию в течение одной минуты. Breath Rx® продемонстрировало самые слабые бактерицидные эффекты в целом. Промывки ClōSYS и хлоргексидином оказались идентичными 100%-ным убийствам против пародонтальных патогенов в течение пяти минут; в некоторых случаях полоскание полости рта ClōSYS приводило к более высокой степени уничтожения при отметке в одну минуту, чем полоскание хлоргексидином.
- **Итог:** Результаты показали, что ополаскиватель для полости рта ClōSYS обладает потенциальным терапевтическим эффектом, что делает его превосходным вариантом для обеспечения комплаентности у пациентов, обеспокоенных вкусом и обесцвечиванием зубов во время оральной оздоровительной терапии.

(J Clin Dent 2011;22:1–5)

Вступление

Гингивит - это воспаление десны без нарушения зубодесневого соединения. Предшественником гингивита является биопленка зубного налета, которая не подвергается внешнему воздействию (например чистка зубок – прим. пер). Исследования показали, что гингивит развивается в течение 10–21 дня, если прекратить все гигиенические процедуры в полости рта и позволить налету накапливаться без помех. Гингивит можно предотвратить обычным уходом за полостью рта, но если его не лечить, это может привести к серьезному заболеванию десен, известному как периодонтит. Периодонтит относится к заболеванию, при котором поддерживающие ткани зубов, такие как соединительная и костная ткань и, разрушаются воспалением, вызванным налетом на зубах. Наиболее распространенная форма, известная как хронический периодонтит, поражает примерно 20% взрослого населения США. Недавние исследования в областях геномики, протеомики и метаболомики описали сложные модели с множеством уровней взаимодействия между клеточными и

молекулярными процессами, происходящими от самых низких уровней до уровней ткани, где проявляется клиническое заболевание.

Зубной налет является одним из наиболее узнаваемых предшественников, инициирующих каскад иммунологических медиаторов, который на основе генетического профиля человека и факторов окружающей среды может вызывать эпигенетические реакции и привести к развитию клинических заболеваний полости рта.

Важным изменением во рту, которое происходит при накоплении биопленки из зубного налета является изменение состава микрофлоры полости рта из-за многих факторов, в результате чего в микробных сообществах доминируют анаэробные бактерии. Зубной налет можно рассматривать как биопленку с высоко структурированной, матричной структурой, разнообразной микробной популяцией с множеством различных видов бактерий. Объем и структура биопленки обеспечивают защиту бактерий, находящихся в ней, потенциально снижая эффективность противомикробных препаратов.

Лечение как гингивита, так и хронического периодонтита сосредоточено вокруг облегчения процедуры удаления и разрушения налета биопленки. Для профилактики гингивита двухразовая чистка полости обычно обеспечивает должный уровень гигиены. Типичные вмешательства обычно включают в себя указания по гигиене полости рта, за которыми следует тщательная работа под десной (например, масштабирование и строгание корней). Рецепты для полоскания рта, такие как содержащие глюконат хлоргексидина, являются эффективными средствами лечения гингивита, но не предназначены для длительного применения, могут окрашивать зубы и иметь неприятный вкус. Примером безрецептурного средства для полоскания рта является Listerine® (McNeal-PPC Inc., Morris Plains, Нью-Джерси, США), который получил одобрение Американской Стоматологической Ассоциации в качестве средства против зубного налета и гингивита. Однако высокое содержание алкоголя и резкий вкус препарата могут быть неприятными для некоторых потребителей. В продаже имеется ополаскиватель со стабилизированным диоксидом хлора (ClōSYS® Oral Rinse, Rowpar Pharmaceuticals Inc., Скоттсдейл, Аризона, США), который не окрашивает зубы и не имеет резкого вкуса, но обеспечивает аналогичную антибактериальную эффективность.

Стабилизированный диоксид хлора представляет собой смесь с антимикробными свойствами против бактерий полости рта. Клинические и лабораторные данные свидетельствуют о том, что полоскание рта стабилизированным диоксидом хлора уменьшает количество бактерий во рту, по существу устраняет неприятный запах изо рта, уменьшает признаки заболевания десен и обладает бактерицидными свойствами, сопоставимыми с другими продуктами, с дополнительной приемлемостью для потребителя, связанной с его безалкогольностью и бесцветностью. Хотя исследование, о котором здесь сообщается, не оценивало отбеливание, в литературе нет сообщений о каком-либо окрашивании или обесцвечивании при использовании этого продукта.

Цель этого исследования состояла в том, чтобы сравнить *in vitro* (в пробирке, прим. пер) бактерицидную активность стабилизированного ополаскивателя с диоксидом хлора с несколькими другими коммерчески доступными оральными ополаскивателями. Оральные бактерии, связанные с заболеванием полости рта, оцениваемые в этом исследовании, включали:

<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	

Другие тестируемые бактерии, не связанные с заболеванием полости рта, но представляющие собой условно-патогенные микроорганизмы для общего состояния здоровья, включали *Klebsiella pneumoniae*

(внутрибольничные инфекции), *Pseudomonas aeruginosa* (внутрибольничные инфекции), *Staphylococcus aureus* (системные инфекции) и гемофильный грипп (системные инфекции).

Оценка данных

Из-за очень большого количества оцениваемых микроорганизмов и применения кинетического подхода было бы трудно включить несколько повторов экспериментов, а отличия в полученных данных были существенными, и это было воспринято как четкий индикатор различий между изучаемыми продуктами без выведенной статистики.

Материалы и Методы

Для определения бактерицидной активности каждого полоскания полости рта использовался метод бактерицидной кинетики с временным уничтожением. Пятьдесят миллилитров питательного бульона инокулировали бактериальным бульоном (от 0,1 до 0,5 мл) и запустили инкубирование в соответствии с требованиями культуры, специфичными для каждого тестируемого вида бактерий.

После инкубации клетки собирали центрифугированием (7500G) и ресуспендировали в растворе Баттерфилда. Абсорбцию измеряли на спектрофотометре при 660А, и регулировали суспензии для достижения желаемой концентрации анализа (10^7 КОЕ / мл) применительно к заранее определенным стандартным кривым для каждого организма. Чистота культуры была подтверждена окрашиванием по Граму.

Стандартизированные суспензии подвергали воздействию каждого продукта для полоскания полости рта: ClōSYS, Listerine, Crest® Pro-Health™ (Procter & Gamble, Цинциннати, Огайо, США); Breath Rx® (Discus Dental, Калвер-Сити, Калифорния, США); и Peridex® (3M ESPE, Панорама Сити, Калифорния, США). Бактерицидную активность определяли следующим образом: сто миллилитров каждого экспериментального ополаскивателя пипеткой переносили в отдельный стерильный стакан на 250 мл, содержащий мешалку, и помещали на специальную пластину при медленном перемешивании. Затем в стакан добавляли десять миллилитров бактериальной суспензии и запускали таймер.

Пробы в один миллилитр брали через одну минуту и через пять минут. Каждый образец добавляли к девяти миллилитрам Neutralizing Broth® (Neogen Corporation, Лансинг, Мичиган, США), чтобы остановить действие ополаскивателя, и из этих пробирок отбирали 10^{-1} смеси для анализа. Образец на исходном уровне анализировали для каждой смеси сразу после добавления бактерий в буфер Баттерфилда (отрицательный контроль).

После того, как эта процедура была выполнена для всех ополаскивателей, каждую пробирку помещали в спираль на соответствующую среду для каждого организма с использованием системы Autoplate 4000® (Advanced Instruments Inc., Норвуд, Массачусетс, США). Чашки с агаром инкубировали в течение 24–96 часов либо в 5% CO₂, либо в анаэробных условиях (камера Кой). Определение количества жизнеспособных бактерий в пробирках для анализа в моменты времени было выполнено в соответствии со стандартной методикой спирального нанесения. Исходные значения были преобразованы в значения log₁₀ (сокращение, принятое для

обозначения снижения количества вирусов/микроорганизмов) для выравнивания отклонений в данных.

Результаты

В таблице I показана бактерицидная активность (логарифмическое снижение по сравнению с исходным уровнем), наблюдаемая при различных полосканиях в течение одной и пяти минут. Бактерицидные данные показывают, что полоскание полости рта ClōSYS проявляет сильную бактерицидную активность в отношении спектра оральных бактерий и других условно-патогенных микроорганизмов. За исключением *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis* и *Pseudomonas aeruginosa*, ClōSYS убил все бактерии в ходе исследования. В большинстве опытов бактерии уничтожались в течение первой минуты воздействия.

В большинстве случаев оральное полоскание с использованием стабилизированного диоксида хлора, используемого в ClōSYS полностью уничтожало бактерии в течение одной минуты; в течение пяти минут он полностью убивал *Actinomyces viscosus* и уменьшал количество бактерий *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis* и *Pseudomonas aeruginosa*. Listerine показал полное уничтожение всех бактерий в течение одной минуты, а хлоргексидин в течение пяти минут. Crest Pro-Health полностью убил золотистого стафилококка за пять минут и всех остальных за первую минуту. Breath Rx в целом показал самые слабые уровни бактерицидной активности, показав полное уничтожение *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens* и *Haemophilus influenzae* в течение одной минуты, а *Streptococcus sanguinis* и *Pseudomonas aeruginosa* только через пять минут. ClōSYS по сравнению с другими опробованными ополаскивателями: бактерицидная активность ClōSYS

превосходила активность хлоргексидина в первую минуту для *Actinomyces naeslundii* (участвующего в заболеваниях пародонта и эндодонтических инфекциях) и *Peptostreptococcus micros* (обнаруживается при заболеваниях пародонта). Для *Streptococcus mutans* (который вызывает кариес) и *Actinomyces viscosus* (связанный с оральными инфекциями) бактерицидная активность была выше для хлоргексидина в пробе первой минуты, но к пяти минутам образцы ClōSYS и хлоргексидина показали идентичное 100% уничтожение тестируемых суспензий.

С *Porphyromonas gingivalis* (сильная связь с прогрессированием хронического периодонтита), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (этиологический агент для локализованного агрессивного периодонтита), *Actinomyces odontolyticus* (связанный с глубоким кариесом и хроническим периодонтитом) и *Prevotella nigrescens* (обнаруживается при эндодонтических инфекциях) ClōSYS и хлоргексидин достигли 100% гибели в первую минуту.

ClōSYS убил все бактерии в исследовании, за исключением *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis* и *Pseudomonas aeruginosa*. Было обнаружено, что ClōSYS проявляет большую бактерицидную активность по сравнению с другими ополаскивателями против золотистого стафилококка, который не обязательно является оральным патогеном, но является возбудителем стафилококковых инфекций, проявляя 100%-ную гибель в течение первой минуты воздействия.

Обсуждение

Бактерии в зубном налете являются основными этиологическими агентами, вызывающими несколько заболеваний полости рта, включая гингивит и периодонтит. Именно на этапе поддержания гигиены полости рта неинвазивные безрецептурные продукты особенно полезны для снижения образования биопленок зубного налета на поверхности зубов и снижения риска заболеваний полости рта.

Таблица I

Бактерицидная активность в течение одной минуты и пяти минут от базовой линии (0 минут)

Бактерия		Log10 (CFU/ml)			Log10 Reduction (CFU/ml) From Baseline	
		Минуты			1	5
		0	1	5		
<i>A. viscosus</i>	Baseline					
	ClōSYS	6.064	3.778	0.000	2.286	6.064
	Listerine	6.064	0.000	0.000	6.064	6.064
	Crest Pro-Health	6.064	0.000	0.000	6.064	6.064
	Breath Rx	6.064	4.869	3.647	1.195	2.417
	Peridex	6.064	2.301	0.000	3.763	6.064
<i>S. oralis</i>	Butterfield's Buffer	6.064	5.893	5.967	0.171	0.097
	ClōSYS	7.033	6.957	6.802	0.076	0.231
	Listerine	7.033	0.000	0.000	7.033	7.033
	Crest Pro-Health	7.033	0.000	0.000	7.033	7.033
	Breath Rx	7.033	6.090	4.511	0.944	2.523
	Peridex	7.033	2.301	0.000	4.732	7.033

The Journal of Clinical Dentistry

	Butterfield's Buffer	7.033	7.090	7.158	- 0.056	- 0.125
<i>E. faecalis</i>	ClōSYS	6.199	6.104	4.809	0.095	1.390
	Listerine	6.199	0.000	0.000	6.199	6.199
	Crest Pro-Health	6.199	0.000	0.000	6.199	6.199
	Breath Rx	6.199	6.086	5.953	0.112	0.246
	Peridex	6.199	5.064	0.000	1.134	6.199
	Butterfield's Buffer	6.199	6.299	6.217	- 0.100	- 0.019
<i>S. sanguinis</i>	ClōSYS	5.241	5.199	4.556	0.042	0.684
	Listerine	5.241	0.000	0.000	5.241	5.241
	Crest Pro-Health	5.241	0.000	0.000	5.241	5.241
	Breath Rx	5.241	3.881	0.000	1.360	5.241
	Peridex	5.241	0.000	0.000	5.241	5.241
	Butterfield's Buffer	5.241	5.255	5.394	- 0.015	- 0.154
<i>A. odontolyticus</i>	ClōSYS	6.225	0.000	0.000	6.225	6.225
	Listerine	6.225	0.000	0.000	6.225	6.225
	Crest Pro-Health	6.225	0.000	0.000	6.225	6.225
	Breath Rx	6.225	6.127	4.680	0.098	1.545
	Peridex	6.225	0.000	0.000	6.225	6.225
	Butterfield's Buffer	6.225	6.199	6.223	0.027	0.003
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	ClōSYS	6.984	0.000	0.000	6.984	6.984
	Listerine	6.984	0.000	0.000	6.984	6.984
	Crest Pro-Health	6.984	0.000	0.000	6.984	6.984
	Breath Rx	6.984	0.000	0.000	6.984	6.984
	Peridex	6.984	0.000	0.000	6.984	6.984
	Butterfield's Buffer	6.984	6.894	6.894	0.090	0.090
<i>A. naeslundii</i>	ClōSYS	6.140	0.000	0.000	6.140	6.140
	Listerine	6.140	0.000	0.000	6.140	6.140
	Crest Pro-Health	6.140	0.000	0.000	6.140	6.140
	Breath Rx	6.140	5.477	4.358	0.663	1.782
	Peridex	6.140	3.204	0.000	2.936	6.140
	Butterfield's Buffer	6.140	6.061	6.017	0.079	0.123
<i>S. mutans</i>	ClōSYS	6.588	6.378	0.000	0.209	6.588
	Listerine	6.588	0.000	0.000	6.588	6.588
	Crest Pro-Health	6.588	0.000	0.000	6.588	6.588
	Breath Rx	6.588	6.253	6.190	0.335	0.397
	Peridex	6.588	0.000	0.000	6.588	6.588
	Butterfield's Buffer	6.588	6.425	6.529	0.163	0.059

(продолжение на след. странице)

Таблица I (продолжение предыдущей страницы)

Бактерицидная активность в течение одной минуты и пяти минут от базовой линии (0 минут)

Бактерия	Log10 (CFU/ml)			Log10 Reduction (CFU/ml) From Baseline	
	Минуты			1	5
	0	1	5		
<i>P. gingivalis</i>					

The Journal of Clinical Dentistry

	ClōSYS	7.628	0.000	0.000	7.628	7.628
	Listerine	7.628	0.000	0.000	7.628	7.628
	Crest Pro-Health	7.628	0.000	0.000	7.628	7.628
	Breath Rx	7.628	0.000	0.000	7.628	7.628
	Peridex	7.628	0.000	0.000	7.628	7.628
	Butterfield's Buffer	7.628	7.631	7.669	-0.003	-0.041
<i>P. micros</i>	ClōSYS	6.621	0.000	0.000	6.621	6.621
	Listerine	6.621	0.000	0.000	6.621	6.621
	Crest Pro-Health	6.621	0.000	0.000	6.621	6.621
	Breath Rx	6.621	6.173	5.124	0.448	1.497
	Peridex®	6.621	3.380	0.000	3.241	6.621
	Butterfield's Buffer	6.621	6.674	6.573	-0.053	0.048
<i>P. nigrescens</i>	ClōSYS	6.314	0.000	0.000	6.314	6.314
	Listerine	6.314	0.000	0.000	6.314	6.314
	Crest Pro-Health	6.314	0.000	0.000	6.314	6.314
	Breath Rx	6.314	0.000	0.000	6.314	6.314
	Peridex	6.314	0.000	0.000	6.314	6.314
	Butterfield's Buffer	6.314	6.267	5.922	0.047	0.392
<i>K. pneumoniae</i>	ClōSYS	6.528	0.000	0.000	6.528	6.528
	Listerine	6.528	0.000	0.000	6.528	6.528
	Crest Pro-Health	6.528	0.000	0.000	6.528	6.528
	Breath Rx	6.528	5.831	4.982	0.697	1.546
	Peridex	6.528	0.000	0.000	6.528	6.528
	Butterfield's Buffer	6.528	6.613	6.615	-0.085	-0.087
<i>P. aeruginosa</i>	ClōSYS	5.851	3.301	2.903	2.550	2.948
	Listerine	5.851	0.000	0.000	5.851	5.851
	Crest Pro-Health	5.851	0.000	0.000	5.851	5.851
	Breath Rx	5.851	4.000	0.000	1.851	5.851
	Peridex	5.851	0.000	0.000	5.851	5.851
	Butterfield's Buffer	5.851	5.771	5.771	0.080	0.080
<i>S. aureus</i>	ClōSYS	5.380	0.000	0.000	5.380	5.380
	Listerine	5.380	0.000	0.000	5.380	5.380
	Crest Pro-Health	5.380	2.602	0.000	2.778	5.380
	Breath Rx	5.380	5.121	4.310	0.260	1.071
	Peridex	5.380	3.531	0.000	1.849	5.380
	Butterfield's Buffer	5.380	5.334	5.365	0.046	0.015
<i>H. influenzae</i>	ClōSYS	5.025	0.000	0.000	5.025	5.025
	Listerine	5.025	0.000	0.000	5.025	5.025
	Crest Pro-Health	5.025	0.000	0.000	5.025	5.025
	Breath Rx	5.025	0.000	0.000	5.025	5.025
	Peridex	5.025	0.000	0.000	5.025	5.025
	Butterfield's Buffer	5.025	5.064	4.991	-0.039	0.035

Бактерицидная активность орального полоскания стабилизированным диоксидом хлора ClōSYS позволяет предположить, что он обладает бактерицидным действием против бактерий полости рта, связанных с гингивитом и периодонтитом, а также с другими условно-патогенными микроорганизмами. Результаты согласуются с

предыдущими исследованиями по оценке орального полоскания стабилизированного диоксида хлора против полимикробных суспензий и биопленочных сред. Продукты ClōSYS были впервые исследованы для лечения периодонтита в качестве дополнительной терапии к скейлингу (глубокая профессиональная чистка зубов) и

очистки корней (снятие поддесневых отложений). Два опубликованных клинических исследования были проведены для оценки влияния полоскания стабилизированным диоксидом хлора и зубной пасты с тем же активным компонентом на гингивит и мягкие

ткани полости рта. Исследование требовало, чтобы субъекты использовали ополаскиватель дважды в день. Пародонтит и пародонтальные карманы были измерены и оценены. Значительный процент карманов (67,4%) был снижен с ≥ 4 мм до ≤ 3 мм в среднем за 3,4 месяца.

Второе ретроспективное клиническое исследование было выполнено для сравнения числа кровотечений на участках исследования с карманами в 4 мм или более, с использованием и неиспользованием системы полоскания рта и зубной пасты ClōSYS. Ополаскиватель и зубная паста, используемые вместе между визитами по гигиене зубов, показали среднее уменьшение мест кровотечения на 71,85%. Небольшое количество участников прекратило использование продуктов и это показало увеличение мест кровотечения на 157%. Когда продукты были возвращены к использованию, кровотечение снова сократилось до 44%.

Кроме того, исследования *in vitro* продемонстрировали микробицидную активность ополаскивателя ClōSYS в отношении различных оральных патогенов. Эти исследования показали, что ополаскиватель полости рта ClōSYS убивает бактерии, связанные с развитием и / или прогрессированием заболеваний полости рта до 99% за 10 секунд, и что этот ополаскиватель менее токсичен, чем хлоргексидин, для клеток десны человека *in vitro*. Было проведено дополнительное исследование, которое оценило инфекционный контроль в стоматологическом кабинете при применении ополаскивателя в качестве лаважа при ультразвуковой чистки зубов. Это исследование установило, что ClōSYS безопасно для пациента снижает бактериальную обсемененность кабинета (микробные аэрозоли) на 60%.

Ополаскиватель для полости рта ClōSYS показал меньшую бактерицидную активность в отношении некоторых тестируемых микроорганизмов, чем хлоргексидин и Листерин. Тем не менее, трудно сделать прямую экстраполяцию результатов в отношении уровня эффективности ополаскивателя на бактерии, находящиеся в биопленке зубов методами, использованными в этом исследовании. Это важный первый шаг, который дает ценную информацию об относительных уровнях активности против бактерий полости рта в стандартизированных лабораторных условиях. Бактерицидный кинетический подход был предпринят, чтобы получить значимые данные относительно кратковременного воздействия ополаскивания полости рта на организмы. Ясно, что необходимо проводить более сложные лабораторные оценки с участием полимикробных биопленок и режима многократного воздействия. Фактически, мы провели многие из этих экспериментов и сообщили об этих результатах на национальных совещаниях. Конечно, необходимо провести хорошо спланированные клинические испытания, чтобы адекватно оценить влияние этих полосканий на флору полости рта в течение более длительного периода времени. Тогда мы сможем выявить действительно клинически значимые изменения в составе флоры, которые могут вызвать заболевания полости рта.

Благодаря своим сильным свойствам против бактерий полости рта, которые, как известно, являются этиологическими агентами инфекций пародонта и эндодонтии, а также кариеса и стафилококковых инфекций, и его благоприятного поведения по отношению к заживляющим клеткам (фибробластам), ClōSYS занимается целым рядом клинических вопросов гигиены полости рта.

Кроме того, приятные вкусовые характеристики и отсутствие воздействия на цвет десен и зубок делают ClōSYS в сочетании с более низкой стоимостью и безрецептурной продажей более удобным для пациентов по сравнению с его аналогами, отпускаемыми по рецепту. Как безрецептурное полоскание для полости рта, ClōSYS не только соответствует и может превосходить хлоргексидин при применении после процедуры, но также может быть рекомендован для регулярного ухода за полостью рта два раза в день в качестве поддерживающей и профилактической меры против заболеваний полости рта.

В заключение, полоскание для рта стабилизированным диоксидом хлора продемонстрировало сильную бактерицидную активность против бактерий полости рта, которые связаны с инфекциями пародонта и эндодонтии, а также с кариесом зубов и стафилококковыми инфекциями. Он также преодолевает плохой запах изо рта и не несет риска окрашивания зубов, которые традиционно препятствуют соблюдению пациентом режима гигиены полости рта. Как средство для полоскания рта без рецепта ClōSYS обеспечивает более низкую стоимость и удобство, за счет безрецептурного отпуска

Acknowledgment: Funding for this project was provided by Rowpar Pharmaceuticals, Inc.

For correspondence with the author of this paper, contact Dr. David Drake—david-drake@uiowa.edu.

References

1. Grootveld M, Silwood C, Gill D, Lynch E. Evidence for the microbicidal activity of a chlorine dioxide-containing oral rinse formulation *in vivo*. *J Clin Dent* 2001;12:67-70.
2. Ratcliff PA, Bolin V. ClO₂/Phosphate germicide vs. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *J Dent Res* 1992;71(Spec Iss):669.
3. Ratcliff PA, Bolin V. Germicidal effect of povidone-iodine and ClO₂ on dental pathogens. *J Dent Res* 1992;71(Spec Iss):189.
4. Villhauer A, Drake DR. Novel ClōSYSII oral rinse: Comparison of bactericidal activity. *J Dent Res* 2010;89(Spec Iss):378.
5. Chapek C, Reed O, Ratcliff P. Management of periodontitis with oral-care products. *Compend Contin Educ Dent* 1994;15:740-746.
6. Chapek C, Reed O, Ratcliff P. Reduction of bleeding on probing with oralcare products. *Compend Contin Educ Dent* 1995;16:188-196.
7. Wirthlin MR, Ahn BJ, Enriquez B, Hussain MZ. Effects of stabilized chlorine dioxide and chlorhexidine mouthrinses *in vitro* on cells involved in periodontal healing. *Periodontol Abstr* 2006;54:67-71.

The Journal of Clinical Dentistry

8. Wirthlin MR, Choi JH, Kye SB. Use of chlorine dioxide mouthrinses as the ultrasonic scaling lavage reduces the viable bacteria in the general aerosols. *Periodontal Abstr* 2006;54:35-44.
9. Drake DR, Villhauer A, Olson B. Bacterial activity of stabilized chlorine dioxide against polymicrobial biofilms. *J Dent Res* 2009;88(Spec Iss):3417.

An *In Vitro* Comparative Study Determining Bactericidal Activity of Stabilized Chlorine Dioxide and Other Oral Rinses

David Drake, MS, PhD Alissa L. Villhauer, BS

Dows Institute for Dental Research
College of Dentistry, University of Iowa
Iowa City, IA, USA

Abstract

- **Objective:** The study was conducted to determine the bactericidal activity of a stabilized chlorine dioxide oral rinse (ClO₂SYS[®] Oral Rinse) compared to products currently available on the market.
- **Methods:** Oral bacteria associated with gingivitis and periodontitis were exposed to rinses for one minute and five minutes. The numbers of colony forming units per milliliter (CFU/ml) were measured prior to and following exposure to determine the bactericidal activity.
- **Results:** As expected, Listerine[®] and Crest[®] Pro-Health[™] demonstrated complete kill on all bacteria exposed within one minute. Breath Rx[®] exhibited the weakest levels of bactericidal effects overall. ClO₂SYS and chlorhexidine rinses proved identical 100% kills against the periodontal pathogens at five minutes; in some cases, ClO₂SYS oral rinse achieved a higher kill at the one-minute mark over the chlorhexidine rinse.
- **Conclusion:** The results demonstrated that ClO₂SYS Oral Rinse has potential for providing a therapeutic benefit, making it an attractive option to induce compliance in patients concerned about taste and tooth discoloration during oral health therapy.

(J Clin Dent 2011;22:1-5)

Introduction

Gingivitis is the presence of gingival inflammation without loss of connective tissue attachment. The precursor to gingivitis is undisturbed dental plaque biofilms. Studies have shown that gingivitis will develop within 10-21 days if all oral hygiene practices are stopped and plaque is allowed to accumulate undisturbed. Gingivitis is preventable by routine oral care, but if untreated may lead to a severe gum disease known as periodontitis. Periodontitis refers to a disease condition in which supporting tissues of the teeth, such as connective tissue and bone, are destroyed by plaque-induced inflammation. The most common form, known as chronic periodontitis, affects approximately 20% of the US adult population. Recent studies using genomics, proteomics, and metabolomics have described complex models with multiple levels of interactions between cellular and molecular processes occurring from the lowest levels to the tissue levels where clinical disease is manifested.

Plaque is one of the most recognizable precursors initiating a cascade of immunological mediators which, based on a person's genetic profile and environmental factors, can elicit epigenetic responses and lead to the development of clinical oral disease. An important change in the mouth within plaque biofilm communities is the shift in the composition of the microflora due to many factors, which results in microbial communities dominated by anaerobic bacteria. Plaque can be considered as a characteristic biofilm with a highly structured, matrix-embedded, diverse microbial population with many various bacterial species. The volume and structure of the biofilm provides protection to bacteria housed within it, potentially reducing the efficacy of antimicrobials.

Treatment of both gingivitis and chronic periodontitis is designed to facilitate the frequent removal and disruption of plaque biofilms. For gingivitis, effective home oral hygiene practices on

a twice-daily basis usually provide a sufficient standard of care. Typical interventions usually include oral hygiene instructions followed by thorough subgingival debridement (e.g., scaling and root planing). Prescription mouthrinses, such as those containing chlorhexidine gluconate, are effective treatments for gingivitis, but are not intended for long-term use, may stain teeth, and have an unpleasant taste. An example of a non-prescription mouthrinse is Listerine[®] (McNeal-PPC Inc., Morris Plains, NJ, USA), which has been granted the American Dental Association seal of approval as an antiplaque and antigingivitis product. However, the high alcohol content and harsh taste of the formulation can be unpleasant for some consumers. A stabilized chlorine dioxide rinse is commercially available (ClO₂SYS[®] Oral Rinse, Rowpar Pharmaceuticals Inc., Scottsdale, AZ, USA) that does not stain teeth or have a harsh taste, yet offers a similar antibacterial efficacy.

Stabilized chlorine dioxide is a compound with antimicrobial properties against oral bacteria.¹⁻⁴ Clinical and laboratory evidence suggest that stabilized chlorine dioxide oral rinse reduces the number of bacteria in the mouth, essentially eliminates oral malodor, reduces the signs of gum disease, and has bactericidal properties comparable to other products with additional consumer acceptability relating to its non-alcoholic and non-staining features. While the study reported here did not assess whitening, there are no reports in the literature of any staining or discoloration from use of this product.

The objective of this study was to compare *in vitro* bactericidal activity of a stabilized chlorine dioxide oral rinse to several other commercially available oral rinses. Oral bacteria associated with oral disease evaluated in this study included:

<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>

Streptococcus sanguinis *Peptostreptococcus micros*
Actinomyces odontolyticus *Prevotella nigrescens*
Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Additional bacteria tested not associated with oral disease, but pose as opportunistic pathogens to overall health, included *Klebsiella pneumonia* (nosocomial infections), *Pseudomonas aeruginosa* (nosocomial infections), *Staphylococcus aureus* (systemic infections), and *Haemophilus influenzae* (systemic infections).

Data Assessment

Due to the very large number of organisms assessed and the kinetic approach, it would have been difficult to include multiple replicates and the differences are also large, and this was taken as a clear indicator of differences between the products studied without inferential statistics.

Materials and Methods

A time-kill bactericidal kinetics approach was used to determine bactericidal activity of each oral rinse. Fifty milliliters of nutrient broth were inoculated with bacterial stock (0.1 to 0.5 ml) and incubated according to culture requirements specific to each bacterial species being tested.

Following incubation, cells were harvested by centrifugation (7,500 × g) and re-suspended in Butterfield's Buffer. Absorbance was measured in a spectrophotometer at A660, and suspensions were adjusted to achieve the desired assay concentration (10⁷ CFU/ml) upon reference to predetermined standard curves for each organism. Culture purity was confirmed through gram staining of all cultures.

Standardized suspensions were exposed to each oral rinse product: Cl6SYS, Listerine, Crest® Pro-Health™ (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA); Breath Rx® (Discus Dental, Culver City, CA, USA); and Peridex® (3M ESPE, Panorama City, CA, USA). Bactericidal activity was determined as follows: One-hundred milliliters of each experimental rinse was pipetted into a separate sterile 250 ml beaker containing a stir bar, and placed on a stir plate with slow stirring. Ten milliliters of bacterial suspension were then added to the beaker and a timer was started.

One-milliliter samples were removed at one minute and at five minutes. Each sample was added to nine milliliters of Neutralizing Broth® (Neogen Corporation, Lansing, MI, USA) to stop the action of the rinse, and an additional 10³ dilution was made from these tubes. A sample at baseline was assayed for each mixture immediately after the bacteria were added to the Butterfield's Buffer (negative control).

After this procedure was performed for all rinses, each tube was spiral-plated onto appropriate media for each organism using an Autoplate 4000® system (Advanced Instruments Inc., Norwood, MA, USA). The agar plates were incubated for 24-96 hours in either 5% CO₂, or anaerobically (Coy Chamber). Determination of the numbers of viable bacteria in the assay tubes at the time points was completed following standard spiral-plating methodology. Raw counts were converted to log₁₀ values to equalize variances in the data.

Results

Table I shows the bactericidal activity (log reduction from baseline) observed with the different rinses at one and five minutes. The bactericidal data show that Cl6SYS oral rinse exhibits strong bactericidal activity against a spectrum of oral bacteria and other opportunistic pathogens. With the exception of *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis*, and *Pseudomonas aeruginosa*, Cl6SYS killed all bacteria in the assay. In most runs, bacteria were eliminated within the first minute of exposure.

In most cases the stabilized chlorine dioxide oral rinse, Cl6SYS, completely eliminated bacteria within one minute; it completely killed *Actinomyces viscosus* within five minutes and reduced bacterial counts of *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Listerine showed complete kill on all bacteria within one minute and chlorhexidine within five minutes. Crest Pro-Health completely killed *Staphylococcus aureus* in five minutes and all others within the first minute. Breath Rx exhibited the weakest levels of bactericidal activity overall, showing complete kill on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, and *Haemophilus influenzae* within one minute, and *Streptococcus sanguinis* and *Pseudomonas aeruginosa* only after five minutes.

Cl6SYS compared well with other rinses tested. Bactericidal activity for Cl6SYS surpassed that of the positive control, chlorhexidine, in the first minute for *Actinomyces naestlundii* (involved in periodontal disease and endodontic infections) and *Peptostreptococcus micros* (found in periodontal disease). For *Streptococcus mutans* (which causes caries) and *Actinomyces viscosus* (involved with oral infections), the bactericidal activity was higher for chlorhexidine in a first-minute sample but, by five minutes, Cl6SYS and chlorhexidine samples exhibited identical 100% killing of the test suspensions.

With *Porphyromonas gingivalis* (strong association with the progression of chronic periodontitis), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (etiologic agent for localized aggressive periodontitis), *Actinomyces odontolyticus* (associated with deep dental caries and chronic periodontitis), and *Prevotella nigrescens* (found in endodontic infections), both Cl6SYS and chlorhexidine achieved a 100% kill in the first minute.

Cl6SYS killed all bacteria in the study, with the exception of *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Cl6SYS was observed to exhibit greater bactericidal activity compared to the other rinses against *Staphylococcus aureus*, which is not necessarily an oral pathogen but is the causative agent of staph infections, exhibiting 100% kill within the first minute of exposure.

Discussion

Bacteria in dental plaque are major etiologic agents initiating several oral diseases, including gingivitis and periodontitis. It is during the maintenance phase of oral hygiene that non-invasive over-the-counter products are especially useful in slowing down the formation of dental plaque biofilms on tooth surfaces and reducing the risk of oral disease. The bactericidal activity of stabilized chlorine dioxide oral rinse, Cl6SYS, suggests that it has

Table I
Bactericidal Activity at One Minute and Five Minutes from Baseline (0 Minutes)

Bacteria		Log10 (CFU/ml)			Log10 Reduction (CFU/ml)	
		0	Minutes		From Baseline	
			1	5	1	5
<i>A. viscosus</i>	Baseline					
	CISSYS	6.964	3.778	0.000	2.286	6.964
	Listerine	6.964	0.000	0.000	6.964	6.964
	Crest Pro-Health	6.964	0.000	0.000	6.964	6.964
	Ibreath Rx	6.964	4.869	3.847	1.195	2.417
	Peridex	6.964	2.301	0.000	3.763	6.964
<i>S. orafii</i>	Butterfield's Buffer	6.964	5.893	5.967	0.171	0.097
	CISSYS	7.033	6.957	6.802	0.076	0.231
	Listerine	7.033	0.000	0.000	7.033	7.033
	Crest Pro-Health	7.033	0.000	0.000	7.033	7.033
	Ibreath Rx	7.033	6.090	4.511	0.944	2.523
	Peridex	7.033	2.301	0.000	4.732	7.033
<i>E. faecalis</i>	Butterfield's Buffer	7.033	7.080	7.158	-0.056	-0.125
	CISSYS	6.199	6.104	4.809	0.095	1.390
	Listerine	6.199	0.000	0.000	6.199	6.199
	Crest Pro-Health	6.199	0.000	0.000	6.199	6.199
	Ibreath Rx	6.199	6.086	5.953	0.112	0.246
	Peridex	6.199	5.064	0.000	1.134	6.199
<i>S. aureus</i>	Butterfield's Buffer	6.199	6.299	6.217	-0.100	-0.019
	CISSYS	5.241	5.199	4.556	0.042	0.684
	Listerine	5.241	0.000	0.000	5.241	5.241
	Crest Pro-Health	5.241	0.000	0.000	5.241	5.241
	Ibreath Rx	5.241	3.881	0.000	1.360	5.241
	Peridex	5.241	0.000	0.000	5.241	5.241
<i>A. odontolyticus</i>	Butterfield's Buffer	5.241	5.255	5.394	-0.015	-0.154
	CISSYS	6.225	0.000	0.000	6.225	6.225
	Listerine	6.225	0.000	0.000	6.225	6.225
	Crest Pro-Health	6.225	0.000	0.000	6.225	6.225
	Ibreath Rx	6.225	6.127	4.680	0.098	1.545
	Peridex	6.225	0.000	0.000	6.225	6.225
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Butterfield's Buffer	6.225	6.199	6.223	0.027	0.003
	CISSYS	6.984	0.000	0.000	6.984	6.984
	Listerine	6.984	0.000	0.000	6.984	6.984
	Crest Pro-Health	6.984	0.000	0.000	6.984	6.984
	Ibreath Rx	6.984	0.000	0.000	6.984	6.984
	Peridex	6.984	0.000	0.000	6.984	6.984
<i>A. viscosus</i>	Butterfield's Buffer	6.984	6.894	6.894	0.090	0.090
	CISSYS	6.140	0.000	0.000	6.140	6.140
	Listerine	6.140	0.000	0.000	6.140	6.140
	Crest Pro-Health	6.140	0.000	0.000	6.140	6.140
	Ibreath Rx	6.140	5.477	4.358	0.663	1.782
	Peridex	6.140	3.204	0.000	2.936	6.140
<i>S. aureus</i>	Butterfield's Buffer	6.140	6.061	6.017	0.079	0.123
	CISSYS	6.588	6.378	0.000	0.209	6.588
	Listerine	6.588	0.000	0.000	6.588	6.588
	Crest Pro-Health	6.588	0.000	0.000	6.588	6.588
	Ibreath Rx	6.588	6.253	6.199	0.335	0.397
	Peridex	6.588	0.000	0.000	6.588	6.588
<i>S. aureus</i>	Butterfield's Buffer	6.588	6.425	6.529	0.163	0.059

(continued on next page)

Table 1 (continued from previous page)
Bactericidal Activity at One Minute and Five Minutes from Baseline (0 Minutes)

Bacteria		Log10 (CFU/ml)			Log10 Reduction (CFU/ml)	
		0	Minutes		From Baseline	
			1	5	1	5
<i>P. gingivalis</i>	CLOSYS	7.628	0.000	0.000	7.628	7.628
	Listerine	7.628	0.000	0.000	7.628	7.628
	Crest Pro-Health	7.628	0.000	0.000	7.628	7.628
	Breath Rx	7.628	0.000	0.000	7.628	7.628
	Peridex	7.628	0.000	0.000	7.628	7.628
	Butterfield's Buffer	7.628	7.631	7.669	-0.003	-0.041
<i>P. micra</i>	CLOSYS	6.621	0.000	0.000	6.621	6.621
	Listerine	6.621	0.000	0.000	6.621	6.621
	Crest Pro-Health	6.621	0.000	0.000	6.621	6.621
	Breath Rx	6.621	6.173	5.124	0.448	1.497
	Peridex®	6.621	3.380	0.000	3.241	6.621
	Butterfield's Buffer	6.621	6.674	6.573	-0.053	0.048
<i>P. nigrescens</i>	CLOSYS	6.314	0.000	0.000	6.314	6.314
	Listerine	6.314	0.000	0.000	6.314	6.314
	Crest Pro-Health	6.314	0.000	0.000	6.314	6.314
	Breath Rx	6.314	0.000	0.000	6.314	6.314
	Peridex	6.314	0.000	0.000	6.314	6.314
	Butterfield's Buffer	6.314	6.267	5.922	0.047	0.392
<i>K. pneumoniae</i>	CLOSYS	6.528	0.000	0.000	6.528	6.528
	Listerine	6.528	0.000	0.000	6.528	6.528
	Crest Pro-Health	6.528	0.000	0.000	6.528	6.528
	Breath Rx	6.528	5.831	4.982	0.697	1.546
	Peridex	6.528	0.000	0.000	6.528	6.528
	Butterfield's Buffer	6.528	6.613	6.615	-0.085	-0.087
<i>P. aeruginosa</i>	CLOSYS	5.851	3.301	2.903	2.550	2.948
	Listerine	5.851	0.000	0.000	5.851	5.851
	Crest Pro-Health	5.851	0.000	0.000	5.851	5.851
	Breath Rx	5.851	4.600	0.000	1.851	5.851
	Peridex	5.851	0.000	0.000	5.851	5.851
	Butterfield's Buffer	5.851	5.771	5.771	0.080	0.080
<i>S. aureus</i>	CLOSYS	5.380	0.000	0.000	5.380	5.380
	Listerine	5.380	0.000	0.000	5.380	5.380
	Crest Pro-Health	5.380	2.602	0.000	2.778	5.380
	Breath Rx	5.380	5.121	4.310	0.260	1.071
	Peridex	5.380	3.531	0.000	1.849	5.380
	Butterfield's Buffer	5.380	5.334	5.365	0.046	0.015
<i>H. influenzae</i>	CLOSYS	5.025	0.000	0.000	5.025	5.025
	Listerine	5.025	0.000	0.000	5.025	5.025
	Crest Pro-Health	5.025	0.000	0.000	5.025	5.025
	Breath Rx	5.025	0.000	0.000	5.025	5.025
	Peridex	5.025	0.000	0.000	5.025	5.025
	Butterfield's Buffer	5.025	5.064	4.991	-0.039	0.035

marked bactericidal effects against oral bacteria associated with gingivitis and periodontitis, as well as other opportunistic pathogens. The results are consistent with previous studies evaluating a stabilized chlorine dioxide oral rinse against polymicrobial suspensions and biofilm environments.^{5,9}

CLOSYS products were first investigated for treating and managing periodontitis as an adjunctive therapy to scaling and root

planing. Two published clinical studies were performed to assess the effect of a stabilized chlorine dioxide oral rinse and toothpaste on both gingivitis and oral soft tissue. The research study called for subjects to use the rinse twice daily. Periodontitis and periodontal pockets were measured and evaluated. A significant percentage of the probe scores (67.4%) were reduced from ≥ 4 mm to ≤ 3 mm in an average of 3.4 months.¹

A second retrospective clinical study was performed to compare the number of bleeding on probing sites that measured 4 mm or more with the use versus the non-use of the Cl6SYS oral rinse and toothpaste system. The rinse and toothpaste, used together between dental hygiene recall visits, showed an average reduction of bleeding sites of 71.85%. A small number of participants discontinued use of the products and exhibited increased bleeding sites by 157%. When the products were returned to use, bleeding was again reduced to 44%.²

Additionally, *in vitro* studies demonstrated Cl6SYS oral rinse's microbicidal activity against various oral pathogens.^{3,4,7,9} These studies showed that Cl6SYS oral rinse kills oral bacteria associated with the development and/or progression of oral diseases up to 99% in 10 seconds, and that the oral rinse is less toxic than chlorhexidine to human gingival cells *in vitro*. An additional study was conducted that showed infection control in the dental office by using the oral rinse as a lavage in ultrasonic scaling. This study established that Cl6SYS safely reduced the exposure to microbial aerosols by 60%.⁹

Cl6SYS oral rinse exhibited less bactericidal activity against some of the least organisms than chlorhexidine and Listerine. However, it is difficult to make direct extrapolations as to the level of activity rinses would have on bacteria within plaque communities by the monoculture methods used in this study. This is an important first step, and one that provides valuable information as to relative levels of activity against oral bacteria in a very standardized laboratory setting. A bactericidal kinetics approach was undertaken to provide meaningful data as to short-term exposure of organisms to the rinses. It is clear that more complex laboratory assessments need to be done involving polymicrobial biofilms and a multiple exposure regimen. We have, in fact, done many of these experiments and have reported these findings at national meetings.^{4,9} Of course, well-designed clinical trials will need to be conducted to adequately assess the effect of these rinses on oral flora over a longer period of time. Then we will be able to discern truly clinically significant changes in the composition of flora that could cause oral disease.

With its strong performance against oral bacteria that are known to be etiological agents of infections of the periodontium and endodontium, as well as dental caries and staph infections, and its favorable behavior toward healing cells (fibroblasts), Cl6SYS addresses a spectrum of clinical oral hygiene concerns.

Additionally, the agreeable taste and non-tooth-staining characteristics of Cl6SYS, coupled with a lower cost and over-the-counter convenience compared to its prescription counterpart, encourage patients to be fully compliant. As a non-prescription oral rinse, Cl6SYS not only meets and may surpass chlorhexidine in post-procedure applications, it also can be recommended for twice-daily regular oral care as a maintenance and preventive measure against oral diseases.

In conclusion, the stabilized chlorine dioxide oral rinse, Cl6SYS, demonstrated strong bactericidal activity against oral bacteria that are associated with infections of the periodontium and endodontium, as well as dental caries and staph infections. It also overcomes the unpleasant taste and potential teeth staining characteristics that have traditionally hindered patient compliance in oral hygiene treatment. As a non-prescription oral rinse, Cl6SYS affords lower cost and over-the-counter convenience for consumers.

Acknowledgment: Funding for this project was provided by Rowpar Pharmaceuticals, Inc.

For correspondence with the author of this paper, contact Dr. David Drake—david-drake@niu.edu.

References

- Georvold M, Silwood C, Gill D, Lynch E. Evidence for the microbicidal activity of a chlorine dioxide-containing oral rinse formulation *in vivo*. *J Clin Dent* 2001;12:67-70.
- Ratcliff PA, Bofin V. ClO₂/Phosphate peroxide vs. *Actinobacillus actinomyces comitans* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *J Dent Res* 1992;71(Spec Iss):869.
- Ratcliff PA, Bofin V. Germicidal effect of povidone-iodine and ClO₂ on dental pathogens. *J Dent Res* 1992;71(Spec Iss):189.
- Villhauer A, Drake DR. Novel Cl6SYS oral rinse: Comparison of bactericidal activity. *J Dent Res* 2010;89(Spec Iss):378.
- Chapek C, Reed O, Ratcliff P. Management of periodontitis with oral-care products. *Compend Contin Educ Dent* 1994;15:740-746.
- Chapek C, Reed O, Ratcliff P. Reduction of bleeding on probing with oral-care products. *Compend Contin Educ Dent* 1995;16:188-196.
- Wirthlin MR, Aho BJ, Enriquez B, Hussain MZ. Effects of stabilized chlorine dioxide and chlorhexidine mouthrinses *in vitro* on cells involved in periodontal healing. *Periodontol Abov* 2006;54:67-71.
- Wirthlin MR, Choi BJ, Kye SB. Use of chlorine dioxide mouthrinses as the ultrasonic scaling lavage reduces the viable bacteria in the general aerosols. *Periodontol Abov* 2006;54:35-44.
- Drake DR, Villhauer A, Olson B. Bacterial activity of stabilized chlorine dioxide against polymicrobial biofilms. *J Dent Res* 2009;88(Spec Iss):3417.

