

Comparaison de l'activité bactéricide et levuricide *in vitro* de bains de bouche, dans des conditions représentatives de l'usage.

Mots clés :

Bain de bouche
Antiseptique
Chlorhexidine
Héxétidine
Ammonium quaternaire
Amine
Fluor

In vitro comparison of the bactericidal and fungicidal mouthwash activity in conditions similar to their use.

Keywords :

Mouthwash
Antiseptic
Chlorhexidine
Hexetidine
Quarternary ammonium
Amide
Fluoramine

MICHEL Carole*, BROUSSE Sabine*, LUC Joëlle*, ROQUES Christine**

* Fonderephar - UFR des Sciences Pharmaceutiques – Toulouse.

** Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Microbiologie Industrielle- UFR des Sciences Pharmaceutiques – Toulouse.

r é s u m é L'activité bactéricide et lévuricide de cinq bains de bouche représentatifs des principes actifs couramment utilisés en antiseptie bucco-dentaire a été évaluée *in vitro*, dans des conditions représentatives de celles de la pratique (présence de substances interférentes : eau dure pour les produits utilisés dilués – matières organiques ; température de contact : 32°C ; temps de contact : 1 min) vis à vis de souches bactériennes cariogènes et parodontopathogènes, ainsi que vis-à-vis de *C. albicans*. Seuls les 2 produits à base de digluconate de chlorhexidine se révèlent bactéricides et fongicides. L'efficacité observée est similaire malgré la différence de concentration en principe actif et de conditions d'utilisation entre les 2 produits (produit à 0.2% utilisé pur ; produit à 0.1% utilisé après dilution au 1/3) et homogène vis-à-vis de l'ensemble des souches testées. Le produit contenant du chlorure de cétylpyridinium est inactif vis-à-vis de l'ensemble des souches testées. Les produits à base d'héxétidine ou de fluoroamines associées au fluorure de zinc sont caractérisés par des spectres d'activité très hétérogènes.

abstract The bactericidal and fungicidal activity of 5 mouthwashes representing the active principles commonly used in oral antiseptics have been evaluated *in vitro*, in conditions similar to their practical use (presence of interfering substances : hard water used to dilute products – organic matters; temperature on contact : 32° ; time of contact : 1 minute) towards the cariogenic and periopathogenic bacterial strains, as well as to *C. albicans*. Only the 2 products based on chlorhexidine digluconate reveal to be bactericidal and fungicidal. The efficacy observed is similar in spite of the difference in the principal active concentration and the conditions for use between the 2 products (product at 0.2 % pure ; product at 0.1 % diluted to 1/3) and homogeneous towards the general strains tested. The product containing cetylpyridinium chloride is inactive towards the general strains tested. The hexetidine or fluoroamine based products associated with zinc fluoride are characterized by a very heterogeneous spectrum activity.

Les pathologies bucco-dentaires d'étiologie microbienne, telles les gingivites et certaines formes de parodontites, présentent une incidence élevée, y compris dans la population jeune (Baehni et Bourgeois, 1998 ; Pilot, 1998). L'hygiène orale individuelle quotidienne par brossage, associée à des interventions professionnelles tel le détartrage, permettent généralement un contrôle de l'évolution de la plaque dentaire et donc du risque de pathologie (Axelsson 1998). Cependant, dans certaines situations et/ou pour des populations à risque (difficulté de brossage, fumeurs,...) des mesures supplémentaires doivent être envisagées.

Ainsi, de nombreux auteurs recommandent l'usage de bains de bouche comme adjuvant à l'hygiène orale mécanique (Addy et coll., 1994 ; Brex et coll., 1992 ; Brex et coll., 1993, Netuschil et coll. 1995). L'usage des bains de bouche ou de solutions de rinçage à propriétés antiseptiques dans la prévention et le traitement des pathologies bucco-dentaires est très ancien. Ceci a conduit, depuis environ 50 ans (Slanetz et Brown, 1949), au développement d'études dont l'objectif est de définir leur efficacité *in vitro* et *in vivo*.

L'activité antimicrobienne revendiquée pour les produits antiseptiques est très clairement définie par l'AFNOR (1999). Il s'agit d'une " Opération au résultat momentané, permettant au niveau des tissus vivants, dans la limite de leur tolérance, d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération ". L'activité revendiquée est une destruction de l'inoculum ou du moins d'une partie de cet inoculum pour un temps de contact court et défini et jamais une simple inhibition de croissance comme certaines publications peuvent encore le décrire (Van der Weijden et coll., 1998 ; Kagermeier et coll., 2000 ; Pilloni et coll. 2002).

Les méthodes normalisées actuellement reconnues pour l'évaluation des antiseptiques *in vitro* comportent des essais dans des conditions représentatives de celles de la pratique (Pr NF EN 14885, AFNOR). Ainsi, pour les bains de bouche, les conditions qui paraissent primordiales sont la présence de substances interférentes (eau dure pour les produits utilisés dilués – matières organiques), dans des conditions (température de contact : 32°C ; temps de contact : 1 min) et pour des souches (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Candida albicans*) représentatives des conditions réelles d'utilisation de ces produits.

Oral pathologies of microbial etiology, such as gingivitis and certain forms of periodontitis, present an increasing incidence in which the young population is included (Baehni & Bourgeois, 1998; Pilot, 1998). Daily individual oral hygiene by toothbrushing associated with professional interventions such as scaling, generally allows the control of the evolution of dental plaque and the development of pathological risks (Axelsson, 1998). However, in certain situations and/or for the populations at risk (difficulty in toothbrushing, smokers, etc.) additional measures must be considered.

Therefore, numerous authors recommend the use of a mouthwash as an adjunct to mechanical oral hygiene (Addy et al., 1994; Brex et al., 1992; Brex et al., 1993, Netuschil et al. 1995). The use of mouthwashes or rinsing solutions with antiseptic properties for the prevention and treatment of oral pathologies is an ancient practice. Since 50 years, this has led (Slanetz & Brown, 1949) to the development of studies for which the objective is to define their efficacy *in vitro* and *in vivo*.

The antimicrobial activity demanded for antiseptic products is clearly defined by the AFNOR (1999). It is "a process of momentary results, allowing at the vital tissue level, in the limit of their tolerance, to eliminate or kill the microorganisms and/or inactivate the virus in function of the fixed objectives. The result of this process is limited to the microorganisms present at the moment of the operation". The activity demanded is a destruction of the inoculum or at least a part of the inoculum during the short and definite time of contact and never a simple growth inhibition such as described in certain publications (Van der Weijden et al., 1998 ; Kagermeier et al., 2000 ; Pilloni et al. 2002).

The standardized methods currently recognized for *in vitro* evaluation of antiseptics include trials in conditions similar to that in practice (Pr NF EN 14885, AFNOR). Thus for mouthwashes, the conditions that appear primordial are the presence of interfering substances (hard water used to dilute products – organic matters), in conditions (temperature on contact : 32° ; time of contact : 1 minute) and for strains (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Candida albicans*) similar to actual conditions when using these products.



Cette étude a donc pour objet de comparer l'efficacité bactéricide et lévuricide *in vitro*, dans des conditions représentatives de celles de la pratique, de bains de bouche couramment utilisés en France et représentatifs des principes actifs les plus couramment utilisés en hygiène bucco-dentaire : bisguanides, ammoniums quaternaires, hététidine, composés fluorés (Sreenivasan et Gaffar, 2002).

Matériel et méthode

Produits soumis à l'essai

- Produit A : 0,10 % de digluconate de chlorhexidine + 0.50 % de chlorobutanol – Utilisation dilué au 1/3
- Produit B : 0,005 % de chlorure de cétypyridinium – Utilisation pur
- Produit C : 0,10 % d'hététidine – Utilisation pur
- Produit D : Fluoroamines + 0.025 % de fluorure de Zn – Utilisation pur
- Produit E : 0.20 % de digluconate de chlorhexidine – Utilisation pur

Afin de se rapprocher des conditions d'utilisation, les produits B, C, D et E ont été utilisés purs (prêts à l'emploi).

Le produit A a été dilué extemporanément au 1/3 dans de l'eau dure (dureté de 30°F, pH 7,0 +/- 0,2). La préparation obtenue est physiquement homogène et stable.

Souches-tests

Toutes les souches tests ont été obtenues auprès de l'Institut Pasteur (Paris) et incluent des espèces cariogènes : *Streptococcus mutans* CIP 103220T et *Lactobacillus acidophilus* CIP 7316T, des espèces parodontopathogènes : *Fusobacterium nucleatum* CIP 101130T, *Prevotella intermedia* CIP 103607 et *Actinobacillus actinomycetemcomitans* CIP 52109, ainsi que l'espèce principalement impliquée dans les candidoses : *Candida albicans* IP 4872.

L'entretien des souches et les dénombrements sont réalisés sur gélose Schaedler (bioMérieux) pour *Streptococcus mutans* CIP 103220T, sur gélose MRS (bioMérieux) pour *Lactobacillus acidophilus* CIP 7316T, sur gélose Columbia + 5% de sang de mouton stérile

Hence the objective of this study was to compare the *in vitro* bactericidal and fungicidal efficacy of mouthwashes commonly used in France, in conditions similar to that in practice, considering the active elements frequently used in oral hygiene: bisguanides, quaternary ammonium, hexetidine, fluorides compounds (Sreenivasan & Gaffar, 2002).

Materials and methods

Products subjected to trial

- Product A : 0.10 % chlorhexidine digluconate + 0.50 % chlorobutanol – used diluted to 1/3
- Product B : 0.005 % cetylpyridinium chloride – used pure
- Product C : 0.10 % hexetidine – used pure
- Product D : Fluoroamines + 0.025 % Zn fluoride – used pure
- Product E : 0.20 % chlorhexidine digluconate – used pure

In order to make the conditions for use more similar, products B, C, D and E have been used pure (ready to use).

Product A has been immediately diluted to 1/3 in **hard water** (hardness of 30°F, pH 7.0 +/- 0.2). The preparation obtained is physically stable and homogenous.

Strain-trials

All the strain trials have been obtained from the Pasteur Institute (Paris) and include cariogenic species : *Streptococcus mutans* CIP 103220T and *Lactobacillus acidophilus* CIP 7316T ; periopathogenic species : *Fusobacterium nucleatum* CIP 101130T, *Prevotella intermedia* CIP 103607 and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* CIP 52109; as well as species principally involved in candidiasis : *Candida albicans* IP 4872

The maintenance and counting of the strains were carried out in Schaedler agar (bioMérieux) for *Streptococcus mutans* CIP 103220T, in MRS agar (bioMérieux) for *Lactobacillus acidophilus* CIP 7316T, in Columbia agar + 5% sterile sheep's blood for





pour *Fusobacterium nucleatum* CIP 101130T, *Prevotella intermedia* CIP 103607 et *Actinobacillus actinomycetemcomytans* CIP 52109 et sur gélose à l'extrait de malt (AES) pour *Candida albicans* IP 4872.

Au moment de l'essai, les cellules sont mises en suspension dans le diluant (Solution tryptone-sel, AES). La suspension est ajustée par néphélémétrie (640nm) à environ 10^8 bactéries/ml pour *S. mutans* et *L. acidophilus*. En ce qui concerne *F. nucleatum*, *P. intermedia* et *A. actinomycetemcomitans*, les dénombrements ne peuvent être réalisés que par étalement de 100µl. Ainsi, les suspensions d'essais doivent être ajustées à environ 1 log de plus que les suspensions des autres bactéries. Pour *C. albicans*, la suspension est ajustée à 10^7 levures/ml.

Pour le dénombrement des suspensions bactériennes d'essai, des dilutions à 10^{-6} et 10^{-7} de la suspension d'essai (dilutions à 10^{-5} et 10^{-6} pour la levure) sont réalisées.

Méthodologie

Essai proprement dit

Avant l'essai, tous les réactifs sont portés à la température d'essai, soit 32°C +/- 1°C. A l'aide d'une pipette, 1,0ml de substance interférente (**solution d'albumine bovine** - fraction V – Sigma, à 0,3 % dans l'eau distillée, stérilisée par filtration sur membrane 0,45µm) est introduit dans le tube essai. 1,0ml de suspension microbienne d'essai est alors ajouté. L'ensemble est placé au bain-marie pendant 2 min +/- 10 s.

A la fin de ce temps, 8,0 ml des produits B, C, D, E ou de la dilution au 1/3 du produit A sont ajoutés et l'ensemble est homogénéisé.

Après 1 min +/- 10 s de contact à 32°C +/- 1°C, 1,0 ml du mélange d'essai est transféré dans un tube contenant 8,0 ml de neutralisant (polysorbate 80 (10 %), saponine (2 %), lécithine de soja (2 %), thio-sulfate de sodium (0,5 %), qs bouillon trypticase soja - BioMérieux) et 1,0 ml d'eau.

Après homogénéisation, le tube est placé dans un bain d'eau maintenu à 20°C +/- 1°C. Après 5 min +/- 10 s de neutralisation, 2 fois 1ml de chaque dilution (*S. mutans*, *L. acidophilus*, *C. albicans*) sont transférés dans des boîtes de Petri distinctes et 15ml de gélose correspondante en surfusion, refroidie à 45°C +/- 1°C

Fusobacterium nucleatum CIP 101130T, *Prevotella intermedia* CIP 103607 and *Actinobacillus actinomycetemcomytans* CIP 52109, and in malt extract agar (AES) for *Candida albicans* IP 4872.

At the time of testing, the cells were placed into suspension in a thinner solution (Tryptone-sel solution, AES). The suspension was adjusted by nephelometry (640nm) to about 10^8 bacteria/ml for *S. mutans* and *L. acidophilus*. As far as *F. nucleatum*, *P. intermedia* and *A. actinomycetemcomitans* were concerned ; except by spreading out 100µl, the counts could not be done. Thus the suspension trials must be adjusted to more than 1 log compared to the suspensions of other bacteria. For *C. albicans*, the suspension is adjusted to 10^7 yeasts/ml.

For the counting of bacterial suspension trials, dilutions of 10^{-6} and 10^{-7} of the suspension trials (dilutions of 10^{-5} and 10^{-6} for the yeast) were done.

Methodology

Actual trial

Before the testing, all the reagents were brought to the trial temperature of either 32°C +/- 1°C. With an aid of a pipette, 1.0 ml interfering substance (**bovine albumin solution** – fraction V – Sigma, to 0.3 % in distilled water, sterilized by filtration on a 0.45 µm membrane) was introduced into a test tube. The 1.0ml microbial trial suspension was then added and placed into the double boiler for 2 mins +/- 10 secs.

At the end of this period, 8.0ml of products B, C, D, E or the dilution to 1/3 of the product A were added to the mixture and were homogenized.

After 1 min +/- 10 secs of contact to 32°C +/- 1°C, 1.0ml of the trial mix was transferred into a tube containing 8.0ml neutralizer (polysorbate 80 (10 %), saponin (2 %), soya lecithin (2 %), sodium thiosulfate (0,5%), qs soya trypticase broth - BioMérieux) and 1.0ml water.

After homogenization, the tube was placed in a double boiler maintained at 20°C +/- 1°C. After 5 mins +/- 10 secs of neutralization, twice 1ml of each dilution (*S. mutans*, *L. acidophilus*, *C. albicans*) were transferred in separate Petri dishes and 15ml of agar in suffusion, and left to cool at 45°C +/- 1°C were added ; or twice





sont ajoutés ; ou 2 fois 100µl de chaque dilution (*F. nucleatum*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*) sont étalés sur 2 géloses Columbia au sang de mouton distinctes. Les géloses sont incubées à 36°C +/- 1°C pour les bactéries et placées en anaérobiose (*F. nucleatum*, *P. intermedia*) ou sous 5 % de CO₂ (*A. actinomycetemcomitans*). Les colonies sont comptées après 48h et 72h d'incubation. Les géloses sont incubées 48h à 30°C +/-1°C pour la levure. Les résultats sont exprimés en nombre d'UFC/ml dans la suspension à la fin de l'essai (Na).

Validation de l'essai

Parallèlement, sont réalisés les dénombrements des suspensions initiales (N) ainsi que les témoins de validation des essais :

- les conditions expérimentales choisies (dénombrement en présence de substances interférentes : A),
- la non-toxicité du neutralisant (dénombrement après contact avec le neutralisant sans produit : B),
- l'inactivation par la méthode de dilution-neutralisation (dénombrement après contact avec le produit neutralisé : C),

sont validées selon les indications des normes européennes.

Expression des résultats et interprétation

Pour chaque essai les réductions bactériennes ou fongiques, indiquant le nombre de cellules détruites dans l'essai par rapport au témoin, sont calculées selon la formule (N/10 - Na). Selon les normes européennes correspondantes, lorsque le contact produit/bactéries conduit à une réduction $\geq 10^5$, (division par 100 000 du nombre de germes) le produit est considéré comme bactéricide dans les conditions d'essai.

Lorsque le contact produit/levures conduit à une réduction $\geq 10^4$ (division par 10 000 du nombre de levures), le produit est considéré comme lévuricide dans les conditions d'essai.

L'ensemble du protocole a été réalisé en double pour chaque souche-test et chaque produit (test 1 et test 2 dans le [tableau 1](#)).

100µl of each dilution (*F. nucleatum*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*) were spread out on 2 separate Columbia sheep's blood agar. The plates were incubated at 36°C +/- 1°C for the bacteria (*F. nucleatum*, *P. intermedia*) and placed under anaerobic conditions or under 5% CO₂ (*A. actinomycetemcomitans*). The colonies were counted after 48 hours and 72 hours of incubation. The plates were incubated 48 hours at 30°C +/-1°C for the yeast. The results were expressed in CFU/ml in the suspensions at the end of the trial (Na).

Validation of the trial

The counting of initial suspensions were at the same time carried out (N) as well as the controls of the validation of trials :

- the chosen experimental conditions (counting in the presence of interfering substances : A),
- the non-toxicity of the neutralizer (counting after contact with the neutralizer without the product : B),
- the inactivation by the method of dilution-neutralization (counting after contact with the neutralized product : C),

were validated in conformity with the indications of the European standards.

Expression and interpretation of the results

Each of the bacterial or fungal reduction trials indicating the number of cells destroyed in the test sample in comparison to the control, were calculated after the formula (N/10-Na). According to the corresponding European standards, when the product/bacteria contact leads to a reduction $\geq 10^5$, (divided by 100,000 of the number of germs) the product is considered bactericidal in the conditions of the trials.

When the product/yeasts contact lead to a reduction $\geq 10^4$ (divided by 10,000 of the number of yeasts) the product is considered fungicidal in the conditions of the trials.

The protocol as a whole was done twice for each strain-trial and for each product (tests 1 and 2 in the [table 1](#)).



Tableau 1 - Activité bactéricide et lévuricide des 5 bains de bouche testés dans des conditions représentatives de celles de la pratique.

	Suspension bactérienne d'essai		Produit A 1/3	Produit B pur	Produit C pur	Produit D pur	Produit E pur
<i>Streptococcus mutans</i> CIP 103220T	Test 1 10 ⁻⁶ : 120 - 167 10 ⁻⁷ : 14 - 25 N : 1,5.10 ⁸	Na Réduction bactérienne	30 > 10 ⁵	> 3.10 ³ NB	40 > 10 ⁵	30 > 10 ⁵	< 10 > 10 ⁵
	Test 2 10 ⁻⁶ : 72 - 72 10 ⁻⁷ : 7 - 7 N : 0,72.10 ⁸	Na Réduction bactérienne	< 10 > 10 ⁵	> 3.10 ³ NB	< 10 > 10 ⁵	< 10 > 10 ⁵	< 10 > 10 ⁵
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CIP 7316T	Test 1 10 ⁻⁶ : 16 - 20 10 ⁻⁷ : 2 - 4 N : 0,18.10 ⁸	Na Réduction bactérienne	< 10 > 10 ⁵	> 3.10 ³ NB	< 10 > 10 ⁵	2,5.10 ³ NB	< 10 > 10 ⁵
	Test 2 10 ⁻⁶ : 30 - 36 10 ⁻⁷ : 3 - 1 N : 0,33.10 ⁸	Na Réduction bactérienne	< 10 > 10 ⁵	> 3.10 ³ NB	< 10 > 10 ⁵	1,6.10 ³ NB	< 10 > 10 ⁵
<i>Fusobacterium nucleatum</i> CIP 101130T	Test 1 10 ⁻⁶ : 16 - 32 10 ⁻⁷ : 0 - 3 N : 0,24.10 ⁹	Na Réduction bactérienne	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵	< 10 ² > 10 ⁵	< 10 ² > 10 ⁵
	Test 2 10 ⁻⁶ : 60-70 10 ⁻⁷ : 1 - 5 N : 0,65.10 ⁹	Na Réduction bactérienne	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵	< 10 ² > 10 ⁵	< 10 ² > 10 ⁵
<i>Prevotella intermedia</i> CIP 103607	Test 1 10 ⁻⁶ : 31 - 37 10 ⁻⁷ : 7 - 5 N : 0,34.10 ⁹	Na Réduction bactérienne	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	5,9.10 ³ NB	> 3,10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵
	Test 2 10 ⁻⁶ : 22 - 42 10 ⁻⁷ : 1 - 1 N : 0,32.10 ⁹	Na Réduction bactérienne	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	5,0.10 ³ NB	> 3,10 ⁴ > 10 ⁵	< 10 ² > 10 ⁵
<i>A. actinomycetemcomitans</i> CIP 52109	Test 1 10 ⁻⁶ : > - > 10 ⁻⁷ : 45 - 50 N : 4,8.10 ⁹	Na Réduction bactérienne	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵	> 3,10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵
	Test 2 10 ⁻⁶ : > - > 10 ⁻⁷ : 59 - 64 N : 6,2.10 ⁹	Na Réduction bactérienne	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵	> 3,10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵
<i>Candida albicans</i> IP 4872	Test 1 10 ⁻⁵ : 180 - 210 10 ⁻⁶ : 20 - 29 N : 2,0.10 ⁷	Na Réduction fongique	< 10 > 10 ⁴	> 3.10 ³ NF	< 10 > 10 ⁴	> 3,10 ³ NF	< 10 > 10 ⁴
	Test 2 10 ⁻⁵ : 242 - 243 10 ⁻⁶ : 24 - 28 N : 62,4.10 ⁷	Na Réduction fongique	< 10 > 10 ⁴	> 3.10 ³ NF	< 10 > 10 ⁴	> 3,10 ³ NF	< 10 > 10 ⁴

N : Nombre d'UFC/ml de suspension bactérienne ou fongique d'essai
 (10⁻⁶ - 10⁻⁷ : nombre de colonies pour les dilutions 10⁻⁶ et 10⁻⁷ à partir des suspensions bactériennes initiales ;
 10⁻⁵ - 10⁻⁶ : nombre de colonies pour les dilutions 10⁻⁵ et 10⁻⁶ à partir des suspensions fongiques initiales)
> : nombre de colonies > 300
Na : Nombre d'UFC/ml dans le mélange essai
Réduction bactérienne ou fongique : réduction du nombre de microorganismes après contact : (N/10) - Na
NB : non bactéricide - **NF** : non fongicide

Table 1 - The bactericidal and fungicidal activity of 5 mouthwashes tested in conditions similar to their practical use.

	Suspension of bacterial trial		Product A 1/3	Product B pur	Product C pur	Produit D pur	Product E pur
<i>Streptococcus mutans</i> CIP 103220T	Test 1 10 ⁻⁶ : 120 – 167 10 ⁻⁷ : 14 – 25 N : 1,5.10 ⁸	Na Bacterial reduction	30 > 10 ⁵	> 3.10 ³ NB	40 > 10 ⁵	30 > 10 ⁵	< 10 > 10 ⁵
		Test 2 10 ⁻⁶ : 72 – 72 10 ⁻⁷ : 7 - 7 N : 0,72.10 ⁸	Na Bacterial reduction	< 10 > 10 ⁵	> 3.10 ³ NB	< 10 > 10 ⁵	< 10 > 10 ⁵
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CIP 7316T	Test 1 10 ⁻⁶ : 16 - 20 10 ⁻⁷ : 2 - 4 N : 0,18.10 ⁸	Na Bacterial reduction	< 10 > 10 ⁵	> 3.10 ³ NB	< 10 > 10 ⁵	2,5.10 ³ NB	< 10 > 10 ⁵
		Test 2 10 ⁻⁶ : 30 - 36 10 ⁻⁷ : 3 - 1 N : 0,33.10 ⁸	Na Bacterial reduction	< 10 > 10 ⁵	> 3.10 ³ NB	< 10 > 10 ⁵	1,6.10 ³ NB
<i>Fusobacterium nucleatum</i> CIP 101130T	Test 1 10 ⁻⁶ : 16 - 32 10 ⁻⁷ : 0 - 3 N : 0,24.10 ⁹	Na Bacterial reduction	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵	< 10 ² > 10 ⁵	< 10 ² > 10 ⁵
		Test 2 10 ⁻⁶ : 60-70 10 ⁻⁷ : 1 - 5 N : 0,65.10 ⁹	Na Bacterial reduction	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵	< 10 ² > 10 ⁵
<i>Prevotella intermedia</i> CIP 103607	Test 1 10 ⁻⁶ : 31 - 37 10 ⁻⁷ : 7 - 5 N : 0,34.10 ⁹	Na Bacterial reduction	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	5,9.10 ³ NB	> 3,10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵
		Test 2 10 ⁻⁶ : 22 - 42 10 ⁻⁷ : 1 - 1 N : 0,32.10 ⁹	Na Bacterial reduction	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	5,0.10 ³ NB	> 3,10 ⁴ > 10 ⁵
<i>A. actinomycetemcomitans</i> CIP 52109	Test 1 10 ⁻⁶ : > - > 10 ⁻⁷ : 45 - 50 N : 4,8.10 ⁹	Na Bacterial reduction	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵	> 3,10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵
		Test 2 10 ⁻⁶ : > - > 10 ⁻⁷ : 59 - 64 N : 6,2.10 ⁹	Na Bacterial reduction	< 10 ² > 10 ⁵	> 3.10 ⁴ NB	< 10 ² > 10 ⁵	> 3,10 ⁴ NB
<i>Candida albicans</i> IP 4872	Test 1 10 ⁻⁵ : 180 - 210 10 ⁻⁶ : 20 - 29 N : 2,0.10 ⁷	Na Bacterial reduction	< 10 > 10 ⁴	> 3.10 ³ NF	< 10 > 10 ⁴	> 3,10 ³ NF	< 10 > 10 ⁴
		Test 2 10 ⁻⁵ : 242 - 243 10 ⁻⁶ : 24 - 28 N : 62,4.10 ⁷	Na Bacterial reduction	< 10 > 10 ⁴	> 3.10 ³ NF	< 10 > 10 ⁴	> 3,10 ³ NF

N : Number of CFU/ml of the bacterial and fungal suspension of the trial
 (10⁻⁶ - 10⁻⁷ : number of colonies for the dilutions 10⁻⁶ and 10⁻⁷ from the initial bacterial suspensions ;
 10⁻⁵ - 10⁻⁶ : number of colonies for the dilutions 10⁻⁵ - and 10⁻⁶ from the initial fungal suspensions)
> : number of colonies > 300
Na : Number of UFC/ml in the mixed trial
Bacterial and fungal reduction : reduction of the number of microorganisms after contact : (N/10) - Na
NB : non bactericidal - **NF** : non fungicidal



Résultats

Les résultats sont présentés dans le **tableau 1**, indiquant les valeurs de N (témoin), Na (essai) et les réductions bactériennes ou fongiques en puissance de 10 calculées à partir de ces valeurs.

Dans les conditions d'essai, le produit A (**tableau 1**) dilué au 1/3 en eau dure (30°F) et en présence de matière organique (0,3 % d'albumine bovine) est bactéricide et lévuricide et présente ainsi la même activité que le produit E utilisé pur. Ces deux produits permettent d'obtenir 5 log de réduction sur l'ensemble des souches bactériennes testées et 4 log de réduction vis à vis de *C. albicans*, après seulement 1 min de contact à 32°C.

Dans les mêmes conditions, hormis la dilution en eau dure, le produit B ne présente aucune activité bactéricide ou lévuricide (réductions logarithmiques respectivement < 5 et < 4). Les produits C et D sont caractérisés par des activités bactéricides hétérogènes. Les 2 produits sont inefficaces vis à vis de *P. intermedia* (réductions logarithmiques < 5). Le produit D se révèle également non bactéricide vis à vis de *L. acidophilus* et *A. actinomycetemcomitans* (réductions logarithmiques < 5), et non lévuricide (réductions logarithmiques < 4).

Discussion

Le travail réalisé correspond à une validation *in vitro* de l'efficacité antiseptique de bain de bouche, dans des conditions représentatives de leur usage. Son originalité repose sur une adaptation des normes européennes décrites dans le cadre de l'évaluation des antiseptiques et désinfectants aux formulations bains de bouche. Ainsi, afin de se rapprocher des conditions pratiques d'utilisation de ces produits, nous avons choisi de réaliser les essais avec une eau de dilution présentant une dureté de 30°F, en présence de matières organiques, représentée par une solution à 0,3 % d'albumine bovine, pour un temps de contact de 1 min et une température de contact de 32°C.

Les souches testées correspondent à des espèces classiquement impliquées dans des pathologies bucco-dentaires : caries (*S. mutans*, *L. acidophilus*), maladies parodontales (*F. nucleatum*, *P. intermedia* et *A. actinomycetemcomitans*) et candidose (*C. albicans*).

Results

The results are presented in **table 1**, indicating the value of N (control), Na (test) and the bacterial and fungal reductions were calculated from these values to the power of 10.

In the trial conditions, the product A (**table 1**) diluted to 1/3 in hard water (30°F) and in the presence of organic matter (0.3 % bovine albumin) is bactericidal and fungicidal. Thus it presents the same activity as the product E when used pure. These two products allows to obtain 5 log reduction on the totality of bacterial strains tested and 4 log reduction with regards to *C. albicans*, after only 1 min. of contact at 32°C.

In the same conditions, except for the dilution into hard water, the product B does not present any bactericidal or fungicidal activity (logarithmic reductions < 5 and < 4 respectively). The products C and D were characterized by heterogeneous bactericidal activities. The 2 products were ineffective on *P. intermedia* (logarithmic reductions < 5). The product D revealed to be equally non-bactericidal for *L. acidophilus* and *A. actinomycetemcomitans* (logarithmic reductions < 5), and non-fungicidal (logarithmic reductions < 4).

Discussion

The work carried out corresponds to an *in vitro* validation of the antiseptic mouthwash efficacy in conditions similar of their use. Its originality relies on the adaptation of European standards described in the scope of evaluation of antiseptics and disinfectants in mouthwash formulations. Therefore, in order to be similar to the conditions of practical use of these products, we have chosen to carry out trials with dilution water presenting a hardness of 30°F, in the presence of organic matters, represented by a solution of 0.3 % bovine albumin, with contact time of 1 min and a contact temperature of 32°C.

The strains tested correspond to the species classically involved in oral pathologies: dental caries (*S. mutans*, *L. acidophilus*), periodontal diseases (*F. nucleatum*, *P. intermedia* et *A. actinomycetemcomitans*) and candidiasis (*C. albicans*).



Selon les indications de la norme, nous avons testé les produits vis à vis de souches de référence, présentes au niveau de la Collection de l'Institut Pasteur et donc susceptibles d'être obtenues et testées par d'autres laboratoires. Enfin, l'étape clé d'arrêt du contact produit/microorganismes a été prise en compte et validée lors de nos essais. De très nombreuses études *in vivo* ne prennent pas en compte l'étape de neutralisation dès le prélèvement (Netuschil et coll., 1995 ; Mengel et coll., 1996). Pitten et Kramer ont publié en 1999 une étude sur l'efficacité antiseptique de différents bains de bouche *in vivo*, avec neutralisation dès le prélèvement. Dans ces conditions, les auteurs notent que le peroxyde d'hydrogène, les bains de bouche à base d'amine fluorée/fluorure de zinc et à base d'huiles essentielles présentent des activités plus faibles et moins durables que la chloramine T ou un bain de bouche à la chlorhexidine.

La réalisation de ces essais spécifiques permet une caractérisation précise de l'activité des produits et conduit donc à leur classification.

Le produit A dilué au 1/3 est caractérisé par une activité bactéricide et lévuricide sur toutes les souches testées. L'efficacité antiseptique du bain de bouche A associant 0,10 % de digluconate de chlorhexidine et 0,50 % de chlorobutanol a fait l'objet de plusieurs publications. Elles démontrent une activité antiseptique optimisée de cette formulation (Roques et coll., 2004) par rapport à la concentration en chlorhexidine (Addy et coll., 1991, Luc et coll., 1998), associée à un spectre large et homogène (Luc et coll., 1991, 1998 ; Hermant et coll., 1997). Ainsi, nous retrouvons une activité bactéricide et lévuricide comparable pour le produit A dilué au 1/3 et le produit E utilisé pur, ce dernier contenant 0.20% de digluconate de chlorhexidine. La formule du produit A est de plus caractérisée par une très bonne préservation de l'activité en présence de substances interférentes, que ce soit eau dure ou matière organique. Cette efficacité *in vitro* est corrélée à une efficacité *in vivo* dans le traitement des gingivites (Hoffmann et coll., 2001 ; Richter et coll., 2003).

Le produit B contenant uniquement 0,005 % de chlorure de cétalpyridinium ne présente d'activité bactéricide ou lévuricide sur aucune des souches testées. Ce manque d'activité antiseptique du produit avait déjà été noté lors d'essais antérieurs (Luc et coll., 1991) et correspond à la faible concentration en principe actif présente dans le produit.

Le produit C à base d'héxétidine et le produit D à base d'amine fluorée et de fluorure d'étain présentent

According to the standard indications, we have tested the products with regards to the reference strains present at the Collection of the Pasteur Institute and thus susceptible to be obtained and tested by other laboratories. Finally, the key stage of product/microorganism inhibition of contact had been taken into consideration and validated at the time of our trials. Numerous *in vivo* studies have not taken into consideration the neutralization stage of the samples (Netuschil et al., 1995 ; Mengel et al., 1996). Pitten and Kramer had published in 1999 a study on the antiseptic *in vivo* efficacy of different mouthwashes, with neutralization of samples. In these conditions, the authors noted that hydrogen peroxide, fluoride amine/zinc fluoride based and essential oil based mouthwashes present weak and less durable activities than chloramine-T or chlorhexidine mouthwash.

The realization of these specific trials allows a precise characterization of the activity of products and thus leads to their classification.

The product A diluted to 1/3 is characterized by a bactericidal and fungicidal activity on all the tested strains. The antiseptic efficacy of the mouthrinse A associating 0.10 % of chlorhexidine digluconate and 0.50 % of chlorobutanol has been the subject of several publications. They demonstrate an optimized antiseptic activity of this formulation (Roques et al., 2004) in comparison with the concentration in chlorhexidine (Addy et al., 1991 ; Luc et al., 1998), associated to a large and homogeneous spectrum (Luc et al., 1991, 1998 ; Hermant et al., 1997). Therefore we find a bactericidal and fungicidal activity comparable for the product A diluted to 1/3 and the product E used pure, the latter contains 0.20 % chlorhexidine digluconate. The formula of product A is more characterized by a very good preservation of the activity in the presence of interfering substances, be it hard water or organic matter. This *in vitro* efficacy is correlated to an *in vivo* efficacy in the treatment of gingivitis (Hoffmann et al., 2001 ; Richter et al., 2003).

The product B, containing only 0.005 % of cetylpyridinium chloride does not present a bactericidal or fungicidal activity on any of the tested strains. This absence of antiseptic activity of the product had already been mentioned during previous trials (Luc et al., 1991) and corresponds to a weak principal active concentration present in the product.

The product C (hexetidine based) and the product D (fluoroamine and stannous fluoride based) present an



une activité plus hétérogène. Ainsi, la résistance particulière de certaines souches est à souligner. Trois des bains de bouche testés se révèlent inefficaces vis à vis de *P. intermedia* et 2 vis à vis de *A. actinomycetemcomitans* et *C. albicans*. L'héxétidine est une molécule antiseptique présentant un spectre spécifique *in vitro* (Luc et coll., 1991). Nos résultats confirment l'activité notable du bain de bouche à base d'héxétidine, bien qu'elle reste inférieure à celle de la chlorhexidine. Ceci est lié au spectre plus étroit de l'héxétidine, mais pourrait également impliquer une plus grande sensibilité du produit C aux protéines par rapport au produit A.

En ce qui concerne le produit D, l'hétérogénéité du spectre est encore plus marquée. La moindre sensibilité de *A. actinomycetemcomitans* au produit D a été précédemment démontrée sur biofilm. Ainsi, Fine et coll. (2001) ont démontré qu'un contact de 15 secondes avec ce biofilm induisait une réduction significative de la population planctonique, mais pas de réductions significatives de la population adhérente. L'activité observée sur bactéries planctoniques correspondant à une réduction logarithmique inférieure aux 5 log recherchés ici.

activity more heterogenous thus emphasizing the particular resistance of certain strains. Three of the mouthwashes tested revealed their inefficacy on *P. intermedia* and two on *A. actinomycetemcomitans* and *C. albicans*. Hexetidine is an antiseptic with a molecule presenting a specific *in vitro* spectrum (Luc et al., 1991). Our results confirm the notable activity of the hexetidine based mouthwash, although it remains inferior to that of chlorhexidine. This is related to a narrower spectrum of the hexetidine but can equally involve a greater sensitivity of product C to proteins compared to product A.

Concerning product D, the heterogeneity of the spectrum is still more evident. The slightest sensitivity of *A. actinomycetemcomitans* to product D had been previously demonstrated on biofilm. Thus Fine et al. (2001) have shown that the contact of 15 seconds with biofilm leads to a significant reduction of the planktonic population but no significant reductions of the adherent population. Carefully chosen in this study, the activity observed on the planktonic bacteria corresponds to a logarithmic reduction inferior to 5 log.

Conclusion

L'intérêt de ce travail est de définir des conditions précises d'évaluation des bains de bouche antiseptiques *in vitro* permettant d'appréhender leur efficacité *in vivo*. L'ensemble des résultats observés confirme que la chlorhexidine est le principe actif antiseptique de référence en hygiène bucco-dentaire. Son activité *in vitro* (Hermant et coll., 1997, Luc et coll., 1991, 1998 ; Sreenivasan et Gaffar, 2002) est corrélée à une efficacité démontrée *in vivo* (Brex et coll., 1992, ; Addy et coll., 1991). Les bains de bouche à base de digluconate de chlorhexidine testés, que ce soit le produit à 0.20 % utilisé pur ou le produit A à 0.10 % dilué au 1/3, présentent *in vivo* une efficacité comparable (Richter et coll., 2003 ; Collaert et coll., 1992, Lucas et Lucas, 1999). Cette efficacité se révèle supérieure à celle de produits à base de fluoroamines et de fluorure d'étain (Brex et coll., 1992 ; Riep et coll., 1999) d'héxétidine (Sharma et coll., 2003) ou de chlorure de cétypyridinium (Gjerme et coll., 1970 ; Moran et coll., 2000) lors de différentes études cliniques. Ainsi, le classement des produits effectué selon la méthodologie proposée est tout à fait en accord avec la littérature portant sur des études *in vivo*, validant l'intérêt d'une telle approche lors du choix des formulations.

The interest of this work is to define the precise conditions of the *in vitro* evaluation of antiseptic mouthwashes that allows recognizing their *in vivo* efficacy. In general, the results observed confirm that chlorhexidine is the principal active antiseptic of reference in oral hygiene. Its *in vitro* activity (Hermant et al., 1997 ; Luc et al. 1991, 1998 ; Sreenivasan and Gaffar, 2002) is correlated to an efficacy shown *in vivo* (Brex et al., 1992 ; Addy et al. 1991). Tested mouthwashes containing chlorhexidine digluconate, 0.2% product tested net and 0.1% product tested after 1/3 dilution present similar *in vivo* efficiency (Richter et al., 2003 ; Collaert et al., 1992 ; Lucas and Lucas, 1999). This efficiency is higher than that of mouthwashes containing fluoroamines and Zn fluoride (Brex et al., 1992 ; Riep et al., 1999), hexetidine (Sharma et al., 2003) or cetylpyridinium (Gjerme et al., 1970 ; Moran et al., 2000) during the different clinical studies. Therefore the filing of products done according to the proposed methodology is completely in accordance with the literature done on *in vivo* studies, validating the interest of such an approach during the choice of formulations.

Traduction : Marie-Grace POBLETE

Demande de tirés-à-part :

Pr Christine ROQUES - Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Microbiologie Industrielle - UFR des Sciences Pharmaceutiques – 31062 Toulouse cedex 4 - FRANCE.



- AFNOR.
Recueil de normes. Antiseptiques et désinfectants. 1999.
- AFNOR. Pr NF EN 14885
Antiseptiques et désinfectants chimiques – Application des normes européennes pour les antiseptiques et désinfectants chimiques. 02 Avril 2004.
- ADDY M., JENKINS S., NEWCOMBE R.
The effect of some chlorhexidine – containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *J clin Periodont* 1991;**18**:90-93.
- ADDY M., MORAN J., WADE W.
Chemical plaque control in the prevention of gingivitis and periodontitis. In: Lang NP, Karring T. Ed: Proceedings of the first European Workshop on Periodontology. *Quintessence* London, 1994.
- AXELSSON P.
Needs-related plaque control measures based on risk prediction. In: Lang NP, Attström R, Loe H. Ed: Proceedings of the first European Workshop on Mechanical Plaque Control. *Quintessence* Berlin 1998.
- BAEHNI P.C., BOURGEOIS D.M.
Epidemiology of periodontal health and disease. In: Lang NP, Attström R, Loe H. Ed: Proceedings of the first European Workshop on Mechanical Plaque Control. *Quintessence* Berlin, 1998.
- BREX M., BROWSTONE E., MAC DONALD L., GELSKY S., CHEANG M.
Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses as supplements to regular tooth – cleaning measures. *J clin Periodont* 1992;**19**:202-207.
- BREX M., MAC DONALD L., LEGARY K., CHEANG M., FORGAY M.
Long-term effects of Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis, staining and bacterial vitality. *J dent Res* 1993;**72**:1194-1197.
- COLLAERT B., ATTSTROM R., De BRUYN H., MOVERT R.
The effect of delmopinol rinsing on dental plaque formation and gingivitis healing. *J clin Periodont* 1992;**19**:274-280.
- FINE D.H., FURGANG D., BARNETT M.L.
Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J clin Periodont* 2001;**28**:697-700.
- GJERMO P., BAASTAD K.L., ROLLA G.
The plaque-inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. *J Periodont Res* 1970;**5**:102-109.
- HERMANT C., LUC J., ROQUES C., PETUREAU F., ESCAMILLA R., FEDERLIN-DUCANI M.
In vitro fungicidal activity of main antiseptic solutions used as mouthwash against gingival fungal strains in HIV infected patients. *Med Mal Infect* 1997;**27**:715-718.
- HOFFMANN T., BRUHN G., RICHTER S., NETUSCHIL L., BREX M.
Clinical controlled study on plaque and gingivitis reduction under long-term use of low-dose chlorhexidine solutions in a population exhibiting good oral hygiene. *Clin Oral Invest* 2001;**5**:89-95.
- KAGERMEIER-CALLAWAY A.S., BREDICK J., WILLERSHAUSEN B.
Effect of three mouthrinses, containing amine/stannous fluoride, herbal extracts or Emser salt on the growth of oral bacteria – an in vitro study. *Eur J Med Res* 2000;**5**:523-529.
- LUC J., ROQUES C., FRAYET M.N., MICHEL G., DUCANI M.
Activité bactéricide in vitro de 5 antiseptiques buccaux vis à vis des principaux germes impliqués dans les affections bucco-dentaires. *J parodont* 1991;**10**:381-387.
- LUC J., MROZ C., ROQUES C., DUCANI-FEDERLIN M.
Activité bactéricide de bains de bouche contenant 0,10%, 0,12% et 0,20% de digluconate de chlorhexidine. *J parodont* 1998;**16**:441-446.
- LUCAS Q.G., LUCAS O.N.
Preventive action of short – term and long – term chlorhexidine rinses. *Acta Odontol Latinoam* 1999;**12**:45-58.
- MENDEL R., WISSING E., SCHMITZ-HABBEN A., FLORES-de-JACOBY L.
Comparative study of plaque and gingivitis prevention by AmF/SnF2 and NaF. A clinical and microbiological 9-month study. *J clin periodont* 1996;**23**:372-378.
- MORAN J., ADDY M., JACKSON R., NEWCOMBE R.G.
Comparative effects of quaternary ammonium mouthrinses on 4-day plaque regrowth. *J clin periodont* 2000;**27**:37-40.
- NETUSCHIL L., WEIGER R., PREISLER R., BREX M.
Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerien mouthrinses. *Eur J Oral Sci* 1995;**103**:355-361.
- PILLONI A.P., BUTTINI G., GIANNARELLI D., GIORDANO B., IOVENE M.R., MONTELLA F., DI SALVO R., COLANTUANO R., LALLI G., TUFANO M.A.
Antimicrobial action of Nitens mouthwash (cetyltrimethylammonium naproxenate) on multiple isolates of pharyngeal microbes : a controlled study against chlorhexidine, benzydamine, hexetidine, amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, clarithromycin, and cefaclor. *Chemotherapy* 2002;**48**:168-173.
- PILOT T.
The periodontal disease problem. A comparison between industrialised and developing countries. *Int dent J* 1998;**48**:S221-S232.
- PITTEN F.A., KRAMER A.
Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 1999;**55**:95-100.
- RICHTER S.
In vivo study of the efficacy of a mouthrinse containing 0.1% chlorhexidine digluconate. *Dent med Probl* 2003; 40:29-36.
- RIEP B.G., BERNIMOULIN J.P., BARNETT M.L.
Comparative antiplaque effectiveness of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse. *J clin Periodont* 1999;**26**:164-168.
- ROQUES C., LUC J., JOMARD P., JOMARD N., DUCANI-FEDERLIN M.
Quel est l'impact réel de l'association d'un agent anionique (dioctylsulfosuccinate de sodium) sur l'activité bactéricide du digluconate de chlorhexidine? *J parodont Impl Orale* 2004;**23**:183-188.
- SHARMA N.C., GALUSTIANS H.J., QAQISH J., CHARLES C.H., VINCENT J.W., McGUIRE J.A. Antiplaque and antigingivitis effectiveness of a hexetidine mouthwash. *J clin Periodont*. 2003;**30**:590-594.
- SLANETZ L.W., BROWN E.A.
Studies on the number of bacteria in the mouth and their reduction by the use of oral antiseptics. *J dent Res* 1949;**28**:313-323.
- SREENIVASAN P., GALFAR A.
Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J clin Periodont* 2002;**29**:965-974.
- VAN DER WEIJDEN G.A., TIMMER C.J., TIMMERMAN M.F., REIJERSE E., MANTEL M.S., VAN DER VELDEN U.
The effect of herbal extracts in an experimental mouthrinse on established plaque and gingivitis. *J clin Periodont* 1998;**25**:399-403.