

Protimikrobno delovanje novih ustnih vod proti planktonskim celicam in biofilmom s patogenimi mikroorganizmi

Sladjana Malić^{1*}, Charlotte Emanuel^{2†}, Michael AO Lewis^{2†} in David W Williams^{2†}

*Korespondenca: S.malic@mmu.ac.uk

†Ti avtorji so enakovredno prispevali k pričujočemu delu.

¹ Šola za zdravstvene vede, Univerza v Manchestru, Manchester M1 5GD, Združeno kraljestvo

² Zobozdravstvena šola, Višja šola za biomedicinske in biološke znanosti, Univerza v Cardiffu, Heath Park, Cardiff, CF14 4XY, Združeno kraljestvo

Izvleček

Ozadje: Ustne bolezni predstavljajo velik javnozdravstveni problem na svetovni ravni. Te bolezni močno vplivajo na posameznike in skupnosti, saj povzročajo bolečine in trpljenje ter poslabšanje funkcij in kakovosti življenja. Cilj te raziskave je bil oceniti protimikrobno delovanje petih ustnih vod na različne mikroorganizme, ki jih povezujemo z okužbami ustne votline in drugih delov telesa.

Metode: Formulacije ustnih vod so bile klorheksidin (0,2 %), Citrox (1 %; Perio plusTM)/hialuronska kislina (0,2 %)®, klorheksidin (0,2 %)/Citrox (1 %; Perio plusTM), klorheksidin (0,2 %)/fenoksetol (0,1 %)® in Citrox (1 %; OralclensTM) (Oraldent Ltd; Združeno kraljestvo). Med testni mikroorganizmi so bile bakterije *Actinomyces viscosus* ATCC 1598; *Actinomyces odontolyticus* NCTC 9935, *Clostridium difficile* R8651, *Prevotella intermedia* NCTC 13070T, *Prevotella denticola* R20771, *Porphyromonas gingivalis* NCTC 11834^T, *Streptococcus gordonii* ATCC 10558T in *Streptococcus sanguinis* NCTC 7863 ter glivice *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida dubliniensis* CD36, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida tropicalis* ATCC 750 in *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Protiglivične in protibakterijske lastnosti so bile določene s pomočjo testa na mikrotitrski ploščici. Pripravljeni so bili in vitro biofilmi na ploščicah s 96 vdolbinicami, ki so bili izpostavljeni različnim koncentracijam ustnih vod. Minimalna koncentracija izkoreninjenja biofilma (MBEC) je bila določena s pregledom naknadne ponovne rasti celic biofilma. Rezultati so bili primerjani z minimalnimi inhibitorskimi koncentracijami (MIC), dobljenimi za planktonske celice, vzgojene na ploščicah s 96 vdolbinicami v različnih koncentracijah ustnih vod.

Rezultati: Rast planktonskih celic aerobnih mikroorganizmov so zavirale vse ustne vode pri koncentracijah ≤ 2 % (v/v) osnovnega pripravka. Pripravek klorheksidina (0,2 %)/Citroxa (1 %)™ je imel najmočnejše protimikrobno delovanje, sledijo mu Citrox (1 %)™, 0,2 % klorheksidin, klorheksidin (0,2 %)/fenoksetol (0,1 %)® in Citrox (1 %)/hialuronska kislina (0,2 %)®. Nekatere anaerobne bakterije (*Actinomyces odontolyticus*, *Clostridium difficile*, *Prevotella intermedia*) so pokazale višje vrednosti MIC pri vseh petih ustnih vodah. Zabeleženo je bilo opazno (do 16-kratno) povečanje tolerance večine aerobnih mikroorganizmov na ustne vode, ko je bila minimalna koncentracija izkoreninjenja biofilma primerjana z minimalno inhibitorsko koncentracijo.

Zaključek: Rezultati kažejo učinkovitejše protimikrobno delovanje pripravka klorheksidina in Citroxa v primerjavi s samostojno uporabo klorheksidina.

Ključne besede: Parodontalne bolezni, zobni karies, planktonski mikroorganizmi pri oralni kandidozi, biofilm, protimikrobno delovanje, Citrox

Uvod

Zobni karies in parodontalne bolezni predstavljajo velik zdravstveni problem za človeka [1] in nastanejo ne glede na družbenoekonomski razred, čeprav so pogostejše v depriviligiranih populacijah [2]. Zobni karies prizadene 60–90 % otrok v industrijsko razvitih državah [3], okrog 10–15 % odraslih pa trpi zaradi hude parodontalne bolezni. Te bolezni, ki jih povzročajo zobne obloge, vodijo v prezgodnje propadanje zob in pomembno vplivajo na kakovost življenja [4,5]. Parodontalna bolezen je povezana tudi s sistemskimi kroničnimi boleznimi, kot so bolezni srca in ožilja [6].

Pomemben dejavnik tako pri kariesu kot pri parodontalni bolezni je ustna mikroflora, v središču patogeneze bolezni pa so

biofilmi, ki jih proizvajajo ti organizmi. Tako je pri preprečevanju bolezni, ki jih povzročajo zobne obloge, najpomembnejše obvladovanje biofilma z mehanskim odstranjevanjem in uporabo dodatnih protimikrobnih sredstev. Najpogostejši dodatki v ustni higieni in preventivi zgoraj omenjenih bolezni so ustne vode in zobne paste, ki vsebujejo protimikrobne sestavine, kot sta triklosan in klorheksidin. Obe sestavini se uvrščata med biocide, saj za doseganje protimikrobnih učinkov delujeta na več mestih.

Triklosan (5-kloro-2(2,4 diklorofenoksi)fenol) je halogeniran fenol in neionsko protimikrobno sredstvo s širokim spektrom delovanja, ki se uporablja za različne namene, med drugim tudi kot aktivna snov v detergentih, oblačilih, zobnih pastah in ustnih vodah [7]. Zaskrbljenost zaradi uporabe triklosana v izdelkih za »vsakdanjo rabo« narašča, saj lahko prevelika izpostavljenost tej snovi spodbuja odpornost, pa tudi dejansko so se pojavili dokazi o nizki stopnji odpornosti pri *Staphylococcus aureus* [1,8]. Triklosan so odkrili tudi v sedimentih, tleh in vodnih organizmih [7], v zadnjem času pa so se zaradi okoljskih pomislekov pojavili pozivi k omejitvi njegove uporabe [7-11]. Klorheksidin povezujemo tudi z neželenimi učinki, vključno z mukozitisom, spremenjenim okusom ter obarvanjem zobnih tkiv in restavracij [1,12]. Zaradi teh neželenih reakcij na klorheksidin strokovnjaki pozivajo k spremembi klinične prakse [13,14], kar je skupaj z željami pacientov gonilna sila raziskovanja alternativnih ustnih vod/sredstev za ustno nego.

Rastlinski pripravki se že stoletja uporabljajo za zdravljenje bolezni, v zadnjem času pa tudi v razvoju novih zdravil [13]. Prejšnje raziskave so pokazale uspešno in učinkovito uporabo naravnih protimikrobnih sredstev pri zaviranju rasti ustne mikroflore [13,14]. Citrox je topljiv pripravek bioflavonoidov iz agrumov s protimikrobnim delovanjem na bakterije, glivice in viruse [15-18].

V pričujoči raziskavi smo preučevali potencialno potenciranje protimikrobnega delovanja z uporabo kombinacij Citroxa (1 %) s klorheksidinom (0,2 %; Perioplus™) in Citroxa (1 %)/hialuronske kisline (0,2 %)®. Zato lahko zmanjšanje koncentracije klorheksidina zmanjša neželene učinke, hkrati pa ohrani protimikrobne lastnosti. Hialuronska kislina je glavna sestavina kolagena in pomemben dejavnik pri celjenju ran, zato je lahko ključna pri zdravljenju parodontalne bolezni [19]. Ugotovljeno je bilo tudi, da hialuronska kislina z majhno molekulsko maso spodbudi izražanje toličnih receptorjev, ki so pomembne sestavine prirojenega imunskega sistema [20]. Tako lahko kombinacija Citroxa s hialuronsko kislino zagotavlja baktericidno delovanje, kot tudi pospeševanje celjenja ran in vivo. Pogosto se ocenjevanje protimikrobnega delovanja in vitro izvaja le na planktonskih celicah, ki so običajno veliko bolj občutljive na protimikrobna sredstva kot njihovi ekvivalenti iz biofilma. V tej raziskavi smo ocenili protimikrobno delovanje petih različnih ustnih vod na 14 testnih sevov, vključno z bakterijami in vrstami *Candida*, gojenimi tako planktonsko kot v biofilmih.

Materiali in metode

Mikroorganizmi, ki so bili pod drobnogledom v tej raziskavi, so: *Actinomyces viscosus* (ATCC 1598), *Actinomyces odontolyticus* (NCTC 9935), *Clostridium difficile* (R865, klinični izolat), *Prevotella intermedia* (NCTC 13070^T), *Prevotella denticola* (R20771), *Porphyromonas gingivalis* (NCTC 11834^T), *Streptococcus gordonii* (ATCC 10558^T), *Streptococcus sanguinis* (NCTC 7863), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida dubliniensis* (CD36 [21]), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida glabrata* (ATCC 2001) in *Candida tropicalis* (ATCC 750).

Bakterije *Actinomyces viscosus* ATCC 1598, *Actinomyces odontolyticus* NCTC 9935, *Clostridium difficile* R8651, *Prevotella intermedia* NCTC 13070^T, *Prevotella denticola* R20771 in *Porphyromonas gingivalis* NCTC 11834^T so bile gojene v anaerobnih pogojih pri 37 °C na agarju za prehransko zahtevne anaerobe (FAA) in bujona za prehransko zahtevne anaerobe (FAB). Vrste *Streptococcus* so bile gojene aerobno pri 37 °C z uporabo krvnega agarja (BA) in možgansko-srčnega infuzijskega bujona (BHI). Vrste *Candida* so bile gojene aerobno pri 37 °C z uporabo Sabouraudovega agarja z dekstrozo (SDA) in Sabouraudovega bujona (SAB). Vsi mediji so bili pridobljeni iz Lab M (International Diagnostics Group plc, Bury, Združeno kraljestvo) in pripravljani po navodilih proizvajalca. Bujoni niso bili prilagojeni na pH ali vsebnost glukoze. Vse ustne vode je priskrbelo podjetje Oraldent Limited iz Združenega kraljestva.

Določitev minimalnih inhibitornih koncentracij (MIC) za planktonske celice

Mikrobni pripravki bakterij in vrst *Candida* so bili pripravljani z nočno inkubacijo in prilagojeni na motnost, ki ustreza MacFarlandovemu standardu 3.0. Pripravljene so bile serijske razredčitve testnih ustnih vod v ustreznem gojišču, tako da je bilo koncentracijsko območje od 0,007 % do 8 % (v/v) matičnih ustnih vod. Nato smo 100 µl vsake testne razredčine združili s 100 µl mikrobne suspenzije. Vključene so bile tudi negativne kontrole bujona in bakterijskih suspenzij brez protimikrobnega sredstva. V vdolbinice mikrotitrskih plošč s 96 vdolbinicami smo dodali 200 µl pripravkov in jih inkubirali 24 ur pri 37 °C v ustreznih atmosferskih pogojih. Po inkubaciji smo relativno rast mikrobnih vrst ocenili tako, da smo s spektrofotometrično absorbanco pri 620nm zabeležili motnost vdolbinic. Odčitki absorbance so bili standardizirani z uporabo kontrolnih razredčin ustne vode »brez mikrobov«. Vrednost MIC je bila zabeležena kot najnižja koncentracija ustne vodice, ki je pokazala ≥ 80-odstotno zmanjšanje absorbance v primerjavi s kontrolami brez ustnih vod.

Minimalne koncentracije izkoreninjenja biofilma (MBEC) za biofilme

Suspenzije vsakega mikroorganizma (MacFarlandov standard 3.0) smo 24 ur pri 37 °C inkubirali v vdolbinicah mikrotitrskeske plošče z ravnim dnom. Kot gojišče za bakterije je bilo uporabljeno gojišče BHI, za gojenje anaerobnih bakterij FAB, za gojenje *Candide* pa SAB; inkubacija je potekala brez mešanja, da se omogoči nastanek biofilma. Gojišče je bilo nato odstranjeno z nežno aspiracijo, biofilm pa izpran s 100 µl fiziološke raztopine s fosfatnim pufrim (PBS), da se odstranijo

planktonske celice. Biofilmom smo dodali sveže gojišče, ki je vsebovalo testne koncentracije ustne vode ali bujon za negativno kontrolo. Biofilme smo nato inkubirali nadaljnjih 24 ur pod opisanimi pogoji. Gojišče je bilo nato odstranjeno z nežno aspiracijo, biofilm pa izpran s PBS. Dodan je bil svež bujon (200 μ l), biofilmi pa so bili prekinjeni z večkratnim pipetiranjem in mešanjem. Motnost resuspendiranega biofilma smo opazovali z merjenjem absorbance pri 620nm. Po nadaljnji inkubaciji, ki je trajala 6 ur, smo ponovno zabeležili absorbanco pri 620nm. Relativno rast mikroorganizmov smo določili z razliko v absorbanci v tem 6-urnem obdobju. Povprečna vrednost je bila izračunana iz štirikratnih vzorcev v vsaki vdolbinici, MBEC pa je bila zapisana kot najnižja koncentracija testne ustne vodice, ki je pokazala \geq 80-odstotno zmanjšanje absorbance v primerjavi s kontrolo. Vsi poskusi so bili izvedeni v treh ločenih primerih.

Minimalna inhibitorna koncentracija % (v/v)					
Ustna vodica	A	B	C	D	E
Mikroorganizem					
C. albicans	1	2	0,5	2	0,5
C. dubliniensis	0,5	1	0,25	2	0,25
C. krusei	0,5	0,5	0,125	0,25	0,125
C. glabrata	0,5	1	0,25	0,5	0,5
C. parapsilosis	0,5	1	0,125	1	0,25
C. tropicalis	0,25	1	0,125	0,25	0,25
S. gordonii	0,5	2	0,25	0,5	1
S. sanguinis	0,5	2	0,25	1	0,5
A. odontolyticus	>4	>4	>4	>4	>4
A. viscosus	0,25	0,5	0,125	0,25	0,25
C. difficile	>4	>4	>4	>4	>4
P. denticola	4	0,5	0,5	0,5	0,5
P. gingivalis	0,5	1	0,25	0,5	0,5
P. intermedia	>4	>4	2	>4	2

Tabela 1a.
**Minimalna inhibitorna koncentracija
% (v/v) ustnih vodnic proti plank-
tonskim mikroorganizmo**

Vzorec A: Klorheksidin za kontrolo (0,2 %).
Vzorec B: Citrox (1 %)/hialuronska kislina (0,2 %)®.
Vzorec C: Klorheksidin (0,2 %)/Citrox (1 %)-Perioplus™.
Vzorec D: Klorheksidin (0,2 %)/fenoksetol (0,1 %)®.
Vzorec E: Citrox (1 %)-Oralclens™.

Minimalna koncentracija izkoreninjenja biofilma % (v/v)					
Ustna vodica	A	B	C	D	E
Mikroorganizem					
C. albicans	4	>4	4	>4	2
C. dubliniensis	2	4	2	>4	4
C. krusei	2	1	0,5	2	0,5
C. glabrata	2	4	2	4	4
C. parapsilosis	>4	4	1	>4	1
C. tropicalis	2	4	2	4	4
S. gordonii	0,5	2	0,5	1	1
S. sanguinis	0,5	2	0,5	1	1
A. odontolyticus	0,25	1	0,125	0,5	0,25
A. viscosus	0,125	0,25	0,125	0,25	0,125
C. difficile	0,5	4	1	4	1
P. denticola	0,125	1	0,5	0,5	0,5
P. gingivalis	0,125	2	0,25	1	1
P. intermedia	0,25	4	0,063	0,125	0,125

Tabela 1b.
**Minimalna koncentracija izkoreninjenja
biofilma % (v/v) ustnih vodnic proti
mikroorganizmom, ki rastejo v biofilmih.**

Vzorec A: Klorheksidin za kontrolo (0,2 %).
Vzorec B: Citrox (1 %)/hialuronska kislina (0,2 %)®.
Vzorec C: Klorheksidin (0,2 %)/Citrox (1 %)-Perioplus™.
Vzorec D: Klorheksidin (0,2 %)/fenoksetol (0,1 %)®.
Vzorec E: Citrox (1 %)-Oralclens™.

Rezultati

Minimalne inhibitorne koncentracije za planktonsko rast v ustnih vodih za 14 testnih mikroorganizmov so prikazane v tabeli 1a. Do inhibicije planktonskih celic vseh aerobnih mikroorganizmov je prišlo pri petih ustnih vodah v koncentracijah $\leq 2\%$ (v/v). Klorheksidin (0,2 %)/Citrox (1 %; Perio plus™ je pokazal najmočnejše protimikrobno delovanje na aerobne mikroorganizme, sledijo mu Citrox (1 %; Oralclens™, 0,2 % klorheksidin, klorheksidin (0,2 %)/fenoksetol (0,1 %)® in Citrox (1 %)/hialuronska kislina (0,2 %)®. Kar zadeva anaerobne mikroorganizme, so *Actinomyces odontolyticus*, *Clostridium difficile* in *Prevotella intermedia* imeli relativno visoke MIC proti petim ustnim vodam ($\geq 4\%$ (v/v)). *Actinomyces viscosus*, *Prevotella denticola* in *Porphyromonas gingivalis* so imeli MIC med 0,125 % in 1 % (v/v).

Minimalne koncentracije izkoreninjenja biofilma (MBEC) za biofilme

Zabeležene vrednosti MBEC v testu z biofilmom so prikazane v tabeli 1b. V primeru biofilmov aerobnih vrst je bila opazna povečana toleranca (vrednosti MBEC do 16-kratnika prejšnjih vrednosti MIC) za večino testiranih mikroorganizmov proti vsem petim formulacijam ustnih vod. Vrednosti MBEC za anaerobne vrste so bile na splošno nižje kot za aerobne vrste. Zanimivo je, da je bila vrednost MBEC za *A. odontolyticus*, *C. difficile* in *P. intermedia* nižja kot vrednost MIC v fazi planktonske rasti, kar je rezultat, ki bi lahko nakazoval relativno slab razvoj biofilma.

Razprava

Bolezni ustne votline so svetovni zdravstveni problem, ki pomembno vpliva na kakovost življenja in delovanje pacientov. Zaskrbljujoče je tudi pričakovanje, da se bo pojavnost zobnega kariesa in parodontalne bolezni še naprej povečevala zaradi vse večjega vnosa sladkorjev v prehrani, uporabe tobaka, nezadostne izpostavljenosti fluoridom in pomanjkanja dostopa do zobozdravstvene oskrbe [22].

Vse večja odpornost proti antibiotikom je spodbudila zanimanje za terapevtsko uporabo nekonvencionalnih ali alternativnih učinkovin in rastlinskih izvlečkov [13,23-26]. Pokazalo se je, da naravni biocidi učinkovito inaktivirajo različne mikroorganizme, saj vplivajo na več ciljnih mest in so zato manj nagnjeni k razvoju odpornosti v primerjavi s konvencionalnimi antibiotiki, ki delujejo na specifična bakterijska mesta [27,28]. Obstajajo velike možnosti za razvoj novih bioaktivnih spojin, saj na svetu obstaja približno 500.000 rastlinskih vrst, od katerih je bilo fitokemično raziskanih le 1 % [29].

Hooper in sod. [13] so predhodno testirali dve formulaciji zdravila Citrox proti številnim mikroorganizmom v ustni votlini in poročali o vrednostih MIC 1 % (v/v) v planktonskih testih in testih z biofilmom. Izvlečki iz *Citrus* sudachi tudi dokazano delujejo protimikrobno na bakterije, vključno z na meticilin odpornim *Staphylococcus aureus* (MRSA) in *Helicobacter pylori* [16]. Razmeroma visok inokulum je bil uporabljen v tej raziskavi, da bi posnemal izziv in vivo, ko se je treba spopasti z ugotovljeno visoko stopnjo mikroorganizmov, kot se pojavlja v zobnih oblogah, in je temeljil na prejšnjih ocenah, zato omogoča primerjave [13].

Rezultati te študije so pokazali protimikrobne učinke petih formulacij ustnih vod na vrsto ustnih mikroorganizmov in *C. difficile*. Štiri od teh ustnih vod so vsebovale Citrox, ki vsebuje kombinacijo naravnih bioflavonoidov. Tri od teh ustnih vod Citrox so bile dopolnjene s klorheksidinom, hialuronsko kislino ali fenoksetolom.

Vse testne ustne vode so imele znatno protimikrobno delovanje proti aerobnim planktonskim mikroorganizmom pri koncentracijah $\leq 2\%$ (v/v), pri čemer so bile anaerobne vrste na splošno manj občutljive. Ta aktivnost proti planktonskim celicam je nedvomno pomembna, saj je v slini veliko prosto živečih mikroorganizmov, ki so vir bakterij za kolonizacijo in poznejšo tvorbo biofilma na ustnih površinah [30,31]. **Splošno znano je, da je zaviranje rasti biofilma bolj problematično kot zaviranje rasti planktonskih celic.** Razlogi za to so večfaktorski in zapleteni. Domnevajo, da je zunajcelična polimerna snov (EPS), ki obdaja celice biofilma, ključna sestavina pri omejevanju dostopa protimikrobnih sredstev do celic biofilma, morda zaradi sekvenciranja, ki jo povzroča naboj [32]. Druga možnost je, da imajo celice biofilma različne fenotipe, nekatere pa imajo lahko zmanjšano aktivnost zaradi omejitev hranil ali plinov. [33]. Ker so lahko celice z zmanjšano hitrostjo rasti odpornejše na številna protimikrobna sredstva, je lahko tudi to razlog za večjo toleranco. Zato morda ni presenetljivo, da je bila antibiotična aktivnost ustnih vod proti nekaterim vrstam včasih do 16-krat višja kot pri planktonskih vrstah. Presenetljivo pa je, da so bile vrednosti MBEC anaerobnih biofilmov pogosto nižje v primerjavi z vrednostmi MIC za planktonske vrste. Upoštevati je treba, da je bila rast anaerobnih bakterij v biofilmu v primerjavi z aerobnimi razmeroma omejena, kar bi lahko pojasnilo nižjo občutljivost v primerjavi z njihovimi planktonskimi ekvivalenti. Anaerobne vrste v primerjavi z aerobnimi za rast pogosto potrebujejo gojišča, bogata s hranili (npr. FAB), prve pa imajo tudi veliko počasnejšo rast. Morda 24-urna inkubacija, ki je bila uporabljena za nastanek biofilma, ni zadostovala za močno rast biofilma anaerobov, zaradi česar so ti bolj občutljivi na ustne vode. Možno je tudi, da so bili biofilmi, ki so jih ustvarili anaerobi, manj stabilni, kar je lahko povzročilo izgubo celic biofilma med postopkom izpiranja. Da bi to težavo odpravili, bi lahko v prihodnje raziskave vključili daljša obdobja inkubacije, da bi omogočili nastanek biofilma, poleg tega pa bi v modelni sistem vključili umetno slino, da bi povečali pritrditev biofilma, ter uporabili gojišče, ki bi bilo bogatejše s hranili.

Sklepne ugotovitve

Rezultati kažejo, da je klorheksidin (0,2 %)/Citrox (1 %; Perio plus™) pokazal najmočnejše protimikrobno delovanje in da je bila uporaba te kombinirane formulacije učinkovitejša kot samostojna uporaba katerekoli od protimikrobnih sestavin (Citrox ali klorheksidin). Razlog za to ugotovitev lahko kaže na različne tarče teh protimikrobnih sestavin, ki vodijo k boljšemu in morebitnemu sinergijskemu učinku. Ustna vodica Oralclens™ (1 % Citrox) je pokazala nekoliko večjo protimikrobno

aktivnost kot ustna vodica CitroX (1 %)/hialuronska kislina (0,2 %)®. Pomembno pa je, da so prejšnje študije pokazale, da je 0,2-odstotni gel, ki vsebuje hialuronan, koristen kot dodatek pri luščenju zobnega kamna in glajenju korenin (SRP) pri pacientih s kroničnim parodontitisom, kar vodi k znatnemu izboljšanju parametrov dlesni [34].

Glede na težave, o katerih so poročali pri več ustnih vodah, ki so na voljo brez recepta, kot so obarvanje sklenine, pekoč občutek, spremembe okusa in prisotnost alkoholne komponente [30,35,36], je treba nenehno razvijati učinkovite ustne vode za pomoč pri ustni higieni. Prav zato so lahko naravne spojine, kot so te, ki jih vsebuje CitroX, primerna alternativa. Poleg tega lahko z združevanjem Citroxa z drugimi dodatki, kot je bilo prikazano v tej predhodni raziskavi, dosežemo večje protimikrobne učinke proti pogostim ustnim patogenom. Te ugotovitve podpirajo nadaljnje raziskave Citroxa kot morebitnega prihodnjega pripravka za izdelke za ustno nego in morebiti tudi druga klinična področja, na katerih je treba preprečevati biofilme.

Seznam uporabljenih kratic

MBEC: Minimalna koncentracija izkoreninjenja biofilma

MIC: Minimalna inhibitorna koncentracija

FAA: Agar za prehransko zahtevne anaerobe

FAB: Bujon za prehransko zahtevne anaerobe

BA: Krvni agar

BHI: Možgansko-srčni infuzijski bujon

SDA: Sabouraudov agar z dekstrozo

SAB: Sabouraudov bujon

PBS: Fiziološka raztopina s fosfatnim pufrom

MRSA: Proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus*

Konkurenčni interesi

Avtorji izjavljajo, da nimajo konkurenčnih interesov.

Zahvala

Avtorji se zahvaljujejo podjetju OralDent Ltd iz Združenega kraljestva za zagotovitev vseh testnih protimikrobnih sredstev.

Zgodovina objav

Urednica: Celine Vidailiac, Center za klinične in epidemiološke preiskave, Luksemburg.

EIC: Todd R. Callaway, Ministrstvo za kmetijstvo Združenih držav Amerike, ZDA. Prejeto: 24. julij 2013 Pregledano: 22. avgust 2013 Sprejeto: 26. september 2013 Objavljeno: 4. oktober 2013

Viri in literatura

1. Rodrigues JA, Lussi A, Seemann R and Neuhaus KW. **Prevention of crown and root caries in adults.** Periodontol 2000. 2011; **55**:231-49. | Article | PubMed
2. Petersen PE and Ogawa H. **The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control.** Periodontol 2000. 2012; **60**:15-39. | Article | PubMed
3. Petersen PE. **The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme.** Community Dent Oral Epidemiol. 2003; **31 Suppl 1**:3-23. | Article | PubMed
4. Petersen PE and Baehni PC. **Periodontal health and global public health.** Periodontol 2000. 2012; **60**:7-14. | Article | PubMed
5. Watt RG and Petersen PE. **Periodontal health through public health--the case for oral health promotion.** Periodontol 2000. 2012; **60**:147-55. | Article | PubMed
6. Meurman JH and Hamalainen P. **Oral health and morbidity--implications of oral infections on the elderly.** Gerodontology. 2006; **23**:3-16. | Article | PubMed
7. Dann AB and Hontela A. **Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action.** J Appl Toxicol. 2011; **31**:285-311. | Article | PubMed
8. Suller MT and Russell AD. **Triclosan and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus.** J Antimicrob Chemother. 2000; **46**:11-8. | Article | PubMed
9. Lubarsky HV, Gerbersdorf SU, Hubas C, Behrens S, Ricciardi F and Paterson DM. **Impairment of the bacterial biofilm stability by triclosan.** PLoS One. 2012; **7**:e31183. | Article | PubMed Abstract | PubMed Full Text
10. Brown J, Bernot MJ and Bernot RJ. **The influence of TCS on the growth and behavior of the freshwater snail, Physa acuta.** J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. 2012; **47**:1626-30. | Article | PubMed
11. Cortez FS, Seabra Pereira CD, Santos AR, Cesar A, Choueri RB, Martini Gde A and Bohrer-Morel MB. **Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel Perna perna (Linnaeus, 1758).** Environ Pollut. 2012; **168**:145-50. | Article | PubMed
12. Bagis B, Baltacioglu E, Ozcan M and Ustaomer S. **Evaluation of chlorhexidine gluconate mouthrinse-induced staining using a digital colorimeter: an in vivo study.** Quintessence Int. 2011; **42**:213-23. | Article | PubMed
13. Hooper SJ, Lewis MA, Wilson MJ and Williams DW. **Antimicrobial activity of Citrox bioflavonoid preparations against oral microorganisms.** Br Dent J. 2011; **210**:E22. | Article | PubMed
14. Verkaik MJ, Busscher HJ, Jager D, Slomp AM, Abbas F and van der Mei HC. **Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro.** J Dent. 2011; **39**:218-24. | Article | PubMed
15. Aqil F, Ahmad I and Owais M. **Evaluation of anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) activity and synergy of some bioactive plant extracts.** Biotechnol J. 2006; **1**:1093-102. | Article | PubMed
16. Nakagawa H, Takaishi Y, Tanaka N, Tsuchiya K, Shibata H and Higuti T. **Chemical constituents from the peels of Citrus sudachi.** J Nat Prod. 2006; **69**:1177-9. | Article | PubMed
17. Oliveira AC, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL and Svidzinski TI. **Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; **101**:493-7. | Article | PubMed
18. Tait S, Salvati AL, Desideri N and Fiore L. **Antiviral activity of substituted homoisoflavonoids on enteroviruses.** Antiviral Res. 2006; **72**:252-5. | Article | PubMed
19. Pilloni A, Annibali S, Dominici F, Di Paolo C, Papa M, Cassini MA and Polimeni A. **Evaluation of the efficacy of an hyaluronic acid-based biogel on periodontal clinical parameters. A randomized-controlled clinical pilot study.** Ann Stomatol (Roma). 2011; **2**:3-9. | PubMed Abstract | PubMed Full Text
20. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C and Simon JC. **Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4.** J Exp Med. 2002; **195**:99-111. | Article | PubMed Abstract | PubMed Full Text
21. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE and Coleman DC. **Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals.** Microbiology. 1995; **141 (Pt 7)**:1507-21. | Article | PubMed
22. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S and Ndiaye C. **The global burden of oral diseases and risks to oral health.** Bull World Health Organ. 2005; **83**:661-9. | Article | PubMed Abstract | PubMed Full Text
23. Cowan, M.M. **Plant Products as Antimicrobial Agents.** Clinical Microbiology Reviews. 1999; **12**:564-582. | Article
24. Moyle J.R, et al. **Palatability of tannin-rich sericea lespedeza fed to broilers.** The Journal of Applied Poultry Research. 2012; **21**:891-896. | Article
25. Miloš Nikoli, Tatjana Markovi, Dejan Markovi, Tamara Peri, Jasmina Glamolija, Dejan Stojkovi and Marina Sokovi. **Screening of antimicrobial and antioxidant activity of commercial Melaleuca alternifolia (tea tree) essential oils.** Journal of Medicinal Plants Research. 2012; **6**:3852-3858. | Pdf
26. Papadopoulos CJ, Carson CF, Hammer KA and Riley TV. **Susceptibility of pseudomonads to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and components.** J Antimicrob Chemother. 2006; **58**:449-51. | Article | PubMed
27. Sreenivasan P and Gaffar A. **Anti plaque biocides and bacterial resistance: a review.** J Clin Periodontol. 2002; **29**:965-74. | Article | PubMed
28. Clatworthy AE, Pierson E and Hung DT. **Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy.** Nat Chem Biol. 2007; **3**:541-8. | Article | PubMed

29. Palombo EA. **Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases.** Evid Based Complement Alternat Med. 2011; **2011**:680354. | Article | PubMed Abstract | PubMed Full Text
30. Ramage G, Jose A, Coco B, Rajendran R, Rautemaa R, Murray C, Lappin DF and Bagg J. **Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against Candida albicans biofilms in vitro.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; **111**:456-60. | Article | PubMed
31. Shapiro S, Giertsen E and Guggenheim B. **An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses.** Caries Res. 2002; **36**:93-100. | Article | PubMed
32. Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, Quach TP, Song JL, Penterman J, Singh PK, Chopp DL, Packman AI and Parsek MR. **The extracellular matrix protects Pseudomonas aeruginosa biofilms by limiting the penetration of tobramycin.** Environ Microbiol. 2013. | Article | PubMed
33. Donlan RM and Costerton JW. **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.** Clin Microbiol Rev. 2002; **15**:167-93. | Article | PubMed Abstract | PubMed Full Text
34. Gontiya G and Galgali SR. **Effect of hyaluronan on periodontitis: A clinical and histological study.** J Indian Soc Periodontol. 2012; **16**:184-92. | Article | PubMed Abstract | PubMed Full Text
35. Conway D. **Oral health, mouthwashes and cancer--what is the story?** Evid Based Dent. 2009; **10**:6-7. | Article | PubMed
36. La Vecchia C. **Mouthwash and oral cancer risk: an update.** Oral Oncol. 2009; **45**:198-200. | Article | PubMed

Citiranje:

Malic S, Emanuel C, Lewis MAO and Williams DW. **Antimicrobial activity of novel mouthrinses against planktonic cells and biofilms of pathogenic microorganisms.** Microbiol Discov. 2013; 1:11.
<http://dx.doi.org/10.7243/2052-6180-1-11>

Več:

https://www.researchgate.net/publication/263010533_Antimicrobial_activity_of_novel_mouthrinses_against_planktonic_cells_and_biofilms_of_pathogenic_microorganisms