

**AĞIZ ÇALKALAMA SULARININ (GARGARA) IN VITRO
ANTİFUNGAL AKTİVİTELERİ****Abdullah KILIÇ¹**
Işıl SAYGUN²**M.Ali SARAÇLI¹****Mustafa ÖZYURT¹****A. Celal BAŞUSTAOĞLU¹****ÖZET**

Etken maddeleri, klorheksidin diglukonat, sanguinarin ekstrakt, setilpiridinium klorid, heksetidin, triklosan ve timol olan altı ticari ağız çalkalama suyunun *in vitro* antifungal aktiviteleri araştırıldı. Test organizması olarak çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* ve *Candida glabrata* kullanıldı. Bu gargaraların *in vitro* antifungal etkileri; MİK, MFK ve "kill-time" ları belirlenerek değerlendirildi. Tüm gargaraların MİK ve MFK değerleri arasında en fazla iki katlık bir fark olduğu, özellikle klorheksidin diglukonat'ın test edilen maya türlerine karşı diğer gargaralara oranla çok daha düşük konsantrasyonlarda inhibitör ve fungisidal etki gösterdiği saptandı. Tüm test organizmaları için en kısa "kill-time" a (≤ 15 saniye) klorheksidin diglukonat ve setilpiridinium klorid'in, en uzun (>180 saniye) ise sanguinarin ekstrakt'ın sahip olduğu saptandı.

Sonuç olarak klorheksidin diglukonat ve setilpiridinium klorid içeren gargaraların mayalara karşı *in vitro* olarak daha etkili olduğu ancak *in vivo* etkilerinin klinik denemelerle desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Ağız çalkalama suları, antifungal aktivite, kill-time

THE IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF DIFFERENT MOUTHRINSES**SUMMARY**

In this study, we aimed to investigate the *in vitro* antifungal activities of six different commercial mouthrinses; chlorhexidine digluconate, sanguinarine extract, cetylpyridinium chloride, hexetidine, triclosan and thymol. We tested these agents activities against clinical isolates of *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* and *Candida glabrata*. The *in vitro* activities of these agents were evaluated by determining the MIC and MFC of each product. The kill time of each drug was also determined. The difference between MIC and MFC values of six agents was not higher than two-fold. It was found that chlorhexidine digluconate had inhibitory and fungicidal properties at lowest concentration when compared to other products. While the kill-time of chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride was equal or less than 15 seconds, period (> 180 seconds) was required for sanguinarine extract.

In conclusion, although all antimicrobial mouthrinses included in this study possess *in vitro* antifungal properties, chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride are more active than other products tested. The *in vivo* activities of these products need to be supported by further clinical trials.

Key words: Mouthrinses, antifungal activity, kill-time

¹GATA Mikrobiyoloji ve Kl. Mik. AD Etilik, Ankara

²GATA Periodontoloji AD, Etilik, Ankara

Geliş tarihi : 04.08.2000 Kabul ediliş tarihi : 12.03.2002

Yazışma Adresi: Dr. Abdullah KILIÇ, T.S.K. Reh. Ve Bak. Merk., Mikrobiyoloji Bölümü, Bilkent, Ankara

GİRİŞ

Antimikrobiyal ajan içeren gargaraların periodontal hastalıkların tedavisinde destek olarak kullanıldıklarında klinik olarak etkili oldukları bilinmektedir. Periodontal sağlık için düzenli ve etkili bir plak kontrolünün önemi de gözardı edilemeyecek bir izleme yöntemidir. Günümüzde bu amaçla kullanılmakta olan antimikrobiklerin plak formasyonunun gerilemesi ve yavaşlaması ile gingivitisin önlenmesi üzerine olan etki ve aktiviteleri kapsamlı olarak çalışılmıştır (1 - 4). Aynı zamanda subgingival floradaki Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalar üzerine etkilerine dair de pek çok çalışma yapılmıştır (3,5,6). Buna karşılık fungal ajanlardan mayalara olan etkilerine dair çok az güncel bilgi mevcuttur (1,6).

Oral floranın zararsız kommensalleri oldukları düşünülen mayalar için primer olarak dilin sırt kısmı ve maksiller protezin altındaki palatal mukoza bölümleri ile dental plak ve mukozal yüzeyler barınak görevi görürler (7,8). Kandidal enfeksiyonların oluşumunda yaş, immünoşüpresif ilaç uygulanan transplantlı hastalar ve HIV ile enfekte bireyler gibi konak defansının baskılandığı durumlar, diabetes mellitus gibi endokrin hastalıklar, heredite, azalmış tükürük akımı, protez kullanımı ve uzun süreli antibiyotik, kortikosteroid ya da sitostatik ilaç kullanımı önemli predispozan faktörleri oluşturmaktadır (8,9).

Sistemik olarak sağlıklı bireylerde derin periodontal ceplerde, tedaviye direnç gösteren periodontal lezyonlarda, akut periodontal abselerde ve başarısız olarak kemik bütünleşmesi olmuş dental implantlarda subgingival *Candida* spp. kolonizasyonu gösterilmiştir (10,11).

Genellikle mayalar klinik tabloya sekonder olarak katılmakla birlikte, *Candida* türlerinin destrüktif periodontal hastalıklarda rol oynayabileceğine dair çeşitli araştırmalar vardır (12).

Oral kandidoz tedavisi için pek çok antifungal ilaç mevcuttur. Ağız gargaraları ile topikal olarak antifungal ajan kullanımı oral *Candida* spp. sayısını azaltabilmekte ve böylece de kandidoz ihtimalini durdurabilmektedir. Klorheksidin (KHD)

antimikrobiyal içeriği nedeniyle oral mukositis ve kandidoza karşı etkili bir topikal profilaktik ajandır (1).

Klorheksidin içeren gargaralar antimikrobiyal aktiviteleri gözönüne alındığında sıklıkla profilaktik olarak kemoterapi ve radyoterapi sırasında gelişen oral infeksiyonlarda kullanılmaktadır (13). Çalışmamızda kullandığımız gargaralardan setilpiridinium klorid (SPK), heksetidin (HEK), sanguinarine (SNG), timol (TİM) ve triklosan (TRK) gibi antimikrobiyal ajan içerenlerin antifungal etkileri hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada, antimikrobiyal ajan içeren altı gargaranın test edilen maya türlerine karşı olan minimal inhibisyon konsantrasyonları (MİK), minimal fungisidal konsantrasyonları (MFK) ile kill-time'lerinin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Test organizmaları: Bu çalışmada, GATA Mikoloji Bilim Dalı stok kültürlerinde saklanan klinik izolatlar kullanıldı. Çalışma için sekiz farklı maya türünden birer izolat seçildi. *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* ve *Candida glabrata* olarak tanımlanan maya türlerinin stoklardan Sabouraud dekstroz agar (SDA) plaklarına iki kez subkültürleri yapılarak test organizmaları olarak kullanıldı.

Ticari gargaralar: Çalışmamızda kullanılan ticari gargaralar ve içerdikleri aktif madde konsantrasyonları Tablo 1' de görülmektedir. Bu gargaralar piyasadan temin edildi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan ticari gargaralar ve aktif madde içerikleri

Ticari gargara	Aktif madde (% konsantrasyon)
Corsodyl	Klorheksidin (0.2)
Viadent	Sanguinarin (3)
Scope	Setilpiridinium klorid (0.05)
Heksoral	Heksetidin (0.1)
Listerine	Timol (0.064)
Colgate plax	Triklosan (0.045)

Duyarlılık Testi: Maya izolatlarının antimikrobiyal gargaralara olan duyarlılıkları makrodilüsyon metodu ile saptandı (14). Testler için steril burgu kapaklı cam tüpler (13x100 mm) içerisinde hazırlanmış Sabouraud dextroz broth (SDB) kullanıldı.

Çalışılacak maya izolatlarının stok kültürlerinden SDA plaklarına iki kez subkültürleri yapılarak canlılıkları ve saflıkları değerlendirildi. 35°C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda ≥ 1 mm çaplı beş koloni alınarak 5 ml tuzlu su (%0.85) içerisinde süspansiyon edildi. Süspansiyon 15 saniye vortekslenerek McFarland 0.5'e (1×10^6 - 5×10^6 CFU/ml) ayarlandı. Final inokulum miktarının doğruluğu, test edilen tüm organizmaların SDA plaklarına subkültürleri yapılarak kontrol edildi (14).

Test broth'ları elde etmek için gargaralardan SDB besiyerinde 1: 2-1: 1024 arasında değişen iki katlı seri dilüsyonları hazırlandı. Herbir test tüpüne 4 ml test broth ve 0.1 ml maya süspansiyonu ilave edildi ve herbir gargara-mikroorganizma karışımlarının final etken madde konsantrasyonları; KHD için 1000-1.9 $\mu\text{g/ml}$, SNG için 15000-29.2 $\mu\text{g/ml}$, SPK için 250-0.5 $\mu\text{g/ml}$, HEK için 500-0.9 $\mu\text{g/ml}$, TİM için 320-0.6 $\mu\text{g/ml}$ ve TRK için 225-0.4 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde hazırlandı. Kontrol tüplerine üreme ve kontaminasyonu kontrol etmek amacıyla etken madde içermeyen SDB besiyeri ve maya süspansiyonu ilave edildi. Test ve kontrol tüpleri aerobik olarak 24 saat 35°C'de inkübe edildi. Maya üremesinin engellendiği, yani besiyerinin berrak olduğu ilk tüpler bize MİK değerini verdi (1).

Gargaraların antifungal aktivitelerini değerlendirmek amacıyla MFK değerleri de saptandı. Minimal fungisidal konsantrasyon değerleri, SDB makrodilüsyon serilerinin her bir tüpünden 20 μl örneğin SDA plaklarına subkültüre edilmesiyle saptandı. Plaklar 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Minimal fungisidal konsantrasyon, herbir gargara için test suşlarının üremesini tamamen inhibe eden en düşük konsantrasyon olarak tanımlandı. Test organizmalarının canlılıklarını ve ortam sterilitelerini kontrol etmek amacı ile her iki kontrol tüpünden 20 μl , SDA plaklarına ekildi. Tüm anti-

fungül duyarlılık deneyleri üç kez tekrarlandı. Minimal fungisidal konsantrasyon ve kill-time sonuçları, üç çalışmadan elde edilen sonuçların ortalaması alınarak saptandı (1).

Kill-Time Saptanması: Oniki test tüpünün herbirinde 2.5 ml miktarında bulunan herbir gargaranın ticari formülasyonlarının yarı konsantrasyonlarını elde etmek için, bu miktar 2.5 ml steril tuzlu su ile dilüe edildi ve 0.1 ml maya süspansiyonu ilave edildi. Kontrol tüplerine ise 0.1 ml maya süspansiyonu ve sadece 5 ml tuzlu su konuldu. Her bir test tüpü vortekslenmiş, 15-180 saniye arasında 15 saniye aralıklarla 20 μl miktarında örnek, SDA plaklarına doğrudan doğruya subkültüre edildi. Test ve kontrol tüpleri 48 saat 37°C'de aerobik olarak inkübe edildi. Hiç üremenin gözlenmediği veya tek bir koloni varlığının saptandığı en kısa süre kill-time olarak tanımlandı. Tüm deneyler üç kez tekrarlandı (1).

BULGULAR

Ticari gargaraların çeşitli maya türlerine karşı bulunan MİK ve MFK değerleri Tablo-2'de gösterilmiştir. *C.albicans* için elde edilen KHD, SPK ve HEK'e ait MİK değerleri birbirlerine benzer olmakla birlikte, MFK yönünden SPK ve HEK'in daha etkin bulunduğu söylenebilir. *S.cerevisiae* için ise en düşük MİK ve MFK değerleri SPK ile elde edilmiştir. Bu iki test organizmasının dışında geri kalan maya türleri için en düşük MİK ve MFK değerleri KHD ile saptanmıştır.

Tablo 3'te farklı gargaraların ticari formülasyonlarının yarı konsantrasyonları ile ortaya çıkan kill-time sonuçları görülmektedir. Buna göre, KHD ve SPK'in 15 saniye içerisinde bütün test organizmalarına letal etkili olduğu, SNG'in test organizmalarının hiç birine 180 saniye içerisinde letal etki oluşturmadığı görülmüştür. Heksitidin *C.glabrata*'ya 180 saniye içerisinde letal etkisi saptanmazken, SNG haricindeki gargaraların *C.albicans* ve *C.kefyr*'e 15 saniye içerisinde letal etki gösterdiği saptanmıştır. Timol ve TRK'ın ise tüm test mikroorganizmalarına karşı 15-180 saniye arasında değişen sürelerde letal etki oluşturduğu gözlenmiştir.

Tablo 2. Ticari gargaraların çeşitli maya türlerine karşı bulunan MİK ve MFK değerleri

Test edilen mayalar	KHD		SPK		HEK		TRK		SNG		TİM	
	MİK*	MFK*	MİK	MFK	MİK	MFK	MİK	MFK	MİK	MFK	MİK	MFK
<i>C. albicans</i>	1/256	1/128	1/256	1/256	1/256	1/256	1/64	1/64	1/16	1/16	1/16	1/8
<i>S. cerevisiae</i>	1/512	1/512	1/1024	1/1024	1/512	1/256	1/128	1/64	1/16	1/16	1/16	1/16
<i>C. parapsilosis</i>	1/512	1/256	1/128	1/128	1/256	1/256	1/128	1/64	1/16	1/8	1/32	1/16
<i>C. guilliermondii</i>	1/1024	1/1024	1/64	1/64	1/256	1/256	1/128	1/64	1/16	1/8	1/8	1/8
<i>C. krusei</i>	1/256	1/128	1/128	1/64	1/128	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/8	1/4
<i>C. tropicalis</i>	1/1024	1/512	1/128	1/64	1/128	1/64	1/16	1/8	1/16	1/8	1/16	1/8
<i>C. glabrata</i>	1/512	1/256	1512	1/128	1/256	1/256	1/64	1/64	1/8	1/8	1/16	1/8
<i>C. kefyr</i>	1/1024	1/1024	1/128	1/64	1/512	1/512	1/64	1/32	1/32	1/16	1/8	1/8

* Tabloda gösterilen MİK ve MFK değerleri, ticari formülasyona ait dilüsyon oranları olarak verilmiştir. Söz konusu dilüsyon değerine ait etkin madde konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) Tablo 1'deki veriler kullanılarak hesaplanabilir.

Tablo 3. Ticari gargaraların çeşitli maya türlerine karşı bulunan kill-time sonuçları

Test edilen mayalar	KHD	SNG	SPK	HEK	TİM	TRK
<i>C. albicans</i>	≤ 15	>180	≤ 15	≤ 15	≤ 15	≤ 15
<i>S. cerevisiae</i>	≤ 15	>180	≤ 15	≤ 15	≤ 15	75
<i>C. parapsilosis</i>	≤ 15	>180	≤ 15	≤ 15	60	180
<i>C. guilliermondii</i>	≤ 15	>180	≤ 15	≤ 15	≤ 15	≤ 15
<i>C. krusei</i>	≤ 15	>180	≤ 15	45	≤ 15	45
<i>C. tropicalis</i>	≤ 15	>180	≤ 15	≤ 15	60	≤ 15
<i>C. glabrata</i>	≤ 15	>180	≤ 15	>180	≤ 15	≤ 15
<i>C. kefyr</i>	≤ 15	>180	≤ 15	≤ 15	≤ 15	≤ 15

TARTIŞMA

Mayalar, immümkompromize hastalarda oral fırsatçı infeksiyonlara sebep olabilmektedirler. *Candida* türleri, özellikle de *C. albicans*, sıklıkla etyolojik ajan olarak karşımıza çıkmaktadır. Oral kandidoz olguları son yıllarda ciddi artışlar göstermiş ve major klinik problemlerden birisi olmuştur. Çünkü oral mukoza ve periodontal doku ciddi sistemik infeksiyonlar için önemli bir giriş kapısı görevi görmektedir. Mayaların subgingival yerleşimi ise periodontal hastalığın ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (12).

Klorheksidinin *Candida* türlerine karşı oldukça etkin olduğuna dair *in vitro* çalışmalar bulunmakla birlikte klinik çalışmalardan farklı

sonuçlar elde edilmiştir (15). Klorheksidin içeren gargaraların kemoradyoterapiye maruz kalan hastalarda oral kandidoz insidansını önemli derecede azalttığı bildirilmiştir (1). Pizzo ve arkadaşlarının (16) oral kandidozlu hastalarda yaptıkları çalışmada KHD içeren gargaraların geleneksel antifungal ilaçlara alternatif bir yaklaşım sunabileceğini bildirmişlerdir. Epstein ve arkadaşları (17) kemik iliği transplantasyonu ya da kemoterapi ile tedavi gören 86 erişkin hastada KHD, nistatin ve saline solüsyonunun oral mukositis, gingivitis ve oral enfeksiyon üzerine etkilerini değerlendirmişler ve potansiyel bakteriyel ve fungal patojenleri KHD kullanan hastalarda daha az sıklıkla izole etmişlerdir. Başka bir çalışmada Listerin ve KHD'in anti-candida özelliklerinden dolayı fırsatçı kandidoz enfeksiyonu olan bireylerde ve immunosupresif alan hastalarda faydalı bir etki gösterebilecekleri bildirilmiştir (18). Bazı klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar ise KHD'in oral maya eradikasyonundaki ve oral orijinli sistemik infeksiyonu önlemedeki etkisini desteklememiştir (7,15,19). Klorheksidinin *in vivo* zayıf, *in vitro* ise güçlü etkisi arasındaki farklılığın çeşitli faktörlere bağlı olabildiği bildirilmiştir. Bunlar arasında tükürük veya gıdalara bağlı inaktivasyon, topikal verilen ilaçlar ile etkileşim, oral sıvılar ile aktif maddenin dilüe edilmesi, çalkalama zamanının kısa olması gibi faktörler önemli

olanlarıdır. Yapılan bir çalışmada tükürük ve nistanin KHD'in *in vitro* antifungal etkisini önemli derece inhibe ettiği bildirilmiştir (20). Bununla birlikte Slots ve arkadaşları (21) test edilen türlerin bazılarının dirençli olabileceği üzerinde durmuşlardır. Çünkü 70 µg/ml'den daha büyük MFK değerleri saptamışlardır. Bu nedenle KHD içeren gargaların, maya izolatlarına ait duyarlılık testleri yapıldıktan sonra kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmamızda tüm test organizmalarında KHD için MFK değeri <16 µg/ml olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada SNG haricindeki diğer ticari gargaların tüm maya türlerine karşı 180 saniye içerisinde etkili olduğu görülmüştür. Klorheksidin ve SPK'in 15 saniye içerisinde test

organizmalarının tümüne karşı fungisidal etki gösterdikleri saptanmıştır. Giovanna ve arkadaşları (1) çalışmalarında KHD ve SPK'in tüm maya türlerine karşı en etkili gargalar olduğunu saptamışlardır.

Sonuç olarak bu çalışmada, SPK ve HEK'in özellikle *C. albicans*'a karşı diğer ürünlerden daha etkili olduğu, fakat KHD'in geri kalan diğer tüm maya türleri için en etkili ürün olduğu, SNG'nin ise zayıf antifungal etki gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgular oral kandidiyaz tedavisinde antimikrobiyal ajan içeren gargaların uygun alternatifler olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte antifungal ajan olarak antimikrobiyal gargaların etkinliklerinin mutlaka klinik deneylerle desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Musotto GC, Giangreco R. In vitro antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. J Periodontol 1997;68(8):729-33.
2. Ciancio SG. Use of mouthrinses for professional indications. J Clin Periodontol 1988;15(8):520-3.
3. Overholser CD. Longitudinal clinical studies with antimicrobial mouthrinses. J Clin Periodontol 1988;15(8):517-9.
4. Overholser CD, Meiller TF, DePaola LG, Minah GE, Niehaus C. Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. J Clin Periodontol 1990;17(8):575-9.
5. Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J Dent Res 1992;71(7):1431-8.
6. Walker CB. Microbiological effects of mouthrinses containing antimicrobials. J Clin Periodontol 1988;15(8):499-505.
7. Barkvoll P, Attramadal A. Effects of nystatin and chlorhexidine digluconate on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1989;67(3):279-81.
8. Zegarelli DJ. Fungal infections of the oral cavity. Otolaryngol Clin North Am 1993;26(6):1069-89.
9. Fotos PG, Vincent SD, Hellstein JW. Oral candidosis. Clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1992;74(1):41-9.
10. Listgarten M, Lai CH, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. J Periodontol 1993;64(3):155-61.
11. MacNeill S, Rindler E, Walker A, Brown AR, Cobb CM: Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. An *in vitro* study. J Clin Periodontol 1997;24(10):753-60.
12. Gonzalez S, Lobos I, Guajardo A, Celis A, Zemelman R, Smith CT, Saglie FR. Yeasts in juvenile periodontitis. Preliminary observations by scanning electron microscopy. J Periodontol 1987;58(2):119-24.
13. Laine P, Meurman JH, Murtomaa H, Lindqvist C, Torkko H, Pyyhonen S, Teerenhovi L. One-year trial of the effect of rinsing with an amine fluoride-stannous-fluoride-containing mouthwash on gingival index scores and salivary microbial counts in lymphoma patients receiving cytostatic drugs. J Clin Periodontol 1993;20(9):628-34.

14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. NCCLS Document M27-A. 17(9):940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087.
15. Thurmond JM, Brown AT, Sims RE, Ferretti GA, Raybould TP, Lillich TT, Henslee PJ. Oral *Candida albicans* in bone marrow transplant patients given chlorhexidine rinses: occurrence and susceptibilities to the agent. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991;72(3):291-5.
16. Pizzo G, Giuliana G. Antifungal activity of chlorhexidine containing mouthrinses. An *in vitro* study. Minerva Stomatol 1998;47(12):665-71.
17. Epstein JB, Vickars L, Spinelli J, Reece D. Efficacy of chlorhexidine and nystatin rinses in prevention of oral complications in leukemia and bone marrow transplantation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1992;73(6):682-9.
18. Ciancio S. Expanded and future uses of mouthrinses. J Am Dent Assoc 1994;125 Suppl 2:29-32.
19. Addy M, Hunter L. The effects of a 0.2% chlorhexidine gluconate mouthrinse on plaque, toothstaining and candida in aphthous ulcer patients. A double-blind placebo-controlled cross-over study. J Clin Periodontol 1987;14(5):267-73.
20. Spijkervet FK, van Saene JJ, van Saene HK, Panders AK, Vermey A, Fidler V. Chlorhexidine inactivation by saliva. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1990;69(4):444-9.
21. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1988;3(2):47-52.