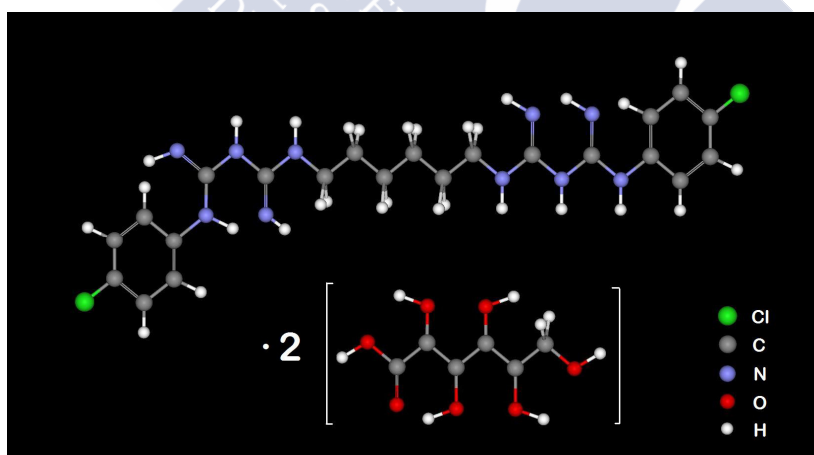




EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Tesis Doctoral



María Consuelo Cousido González



El **Dr. Pedro Diz Dios**, profesor del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela

La **Dra. Inmaculada Tomás Carmona**, profesora del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela

El **Dr. Jacobo Limeres Posse**, profesor del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela

HACEN CONSTAR:

Como Directores de la Tesis Doctoral que lleva por título **“EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA”**, realizada por la Licenciada en Medicina y Cirugía, y Licenciada en Odontología, D. María Consuelo Cousido González, que cumple todos los requisitos para ser presentada y defendida ante el oportuno Tribunal para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Santiago de Compostela.

Dr. P. Diz Dios

Dra. I. Tomás Carmona

Dr. J. Limeres Posse

D. M. C. Cousido González

Santiago de Compostela, 2009



Mi sincero agradecimiento, en primer lugar, a los Directores de esta Tesis Doctoral, Pedro Diz Dios, Inmaculada Tomás Carmona y Jacobo Limeres Posse, por la confianza que han depositado en mí al haberme incorporado a una investigación de la envergadura y trascendencia de la suya y por la maestría de sus directrices; en segundo lugar, al profesor Luis Concheiro Carro, por haberme contagiado la energía y el entusiasmo científico que los discentes necesitamos, precisamente, en la etapa final de nuestra formación académica; finalmente, al Dr. Tomás García-Caballero, Catedrático de la Universidad de Santiago de Compostela, por compartir conmigo durante estos años su preciado material, con la sencilla generosidad que sólo puede caracterizar a un universitario con genuina vocación docente e investigadora.



1. Introducción.....	9
1.1. Recuerdo histórico del empleo de colutorios	11
1.2. Características generales de los antisépticos orales	21
1.3. Características generales de la clorhexidina.....	23
1.3.1. Estructura química	23
1.3.2. Propiedades físicas	25
1.3.3. Mecanismo de acción antibacteriana	28
1.3.4. Retención y sustantividad	31
1.3.5. Espectro antimicrobiano. Susceptibilidad y resistencia	36
1.3.6. Aplicaciones clínicas	40
1.4. Efecto antimicrobiano de una única aplicación de un colutorio de clorhexidina sobre la flora salival	48
1.4.1. Ventajas de la saliva sobre otros ecosistemas.....	48
1.4.2. Experimentos previos. Revisión de la literatura	49
1.4.3. Variables metodológicas	60
1.4.4. Otros factores potencialmente condicionantes.....	63
1.5. Bibliografía.....	66
2. Justificación y objetivos	83
3. Evaluación de la sustantividad <i>in vivo</i> de la clorhexidina sobre la flora salival mediante técnicas de cultivo en placa.....	87
3.1. Efecto de un agente neutralizador.	89
3.2. Actividad bactericida de la clorhexidina al 0,2% <i>versus</i> 0,12%.....	101
4. Evaluación de la sustantividad <i>in vivo</i> de la clorhexidina sobre la flora salival mediante microscopía de epifluorescencia.....	117
4.1. Evaluación de la sustantividad de la clorhexidina sobre la flora salival aplicando microscopía de epifluorescencia.....	119
4.2. Evaluación de la sustantividad de la clorhexidina al 0,2% <i>versus</i> 0,12% sobre la flora salival.. ..	136
4.3. Evaluación de la sustantividad en saliva de diferentes formas de aplicación de la clorhexidina.	151
4.4. Sustainividad de un enjuague de clorhexidina sobre la flora salival: influencia de factores intrínsecos y extrínsecos.	161
5. Conclusiones	179





1. INTRODUCCIÓN



1.1. Recuerdo histórico del empleo de colutorios

Los colutorios son “preparaciones líquidas que se aplican sobre los dientes y las mucosas de la cavidad oral y la faringe, con el fin de ejercer una acción local antiséptica, astringente o calmante” (*García Pola, 1997*). En la actualidad, dada su importante actividad antimicrobiana y su escasa toxicidad sobre los tejidos vivos (*Baca et al, 1996*), se reconoce su eficacia preventiva y terapéutica ante determinadas afecciones bucodentales y se estudia su condición como coadyuvante de los métodos mecánicos de higiene oral (*Franch et al, 2005*), aunque a lo largo de la historia su prescripción ha respondido a diferentes motivaciones.

✓ **Los primeros colutorios. Prescripción empírica con fines mágico-religiosos o curativos**

No existen evidencias de que el hombre prehistórico mostrara una especial preocupación por la higiene oral (*Saba-Chujfi y Pereira, 2000*), pero por analogía con poblaciones actuales que viven en condiciones primitivas, es factible pensar que intentara eliminar los residuos interdentarios mediante raíces o cuñas de madera (*González, 1988c*). Las aportaciones de las “grandes civilizaciones antiguas”, constituidas hace 10.000-12.000 años por el hombre sedentario del Neolítico en los asentamientos agrícola-ganaderos de Mesopotamia, India, China, Egipto y en la América precolombina, se basan en la experimentación con sustancias procedentes del reino animal, vegetal y mineral, cuya finalidad era minimizar o eliminar las afecciones bucodentales (*González, 1988d*).

En la antigua Mesopotamia las enfermedades se interpretaban como un castigo de los dioses, aunque proliferaban los remedios específicos para combatirlas. Asurbanipal, el último rey de Asiria (reinó desde el año 668 hasta el 626 a.C.), fue el fundador de la

biblioteca de Nínive, en la que se recopilaron tablillas de arcilla con prescripciones en escritura cuneiforme en las que se recomendaba la cebolla mezclada con aceite o las semillas de nabo, para combatir la inflamación gingival, el edema y las ulceraciones de la mucosa alveolar (*Jastrow, 1914*).

En la civilización egipcia (5000 años a.C.) las enfermedades se atribuían a conflictos con los dioses y a venganzas de los espíritus, de ahí que sus tratamientos comenzaran invocándolos con oraciones y jaculatorias. El Papiro de Ebers (3700-1550 a.C.) recoge diferentes fórmulas a base de cinamomo, goma, miel, aceite, hinojo, anís o genón, que se administraban para aliviar las úlceras orales y la inflamación de la mucosa peridantaria (*González, 1998d*).

En la India antigua, desde la época de Buda (560-480 a.C.) hasta el apogeo de los Maurya y de los Gupta en el siglo VII, se prestó una especial atención a la higiene oral por motivos religiosos, ya que consideraban la boca como la puerta de entrada del cuerpo. Además, la dieta de las castas más poderosas -basada en alimentos como miel, higos y dátiles- era altamente cariogénica, lo que explicaría por qué en esta cultura abundaron los remedios para el tratamiento de las enfermedades orales, como los colutorios a base de hojas de betel, alcanfor, cardamomo u otras hierbas. Sushruta Samhita fue un afamado médico hindú en cuyos textos del siglo VI antes de nuestra era se incluyeron minuciosas descripciones de enfermedades que interesaban a las estructuras orales como el escorbuto, la gingivitis, o la hipersensibilidad dentaria, y se proponían remedios para “las llagas y el dolor dental”. Se aconsejaba el cepillado de los dientes al levantarse de la cama con un cepillo hecho con ramas verdes de árboles y una pasta compuesta por miel y otras sustancias, para eliminar “el mal aliento y las impurezas del cuerpo” (*González, 1998d*).

Después de la destrucción del templo de Jerusalén, y el declive económico y político de la comunidad judía en Israel, la continuidad de la transmisión oral estaba en

peligro, por lo que Rabi Yehuda (el Príncipe) inició la redacción del Talmud hebreo alrededor del año 200 de nuestra era, que se completaría 2 siglos más tarde con las aportaciones de varias academias rabínicas. El Talmud es un libro sagrado que recoge discusiones sobre leyes, historia, tradiciones, costumbres y leyendas, pero también es un referente de conocimientos médicos, en el que se citan con frecuencia procedimientos como el consumo de vinagre para la curación de heridas o “llagas gingivales”, recomendándose precaución en su empleo al considerarlo dañino para los dientes (González, 1998d).

La medicina tradicional china se fundamenta en la búsqueda del equilibrio entre 2 principios de la realidad: el yin (principio femenino, pasividad, sombra, absorción, tierra) y el yang (principio masculino, actividad, luz, penetración, cielo). Cuando se altera este equilibrio se recurre a la acupuntura y a la moxibustión; existen 116 puntos de acupuntura relacionados con los dientes y otras estructuras bucales, que deben activarse para curar afecciones orales. En la civilización china, en la que se reconoció la teoría del “gusano dental” como agente etiológico de la caries (chong ya) (Sedgley, 2004), ya se recomendaba la práctica de enjuagues orales de carácter preventivo después de cada comida (Ring, 1985e; Hoffmann et al, 2001). En algunos escritos antiguos se mencionan remedios para combatir las enfermedades de los dientes y las encías, como realizar enjuagues con la orina de un niño cuando “los dientes caen y el aliento se hace fétido” (Merritt, 1930).

Según las crónicas de Bernardino de Sahagún (escritas entre 1565 y 1572), el pueblo azteca también creía en “el gusano” como causa de la caries, y lo combatía con otros gusanos que proliferaban en el estiércol, con pimienta caliente y sal. Las civilizaciones precolombinas se enjuagaban con orina de niño, agua e incienso para reblandecer el sarro y tratar las inflamaciones gingivales (González, 1998d), recomendando además el pulido dental con trozos de carbón y sal (Hoffmann-Axthelm, 1981).

✓ **Superando el empirismo. Desde la Antigua Grecia a la Edad Moderna**

La superación de las concepciones mágico-religiosas y empíricas de la historia de la salud se produjo en la Antigua Grecia (*Laín Entralgo, 2006*). Hipócrates (460-370 a.C.), considerado el Padre de la Medicina, hace referencia a un colutorio curativo compuesto por anís, eneldo, mirra y vino blanco (*Ring, 1985e; Hoffmann et al, 2001*). La medicina hipocrática propugna como métodos terapéuticos para las enfermedades de los dientes, “la cauterización, los masticatorios y somníferos, el vinagre y la pimienta”, y para combatir “el mal aliento de las mujeres” recomendaba enjuagarse con un preparado a base de cabeza de liebre y cuerpos de ratones (excepto el hígado y los riñones) mezclados con polvo de mármol (*González, 1998b*).

La medicina romana, al igual que la griega, heredó un vasto legado de civilizaciones más antiguas como la egipcia o la india. En la época del emperador Tiberio, Celso escribió un compendio denominado “Medicina”, en el que se recogieron aportaciones desde la época de Hipócrates hasta los años 30 a.C., donde se menciona la importancia del agua fría y del vino como elementos de higiene oral, y se recomiendan colutorios con vino, beleño, mandrágora y adormidera, para aliviar la odontalgia. Se aconseja masticar peras y manzanas no muy maduras, y mantener el jugo en la boca para aprovechar sus propiedades astringentes (*Foster, 1879*). Plinio, el más universal de los enciclopedistas romanos -nacido en Como en el año 23 d.C.-, fue autor de la “Historia Natural”, en la que se recogen múltiples remedios para combatir afecciones bucales, como: los colutorios a base de ceniza de cuerno de ciervo para “consolidar los dientes flojos y calmar los dolores”, la leche de cabra y la hiel de toro contra el “dolor de dientes”, la leche de burra y la espina de puercoespín en caso de “dientes sueltos”, y la ceniza de rata con miel para “perfumar el aliento” (*González, 1998b*). En el año 47 a.C. Escribonio Largo, médico personal del emperador Claudio, defensor de la teoría etiológica del “gusano dental”, elaboró un remedio para su eliminación: “contra el dolor de dientes son buenas las fumigaciones de semillas de Hyoscyamus (beleño) esparcidas sobre las

brasas y a continuación enjuagarse con agua caliente. De esta forma, a veces expulsaremos a los pequeños gusanos” (*Ring, 1985b*).

Aunque los árabes ya habían ritualizado la limpieza corporal antes de la llegada de Mahoma, éste incluyó los hábitos de higiene personal en el Corán y los elevó a la categoría de preceptos religiosos, por lo que se llegó a recomendar la práctica de enjuagatorios orales hasta 15 veces al día. Rabán Al Tabari escribió hacia el año 870 el “Paraíso de la sabiduría”, donde incluyó algunos comentarios de índole odontológica en los que se plasma la influencia de Grecia, Siria e India; para el mal aliento “que proviene de la boca y no de malas digestiones”, se aconsejaba la práctica de gargarismos a base de pelitre y mirabolanos amarillos, y para las enfermedades de las encías, mirabolanos con vinagre, mejorana y semilla de mostaza. Ali Abbás (años 925-982) recomendó el zumo de dátiles y asafétida para “la putrefacción provocada por el gusano de la caries” (*González, 1998e*). Los árabes profundizaron en el estudio de la farmacología, introduciendo nuevos conceptos como “elixir” y utilizando por primera vez en la historia compuestos mercuriales y sulfúreos. Muchos de estos conocimientos fueron transmitidos posteriormente a los europeos, lo que permitió contrastar su efectividad algunos siglos más tarde; este fue el caso de Robert Koch, que demostró definitivamente la eficacia del “sublimado corrosivo” provocado por los compuestos mercuriales sobre los microorganismos cultivados *in vitro*, lo que sin duda contribuyó a que algunos derivados orgánicos como el mertiolato o el mercurocromo continúen empleándose en el ámbito de la Medicina.

En el siglo XII, en la alta Edad Media, santa Hildegarda de Bingen describió en el tratado “*Physica y Causae et curae*” un remedio para aliviar el dolor dentario mediante enjuagatorios calientes elaborados con una mezcla de plantas cocidas como el ajeno o la hierba mora. En este manuscrito también se aconsejaba como medida profiláctica evitar la contaminación dental con el “gusano de la caries”, aclarando para ello la boca con agua fresca al levantarse y en varias ocasiones a lo largo del día (*Ring, 1985c*).

En 1530, ya bien entrada la Edad Moderna, se editó en Leipzig un importante tratado sobre Odontología, de autor anónimo, titulado “Artzney Buchlein”. En esta obra se recomendaba la limpieza de los dientes por la mañana con un trozo de tela y frotarlos con sal, bien sola o bien mezclada con mirra, alumbre y vinagre. Para aliviar los “males de los dientes” se sugerían “remedios calientes” (a base de piretro, pimienta, euforbio o beleño) y “remedios fríos” (con zumaque, rosas, cebada, lechuga o vinagre). Los “gusanos de la caries” se combatían con buches de simientes de beleño, puerro y cebolla hervidos con vinagre, y sino en forma de “bolas sahumadas sobre el brasero” (González, 1998a).

En 1547, el médico y pastor anglicano Andrew Boorde publicó uno de los primeros libros ingleses de Medicina titulado “Breviario of Helthe”, con abundantes alusiones al tratamiento de la patología bucal; por ejemplo, recomendaba la realización de gargarismos en casos de submaxilitis obstructiva (Ring, 1985f). En esta época, para expulsar al “gusano dental”, todavía se recurría a las “fumigaciones” con semillas de beleño quemadas, ya que provocaban la caída de estos “gusanos” que finalmente debían ser rematados empleando las uñas (Ring, 1985f).

En el siglo XVII se produce un hecho trascendental en la historia de la Medicina, cuando el holandés Jansen Leeuwenhoeck diseña el primer microscopio (Herrera *et al*, 2005). Leeuwenhoeck describió la placa dental como un acúmulo de restos blandos de comida en los que proliferaban unos extraños “animalículos”. Después de recuperar las bacterias adheridas a sus propios dientes con vinagre de vino, pudo observar que eran “como pequeñas anguilas” que no dejaban de moverse. Poco después éste constituiría el principal argumento para desterrar definitivamente la “teoría vermicular” de la caries y reemplazarla por la “teoría bacteriana”, todavía vigente en la actualidad. Este notable investigador también demostró la acción corrosiva de los ácidos secretados por las bacterias y el efecto antimicrobiano de determinados enjuagatorios (Romero, 1998a).

En Francia, a mediados del siglo XVIII, Pierre Fauchard, uno de los pioneros de la Odontología preventiva, sugirió que existía una relación entre el acúmulo de placa dental y sarro, y la que hoy conocemos como periodontitis, proponiendo además variadas fórmulas para elaborar enjuagues bucales (*Liébana et al, 1998*), entre los que era habitual incluir la orina reciente (*Ring, 1985d*).

En América, durante el siglo XVII y principios del XVIII, era frecuente que los sacerdotes -que tenían mayor formación que los colonos- visitaran a los enfermos, debido a la escasez de médicos en las colonias. John Wesley, un clérigo inglés fundador de la Iglesia Metodista, aceptó sin objeción la “teoría de los animalículos” como factor etiológico de las afecciones periodontales, recomendando la práctica de gárgaras con agua salada 3 veces al día con la finalidad de “matar a los animalículos que causan la separación de las encías de los dientes”. Para el tratamiento de la parálisis facial también prescribía gargarismos con jugo de madera de salvia. Además Wesley, partidario de recurrir a remedios naturales sencillos, propuso técnicas básicas de higiene oral y reglas elementales para prevenir la odontalgia (*Ring, 1985a*).

✓ **Los colutorios como antimicrobianos. Desde el siglo XIX hasta la actualidad**

En el siglo XIX, al plantearse la “teoría de la infección bacteriana”, el enfoque sobre la prevención de las enfermedades varió ostensiblemente. Joseph Lister (1827-1912), basándose en las aportaciones de Pasteur sobre la putrefacción de la materia por gérmenes vivos, puso en práctica la denominada “cirugía antiséptica”, empleando por primera vez en 1865 una solución de fenol para desinfectar las heridas quirúrgicas, las superficies, los instrumentos y las manos. Algunos derivados fenólicos como el eugenol, el resorcinol o el hexaclorofeno, aún se utilizan en la actualidad en el ámbito de la Odontología -más concretamente en endodoncia-, por su doble actividad antimicrobiana y anestésica (*Baca et al, 1996*).

El alemán Robert Koch (1843-1910) contribuyó de forma decisiva al desarrollo de la Microbiología, formulando sus célebres postulados, que demostraban que un agente microbiano originaba enfermedades infecciosas como el cólera y la tuberculosis (Sedgley, 2005). Willoughby D. Millar, un discípulo de Koch con el que trabajó en la Universidad de Berlín desde 1880 hasta 1896, se considera el “padre de la Microbiología oral”; entre sus principales contribuciones están la “teoría del ataque ácido de las bacterias” y la “teoría quimioparasitaria” sobre la génesis de la caries dental (Liébana *et al*, 1998). Estos principios favorecieron la universalización de las medidas de higiene oral para prevenir la pérdida de dientes y acentuaron la importancia de la esterilización de los materiales en el ámbito odontológico (Romero, 1998b).

La mayoría de los antisépticos se elaboraron a partir de 1853, cuando se demostró que el etanol desnaturalizaba proteínas, lo que le confería propiedades antimicrobianas. En la tabla 1 se detallan cronológicamente los nombres de los compuestos que alcanzaron mayor difusión en los 2 últimos siglos.

En 1891 se sintetizó el bis-fenol-A, más conocido como triclosán, un antimicrobiano no iónico que durante años se consideró un compuesto fenólico, aunque recientemente se ha sugerido que no debería clasificarse en este grupo químico. Inicialmente se incorporó en las formulaciones de dentífricos y después en los colutorios. Además de inhibir la formación de placa tiene un efecto antigingivitis *per se*, ya que inhibe las enzimas del metabolismo del ácido araquidónico -fundamentalmente la ciclooxigenasa 2-, lo que le confiere propiedades antiflogísticas (Noguerol y Sicilia, 1996; Manau, 1995).

Tabla 1. Principales antisépticos (año de comercialización)

Cloro gaseoso (1832)	Flavinas colorantes (1913)
Yodo (1839)	N-cloro compuesto (1916)
Agua de cloro (1842)	Amonio cuaternario (1917)
Creolina (1850)	Oxido de etileno (1936)
Fenol (1860)	Amidinas (1942)
Formaldehído (1886)	Yodóforos (1949)
Peróxido de hidrógeno (1887)	Clorhexidina (1954)
Fenol-Aceites esenciales (1895)	Acido peracético (1955)
Cresol jabonoso (1897)	Glutaraldehído (1957)
Fenoles clorados (1906)	Hexetidina (1961) –derivada de la pirimidina–

El estadounidense Jordan W. Lambert desarrolló un fenol cuya actividad antimicrobiana se potenciaba al combinarlo con determinados aceites esenciales como timol y eucaliptol (Santos *et al*, 2005) y propuso que se denominara listerine, en homenaje a Joseph Lister (Twitchell, 2000). El listerine no sólo se empleó para desinfectar campos quirúrgicos, sino también como ducha nasal, para el tratamiento de la gonorrea, para limpiar suelos, como anticaspa, loción para después del afeitado e incluso para combatir la calvicie. Posteriormente se comprobó que tenía una buena actividad antimicrobiana contra bacterias de origen oral, por lo que a partir de 1895 se comercializó como colutorio, convirtiéndose en 1914 en uno de los productos de prescripción más vendidos en EE.UU.. El Listerine® bucal, se considera el más popular de los fenoles y representa el agente antiplaca más antiguo de los utilizados clínicamente (Franch *et al*, 2005). El mecanismo de acción tradicional de los compuestos fenólicos es por disrupción

e inhibición de las enzimas bacterianas, actuando además sobre la pared celular; los aceites esenciales por su parte pueden extraer las endotoxinas bacterianas, disminuyendo la patogenicidad de la placa (*Dennison et al, 1995*). Una de las principales ventajas del Listerine® es su capacidad para penetrar la biopelícula dental (*Pan et al, 2000; Fine et al, 2001*) y acceder a los espacios interdetales (*Charles et al, 2000*)

En 1947, en el marco de un complejo estudio para sintetizar nuevos agentes antipalúdicos, se desarrollaron las polibiguanidas (*Lang y Brex, 1986*). Estos compuestos demostraron un importante potencial antimicrobiano, especialmente el 10.040, un detergente catiónico que se denominaría clorhexidina (*Davies et al, 1954*); aunque inicialmente se seleccionaron dos sales, el diacetato y el dihidrocloruro, con una actividad antibacteriana similar, el diacetato era más soluble y por lo tanto más adecuado para el trabajo de laboratorio. Davies et al (*Davies et al, 1954*) demostraron que este compuesto tenía actividad bacteriostática, especialmente frente a Gram-positivos (vinculada a la unidad central de hexametileno y al anillo benceno terminal), y bactericida (condicionada por la concentración de 10.040, el tamaño del inóculo y el pH). El compuesto no modificaba la acción de la penicilina, la estreptomina, el cloranfenicol, la oxitetraciclina ni la aureomicina. Utilizando ratones albinos como animales de experimentación se demostró su baja toxicidad a los 10 días de la administración de una única dosis por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa y oral, así como después de un año de administración continuada por vía oral. La primera sal derivada del compuesto 10.040 que llegó a comercializarse fue el gluconato de clorhexidina, registrada en 1954 por la compañía Imperial Chemical Industries Limited de Macclesfield (Reino Unido) como Hibitane®, el primer antiséptico aceptado internacionalmente para la limpieza de heridas y piel (*Bascones y Manso, 1994; Ruppert y Schlagenhauf, 2005*), cuya indicación como colutorio oral se aprobó en 1959 (*Al-Tannir y Goodman, 1994*).

1.2. Características generales de los antisépticos orales

Entre las propiedades ideales de un colutorio oral se incluyen: que sea rápido y seguro, capaz de eliminar las bacterias de la biopelícula en áreas de difícil acceso, de buen sabor, económico y fácil de usar (*Baker, 1995*). Para que además sea considerado un antiséptico, debe ser un producto que aplicado a los tejidos vivos destruya o inhiba la proliferación de los microorganismos patógenos sin lesionar las células del huésped (*Albertos et al, 1996*).

En base a su actividad antimicrobiana los antisépticos orales se consideran: de muy baja potencia -como el timol o el cetilpiridinio-, de baja potencia -como el fluoruro sódico- y de alta potencia -como la clorhexidina o la sanguinaria-. La actividad antimicrobiana de un colutorio antiséptico está condicionada por su estructura química (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los antisépticos por su estructura química
(*Bascones y Morante, 2006*)

Compuestos fenólicos (fenol, timol, hexilresorcinol, triclosán)
Compuestos de amonio cuaternario (cloruro de cetilpiridinium, cloruro de benzetonium, bromuro de domiphen)
Agentes oxigenantes (peróxidos, perborato)
Compuestos alcaloides (sanguinaria)
Bisguanidas (clorhexidina, alexidina)
Bispiridina (octaridina)
Pirimidinas (hexetidina)
Derivados halógenos (fluoruros, iodoforos)
Sales de metales pesados (zinc, cobre, estaño, plata, mercurio)

La sustentividad de un colutorio antiséptico se define como la adherencia prolongada a las superficies orales (dientes y mucosas) y su liberación lenta a dosis

eficaces que garanticen la persistencia de la actividad antimicrobiana (*Manau-Navarro y Guasch-Serra, 2005*). Los agentes antisépticos con escasa sustantividad se denominan de primera generación; a este grupo pertenecen los compuestos de amonio cuaternario, los compuestos fenólicos, los agentes oxidantes y los fluoruros. Los agentes de alta sustantividad -como las biguanidas, cuyo principal representante es la clorhexidina- se consideran de segunda generación. La incorporación al mercado de nuevos productos como el decapinol, ha obligado a establecer una nueva categoría de colutorios antisépticos -los de tercera generación-, cuyo mecanismo de acción fundamental es la inhibición de la adherencia bacteriana (*Kornman, 1990*)

Muchos antimicrobianos se comercializaron en base a los resultados de estudios *in vitro*, en los que se analizaba exclusivamente la concentración mínima bactericida y la toxicidad bacteriana, frente a determinadas especies habituales de la flora oral en forma planctónica. A finales de los 80 se constató que las bacterias de la cavidad oral se organizan en una biopelícula, que Costerton (*Costerton et al, 1987; Donlan y Costerton, 2002*) definió como: “una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un sustrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas por una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o a la expresión de sus genes”. Esta biopelícula confiere a las bacterias una especial resistencia frente a los antimicrobianos, lo que obligó a revisar los resultados de la eficacia antiséptica de los colutorios orales obtenidos con modelos experimentales de fenotipos bacterianos planctónicos. En estudios *in vitro*, la clorhexidina fue la que mostró mayor actividad antibacteriana, seguida de un grupo de antisépticos entre los que se incluyen los aceites esenciales, la octenidina, el fluoruro estañoso y la hexetidina; la eficacia antiséptica del triclosán y los extractos de hierbas resultó muy escasa. En modelos *in vivo*, la clorhexidina y los aceites esenciales son los que mejor penetran la biopelícula y presentan mayor efecto antibacteriano (*Calsina-Gomis y Serrano-Granger, 2005*).

1.3. Características generales de la clorhexidina

La Clorhexidina (CHX) en sus diferentes formas de presentación se considera el antiséptico oral por excelencia (*Ruppert y Schlagenhauf, 2005*). En 1957, sólo 3 años después de su comercialización, en virtud de su amplio espectro antimicrobiano, ya estaba indicada -además de en las infecciones cutáneas- en el ámbito de la oftalmología, urología, ginecología y otorrinolaringología. Aunque desde 1959 se empezó a administrar para el control de la placa bacteriana, los trabajos de Harold Løe publicados en los años 70 fueron los que definitivamente popularizaron su uso en Odontología (*Al-Tannir y Goodman, 1994*). En la actualidad se considera el agente antiplaca y antigingivitis más efectivo, más ensayado y de elección, y representa el antiséptico oral de segunda generación con mayor actividad antibacteriana y sustantividad.

1.3.1. Estructura química

La CHX es una molécula ambifática con grupos hidrófilos e hidrófobos, que a pH fisiológico tiene carácter catiónico. Se sintetizó a partir del proguanil y pertenece al grupo químico de las biguanidas, que son compuestos con actividad antimalárica (*Al-Tannir y Goodman, 1994*). Estructuralmente está constituida por 2 anillos clorofenólicos simétricos (4-clorofenil) y 2 grupos biguanidas, unidos a través de una cadena central hidrofóbica de hexametileno (*Albertos et al, 1996; Gilbert y Moore, 2005*); el resultado es una molécula bicatiónica simétrica que se denomina 1,6-bis-4-cloro-fenildiguanidohexano (*Lang y Brex, 1986*) (Figura 1).

Por tratarse de una base poco hidrosoluble, habitualmente se emplea en forma de sal, fundamentalmente diacetato, diclorhidrato o digluconato (*Franch et al, 2005; Ruppert y Schlagenhauf, 2005; Arévalo et al, 1998*). De ellas, la sal de digluconato es la más soluble en agua y alcoholes (*Arévalo et al, 1998*), por lo que es la que se incorpora en la mayor parte de los colutorios, geles y barnices (Figura 2). Además, esta forma

salina de la CHX presenta la ventaja añadida de liberar -a pH fisiológico- el componente activo con carga iónica positiva (Albertos *et al*, 1996).

Figura 1. Estructura química de la clorhexidina ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$)

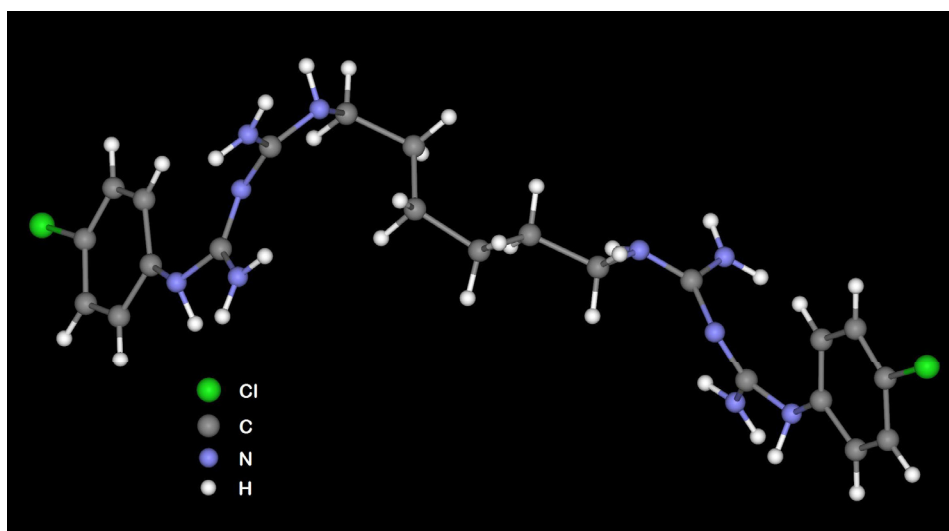
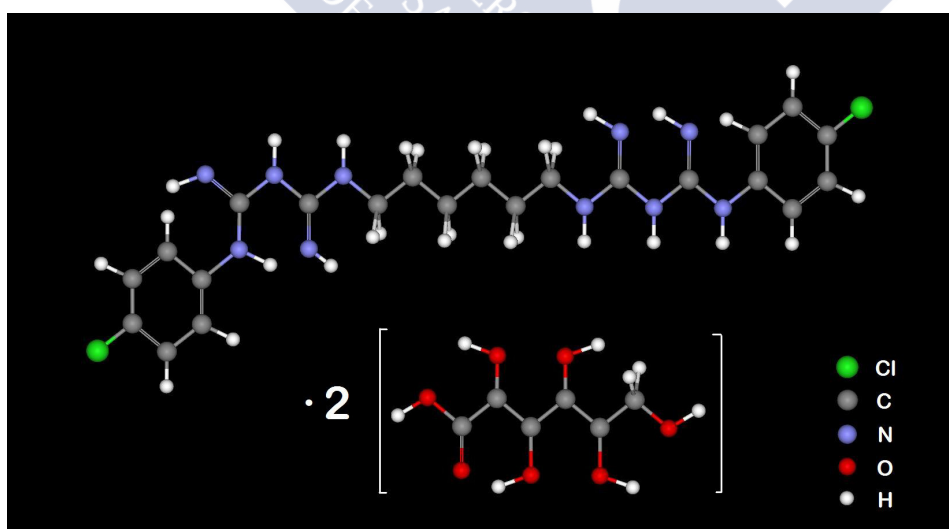


Figura 2. Estructura química del digluconato de clorhexidina



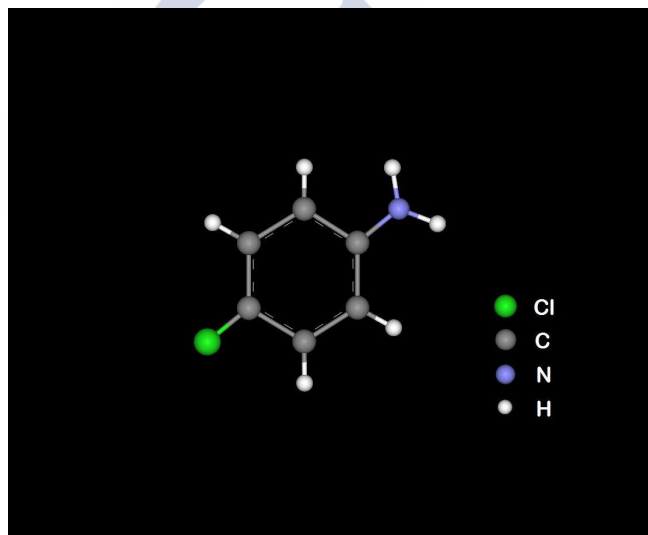
1.3.2. Propiedades físicas

La CHX es una base fuerte dicatiónica, estable a un pH entre 5 y 8 (Arévalo *et al*, 1998), aunque el óptimo está comprendido entre 5,5 y 7 (Albertos *et al*, 1996; Franch *et al*, 2005). En consecuencia, el pH del medio oral afecta significativamente a la unión de la CHX con las superficies dentarias y gingivales, así como a la posterior liberación de CHX activa (Ellepola y Samaranayake, 2001). También se ha demostrado que su permanencia en la boca es mucho menor cuando el pH del colutorio empleado es muy ácido (1,5-3), comparada con la de soluciones neutras o alcalinas (Gjerme *et al*, 1975), probablemente porque con la acidificación se reduce el número de receptores con carga negativa; sin embargo, el aumento del pH no conlleva un incremento proporcional de la retención de la CHX (Ellepola y Samaranayake, 2001). Además, su actividad frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras es superior cuando el pH se sitúa en un rango de 5-8 (Albertos *et al*, 1996; Franch *et al*, 2005).

La CHX es fotolítica, por lo que debe protegerse de la exposición a la luz. Aunque es estable a temperatura ambiente, también es termolábil y con el calor se descompone en cloroanilina (Figura 3) -un compuesto altamente contaminante y con propiedades mutágenas-; el almacenaje prolongado favorece la producción de anilinas. Las autoridades sanitarias europeas establecieron como valor máximo permitido de cloroanilina en preparados de CHX destinados a uso humano 500 ppm y la mayoría de las soluciones disponibles en el mercado sólo tienen en torno a 5 ppm, por lo que conservan un amplio margen de seguridad. Experimentalmente, después de almacenar muestras de CHX durante 6 meses a 40°C, no se consiguió alcanzar esa concentración límite de cloroanilinas (Ruppert y Schlagenhauf, 2005). En cualquier caso, se recomienda conservar este antiséptico en un ambiente frío y oscuro, y reponerlo con cierta frecuencia.

Se ha sugerido que el calor aumenta su actividad antibacteriana. König et al (König et al, 2002) demostraron que las soluciones calientes de clorhexidina al 0,2 % proporcionaban mayores reducciones de la vitalidad de la placa bacteriana supragingival que las soluciones frías (47 versus 21%). Estos autores señalaron además, que el calentamiento de una solución acuosa reciente de gluconato de CHX a 60°C no producía p-cloroanilina, pero en cambio su almacenamiento a altas temperaturas aumentaba el nivel de impurezas. Estos hallazgos coincidieron con los obtenidos previamente por otros autores (Kohlbecker, 1989).

Figura 3. Estructura química de la 4-cloroanilina



Aunque muchos investigadores sostienen que la presencia de materia orgánica inactiva fácilmente la CHX (Russell y Day, 1993; Baca et al, 1996), esta afirmación ha originado cierta controversia. Se ha sugerido que algunas proteínas plasmáticas podrían combinarse con la molécula bicatiónica de CHX a través de sus cargas negativas exteriores bloqueándola, por lo que no la recomiendan como un recurso de primera elección para la desinfección de heridas cruentas ni de lesiones que cursan con interrupción de la integridad de la mucosa oral (Ruppert y Schlagenhauf, 2005). Algunos autores consideran que además de la sangre, el pus también puede inactivar la CHX

(Lang y Brex, 1986), aunque esta opinión no es compartida por otros investigadores (Fardal y Turnbull, 1986; Albertos et al 1997); también se ha señalado que los detritus orgánicos generados por un procedimiento de raspado y alisado no modifican la actividad de la CHX (Veksler et al, 1991).

La CHX forma sales solubles con los nitratos, sulfatos, carbonatos y fosfatos (Arévalo et al, 1988). Sin embargo, es incompatible con los agentes tensioactivos aniónicos como el lauril sulfato, un surfactante que se incorpora como excipiente en muchos dentífricos convencionales (Arévalo et al, 1988; Barkvoll y Attramadal, 1989; Ruppert y Schlagenhauf, 2005;). Aunque la eficacia clínica de la asociación de CHX y flúor para la prevención de caries y gingivitis ha sido constatada en numerosos trabajos (Beazley et al, 1980; Novikov et al, 1980; Katz, 1982; Ben-Yaakov et al, 1984; Luoma, 1992; Jenkins et al 1994a), la asociación de moléculas aniónicas como el flúor con catiónicas como la CHX continúa siendo controvertida (Bascones y Manso, 1994; Mendieta et al, 1994); en este sentido, parece que la combinación de ambos principios activos no tiene ningún efecto sinérgico en términos de inhibición de formación de placa *de novo* ni en la reducción del contenido bacteriano salival (Mendieta et al, 1994; Quirynen et al, 2001); además, también se ha demostrado que la incorporación de fluoruro de sodio reduce la sustantividad de la CHX (De Freitas et al, 2003; Herrera et al, 2003); la polémica ha vuelto a plantearse recientemente, cuando algunos autores subrayaron que no existen evidencias de que la combinación de flúor y CHX reduzca la eficacia de estos compuestos, argumentando que incluso tienen cierto sinergismo en la prevención de caries (al actuar simultáneamente sobre el citoplasma bacteriano y sobre las enzimas fermentadoras de los carbohidratos) (Franch et al, 2005). La CHX es compatible con la mayoría de los antibióticos de uso común y con derivados catiónicos como los de amonio cuaternario (Gilbert y Moore, 2005). Muchos de los colutorios comercializados incorporan un 5-12% de etanol (Ruppert y Schlagenhauf, 2005), fundamentalmente por sus propiedades como solvente, conservante y antiséptico (Sissons et al, 1996); se ha sugerido que la actividad antimicrobiana de la CHX es mayor

en las formulaciones con alcohol en concentraciones inferiores al 5% (*Herrera et al, 2001*), pero otros autores han observado que la ausencia de alcohol no disminuye la eficacia antiplaca ni antigingivitis (*Leyes et al, 2002*); aunque se ha discutido una posible relación de causalidad entre el uso de colutorios con alcohol a largo plazo y el cáncer oral, ésta no ha podido corroborarse aplicando principios de evidencia científica (*Carretero Pelaez et al, 2004*). La búsqueda de combinaciones incluye: el cloruro de cetilpiridinio, que no resta actividad al principio activo y es particularmente útil en caso de mucositis o intolerancia al alcohol (*Santos et al, 2004*); los iones de zinc, con acción antimicrobiana sinérgica -al inhibir los enzimas glicolíticos- y reducción de los efectos adversos de la CHX como la tinción extrínseca y la formación de calculo supragingival (*Giertsen y Scheie, 1995*); por último los iones libres de calcio, que reducen la sustentividad de la CHX al competir por los grupos carboxilo, su principal nexo de unión a las superficies orales (*Seymour et al, 1999; Ellepola y Samaranayake, 2001*).

1.3.3. Mecanismo de acción antibacteriana

La noción de “diana” que se utiliza para explicar el mecanismo de acción de los antibióticos también es aplicable a la CHX, aunque a diferencia de éstos no descompone la pared bacteriana (*Maris, 1995*). La CHX, al igual que otros antimicrobianos catiónicos - denominados durante décadas “agentes activos de membrana”- (*Gilbert y Moore, 2005*), actúa sobre la membrana celular, aumentando su permeabilidad y facilitando la liberación del material intracitoplasmático (*Hugo, 1992*) (Figura 4). En consecuencia, para comprender el mecanismo de acción de la CHX es imprescindible conocer la estructura celular bacteriana.

Las bacterias son organismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. Su tamaño es del orden de los micrones y tienen una relación superficie/volumen muy alta (aproximadamente 100.000). La mayoría pueden sobrevivir de forma independiente, pero algunas especies como *Chlamydia* y *Rickettsia* son organismos intracelulares obligados. La organización celular de las bacterias recibe el nombre de procariota o

protozito. Las procariotas no tienen un núcleo propiamente dicho, poseen un solo cromosoma circular y ribosomas que sedimentan a 70 S (los de los eucariotas lo hacen a 80 S), y carecen de organelas rodeadas por membranas. Casi todas las procariotas están circunvaladas por una pared celular -generalmente de consistencia rígida- que da a la célula su forma característica y evita el estallido osmótico (puesto que la mayoría de las bacterias son hipertónicas en relación con su ambiente). La tinción de Gram (desarrollada por el microbiólogo danés Christian Gram en 1844) refleja una diferencia fundamental en la arquitectura de la pared celular de las eubacterias: la pared de las Gram-positivas consta de sólo una capa de 10-80 nm de espesor de peptidoglicano; la pared de las Gram-negativas consta de una capa de 2-3 nm de espesor de peptidoglicano, el periplasma y una membrana externa de 7 a 8 nm de espesor con lipoproteínas y lipopolisacáridos de estructura similar a la membrana celular. Algunas bacterias, por fuera de la pared celular, secretan una cápsula viscosa de polisacáridos; esta cápsula sirve de protección contra la desecación y los materiales tóxicos, promueve la concentración de nutrientes en la superficie de la célula y participa en la adherencia celular; aunque en general su presencia no es vital para la bacteria, durante una infección puede protegerla del sistema inmune del hospedador, aumentando así su virulencia.

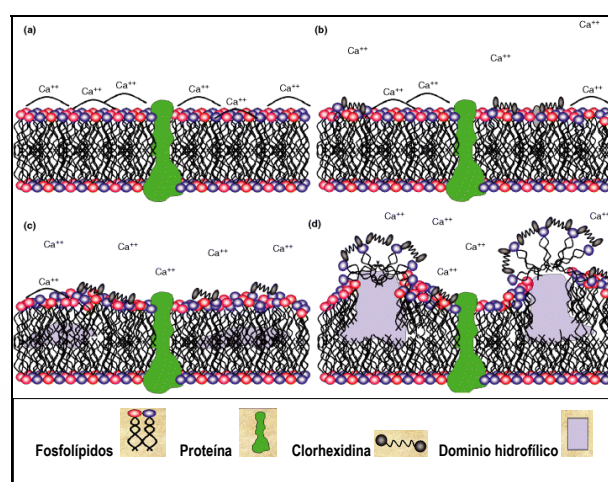
La envoltura más externa de las bacterias posee una carga negativa, normalmente estabilizada por la presencia de cationes como el Mg^{2+} y el Ca^{2+} , por lo que la mayoría de los agentes antisépticos son de carácter catiónico y tienen una elevada afinidad por las células bacterianas (Maillard, 2002; Gilbert y Moore, 2005). La primera fase de actuación de la CHX es la de adsorción a la pared de los microorganismos (Albertos *et al*, 1996); se trata de un proceso muy rápido que se explica por la presencia de los 2 grupos básicos y simétricos de clorofenilguanida unidos a la cadena lipofílica de hexametileno, que conforman la molécula bicatiónica que interactúa con facilidad con la superficie bacteriana (Musteata y Pawliszyn, 2005); esta unión se favorece cuando el pH es neutro o ligeramente alcalino; la cantidad de CHX adsorbida depende de su concentración. Aunque el mecanismo de acción de las bisbiguanidas es muy similar al de los compuestos de amonio cuaternario, a diferencia de ellos las uniones a los fosfolípidos

y a las proteínas de la pared y de la membrana bacterianas son más fuertes, y además la longitud de la región hidrofóbica de las bisbiguanidas impide su interdigitación dentro de la bicapa lipídica. La CHX, por tanto, establece un puente entre pares de fosfolípidos adyacentes y desplaza los cationes divalentes asociados; la molécula catiónica de la CHX se unirá fundamentalmente a compuestos aniónicos como sulfatos libres, grupos fosfato de los lipopolisacáridos y grupos carboxilo de las proteínas (Rölla y Melsen, 1975).

A bajas concentraciones, la CHX reduce la permeabilidad de la membrana citoplasmática, alterando su capacidad metabólica, de osmorregulación y su contenido enzimático (Hugo y Longworth, 1966; Al-Tannir y Goodman, 1994). Algunos indicadores indirectos de estos efectos son la evasión de iones potasio, de fósforo y de protones, así como la inhibición de la respiración y del transporte de solutos. Esta alteración de la integridad de la membrana constituye el efecto bacteriostático de la CHX y es de carácter reversible (Fardal y Turnbull, 1986; Hugo, 1992; Franch et al, 2005).

A concentraciones más elevadas de CHX las interacciones son más severas, provocando la cristalización de la membrana, que finalmente pierde su integridad estructural y permite la salida catastrófica del material celular (Longworth 1971; Chawner y Gilbert, 1989a; Chawner y Gilbert, 1989b). Esta es la esencia del efecto bactericida de la CHX, que produce la precipitación o coagulación del citoplasma bacteriano, lo que paradójicamente provoca una disminución de la salida de componentes a través de la membrana, que finalmente conduce a la muerte celular.

Figura 4. Interacción de la clorhexidina con la membrana citoplasmática
(modificado de Gilbert y Moore, 2005)



Las concentraciones a las que la CHX tiene efecto bacteriostático o bactericida varían para cada especie bacteriana (Franch *et al*, 2005). Empleando gluconato de CHX sobre bacterias y levaduras se comprobó que en cualquier caso esta acción era extremadamente rápida, obteniéndose un efecto máximo a los 20 segundos. Puede resultar difícil determinar la concentración bactericida porque exige la neutralización previa del principio activo (Arévalo *et al*, 1998) y además se ha constatado que sólo la CHX libre tiene efecto antimicrobiano (Musteata y Pawliszyn, 2005).

1.3.4. Retención y sustantividad

La liberación de un agente en el lugar de acción de forma biológicamente activa y a dosis eficaces, hace que sus efectos se vean incrementados a largo plazo y se define como sustantividad (Ferreira *et al*, 2003). Esta propiedad, junto con la capacidad antimicrobiana, son imprescindibles para que un antiséptico resulte clínicamente eficaz. Una de las principales ventajas de la CHX, además de que es un potente antimicrobiano, es su capacidad de unirse a sustratos distintos y muy heterogéneos, como son los

dientes y la mucosa oral, de retenerse de manera prolongada en estas superficies y de mantener su actividad antibacteriana al liberarse lentamente a un ritmo que permite la persistencia de dosis eficaces (*Herrera et al, 2001*).

La unión de los agentes antisépticos con capacidad sustantiva a las diferentes superficies orales, es una cuestión que todavía no se ha estudiado en profundidad, pero se sostiene que dicha fijación depende no sólo de la naturaleza del producto, si no también de otras variables como la dosis, la concentración, el tiempo y la frecuencia de aplicación, y la concentración de iones hidrógeno e hidroxilo del medio (pH) (*Van der Weijden et al, 2005*). Se ha sugerido que las propiedades catiónicas de la CHX son las que explican su unión a la hidroxiapatita del esmalte dental, a la película adquirida de la superficie del diente, a las proteínas salivales, bacterias y polisacáridos extracelulares de origen bacteriano (*Hjeljord et al, 1973; Turesky et al, 1977*). Waler y Rölle (*Waler y Rölle, 1983*) estimaron que un 25-33% de la CHX retenida en la boca estaba unida a grupos fosfato. Parece que el mecanismo de retención puede estar constituido fundamentalmente por un sistema de intercambio de iones, ya que la CHX es retenida cuando se desplazan los iones calcio de la cavidad oral al realizar un enjuague, y cuando la concentración de Ca^{2+} en saliva se incrementa, éstos desplazan a la CHX y provocan su liberación (*Jones, 1977; Waaler, 1990*).

Se estima que aproximadamente el 30% de la CHX que se emplea en los enjuagues queda retenida en la cavidad oral (*Bonesvoll et al, 1974b*). La liberación gradual de la CHX adsorbida mantiene niveles bastante constantes en la saliva, suficientes para crear un medio bacteriostático durante varias horas después del empleo del colutorio (*Gjerme et al, 1975*); Musteata y Pawliszyn (*Musteata y Pawliszyn, 2005*), empleando una técnica de microextracción de fase sólida, demostraron que la CHX seguía siendo estable en la cavidad bucal por lo menos durante 9 horas y que se detectaban altas concentraciones incluso 8 horas después del enjuague; con la misma técnica comprobaron que la concentración de CHX total seguía una cinética de

eliminación de primer orden y que la concentración de CHX libre permanecía casi constante las 2 primeras horas post-enjuague, por lo que dedujeron que la cavidad oral actuaba como un reservorio que liberaba la CHX lentamente.

Se ha sugerido que existe una proporción directa y positiva entre la concentración del antiséptico y su retención, es decir, que a mayor concentración más cantidad de antiséptico se retiene (*Bonesvoll et al, 1974a*). También es destacable el hecho de que, tras un enjuague de 60 segundos, aproximadamente un 50% de la CHX se retiene en los primeros 15 segundos, y de que la máxima cantidad retenida después de enjuagarse con una concentración del 0,2% durante 30 segundos es similar a la obtenida tras un enjuague de 1 minuto con CHX al 0,1% (*McDonell y Russell, 1999*). La temperatura no parece condicionar la retención de la CHX, cuando no se superan los 60°C (*Waler, 1990; Sreenivasan y Gittins, 2004b*). En relación a otros parámetros como el pH, se ha señalado que la cantidad de CHX retenida aumenta si el pH es básico, especialmente en el rango de 6,4-9,0 (*Bonesvoll et al, 1974b*), aunque otros autores consideran que el pH óptimo se encuentra entre 5,5 y 7, ya que entre estos valores se conserva el efecto antimicrobiano (*Albertos et al, 1996; Waler, 1990*); tras efectuar varios enjuagues con ácido acético la actividad de la CHX disminuye notablemente, confirmando así que un pH ácido reduce considerablemente la retención del antiséptico (*Gjerme et al, 1974*); este hallazgo se fundamenta en que la CHX se une electrostáticamente a los grupos aniónicos de la cavidad oral -en especial a los grupos carboxilo de las proteínas salivales-, y cuando estos grupos se encuentran en un medio con un pH inferior a 4 su ionización se reduce y en consecuencia la retención de CHX también disminuye (*Tanzer et al 1977, Maillard, 2002*); a pesar de que los tests bacteriológicos reflejan que la actividad de la CHX se mantiene a pH 3, se ha constatado que por debajo de este valor este antiséptico pierde su eficacia clínica (*Waler, 1990*), probablemente porque con este pH los grupos carboxilo pierden su carga negativa y se convierten en el principal lugar de unión del agente antimicrobiano, aunque otros autores insisten en que la CHX también tiene afinidad por los grupos sulfato de algunas glucoproteínas, por los grupos fosfato de los

lipopolisacáridos y por la placa dental (Gjerme *et al*, 1974); en cualquier caso, el pH ácido altera tanto la cantidad como la naturaleza de los lugares de unión del antiséptico, con acciones que incluyen desde la desnaturalización de proteínas hasta la precipitación de las macromoléculas a las que se une la CHX a pH neutro.

Dado que en la cavidad oral se encuentran diferentes superficies, estructuras y tejidos, consideramos pertinente hacer hincapié en la retención de CHX en los más relevantes:

- Saliva

La CHX se une a los compuestos aniónicos de las glicoproteínas salivales y al bloquear los grupos ácidos disminuye la adsorción de dichas proteínas a la superficie del diente. Las moléculas de CHX unidas a las proteínas salivales se liberan en forma activa durante 8-12 horas (Bonesvoll *et al*, 1974b; Netuschil *et al*, 1995). La CHX también se une a las bacterias que integran la flora salival, impidiendo la adsorción de los microorganismos al diente y en consecuencia inhibiendo la formación de placa dental. Sin embargo, se ha especulado que el tiempo de aclaramiento salival del 50% se sitúa en torno a 2,2 minutos, por lo que en ese periodo la concentración de cualquier componente exógeno de la saliva -como la CHX- se reduciría a la mitad (Dawes, 2004), y por lo tanto la cantidad de CHX inicialmente retenida en la saliva tendría muy poca relevancia. En el apartado 1.4. se analiza en detalle la bibliografía más destacada sobre el efecto antimicrobiano de una única aplicación de un colutorio de CHX sobre la flora salival.

- Superficie dentaria

Bonesvoll y Olsen (Bonesvoll y Olsen, 1974) concluyeron que la retención de CHX era similar en desdentados totales que en parcialmente edéntulos, y que los dientes limpios y pulidos no retenían mayores cantidades de CHX que los que estaban recubiertos de placa. Aunque la retención de CHX en la superficies dentarias no sea significativa, numerosos autores han insistido en que puede tener importancia clínica (Davies, 1973; Bonesvoll y Olsen, 1974; Bonesvoll *et al*, 1974c; Waaler y Rølla, 1985). Sin embargo, cuando se estudian *in vitro* superficies de hidroxiapatita, éstas evidencian una mayor

adsorción que las coronas limpias y pulidas, quizás por el incremento del área total a la que potencialmente puede unirse la CHX (Waalder y Rølla, 1985).

- Mucosa oral

Se ha sugerido que existen zonas alternativas de retención dentro de la cavidad oral como por ejemplo la mucosa yugal, la vestibular o el paladar (Waalder y Rølla, 1985). Para algunos autores la mucosa representa el principal reservorio, debido a las interacciones reversibles de la molécula de CHX con los grupos fosfato, sulfato y carboxilo de los tejidos blandos orales (Stabholz *et al*, 1986; Sanz *et al*, 1989).

- Prótesis dentales

Las prótesis de acrílico retienen importantes cantidades de CHX, especialmente en las zonas donde hay mayor presencia de placa (Bonesvoll y Olsen, 1974). La inmersión de las prótesis en una solución de CHX durante 15 minutos permite acercarse a los mayores índices de retención del antiséptico, por lo que ésta podría ser una buena pauta para el tratamiento de la estomatitis protética (Bonesvoll y Olsen, 1974).

- Otras

Al menos desde un punto de vista teórico, parece que los dientes e incluso otras estructuras intraorales como la lengua, no constituyen lugares prominentes de retención con respecto a su potencial efecto clínico -ya que en el caso de la lengua parece que sí retiene grandes cantidades de CHX pero aún así sin gran relevancia clínica- (Waalder y Rølla, 1985). En consecuencia, no se pueden descartar otras hipótesis, como que las glucoproteínas sulfatadas cargadas negativamente que contienen las secreciones glandulares interactúen con la CHX y faciliten su retención en la proximidad de las glándulas; esto haría que la bisbiguanida se liberara lentamente, al ritmo de producción/aclaramiento de las secreciones (Waalder y Rølla, 1985).

En definitiva, aunque se ha señalado que la acción bactericida de la CHX *in vitro* no es superior a la de otros agentes antibacterianos, su propiedad de fijarse a las estructuras bucales y su posterior liberación durante horas -sustantividad- la convierten en un excelente agente antiséptico; durante este tiempo exhibe una actividad

bacteriostática prolongada, que constituye un complemento importante de su elevada actividad bactericida inicial (Lang y Brex, 1986), aunque no podemos ignorar que en la cavidad oral también ejerce un efecto inhibitor primario de algunos mecanismos de adhesión a superficies epiteliales y dentales (Baca et al, 1996). La duración de la adhesión prolongada en la boca presenta variaciones interindividuales según la intensidad del flujo salival, presencia de iones H^+ y concentración de cationes divalentes como Ca^{2+} (Ruppert y Schlagenhauf, 2005). La sustentividad puede determinarse midiendo la magnitud y duración del descenso de bacterias salivales post-enjuague simple con el antimicrobiano (Schiött et al, 1970); en el apartado 1.4. se analizan los principales trabajos recogidos en la literatura de evaluación *in vivo* de la sustentividad de la CHX sobre la flora salival.

1.3.5. Espectro antimicrobiano. Susceptibilidad y resistencia

La CHX es un antiséptico de amplio espectro, bactericida y fungicida (Fardal y Turnbull, 1986). Aunque no se considera un viricida, tiene cierta actividad sobre los virus con cubierta lipídica, como VIH, Herpesvirus 1 y 2 e Influenza A (Arévalo et al, 1998; Bernimoulin, 2003). Tampoco es esporicida, ni elimina las bacterias ácido-alcohol resistentes (Albertos et al, 1996; Junco-Lafuente et al, 2001), pero puede inhibir el crecimiento de las esporas y tiene efecto bacteriostático sobre algunas micobacterias (Arévalo et al, 1998).

Es más efectiva frente a bacterias Gram-positivas que frente a Gram-negativas, como consecuencia de las características estructurales de la membrana externa de éstas últimas (Schiött et al, 1970, Järvinen et al, 1993, Bascones y Manso, 1994; De Freitas et al, 2003; Sekino et al, 2004). *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* y *Escherichia coli* son particularmente susceptibles a la acción de la CHX (Emilson, 1977). Järvinen et al (Järvinen et al, 1993) evaluaron la susceptibilidad *in vitro* de los estreptococos del grupo mutans a la CHX, obteniendo los siguientes rangos de

CMI: 0,25-1 µg/ml para *S. pyogenes*, 0,25-1 µg/ml para *S. mutans* y 0,5-2 µg/ml para *S. sobrinus*. *Streptococcus sanguis* tiene una sensibilidad intermedia, y *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Klebsiella* spp. son muy poco susceptibles (Hennessey, 1973). Entre los anaerobios, *Propionibacterium* spp. y *Selenomonas* spp. han demostrado una alta susceptibilidad, mientras que entre los cocos Gram-negativos -como *Veillonella* spp.- se observa el mayor porcentaje de resistencias (Fardal y Turnbull, 1986). En una revisión efectuada por McDonell y Russell en 1999 (McDonell y Russell, 1999), se confirmó que los valores de CMI de CHX más bajos correspondían a *Staphylococcus aureus* (0,5-1 µg/ml) y los más altos a *Pseudomonas aeruginosa* (5-60 µg/ml).

Existe una gran variabilidad intergéneros e incluso interespecies en términos de susceptibilidad y de ratios CMI/CMB (McBain et al, 2003), pero los trabajos publicados recientemente confirman los hallazgos de los años 70 (independientemente de los progresos metodológicos y del empleo generalizado de este antiséptico):

- Sreenivasan y Gittins (Sreenivasan y Gittins, 2004a), analizando los niveles de microorganismos detectables en saliva y en la lengua 3 horas después de haber realizado un único enjuague con CHX al 0,12%, demostraron que este antiséptico posee un amplio espectro de acción antibacteriana en ambas localizaciones. En la saliva, la reducción total de especies anaerobias fue del 91%, con la siguiente distribución: 95% las Gram-positivas, 89% las Gram-negativas, 91% las bacterias proteolíticas y 94% las productoras de H₂S -implicadas en la halitosis-. En la lengua, la concentración de anaerobios se redujo un 90%, la de Gram-positivos un 85%, la de Gram-negativos un 90%, las bacterias proteolíticas un 81% y las productoras de H₂S un 94%.
- Sekino et al (Sekino et al, 2004) sugirieron que el uso de este antimicrobiano disminuía considerablemente el recuento total de bacterias en saliva; *Actinomyces* spp. era el género más sensible, mientras que la concentración de *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* sólo se modificaba mínimamente.
- Do Amorin et al (Do Amorin et al, 2004) realizaron un estudio para determinar la CMI de la CHX frente a diferentes microorganismos aislados en los conductos radiculares, para

evaluar la aplicación de este antiséptico como irrigante en el tratamiento endodóncico. *Pseudomonas aeruginosa* resultó el microorganismo menos susceptible, con una CMI de 80 µl/ml, siendo este valor aproximadamente 30 veces superior a los requeridos para *Prevotella denticola* y *Escherichia coli*, que presentaron los valores más bajos (CMI= 2,67 µg/ml). La CMI de los anaerobios estrictos Gram-negativos como *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* y *Prevotella melaninogenica* fue de 3,40 µg/ml.

- Goldstein et al (Goldstein et al, 2004) evaluaron la actividad *in vitro* de la CHX al 0,12% frente a 322 periodontopatógenos anaerobios (los resultados se emplearon como referencia para analizar la actividad de 11 compuestos salinos y 4 antimicrobianos). Las CMI más elevadas fueron las de *Eubacterium yurii* (60 µg/ml), *Bacteroides fragilis* (60 µg/ml), *Collinsella aerofaciens* (30 µg/ml), *Eikenella corrodens* (30 µg/ml) y *Prevotella oralis* (30 µg/ml). Los valores de CMI más bajos fueron para *Porphyromonas gingivalis*, una cepa de *Prevotella melaninogénica*, *Veillonella* spp., *Campilobacter gracilis*, *Prevotella intermedia* y *Eubacterium saburreum*, todos ellos con una CMI de 4 µg/ml.

- McBain et al (McBain et al, 2004) estudiaron la CMI y la CMB para la CHX tras 5 exposiciones a la misma y 10 exposiciones al triclosán. La susceptibilidad a la CHX varió considerablemente intergéneros, y entre microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. Las bacterias más susceptibles fueron *Actinomyces naeslundii*, seguidas de anaerobios como *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* y *Veillonella dispar*; *Streptococcus mutans* y *sanguis* también tenían valores de CMI bajos. *Fusobacterium nucleatum* y *Lactobacillus rhamnosus* resultaron menos susceptibles. Los ratios CMI/CMB fueron especialmente elevados para *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella nigrescens* y *Streptococcus mutans*.

Muchas especies bacterianas expresan resistencia natural a la CHX. La ineficacia de este agente antimicrobiano frente a algunas bacterias Gram-negativas, concretamente *Pseudomonadaceae* y *Providentia* spp. (Thomas y Stickler, 1979), puede revertirse mediante formulaciones que incluyan agentes quelantes; éstos secuestran los cationes

bivalentes de la membrana externa y citoplasmática para facilitar la interacción de la CHX (Gilbert y Moore, 2005). La resistencia bacteriana a los antimicrobianos tras su aplicación prolongada se relaciona con la selección de mutantes resistentes. Hennessey (Hennessey, 1973) demostró *in vitro* que la selección de mutantes resistentes a la CHX de *Escherichia coli* y de *Streptococcus* spp., era poco frecuente. Schiött et al (Schiött et al, 1976) analizaron las consecuencias microbiológicas del empleo de CHX durante 2 años y sólo detectaron una ligera disminución de la sensibilidad microbiana (aunque la reducción de la concentración de aerobios y anaerobios salivales fue de sólo 30-50% frente al 85-90% conseguido después de 40 días de aplicación de la CHX). Posteriormente, otros autores corroboraron la existencia de una adaptación temporal a la CHX, con una pérdida relativa de susceptibilidad de los estreptococos orales (Emilson, 1977; Emilson y Fornell, 1976; Hase et al, 1998). Otros investigadores sólo constataron ésta susceptibilidad reducida en aislamientos salivales de “estreptococos-like” y exclusivamente durante el periodo de enjuague (Hase et al, 1998). Al-Tannir y Goodman (Al-Tannir y Goodman, 1994) atribuyeron estos hallazgos, más que a una resistencia adquirida a la CHX, al crecimiento preferente de cepas menos sensibles. Aunque se han detectado cepas bacterianas Gram-negativas (Khor y Jegathesan, 1983) y de *Streptococcus sanguis* resistentes -con resistencia transferible a cepas sensibles- (Westergren y Emilson, 1980), en general se acepta que la susceptibilidad a CHX de la mayoría de las bacterias orales no se modifica con el uso habitual de este antiséptico (Sreenivasan y Gaffar, 2002); en este sentido, se ha constatado que la aplicación de enjuagues de CHX al 0,12% durante 2 años, disminuye la concentración de especies asociadas con la gingivitis y la enfermedad periodontal (como *Actinomyces* spp., *Veillonella* spp. y *Fusobacterium* spp.), sin originar ningún tipo de resistencias (Briner et al, 1989). Ruppert y Schlagenhauf (Ruppert y Schlagenhauf, 2005) señalaron que era improbable que los gérmenes orales desarrollaran resistencias a la CHX por la inespecificidad de su mecanismo de acción contra la pared bacteriana; para evitar resistencias, el agente terapéutico debe ser inespecífico, con un espectro de acción muy amplio y eficaz a concentraciones muy bajas. A pesar de la utilización generalizada de la

CHX durante más de 50 años, las mutaciones son muy infrecuentes (*Lang y Brex, 1986; Bascones y Manso, 1994*), aunque se han descrito pequeños cambios en los valores de CMI (*Thomas y Stickler, 1979; Kropinski et al, 1982*).

1.3.6. Aplicaciones clínicas

El primer estudio clínico sistemático sobre el efecto antiplaca de la CHX y su eficacia consiguiente para prevenir la aparición de gingivitis (en ausencia de control mecánico mediante cepillado), fue publicado en 1970 por Loe y Schiött (*Loe y Schiött, 1970*). En dicho estudio participaron 8 estudiantes voluntarios, con índices basales de placa y gingivales próximos a 0. Durante un periodo de 22 días, 4 participantes se enjuagaron con 10 ml de una solución de digluconato de CHX al 0,2% durante 1 minuto 2 veces al día. Después de 22 días se interrumpieron los enjuagues y a continuación durante 11 días se mantuvieron sin ninguna medida de higiene oral. Los otros 4 estudiantes constituyeron el grupo control, y no aplicaron ninguna medida de higiene oral durante los 22 días. En el grupo control el número de bacterias por ml de saliva había aumentado un 300% al finalizar el experimento. En el grupo tratado con CHX el recuento bacteriano se redujo un 85-90%; cuando terminó la fase de los enjuagues, el número de bacterias aumentó hasta alcanzar a las 48 horas un nivel similar al grupo control, que se mantuvo durante los 11 días restantes del experimento. La colonización bacteriana del área gingival y dental de los controles también fue muy superior a la observada en los participantes que utilizaron la CHX.

Los excelentes resultados clínicos obtenidos con la CHX en los ensayos clínicos a corto plazo, se corroboraron en diversos estudios a largo plazo. En el primero de ellos (*Loe et al, 1976*), 150 estudiantes de Medicina realizaron enjuagues diarios durante 2 años con una solución de CHX al 0,2%; se demostraron reducciones significativas de placa, gingivitis, y del número total de bacterias anaerobias estrictas y facultativas (especialmente de *Streptococcus mutans* en saliva) (*Schiött et al, 1976*). En este mismo

ensayo clínico, se realizaron diversas pruebas de seguimiento sistémico a intervalos regulares, incluyendo un cuestionario de salud, hemograma, bioquímica sanguínea, velocidad de sedimentación y análisis de orina, y se concluyó que la CHX al 0,2% era efectiva y no tenía efectos tóxicos. Posteriormente, muchos investigadores han ratificado que la CHX es un agente antiplaca muy eficaz, seguro y con escasos efectos colaterales (Grossman *et al*, 1986; Segreto *et al*, 1986; Gjermo, 1989; Collaert *et al*, 1992).

Además de su actividad antiplaca y antigingivitis, la CHX en colutorio es eficaz en la prevención y tratamiento de la caries, en los procedimientos de cirugía oral, en el mantenimiento de los implantes, reduce la carga bacteriana de los aerosoles, previene las bacteriemias post-manipulación dental, en el tratamiento de la aftosis recurrente y de la estomatitis protética, y está particularmente indicada en determinados colectivos como los portadores de aparatología ortodóncica, discapacitados y pacientes inmunológicamente comprometidos (Enrile de Rojas *et al*, 2006).

La actividad de caries está íntimamente relacionada con los niveles de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral (Shklair *et al*, 1974). La CHX es un potente inhibidor de esta especie bacteriana (Emilson y Fornell, 1976), ya que además de su acción bactericida compromete su adherencia a la hidroxiapatita recubierta de saliva y de dextrano (Fardal y Turnbull, 1986). En 2004, Nomura *et al* (Nomura *et al*, 2004) diseñaron un protocolo combinando la limpieza profesional intensiva, con la aplicación de CHX al 1% en cubetas y al 0,2% en colutorio (2 veces al día), junto con el cepillado convencional; a los 4 meses este régimen había erradicado los *Streptococcus mutans* de la cavidad oral de todos los participantes, excepto en 3 individuos con bolsas periodontales profundas, en las que las bacterias consiguieron eludir el efecto de la CHX. En los pacientes en los que el consejo dietético (reducción drástica del consumo de carbohidratos fermentables) y la profilaxis con flúor no logren el control clínico satisfactorio de la caries, se recomienda la administración de CHX para minimizar la presencia de flora cariogénica (Ruppert y Schlagenhauf, 2005). La eficacia de la CHX con respecto a otros antisépticos

para reducir los recuentos de colonias de *Streptococcus mutans* (Kulkarni y Damle, 2003) y la acidogenicidad de la placa (Giertsen y Scheie, 1993), justifican su empleo en pacientes de alto riesgo de caries.

En las primeras semanas después de efectuar un procedimiento de cirugía bucal, cuando la capacidad de control de placa está disminuida, la CHX resulta muy útil como complemento de la higiene oral mecánica y para facilitar la cicatrización. En 1989, dos grupos independientes de investigadores demostraron que la CHX al 0,12%, aplicada después de la cirugía periodontal, interfería la recolonización bacteriana de la placa adherida a la herida quirúrgica y mejoraba la evolución clínica del paciente (Newman et al, 1989; Sanz et al, 1989). Newman et al (Newman et al, 1989) prescribieron un colutorio de CHX al 0,12% durante las 6 semanas posteriores a la cirugía, confirmando que reducía significativamente la placa subgingival y marginal acumuladas sobre el área quirúrgica; estos autores relacionaron la presencia de placa con el retraso en la cicatrización de la herida, y atribuyeron el éxito del tratamiento antimicrobiano postquirúrgico a la eliminación de los microorganismos asociados a la herida y a la prevención de la recolonización por gérmenes periodontopatógenos. En el estudio de Sanz et al (Sanz et al, 1989) se confirmó que la administración de CHX facilitaba la epitelización y disminuía el dolor. Heitz et al (Heitz et al, 2004) demostraron que en las 4 semanas siguientes a la cirugía periodontal, un enjuague con CHX al 0,1% (2 veces al día durante 1 minuto) y, con la misma frecuencia diaria, un cepillado dental con un cepillo quirúrgico (desde el día 3 al 14) o ultrasuave (desde el día 14 al 28), optimizaban el proceso de cicatrización de la herida y su curación. Recientemente, Powell et al (Powell et al, 2005) evaluaron retrospectivamente 1053 procedimientos quirúrgicos periodontales, encontrando una relación en términos de tendencia -aunque sin alcanzar significación estadística-, entre el uso postquirúrgico de CHX y una menor prevalencia de complicaciones infecciosas. Caso et al (Caso et al, 2005) efectuaron un metaanálisis, en el que revisaron 7 ensayos clínicos randomizados sobre la aparición de osteítis secundaria a la exodoncia de los cordales mandibulares, concluyendo que era posible

reducir la incidencia de esta complicación enjuagándose con CHX el día de la intervención y los días posteriores. Metin et al (*Metin et al, 2006*) no encontraron diferencias significativas en la prevalencia de osteítis después de la exodoncia quirúrgica del tercer molar mandibular impactado, entre un grupo de pacientes que se enjuagaron durante 30 segundos con 15 ml de CHX (2 veces al día) en la semanas previa y posterior a la cirugía, con respecto a otro grupo que sólo utilizaron el colutorio durante la semana siguiente al acto quirúrgico.

Los enjuagues de CHX al 0,12% en el período perioperatorio inmediato reducen significativamente la frecuencia de complicaciones infecciosas en la cirugía implantológica y facilitan la osteointegración (*Lambert et al, 1997*). Young et al (*Young et al, 2002*), aplicando enjuagues prequirúrgicos de CHX al 0,1% y un protocolo de aspiración estricto, redujeron la contaminación bacteriana de los fragmentos óseos generados durante la colocación de implantes, que fueron empleados simultáneamente para aumentar el volumen de la cresta ósea. Felo et al (*Felo et al, 1997*) evaluaron durante 3 meses el efecto de la irrigación subgingival con CHX al 0,06%, comparándola con un enjuague diario de CHX al 0,12%; en base a los resultados obtenidos con la irrigación, se sugirió que ésta constituía un complemento valioso en el mantenimiento de la salud oral en pacientes portadores de implantes. Los resultados obtenidos por Kozlovsky et al (*Kozlovsky et al, 2006*) sobre la interacción de la CHX con la superficie de titanio, parecen indicar que la adsorción (mayor con CHX al 0,2% que al 0,1%) y la eficacia antiplaca de la CHX en el ambiente periimplantario, proporcionarían un efecto antiplaca a largo plazo sobre la superficie del implante. Algunos autores, por el contrario, han subrayado la falta de estudios clínicos a largo plazo sobre la eficacia de la aplicación prolongada de CHX en el mantenimiento de la salud gingival periimplantaria (*Enrile de Rojas et al, 2006*). En el tratamiento de la periimplantitis, la irrigación de los surcos periimplantarios mayores de 3 mm con CHX al 0,5% junto con el desbridamiento mecánico, mejoraron significativamente la evolución clínica (*Mombelli y Lang, 1992*).

Los aerosoles generados durante el tratamiento odontológico con instrumental rotatorio, contienen bacterias procedentes de la cavidad oral que aumentan el riesgo de infecciones entre el personal sanitario y contaminan el área quirúrgica (Miller, 1976). Fine et al (Fine et al, 1993) demostraron que los enjuagues preoperatorios con antisépticos reducían significativamente la carga bacteriana de los aerosoles generados por los aparatos de detartraje ultrasónico. Logothetis y Martínez-Welles (Logothetis y Martínez-Welles, 1995) constataron que la CHX al 0,12% (2 enjuagues consecutivos de 30 segundos cada uno) era más eficaz que un antiséptico a base de aceites esenciales, para minimizar la contaminación bacteriana ocasionada por un dispositivo de limpieza intraoral. Sin embargo, Klyn et al (Klyn et al, 2001) compararon la concentración bacteriana en un aerosol generado durante la limpieza con ultrasonidos, empleando un aspirador específico para aerosoles y/o un enjuague previo con CHX al 0,12%; el aspirador resultó más eficaz que la CHX preoperatoria, y la combinación de ambos no fue más efectiva que el aspirador solo. En definitiva, aunque no existe evidencia científica de que los enjuagues antisépticos preoperatorios prevengan la infección cruzada, se ha demostrado que reducen significativamente la carga bacteriana de los aerosoles (Kaplowitz y Cortell, 2006).

La CHX es el antiséptico más evaluado para la prevención de bacteriemias post-manipulación dental (Enrile de Rojas et al, 2006). En 1978, Jokinen (Jokinen, 1978) demostró que una solución de CHX al 0,5% reducía la bacteriemia post-exodoncia de manera más efectiva que las soluciones yodadas al 1% y al 10%, recomendándola como método de profilaxis local en la práctica diaria. Aunque los resultados de investigaciones posteriores no fueron concluyentes, la Asociación Americana de Cardiología (Wilson et al, 2007) incluyó el empleo de CHX en los protocolos de profilaxis de endocarditis bacteriana, como complemento de la pauta específica de antibióticos. Tomás et al (Tomás et al, 2007) comprobaron que enjuagándose con CHX al 0,2% durante 30 segundos antes de efectuar una exodoncia (paradigma de una manipulación dental cruenta y con potencial para originar bacteriemia), disminuía la prevalencia de

bacteriemias de manera significativa, por lo que recomendaron su empleo sistemático antes de efectuar cualquier manipulación dental.

La aftosis recurrente es una patología común en la población general, de etiología generalmente idiopática, con una prevalencia que llega a alcanzar hasta el 25% (*Barrons, 2001*). Las lesiones pueden ser muy dolorosas, interfiriendo la alimentación, la deglución y el habla; su severidad y duración pueden incrementarse por contaminación bacteriana. El tratamiento es sintomático y exige la retirada de factores predisponentes como el trauma local o el estrés (*Fardal y Turnbull, 1986*). Se ha demostrado que la CHX, tanto en colutorio como en gel, disminuye la incidencia, duración y severidad de las úlceras (*Addy, 1977; Piccione, 1979*). Su eficacia para el control del dolor asociado a estas lesiones es comparable a la del acetónido de triamcinolona al 0,025% (*Miles et al, 1993*).

La estomatitis protética por *Candida* spp. es la infección micótica más común en portadores de prótesis dentales de acrílico (especialmente en los ancianos) (*Budtz-Jørgensen, 1990*). Uno de los primeros estudios sobre el empleo de la CHX en el tratamiento de la estomatitis protética fue publicado por Heyden et al (*Heyden et al, 1971*) en 1971, demostrando la eficacia del antiséptico al embeber las prótesis en CHX al 0,2%. Se ha señalado que los colutorios de CHX tanto al 0,12% como al 0,2% eliminan los hongos adheridos a la superficie mucosa y reducen la inflamación palatina (*Kamalakshi et al, 1992*). Se ha recomendado el empleo nocturno de una suspensión de CHX al 2% para desinfectar las prótesis (*Budtz-Jørgensen, 1990; Lal et al, 1992; Ellepola y Samaranayake, 2000*). La sustantividad de la CHX supone una ventaja añadida al tratamiento, ya que prolonga su actividad antimicótica durante varias horas, tras una breve exposición al gluconato de CHX (incluso cuando se utilizan concentraciones muy bajas) (*Ellepola y Samaranayake, 1999*). Las combinaciones de CHX con antifúngicos como anfotericina B y fluconazol resultaron eficaces en el control de la inflamación palatina (*Olsen, 1975; Kulak et al, 1994; Arikan et al, 1995*). La CHX combinada con nistatina o cotrimoxazol disminuye significativamente la incidencia de candidiasis oral en

pacientes sometidos a quimioterapia (*Ferreti et al, 1990*). No obstante, Barkvoll y Attramadal (*Barkvoll y Attramadal, 1989*) observaron que la CMI de la combinación CHX-nistatina frente a *Candida* spp. era significativamente más alta que los valores de cada uno de estos principios activos por separado, lo que resta eficacia a la combinación.

La aparatología ortodóncica dificulta la aplicación de medidas mecánicas de higiene oral convencionales y favorece la aparición de úlceras traumáticas (*Enrile de Rojas et al, 2006*). Shaw et al (*Shaw et al, 1984*) demostraron que la CHX disminuye la prevalencia, la sintomatología y la duración de estas úlceras, cuando complementa a la higiene mecánica. En adolescentes portadores de aparatología ortodóncica con gingivitis establecida, la CHX al 0,12% redujo significativamente el acúmulo de placa, la gingivitis y el sangrado gingival, aunque provocó una tinción moderada de las superficies dentales linguales mandibulares (*Brightman et al, 1991; Anderson et al 1997*). Posteriormente, Gehlen et al (*Gehlen et al, 2000a*) comprobaron la eficacia clínica (en términos de formación de placa y gingivitis) de un colutorio de CHX al 0,2% en pacientes portadores de ortodoncia, concluyendo que era un complemento eficaz de las medidas de higiene convencionales. El mismo grupo de investigadores demostró que la CHX al 0,2% también era eficaz desde el punto de vista microbiológico (en términos de vitalidad bacteriana, UFC y niveles de *Streptococcus mutans*), recomendando nuevamente su empleo como complemento de las medidas de control mecánico de la placa (*Gehlen et al, 2000b*).

Se ha sugerido que la administración regular de colutorios antisépticos está particularmente indicada en los pacientes que por su condición física o psíquica tienen limitaciones para llevar a cabo una correcta higiene bucodental, así como en aquéllos con un especial riesgo de desarrollar complicaciones orales debido a alguna patología sistémica o como consecuencia de su abordaje terapéutico. McKenzie et al (*McKenzie et al, 1992*) comprobaron, en un grupo de discapacitados psíquicos, que la administración de un colutorio de CHX al 0,12% reducía la placa bacteriana y el índice gingival, aunque después de un año de aplicación éste seguía siendo indicativo de enfermedad. Montiel y Almerich (*Montiel y*

Almerich, 2002) también confirmaron que la CHX podía complementar eficazmente al control mecánico de la placa dental y la gingivitis, en pacientes con retraso mental. Aunque en múltiples estudios se han demostrado los beneficios derivados del uso de CHX al 0,2% en discapacitados físicos y psíquicos así como en colectivos geriátricos, no se ha concretado ningún régimen de uso específico (*Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración, 2006*). Los pacientes médicamente comprometidos son especialmente susceptibles de padecer complicaciones orales, preferentemente de etiología infecciosa, como la candidiasis. Con la administración de CHX, se han obtenido efectos beneficiosos en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, trasplantados de médula ósea, con neoplasias hematológicas, infectados por VIH/SIDA y otras enfermedades graves asociadas a inmunosupresión, y en pacientes conectados a sistemas de ventilación asistida (*Simon y Roberts, 1991; Giertsen y Scheie, 1993; Barasch et al, 2004; Haytac et al, 2004; Safdar et al, 2005*).



1.4. Efecto antimicrobiano de una única aplicación de un colutorio de clorhexidina sobre la flora salival

1.4.1. Ventajas de la saliva sobre otros ecosistemas

Los primeros tests antimicrobianos en saliva fueron realizados en 1970 por Schiött et al (*Schiött et al, 1970*), que cuantificaron la reducción del número de bacterias salivales tras aplicar múltiples dosis de CHX, así como la duración de dicho efecto (*Schiött et al, 1970*). A partir de ese momento, la determinación de la concentración bacteriana en muestras de saliva aplicando técnicas de cultivo convencionales, constituyó un recurso muy utilizado por la comunidad científica para establecer el efecto antibacteriano *in vivo* de la CHX (*Jenkins et al, 1994b; Addy y Moran, 1997*). La actividad antimicrobiana salival proporciona además información sobre la persistencia de la acción antibacteriana del agente antiséptico -sustantividad- (*Roberts y Addy, 1981; Addy et al, 1989; Jenkins et al, 1994b*) y sobre su efecto inhibitorio antiplaca (*Schiött et al, 1970; Elworthy et al, 1996; Yates et al, 1997*). En este sentido, se ha sugerido que los primeros fenómenos de colonización microbiana después de exponer al contacto con saliva una superficie dentaria limpia, se desarrollan fundamentalmente a expensas de la adhesión de las bacterias salivales (*Weiger et al, 1998*); sin embargo, otros autores sostienen que una única determinación en la reducción de la carga bacteriana no permite establecer ningún tipo de correlación con efectos sobre inhibición de la placa (*Rosin et al, 2001*). Recientemente, Sekino et al (*Sekino et al, 2003*) volvieron a ratificar la importancia del estudio de la flora salival después del empleo de CHX, al señalar que: "las bacterias salivales contribuyen a la formación de la placa bacteriana, por lo que en los pacientes con elevadas concentraciones de bacterias en saliva la placa se desarrolla más rápidamente y es más abundante".

En la literatura existen algunos trabajos en los que se ha determinado la sustentividad *in vivo* de la CHX sobre diferentes ecosistemas orales como la placa dental “desestructurada” (König *et al*, 2002) y “estructurada” (Filoche *et al*, 2007), o el surco gingival (Barros *et al*, 1998), aunque muy pocos autores han investigado simultáneamente la actividad antibacteriana ejercida después de una única aplicación de CHX sobre la saliva y otras biopelículas orales (Sreenivasan y Gittins, 2004a). En general, estos autores coinciden en afirmar que la eficacia antimicrobiana de la CHX es detectable en diferentes localizaciones, probablemente porque la saliva representa un “medio de diseminación” de los microorganismos orales de un nicho ecológico a otro (Collaert *et al*, 1992).

La saliva tiene además algunas ventajas añadidas con respecto a otros ecosistemas orales como son:

- Es fácilmente accesible
- No necesita un período de neoformación -como ocurre con la placa dental-, durante el cual habitualmente se exige un cambio de hábitos (de higiene oral, alimenticios, tabaquismo, etc.)
- Permite obtener varios ejemplares consecutivos
- La muestra no se desestructura al recogerla
- Es fácil de conservar y de almacenar

1.4.2 Experimentos previos. Revisión de la literatura

✓ **Clorhexidina al 0,12%**

Buckner *et al* (Buckner *et al*, 1994) demostraron, en un grupo de voluntarios sanos, que un colutorio de CHX al 0,12% (un único enjuague de 15 ml durante 30 segundos) provocaba al minuto una reducción significativa en la población bacteriana aeróbica y anaeróbica en contraste con los valores basales y con un enjuague de control de agua destilada (los porcentajes de reducción oscilaron entre 72 y 87%). El descenso de la

carga bacteriana se mantuvo constante en todas las muestras salivales post-enjuague, alcanzando el 94% a las 3 horas post-enjuague para los anaerobios, y el 93 y 92% a las 3 y 5 horas post-enjuague respectivamente para los aerobios. Al igual que Addy et al (Addy et al, 1991), en esta serie la mayor eficacia antimicrobiana de la CHX no se observó de forma inmediata, sino a las 5 horas después de su aplicación.

Previamente, Veksler et al (Veksler et al, 1991) habían evaluado el efecto antibacteriano sobre la flora salival de 2 enjuagues consecutivos (15 ml/30 segundos) de CHX al 0,12% durante la práctica de un raspado y alisado radicular en pacientes con periodontitis. Se obtuvieron muestras de saliva en condiciones basales, 1 minuto, 30 minutos y 1 hora post-enjuague (las 2 últimas muestras contenían restos de sangre y detritus). En comparación con la situación basal, el enjuague con CHX disminuyó en un 97% la población bacteriana aeróbica al minuto de su aplicación, y en un 96% a los 30 minutos y 1 hora post-enjuague respectivamente. Aunque se ha señalado que la presencia de materia orgánica podría inactivar a la CHX reduciendo su actividad antibacteriana, en esta serie su eficacia antimicrobiana no se redujo por la presencia de sangre y detritus derivados del procedimiento odontológico.

Recientemente, Sreenivasan y Gittins (Sreenivasan y Gittins, 2004b) compararon la eficacia antibacteriana sobre la flora salival hasta 3 horas después de la aplicación de un enjuague único (15 ml durante 30 segundos) de CHX al 0,12% versus 0,06% y de CHX al 0,06% versus 0,03%. Los enjuagues de CHX ocasionaron reducciones significativas de la flora salival y de la concentración de bacterias productoras de sulfuro de hidrógeno con respecto al enjuague control. La concentración al 0,12% provocó una disminución $\geq 1 \log_{10}$ en la concentración de bacterias salivales y productoras de sulfuro de hidrógeno, 1,5 y 3 horas después de su aplicación, resultando la más eficaz de todas las utilizadas en este trabajo, lo que confirma que la acción de la CHX es concentración-dependiente. Este resultado ya había sido obtenido previamente por otros autores, cuando evaluaron la CHX a concentraciones del 0,12% y del 0,1% (Addy et al, 1991).

Existen numerosos estudios en la literatura en los que se comparó la sustentividad de la CHX al 0,12% con la de otros antisépticos aplicados en forma de colutorios. En 1994, Briner et al (*Briner et al, 1994*) contrastaron la sustentividad de un único enjuague de 15 ml durante 30 segundos de CHX al 0,12% y de aceites esenciales; se obtuvieron muestras de saliva post-enjuague al minuto, 30 minutos, 1, 2, 3 y 5 horas. Ambos antisépticos ejercieron un efecto antibacteriano inmediato en contraste con un enjuague control de agua; los porcentajes de reducción de la población bacteriana fueron 72% para la CHX y 74% para los aceites esenciales. Sin embargo, la CHX conservó su efecto antibacteriano en las siguientes tomas post-enjuague, con porcentajes de reducción de la concentración bacteriana del 72-91%, mientras que con los aceites esenciales la recuperación de la población bacteriana ya era significativa una hora después de la aplicación del colutorio, y los porcentajes de reducción de los niveles bacterianos en las tomas subsiguientes oscilaron entre 35 y 48%. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por otros investigadores, que también constataron una mayor sustentividad de la CHX que de los aceites esenciales (*Balbuena et al, 1998*).

En 1996, Elworthy et al (*Elworthy et al, 1996*), determinaron la sustentividad sobre la flora salival de los siguientes antisépticos hasta 7 horas después de su aplicación: colutorio de CHX al 0,12%, colutorio C31G (alkidimetilbetaína+óxido de dimetilalkilamina), pasta dentífrica con SnF al 0,45%, colutorio con cloruro de cetil piridinio (CCP) al 0,05%, colutorio con CCP al 0,05%+NaF, colutorio con CCP al 0,05%+alcohol al 8%, y colutorio con CCP al 0,05%+NaF+alcohol al 8%. Se realizaron enjuagues simples durante 1 minuto con 15 ml del colutorio asignado o con la mezcla de 3 gramos del dentífrico en 10 ml de agua. El dentífrico con SnF demostró cierta actividad antibacteriana hasta 7 horas después de su aplicación, comparado con el enjuague con agua. Las formulaciones conteniendo CCP se asociaron a un efecto antibacteriano significativamente superior al enjuague con agua a las 3 y 5 horas post-enjuague, mientras que el colutorio con C31G resultó eficaz sólo durante la primera hora. Al comparar las distintas formulaciones, el grado más alto de sustentividad lo presentó la CHX al 0,12%, con una eficacia

antibacteriana máxima a las 3 y 5 horas post-enjuague, persistiendo una reducción significativa en el conteo bacteriano hasta las 7 horas post-enjuague. Estos autores concluyeron que la sustentividad de diferentes formulaciones de antisépticos varía considerablemente en base a su actividad antimicrobiana, estableciéndose probablemente una estrecha correlación con las propiedades antiplaca ejercidas por estos agentes.

Yates et al (Yates et al, 1997) investigaron la persistencia de la actividad antimicrobiana de la CHX al 0,12% (durante 30 segundos) y la contrastaron con los resultados obtenidos empleando 3 colutorios diferentes de cloruro sódico acidificado conteniendo NaF al 0,1% (durante 1 minuto); el efecto antimicrobiano se determinó hasta 7 horas post-enjuague. Los colutorios con cloruro sódico provocaron reducciones significativas en las concentraciones bacterianas detectadas a los 30 minutos post-enjuague, que se mantuvieron hasta las 5 horas. Los colutorios que incluían en su composición ácidos málico y mandélico buferados, demostraron una actividad antimicrobiana mayor que la CHX, a los 30 minutos y 1 hora después de su aplicación. La CHX ocasionó un descenso continuo de la concentración bacteriana salival desde los 30 minutos hasta las 3 horas post-enjuague, para posteriormente mantenerse en la toma de las 5 horas post-enjuague. Con todos los colutorios aplicados en este estudio -tanto de cloruro sódico acidificado como de CHX- se observó una recuperación de la población bacteriana a las 7 horas post-enjuague, aunque los valores alcanzados fueron inferiores a los registrados en condiciones basales; estos hallazgos contrastan con los obtenidos por Addy et al (Addy et al, 1991), que no detectaron efecto de “recrecimiento bacteriano” de la flora salival a las 7 horas post-enjuague tras la administración de CHX al 0,12%.

En el año 2001, en un estudio de características similares al anterior, Fernandes-Naglik et al (Fernandes-Naglik et al, 2001) analizaron la eficacia antimicrobiana de div colutorios de cloruro sódico: NaCl al 0,14%+ácido málico al 1,34% y NaCl al 0,14%+ácido glucónico al 3,55% (durante 1 minuto), contrastando los resultados con los obtenidos con

agua estéril y con CHX al 0,12% (durante 30 segundos). El enjuague de NaCl acidificado con ácido glucónico presentó un efecto antibacteriano sobre la flora salival similar al ejercido por la CHX, provocando reducciones significativas de la población bacteriana hasta 7 horas después su aplicación. La actividad antimicrobiana desarrollada por la CHX a los 30 minutos de su aplicación persistió hasta 7 horas después ($10,4 \times 10^6$ UFC/ml a los 30 minutos post-enjuague y $11,3 \times 10^6$ UFC/ml a las 7 horas post-enjuague); en las tomas salivales intermedias efectuadas a las 3 y 5 horas se observó un descenso de la concentración bacteriana $\geq 1 \log_{10}$.

Con la finalidad de determinar la influencia sobre la actividad antibacteriana de la CHX de otros componentes habituales de los colutorios antisépticos, Herrera et al (Herrera et al, 2001) testaron en saliva la eficacia antimicrobiana de un único enjuague (15 ml durante 1 minuto) de 4 colutorios de CHX al 0,12% con diferentes formulaciones, empleando suero salino como solución control. Los colutorios utilizados fueron: CHX+alcohol al 5%, CHX+ CCP al 0,05% sin alcohol, CHX+fluoruro sódico (NaF) sin alcohol y CHX sola. Coincidiendo con los hallazgos obtenidos *in vitro* por Jenkins et al (Jenkins et al, 1994b), el mayor efecto antibacteriano se obtuvo con la CHX con CCP, ya que provocó un descenso significativo en el número de UFC/ml de bacterias aerobias y anaerobias hasta 7 y 5 horas post-enjuague respectivamente, en comparación con el suero salino. La menor actividad antimicrobiana se observó con la asociación de CHX con NaF. En el año 2004, este mismo grupo de investigación, además de determinar la actividad antibacteriana sobre la flora salival, evaluó el efecto antihalitosis hasta 5 horas después de una única aplicación de los colutorios testados en el estudio anterior, añadiendo otra formulación basada en CHX al 0,05%+CCP al 0,05%+Zn al 0,14%. Los resultados previos fueron corroborados, ya que las combinaciones de CHX+CCP originaron el porcentaje más bajo de supervivencia de bacterias aerobias y anaerobias en saliva (6 y 10% respectivamente a la hora; 18 y 23% respectivamente a las 5 horas), seguido de la CHX+alcohol (18% de bacterias anaerobias viables a las 5 horas). Por el contrario, la formulación CHX+NaF resultó la menos eficaz (Roldán et al, 2004).

Coincidiendo con Jenkins et al (*Jenkins et al, 1994b*) y Harper et al (*Harper et al, 1995*), estos autores concluyeron que existen diferencias importantes en la actividad antibacteriana sobre la flora salival en base al principio activo con el que se combine la CHX.

✓ **Clorhexidina al 0,2%**

Se han publicado algunos trabajos en los que se investigó la actividad antimicrobiana de una única aplicación de CHX a diferentes concentraciones y volúmenes, para analizar la influencia de la dosis aplicada sobre la eficacia antibacteriana. Addy et al (*Addy et al, 1991*) estudiaron la sustantividad de 4 colutorios diferentes de CHX: CHX al 0,2 % (10 ml), CHX al 0,12% (15 ml) y 2 preparados comerciales de CHX al 0,1% (15 ml diluidos en 30 ml de agua); todos los enjuagues se efectuaron durante 1 minuto; el número de bacterias salivales se cuantificó a los 30 minutos, 1, 3, 5 y 7 horas post-enjuague. En contraste con los recuentos basales, a los 30 minutos post-enjuague las CHX al 0,2% y al 0,12% provocaron reducciones significativas de la concentración bacteriana. Esta importante actividad antimicrobiana (descenso del número de UFC $\geq 1 \log_{10}$) se observó con ambas concentraciones de CHX en las siguientes tomas salivales y persistió hasta 7 horas post-enjuague, lo que permitió a estos autores concluir que la actividad de la CHX es dosis-dependiente.

Existen numerosos estudios en los que se evaluó la sustantividad *in vivo* de la CHX al 0,2% en relación a otros antisépticos aplicados en forma de colutorios, empleando habitualmente la CHX como un control positivo. En 1976, Altonen et al (*Altonen et al, 1976*), estudiaron la actividad antimicrobiana sobre la flora salival hasta 2 horas después de la práctica de un único enjuague de 10 ml de povidona yodada al 1% y de CHX al 0,2%, tanto en sujetos sanos como en pacientes con enfermedad periodontal. Dos años más tarde, Addy y Wright (*Addy y Wright, 1978*) publicaron un estudio similar, aunque la evaluación de la sustantividad de estos antisépticos también se determinó a las 5, 7 y 24 horas después de su aplicación. En ambas series, en las diferentes tomas

salivales efectuadas a los 2, 5 y 30 minutos post-enjuague, la povidona yodada ocasionó una reducción significativa de la viabilidad bacteriana comparada con los valores basales (Altonen *et al*, 1976; Addy y Wright, 1978), aunque estos porcentajes de reducción disminuyeron hasta un 35-68% a las 2 horas post-enjuague (Altonen *et al*, 1976) y se igualaron en las tomas salivales posteriores (Addy y Wright, 1978). Por el contrario, en ambas series, la CHX se asoció a un mayor efecto antibacteriano tanto inmediato como a las 2 horas post-enjuague (descenso $\geq 1 \log_{10}$ con respecto a la población bacteriana basal) (Altonen *et al*, 1976; Addy y Wright, 1978), que se mantuvo constante hasta 7 horas después de su aplicación, pero que en un control efectuado a las 24 horas había perdido su eficacia, observándose un completo restablecimiento de la flora salival (Addy y Wright, 1978).

Salem *et al* (Salem *et al*, 1987) analizaron las propiedades antimicrobianas de 2 aminas alifáticas (tetradecilamina y hexadecilamina al 0,5%) y de la CHX al 0,2%. Todos los colutorios se aplicaron en enjuagues de 10 ml durante 2 minutos. La sustantividad se determinó 1, 3, 24 y 48 horas post-enjuague. Los resultados obtenidos en la primera muestra post-enjuague revelaron una mayor actividad antimicrobiana de la tetradecilamina con respecto a la hexadecilamina, con un descenso de un 90% en la concentración de bacterias aerobias y anaerobias estrictas, así como de *Streptococcus* spp.. A las 3 horas post-enjuague, con la tetradecilamina se observó un incremento de un 80, 68 y 87% de aerobios, anaerobios y *Streptococcus* del grupo *viridans* respectivamente, con respecto a las concentraciones basales, mientras que con la hexadecilamina se constató una recuperación total de la flora salival. Con respecto a la CHX, 1 hora después de efectuar el enjuague el conteo de bacterias aerobias y anaerobias había descendido aproximadamente un 90% y el de estreptococos un 94%, manteniéndose este efecto antibacteriano hasta 3 horas después del enjuague y recuperando los valores basales a las 24 horas; este resultado concuerda con el descrito en investigaciones previas (Addy y Wright, 1978). Curiosamente, en las muestras salivales recogidas a las 24 y 48 horas post-enjuague se detectó un aumento progresivo

del número de *Streptococcus viridans*, independientemente del antiséptico aplicado (aunque este efecto no fue tan acentuado con la CHX).

En 1991, Jenkins et al (*Jenkins et al, 1991*) cuantificaron la flora bacteriana salival después de una única aplicación de 3 colutorios diferentes (10 ml durante 1 minuto): triclosán al 0,2%, laurilsulfato sódico al 1% y CHX al 0,2%. Las 3 formulaciones provocaron reducciones significativas de la flora salival con respecto a los valores basales, que en el caso del triclosán se mantuvieron hasta 3 horas después del enjuague (aunque el descenso fue $\geq 1 \log_{10}$ sólo hasta a los 30 minutos), y con el laurilsulfato sódico y la CHX se prolongaron hasta 7 horas (el descenso fue $\geq 1 \log_{10}$ hasta las 5 y 7 horas post-enjuague respectivamente). Los incrementos de las concentraciones bacterianas con respecto a los valores obtenidos a los 30 minutos post-enjuague con triclosán y laurilsulfato sódico, fueron progresivos en todas las tomas salivales posteriores, indicando la existencia de un efecto de "recrecimiento"; por el contrario, coincidiendo con estudios previos (*Addy y Wright, 1978*), este efecto no se observó con la CHX, ya que su eficacia antibacteriana se mantuvo constante hasta las 7 horas post-enjuague. Consecuentemente, al comparar la actividad de los 3 enjuagues, la CHX resultó significativamente más efectiva que el triclosán (a partir de la primera hora) y que el laurilsulfato sódico (a partir de la tercera hora).

Ese mismo año, se publicó otro trabajo en el que se determinó el efecto antibacteriano sobre la flora salival de un único enjuague de taurolidina al 2% (Taurolin®) -una solución de irrigación quirúrgica para el control de las infecciones abdominales- y de CHX al 0,2%, aplicando en ambos casos un volumen de 10 ml durante 1 minuto (*Reynolds et al, 1991*). Se utilizó suero salino como solución control y se recogieron muestras de saliva a los 30 minutos, 1, 3, 5 y 7 horas. A los 30 minutos post-enjuague, tanto la taurolidina como la CHX provocaron una reducción significativa de la concentración bacteriana con respecto a los niveles basales ($\geq 1 \log_{10}$), que se mantuvieron hasta 5 horas después para la taurolidina y hasta las 7 horas en el caso de

la CHX. Al comparar ambos antisépticos, la CHX se asoció a una mayor reducción en la concentración bacteriana que la taurolidina (por ejemplo, a las 5 horas post-enjuague, la carga bacteriana resultó 20 y 7 veces respectivamente menor que la basal).

Simonsson et al (*Simonsson et al, 1991*) evaluaron el efecto antibacteriano del delmopinol y la CHX sobre la flora salival (ambos antisépticos a una concentración del 0,2%). Las muestras salivales se recogieron 1, 5, 15, 30 y 60 minutos después de efectuar un único enjuague (10 ml durante 1 minuto). Un año más tarde, se efectuó el mismo ensayo clínico, pero prolongando la recogida de muestras hasta 7 horas después de la aplicación de ambos colutorios (*Moran et al, 1992*). Los resultados sobre el efecto antibacteriano inmediato del delmopinol son contradictorios entre ambas series; en el estudio de Simonsson et al (*Simonsson et al, 1991*), el delmopinol no condicionó la flora bacteriana 1 minuto después del enjuague, mientras que Moran et al (*Moran et al, 1992*) observaron un descenso significativo de la población bacteriana a los 30 minutos después de su aplicación en contraste con los valores basales (de 110×10^6 UFC/ml descendió a 50×10^6 UFC/ml). Simonsson et al (*Simonsson et al, 1991*) constataron que la "actividad antibacteriana residual" de la CHX persistía como mínimo hasta 60 minutos después de su empleo, ya que ésta provocó una disminución significativa (superior al 90%) del número de UFC/ml en todas las tomas. Esta actividad antibacteriana de la CHX se prolongó hasta las 7 horas post-enjuague (con una reducción $\geq 1 \log_{10}$), demostrando un mayor efecto antibacteriano en todas las muestras salivales obtenidas con respecto al colutorio control y al delmopinol (*Moran et al, 1992*). En base a estos resultados, aunque se desconoce con exactitud el mecanismo de acción del delmopinol, las propiedades antiplaca y antigingivitis mostradas por este antiséptico se atribuyen a una acción de "desestructuración" de la matriz de la placa bacteriana, más que a una actividad antimicrobiana *per se* (*Moran et al, 1992*).

Jenkins et al (*Jenkins et al, 1994b*), evaluaron el efecto antibacteriano durante 7 horas de un único enjuague (aplicado durante 1 minuto) de 5 colutorios, sobre la flora

salival de voluntarios sanos. Los principios activos utilizados fueron: triclosán, cloruro de zinc, aceites esenciales, 2 preparados comerciales con CCP y CHX al 0,2%. Exceptuando el enjuague control con suero salino, todos los colutorios provocaron un efecto antibacteriano significativo a los 30 minutos post-enjuague con respecto a la concentración bacteriana basal. Todos los colutorios, excepto uno de los que contenían CCP, provocaron un descenso significativo en la concentración bacteriana hasta las 5-7 horas post-aplicación; el triclosán, los aceites esenciales y uno de los preparados con CCP exhibieron una actividad antibacteriana similar. Las diferencias detectadas al contrastar los 2 productos con CCP, confirmaron la participación de otros ingredientes de la formulación en su efecto antimicrobiano, tal y como posteriormente confirmarían otros autores (*Harper et al, 1995*). En relación a la acción de la CHX, aunque los resultados se mantuvieron significativos hasta las 7 horas post-enjuague, se apreció una recuperación progresiva de la población bacteriana, con niveles similares a los detectados a los 30 minutos; este resultado difiere del obtenido previamente por otros investigadores (*Addy et al, 1991*). El mayor efecto antibacteriano de los colutorios testados en todas las tomas salivales post-enjuague se atribuyó a la CHX.

Moran et al (*Moran et al, 1995*), evaluaron la sustentividad sobre la flora salival de 3 colutorios que contenían peroxiborato, peroxicarbonato y CHX al 0,2%, hasta 7 horas después de una única aplicación durante 1 minuto. El peroxiborato y el peroxicarbonato mostraron un efecto antibacteriano similar, reduciendo significativamente la concentración bacteriana salival hasta 5 horas después de su aplicación, en comparación con los niveles basales (los niveles bacterianos disminuyeron de 160×10^6 UFC/ml a 80×10^6 UFC/ml). La CHX al 0,2% ocasionó un descenso significativo de un 90% en la vitalidad bacteriana, que se prolongó hasta las 7 horas post-enjuague (de 230×10^6 UFC/ml en la muestra basal a 20×10^6 UFC/ml), confirmando su importante sustentividad.

Harper et al (*Harper et al, 1995*) también evaluaron la sustentividad de varios antisépticos hasta 7 horas después de efectuar un único enjuague durante 1 minuto con: diferentes concentraciones y volúmenes de CHX (0,2%/10 ml, 2 preparados al 0,12%/15 ml, y 0,1%/15 ml diluidos en 30 ml de agua), hexetidina al 0,2% (15 ml) y CCP al 0,005% (15 ml). En contraste con un enjuague con suero salino, la mayor actividad antibacteriana a los 30 minutos post-enjuague la presentaron la CHX al 0,2% y los 2 preparados comerciales al 0,12%. Estas diferencias significativas persistieron hasta 5 horas post-enjuague con los 3 colutorios de CHX, aunque a las 7 horas este efecto solo se observó con la CHX al 0,2% y con una de las CHX al 0,12% (Prexidine®). Coincidiendo con Addy et al (*Addy et al, 1991*), estos autores ratificaron que la actividad antibacteriana de la CHX es dosis-dependiente y también sugirieron que esta actividad no sólo se encuentra condicionada por el principio activo, sino que también es importante considerar la participación de otros agentes incluidos en la formulación.

Para determinar si la combinación de CHX al 0,2% con otros principios activos podía alterar su actividad antimicrobiana, Dahlen (*Dahlen, 1984*) comparó su eficacia frente a: CHX+agente oxidante, CHX+peróxido de hidrógeno al 3%, CHX+CHX y CHX+suero salino. Después de efectuar un único enjuague de 1 minuto con cada combinación, se recogieron muestras de saliva a los 10 minutos, 1 y 24 horas post-aplicación. Todas las combinaciones ocasionaron una reducción bacteriana significativa (de $\geq 1 \log_{10}$) en las 2 primeras determinaciones (10 minutos y 1 hora post-enjuague), excepto la asociación CHX+agente oxidante. La aplicación de CHX al 0,2% combinada con CHX (duplicando así la dosis del principio activo) originó el mayor efecto antibacteriano, con descensos de $1,9 \log_{10}$ UFC/ml a los 10 minutos y de $1,4 \log_{10}$ UFC/ml a la hora. A las 24 horas post-enjuague se observó una recuperación de la flora salival con todas las combinaciones de CHX empleadas.

1.4.3. Variables metodológicas

Después de estudiar en profundidad numerosos trabajos en los que se evaluó la sustantividad de la CHX *in vivo* sobre la flora salival, encontramos importantes diferencias metodológicas que sin duda pueden haber condicionado sus resultados y por lo tanto consideramos que merecen ser comentadas.

La mayoría de estos estudios se plantearon como ensayos clínicos cruzados y randomizados, en los que los mismos participantes se sometieron a la acción de una solución control (suero salino o agua estéril) y una de CHX, y en ocasiones a la de otros antisépticos. Generalmente, el tamaño muestral de estos trabajos osciló entre 10 y 20 pacientes (Addy *et al*, 1991; Jenkins *et al*, 1991; Buckner *et al*, 1994; Harper *et al*, 1995). Los participantes de la mayoría de estas series eran voluntarios sanos sin afectación gingival (Jenkins *et al*, 1994b; Moran *et al*, 1995), aunque en algunas se incluyeron exclusivamente pacientes con enfermedad periodontal (Veksler *et al*, 1991), y en otras se compararon sujetos periodontalmente sanos y enfermos (Altonen *et al*, 1976). Ocasionalmente, en algunos trabajos, el efecto antibacteriano derivado del empleo de la CHX se cuantificó durante la práctica de un procedimiento odontológico (Veksler *et al*, 1991). Prácticamente todos los autores especificaron el tiempo que debía transcurrir como “periodo de descanso” para la aplicación de las diferentes formulaciones, que generalmente osciló entre 2 y 9 días (Addy *et al*, 1989; Jenkins *et al*, 1990b; Buckner *et al*, 1994; Jenkins *et al*, 1994b; Rosin *et al*, 2001; Herrera *et al*, 2003; Sreenivasan y Gittins, 2004a; Roldán *et al* 2004).

En la mayoría de los estudios publicados, el análisis microbiológico se efectuó sobre muestras de saliva no estimulada (Addy *et al*, 1989; Addy *et al*, 1991; Buckner *et al*, 1994; Veksler *et al*, 1991; Jenkins *et al*, 1994b; Elworthy *et al*, 1996; Herrera *et al*, 2001; Sreenivasan y Gittins, 2004a), aunque en algunas series se empleó saliva estimulada obtenida después de masticar durante unos minutos una tableta de parafina (Schjött *et al*, 1970; Dahlen, 1984), e incluso en otras, las muestras salivales post-enjuague de CHX se

obtuvieron después de aclarar la boca con agua o suero salino (*Reynolds et al, 1991; Balbuena et al, 1998; Sreenivasan y Gittins, 2004a*).

La recogida de una muestra salival en condiciones basales previa a la aplicación del antiséptico resultó imprescindible para poder analizar su eficacia antibacteriana, pero detectamos una gran variabilidad en el número de tomas posteriores a la realización del enjuague. Así, para evaluar el efecto antibacteriano inmediato, hay investigadores que recogieron las muestras 1, 5 ó 10 minutos post-enjuague (*Dahlen, 1984; Veksler et al, 1991; Buckner et al, 1994; Herrera et al, 2003*), aunque en la mayoría de los trabajos se determinó a los 30 minutos post-enjuague (*Addy et al, 1991; Jenkins et al, 1991; Reynolds et al, 1991; Harper et al, 1995; Moran et al, 1995; Elworthy et al, 1996*).

Para el estudio de la sustentividad de un antiséptico, se efectuaron entre 1 y 4 determinaciones, que variaron entre 1 y 7 horas post-enjuague (*Addy et al, 1989; Addy et al, 1991; Buckner et al, 1994; Jenkins et al, 1994b; Herrera et al, 2001; Sreenivasan y Gittins, 2004a*). Después del trabajo publicado por Schiött et al (*Schiött et al, 1970*) en 1970, en el que se investigó la sustentividad de la CHX a las 12 y 14 horas después de su aplicación, han sido escasas las series en las que se realizaran determinaciones posteriores a las 7 horas y generalmente en éstas se analizaron muestras recogidas a las 24 horas post-aplicación (*Addy y Wright, 1978; Dahlen, 1984*).

En la mayoría de los trabajos se especificaron algunas instrucciones que debían de cumplir los participantes durante la fase experimental, como evitar la práctica de técnicas de higiene oral (incluyendo las horas previas al inicio del experimento) (*Herrera et al, 2003; Sreenivasan y Gittins, 2004a; Roldán et al, 2004*), y la ingesta de comida y líquidos (*Sreenivasan y Gittins, 2004a*). Sin embargo, hay autores (*Herrera et al, 2003; Roldán et al, 2004*) que admitían el consumo de agua durante la fase experimental, e incluso algunos permitieron además efectuar una comida en el intervalo entre las 5 y las 7 horas post-enjuague (*Herrera et al, 2003*).

A pesar de haberse confirmado la necesidad de utilizar inactivadores para evaluar la actividad antimicrobiana de los antisépticos (*Sheikh, 1981; Rotter et al, 1988; Kampf et al, 2005*), se han publicado pocos estudios sobre CHX y flora oral en cuya metodología se haya especificado el empleo de estos agentes neutralizadores (*Buckner et al, 1994; Pitten y Kramer, 1999; De Albuquerque et al, 2004*). En la mayoría de las series, el procesamiento de la muestra se realizó inmediatamente (*Addy et al, 1989; Jenkins et al, 1994b; Elworthy et al, 1996*), a los 30 minutos (*Herrera et al, 2003*) o hasta 1 hora después de su recogida (*Fernandes-Naglik et al, 2001*), aunque en muchos estudios no se detalló este aspecto metodológico.

Para la cuantificación de los recuentos bacterianos es necesario efectuar diluciones seriadas de la muestra salival, constatándose notables diferencias en el número de diluciones realizadas entre las diferentes series. Hay autores que señalan haber efectuado varias diluciones -aunque no especifican el número- (*Altonen et al, 1976; Balbuena et al, 1998; Sreenivasan y Gittins, 2004a*), mientras que otros sólo practicaron 1 (1/1.000 o 1/10.000) (*Moran et al, 1992; Elworthy et al, 1996*) ó 2 diluciones (1/10.000 y 1/100.000) (*Addy et al, 1991; Reynolds et al, 1991; Jenkins et al, 1994b*). Los medios de cultivo y los tiempos de incubación empleados resultaron bastante heterogéneos y estaban condicionados por el tipo de población bacteriana que se deseaba cultivar: aerobia y anaerobia (*Veksler et al, 1991; Buckner et al, 1994; Balbuena et al, 1998*), exclusivamente anaerobia (*Addy et al, 1989; Elworthy et al, 1996; Sreenivasan y Gittins, 2004a*), o determinadas bacterias anaerobias como las productoras de sulfuro de hidrógeno (*Sreenivasan y Gittins, 2004a*). Los resultados obtenidos en este tipo de estudios se basan en el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) y generalmente se expresan como logaritmos en base 10 ($\log_{10}$), con la finalidad de que los valores obtenidos sigan una distribución normal (*Moran et al, 1988; Jenkins et al, 1991; Rosin et al, 2002*).

1.4.4. Otros factores potencialmente condicionantes

La CHX se presenta habitualmente en 2 concentraciones -0,12% y 0,2%-, pero se ha sugerido que la dosis total diaria de CHX administrada puede tener mayor importancia que su concentración (*Bascones y Manso, 1994*). Desde el punto de vista clínico, *Segreto et al (Segreto et al, 1986)* compararon durante 3 meses la eficacia de 2 colutorios de CHX con 2 concentraciones diferentes, para prevenir la gingivitis y el acúmulo de placa bacteriana. Emplearon CHX al 0,2% porque era el estándar internacional y al 0,12% porque previamente se habían publicado 3 estudios en los que se obtuvieron resultados similares con la CHX al 0,12% y al 0,2% en la reducción de la gingivitis (*Bay, 1978; Briner y Leonard, 1980; Lang et al, 1982*). Los 597 participantes se dividieron en 3 grupos de tratamiento en base al sexo, edad y severidad de la gingivitis inicial. Después de un minucioso examen y de una profilaxis basal, los voluntarios se enjuagaron 2 veces diarias durante 30 segundos con 15 ml de un colutorio de CHX al 0,12%, al 0,2% o con un colutorio placebo. Los participantes mantuvieron sus hábitos de higiene oral y recibieron para ello un dentífrico de fluoruro de sodio y un cepillo blando. A los 3 meses, los 2 grupos que habían recibido colutorios de CHX demostraron significativamente menos gingivitis y acúmulo de placa que los del grupo placebo. Además, no se encontraron ventajas significativas del colutorio de CHX al 0,2% sobre el enjuague al 0,12% y concluyeron que este último, enjuagándose 2 veces al día, ofrecía los mismos beneficios clínicos que la CHX a mayor concentración. Las observaciones de *Segreto et al (Segreto et al, 1986)* corroboradas posteriormente por *Jenkins et al (Jenkins et al, 1994b)* sobre la actividad antibacteriana de la CHX *in vivo*, indicaban que ésta era dosis dependiente.

Quirynen et al (Quirynen et al, 2001) señalaron que la cantidad de CHX administrada diariamente utilizando 3 formulaciones a base de CHX al 0,12% combinada con NaF, alcohol y CCP era similar (36, 36 y 37 mg respectivamente); esta dosis resultó inferior a la aportada por un colutorio de CHX al 0,2% (46 mg); sin embargo, desde el punto de vista clínico, la CHX al 0,12% con alcohol y con CCP resultaron tan eficaces como la CHX al 0,2%. Según *Quirynen et al (Quirynen et al, 2001)*, sus resultados podían

indicar saturación o, como sugirieron Cancro et al (*Cancro et al, 1973; Cancro et al, 1974*) y Jenkins et al (*Jenkins et al, 1994a*), que el efecto antiplaca es dosis dependiente con una meseta de aproximadamente 30-40 mg de CHX al día.

Según Addy et al (*Addy et al, 1991*), dentro del estrecho rango de dosis de 15-20 mg de CHX por enjuague, podría variarse la concentración -reduciéndola- y obtener resultados similares, si se mantienen las dosis proporcionadas. Esta dosis eficaz para Segreto et al (*Segreto et al, 1986*) se establece en un mínimo de 18 mg de CHX por enjuague. En general, desde el punto de vista clínico, parece que la CHX al 0,2% y al 0,12% son comparables en eficacia y tolerancia, cuando se administran volúmenes de 10 ml y 15 ml respectivamente, lo que equivale a una dosis total de CHX de 20 mg y 18 mg respectivamente.

Como la CHX es un antimicrobiano de uso tópico, se ha sugerido que la duración del enjuague puede condicionar el contacto inicial de la formulación empleada con el ecosistema oral, así como el grado de cumplimiento de la prescripción. En 1986, Segreto et al (*Segreto et al, 1986*), para comparar los efectos antigingivitis y antiplaca de 2 concentraciones diferentes de CHX, efectuaron enjuagues simples de 30 segundos. Este mismo tiempo fue el recomendado por Buckner et al (*Buckner et al, 1994*) para comprobar la eficacia antibacteriana sobre la flora salival de un enjuague simple de CHX al 0,12% y por Sreenivasan y Gittins (*Sreenivasan y Gittins, 2004a*) en un trabajo de características similares sobre la flora salival y lingual. Sin embargo, la mayoría de los investigadores que efectúan este tipo de estudios, aplican enjuagues simples de 1 minuto de duración (*Schiött et al, 1970; Addy et al, 1991; Jenkins et al, 1994b; Elworthy et al, 1996; Herrera et al, 2001; König et al, 2002*). Aunque algunos autores insinúan que el tiempo de duración del enjuague tiene una importancia relativa, especialmente en términos de acción antiplaca (*Keijser et al, 2003; Martínez Lizán et al, 2003*), otros sostienen que siempre que se utilicen las concentraciones y volúmenes adecuados, el tiempo de enjuague no es significativo, aunque un tiempo de aplicación corto mejora el

cumplimento y produce menos tinciones dentarias (*Calsina-Gomis y Serrano-Granger, 2005*)

En la literatura existen muy pocas referencias sobre otros factores que podrían teóricamente condicionar la actividad de la CHX. Por ejemplo, con respecto a la forma de presentación, en general se acepta que la distribución del principio activo es más homogénea con el colutorio (*Martens et al, 1997*) y que la dosis aplicada es mayor que cuando se administra mediante gasas o en spray (*Stoeken et al, 2007*).



1.5. Bibliografía

- Aitken C, Cannell H, Sefton AM et al. Comparative efficacy of oral doses of clindamycin and erythromycin in the prevention of bacteraemia. *Br Dent J* 1995; 178: 418-22.
- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. The effect of some chlorhexidine-containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 90-93.
- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. Toothpastes containing 0.3% and 0.5% triclosan. II. Effects of single brushings on salivary bacterial counts. *Am J Dent* 1989; 2: 215-219.
- Addy M, Moran J. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. *Periodontol 2000* 1997; 15: 52-54.
- Addy M, Wright R. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* antibacterial properties of povidone iodine and chlorhexidine gluconate mouthrinses. *J Clin Periodontol* 1978; 5: 198-205.
- Addy M. Hibitane in the treatment of aphthous ulceration. *J Clin Periodontol* 1977; 4: 108-116.
- Albertos JM, Junquera LM, Albertos MT, Olay S, López-Arranz E. La clorhexidina. Perspectiva actual. *Anales de Odontoestomatología* 1996; 5: 217-223.
- Albertos JM, Junquera LM, Albertos MT, Olay S, López-Arranz E. La clorhexidina en pacientes especiales. *Revista Europea de Odonto-Estomatología* 1997; 6: 393-396.
- Al-Tannir MA, Goodman HS. A review of chlorhexidine and its use in special populations. *Spec Care Dentist* 1994; 14: 116-122.
- Altonen M, Saxén L, Kosunen T, Ainamo J. Effect of two antimicrobial rinses and oral prophylaxis on preoperative degerming of saliva. *Int J Oral Surg* 1976; 5: 276-284.
- Anderson GB, Bowden J, Morrison EC, Caffesse RG. Clinical effects of chlorhexidine mouthwashes on patients undergoing orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997; 111: 606-612.
- Arévalo JM, Arribas JL, Calbo L, Hernández MJ, Lizán M, Herruzco R. Guía del grupo de trabajo sobre desinfectantes y antisépticos. Revisión 1998. *Medicina Preventiva* 1998; 4: 38-43.
- Arikan A, Kulak Y, Kadir T. Comparison of different treatment methods for localized and generalized simple denture stomatitis. *J Oral Rehabil* 1995; 22: 365-369.
- Baca P, LLodra JC, Junco P. Antisépticos y desinfectantes en odontoestomatología. En: Liébana J y Bagán JV, eds. *Terapéutica antimicrobiana en odontoestomatología*. Madrid: IM&C, 1996; 175-187.

- Baker KA. The role of dental professionals and the patient in plaque control. *Periodontol* 2000 1995; 8: 108-113.
- Balbuena L, Stambaugh KI, Ramirez SG, Yeager C. Effects of topical oral antiseptic rinses on bacterial counts of saliva in healthy human subjects. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 118: 625-629.
- Barasch A, Safford MM, Dapkute-Marcus I, Fine DH. Efficacy of chlorhexidine gluconate rinse for treatment and prevention of oral candidiasis in HIV-infected children: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 204-207.
- Barkvoll P, Attramadal A. Effect of nystatin and chlorhexidine digluconate on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 67: 279-281.
- Barrons RW. Treatment strategies for recurrent oral aphthous ulcers. *Am J Health Syst Pharm* 2001; 58: 41-50.
- Barros VMR, Ito YZ, Azevedo RVP, Morello D, Rosateli PA. Estudo comparativo da eficiência de três métodos de anti-sepsia intrabucal na redução do número de estreptococos do sulco gengival. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1998; 12: 201-206.
- Bascones A, Manso FJ. Clorhexidina en Odontoestomatología: conceptos actuales y revisión de la literatura. *Avances en Odontoestomatología* 1994; 10: 685-708.
- Bascones A, Morante S. Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Av Periodon Implantol* 2006; 18: 31-59.
- Bay LM. Effect of toothbrushing with different concentrations of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis. *J Dent Res* 1978; 57: 181-185.
- Beazley VC, Thrane P, Rölla G. Effect of mouthrinses with SnF₂, LaCl₃, NaF and chlorhexidine on the amount of lipoteichoic acid formed in plaque. *Scand J Dent Res* 1980; 88: 193-200.
- Ben-Yaakov D, Friedman M, Hirschfeld Z, Gedalia I. Fluoride enhancement of chlorhexidine uptake by hydroxyapatite and enamel powders. *J Oral Rehabil* 1984; 11: 65-70.
- Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 7-9.
- Bonesvoll P, Lökken P, Rölla G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouthrinses. *Arch Oral Biol* 1974a; 19: 1025-1029.
- Bonesvoll P, Lokken P, Rolla G, Paus PN. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouthrinses. *Arch Oral Biol* 1974 b; 19: 209-212.
- Bonesvoll P, Olsen I. Influence of teeth, plaque and dentures on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *J Clin Periodontol* 1974; 1: 214-221.

- Brightman LJ, Terezhalmay GT, Greenwell H, Jacobs M, Enlow DH. The effects of a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthrinse on orthodontic patients aged 11 through 17 with established gingivitis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991; 100: 324-329.
- Briner W, Buckner R, Rebitski G et al. Effect of two years use of 0.12% chlorhexidine on plaque bacteria. *J Dent Res* 1989; 68: 1719-1721.
- Briner WW, Kayrouz GA, Chanak MX. Comparative antimicrobial effectiveness of a substantive (0.12% chlorhexidine) and a nonsubstantive (phenolic) mouthrinse *in vivo* and *in vitro*. *Compendium* 1994; 15: 1158, 1160, 1162.
- Briner WW, Leonard GJ. Antiplaque and antigingivitis effects as a function of chlorhexidine dose in beagles. *J Dent Res* 1980; 59: 536.
- Buckner RY, Kayrouz GA, Briner W. Reduction of oral microbes by a single chlorhexidine rinse. *Compendium* 1994; 15: 512, 514, 516.
- Budtz-Jørgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 61-69.
- Calsina-Gomis G, Serrano-Granger J. ¿Existen realmente diferencias clínicas entre las distintas concentraciones de clorhexidina?. Comparación de colutorios. *RCOE* 2005; 10: 457-464.
- Cancro LP, Klein K, Picozzi A. Dose response of chlorhexidine gluconate in a model *in vivo* plaque system. *J Dent Res* 1973; 52: 659.
- Cancro LP, Paulovich DB, Bolton S, Picozzi A. Dose response of chlorhexidine gluconate in a model *in vivo* plaque system. *J Dent Res* 1974; 53: 765.
- Carretero Peláez MA, Esparza Gómez GC, Figuero Ruiz E, Cerero Lapiedra R. Alcohol-containing mouthwashes and oral cancer. Critical analysis of literature. *Med Oral* 2004; 9: 120-123.
- Caso A, Hung LK, Beirne OR. Prevention of alveolar osteitis with chlorhexidine: a meta-analytic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99: 155-159.
- Charles CH, Pan PC, Sturdivant L, Vincent JW. *In vivo* antimicrobial activity of an essential oil-containing mouthrinse on interproximal plaque bacteria. *J Clin Dent* 2000; 11: 94-97.
- Chawner JA, Gilbert P. A comparative study of the bactericidal and growth inhibitory activities of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine. *J Appl Bacteriol* 1989a; 66: 243-252.
- Chawner JA, Gilbert P. Interaction of the bisbiguanides chlorhexidine and alexidine with phospholipid-vesicles: evidence for separate modes of action. *J Appl Bacteriol* 1989b; 66: 253-258.

- Collaert B, Edwardsson S, Attstrom R, Hase JC, Astrom M, Mover R. Rinsing with delmopinol 0.2% and chlorhexidine 0.2%: short-term effect on salivary microbiology, plaque, and gingivitis. *J Periodontol* 1992; 63: 618-625.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 435-464.
- Dahlen G. Effect of antimicrobial mouthrinses on salivary microflora in healthy subjects. *Scand J Dent Res* 1984; 92: 38-42.
- Davies A. The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res* 1973; 12 (Suppl): 68-75.
- Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother* 1954; 9: 192-196.
- Dawes C. Salivary clearance and its effects on oral health. In: Edgar M, Dawes C, O'Mullane D, eds. *Saliva and oral health*. 3rd ed. London: British Dental Association, 2004; 71-85.
- De Albuquerque RF Jr, Head TW, Mian H et al. Reduction of salivary *S. aureus* and *mutans* group *streptococci* by a preprocedural chlorhexidine rinse and maximal inhibitory dilutions of chlorhexidine and cetylpyridinium. *Quintessence Int* 2004; 35: 635-640.
- De Freitas CS, Diniz HF, Gomes JB, Sinisterra RD, Cortés ME. Evaluation of the substantivity of chlorhexidine in association with sodium fluoride *in vitro*. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17: 78-81.
- Dennison DK, Meredith GM, Shillitoe EJ, Caffesse RG. The antiviral spectrum of Listerine antiseptic. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79: 442-448.
- Do Amorin CV, Aun CE, Alves MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Braz Oral Res* 2004; 18: 242-246.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193.
- Ellepola AN, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis* 2001; 7: 11-17.
- Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11: 172-198.
- Ellepola ANB, Samaranayake LP. *In vitro* post-antifungal effect (PAFE) elicited by chlorhexidine gluconate on oral isolates of *Candida albicans*. *Microb Ecol Health Dis* 1999; 11: 143-148.

- Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol* 1996; 67: 572-576.
- Emilson CG, Fornell J. Effect of toothbrushing with chlorhexidine gel on salivary microflora, oral hygiene, and caries. *Scand J Dent Res* 1976; 84: 308-319.
- Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 255-265.
- Enrile de Rojas FJ, Santos Alemany A, Carrasquer Burguera A, Diz Dios P. Aplicaciones clínicas adicionales de colutorios antisépticos. *Periodoncia* 2006; 16: 95-104.
- Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1986; 112: 863-869.
- Felo A, Shibly O, Ciancio SG, Lauciello FR, Ho A. Effects of subgingival chlorhexidine irrigation on peri-implant maintenance. *Am J Dent* 1997; 10: 107-110.
- Fernandes-Naglik L, Downes J, Shirlaw P et al. The clinical and microbiological effects of a novel acidified sodium chlorite mouthrinse on oral bacterial mucosal infections. *Oral Dis* 2001; 7: 276-280.
- Ferretti GA, Raybould TP, Brown AT et al. Chlorhexidine prophylaxis for chemotherapy- and radiotherapy-induced stomatitis: a randomized double-blind trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69: 331-338.
- Filoché SK, Coleman MJ, Angker L, Sissons CH. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J Microbiol Methods* 2007; 69: 489-496.
- Fine DH, Furgang D, Barnett ML. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 697-700.
- Fine DH, Furgang D, Korik I, Olshan A, Barnett ML, Vincent JW. Reduction of viable bacteria in dental aerosols by preprocedural rinsing with an antiseptic mouthrinse. *Am J Dent* 1993; 6: 219-221.
- Fine DH, Letizia J, Mandel ID. The effect of rinsing with Listerine antiseptic on the properties of developing dental plaque. *J Clin Periodontol* 1985; 12: 660-666.
- Foster EW. Celsus concerning the teeth. *Dent Cosmos* 1879; 21: 235-241.
- Franch M, Pascual A, Santos A. Colutorios en periodoncia. Parte II. *Archivos de Odontoestomatología* 2005; 21: 471-487.
- Franco CF, Pataro AL, Souza LCR, Santos VR, Cortés ME, Sinisterra RD. *In vitro* effects of a chlorhexidine controlled delivery system. *Artif Organs* 2003; 27: 486-491.
- García Pola, MJ. Formulación Magistral en Odontoestomatología. Madrid: International Marketing & Communication y Smithkline Beecham, 1997.

- Gehlen I, Netuschil L, Berg R, Reich E, Katsaros C. The influence of a 0.2% chlorhexidine mouthrinse on plaque regrowth in orthodontic patients. A randomized prospective study. Part I: clinical parameters. *J Orofac Orthop* 2000a; 61: 54-62.
- Gehlen I, Netuschil L, Georg T, Reich E, Berg R, Katsaros C. The influence of a 0.2% chlorhexidine mouthrinse on plaque regrowth in orthodontic patients. A randomized prospective study. Part II: bacteriological parameters. *J Orofac Orthop* 2000b; 61: 138-148.
- Giertsen E, Scheie AA. Effects of mouthrinses with chlorhexidine and zinc ions combined with fluoride on the viability and glycolytic activity of dental plaque. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: 306-312.
- Giertsen E, Scheie AA. *In vivo* effects of fluoride, chlorhexidine and zinc ions on acid formation by dental plaque and salivary *mutans streptococcus* counts in patients with irradiation-induced xerostomia. *Eur J Cancer B (Oral Oncol)* 1993; 29: 307-312.
- Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* 2005; 99: 703-715.
- Gjerme P, Bonesvoll P, Hjeljord LG, Rølla G. Influence of variation of pH of chlorhexidine mouthrinses on oral retention and plaque-inhibiting effect. *Caries Res* 1975; 9: 74-82.
- Gjerme P, Bonesvoll P, Rølla G. Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 1031-1034.
- Gjerme P. Chlorhexidine and related compounds. *J Dent Res* 1989; 68: 1602-1608.
- Gjerme P. Some aspects of drug dynamics as related to oral soft tissue. *J Dent Res* 1975; 54: 844-856.
- Goldstein EJC, Citron DM, Warren Y et al. *In vitro* activities of iodonium salts against oral and dental anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2766-2770.
- González J. La Odontoestomatología durante el Renacimiento. En: Bascones A, ed. Tratado de Odontología. Madrid: Trigo Ediciones, S.L., 1998a; 949-955.
- González J. La Odontoestomatología en el Mundo Clásico En: Bascones A, ed. Tratado de Odontología. Madrid: Trigo Ediciones, S.L., 1998b; 929-935.
- González J. La Odontoestomatología en la Prehistoria. En: Bascones A, ed. Tratado de Odontología. Madrid: Trigo Ediciones, S.L., 1998c; 913-918
- González J. La Odontoestomatología en las grandes Civilizaciones Antiguas. En: Bascones A, ed. Tratado de Odontología. Madrid: Trigo Ediciones, S.L., 1998d; 919-927.
- González J. La Odontoestomatología Islámica y la Odontoestomatología en la Edad Media Cristiana. En: Bascones A, ed. Tratado de Odontología. Madrid: Trigo Ediciones, S.L., 1998e; 937-947.

- Grossman E, Reiter G, Sturzenberger OP et al. Six month study of effects of a chlorhexidine mouthrinse on gingivitis in adults. *J Periodontol Res* 1986; 21: 33-43.
- Harper PR, Milsom S, Wade W, Addy M, Moran J, Newcombe RG. An approach to efficacy screening of mouthrinses: studies on a group of French products (II). Inhibition of salivary bacteria and plaque *in vivo*. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 723-727.
- Hase JC, Edwardsson S, Rundegren J, Attstrom R, Kelty E. 6-month use of 0.2% delmopinol hydrochloride in comparison with 0.2% chlorhexidine digluconate and placebo (II). Effect on plaque and salivary microflora. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 841-849.
- Haytac MC, Dogan MC, Antmen B. The results of a preventive dental program for pediatric patients with hematologic malignancies. *Oral Health Prev Dent* 2004; 2: 59-65.
- Heitz F, Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Effects of post-surgical cleansing protocols on early plaque control in periodontal and/or periimplant wound healing. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 1012-1018.
- Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontol Res* 1973; 12: 61-67.
- Herrera D, Roldán S, Santacruz I, O'Connor A, Sanz M. Actividad antimicrobiana en saliva de cuatro colutorios con clorhexidina. *Periodoncia* 2001; 11: 193-202.
- Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 307-314.
- Herrera D, Serrano-Granger J. La placa dental como biofilm. ¿Cómo eliminarla? *RCOE* 2005; 10: 431-439.
- Heyden G, Widmalm SE, Arwill T, Hedegard B. The effects of chlorhexidine on the oral mucosa in patients with partial or complete dentures. Twelve case reports. *Sven Tandlak Tidskr* 1971; 64: 239-246.
- Hjeljord LG, Rolla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. *J Periodontol Res* 1973; 12 (Suppl): 11-16.
- 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 Investig* 2001; 5: 89-95.
- Hoffmann-Axthelm W. History of Dentistry. Chicago: Quintessence Publ. Co., 1981.
- Hugo WB, Longworth AR. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol* 1966; 18: 569-578.

- Hugo WB. Disinfection mechanisms. In: Rusell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, eds. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford: Blackwell, 1992; 187-210.
- Järvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. *In vitro* susceptibility of *streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:1158-1159.
- Jastrow M. Hebrew and Babylonian traditions. New York: New York Scribner, 1914
- Jenkins S, Addy M, Newcombe R. Comparative effects of toothpaste brushing and toothpaste rinsing on salivary bacterial counts. *J Periodontal Res* 1990a; 25: 316-319.
- Jenkins S, Addy M, Newcombe R. The effect of triclosan, stannous fluoride and chlorhexidine products on: (II) Salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1990b; 17: 698-701.
- Jenkins S, Addy M, Newcombe R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthwashes (I). Effects on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 140-144.
- Jenkins S, Addy M, Newcombe RG. Dose response of chlorhexidine against plaque and comparison with triclosan. *J Clin Periodontol* 1994a; 21: 250-255.
- Jenkins S, Addy M, Wade W, Newcombe RG. The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1994b; 21: 397-401.
- Jokinen MA. Prevention of postextraction bacteremia by local prophylaxis. *Int J Oral Surg* 1978; 7: 450-452.
- Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periodontology 2000* 1977; 15: 55-62.
- Junco-Lafuente MP, Baca-García P, Mesa-Aguado FL. Utilizacion de la clorhexidina en la prevencion oral de pacientes de la tercera edad. *RCOE* 2001; 6: 81-89.
- Kamalakshi BA, Santarpia PR, Pollack JJ, Renner RP. Assessment of antimicrobial treatment of denture stomatitis using an *in vivo* replica model system: therapeutic efficacy of an oral rinse. *J Prosthet Dent* 1992; 67: 72-77.
- Kampf G, Shaffer M, Hunte C. Insufficient neutralization in testing a chlorhexidine-containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 48.
- Kaplowitz G J, Cortell M. Chlorhexidine: a multi-functional antimicrobial drug. *ADTS Dental Continuing Education Courses*, 2006.
- Katz S. The use of fluoride and chlorhexidine for the prevention of radiation caries. *J Am Dent Assoc* 1982; 104: 164-170.
- Keijser JA, Verkade H, Timmerman MF, Van der Weijden FA. Comparison of 2 commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Periodontol* 2003; 74: 214-218.

- Khor SY, Jegathesan M. Heavy metal and disinfectant resistance in clinical isolates of gram-negative rods. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health* 1983; 14: 199-203.
- Klyn SL, Cummings DE, Richardson BW, Davis RD. Reduction of bacteria-containing spray produced during ultrasonic scaling. *Gen Dent* 2001; 49: 648-652.
- Kohlbecker G. Toxic impurities in chlorhexidine digluconate. *Dtsch Zahnarztl Z* 1989; 44: 273-276.
- König J, Storcks V, Kocher T, Bössmann K, Plagmann HC. Anti-plaque effect of tempered 0.2% chlorhexidine rinse: an *in vivo* study. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 207-210.
- Kornman KS. Topical antimicrobial agents: Individual Drugs. In: Newman MG and Kornman RS, eds. Antibiotic and antimicrobial use in dental practice. Chicago: Quintessence, 1990; 98-109.
- Kozlovsky A, Artzi Z, Moses O, Kamin-Belsky N, Greenstein RB. Interaction of chlorhexidine with smooth and rough types of titanium surfaces. *J Periodontol* 2006; 77: 1194-1200.
- Kropinski AM, Kuzio J, Angus BL, Hancock RE. Chemical and chromatographic analysis of lipopolysaccharide from an antibiotic-supersusceptible mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21: 310-319.
- Kulak Y, Arian A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent* 1994; 72: 283-288.
- Kulkarni VV, Damle SG. Comparative evaluation of efficacy of sodium fluoride, chlorhexidine and triclosan mouthrinses in reducing the *mutans streptococci* count in saliva: an *in vivo* study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2003; 21: 98-104.
- Lain Entralgo P. Historia de la Medicina. Barcelona: Masson, 2006.
- Lal K, Santarpia RP 3rd, Pollock JJ, Renner RP. Assessment of antimicrobial treatment of denture stomatitis using an *in vivo* replica model system: therapeutic efficacy of an oral rinse. *J Prosthet Dent* 1992; 67: 72-77.
- Lambert PM, Morris HF, Ochi S. The influence of 0.12% chlorhexidine digluconate rinses on the incidence of infectious complications and implant success. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 25-30.
- Lang NP, Brex M. Chlorhexidine digluconate: an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodontal Res* 1986; 21: 74-89.
- Lang NP, Hotz P, Graf H et al. Effects of supervised chlorhexidine mouthrinses in children. A longitudinal clinical trial. *J Periodontal Res* 1982; 17: 101-111.
- Leyes JL, García L, López G, Rodríguez I, García M, Gallas M. Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol: a clinical study. *J Periodontol* 2002; 73: 317-321.

- Liébana J, Castillo AM, Quirós E. Introducción al estudio de la microbiología oral. En: Bascones A. Tratado de Odontología. Madrid: Trigo Ediciones, S.L., 1998; 527-532.
- Löe H, Schiött CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res* 1970; 5: 79-83.
- Loe H, Schiött CR, Karring G, Karring T. Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects. *J Periodontal Res* 1976; 11: 135-144.
- Logothetis DD, Martinez-Welles JM. Reducing bacterial aerosol contamination with a chlorhexidine gluconate pre-rinse. *J Am Dent Assoc* 1995; 126: 1634-1639.
- Longworth, AR. Chlorhexidine. In: Hugo WB. ed. Inhibition and destruction of the bacterial cell. New York: Academic Press, NY, 1971; 95-106.
- Luoma H. Chlorhexidine solutions, gels and varnishes in caries prevention. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88: 147-153.
- Maillard JY: Bacterial target sites for biocide action. *J Appl Microbiol Symp* 2002; 92: 16-27.
- Manau C. Control de la placa bacteriana. En: Echeverría JJ, Cuenca E, eds. El manual de Odontología. Barcelona: Masson-Salvat, 1995; 64-72.
- Manau-Navarro C, Guasch-Serra S. Métodos de control de placa bacteriana. En: Cuenca E, Manau C, Serra LL, eds. Odontología Preventiva y Comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones, 2ª ed. Barcelona: Masson, 2005; 69-88.
- Maris P. Modes of action of disinfectants. *Rev Sci Tech* 1995; 14: 47-55.
- Martens L, Marks L, Kint J. The use of chlorhexidine as a preventive and therapeutic means of plaque control in the handicapped. Review of the literature and definitive advice for application. *Rev Belge Med Dent* 1997; 52: 27-37.
- Martínez Lizán I, Joan T, Muñoz V, Calatayud M, Ramón RM, Cuenca E. Estudio de la efectividad de dos colutorios a base de clorhexidina sin alcohol al 0,2% y 0,12%: control de la placa supragingival. *Arch Odontoestomatol Prev y Comun* 2003; 19: 100-104.
- McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of *in vitro* oral bacterial ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 4770-4776.
- McBain AJ, Ledder RG, Sreenivasian P, Gilbert P. Selection for high-level resistance by chronic triclosan exposure is not universal. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 772-777.
- McDonell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 147-179.

- Mckenzie WT, Forga L, Vernio AR, Parker D, Limestall JD. Comparison of a 0.12% chlorhexidine mouthrinse and a essential oil mouthrinse on oral health in institutionalised, mentally handicapped adults: one year results. *J Periodontol* 1992; 63: 1987-1993.
- Mendieta C, Vallcorba N, Binney A, Addy M. Comparison of two chlorhexidine mouthwash on plaque regrowth *in vivo* and dietary staining *in vitro*. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 296-300.
- Merritt AH. Periodontal diseases: diagnosis and treatment. New York: Macmillan, 1930; 1-17
- Metin M, Tek M, Sener I. Comparison of two chlorhexidine rinse protocols on the incidence of alveolar osteitis following the surgical removal of impacted third molars. *J Contemp Dent Pract* 2006; 7: 79-86.
- Miles DA, Bricker SL, Razmus TF, Potter RH. Triamcinolone acetonide versus chlorhexidine for treatment of recurrent stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 75: 397-402.
- Mombelli A, Lang NP. Antimicrobial treatment of peri-implant infections. *Clin Oral Implants Res* 1992; 3: 162-168.
- Montiel JM, Almerich JM. Efficacy of two antiplaque and antigingivitis treatments in a group of young retarded patients. *Med Oral* 2002; 7: 136-143.
- Moran J, Addy M, Newcombe R. The antibacterial effect of toothpastes on the salivary flora. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 193-199.
- Moran J, Addy M, Wade W, Milson S, McAndrew R, Newcombe RG. The effect of oxidising mouthrinses compared with chlorhexidine on salivary bacterial counts and plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 750-755.
- Moran J, Addy M, Wade WG et al. A comparison of delmopinol and chlorhexidine on plaque regrowth over a 4-day period and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 749-753.
- Musteata FM, Pawliszyn J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 37: 1015-1024.
- Netuschil L, Weiger R, Preisler R, Brex M. Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: 355-361.
- Newman MG, Sanz M, Nachnani S, Saltini C, Anderson L. Effect of 0.12% chlorhexidine on bacterial recolonization following periodontal surgery. *J Periodontol* 1989; 60: 577-581.
- Noguerol B, Sicilia A. Terapéutica antimicrobiana en Periodoncia. Tratamiento antimicrobiano de las complicaciones periimplantarias. En: Liébana J, Bagán JV. Terapéutica antimicrobiana en Odontoestomatología. Madrid: IM&C, 1996; 275-310.

- Nomura Y, Takeuchi H, Kaneko N et al. Feasibility of eradication of mutans streptococci from oral cavities. *J Oral Sci* 2004; 46: 179-183.
- Novikov LL, Treide A, Kolesnik AG, Stösser L, Schaper R. Effects of inorganic and organic fluorides combined with molybdenum and chlorhexidine upon processes of metabolism, fluoride content, and cariosity of the teeth of Wistar rats. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 1980; 68: 3-8.
- Olsen I. Denture stomatitis. Relapse tendency and removal of acquired discolourations in long-term denture disinfection with chlorhexidine. *Acta Odontol Scand* 1975; 33: 111-114.
- Pan P, Barnett ML, Coelho J, Brogdon C, Finnegan MB. Determination of the *in situ* bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 256-261.
- Pascual-La Rocca A, Savoini M, Santos A. Halitosis y colutorios orales. Revisión de la literatura. *RCOE* 2005; 10: 417-425.
- Piccione N. Use of chlorhexidine in the therapy of some stomatological diseases. *Minerva Stomatol* 1979; 28: 209-214.
- Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55: 95-100.
- Powell CA, Mealey BL, Deas DE, McDonnell HT, Moritz AJ. Post-surgical infections: prevalence associated with various periodontal surgical procedures. *J Periodontol* 2005; 76: 329-333.
- Quirynen M, Avontroodt P, Peeters W, Pauwels M, Coucke W, Van Steenberghe D. Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on *de novo* plaque formation. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 1127-1136.
- Reynolds S, Moran J, Addy M, Wade WG, Newcombe R. Taurolin as an oral rinse. I. Antimicrobial effects *in vitro* and *in vivo*. *Clin Prev Dent* 1991; 13: 13-17.
- Ring ME. America: from the earliest times to the mid-nineteenth century. In: Ring ME, ed. *Dentistry: an illustrated history*. New York/St. Louis: Abradale Press/ Mosby-Year Book, 1985a; 183-228.
- Ring ME. The classical world. . In: Ring ME, ed. *Dentistry: an illustrated history*. New York/St. Louis: Abradale Press/ Mosby-Year Book, 1985b; 39-53.
- Ring ME. The early middle ages. . In: Ring ME, ed. *Dentistry: an illustrated history*. New York/St. Louis: Abradale Press/ Mosby-Year Book, 1985c; 54-62.
- Ring ME. The eighteenth century in Europe. . In: Ring ME, ed. *Dentistry: an illustrated history*. New York/St. Louis: Abradale Press/ Mosby-Year Book, 1985d; 157-182.
- Ring ME. The far east. In: Ring ME, ed. *Dentistry: an illustrated history*. New York/St. Louis: Abradale Press/ Mosby-Year Book, 1985e; 73-100.

- Ring ME. The Renaissance. In: Ring ME, ed. *Dentistry: an illustrated history*. New York/St. Louis: Abroad Press/ Mosby-Year Book, 1985f; 117-144.
- Roberts WR, Addy M. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol* 1981; 8: 295-310.
- Roldán S, Herrera D, Santa-Cruz I, O'Connor A, González I, Sanz M. Comparative effects of different chlorhexidine mouth-rinse formulations on volatile sulphur compounds and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 1128-1134.
- Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 1975; 54: 57-62.
- Romero M. La Odontoestomatología del Barroco. Siglo XVII. En: Bascones A, ed. *Tratado de Odontología*. Madrid: Trigo Ediciones, S.L., 1998a; 957-960.
- Romero M. La Odontoestomatología del siglo XIX. En: Bascones A, ed. *Tratado de Odontología*. Madrid: Trigo Ediciones, S.L., 1998b; 969-973.
- Rosin M, Welk A, Bernhardt O et al. Effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse on bacterial counts and plaque. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 1121-1126.
- Rosin M, Welk A, Kocher T, Majic-Todt A, Kramer A, Pitten FA. The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 392-399.
- Rotter ML, Hirschl AM, Koller W. Effect of chlorhexidine-containing detergent, non-edicated soap or isopropanol and the influence of neutralizer on bacterial pathogenicity. *J Hosp Infect* 1988; 11: 220-225.
- Ruppert M, Schlagenhauf U. La clorhexidina en Odontología. Aspectos generales. *Quintessence (Ed. Española)* 2005; 18: 12-23.
- Russell AD, Day MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect* 1993; 25: 229-238.
- Saba-Chujfi E, Pereira S. Evolution of local chemical therapies in buccal diseases treatment. (Personal communication). Congrès IAHD. París, 2000.
- Safdar N, Crnich CJ, Maki DG. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. *Respir Care* 2005; 50: 725-741.
- Salem AM, Adams D, Newman HN, Rawle LW. Antimicrobial properties of 2 aliphatic amines and chlorhexidine *in vitro* and in saliva. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 44-47.
- Santos A, Franch M, Pascual A. Colutorios en Periodoncia. Parte I. *Archivos de Odontoestomatología* 2005; 21: 447-456.

- Santos S, Herrera D, López E, O'Connor A, Gonzalez I, Sanz M. A randomized clinical trial on the short-term clinical and microbiological effects of the adjunctive use of a 0.05% chlorhexidine mouthrinse for patients in supportive periodontal care. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 45-51.
- Sanz M, Newman MG, Anderson L, Matoska W, Otomo-Corgel J, Saltini C. Clinical enhancement of post-periodontal surgical therapy by a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthrinse. *J Periodontol* 1989; 60: 570-576.
- Schiött CR, Briner WW, Kirkland JJ, Loe H. Two years oral use of chlorhexidine in man. III. Changes in sensitivity of the salivary flora. *J Periodontal Res* 1976; 11: 153-157.
- Schiött CR, Loe H, Jensen SB, Kilian M, Davies RM, Glavind K. The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J Periodontal Res* 1970; 5: 84-89.
- Sedgley C. Root canal irrigation-a historical perspective. *J Hist Dent* 2004; 52: 61-65.
- Segreto VA, Collins EM, Beiswanger BB et al. A comparison of mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine. *J Periodontal Res* 1986; 21: 23-32.
- Sekino S, Ramberg P, Uzel N, Socransky S, Lindhe J. The effect of chlorhexidine regimen on *de novo* plaque formation. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 609-614.
- Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and *de novo* plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 919-925.
- Seymour RA, Meechan JG, Yates MS. Pharmacological control of dental caries and periodontal disease. In: Seymour RA, Meechan JG, Yates MS, eds. *Pharmacology and Dental Therapeutics*. Oxford: Oxford University Press, 1999; 179-196.
- Shaw WC, Addy M, Griffiths S, Price C. Chlorhexidine and traumatic ulcers in orthodontic patients. *Eur J Orthod* 1984; 6: 137-140.
- Sheikh W. Development and validation of a neutralizer system for *in vitro* evaluation of some antiseptics. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19: 429-434.
- Shklair IL, Keene HJ, Cullen P. The distribution of *Streptococcus mutans* on the teeth of two groups of naval recruits. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 199-202.
- Simon AR, Roberts MW. Management of oral complications associated with cancer therapy in pediatric patients. *ASDC J Dent Child* 1991; 58: 384-389.
- Simonsson T, Hvid EB, Rundegren J, Edwardsson S. Effect of delmopinol on *in vitro* dental plaque formation, bacterial acid production and the number of microorganisms in human saliva. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 305-309.
- Sissons CH, Wong L, Cutress TW. Inhibition by ethanol of the growth of biofilm and dispersed microcosm dental plaques. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 27-34.

- Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración. 1º Workshop Ibérico de Control de Placa e Higiene Bucodental. Conclusiones y recomendaciones. Madrid: Ediciones Ergón, 2004.
- Sreenivasan P, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 965-974.
- Sreenivasan PK, Gittins E. The effects of a chlorhexidine mouthrinse on culturable microorganisms of the tongue and saliva. *Microbiol Res* 2004a; 159: 365-370.
- Sreenivasan PK, Gittins E. Effects of low dose chlorhexidine mouthrinses on oral bacteria and salivary microflora including those producing hydrogen sulfide. *Oral Microbiol Immunol* 2004b; 19: 309-313.
- Stabholz A, Sela MN, Friedman M, Golomb G, Soskolne A. Clinical and microbiological effects of sustained release chlorhexidine in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 783-788.
- Stoeken JE, Versteeg PA, Rosema NA, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Inhibition of *de novo* plaque formation with 0.12% chlorhexidine spray compared to 0.2% spray and 0.2% chlorhexidine mouthwash. *J Periodontol* 2007; 78: 899-904.
- Tanzer JM, Slee AM, Kamay B. Structural requirements of guanide, biguanide, and bisbiguanide agents for antiplaque activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 12: 721-729.
- Thomas B, Stickler DJ. Chlorhexidine resistance and the lipids of *Providencia stuartii*. *Microbios* 1979; 24: 141-150.
- Tomás I, Alvarez M, Limeres J et al. Effect of a chlorhexidine mouthwash on the risk of postextraction bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28: 577-582.
- Turesky S, Warner V, Lin PS, Soloway B. Prolongation of antibacterial activity of chlorhexidine adsorbed to teeth. Effect of sulfates. *J Periodontol* 1977; 48: 646-649.
- Twitchell JB. Twenty ads that shook the world: The century's most groundbreaking advertising and how it changed us all. New York: Three Rivers Press, 2000; 62.
- Van der Weijden GA, Timmerman MF, Novotny AGA, Rosema NAM, Verkerk AAJ. Three different rinsing times and inhibition of plaque accumulation with chlorhexidine. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 89-92.
- Veksler AE, Kayrouz GA, Newman MG. Reduction of salivary bacteria by pre-procedural rinses with chlorhexidine 0.12%. *J Periodontol* 1991; 62: 649-651.
- Waler SM, Rølla G. Importance of teeth and tongue as possible receptor sites for chlorhexidine in relation to its clinical effect. *Scand J Dent Res* 1985; 93: 222-226.
- Waler SM. Further *in vivo* studies on the plaque-inhibiting effect of chlorhexidine and its binding mechanisms. *Scand J Dent Res* 1990; 98: 422-427.

- Waler SM, Rølla G. Effect of chlorhexidine and lanthanum on plaque formation. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 260-262.
- Weiger R, Netuschil L, Wester-Ebbinghaus T, Brex M. An approach to differentiate between antibacterial and antiadhesive effects of mouthrinses *in vivo*. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 559-565.
- Westergren G, Emilson CG. *In vitro* development of chlorhexidine resistance in *Streptococcus sanguis* and its transmissibility by genetic transformation. *Scand J Dent Res* 1980; 88: 236-243.
- Wilson W, Taubert KA, Gewitz M et al. Prevention of infective endocarditis: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *J Am Dent Assoc* 2007; 138: 739-745, 747-760.
- Yates R, Moran J, Addy M, Mullan PJ, Wade WG, Newcombe R. The comparative effect of acidified sodium chlorite and chlorhexidine mouthrinses on plaque regrowth and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 603-609.
- Young MP, Korachi M, Carter DH, Worthington HV, McCord JF, Drucker DB. The effects of an immediately pre-surgical chlorhexidine oral rinse on the bacterial contaminants of bone debris collected during dental implant surgery. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13: 20-29.





2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La CHX representa el antiséptico oral por excelencia. Una de sus principales ventajas, además de que es un potente antimicrobiano, es su capacidad de unirse a sustratos muy heterogéneos, manteniendo su actividad antibacteriana al liberarse lentamente a un ritmo que permite la persistencia de dosis eficaces, propiedad denominada sustantividad.

Aunque existen algunos trabajos en los que se ha determinado la sustantividad de la CHX sobre diferentes ecosistemas orales como la placa dental o el surco gingival, la determinación de los recuentos bacterianos salivales representa la prueba más aceptada por la comunidad científica para investigar el efecto antibacteriano *in vivo* de la CHX, probablemente porque la saliva representa un “medio de diseminación” de los microorganismos orales de un nicho ecológico a otro.

Por otra parte, en la mayoría de los estudios microbiológicos más recientes en los que se evalúa la actividad antibacteriana de la CHX en saliva, este antiséptico se aplica como control positivo, para analizar los resultados obtenidos con otros principios activos. Sin embargo, pocos autores han estudiado la actividad antibacteriana *in vivo* de una única aplicación de CHX sobre la flora salival, analizando la influencia de factores intrínsecos y extrínsecos al enjuague.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es determinar *in vivo* la eficacia antimicrobiana y la sustantividad de la CHX sobre la flora bacteriana salival. Este planteamiento general se concreta en los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar la actividad antimicrobiana sobre la flora salival de un único enjuague de digluconato de CHX mediante técnicas de cultivo convencionales.

Objetivos secundarios

- Comprobar la eficacia de un sistema de neutralización previamente validado, para contrarrestar la "actividad antimicrobiana residual" de la CHX presente después de la exposición y durante el procesamiento de la muestra.

- Comparar la actividad antimicrobiana de un colutorio de digluconato de CHX al 0,12% y al 0,2% sobre la flora salival hasta 1 hora después de su utilización.

2. Evaluar la actividad antimicrobiana y la sustantividad del digluconato de CHX sobre la flora salival mediante microscopía de epifluorescencia.

Objetivos secundarios

- Validar la técnica de epifluorescencia con la solución SYTO 9/yoduro de propidio para analizar la viabilidad bacteriana en muestras de saliva tras un enjuague con digluconato de CHX al 0,2%.
- Comparar la actividad antimicrobiana de un colutorio de digluconato de CHX al 0,12% y al 0,2% sobre la flora salival hasta 7 horas después de su utilización.
- Determinar si la forma de aplicación de la CHX (colutorio, gel, spray y gasa impregnada) condiciona su sustantividad.
- Analizar la influencia de factores intrínsecos (concentración, volumen, tiempo) y extrínsecos (“comer”, “beber”, “masticar” y “fumar”) sobre el efecto antibacteriano inmediato y la sustantividad de la CHX.



3. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD *IN VIVO* DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO EN PLACA



3.1. EFECTO DE UN AGENTE NEUTRALIZADOR PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL.

Archives of Oral Biology 2008; 53: 981-984.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue comprobar la eficacia de un agente neutralizador (AN) previamente validado, para contrarrestar la "actividad antimicrobiana residual" *in vitro* (presente después de la exposición y durante el procesamiento de la muestra) de un colutorio de Clorhexidina (CHX) al 0,2% sobre la flora salival.

El grupo de estudio lo constituyeron 20 voluntarios adultos de los cuáles se recogieron muestras de saliva no estimulada en condiciones basales, a los 30 segundos y 1 hora después de la aplicación de un único enjuague de 10 ml durante 30 segundos con CHX al 0,2%. De cada paciente, los 4 ml de saliva recogidos en cada toma se dividieron en 2 alícuotas iguales: una se mezcló con la solución neutralizadora (compuesta por tween 80 al 3%, lecitina al 0,3% y cisteína al 0,1%) y la otra con la solución control. Se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) y los resultados se expresaron en logaritmos ($\log_{10}$ UFC/ml). La diferencia entre la concentración bacteriana detectada en una alícuota de una determinada muestra con solución neutralizadora y la alícuota correspondiente con solución control se denominó "factor de reducción".

En condiciones basales, las concentraciones bacterianas totales fueron similares, independientemente de la adición de la solución neutralizadora o de la solución control ($8,419 \pm 0,346 \log_{10}$ UFC/ml y $8,462 \pm 0,474 \log_{10}$ UFC/ml respectivamente, $p = 0,440$). A los 30 segundos y 1 hora después de efectuar el enjuague con CHX al 0,2%, el factor de reducción ($1,917 \pm 1,275 \log_{10}$ UFC/ml y $0,537 \pm 0,706 \log_{10}$ UFC/ml respectivamente) resultó estadísticamente significativo ($p < 0,001$ y $p = 0,003$ respectivamente).

En conclusión, el AN (tween 80 al 3%, lecitina al 0,3% y cisteína al 0,1%) no resultó tóxico para la flora salival e inactivó eficazmente la "actividad antimicrobiana residual" *in vitro* de la CHX al 0,2% (presente después de la exposición y durante el procesamiento de la muestra) como mínimo hasta 1 hora después de efectuar un único enjuague con este antiséptico.

INTRODUCCIÓN

La Clorhexidina (CHX) es una bisbiguanida activa frente a un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Su eficacia biocida por vía tópica se ha demostrado de forma contundente en el lavado de manos (*Tanner et al, 2008*), en la prevención y tratamiento de infecciones quirúrgicas (*Napolitano 2006; Edmiston et al, 2007*) y en la prevención de neumonías asociadas a ventilación mecánica en pacientes ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos (*Genuit et al, 2001*). También se ha constatado la elevada actividad antimicrobiana del digluconato de CHX sobre la flora salival (*Roldán et al, 2004*) y la biopelícula dental (*Van der Mei et al, 2006*), cuya expresión clínica es la reducción significativa de la placa supragingival y la gingivitis (*Lorenz et al, 2006*).

A pesar de la necesidad asumida de utilizar inactivadores para la evaluación antimicrobiana de los antisépticos (*Sheikh 1981; Rotter et al, 1988; Kampf et al, 2005*), son escasos los estudios sobre CHX y flora oral en cuya metodología se especifique el empleo de agentes neutralizadores (AN) (*Buckner et al, 1994; Pitten et al, 1999; de Albuquerque et al, 2004*). La función de estos agentes es anular el "efecto antimicrobiano residual" *in vitro* de la CHX (presente después de la exposición y durante el procesamiento de la muestra), lo que permitiría precisar con exactitud su actividad tras un determinado tiempo de exposición, evitando resultados de "sobreestimación" de su eficacia antibacteriana (*Kampf y Kramer, 2004*). Para ello, el AN debe cumplir 2 requisitos fundamentales: ser inocuo sobre la flora bacteriana y capaz de bloquear la acción del antiséptico (*Sheikh, 1981; Kampf et al, 2005*).

En la mayoría de los trabajos en los que se evalúan AN de la CHX se emplearon soluciones para la higiene de manos (*Sheikh, 1981; Cremieux et al, 1989; Benson et al, 1990; Kampf et al, 2005*). En los colutorios de CHX -en los que la concentración del

antiséptico es significativamente menor- la necesidad de utilizar un AN para analizar su eficacia antimicrobiana aún no se ha demostrado de forma concluyente.

El objetivo del presente estudio fue comprobar la eficacia de un sistema de neutralización previamente validado por la Sociedad Alemana de Higiene y Microbiología (*Borneff et al, 1981*), para contrarrestar la "actividad antimicrobiana residual" *in vitro* de un colutorio de CHX al 0,2% (presente después de la exposición y durante el procesamiento de la muestra) sobre la flora salival.

PACIENTES Y MÉTODOS

- **Selección del grupo de estudio y recogida de muestras salivales**

El grupo de estudio lo constituyeron 20 voluntarios adultos con edades comprendidas entre 20 y 45 años que presentaban un buen estado de salud oral: mínimo de 24 dientes permanentes, sin evidencia de gingivitis ni periodontitis (Índice Periodontal Comunitario= 0) (*World Health Organisation, 1997*) y ausencia de caries. Los criterios de exclusión aplicados fueron: fumar, ser portador de prótesis dentales o aparatos ortodóncicos, haber recibido antibióticos o utilizar de forma rutinaria antisépticos orales durante los últimos 3 meses, y padecer alguna enfermedad sistémica que pudiera provocar alteraciones en la producción y/o la composición de la saliva. Previamente al inicio del estudio, a todos los voluntarios se les efectuó una tartrectomía.

De cada participante, se recogieron muestras de saliva no estimulada (4 ml) en condiciones basales, a los 30 segundos y 1 hora después de la aplicación de un único enjuague con 10 ml de digluconato de CHX al 0,2% en solución acuosa (Oraldine Perio®, Pfizer, Barcelona, España) durante 30 segundos. Los voluntarios no practicaron ninguna técnica de higiene oral desde la noche anterior; el día del experimento, se les prohibió ingerir alimentos o bebidas, y fumar desde 1 hora antes de la primera recogida salival y durante el transcurso del experimento. En el día del experimento, la recogida de las

diferentes muestras salivales se realizaron desde las 11:50 a.m. (muestra basal) hasta las 1:00 p.m. (última muestra obtenida 1 hora después de finalizar el enjuague). Las muestras de saliva no estimulada se recogieron aplicando métodos previamente descritos ("spitting method") (Navazesh y Christensen, 1982).

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela; en todos los casos, se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes para participar en el estudio.

- **Composición del agente neutralizador**

La composición del AN previamente validado para inactivar a la CLX al 0,2% consistió en: tween 80 al 3%, lecitina al 0,3% y cisteína al 0,1% (Pitten y Kramer, 1999).

Para la elaboración de las soluciones neutralizadora y control se utilizó agua deionizada estéril. Ambas soluciones se ajustaron a un pH $7 \pm 0,2$ con una solución de NaOH y se filtraron mediante filtros de membrana Millipore 0,22 μm (Millipore Ibérica S.A., Madrid, España).

- **Procesamiento de las muestras**

De cada voluntario, los 4 ml de saliva recogidos en cada toma se dividieron en 2 alícuotas iguales: 2 ml de saliva se mezclaron con la solución neutralizadora y los 2 ml restantes con la solución control.

Las muestras de saliva fueron inmediatamente inoculadas en un medio de transporte (BBL™, Port-A-Cul™, Becton, Dickinson and Company, Sparks, EE.UU.), conservadas a temperatura ambiente y enviadas al laboratorio. Transcurridas 3-4 horas, las muestras se diluyeron de forma seriada (muestra directa, 1/10, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000). Para el conteo de bacterias aerobias-anaerobias facultativas, las diferentes diluciones fueron cultivadas en agar sangre (bioMérieux Inc., Hazelwood, Missouri, EE.UU.) en una atmósfera de CO₂ bajo condiciones aeróbicas durante 24 horas. Para el

contaje de bacterias anaerobias estrictas, las diferentes diluciones fueron cultivadas en agar Columbia CNA con un 5% de sangre de cordero (bioMérieux Inc.) bajo condiciones anaeróbicas durante 48-72 horas. Para excluir a los anaerobios facultativos, las colonias bacterianas obtenidas inicialmente bajo condiciones anaeróbicas fueron subcultivadas en agar sangre (bioMérieux Inc.) bajo condiciones aeróbicas en una atmósfera de 5-10% CO₂ durante 24 horas. La atmósfera anaeróbica fue obtenida usando el sistema GENbox 2,5 o 7,0 L (bioMérieux Inc.) con una concentración de oxígeno <0,1% y una concentración de CO₂ >15%. Para todos los cultivos, se utilizó un indicador de anaerobiosis (bioMérieux Inc.) para comprobación de la atmósfera.

Después de la incubación durante 24-48 horas a 37 °C, se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) y los resultados se expresaron en logaritmos decimales (log₁₀ UFC/ml). La diferencia entre la concentración bacteriana detectada en una alícuota de una determinada muestra con solución neutralizadora y la alícuota correspondiente con solución control se denominó "factor de reducción" (FR).

- **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS versión 12.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.). Para el estudio de muestras pareadas se aplicaron el test de la t de Student o el test de Wilcoxon. La elección de un test paramétrico o no paramétrico dependió de si los valores de la variable cuantitativa analizada presentaban o no una distribución normal, lo que se determinó con el test de Kolmogorov-Smirnov. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En condiciones basales, las concentraciones bacterianas totales fueron similares, independientemente de la adición de la solución neutralizadora o de la solución control ($8,419 \pm 0,346 \log_{10}$ UFC/ml y $8,462 \pm 0,474 \log_{10}$ UFC/ml respectivamente) (Tabla 1).

A los 30 segundos de efectuar el enjuague con CHX al 0,2%, el número total de bacterias disminuyó significativamente con respecto al valor basal tanto con la solución neutralizadora ($7,098 \pm 1,324 \log_{10}$ UFC/ml *versus* $8,419 \pm 0,346 \log_{10}$ UFC/ml, $p < 0,001$) como con la solución control ($5,181 \pm 1,466 \log_{10}$ UFC/ml *versus* $8,462 \pm 0,474 \log_{10}$ UFC/ml, $p < 0,001$). El FR ($1,917 \pm 1,275 \log_{10}$ UFC/ml) también resultó estadísticamente significativo ($p < 0,001$). Estas diferencias significativas se confirmaron tanto en bacterias aerobias-anaerobias facultativas como en bacterias anaerobias estrictas (Tabla 1).

Una hora después de efectuar el enjuague con CHX al 0,2% la carga bacteriana total fue significativamente inferior con respecto al valor basal tanto con la solución neutralizadora ($7,390 \pm 0,921 \log_{10}$ UFC/ml *versus* $8,419 \pm 0,346 \log_{10}$ UFC/ml, $p < 0,001$) como con la solución control ($6,853 \pm 1,109 \log_{10}$ UFC/ml *versus* $8,462 \pm 0,474 \log_{10}$ UFC/ml, $p < 0,001$). El FR ($0,537 \pm 0,706 \log_{10}$ UFC/ml) también alcanzó significación estadística ($p = 0,003$). Estas diferencias significativas se confirmaron tanto en bacterias aerobias-anaerobias facultativas como en bacterias anaerobias estrictas, aunque en éstas últimas el FR fue mayor ($0,762 \pm 0,922 \log_{10}$ UFC/ml y $1,363 \pm 0,823 \log_{10}$ UFC/ml respectivamente) (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de bacterias aerobias-anaerobias facultativas (Grupo A), bacterias anaerobias estrictas (Grupo B) y bacterias totales, detectadas en muestras de saliva recogidas en distintas tomas, a las que se incorporó la Solución Neutralizadora (SN) o la Solución Control (SC).

Muestra	Bacterias	SN Log ₁₀ UFC/ml ^a	SC Log ₁₀ UFC/ml ^a	Factor de reducción Log ₁₀ UFC/ml ^a	p
Basal ^b	Grupo A	8,303 ± 0,293	8,350 ± 0,443	-0,047 ± 0,242	0,397
	Grupo B	7,212 ± 1,218	7,213 ± 1,520	-0,00 ± 0,572	0,999
	Totales	8,419 ± 0,346	8,462 ± 0,474	-0,042 ± 0,243	0,440
30 segundos ^c	Grupo A	6,905 ± 1,398	5,116 ± 1,537	1,789 ± 1,112	<0,001
	Grupo B	3,627 ± 1,587	2,157 ± 0,703	1,470 ± 1,341	0,001
	Totales	7,098 ± 1,324	5,181 ± 1,466	1,917 ± 1,275	<0,001
1 hora ^d	Grupo A	7,375 ± 0,905	6,613 ± 1,559	0,762 ± 0,922	0,002
	Grupo B	5,368 ± 1,441	4,004 ± 1,389	1,363 ± 0,823	<0,001
	Totales	7,390 ± 0,921	6,853 ± 1,109	0,537 ± 0,706	0,003

a- Se expresó la media ± desviación estándar.

b- Muestra de saliva recogida en condiciones basales (previa al enjuague).

c- Muestra de saliva recogida 30 segundos después del enjuague con clorhexidina.

d- Muestra de saliva recogida 1 hora después del enjuague con clorhexidina.

Grupo A= bacterias aerobias-anaerobias facultativas; Grupo B= bacterias anaerobias estrictas; NS= no significativo.

DISCUSIÓN

La neutralización del digluconato de CHX es un proceso complejo pero imprescindible para evaluar su actividad antimicrobiana (*Kampf et al, 2005*). En la mayoría de los estudios recogidos en la literatura sobre validación de AN para la inactivación de la "actividad antimicrobiana residual" *in vitro* de la CHX se emplearon concentraciones elevadas de este antiséptico (oscilando entre 1-4%), diferentes cargas bacterianas previamente establecidas y se aplicaron distintos protocolos de recogida y procesamiento de las muestras (*Sheikh, 1981; Cremieux et al, 1989; Benson et al, 1990*;

Kampf et al, 2005). En consecuencia, estas diferencias metodológicas dificultan la comparación de los resultados entre las diferentes series (*Cremieux et al, 1989*).

Aunque se ha investigado la eficacia de diferentes AN (*Sheikh, 1981; Benson et al, 1990; Kampf et al, 2005*), no hemos encontrado en la literatura ningún trabajo en el que se haya estudiado *in vivo* la actividad de la solución neutralizadora aplicada en el presente estudio. Además, aún no se ha confirmado la necesidad de incorporar un AN para evaluar la actividad antimicrobiana de la CHX sobre la flora salival, por lo que no podemos contrastar nuestros resultados con los de otros investigadores.

Según Kampf et al (*Kampf et al, 2005*) y Benson et al (*Benson et al, 1990*), el AN debería incorporarse a la muestra de forma inmediata (especialmente si utilizamos CHX y el tiempo de aplicación es corto), ya que se ha demostrado que el antiséptico podría permanecer activo hasta el momento de su dilución (*Rotter, 1988*). En la presente serie, el procesado de las muestras se efectuó a las 3-4 horas después de su recogida, lo que presumiblemente favoreció la actuación del AN. Con la finalidad de facilitar la inactivación del antiséptico residual, Pitten y Kramer (*Pitten y Kramer, 1999*) incubaron las muestras durante 30 minutos antes de proceder a efectuar las diluciones seriadas. Otros autores (*Larson et al, 1980; Sheikh, 1981; Reverdy et al, 1984; Cremieux et al, 1989*) también incorporaron a los medios de cultivos uno o varios compuestos, como tween 80 (1%), asolectina (0,3%), sulfito de sodio o tiosulfato de sodio (0,1-0,3%), para completar el proceso de neutralización.

El criterio de eficacia antimicrobiana de un antiséptico descrito por Pitten y Kramer (*Pitten y Kramer, 1999*), exige tras su aplicación una reducción de la concentración bacteriana $\geq 1 \log_{10}$ UFC/ml. Coincidiendo con otros autores (*Jenkins et al, 1994*), en nuestro estudio constatamos que la práctica de un único enjuague de CHX al 0,2%

durante 30 segundos se asocia a un importante efecto antibacteriano inmediato sobre la flora salival, que persiste al menos hasta 1 hora después de su aplicación.

De acuerdo con otros autores que demostraron la inocuidad de diferentes AN frente a determinados patógenos cutáneos (*Larson et al, 1980; Sheikh, 1981; Kampf et al, 2005*), el AN empleado en la presente serie no condicionó significativamente la concentración bacteriana detectada en saliva en condiciones basales. Sheikh (*Sheikh, 1981*) evaluó *in vitro* la influencia del tiempo de contacto entre el AN (asolectina al 3%, tween 80 al 10% y tiosulfato de sodio al 0,3%) y la suspensión bacteriana, no detectando ningún efecto sobre la vitalidad de los microorganismos tras 60 minutos de contacto. En la presente serie, el tiempo de contacto entre el AN y la muestra salival fue de 3-4 horas, pero tampoco se detectó ningún efecto sobre la vitalidad de la flora salival.

Kampf et al (*Kampf et al, 2005*) demostraron que una solución antiséptica con etanol al 61% y CHX al 1% sin presencia de un AN en la muestra provocaba una reducción de la carga bacteriana significativamente mayor a la obtenida en aquellas con AN (4,8 log₁₀ UFC/ml y 2,7 log₁₀ UFC/ml respectivamente). En concordancia con estos resultados, en la presente serie, en la muestra salival recogida a los 30 segundos de efectuar el enjuague con CHX, se alcanzó un FR de casi 2 log₁₀ UFC/ml.

Se ha sugerido que la sustantividad de la CHX al 0,2% sobre la flora salival es mayor que la de otros antisépticos y puede superar las 7 horas (*Addy et al, 1991; Moran et al, 1992; Jenkins et al, 1994*), lo que justificaría la incorporación de AN a todas las muestras que queramos procesar, independientemente del tiempo transcurrido entre la aplicación del antiséptico y la recogida de la muestra. En la presente serie, en la muestra salival recogida 1 hora después del enjuague, el FR fue de 0,5 log₁₀ UFC/ml.

En conclusión, el AN (tween 80 al 3%, lecitina al 0,3% y cisteína al 0,1%) no resultó tóxico para la flora salival e inactivó eficazmente la "actividad antimicrobiana residual" *in vitro* de la CHX al 0,2% (presente después de la exposición y durante el procesamiento de la muestra) como mínimo hasta 1 hora después de efectuar un único enjuague con este antiséptico. Consecuentemente, proponemos la utilización de este AN cuando se evalúe la actividad antibacteriana de colutorios de CHX al 0,2%. Su utilidad para analizar la eficacia de otras concentraciones de CHX y los efectos de este antiséptico sobre otras muestras biológicas como la biopelícula dental, serán objeto de futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. The effect of some chlorhexidine-containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 90-93.
- Benson L, Bush L, LeBlanc D. Importance of neutralizers in the stripping fluid in a simulated health care personnel handwash. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1990, 11: 595-599.
- Borneff J, Eggers HJ, Grün L et al. Directives for the testing and evaluation of chemical disinfection methods-1st part (1.1.1981). I. In vitro tests. II. Tests under medical practice conditions. 1. Hygienic hand disinfection. 2. Surgical hand disinfection. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* 1981; 172: 534-562.
- Buckner RY, Kayrouz GA, Briner W. Reduction of oral microbes by a single chlorhexidine rinse. *Compendium* 1994, 15: 512, 514, 516.
- Cremieux A, Reverdy ME, Pons JL et al, Standardized method for evaluation of hand disinfection by surgical scrub formulations. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 2944-2948.
- De Albuquerque RF Jr, Head TW, Mian H et al. Reduction of salivary *S. aureus* and *mutans* group streptococci by a preprocedural chlorhexidine rinse and maximal inhibitory dilutions of chlorhexidine and cetylpyridinium. *Quintessence Int* 2004, 35: 635-640.
- Edmiston JR CE, Seabrook GR, Johnson CP, Paulson DS, Beausoleil CM. Comparative of a new and innovative 2% chlorhexidine gluconate-impregnated cloth with 4% chlorhexidine gluconate as topical antiseptic for preparation of the skin prior to surgery. *Am J Infect Control* 2007; 35: 89-96.

- Genuit T, Bochicchio G, Napolitano LM, McCarter RJ, Roghman MC. Prophylactic chlorhexidine oral rinses decrease ventilator-associated pneumonia in surgical ICU patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2001; 2: 5-18.
- Jenkins S, Addy M, Wade W, Newcombe RG. The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 397-401.
- Kampf G, Kramer A. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 863-893.
- Kampf G, Shaffer M, Hunte C. Insufficient neutralization in testing a chlorhexidine-containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 48.
- Larson EL, Strom MS, Evans CA. Analysis of three variables in sampling solutions used to assay bacteria of hands: type of solution, use of antiseptic neutralizers, and solution temperature. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 355-360.
- Lorenz K, Bruhn G, Heumann C, Netuschil L, Brex M, Hoffmann T. Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discolouration. A randomized, investigator-blind, placebo-controlled, 3 week experimental gingivitis study. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 561-567.
- Moran J, Addy M, Wade WG et al. A comparison of delmopinol and chlorhexidine on plaque regrowth over a 4-day period and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 749-753.
- Napolitano LM. Decolonization of the skin of the patient and surgeon. *Surg Infect (Larchmt)* 2006; 7 (Suppl 3): S3-S15.
- Navazesh M, Christensen CM. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Den Res* 1982; 61: 1158-1162.
- Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55: 95-100.
- Reverdy ME, Martra A, Fleurette J. Verification of the effectiveness of neutralization in the *in vivo* study of antiseptics. *Pathol Biol (Paris)* 1984; 32: 588-590.
- Roldán S, Herrera D, Santa-Cruz I, O'Connor A, González I, Sanz M. Comparative effects of different chlorhexidine mouthrinse formulations on volatile sulphur compounds and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 1128-1134.
- Rotter ML. Are models useful for testing hand antiseptics?. *J Hosp Infect* 1988; 11: 236-243.
- Rotter ML, Hirschl AM, Koller W. Effect of chlorhexidine-containing detergent, non-alkali soap or isopropanol and the influence of neutralizer on bacterial pathogenicity. *J Hosp Infect* 1988; 11: 220-225.

- Sheikh W. Development and validation of a neutralizer system for *in vitro* evaluation of some antiseptics. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19: 429-434.
- Tanner J, Swarbrook S, Stuart J. Surgical hand antisepsis to reduce surgical site infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 23 (CD004288).
- Van der Mei HC, White DJ, Ateima-Smit J, van de Belt-Gritter E, Busscher HJ. A method to study sustained antimicrobial activity of rinse and dentifrice components on biofilm viability *in vivo*. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 14-20.
- World Health Organization. Oral health surveys, basic methods, 4th edn. Geneva: WHO, 1997.



3.2. ACTIVIDAD BACTERICIDA *IN VIVO* DE LA CLORHEXIDINA AL 0,2% *VERSUS* CLORHEXIDINA AL 0,12% SOBRE LOS ANAEROBIOS ERICTOS DE LA FLORA SALIVAL.

Archives of Oral Biology 2008; 53: 1186-1191.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vivo* la actividad antimicrobiana sobre la flora salival de un único enjuague de digluconato de Clorhexidina (CHX), analizando la influencia de su concentración (0,12% *versus* 0,2%).

El grupo de estudio lo constituyeron 20 voluntarios adultos a los que se recogieron muestras de saliva no estimulada en condiciones basales, a los 30 segundos y 1 hora después de un único enjuague de agua estéril, CHX al 0,12% y CHX al 0,2%. Las muestras de saliva se diluyeron de forma seriada y se cultivaron en medios de cultivo convencionales para el aislamiento de bacterias aerobias-anaerobias facultativas y bacterias anaerobias estrictas. Se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) y los resultados se expresaron en logaritmos decimales ($\log_{10}$ UFC/ml).

Las CHX al 0,12% y al 0,2% disminuyeron significativamente la población bacteriana total a los 30 segundos y 1 hora después del enjuague; esta actividad antimicrobiana fue mayor sobre los anaerobios estrictos. Cuando comparamos ambos colutorios, la CHX al 0,2% presentó una mayor actividad antimicrobiana que la CHX al 0,12% sobre la flora salival a los 30 segundos y a la hora post-enjuague. Sólo la CHX al 0,2% mostró actividad bactericida (Factor de Reducción $\geq 3 \log_{10}$ UFC/ml) frente a las bacterias anaerobias estrictas de la flora salival.

La mayor reducción en la carga bacteriana provocada por la CHX al 0,2% confirma la influencia de la concentración sobre su actividad antimicrobiana. En consecuencia, la concentración de la CHX es un factor importante a tener en cuenta en aquellas situaciones clínicas en las que se precise un elevado efecto antibacteriano.

INTRODUCCIÓN

La Clorhexidina (CHX) es uno de los biocidas más empleados como antiséptico oral, y se encuentra especialmente comercializado como un agente antiplaca o como un vehículo de liberación lenta para el tratamiento de la enfermedad periodontal (*Gilbert y Moore, 2005*). Una de las principales razones es su amplio espectro de acción (*McDonnell y Russell, 1999*). El mecanismo de acción de la CHX implica la alteración de la membrana citoplasmática, provocando la interacción y liberación de componentes intracelulares (*Maillard, 2002*). Se ha señalado que la afectación exclusiva de las capas celulares externas por acción de la CHX es insuficiente para inducir la muerte bacteriana, siendo esta actividad dependiente de 2 factores: el pH y la concentración (*Hugo y Longworth, 1966*).

La cuantificación de las colonias bacterianas en muestras de saliva es una prueba aceptada por la comunidad científica para evaluar *in vivo* la actividad antimicrobiana de la CHX (*Jenkins et al, 1994; Addy y Moran, 1997*). En 2003, Sekino et al (*Sekino et al, 2003*) demostraron que la concentración de bacterias salivales presentes después de la aplicación de diferentes protocolos de CHX puede condicionar los niveles de placa bacteriana durante las primeras fases de su formación.

En los colutorios comercializados de CHX, las concentraciones utilizadas con mayor frecuencia son la 0,12% y la 0,2%. Aunque existen numerosos estudios de la actividad antibacteriana *in vivo* de la CHX 0,12% o CHX 0,2% sobre la flora salival (*Jenkins et al, 1991; Buckner et al, 1994; Briner et al, 1994; Moran et al, 1995; Fernandes-Naglik et al, 2001*), la heterogeneidad de las metodologías aplicadas dificulta la comparación de los resultados entre las diferentes series. Por otro lado, pocos autores han investigado *in vivo* la actividad antibacteriana sobre la flora salival de un único enjuague de CHX al 0,12% *versus* CHX al 0,2%, analizando principalmente la influencia

de la dosis administrada (al aplicar diferentes volúmenes de ambas concentraciones de CHX) (Addy *et al*, 1991; Harper *et al*, 1995)

El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vivo* la actividad antimicrobiana sobre la flora salival de un único enjuague de digluconato de CHX, analizando la influencia de su concentración (0,12% *versus* 0,2%).

METODOLOGÍA

- **Selección del grupo de estudio y recogida de muestras salivales**

El grupo de estudio lo conformaron 20 voluntarios adultos con edades comprendidas entre 20 y 45 años, que presentaban un buen estado de salud oral: mínimo de 24 dientes permanentes, sin evidencia de gingivitis o periodontitis (Community Periodontal Index score= 0) (World Health Organisation, 1997) y ausencia de caries. Los criterios de exclusión aplicados fueron: fumar, ser portador de algún tipo de prótesis dental o aparatología ortodóncica, haber recibido antibióticos o utilizar de forma rutinaria antisépticos orales durante los últimos 3 meses, y padecer alguna enfermedad sistémica o consumir algún fármaco que pueda alterar la producción y/o la composición de la saliva. Previamente al inicio del estudio, a todos los voluntarios se les efectuó una tartrectomía.

De cada participante, se recogieron muestras de saliva no estimulada (2 ml) en condiciones basales, a los 30 segundos y 1 hora después de la aplicación, bajo supervisión, de:

- Un Único Enjuague con 10 ml de agua estéril durante 30 segundos (control negativo) (UE-agua).
- Un Único Enjuague con 10 ml de CHX al 0,12% en solución acuosa durante 30 segundos (Paroex®, DistriFarma, Barcarena, Portugal) (UE-CHX 0,12%).

- Un Único Enjuague con 10 ml de CHX al 0,2% en solución acuosa durante 30 segundos (Oraldine Perio®, Pfizer, Barcelona, España) (UE-CHX 0,2%).

Los voluntarios no practicaron ninguna técnica de higiene oral desde la noche anterior al experimento; el día del experimento, se les prohibió ingerir alimentos o bebidas, y fumar desde 1 hora antes de la primera recogida salival y durante el transcurso del experimento. En el día del experimento, la hora de recogida de muestras salivales osciló entre las 11:50 horas de la mañana (muestra basal) hasta las 1:00 horas de la tarde (última muestra recogida 1 hora después de concluir en enjuague). Aplicando un sistema de aleatorización equilibrada, todos los voluntarios efectuaron los 3 enjuagues, estableciéndose un “período de descanso” de 2 semanas entre las diferentes aplicaciones. Las muestras de saliva no estimulada se recogieron aplicando métodos previamente descritos (“spitting method”) (Navazesh y Christensen, 1982).

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela. En todos los casos se obtuvo por escrito el consentimiento informado de los participantes en el estudio.

- **Procesamiento de las muestras**

Los 2 ml de saliva recogidos en cada toma se mezclaron con una solución neutralizadora de la CHX previamente validada que incluía: tween 80 al 3%, lecitina al 0,3% y cisteína al 0,1% (Borneff *et al*, 1981). En un estudio realizado por nuestro grupo previamente, comprobamos que esta solución neutralizadora de la CHX no resulta tóxica para la flora salival y efectivamente bloquea la actividad antibacteriana residual *in vitro* de la CHX al 0,2% durante el procesamiento de las muestras (Cousido *et al*, 2008). Las muestras de saliva mezcladas con la solución neutralizadora fueron inmediatamente inoculadas en un medio de transporte (BBL™, Port-A-Cul™, Becton, Dickinson and Company, Sparks, EE.UU.) y enviadas al laboratorio.

Las muestras de saliva se diluyeron de forma seriada (muestra directa, 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10.000). Para la detección de bacterias aerobias y anaerobias facultativas, las diluciones seriadas se cultivaron en agar sangre (bioMérieux Inc., Hazelwood, Missouri, EE.UU.) bajo condiciones aeróbicas en una atmósfera de 5-10% CO₂ durante 24 horas. Para la detección de bacterias anaerobias estrictas, las diluciones seriadas se cultivaron en agar CNA Columbia con sangre de carnero (bioMérieux Inc.) bajo condiciones anaeróbicas durante 48-72 horas. Para excluir a los anaerobios facultativos, las colonias bacterianas obtenidas inicialmente bajo condiciones anaeróbicas fueron subcultivadas en agar sangre (bioMérieux Inc.) bajo condiciones aeróbicas en una atmósfera de 5-10% CO₂ durante 24 horas. La atmósfera anaeróbica se alcanzó empleando el sistema GENbox -jarra de 2,5 o 7,0 L- (bioMérieux Inc.) con una concentración de oxígeno <0.1% y una concentración de dióxido de carbono >15%. Con cada cultivo en atmósfera anaeróbica, se incluyó un indicador anaeróbico (bioMérieux Inc.).

Después de la incubación durante 24-72 horas a 37 °C, se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) y los resultados se expresaron en logaritmos decimales (log₁₀ UFC/ml). La ausencia de UFC en las placas de cultivo procedentes de muestra directa se consideró <100 UFC/ml. La diferencia en las concentraciones bacterianas entre 2 diferentes muestras salivales (intra-enjuague o inter-enjuague) se denominó "Factor de Reducción" (FR). Consideramos que un antimicrobiano presenta actividad bactericida cuando provoca "un descenso de al menos un 99,9% de la población bacteriana inicial, lo que equivale a una reducción de 3 log₁₀ UFC/ml" (*Pankey y Sabath, 2004*).

- **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SSPSS Inc., Chicago, EE.UU.). Los resultados obtenidos se transformaron en log₁₀ para favorecer un patrón de distribución normal de los datos, el cual se confirmó

mediante la aplicación del test Kolmogorov-Smirnov. Se aplicó el test de ANOVA para medidas repetidas para el análisis de comparaciones intra- e inter-enjuague de todas las muestras salivales, y los contrastes simple y repetidos para el análisis de comparaciones intra- e inter-enjuague entre 2 muestras salivales. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de bacterias totales, aerobias-anaerobias facultativas y anaerobias estrictas detectadas en saliva en condiciones basales, a los 30 segundos y 1 hora después de efectuar el UE-agua, el UE-CHX 0,12% y el UE-CHX 0,2%.

Tabla 1. Concentraciones de bacterias totales, bacterias aerobias-anaerobias facultativas y anaerobias estrictas en saliva en condiciones basales, a los 30 segundos y 1 hora después de efectuar un único enjuague con agua estéril, CHX al 0,12% y CHX al 0,2%.

MUESTRA SALIVAL	ENJUAGUE	BACTERIAS		
		Totales Log ₁₀ UFC/ml ^c	Aerobias- Anaer. fac. ^a Log ₁₀ UFC/ml ^c	Anaer. estrictas ^b Log ₁₀ UFC/ml ^c
Basal	Agua estéril	8,444 ± 0,303	8,361 ± 0,238	6,645 ± 1,620
	CHX 0,12%	8,348 ± 0,525	8,254 ± 0,477	6,537 ± 1,483
	CHX 0,2%	8,525 ± 0,643	8,448 ± 0,157	6,827 ± 0,553
30 segundos	Agua estéril	8,317 ± 0,250	8,246 ± 0,196	6,459 ± 1,594
	CHX 0,12%	7,897 ± 0,567	7,890 ± 0,576	5,302 ± 0,659
	CHX 0,2%	6,726 ± 0,706	6,725 ± 0,707	2,735 ± 0,910
1 hora	Agua estéril	8,426 ± 0,312	8,345 ± 0,242	6,625 ± 1,632
	CHX 0,12%	8,214 ± 0,385	8,211 ± 0,386	5,854 ± 0,797
	CHX 0,2%	7,105 ± 0,846	7,104 ± 0,847	3,684 ± 0,714

a- Anaer. fac.= bacterias anaerobias facultativas; b- Anaer. estrictas = bacterias anaerobias estrictas; c- Se expresó la media ± desviación estándar.

En el análisis intra-enjuague se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de bacterias totales, aerobias-anaerobias facultativas y anaerobias estrictas entre los diferentes momentos de recogida de las muestras ($p < 0,001$) (Tabla 2). El UE-agua disminuyó significativamente la población bacteriana total a los 30 segundos después del enjuague con respecto a la concentración bacteriana basal ($p < 0,001$). El UE-CHX 0,12% disminuyó significativamente la población bacteriana total a los 30 segundos ($p < 0,001$) y 1 hora ($p < 0,05$) después del enjuague con respecto a la concentración bacteriana basal. La actividad antimicrobiana fue más significativa sobre las bacterias anaerobias estrictas ($FR = 1,235 \pm 1,479 \log_{10}$ UFC/ml a los 30 segundos post-enjuague y $FR = 0,682 \pm 1,444 \log_{10}$ UFC/ml a la hora post-enjuague; $p < 0,05$ y $p < 0,05$ respectivamente). Por el contrario, las bacterias aerobias-anaerobias facultativas alcanzaron valores basales 1 hora después del enjuague. El UE-CHX 0,2% disminuyó significativamente la población bacteriana total a los 30 segundos y 1 hora después del enjuague con respecto a la concentración bacteriana basal ($p < 0,001$ y $p < 0,001$ respectivamente). La actividad antimicrobiana fue especialmente significativa sobre las bacterias anaerobias estrictas ($FR = 4,091 \pm 1,283 \log_{10}$ UFC/ml a los 30 segundos post-enjuague y $FR = 3,142 \pm 0,917 \log_{10}$ UFC/ml a la hora post-enjuague; $p < 0,001$ y $p < 0,001$ respectivamente). Con respecto a los resultados obtenidos a los 30 segundos post-enjuague, las muestras salivales recogidas 1 hora después de las diferentes aplicaciones de CHX presentaron una recuperación significativa de la flora bacteriana total ($p < 0,001$ con CHX al 0,2% y $p < 0,001$ con CHX al 0,12%)

En el análisis inter-enjuague se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de bacterias totales, aerobias-anaerobias facultativas y anaerobias estrictas entre las diferentes aplicaciones ($p < 0,001$) (Tabla 3). Con respecto al UE-agua, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones bacterianas totales después del enjuague con las CHX al 0,12% y al 0,2%, tanto a los 30 segundos ($p < 0,001$ y $p < 0,001$ para ambas concentraciones) como 1 hora después de concluir el enjuague ($p < 0,001$ y $p < 0,001$ para ambas

concentraciones). Al comparar los 2 colutorios de CHX, la CHX al 0,2% presentó una mayor actividad antimicrobiana sobre la flora salival que la CHX al 0,12%, tanto a los 30 segundos ($FR = 1,171 \pm 0,596 \log_{10}$ UFC/ml, $p < 0,001$) como a la hora post-enjuague ($FR = 1,109 \pm 0,684 \log_{10}$ UFC/ml, $p < 0,001$). Estas diferencias resultaron especialmente significativas sobre la población de bacterias anaerobias estrictas ($FR = 2,567 \pm 1,272 \log_{10}$ UFC/ml a los 30 segundos post-enjuague y $FR = 2,170 \pm 1,273 \log_{10}$ CFU/ml a la hora post-enjuague; $p < 0,001$ y $p < 0,001$ respectivamente).

Tabla 2. Comparaciones intra-enjuague de las concentraciones de bacterias totales, aerobias-anaerobias facultativas y anaerobias estrictas en saliva en condiciones basales, a los 30 segundos y 1 hora después de efectuar un único enjuague con agua estéril, CHX al 0,12% y CHX al 0,2%.

COMPARACIONES INTRA-ENJUAGUE	BACTERIAS		
	Totales Factor de reducción $\log_{10}$ UFC/ml ^c	Aerobias- Anaer. fac. ^a Factor de reducción $\log_{10}$ UFC/ml ^c	Anaer. estrictas ^b Factor de reducción $\log_{10}$ UFC/ml ^c
Agua estéril (Basal)			
Agua estéril (30 seg)	$0,127 \pm 0,737^{**}$	$0,114 \pm 0,063^{**}$	$0,185 \pm 0,067^{**}$
Agua estéril (Basal)			
Agua estéril (1 h)	$0,018 \pm 0,046$	$0,015 \pm 0,040$	$0,019 \pm 0,133$
Agua estéril (30 seg)			
Agua estéril (1 h)	$-0,109 \pm 0,096^{**}$	$-0,098 \pm 0,079^{**}$	$-0,165 \pm 0,139^{**}$
CHX 0,12% (Basal)			
CHX 0,12% (30 seg)	$0,450 \pm 0,210^{**}$	$0,364 \pm 0,204^{**}$	$1,235 \pm 1,479^{**}$
CHX 0,12% (Basal)			
CHX 0,12% (1 h)	$0,133 \pm 0,235^{*}$	$0,043 \pm 0,104$	$0,682 \pm 1,444^{*}$
CHX 0,12% (30 seg)			
CHX 0,12% (1 h)	$-0,316 \pm 0,267^{**}$	$-0,321 \pm 0,273^{**}$	$-0,552 \pm 0,797^{**}$
CHX 0,2% (Basal)			
CHX 0,2% (30 seg)	$1,799 \pm 0,683^{**}$	$1,723 \pm 0,658^{**}$	$4,091 \pm 1,283^{**}$
CHX 0,2% (Basal)			
CHX 0,2% (1 h)	$1,420 \pm 0,853^{**}$	$1,344 \pm 0,843^{**}$	$3,142 \pm 0,917^{**}$
CHX 0,2% (30 seg)			
CHX 0,2% (1 h)	$-0,379 \pm 0,563^{**}$	$-0,378 \pm 0,563^{**}$	$-0,948 \pm 0,578^{**}$

a- Anaer. fac.= bacterias anaerobias facultativas; b- Anaer. estrictas = bacterias anaerobias estrictas; c- Se expresó la media $\pm$ desviación estándar; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Tabla 3. Comparaciones inter-enjuague de las concentraciones de bacterias aerobias-anaerobias facultativas y anaerobias estrictas en saliva en condiciones basales, a los 30 segundos y 1 hora después de efectuar un único enjuague con agua estéril, CHX al 0,12% y CHX al 0,2%.

COMPARACIONES INTER-ENJUAGUE	BACTERIAS		
	Totales Factor de reducción Log ₁₀ UFC/ml ^c	Aerobias- Anaer. fac. ^a Factor de reducción Log ₁₀ UFC/ml ^c	Anaer. estrictas ^b Factor de reducción Log ₁₀ UFC/ml ^c
Agua estéril (Basal) CHX 0,12% (Basal)	0,096 ± 0,249	0,106 ± 0,284	0,107 ± 0,960
Agua estéril (30 seg) CHX 0,12% (30 seg)	0,419 ± 0,370**	0,356 ± 0,418*	1,157 ± 1,592*
Agua estéril (1 h) CHX 0,12% (1 h)	0,211 ± 0,180**	0,134 ± 0,203*	0,770 ± 1,286*
Agua estéril (Basal) CHX 0,2% (Basal)	-0,806 ± 0,293	-0,087 ± 0,233	-0,181 ± 1,554
Agua estéril (30 seg) CHX 0,2% (30 seg)	1,591 ± 0,693**	1,521 ± 0,643**	3,724 ± 1,952**
Agua estéril (1 h) CHX 0,2% (1 h)	1,321 ± 0,824**	1,241 ± 0,774**	2,941 ± 1,817**
CHX 0,12% (Basal) CHX 0,2% (Basal)	-0,177 ± 0,523	-0,193 ± 0,447	-0,289 ± 1,237
CHX 0,12% (30 seg) CHX 0,2% (30 seg)	1,171 ± 0,596**	1,165 ± 0,601**	2,567 ± 1,272**
CHX 0,12% (1 h) CHX 0,2% (1 h)	1,109 ± 0,684**	1,107 ± 0,684**	2,170 ± 1,273**

a- Anaer. fac.= bacterias anaerobias facultativas; b- Anaer. estrictas = bacterias anaerobias estrictas; c- Se expresó la media ± desviación estándar; * p < 0,05, ** p< 0,001

DISCUSIÓN

En la mayoría de los estudios microbiológicos más recientes en los que se evalúa la actividad antibacteriana de la CHX al 0,12% o al 0,2% sobre la flora salival, este antiséptico se aplica como control positivo, para analizar los resultados obtenidos con otros principios activos (Moran *et al*, 1995; Fernandes-Naglik *et al*, 2001). Los resultados de estos trabajos son difícilmente comparables, ya que existen importantes discrepancias

en relación a los volúmenes y/o los tiempos de aplicación de los colutorios de CHX empleados, las muestras de saliva utilizadas (no estimulada, estimulada, o post-enjuague con agua o suero salino) (Addy y Wright, 1978; Dahlen, 1984; Sreenivasan y Gittins, 2004) y las características de su procesamiento (empleo de agentes neutralizadores en los medios de transporte y/o de cultivo, número de diluciones seriadas y tipo de población bacteriana cultivada) (Addy et al, 1991; Jenkins et al, 1994; Buckner et al, 1994; Pitten y Kramer, 1999; Sreenivasan y Gittins, 2004).

Se ha descrito que la actividad antibacteriana de la CHX es extremadamente rápida con un efecto máximo detectado a los 20 segundos después de su aplicación (McDonnell y Russell, 1999). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos publicados el efecto antibacteriano inmediato de la CHX se determinó a los 30 minutos post-enjuague (Addy et al, 1991; Jenkins et al, 1991; Reynolds et al, 1991; Harper et al, 1995; Moran et al, 1995; Elworthy et al, 1996). Para estudiar la duración de la actividad antibacteriana de un antiséptico, los diferentes autores efectuaron entre 1-4 determinaciones (que oscilan desde 1 hora hasta 7 horas post-enjuague) (Harper et al, 1995; Morán et al, 1995; Herrera et al, 2003; Sreenivasan y Gittins, 2004). En la presente serie, el efecto antibacteriano inmediato se determinó a los 30 segundos post-enjuague y para el estudio de su duración se efectuó una única determinación 1 hora después la aplicación de la CHX.

Se han aplicado diferentes criterios para expresar los resultados microbiológicos obtenidos después de la aplicación de la CHX: diferencias estadísticamente significativas (Fernandes-Naglik et al, 2001), eficacia antimicrobiana definida como “una reducción en la concentración bacteriana basal $\geq 1 \log_{10}$ UFC/ml” (Pitten y Kramer, 1999), o actividad bactericida definida como “aquella que origina un descenso de al menos un 99,9% de la población bacteriana inicial” (Pankey y Sabath, 2004).

En individuos con buen estado de salud periodontal, se ha demostrado que las variaciones inter- e intra-individuales de las concentraciones bacterianas salivales basales son mínimas (*Addy et al, 1991; Reynolds et al, 1991*). Este resultado concuerda con el estrecho rango de concentraciones bacterianas basales obtenido en la presente serie.

Algunos autores han señalado que un enjuague con agua estéril no altera la población bacteriana basal (*Addy y Wright, 1978; Addy et al, 1989*), por lo que se ha sugerido que el efecto de "arrastre mecánico" inherente a la acción de enjuagarse no tiene repercusión microbiológica (*Altonen et al, 1976*). Por el contrario en la presente serie, coincidiendo con Pitten y Kramer (*Pitten y Kramer, 1999*) y Herrera et al (*Herrera et al, 2003*), el UE-agua disminuyó significativamente la concentración bacteriana total, aunque este efecto fue transitorio, el FR fue muy bajo ($0,127 \pm 0,737 \log_{10}$ UFC/ml) y la concentración bacteriana salival 1 hora después del enjuague era similar a la basal.

Bruckner et al (*Bruckner et al, 1994*), Briner et al (*Briner et al, 1994*) y Fernandes-Naglik et al (*Fernandes-Naglik et al, 2001*) demostraron que la práctica de un único enjuague de CHX al 0,12% (15 ml/durante 30 segundos) provocaba una reducción significativa de la flora salival 1 minuto, 30 minutos y 1 hora después de la aplicación, aunque este descenso fue $<1 \log_{10}$ UFC/ml. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente serie. Por el contrario, Jenkins et al (*Jenkins et al, 1991*) y Moran et al (*Moran et al, 1995*) demostraron que la práctica de un único enjuague de CHX al 0,2% (10 ml/durante 1 minuto) provocaba una reducción significativa de la flora salival a los 30 minutos y 1 hora después de la aplicación, detectándose un descenso $\geq 1 \log_{10}$ UFC/ml. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente serie.

En la mayoría de las series que evalúan el efecto antibacteriano sobre la flora salival de las CHX al 0,12% o 0,2%, los autores coinciden en que la actividad antimicrobiana se mantiene o incluso aumenta 1 hora después de efectuar el enjuague,

con respecto a la detectada en las muestras inmediatas (*Addy et al, 1989; Jenkins et al, 1990; Jenkins et al, 1991; Reynolds et al, 1991; Briner et al, 1994; Buckner et al, 1994; Moran et al, 1995; Fernandes-Naglik et al, 2001*). Por el contrario, en la presente serie, se observó un efecto de “recrecimiento” de la flora salival 1 hora después de la aplicación del colutorio de CHX (con ambas concentraciones) con respecto a los valores obtenidos a los 30 segundos post-enjuague. Aunque desconocemos las causas de esta discrepancia, probablemente respondan a diferencias metodológicas.

Se han publicado muy pocos estudios en los que se haya comparado el efecto antibacteriano *in vivo* de una única aplicación de CHX al 0,12% *versus* CHX al 0,2 % sobre la flora salival (*Addy et al, 1991; Harper et al, 1995*). Addy et al (*Addy et al, 1991*) estudiaron la sustantividad en saliva de varios colutorios de CHX a diferentes concentraciones (10 ml de CHX al 0,2%, 15 ml de CHX al 0,12% y 15 ml de CHX al 0,1% durante 1 minuto). A los 30 minutos post-enjuague los colutorios de CHX al 0,2% y 0,12% presentaron efectos significativos sobre la concentración bacteriana (descenso de ≥ 1 log₁₀ UFC/ml) que persistieron hasta 7 horas después del enjuague. Harper et al (*Harper et al, 1995*) también evaluaron la sustantividad de varios colutorios de CHX con diferentes concentraciones y volúmenes, aplicados durante 1 minuto (10 ml de CHX al 0,2%, 15 ml de 2 CHX al 0,12% y 15 ml de CHX al 0,1% disuelta en 30 ml de agua). En contraste con el enjuague con suero salino, la mayor actividad antibacteriana a los 30 minutos post-enjuague la presentaron la CHX al 0,2% y las 2 CHX al 0,12%. Estas diferencias significativas persistieron hasta las 5 horas post-enjuague para los 3 colutorios de CHX, aunque a las 7 horas este efecto solo se observó con la CHX al 0,2% y una de las CHX al 0,12% (Prexidine®). Coincidiendo con Addy et al (*Addy et al, 1991*), Harper et al (*Harper et al, 1995*) ratificaron que la actividad antibacteriana de la CHX es de carácter dosis-dependiente.

Se ha descrito la importancia de la concentración de la CHX sobre su actividad antibacteriana (*Hugo y Longworth, 1966; McDonnell y Russell, 1999; Maillard, 2002*). Sin

embargo, no hemos encontrado en la literatura ningún estudio en el que se evalúe *in vivo* el efecto antibacteriano sobre la flora salival de una única aplicación de CHX al 0,12% *versus* CHX al 0,2% utilizando volúmenes de colutorio similares, para poder determinar la influencia de la concentración de CHX aplicada. Recientemente, Sreenivasan y Gittins (Sreenivasan y Gittins, 2004) compararon la eficacia antibacteriana sobre la flora salival de un enjuague único de 15 ml de CHX durante 30 segundos al 0,12%, al 0,06% y al 0,03%, hasta 3 horas después de su aplicación. Respecto al enjuague control, los enjuagues de CHX provocaron reducciones significativas sobre la flora salival y la concentración de bacterias productoras de sulfuro de hidrógeno hasta 1,5 y 3 horas post-enjuague, aumentando la actividad antibacteriana cuanto mayor era la concentración de CHX. Estos hallazgos coinciden con los de otros autores, que previamente habían descrito una mayor actividad antibacteriana de la CHX al 0,12% que al 0,1% (Addy *et al*, 1991), confirmando que la acción de la CHX es concentración-dependiente. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente serie.

En algunos estudios *in vitro* sobre susceptibilidad antibacteriana de la CHX frente a aislamientos procedentes de saliva y placa dental se han observado que los anaerobios estrictos muestran un perfil mayor de sensibilidad que las bacterias aerobias o anaerobias facultativas. Con respecto a valores de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), McBain *et al* (McBain *et al*, 2003) demostraron que *Actinomyces naeslundii* era la bacteria más sensible a la CHX, seguida de anaerobios estrictos Gram-negativos como *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* y *Veillonella dispar*. En consonancia con estas aportaciones, ambas concentraciones de CHX estudiadas en la presente serie ejercieron una actividad antibacteriana particularmente intensa frente a anaerobios estrictos, aunque sólo la CHX al 0,2% presentó actividad bactericida ($FR \geq 3 \log_{10} \text{ UFC/ml}$)

En conclusión, la CHX al 0,2% presentó una actividad antimicrobiana significativamente mayor que la CHX al 0,12% a los 30 segundos y 1 hora después de su aplicación, corroborando la influencia de la concentración sobre su actividad antibacteriana.

En consecuencia, la concentración de la CHX es un factor importante a tener en cuenta en aquellas situaciones clínicas en las que se precise un elevado efecto antibacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. The effect of some chlorhexidine-containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 90-93.
- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. Toothpastes containing 0.3% and 0.5% triclosan. II. Effects of single brushings on salivary bacterial counts. *Am J Dent* 1989; 2: 215-219.
- Addy M, Moran JM. Evaluation of oral hygiene products: science is true; don't be misled by the facts. *Periodontol 2000* 1997; 15: 40-51.
- Addy M, Wright R. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* antibacterial properties of povidone iodine and chlorhexidine gluconate mouthrinses. *J Clin Periodontol* 1978; 5: 198-205.
- Altonen M, Saxen L, Kosunen T, Ainamo J. Effect of two antimicrobial rinses and oral prophylaxis on preoperative degerming of saliva. *Int J Oral Surg* 1976; 5: 276-284.
- Borneff J, Eggers HJ, Grün L et al. Directives for the testing and evaluation of chemical disinfection methods-1st part (1.1.1981). I. *In vitro* tests. II. Tests under medical practice conditions. 1. Hygienic hand disinfection. 2. Surgical hand disinfection. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* 1981; 172: 534-562.
- Briner WW, Kayrouz GA, Chanak MX. Comparative antimicrobial effectiveness of a substantive (0.12% chlorhexidine) and a nonsubstantive (phenolic) mouthrinse *in vivo* and *in vitro*. *Compendium* 1994; 15: 1158-1170.
- Buckner RY, Kayrouz GA, Briner W. Reduction of oral microbes by a single chlorhexidine rinse. *Compendium* 1994; 15: 512-520.
- Cousido MC, Tomás M, Tomás I, Limeres J, García-Caballero L, Diz P. Effect of a neutralising agent on the evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine on the bacterial salivary flora. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 981-984.
- Dahlen G. Effect of antimicrobial mouthrinses on salivary microflora in healthy subjects. *Scand J Dent Res* 1984; 92: 38-42.
- Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol* 1996; 67: 572-576.
- Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 255-265.

- Fernandes-Naglik L, Downes J, Shirlaw P et al. The clinical and microbiological effects of a novel acidified sodium chlorite mouthrinse on oral bacterial mucosal infections. *Oral Dis* 2001; 7: 276-280
- Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* 2005; 99: 703-715.
- Harper PR, Milsom S, Wade W, Addy M, Moran J, Newcombe RG. An approach to efficacy screening of mouthrinses: studies on a group of French products (II). Inhibition of salivary bacteria and plaque *in vivo*. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 723-727.
- Herrera D, Roldan S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 307-314.
- Hugo WB, Longworth AR. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol* 1966; 18: 569-578.
- Jenkins S, Addy M, Newcombe R. The effect of triclosan, stannous fluoride and chlorhexidine products on: (II) Salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 698-701.
- Jenkins S, Addy M, Newcombe R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthwashes (I). Effects on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 140-144.
- Jenkins S, Addy M, Wade W, Newcombe RG. The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 397-401.
- Maillard JY. Bacterial target sites for biocide action. *J Appl Microbiol* 2002; 92 (Suppl): 16S-27S.
- McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of a chlorhexidine gluconate containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of *in vitro* oral bacterial ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 4770-4776.
- McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 147-179.
- Moran J, Addy M, Wade W, Milson S, McAndrew R, Newcombe RG. The effect of oxidising mouthrinses compared with chlorhexidine on salivary bacterial counts and plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 750-755.
- Navazesh M, Christensen CM. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res* 1982; 61: 1158-1162.

- Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic *versus* bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 864-870.
- Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55: 95-100.
- Reynolds S, Moran J, Addy M, Wade WG, Newcombe R. Taurolin as an oral rinse. I. Antimicrobial effects *in vitro* and *in vivo*. *Clin Prev Dent* 1991; 13: 13-17.
- Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and *de novo* plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 919-925.
- Sreenivasan PK, Gittins E. Effects of low dose chlorhexidine mouthrinses on oral bacteria and salivary microflora including those producing hydrogen sulfide. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 309-313.
- World Health Organization. Oral health surveys, basic methods, 4th edn. Geneva: WHO, 1997.





4. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD *IN VIVO* DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA



4.1. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL APLICANDO MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA.

Oral Diseases 2009 (en prensa).

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo* de un colutorio de digluconato de Clorhexidina (CHX) sobre la flora salival hasta 7 horas después de su utilización, aplicando una técnica de microscopía de epifluorescencia con la solución LIVE/DEAD® BacLight™.

El grupo de estudio lo constituyeron 15 voluntarios adultos que efectuaron un único enjuague de agua estéril (UE-agua) y con CHX al 0,2% (UE-CHX 0,2%). De cada paciente, se recogieron muestras de saliva en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de efectuar el enjuague. La suspensión bacteriana se mezcló con la tinción dual SYTO 9/yoduro de propidio y las observaciones se efectuaron con un microscopio Olympus BX51. Se calculó el porcentaje medio de viabilidad bacteriana de cada muestra salival.

En comparación con los valores basales, la frecuencia de bacterias viables disminuyó significativamente a los 30 segundos después del UE-CHX 0,2% ($p < 0,001$) y persistió la actividad antibacteriana significativa hasta las 7 horas post-enjuague ($p < 0,001$). En comparación con el UE-agua, la prevalencia de viabilidad fueron significativamente inferiores a los 30 segundos post-enjuague de CHX al 0,2% ($p < 0,001$) y ejerció un efecto antibacteriano significativo hasta las 7 horas post-enjuague ($p < 0,001$).

En conclusión, la microscopía de epifluorescencia con la solución dual SYTO 9/yoduro de propidio es un método eficaz que permite la cuantificación en “tiempo real” de la actividad antimicrobiana de la CHX sobre la flora salival. La aplicación de técnicas de fluorescencia podría resultar particularmente útil para analizar simultáneamente la actividad de antimicrobianos que alteran la integridad de la membrana citoplasmática sobre diferentes ecosistemas orales.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la actividad antibacteriana *in vivo* de un antiséptico implica el análisis de su efecto inmediato y de su sustantividad. Se ha demostrado que la Clorhexidina (CHX) provoca el mayor efecto antibacteriano inmediato y presenta la mayor sustantividad *in vivo* en comparación a otros antisépticos empleados en la cavidad oral (Moran *et al*, 1992; Jenkins *et al*, 1994; Elworthy *et al*, 1996; Balbuena *et al*, 1998).

A partir de los primeros resultados aportados por Schiott *et al* en 1970 (Schiott *et al*, 1970), existen numerosos estudios en la literatura en los que se evalúan la sustantividad de la CHX sobre la flora salival (Moran *et al*, 1992; Jenkins *et al*, 1994; Elworthy *et al*, 1996; Balbuena *et al*, 1998). La determinación de los recuentos bacterianos salivales representa una prueba aceptada por la comunidad científica para investigar el efecto antibacteriano *in vivo* de la CHX (Addy y Moran, 1997; Sekino *et al* 2003), siendo considerada predictora de su sustantividad (Roberts y Addy, 1981; Addy *et al*, 1989; Jenkins *et al*, 1994).

En la mayoría de las series publicadas, la determinación de la actividad antimicrobiana de la CHX en saliva se efectuó con técnicas microbiológicas de cultivo en placa (Moran *et al*, 1992; Jenkins *et al*, 1994; Elworthy *et al*, 1996; Balbuena *et al*, 1998). Sin embargo, hay autores que cuestionaron la fiabilidad de estas técnicas y propusieron como alternativa los métodos de fluorescencia que emplean fluorocromos específicos para el marcaje de bacterias viables y no-viables (Weiger *et al*, 1998). La solución de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) la componen 2 fluorocromos, SYTO-9 y yoduro de propidio (YP), que al ser aplicados simultáneamente permiten diferenciar entre bacterias con membranas intactas (emiten fluorescencia verde) y bacterias con membranas dañadas (emiten fluorescencia roja). La solución de fluorescencia SYTO 9/YP ha sido aplicada en diferentes técnicas como: microscopía de epifluorescencia (Weiger *et al*, 1998; Boulos *et al*, 1999), microscopía de

láser confocal (*Hope y Wilson 2004; Van der Mei et al, 2006; Filoche et al, 2007*), citometría de flujo (*Lehtinen et al, 2004; Berney et al, 2007*) y espectroscopia de fluorescencia usando un lector de microplaca o electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser (*Hoerr et al, 2007*).

Por consiguiente, esta solución detecta viabilidad bacteriana en base a la integridad de la membrana citoplasmática, por lo que se ha considerado especialmente útil para analizar la actividad antimicrobiana de la CHX (*Hope y Wilson, 2004; Filoche et al, 2007*). Hasta la actualidad, la solución SYTO 9/YP se ha aplicado sólo para estudiar la acción antibacteriana de la CHX sobre el biofilm (*Hope y Wilson, 2004; Van Der Mei et al, 2006; Filoche et al, 2007*), ya que no hemos encontrado referencias sobre su empleo en otros ecosistemas orales como la flora salival.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo* de un colutorio de digluconato de CHX sobre la flora salival hasta 7 horas después de su utilización, aplicando una técnica de epifluorescencia con la solución LIVE/DEAD® BacLight™.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Selección del grupo de estudio y recogida de muestras salivales**

El grupo de estudio estuvo formado por 15 voluntarios adultos con edades comprendidas entre los 20 y 45 años que presentaban un buen estado de salud oral: mínimo de 24 dientes permanentes explorables, sin evidencia de gingivitis ni periodontitis (Community Periodontal Index score= 0) (*World Health Organisation, 1997*), y ausencia de caries. Los criterios de exclusión aplicados fueron: fumar, ser portador de prótesis dentales o aparatos ortodóncicos, haber recibido antibióticos o utilizar de forma rutinaria antisépticos orales durante los últimos 3 meses, y padecer alguna enfermedad sistémica

que provoque una alteración en la producción y/o composición de la saliva. Previamente al inicio del estudio, a todos los voluntarios se les efectuó una tartrectomía.

De cada voluntario, se recogieron muestras de saliva no estimulada (1 ml) en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de realizar bajo supervisión:

- 1) Un único enjuague de 10 ml durante 30 segundos de agua estéril (control negativo) (UE-agua).
- 2) Un único enjuague de 10 ml durante 30 segundos con CHX al 0,2% en solución acuosa (Oraldine Perio®, Johnson and Johnson, Madrid, España) (UE-CHX 0,2%).

Los participantes no practicaron ninguna técnica de higiene oral desde la noche anterior al experimento; el día del experimento, se les prohibió ingerir alimentos o bebidas, y fumar desde 1 hora antes de la primera recogida salival y durante el transcurso del experimento. En el día del experimento, la hora de recogida de muestras salivales osciló entre las 11:50 horas de la mañana (muestra basal) hasta las 7:00 horas de la tarde (última muestra recogida 7 horas después de concluir en enjuague). Aplicando un sistema de aleatorización equilibrada, todos los voluntarios efectuaron los 2 enjuagues, estableciéndose un “período de descanso” de 2 semanas entre las diferentes aplicaciones. Las muestras de saliva no estimulada se recogieron aplicando métodos previamente descritos (“spitting method”) (Navazesh y Christensen, 1982).

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela. En todos los casos se obtuvo por escrito el consentimiento informado de los participantes en el estudio.

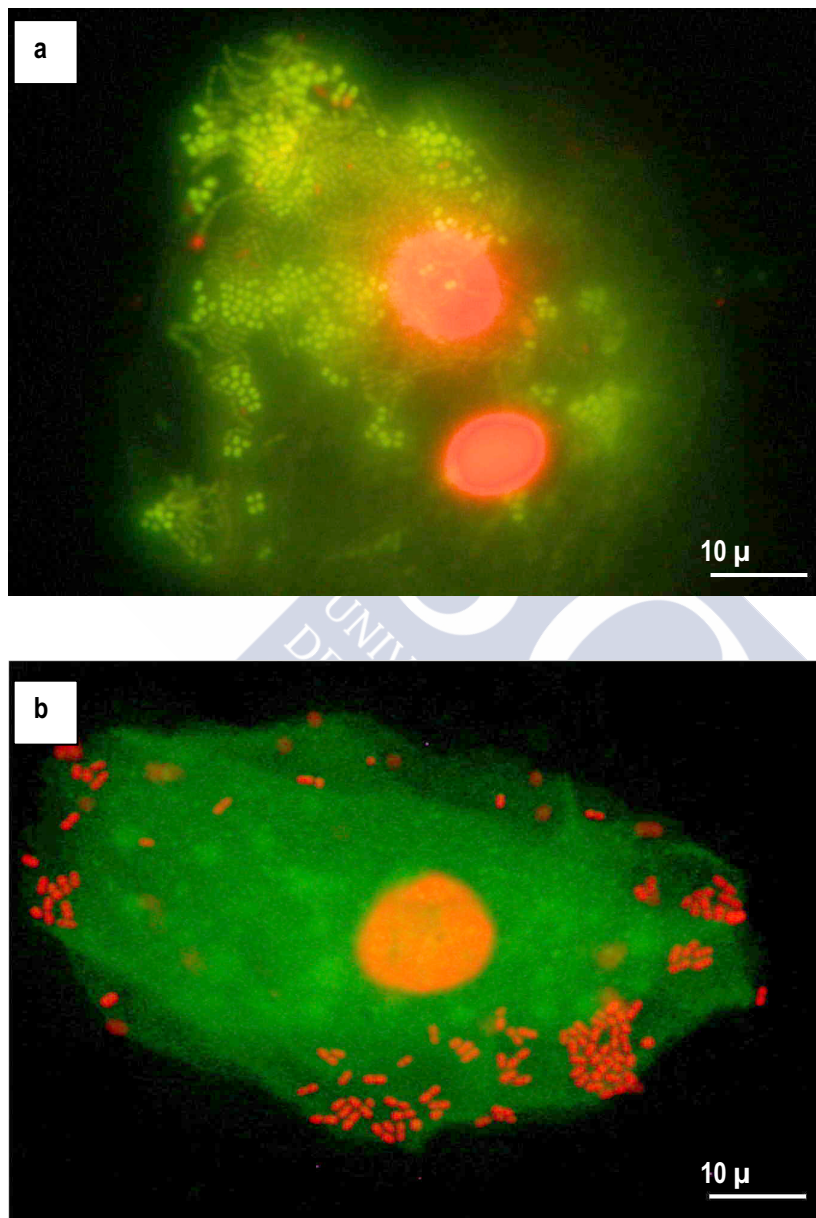
- **Procesamiento de las muestras salivales**

La solución de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™ se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante en 5 ml de agua esterilizada y filtrada usando un filtro de

membrana Millipore de 0,22 μm (Millipore Ibérica S.A., Madrid, España), , alcanzando una proporción 1:1 de ambos fluorocromos y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras de saliva se centrifugaron a 2000 rpm durante 6 minutos. El sobrenadante se desechó y el pellet obtenido fue resuspendido en 100 μl de agua estéril. Después de agitar la suspensión bacteriana para homogeneizarla, se mezcló con 100 μl de la solución de fluorescencia y se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La observación microscópica la realizaron 2 investigadores que desconocían el diseño del estudio, empleando un microscopio Olympus BX51 (Olympus, Tokio, Japón) equipado con un set de filtros para fluoresceína y Texas Red. El conteo de bacterias viables y no-viables se realizó a gran aumento (100x) en 20 campos microscópicos (10 campos por porta) que presentaban un mínimo de 100-150 bacterias y se excluyeron los agregados bacterianos (Figura 1). Se calculó el porcentaje medio de viabilidad bacteriana de cada muestra salival y a la diferencia en el porcentaje de bacterias viables entre 2 muestras salivales se le denominó “Reducción de la Viabilidad” (RV). Los valores positivos de RV representan un descenso de la viabilidad bacteriana y los valores negativos de RV un incremento de la viabilidad bacteriana.

Simultáneamente, para contrastar los resultados obtenidos con la microscopía de epifluorescencia *versus* cultivos en placa, en 5 voluntarios se recogieron muestras de saliva no estimulada (2 ml) en condiciones basales, y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de realizar el UE-CHX 0,2%. Se efectuaron diluciones seriadas y las muestras resultantes se cultivaron y subcultivaron en medios de cultivos convencionales para el aislamiento de bacterias aerobias/anaerobias facultativas y anaerobias estrictas tal y como se describió previamente (Tomás *et al*, 2008). Se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) y los resultados se expresaron en logaritmos decimales ($\log_{10}$ UFC/ml).

Figura 1a,b. Bacterias de la flora salival con membranas intactas (emitiendo fluorescencia verde) y con membranas dañadas (emitiendo fluorescencia roja) sobre células epiteliales (objetivo x100).



- **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.). Se determinó el coeficiente de correlación intraclase para obtener el grado de consistencia o acuerdo intra-examinador y inter-examinador en el conteo de bacterias viables y no-viables. La elección de un test paramétrico o no paramétrico dependió del tipo de distribución de los valores de la variable cuantitativa analizada; lo cual se determinó aplicando el test Kolmogorov-Smirnov. Todas las variables cuantitativas analizadas mostraron una distribución normal. Se aplicó el test de ANOVA para medidas repetidas para el análisis de comparaciones intra- e inter-enjuague de todas las muestras salivales, y los contrastes simples para el análisis de comparaciones intra- e inter-enjuague entre 2 muestras salivales. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

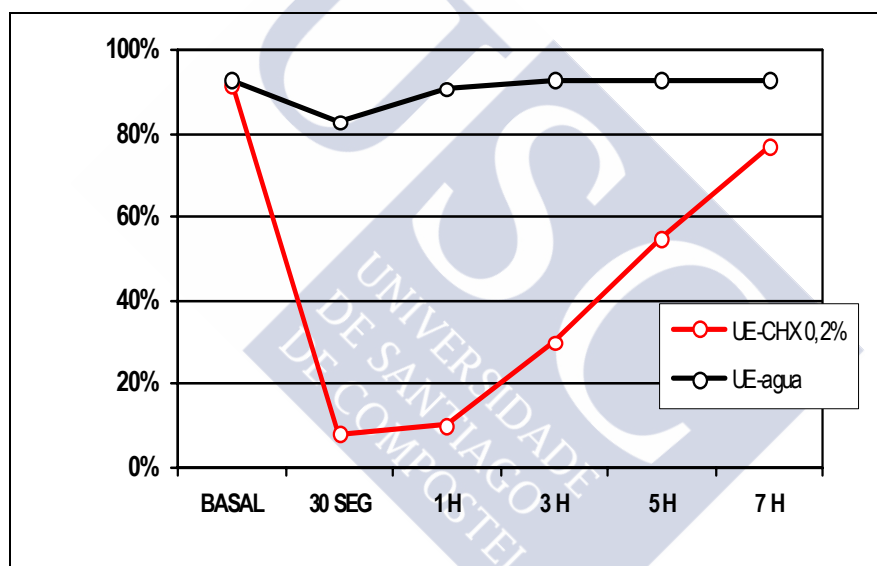
En el análisis intra-examinador, el coeficiente de correlación intraclase promedio obtenido en las diferentes tomas salivales fue 0,850 ($p < 0,001$) y en el análisis inter-examinador fue 0,890 ($p < 0,001$).

En la Figura 2 se muestran los porcentajes medios de viabilidad bacteriana salival en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después del UE-agua y del UE-CHX 0,2%.

En el análisis intra-enjuague, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad bacteriana entre los diferentes tiempos de recogida de las muestras ($p < 0,001$) (Tabla 1). En comparación con los valores basales, la frecuencia de bacterias viables disminuyó significativamente a los 30 segundos después del UE-agua ($RV = 10,13\% \pm 0,51\%$, $p < 0,001$) y del UE-CHX 0,2% ($RV = 91,35\% \pm 4,37\%$, $p < 0,001$). En comparación con los valores basales, la CHX al 0,2% ejerció una actividad

antibacteriana significativa hasta las 7 horas post-enjuague ($RV = 14,14\% \pm 11,56\%$, $p < 0,05$). En comparación con los valores obtenidos a los 30 segundos después del UE-CHX 0,2%, se apreció una “recuperación” significativa de la población bacteriana en las tomas salivales posteriores a su aplicación, con un RV que osciló entre $-9,53\% \pm 6,24\%$ a la hora post-enjuague ($p < 0,001$) y $-76,06\% \pm 11,72\%$ a las 7 horas post-enjuague ($p < 0,001$) (Tabla 1).

Figura 2. Porcentajes de viabilidad bacteriana en saliva en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación del único enjuague de agua estéril y del colutorio de clorhexidina al 0,2%.



VIABILIDAD BACTERIANA (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua	92,87 ± 1,80	82,73 ± 2,05	92,27 ± 2,76	92,60 ± 2,09	93,27 ± 1,43	93,13 ± 1,95
UE-CHX 0,2%	92,14 ± 4,24	0,80 ± 1,20	10,33 ± 7,28	29,73 ± 14,85	55,13 ± 19,96	76,87 ± 12,00

BASAL= Muestra de saliva recogida en condiciones basales; 30 SEG= Muestra de saliva recogida a los 30 segundos después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 1 H= Muestra de saliva recogida 1 hora después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 3 H= Muestra de saliva recogida 3 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 5 H= Muestra de saliva recogida 5 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 7 H= Muestra de saliva recogida 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; UE= único enjuague; CHX= clorhexidina

En la muestra pre-enjuague, la frecuencia de bacterias viables fue similar en ambos grupos (UE-agua y UE-CHX 0,2%). En comparación con el UE-agua, las prevalencias de viabilidad fueron significativamente inferiores a los 30 segundos post-enjuague de CHX al 0,2% (RV= 81,93% $\pm$ 2,46%, $p < 0,001$). En comparación con el UE-agua, la CHX al 0,2% ejerció un efecto antibacteriano significativo hasta las 7 horas post-enjuague (RV= 16,26% $\pm$ 11,72%, $p < 0,001$) (Tabla 1).

Tabla 1. Comparaciones intra-enjuague e inter-enjuague de los porcentajes de viabilidad bacteriana en saliva en condiciones basales, a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación de un único enjuague de agua estéril y clorhexidina al 0,2%.

ANÁLISIS INTRA-ENJUAGUE (UE-agua y UE-CHX 0,2%) Diferencia de Medias $\pm$ Desviación estándar (Reducción de la viabilidad en %)					
	BASAL vs 30 SEG	BASAL vs 1 H 30 SEG vs 1 H	BASAL vs 3 H 30 SEG vs 3 H	BASAL vs 5 H 30 SEG vs 5 H	BASAL vs 7 H 30 SEG vs 7 H
UE-agua	10,13 $\pm$ 0,51**	0,60 $\pm$ 1,29 -9,53 $\pm$ 1,18**	0,26 $\pm$ 1,48 -9,86 $\pm$ 1,45**	-0,40 $\pm$ 1,68 -10,53 $\pm$ 1,76**	-0,26 $\pm$ 0,79 -10,40 $\pm$ 0,91**
UE-CHX 0,2%	91,35 $\pm$ 4,37**	81,92 $\pm$ 8,66** -9,53 $\pm$ 6,24**	61,35 $\pm$ 15,09** -28,93 $\pm$ 14,10**	35,50 $\pm$ 18,77** -54,33 $\pm$ 19,21**	14,14 $\pm$ 11,56** -76,06 $\pm$ 11,72**
ANÁLISIS INTER-ENJUAGUE (UE-agua vs UE-CHX 0,2%) Diferencia de Medias $\pm$ Desviación estándar (Reducción de la viabilidad en %)					
agua vs CHX BASAL	agua vs CHX 30 SEG	agua vs CHX 1 H	agua vs CHX 3 H	agua vs CHX 5 H	agua vs CHX 7 H
0,85 $\pm$ 5,49	81,93 $\pm$ 2,46**	81,93 $\pm$ 7,95**	62,86 $\pm$ 15,32**	38,13 $\pm$ 19,80**	16,26 $\pm$ 11,72**

BASAL= Muestra de saliva recogida en condiciones basales; 30 SEG= Muestra de saliva recogida a los 30 segundos después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 1H= Muestra de saliva recogida 1 hora después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 3 H= Muestra de saliva recogida 3 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 5 H= Muestra de saliva recogida 5 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 7 H= Muestra de saliva recogida 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; UE= único enjuague; CHX= clorhexidina

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Aplicando técnicas microbiológicas de cultivo en placa, la concentración bacteriana salival en condiciones basales fue $8,146 \pm 0,300 \log_{10}$ UFC/ml. Después del UE-CHX 0,2%, las concentraciones bacterianas detectadas en flora salival fueron: a los 30

segundos, $5,481 \pm 0,652 \log_{10}$ UFC/ml; a la hora, $5,508 \pm 0,432 \log_{10}$ UFC/ml; a las 3 horas, $5,779 \pm 0,558 \log_{10}$ UFC/ml, a las 5 horas, $7,001 \pm 0,310 \log_{10}$ UFC/ml; a las 7 horas, $7,042 \pm 0,491 \log_{10}$ UFC/ml.

DISCUSIÓN

La determinación de los recuentos bacterianos mediante cultivos en placa es la metodología empleada en la mayoría de los trabajos publicados sobre sustentividad *in vivo* de la CHX sobre la flora salival (Morán *et al*, 1992; Jenkins *et al*, 1994; Elworthy *et al*, 1996; Balbuena *et al*, 1998). Sin embargo, hay autores que han cuestionado la fiabilidad de esta técnica, a la que atribuyen numerosos inconvenientes como: representar un análisis retrospectivo de la vitalidad bacteriana (Berney *et al*, 2007); el conteo se basa en la determinación del número de UFC/ml y no del número de bacterias individuales (Weiger *et al*, 1998); la dificultad en garantizar los requerimientos fisiológicos y metabólicos de una comunidad polimicrobiana (como es la flora salival) para su reproducción *in vitro* (Nadkarni *et al*, 2002; Biggerstaff *et al*, 2006); la existencia de factores como los medios de transporte y de cultivo, la temperatura, la atmósfera y el periodo de incubación, que condicionan su reproductibilidad (Boulos *et al*, 1999; Lehtinen *et al*, 2004). Estos inconvenientes podrían favorecer la infraestimación de la vitalidad bacteriana (Boulos *et al*, 1999) o incluso la sobreestimación de algunos géneros bacterianos. Por otra parte, la heterogeneidad de las metodologías aplicadas (el uso de agentes neutralizantes de la CHX en los medios de transporte y/o cultivo, el número de diluciones seriadas, el tipo de población bacteriana cultivada y la aplicación de diferentes criterios para la interpretación de los hallazgos) (Addy *et al*, 1991; Jenkins *et al*, 1994; Buckner *et al*, 1994; Pitten y Kramer 1999; Sreenivasan y Gittins, 2004) dificulta la comparación de los resultados entre las diferentes series.

En consecuencia, algunos autores propusieron como metodología alternativa para la cuantificación de poblaciones bacterianas viables, el empleo de la microscopía de epifluorescencia con fluorocromos específicos, como la solución LIVE/DEAD® BacLight™

(Boulos *et al*, 1999; Nadkarni *et al*, 2002). Entre las ventajas más destacables de este sistema se incluyen: es una técnica rápida y de fácil uso, que cuantifica la viabilidad bacteriana en "tiempo real" (Boulos *et al*, 1999); la solución SYTO 9/YP permite la determinación simultánea de bacterias viables y no-viables (Boulos *et al*, 1999); la posibilidad de detectar bacterias no cultivables con técnicas de cultivo en placa (Joux y Lebaron, 2000; Berney *et al*, 2007).

Algunos autores estudiaron la correlación de ambas técnicas (cultivo en placa *versus* microscopía de epifluorescencia con la solución SYTO 9/YP) para la cuantificación bacteriana en muestras de agua potable, obteniéndose resultados heterogéneos sobre viabilidad bacteriana entre ambas técnicas (Boulos *et al*, 1999; Lahtinen *et al*, 2006). En nuestra opinión, el efecto antibacteriano inmediato observado con ambas técnicas microbiológicas podría ser interpretado de forma similar. Sin embargo, y de acuerdo con autores previos (Boulos *et al*, 1999; Ihalin *et al*, 2003), observamos que la técnica del cultivo en placa podría sobreestimar la sustentividad *in vivo* de la CHX, ya que detectamos un incremento significativo y progresivo de la viabilidad bacteriana en las diferentes muestras salivales post-enjuague aplicando la técnica de la microscopía de epifluorescencia con la solución SYTO 9/YP.

La ausencia de correlación entre ambas técnicas microbiológicas (cultivo en placa *versus* microscopía de epifluorescencia con la solución SYTO 9/YP) probablemente se debe a las diferentes características descritas para cada técnica. Por otra parte, algunos autores sugirieron que: "*La membrana celular tiene una función vital en la supervivencia bacteriana, pero esto no implica necesariamente que una membrana celular intacta sea viable o cultivable*" (Joux y Lebaron, 2000; Konings *et al*, 2002; Lahtinen *et al*, 2006) y "*No esta claro si las diferencias observadas entre ambas técnicas microbiológicas son debidas a que las bacterias adoptan un estado activo pero no cultivable*" (Hoefel *et al*, 2003).

No obstante, también existen algunos inconvenientes que dificultan la cuantificación bacteriana asociados a la microscopía de epifluorescencia como la coagregación bacteriana (incluso después de homogeneizar la muestra), la tinción de elementos celulares o material contaminante (*Nadkarni et al, 2002*). Incluso, hay autores que opinaron que el examen microscópico de las bacterias teñidas con la solución de fluorescencia es una tarea tediosa, que consume gran cantidad de tiempo y por tanto poco indicada para analizar un gran número de muestras (*Singh, 2006*). En este sentido, un objetivo interesante sería analizar si la sensibilidad de la detección bacteriana sobre la flora salival con la solución de fluorescencia SYTO 9/YP podría incrementarse con el empleo de otras técnicas de fluorescencia como el microscopio de láser confocal, la citometría de flujo o el lector de microplaca de fluorescencia. Otros problemas asociados a la solución SYTO 9/YP incluyen: el daltonismo que afecta al 8-12% de los varones y casi al 1% de las mujeres (*Hope et al, 2002*), la posible influencia del estado fisiológico de la bacteria sobre las propiedades de la tinción (fase de crecimiento exponencial *versus* fase estacionaria) (*Berney et al, 2007*), un grado significativamente mayor de "fijación no-específica" a los componentes de la muestra y mayor "background de fluorescencia" con respecto a otros fluorocromos (*Biggerstaff et al, 2006*) o la detección de colores intermedios (amarillo o naranja) de interpretación desconocida (*Berney et al, 2007*). Se ha especulado que la presencia de estos colores intermedios podría ser consecuencia de grados diferentes de alteración de la membrana celular (*Boulos et al, 1999; Berney et al, 2007*) o de la penetración lenta del SYTO 9 a través de membranas intactas (*Lehtinen et al, 2004*), especialmente de las bacterias Gram-negativas (*Berney et al, 2007*).

Aunque algunos autores emplearon técnicas de epifluorescencia para el análisis de la flora salival (*Weiger et al, 1997; Weiger et al 1998; Ihalin et al, 2003*), no hemos encontrado ningún trabajo en el que se aplicara la microscopía de epifluorescencia y la solución SYTO 9/YP para evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo* de la CHX sobre la flora salival, por lo que la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por otros autores que aplicaron técnicas de cultivo en placa debe ser interpretada con cautela.

Al ser considerada una técnica observador-dependiente (Hope et al, 2004), resulta importante determinar las correlaciones intra- e inter-observador, cuyos valores en la presente serie fueron $\geq 0,85$.

Con la microscopía de epifluorescencia y la solución de diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio, Weiger et al (Weiger et al, 1998) encontraron que aproximadamente el 85% de la flora salival es viable en condiciones basales. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente serie (la viabilidad osciló entre el 92-93%).

De acuerdo con los resultados obtenidos por algunos autores con el empleo de técnicas de cultivo en placa (Pitten y Kramer 1999; Herrera et al, 2003), en la presente serie, el U-E con agua estéril provocó un descenso significativo en la viabilidad bacteriana a los 30 segundos post-aplicación (de un 10%) aunque de carácter transitorio.

Numerosos autores han constatado que un UE-CHX 0,2% (10 ml/1 minuto) provocó un efecto antibacteriano inmediato con una reducción $\geq 90\%$ ($\geq 1 \log_{10}$ UFC/ml) en la concentración bacteriana salival con respecto a los valores basales (Jenkins et al, 1991; Reynolds et al, 1991; Simonsson et al, 1991; Moran et al, 1992; Moran et al, 1995) y su sustentividad persiste como mínimo hasta las 7 horas post-aplicación, con una reducción $\geq 90\%$ ($\geq 1 \log_{10}$ UFC/ml) (Jenkins et al, 1991; Reynolds et al, 1991; Moran et al, 1992; Moran et al, 1995). En la presente serie, el UE-CHX 0.2% provocó un descenso inmediato en el porcentaje de bacterias viables ($\geq 90\%$) y esta actividad antimicrobiana fue detectable hasta las 7 horas post-aplicación (la reducción de la viabilidad fue del 14%). A diferencia de los resultados obtenidos en estudios previos basados en técnicas de cultivo en placa (Jenkins et al, 1991; Reynolds et al, 1991; Morán et al, 1992; Morán et al, 1995), en la presente serie, se detectó una recuperación significativa de la viabilidad bacteriana en todas las tomas salivales posteriores en comparación a la obtenida a los 30 segundos post-aplicación de la CHX al 0,2%.

En conclusión, la microscopía de epifluorescencia con la solución LIVE/DEAD® BacLight™ es un método eficaz que permite la cuantificación en “tiempo real” de la viabilidad bacteriana de la flora salival. La aplicación de técnicas de fluorescencia podría resultar particularmente útil para analizar simultáneamente la actividad de antimicrobianos que alteran la integridad de la membrana citoplasmática sobre diferentes ecosistemas orales.

BIBLIOGRAFÍA

- Addy M, Moran J. Evaluation of oral hygiene products: science is true; don't be misled by the facts. *Periodontol 2000* 1997; 15: 40-51.
- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. The effect of some chlorhexidine-containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 90-93.
- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. Toothpastes containing 0.3% and 0.5% triclosan. II. Effects of single brushings on salivary bacterial counts. *Am J Dent* 1989; 2: 215-219.
- Balbuena L, Stambaugh KI, Ramirez SG, Yeager C. Effects of topical oral antiseptic rinses on bacterial counts of saliva in healthy human subjects. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 118: 625-629.
- Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 3283-3290.
- Biggerstaff JP, Le Puil M, Weidow BL et al. New methodology for viability testing in environmental samples. *Mol Cell Probes* 2006; 20: 141-146.
- Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 1999; 37: 77-86.
- Buckner RY, Kayrouz GA, Briner WW. Reduction of oral microbes by a single chlorhexidine rinse. *Compendium* 1994; 15: 512-520.
- Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol* 1996; 67: 572-576.
- Filoche SK, Coleman MJ, Angker L, Sissons CH. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J Microbiol Methods* 2007; 69: 489-496.

- Herrera D, Roldan S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 307-314.
- Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, Andrews S, Saint CP. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *J Microbiol Methods* 2003; 55: 585-597.
- Hoerr V, Ziebuhr W, Kozitskaya S, Katzowitsch E, Holzgrabe U. Laser-induced fluorescence-capillary electrophoresis and fluorescence microplate reader measurement: two methods to quantify the effect of antibiotics. *Anal Chem* 2007; 79: 7510-7518.
- Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1461-1468.
- Hope CK, Clements D, Wilson M. Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. *J Appl Microbiol* 2002; 93: 448-455.
- Ihalin R, Nuutila J, Loimaranta V, Lenander M, Tenonvuo J, Lilius EM. Susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* to killing by peroxidase-iodide-hydrogen peroxide combination in buffer solution and in human whole saliva. *Anaerobe* 2003; 9: 23-30.
- Jenkins S, Addy M, Newcombe R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthwashes (I). Effects on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 140-144.
- Jenkins S, Addy M, Wade W, Newcombe RG. The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 397-401.
- Joux F, Lebaron P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect* 2000; 2: 1523-1535.
- Konings WN, Albers SV, Koning S, Driessen AJ. The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002; 81: 61-72.
- Lahtinen SJ, Gueimonde M, Ouwehand AC, Reinikainen JP, Salminen SJ. Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiol* 2006; 23: 571-577.
- Lehtinen J, Nuutila J, Lilius EM. Green fluorescent protein-propidium iodide (GFP-PI) based assay for flow cytometric measurement of bacterial viability. *Cytometry* 2004; 60: 165-172.

- Moran J, Addy M, Wade W, Milson S, McAndrew R, Newcombe RG. The effect of oxidising mouthrinses compared with chlorhexidine on salivary bacterial counts and plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 750-755.
- Moran J, Addy M, Wade WG et al. A comparison of delmopinol and chlorhexidine on plaque regrowth over a 4-day period and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 749-753.
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002; 148: 257-266.
- Navazesh M, Christensen CM. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res* 1982; 61: 1158-1162.
- Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55: 95-100.
- Reynolds S, Moran J, Addy M, Wade WG, Newcombe R. Taurolin as an oral rinse. I. Antimicrobial effects *in vitro* and *in vivo*. *Clin Prev Dent* 1991; 13: 13-17.
- Roberts WR, Addy M. Comparison of *in vitro* and *in vivo* antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, CPC and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol* 1981; 8: 295-310.
- Schiött CR, Loe H, Jensen SB, Kilian M, Davies RM, Glavind K. The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J Clin Periodontol* 1970; 5: 84-89.
- Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and *de novo* plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 919-925.
- Simonsson T, Hvid EB, Rundegren J, Edwardsson S. Effect of delmopinol on *in vitro* dental plaque formation, bacterial acid production and the number of microorganisms in saliva. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 305-309.
- Singh MP. Rapid test for distinguishing membrane-active antibacterial agents. *J Microbiol Methods* 2006; 67: 125-130.
- Sreenivasan PK, Gittins E. Effects of low dose chlorhexidine mouthrinses on oral bacteria and salivary microflora including those producing hydrogen sulfide. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 309-313.
- Tomás I, Cousido MC, Tomás M, Limeres J, García-Caballero L, Diz P. *In vivo* bactericidal effect of 0.2% chlorhexidine but not 0.12% on salivary obligate anaerobes. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 1186-1191.
- Van der Mei HC, White DJ, Ateman-Smit J, Van de Belt-Gritter E, Busscher HJ. A method to study sustained antimicrobial activity of rinse and dentifrice components on biofilm viability *in vivo*. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 14-20.

Weiger R, Netuschil L, Wester-Ebbinghaus T, Brex M. An approach to differentiate between antibacterial and antiadhesive effects of mouthrinses *in vivo*. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 559-565.

Weiger R, Von Ohle C, Decker E, Axmann-Krcmar D, Netuschil L. Vital microorganisms in early supragingival dental plaque and in stimulated human saliva. *J Periodontal Res* 1997; 32: 233-240.

World Health Organization. Oral health surveys, basic methods, 4th edn. Geneva: WHO, 1997.



4.2. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD *IN VIVO* DE LA CLORHEXIDINA AL 0,2% *VERSUS* 0,12% SOBRE LA FLORA SALIVAL.

Clinical Oral Investigations 2009 (en prensa).

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vivo* la actividad antimicrobiana de un colutorio de digluconato de Clorhexidina al 0,12% y al 0,2% sobre la flora salival hasta 7 horas después de su utilización, mediante microscopía de epifluorescencia y el empleo de la solución de tinción dual LIVE/DEAD® BacLight™.

El grupo de estudio estuvo formado por 15 voluntarios adultos que efectuaron un único enjuague de agua estéril (UE-agua), un único enjuague con CHX al 0,12% (UE-CHX 0,12%), y un único y doble enjuague con CHX al 0,2% (UE-CHX 0,2% y DE-CHX 0,2%). De cada voluntario, se recogieron muestras de saliva no estimulada (1 ml) en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de los diferentes enjuagues. La suspensión bacteriana se mezcló con la tinción dual SYTO 9/yoduro de propidio y las observaciones se efectuaron con un microscopio Olympus BX51. Se calculó el porcentaje medio de viabilidad bacteriana de cada muestra salival.

En comparación con el UE-agua, la CHX al 0,2% (UE y DE) ejerció un efecto antibacteriano significativo hasta las 7 horas post-enjuague, mientras que este efecto persistió sólo hasta 5 horas después del UE-CHX 0,12%. Al contrastar las 2 concentraciones de CHX, se obtuvieron porcentajes de viabilidad bacteriana significativamente superiores en todas las tomas salivales después de la aplicación de la CHX al 0,12% que de la CHX al 0,2%. Al contrastar los enjuagues de CHX al 0,2% (UE y DE), se obtuvieron porcentajes de viabilidad bacteriana significativamente superiores en todas las tomas salivales obtenidas 1, 3, 5 y 7 horas post-enjuague después de la aplicación del UE que del DE.

El colutorio de CHX al 0,2% fue el que ejerció la mayor actividad antibacteriana sobre la flora salival hasta 7 horas después de su aplicación, existiendo una recuperación progresiva de la viabilidad bacteriana. Las diferencias observadas con respecto al colutorio de CHX al 0,12% ponen de manifiesto la influencia de la concentración sobre su actividad antibacteriana inmediata y su sustentividad. Estos resultados podrían contribuir a optimizar los protocolos antisépticos aplicados en situaciones clínicas en las que se precise una reducción significativa de la carga bacteriana durante un corto periodo de tiempo.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la actividad antibacteriana *in vivo* de un antiséptico implica el análisis de su efecto inmediato y de su sustantividad. La sustantividad se define como la adherencia prolongada del antiséptico a las superficies orales (dientes y mucosas) y su liberación lenta a dosis eficaces que garanticen la persistencia de su actividad antimicrobiana (Manau Navarro y Guasch Serra, 2003). Numerosos autores demostraron que la Clorhexidina (CHX) provoca el mayor efecto antibacteriano inmediato y presenta la mayor sustantividad *in vivo* en comparación a otros antisépticos empleados en la cavidad oral (Moran et al, 1992; Jenkins et al, 1994; Elworthy et al, 1996; Balbuena et al, 1998)

Desde hace varias décadas, la determinación de los recuentos bacterianos salivales representa una prueba aceptada por la comunidad científica para investigar el efecto antibacteriano *in vivo* de la CHX (Addy y Moran, 1997; Sekino et al 2003), siendo considerada predictora de su sustantividad (Roberts y Addy, 1981; Addy et al, 1989; Jenkins et al, 1994) y de su actividad antiplaca (Jenkins et al, 1990). A partir de los primeros resultados aportados por Schiött et al en 1970 (Schiött et al, 1970), existen numerosos estudios en la literatura en los que se evalúan la sustantividad de la CHX sobre la flora salival (Moran et al, 1992; Jenkins et al, 1994; Elworthy et al, 1996; Balbuena et al, 1998). Sin embargo, pocos autores han estudiado *in vivo* el efecto antibacteriano y la sustantividad de una única aplicación de CHX al 0,2% versus CHX al 0,12% sobre la flora salival, analizando fundamentalmente la influencia de la dosis administrada (al aplicar volúmenes diferentes de ambas CHX) (Addy et al, 1991; Harper et al, 1995).

En la mayoría de las series publicadas, la determinación de la actividad antimicrobiana de la CHX en saliva se efectuó con técnicas microbiológicas de cultivo en placa (Moran et al, 1992; Jenkins et al, 1994; Elworthy et al, 1996; Balbuena et al, 1998; Tomás et al, 2008). Sin embargo, hay autores que cuestionaron la fiabilidad de estas

técnicas y propusieron como alternativa los métodos de fluorescencia que emplean fluorocromos específicos para el marcaje de bacterias viables y no-viables (*Weiger et al, 1998; García-Caballero et al, 2009*).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vivo* la actividad antimicrobiana de un colutorio de digluconato de CHX al 0,12% y al 0,2% sobre la flora salival hasta 7 horas después de su utilización, mediante microscopía de epifluorescencia y el empleo de la solución de tinción dual LIVE/DEAD® BacLight™.

MATERIAL Y MÉTODOS

• Selección del grupo de estudio y recogida de muestras salivales

El grupo de estudio lo constituyeron 15 voluntarios adultos con edades comprendidas entre los 20 y 45 años que presentaban un buen estado de salud oral: mínimo de 24 dientes permanentes, sin evidencia de gingivitis ni periodontitis (Community Periodontal Index score= 0) (*World Health Organisation, 1997*), y ausencia de caries. Los criterios de exclusión aplicados fueron: fumar, ser portador de prótesis dentales o aparatos ortodóncicos, haber recibido antibióticos o utilizar de forma rutinaria antisépticos orales durante los últimos 3 meses, y padecer alguna enfermedad sistémica que provoque una alteración en la producción y/o composición de la saliva. Previamente al inicio del estudio, a todos los voluntarios se les efectuó una tartrectomía.

De cada voluntario, se recogieron muestras de saliva no estimulada (1 ml) en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de realizar bajo supervisión:

- 1) Un Único Enjuague de 10 ml durante 30 segundos de agua estéril (control negativo) (UE-agua).
- 2) Un Único Enjuague de 10 ml durante 30 segundos con CHX al 0,12% (Paroex®, DistriFarma, Barcarena, Portugal) (UE-CHX 0,12%).

3) Un Único Enjuague de 10 ml durante 30 segundos con CHX al 0,2% (Oraldine Perio®, Pfizer, Barcelona, España) (UE-CHX 0,2%).

4) Un Doble Enjuague (2 enjuagues consecutivos) de 10 ml durante 30 segundos con CHX al 0,2% (Oraldine Perio®, Pfizer, Barcelona, España) (DE-CHX 0,2%).

Todos los colutorios empleados se presentaban en solución acuosa.

Los voluntarios no practicaron ninguna técnica de higiene oral desde la noche anterior; el día del experimento, se les prohibió ingerir alimentos o bebidas, desde 1 hora antes de la primera recogida salival y durante el transcurso del experimento. En el día del experimento, la recogida de las diferentes muestras salivales se realizaron desde las 11:50 a.m. (muestra basal) hasta las 7 p.m. (última muestra obtenida 7 horas después de finalizar el enjuague). Aplicando un sistema de aleatorización equilibrada, todos los voluntarios efectuaron los 4 enjuagues, estableciéndose un “período de descanso” de 2 semanas entre las diferentes aplicaciones. Las muestras de saliva no estimulada se recogieron aplicando métodos previamente descritos (“spitting method”) (Navazesh y Christensen, 1982).

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela. En todos los casos se obtuvo por escrito el consentimiento informado de los participantes en el estudio.

- **Procesamiento de las muestras salivales**

La solución de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™ se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante en 5 ml de agua esterilizada y filtrada mediante un filtro de membrana Millipore de 0,22 µm (Millipore Ibérica S.A., Madrid, España), alcanzando una proporción 1:1 de ambos fluorocromos y se conservó a -20 °C. Las muestras de saliva se centrifugaron a 2000 rpm durante 6 minutos. El sobrenadante se desechó y el pellet obtenido fue resuspendido en 100 µl de agua estéril. Después de agitar la suspensión bacteriana para homogeneizarla, se mezcló con 100 µl de la solución de

fluorescencia y se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La observación microscópica la realizaron 2 investigadores que desconocían el diseño del estudio, empleando un microscopio Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japón) equipado con un set de filtros para fluoresceína y Texas Red. El conteo de bacterias viables y no-viables se realizó a gran aumento (100x) en 20 campos microscópicos (10 campos por porta) que presentaban un mínimo de 100-150 bacterias y se excluyeron los agregados bacterianos. Se calculó el porcentaje medio de viabilidad bacteriana de cada muestra salival y a la diferencia en el porcentaje medio de bacterias viables entre 2 muestras salivales se le denominó "Reducción de la Viabilidad" (RV). Los positivos de RV representan un descenso de la viabilidad bacteriana y los valores negativos de RV un incremento de la viabilidad bacteriana.

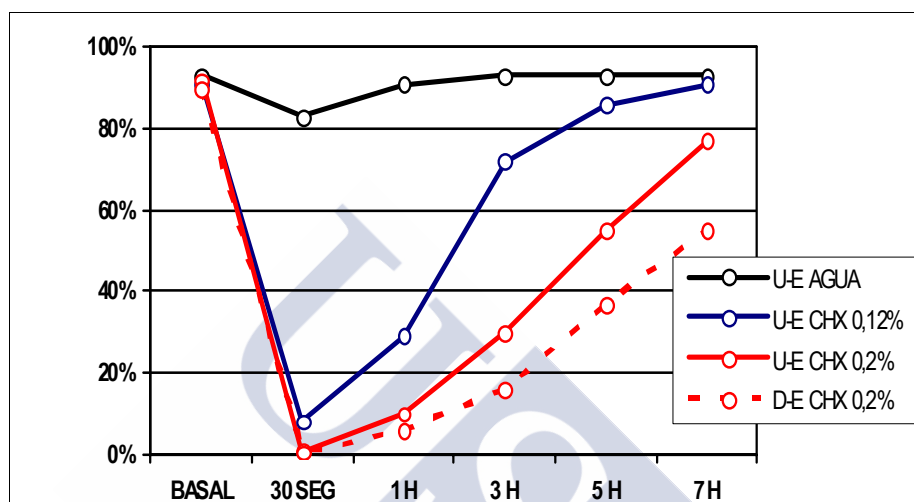
- **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.). La elección de un test paramétrico o no paramétrico dependió del tipo de distribución de los valores de la variable cuantitativa analizada; lo cual se determinó aplicando el test Kolmogorov-Smirnov. Todas las variables cuantitativas analizadas mostraron una distribución normal. Se aplicó el test de ANOVA para medidas repetidas para el análisis de comparaciones intra- e inter-enjuague de todas las muestras salivales, y los contrastes simple y repetidos para el análisis de comparaciones intra- e inter-enjuague entre 2 muestras salivales. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran los porcentajes medios de viabilidad bacteriana salival en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después del UE-agua, del UE-CHX 0,12%, del UE-CHX 0,2% y del DE-CHX 0,2%.

Figura 1. Porcentajes de viabilidad bacteriana en saliva en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación de agua estéril (único enjuague), del colutorio de clorhexidina al 0,12% (único enjuague) y del colutorio de clorhexidina al 0,2% (único y doble enjuague).



VIABILIDAD BACTERIANA (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE- agua	92,87 ± 1,80	82,73 ± 2,05	92,27 ± 2,76	92,60 ± 2,09	93,27 ± 1,43	93,13 ± 1,95
UE-CHX 0,12%	91,00 ± 6,91	7,67 ± 9,67	29,00 ± 16,35	71,67 ± 15,52	85,60 ± 8,59	90,80 ± 5,42
UE-CHX 0,2%	92,14 ± 4,24	0,80 ± 1,20	10,33 ± 7,28	29,73 ± 14,85	55,13 ± 19,96	76,87 ± 12,00
DE-CHX 0,2%	89,92 ± 10,66	0,43 ± 0,93	5,71 ± 3,97	15,79 ± 10,65	37,50 ± 18,30	54,93 ± 22,26

BASAL= Muestra de saliva recogida en condiciones basales; 30 SEG= Muestra de saliva recogida a los 30 segundos después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 1 H= Muestra de saliva recogida 1 hora después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 3 H= Muestra de saliva recogida 3 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 5 H= Muestra de saliva recogida 5 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 7 H= Muestra de saliva recogida 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; UE= único enjuague; DE= doble enjuague; CHX= clorhexidina

En el análisis intra-enjuague, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad bacteriana entre los diferentes tiempos de recogida de las muestras ($p < 0,001$) (Tabla 1). En comparación con los valores basales, la frecuencia de bacterias viables disminuyó significativamente a los 30 segundos después del UE-agua ($RV = 10,13\% \pm 0,51\%$, $p < 0,001$), del UE-CHX 0,12% ($RV = 86,77\% \pm 6,36\%$, $p < 0,001$), del UE-CHX 0,2% ($RV = 91,35\% \pm 4,37\%$, $p < 0,001$) y del DE-CHX 0,2% ($RV = 89,41\% \pm$

10,70%, $p < 0,001$). En comparación con los valores basales, la CHX al 0,2% (UE y DE) ejerció una actividad antibacteriana significativa hasta las 7 horas post-enjuague (RV= 14,14% $\pm$ 11,56% y 39,16% $\pm$ 19,35% respectivamente, $p < 0,001$ y $p < 0,001$ para ambos tipos de enjuagues), mientras que con la CHX al 0,12% esta actividad persistió sólo hasta 3 horas después de su aplicación (RV= 19,88% $\pm$ 20,07%, $p < 0,05$). En comparación con los valores obtenidos a los 30 segundos post-enjuague, se apreció una recuperación significativa de la flora en las tomas salivales posteriores al empleo de los diferentes enjuagues, presentando el UE-CHX 0,12% los porcentajes más altos y el DE-CHX 0,2% los porcentajes más bajos.

Tabla 1. Comparaciones intra-enjuague del porcentaje de viabilidad bacteriana salival en condiciones basales *versus* tomas post-enjuague (30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas) y a los 30 segundos post-enjuague *versus* restantes tomas post-enjuague (1, 3, 5 y 7 horas), después de la aplicación de agua estéril (único enjuague), del colutorio de clorhexidina al 0,12% (único enjuague) y del colutorio de clorhexidina al 0,2% (único y doble enjuague).

REDUCCIÓN DE LA VIABILIDAD BACTERIANA Diferencia de medias $\pm$ desviación típica (%)				
	UE-agua	UE-CHX 0,12%	UE-CHX 0,2%	DE-CHX 0,2%
BASAL vs 30 SEG	10,13 $\pm$ 0,51**	86,77 $\pm$ 6,36**	91,35 $\pm$ 4,37**	89,41 $\pm$ 10,70**
BASAL vs 1 H	0,60 $\pm$ 1,29	68,33 $\pm$ 17,99**	81,92 $\pm$ 8,66**	84,25 $\pm$ 10,93**
30 SEG vs 1 H	-9,53 $\pm$ 1,18**	-21,33 $\pm$ 17,77**	-9,53 $\pm$ 6,24**	-5,28 $\pm$ 4,14**
BASAL vs 3 H	0,26 $\pm$ 1,48	19,88 $\pm$ 20,07*	61,35 $\pm$ 15,09**	77,00 $\pm$ 9,78**
30 SEG vs 3 H	-9,86 $\pm$ 1,45**	-64,00 $\pm$ 16,44**	-28,93 $\pm$ 14,10**	-15,35 $\pm$ 10,78**
BASAL vs 5 H	-0,40 $\pm$ 1,68	3,33 $\pm$ 11,29	35,50 $\pm$ 18,77**	54,66 $\pm$ 22,61**
30 SEG vs 5 H	-10,53 $\pm$ 1,76**	-77,93 $\pm$ 14,55**	-54,33 $\pm$ 19,21**	-37,07 $\pm$ 18,37**
BASAL vs 7 H	-0,26 $\pm$ 0,79	-1,55 $\pm$ 10,15	14,14 $\pm$ 11,56**	39,16 $\pm$ 19,35**
30 SEG vs 7 H	-10,40 $\pm$ 0,91**	-83,13 $\pm$ 12,42**	-76,06 $\pm$ 11,72**	-54,50 $\pm$ 22,13**

BASAL= Muestra de saliva recogida en condiciones basales; 30 SEG= Muestra de saliva recogida a los 30 segundos después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 1 H= Muestra de saliva recogida 1 hora después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 3 H= Muestra de saliva recogida 3 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 5 H= Muestra de saliva recogida 5 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 7 H= Muestra de saliva recogida 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; UE= único enjuague; DE= doble enjuague; CHX= clorhexidina; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

En el análisis inter-enjuague, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de viabilidad bacteriana entre los diferentes tipos de enjuagues ($p < 0,001$) (Tabla 2).

Tabla 2. Comparaciones inter-enjuague del porcentaje de viabilidad bacteriana salival en condiciones basales y en las tomas post-enjuague (30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas) después de la aplicación de agua estéril (único enjuague), del colutorio de clorhexidina al 0,12% (único enjuague) y del colutorio de clorhexidina al 0,2% (único y doble enjuague).

REDUCCIÓN DE LA VIABILIDAD BACTERIANA Diferencia de medias $\pm$ desviación típica (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua UE-CHX 0,12%	1,55 $\pm$ 7,02	75,06 $\pm$ 9,89**	63,26 $\pm$ 15,22**	20,93 $\pm$ 14,83**	7,66 $\pm$ 8,64*	2,33 $\pm$ 6,35
UE-agua UE-CHX 0,2%	0,85 $\pm$ 5,49	81,93 $\pm$ 2,46**	81,93 $\pm$ 7,95**	62,86 $\pm$ 15,32**	38,13 $\pm$ 19,80**	16,26 $\pm$ 11,72**
UE-agua DE-CHX 0,2%	3,00 $\pm$ 10,74	82,28 $\pm$ 1,89**	86,64 $\pm$ 4,05**	76,92 $\pm$ 10,99**	55,92 $\pm$ 18,58**	38,21 $\pm$ 22,54**
UE-CHX 0,12% UE-CHX 0,2%	2,87 $\pm$ 9,09	6,86 $\pm$ 9,34*	18,66 $\pm$ 17,67**	41,93 $\pm$ 16,22**	30,46 $\pm$ 17,97**	13,93 $\pm$ 11,16**
UE-CHX 0,2% DE-CHX 0,2%	-0,09 $\pm$ 5,02	0,42 $\pm$ 1,65	4,85 $\pm$ 6,50*	13,57 $\pm$ 13,58*	19,00 $\pm$ 23,83*	22,78 $\pm$ 19,54**
UE-CHX 0,12% DE-CHX 0,2%	2,66 $\pm$ 18,80	7,14 $\pm$ 9,67*	23,71 $\pm$ 15,98**	56,28 $\pm$ 13,96**	48,42 $\pm$ 17,48**	36,64 $\pm$ 21,73**

BASAL= Muestra de saliva recogida en condiciones basales; 30 SEG= Muestra de saliva recogida a los 30 segundos después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 1 H= Muestra de saliva recogida 1 hora después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 3 H= Muestra de saliva recogida 3 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 5 H= Muestra de saliva recogida 5 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 7 H= Muestra de saliva recogida 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; UE= único enjuague; DE= doble enjuague; CHX= clorhexidina
* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

La frecuencia de bacterias viables fue similar entre las diferentes tomas pre-enjuague. En comparación con el UE-agua, las prevalencias de viabilidad fueron significativamente inferiores a los 30 segundos después del enjuague con CHX al 0,12% (RV= 75,06% $\pm$ 9,89%, $p < 0,001$) y con CHX al 0,2% (RV del UE= 81,93% $\pm$ 2,46%, $p < 0,001$; RV del DE= 82,28% $\pm$ 1,89%, $p < 0,001$). En comparación con el UE-agua, la CHX al 0,2% (UE y DE) ejerció un efecto antibacteriano significativo hasta las 7 horas post-

enjuague (RV= 16,26% $\pm$ 11,72% y 38,21% $\pm$ 22,54% respectivamente, $p < 0,001$ y $p < 0,001$ para ambos tipos de enjuagues), mientras que este efecto persistió sólo hasta 5 horas después del UE-CHX 0,12% (RV= 7,66% $\pm$ 8,64%, $p < 0,05$). Al contrastar ambos colutorios de CHX (UE), se obtuvieron porcentajes de viabilidad bacteriana significativamente superiores en todas las tomas salivales después de la aplicación de la CHX al 0,12% que de la CHX al 0,2%, oscilando entre una RV a los 30 segundos= 6,86% $\pm$ 9,34% ($p < 0,05$) y RV a las 3 horas= 41,93% $\pm$ 16,22% ($p < 0,001$). Al contrastar los enjuagues de CHX al 0,2% (UE y DE), se obtuvieron porcentajes de viabilidad bacteriana significativamente superiores en todas las tomas salivales obtenidas a partir de 1 hora después de la aplicación del UE que del DE, oscilando entre una RV a la hora= 4,85% $\pm$ 6,50% ($p < 0,05$) y una RV a las 7 horas= 22,78% $\pm$ 19,54% ($p < 0,001$).

DISCUSIÓN

Aunque algunos autores emplearon técnicas de epifluorescencia para el análisis de la flora salival (Weiger *et al*, 1997; Weiger *et al* 1998), no hemos encontrado trabajos en los que utilizaran la microscopía de epifluorescencia y la solución SYTO 9/YP para estudiar *in vivo* la actividad antimicrobiana de la CHX sobre la flora salival, por lo que la comparación de los resultados obtenidos en la presente serie y los aportados por otros autores que aplicaron técnicas de cultivo en placa debe ser interpretada con cautela.

Con la microscopía de epifluorescencia y la solución de fluoresceína y bromuro de etidio, Weiger *et al* (Weiger *et al*, 1998) encontraron que aproximadamente el 85% de la flora salival es viable en condiciones basales. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por nuestro grupo aplicando la solución SYTO 9/YP (Caballero *et al*, 2009) y con los obtenidos en la presente serie (la viabilidad osciló entre el 90-93%).

De acuerdo con los resultados obtenidos por algunos autores con el empleo de técnicas de cultivo en placa (Pitten y Kramer 1999; Herrera *et al*, 2003), en la presente

serie, el UE con agua estéril provocó un descenso significativo en la viabilidad bacteriana a los 30 segundos post-aplicación (de un 10%) aunque de carácter transitorio.

Hay autores que demostraron que el efecto antibacteriano inmediato y la persistencia de su sustantividad como mínimo hasta las 7 horas post-aplicación después de efectuar un UE-CHX 0,12% (15 ml/30 segundos), aunque en este caso el descenso inmediato en la vitalidad no superó el 72-87% ($<1 \log_{10}$ UFC/ml) (Jenkins *et al*, 1990; Buckner *et al*, 1994; Briner *et al*, 1994; Fernandes-Naglik *et al*, 2001) y a las 7 horas post-aplicación, el 58-88% ($<1 \log_{10}$ UFC/ml) (Jenkins *et al*, 1990; Elworthy *et al*, 1996; Fernandes-Naglik *et al*, 2001). En la presente serie, en contraste con los valores basales, el UE-CHX 0,12% provocó un descenso inmediato en el porcentaje de bacterias viables ($<90\%$) y esta actividad antimicrobiana sólo fue detectable hasta las 3 horas post-aplicación (la reducción de la viabilidad fue del 20%).

Los resultados obtenidos en otros estudios también constataron que la aplicación de un UE-CHX 0,2% (10 ml/1 minuto) se asociaba a un efecto antibacteriano inmediato con una reducción de $\geq 90\%$ ($\geq 1 \log_{10}$ UFC/ml) en la concentración bacteriana con respecto a los valores basales (Jenkins *et al*, 1991; Reynolds *et al*, 1991; Simonsson *et al*, 1991; Moran *et al*, 1992; Morán *et al*, 1995) y su sustantividad persistía como mínimo hasta las 7 horas post-aplicación, con una reducción $\geq 90\%$ ($\geq 1 \log_{10}$ UFC/ml) (Jenkins *et al*, 1991; Reynolds *et al*, 1991; Moran *et al*, 1992; Moran *et al*, 1995). En la presente serie, en contraste con los valores basales, los enjuagues con CHX 0,2% (UE y DE) provocaron un descenso inmediato en el porcentaje de bacterias viables ($\geq 90\%$) y esta actividad antimicrobiana aún era detectable a las 7 horas post-aplicación (la reducción de la viabilidad fue del 14% para el UE y del 39% para el DE).

A pesar de la importancia atribuida a la concentración de la CHX en su actividad antimicrobiana (Milestone *et al*, 2008), no hemos encontrado ningún trabajo que haya evaluado *in vivo* la influencia de la concentración de CHX (0,2% *versus* 0,12%) sobre su

actividad antibacteriana en la flora salival. Recientemente, aplicando técnicas de cultivo en placa, nuestro grupo observó que un enjuague de CHX al 0,2% (10 ml/30 segundos) se asociaba a una actividad antimicrobiana significativamente mayor que la CHX al 0,12% (10 ml/30 segundos) con carácter inmediato y que se mantenía 1 hora después de su aplicación (Tomás *et al*, 2008). En la presente serie, la CHX al 0,2% provocó un efecto antibacteriano significativamente mayor que la CHX al 0,12% en todas las muestras salivales obtenidas post-aplicación. Estos resultados confirman que el efecto antibacteriano de la CHX y su sustentividad son concentración-dependiente, tal y como describieron previamente otros autores que contrastaron otras concentraciones de CHX (0,12% *versus* 0,06%, 0,06% *versus* 0,03% y 0,12% *versus* 0,1%) (Addy *et al*, 1991; Sreenivasan *et al*, 2004).

Dahlen (Dahlen, 1984) observó que la realización de un DE-CHX 0,2% (10 ml/1 minuto cada uno de los enjuagues) ocasionaba un mayor efecto antibacteriano a los 10 minutos y 1 hora post-enjuague que un UE-CHX 0,2%. En la presente serie, el DE-CHX 0,2% provocó un efecto antibacteriano significativamente mayor que el UE-CHX 0,2% en todas las muestras salivales recogidas 1, 3, 5 y 7 horas post-aplicación. Estos resultados sugieren que no solamente la concentración, sino también otras variables como la dosis aplicada o la duración del enjuague pueden condicionar la sustentividad de la CHX.

Numerosos autores han observado que el efecto antibacteriano inmediato de una única aplicación de CHX al 0,2% y 0,12% permanece constante como mínimo hasta las 7 horas después del enjuague sin indicios de recrecimiento bacteriano (Addy y Wright, 1978;; Addy *et al*, 1991; Jenkins *et al*, 1991; Reynolds *et al*, 1991; Moran *et al*, 1992; Briner *et al*, 1994; Moran *et al*, 1995). Sin embargo, otros autores apreciaron un descenso continuo en la vitalidad bacteriana hasta las 3-5 horas después de su aplicación y posteriormente una recuperación de la flora salival a las 7 horas post-enjuague (Jenkins *et al*, 1994; Yates *et al*, 1997).

Coincidiendo con los resultados obtenidos en algunos trabajos *in vitro* (Toljanic *et al*, 1992), en la presente serie, con las 3 modalidades de CHX testadas, se detectó una recuperación significativa de la viabilidad bacteriana en todas las tomas salivales posteriores en comparación a la obtenida a los 30 segundos post-enjuague. Estas diferencias podrían justificarse en la heterogeneidad de las metodologías aplicadas y constatan la necesidad de clarificar la influencia de la sustantividad de la CHX sobre el recrecimiento bacteriano de la flora salival después de su aplicación.

En conclusión, el colutorio de CHX al 0,2% fue el que ejerció la mayor actividad antibacteriana sobre la flora salival hasta 7 horas después de su aplicación, existiendo una recuperación progresiva de la viabilidad bacteriana. Las diferencias observadas con respecto al colutorio de CHX al 0,12% ponen de manifiesto la influencia de la concentración sobre su actividad antibacteriana inmediata y su sustantividad. Estos resultados podrían contribuir a optimizar los protocolos antisépticos empleados en situaciones clínicas que requieren un descenso significativo de la carga bacteriana durante un corto periodo de tiempo, como por ejemplo en la prevención de complicaciones infecciosas post-operatorias.

BIBLIOGRAFÍA

- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. The effect of some chlorhexidine-containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 90-93.
- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. Toothpastes containing 0.3% and 0.5% triclosan. II. Effects of single brushings on salivary bacterial counts. *Am J Dent* 1989; 2: 215-219.
- Addy M, Moran J. Evaluation of oral hygiene products: science is true; don't be misled by the facts. *Periodontology 2000* 1997; 15: 40-51.
- Addy M, Wright R. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* antibacterial properties of povidone iodine and chlorhexidine gluconate mouthrinses. *J Clin Periodontol* 1978; 5: 198-205.
- Balbuena L, Stambaugh KI, Ramirez SG, Yeager C. Effects of topical oral antiseptic rinses on bacterial counts of saliva in healthy human subjects. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 118: 625-629.

- Briner WW, Kayrouz GA, Chanak MX. Comparative antimicrobial effectiveness of a substantive (0.12% chlorhexidine) and a nonsubstantive (phenolic) mouthrinse *in vivo* and *in vitro*. *Compendium* 1994; 15: 1158-1170.
- Buckner RY, Kayrouz GA, Briner WW. Reduction of oral microbes by a single chlorhexidine rinse. *Compendium* 1994; 15: 512-520.
- Caballero LG, Carmona IT, González MC, Posse JL, Taboada JL, Dios PD. Evaluation of the substantivity in saliva of different forms of application of chlorhexidine. *Quintessence Int* 2009; 40: 141-144..
- Dahlen G. Effect of antimicrobial mouthrinses on salivary microflora in healthy subjects. *Scand J Dental Res* 1984; 92: 38-42.
- Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol* 1996; 67: 572-576.
- Fernandes-Naglik L, Downes J, Shirlaw P et al. The clinical and microbiological effects of a novel acidified sodium chlorite mouthrinse on oral bacterial mucosal infections. *Oral Dis* 2001; 7: 276-280.
- Harper PR, Milsom S, Wade W, Addy M, Moran J, Newcombe RG. An approach to efficacy screening of mouthrinses: studies on a group of French products (II). Inhibition of salivary bacteria and plaque *in vivo*. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 723-727.
- Herrera D, Roldan S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 307-314.
- Jenkins S, Addy M, Newcombe R. The effect of triclosan, stannous fluoride and chlorhexidine products on: (II) Salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 698-701.
- Jenkins S, Addy M, Newcombe R. The effects of 0.5% chlorhexidine and 0.2% triclosan containing toothpastes on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 85-89.
- Jenkins S, Addy M, Newcombe R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthwashes (I). Effects on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 140-144.
- Jenkins S, Addy M, Wade W, Newcombe RG. The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 397-401.
- Manau-Navarro C, Guasch-Serra S. Métodos de control de la placa bacteriana. En: Cuenca Sala E, Manau Navarro C, Serra Majem L, eds. *Odontología Preventiva y Comunitaria: principios, métodos y aplicaciones*, 2ª ed. Barcelona: Masson, 2003; 79.

- Milstone AM, Passaretti CL, Perl TM. Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 274-281.
- Moran J, Addy M, Wade W, Milson S, McAndrew R, Newcombe RG. The effect of oxidising mouthrinses compared with chlorhexidine on salivary bacterial counts and plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 750-755.
- Moran J, Addy M, Wade WG et al. A comparison of delmopinol and chlorhexidine on plaque regrowth over a 4-day period and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 749-753.
- Navazesh M, Christensen CM. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dental Res* 1982; 61: 1158-1162.
- Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55: 95-100.
- Reynolds S, Moran J, Addy M, Wade WG, Newcombe R. Taurolin as an oral rinse. I. Antimicrobial effects *in vitro* and *in vivo*. *Clin Prev Dent* 1991; 13: 13-17.
- Roberts WR, Addy M. Comparison of *in vitro* and *in vivo* antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, CPC and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol* 1981; 8: 295-310.
- Schiött CR, Løe H, Jensen SB, Kilian M, Davies RM, Glavind K. The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J Clin Periodontol* 1970; 5: 84-89.
- Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and *de novo* plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 919-925.
- Simonsson T, Hvid EB, Rundegren J, Edwardsson S. Effect of delmopinol on *in vitro* dental plaque formation, bacterial acid production and the number of microorganisms in saliva. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 305-309.
- Sreenivasan PK, Gittins E. Effects of low dose chlorhexidine mouthrinses on oral bacteria and salivary microflora including those producing hydrogen sulfide. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 309-313.
- Toljanic JA, Hagen JC, Takahashi Y, Shapiro RD. Evaluation of the substantivity of a chlorhexidine oral rinse in irradiated head and neck cancer patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50: 1055-1059.
- Tomás I, Cousido MC, Tomás M, Limeres J, García-Caballero L, Diz P. *In vivo* bactericidal effect of 0.2% chlorhexidine but not 0.12% on salivary obligate anaerobes. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 1186-1191.
- Weiger R, Netuschil L, Wester-Ebbinghaus T, Brex M. An approach to differentiate between antibacterial and antiadhesive effects of mouthrinses *in vivo*. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 559-565.

Weiger R, Von Ohle C, Decker E, Axmann-Krcmar D, Netuschil L. Vital microorganisms in early supragingival dental plaque and in stimulated human saliva. *J Periodontol Res* 1997; 32: 233-240.

World Health Organization. Oral health surveys, basic methods, 4th edn. Geneva: WHO, 1997.

Yates R, Moran J, Addy M, Mullan PJ, Wade WG, Newcombe R. The comparative effect of acidified sodium chlorite and chlorhexidine mouthrinses on plaque regrowth and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 603-609.



4.3. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD EN SALIVA DE DIFERENTES FORMAS DE APLICACIÓN DE LA CLORHEXIDINA.

Quintessence Internacional 2009; 40: 141-144.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo* del digluconato de Clorhexidina (CHX) aplicado en colutorio (enjuague y gasa), gel y spray sobre la flora salival, mediante microscopía de epifluorescencia y el empleo de la solución de tinción dual LIVE/DEAD® BacLight™.

El grupo de estudio lo constituyeron 10 voluntarios adultos que efectuaron un único enjuague con CHX al 0,2% y se recogieron muestras de saliva a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas. Se aplicó el mismo protocolo con un colutorio de CHX al 0,12%, un gel de CHX al 0,2%, un spray de CHX al 0,2% y otro al 0,12% y una gasa impregnada en CHX al 0,2%. Las muestras salivales de todos los participantes obtenidas en los diferentes momentos de recogida se mezclaron para obtener una muestra única común ("muestra pool"). La suspensión bacteriana se mezcló con la tinción dual SYTO 9/yoduro de propidio y las observaciones se efectuaron con un microscopio Olympus BX51. Se calculó el porcentaje medio de viabilidad bacteriana de cada "muestra pool" de saliva resultante de las 3 ocasiones en las que se efectuó cada experimento.

El porcentaje medio de viabilidad bacteriana en condiciones basales osciló entre $90,10\% \pm 2,25\%$ y $93,19\% \pm 4,75\%$. A los 30 segundos después de la aplicación de la CHX, el nivel más bajo de bacterias viables se detectó con los colutorios al 0,2% y 0,12% ($0,40\% \pm 0,54\%$ y $9,80\% \pm 11,03$ respectivamente). Transcurridas 3 horas, el porcentaje de bacterias vivas con el gel y los sprays fueron similares a los detectados en situación basal ($80,20\% \pm 6,66\%$ - $91,90\% \pm 5,10\%$). La viabilidad bacteriana a las 7 horas después de las diferentes aplicaciones de CHX coincidió con la detectada en condiciones basales, exceptuando la obtenida con el colutorio al 0,2% ($78,80\% \pm 11,51\%$).

En conclusión, el colutorio de CHX al 0,2% fue el que ejerció la mayor actividad antimicrobiana sobre la flora salival hasta 7 horas después de su aplicación, confirmando la influencia de la concentración y de la forma de aplicación sobre su efecto antibacteriano inmediato y su sustantividad.

INTRODUCCIÓN

Los colutorios de Clorhexidina (CHX) tienen muchas aplicaciones derivadas de su demostrada actividad antiplaca y antigingivitis, como disminuir el riesgo de periimplantitis -lo que podría favorecer el éxito de los implantes a largo plazo- reducir la gingivitis en portadores de aparatología ortodóncica fija y prevenir complicaciones orales en pacientes discapacitados o médicamente comprometidos (*Ciancio et al, 1995; Gehlen et al, 2000; Montiel-Company y Almerich-Silla, 2002*). Además, su actividad antimicrobiana le otorga un papel destacado en la prevención de caries, en la evolución postoperatoria de intervenciones de cirugía oral -en términos de sintomatología y cicatrización-, disminuyendo la recurrencia, severidad y duración de las úlceras orales recurrentes, para minimizar la transmisión de agentes patógenos en el gabinete dental -vía aerosoles-, así como reduciendo el riesgo de endocarditis bacteriana y otras infecciones focales consecutivas a bacteriemias de origen oral (*Logothetis y Martínez-Welles, 1995; Powell et al, 2005; Tomás et al, 2007*).

Aunque numerosos autores han demostrado el efecto clínico antiplaca y antigingivitis asociado a la utilización prolongada de la CHX en gel y spray (*Francis et al, 1987; Kalaga et al, 1989*), sin embargo, no se ha investigado la sustantividad de este antiséptico en sus diferentes formas de aplicación después de una única dosis.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo* del digluconato de CHX hasta 7 horas después de su aplicación en colutorio, gel, spray y gasa sobre la flora salival, mediante microscopía de epifluorescencia y el empleo de la solución de tinción dual LIVE/DEAD® BacLight™.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Selección del grupo de estudio y recogida de muestras salivales**

El grupo de estudio estuvo formado por 10 voluntarios adultos con edades comprendidas entre los 20 y 45 años que presentaban un buen estado de salud oral: mínimo de 24 dientes permanentes, sin evidencia de gingivitis ni periodontitis (Community Periodontal Index score= 0) (*World Health Organisation, 1997*), y ausencia de caries. Los criterios de exclusión aplicados fueron: fumar, ser portador de prótesis dentales o aparatos ortodóncicos, haber recibido antibióticos o utilizar de forma rutinaria antisépticos orales durante los últimos 3 meses, y padecer alguna enfermedad sistémica que provoque una alteración en la producción y/o composición de la saliva. Previamente al inicio del estudio, a todos los voluntarios se les efectuó una tartrectomía.

De cada voluntario, se recogieron muestras de saliva no estimulada (1 ml) en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de efectuar, bajo supervisión, uno de los siguientes protocolos:

- 1) 10 ml durante 30 segundos de un colutorio de CHX al 0,12% en solución acuosa (dosis= 12 mg) (Paroex®, DistriFarma, Barcarena, Portugal).
- 2) 10 ml durante 30 segundos de un colutorio de CHX al 0,2% en solución acuosa (dosis= 20 mg) (Oraldine Perio®, Pfizer, Barcelona, España).
- 3) 10 ml durante 30 segundos de un gel de CHX al 0,2% aplicado en cubetas (dosis= 20 mg) (Clorhexidina Lácer®, Lácer, Barcelona, España).
- 4) 2 ml durante 30 segundos distribuidos en 5 aplicaciones en cada arcada de un spray de CHX al 0,12% (dosis= 2.4 mg) (Clorhexidina Lácer®).
- 5) 2 ml durante 30 segundos distribuidos en 5 aplicaciones en cada arcada de un spray de CHX al 0,2% (dosis= 4 mg) (PerioKin®, Kin, Barcelona, España).
- 6) 5 ml durante 15 segundos en cada arcada utilizando una gasa impregnada en CHX al 0,2% (dosis= 10 mg) (Oraldine Perio®, Pfizer).

Los voluntarios no practicaron ninguna técnica de higiene oral desde la noche anterior; el día del experimento, se les prohibió ingerir alimentos o bebidas, y fumar desde 1 hora antes de la primera recogida salival y durante el transcurso del experimento. En el día del experimento, la recogida de las diferentes muestras salivales se realizaron desde las 11:50 a.m. (muestra basal) hasta las 7 p.m. (última muestra obtenida 7 horas después de finalizar el enjuague). Las muestras de saliva no estimulada se recogieron aplicando métodos previamente descritos ("spitting method") (Navazesh y Christensen, 1982).

Las muestras salivales obtenidas en los diferentes momentos de recogida se mezclaron para obtener una muestra única común ("muestra pool") de 10 ml (1 ml de cada voluntario). Todos los voluntarios efectuaron de forma aleatoria el mismo protocolo de aplicación de la CHX, estableciéndose un "período de descanso" de 2 semanas entre las diferentes aplicaciones. Cada protocolo de aplicación de la CHX se repitió en 3 ocasiones. Previamente, los porcentajes de viabilidad bacteriana observados en 5 participantes hasta 7 horas después de la aplicación de un enjuague de CHX al 0,2% se contrastaron con los detectados en una "muestra pool" de esos mismos participantes después de la aplicación del protocolo anterior. Los resultados obtenidos revelaron que los porcentajes medios de viabilidad bacteriana procedentes del análisis de "muestras individuales" son similares a los obtenidos del análisis de una "muestra pool" (datos no publicados).

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela. En todos los casos se obtuvo por escrito el consentimiento informado de los participantes en el estudio.

- **Procesamiento de las muestras**

La solución de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™ se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante en 5 ml de agua esterilizada y filtrada mediante un filtro de membrana Millipore de 0,22 μ m (Millipore Ibérica S.A., Madrid, España), alcanzando una proporción 1:1 de ambos fluorocromos y se conservó a -20 °C.

De la "muestra pool" de saliva obtenido después de las diferentes aplicaciones de CHX, se extrajo 1 ml que se centrifugó a 2000 rpm durante 6 minutos. El sobrenadante se desechó y el pellet obtenido fue resuspendido en 100 μ l de agua estéril. Después de agitar la suspensión bacteriana para homogeneizarla, se mezcló con 100 μ L de una solución de fluorescencia (LIVE/DEAD® BacLight™, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) y se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La observación microscópica la realizaron 2 investigadores que desconocían el diseño del estudio, empleando un microscopio Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japón) equipado con un set de filtros para fluoresceína y Texas Red. El conteo de bacterias viables y no-viables se realizó a gran aumento (100x) en 20 campos microscópicos (10 campos por porta) que presentaban un mínimo de 100-150 bacterias y se excluyeron los agregados bacterianos. Se calculó el porcentaje medio de viabilidad bacteriana de cada "muestra pool" de saliva resultante de las 3 ocasiones en las que se efectuó cada experimento.

RESULTADOS

El porcentaje medio de viabilidad bacteriana en condiciones basales osciló entre 90,10% $\pm$ 2,25% y 93,19% $\pm$ 4,75%. A los 30 segundos después de la aplicación de la CHX, el nivel más bajo de bacterias viables se detectó con los colutorios al 0,2% y 0,12% (0,40% $\pm$ 0,54% y 9,80% $\pm$ 11,03% respectivamente frente al 20,30% $\pm$ 4,58% con el gel al 0,2%, al 30,10% $\pm$ 6,41% con el spray al 0,2% y al 51,21% $\pm$ 2,12% con el spray al 0,12% y 51,25% $\pm$ 4,17% con la gasa al 0,2%).

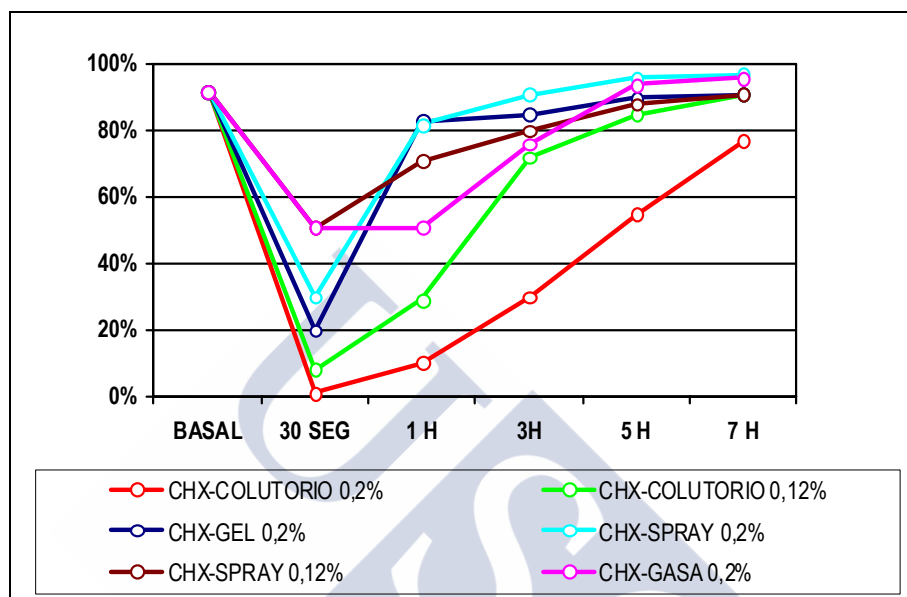
Transcurrida 1 hora, las frecuencias de viabilidad bacteriana con los colutorios al 0,2 y 0,12% fueron $8,00\% \pm 3,16\%$ y $40,80\% \pm 11,94\%$ respectivamente, con la gasa impregnada con CHX al 0.2% se mantuvo en el $51,40\% \pm 5,60\%$, y los valores fueron más altos con el gel y los sprays ($71,85\% \pm 6,40\%$ a $83,27\% \pm 3,45\%$).

Transcurridas 3 horas, el porcentaje de bacterias vivas con el colutorio al 0,2% fue $21,60\% \pm 7,89\%$, con el colutorio al 0,12% y la gasa impregnada al 0,2% se obtuvieron cifras más altas ($79,40\% \pm 10,16\%$ y $76,25\% \pm 8,20\%$ respectivamente), mientras que con el gel y los sprays los resultados fueron similares a los detectados en situación basal ($80,20\% \pm 6,66\%$ a $91,90\% \pm 5,10\%$).

Transcurridas 5 horas, el porcentaje de bacterias vivas con el colutorio al 0,2% fue $53,00\% \pm 19,45\%$, mientras que con el colutorio al 0,12%, el gel, los sprays y la gasa los resultados fueron similares a los detectados en situación basal ($88,40\% \pm 4,27\%$ a $96,29\% \pm 7,10\%$).

La viabilidad bacteriana a las 7 horas después de las diferentes aplicaciones de la CHX coincidió con la detectada en condiciones basales ($88,80\% \pm 6,01\%$ a $97,00\% \pm 6,90\%$), exceptuando el colutorio al 0,2% cuyo porcentaje de bacterias viables fue $78,80\% \pm 11,51\%$ (Figura 1).

Figura 1. Porcentajes de viabilidad bacteriana en saliva en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas, después de la aplicación de las diferentes formas de presentación de la clorhexidina.



VIABILIDAD BACTERIANA (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
CHX-colutorio 0,12%	92,35 ± 5,90	9,80 ± 11,03	40,80 ± 11,94	79,40 ± 10,16	88,40 ± 4,27	88,80 ± 6,01
CHX-colutorio 0,2%	90,40 ± 4,56	0,40 ± 0,54	8,00 ± 3,16	21,60 ± 7,89	53,00 ± 19,45	78,80 ± 11,51
CHX-gel 0,2%	91,30 ± 3,72	20,30 ± 4,58	83,27 ± 3,45	85,65 ± 8,20	90,20 ± 5,18	91,82 ± 7,13
CHX-spray 0,12%	93,13 ± 5,02	51,21 ± 2,12	71,85 ± 6,40	80,20 ± 6,66	88,70 ± 10,20	91,50 ± 5,35
CHX-spray 0,2%	90,10 ± 2,25	30,10 ± 6,41	82,50 ± 8,25	91,90 ± 5,10	96,29 ± 7,10	97,00 ± 6,90
CHX-gasa 0,2%	93,19 ± 4,75	51,25 ± 4,17	51,40 ± 5,60	76,25 ± 8,20	94,92 ± 6,19	96,80 ± 8,01

BASAL= Muestra de saliva recogida en condiciones basales; 30 SEG= Muestra de saliva recogida a los 30 segundos después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 1 H= Muestra de saliva recogida 1 hora después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 3 H= Muestra de saliva recogida 3 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 5 H= Muestra de saliva recogida 5 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 7 H= Muestra de saliva recogida 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; CHX= clorhexidina

DISCUSIÓN

Numerosos autores analizaron la sustantividad *in vivo* de la CHX cuantificando la microbiota salival mediante el empleo de técnicas de cultivo convencionales. La mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha en los que se aplicaron técnicas de epifluorescencia evaluaron el efecto antiplaca de diversos antisépticos (*Gelskey et al, 1993; Weiger et al, 1998*). En el presente estudio esta técnica se empleó para analizar la actividad antimicrobiana de la CHX sobre la flora salival.

Empleando técnicas microbiológicas convencionales, Addy et al (*Addy et al, 1991*) demostraron que un único enjuague de CHX al 0,2% (10 ml durante 1 minuto; dosis= 20 mg) o de CHX al 0,12% (15 ml durante 1 minuto; dosis= 18 mg) provocaban un efecto antibacteriano similar sobre la flora salival, persistiendo la reducción significativa de los niveles bacterianos hasta 7 horas después de la aplicación de la CHX. Estos resultados no coinciden con los obtenidos en el presente estudio, probablemente debido a las diferencias observadas en la dosis de CHX al 0,12% aplicada y en el tiempo de exposición.

En la presente serie, el colutorio fue el que presentó una mayor actividad antimicrobiana inmediata y sustantividad. Estos resultados podrían justificarse probablemente en que el enjuague de CHX en comparación con otras formas de aplicación de este antiséptico muestra un "contacto directo" sobre la flora salival favoreciendo su efecto antibacteriano. Vianna et al (*Vianna et al, 2004*) observaron que el gel de CHX presentaba mayor dificultad para mezclarse con la suspensión bacteriana, ejerciendo su mayor actividad antibacteriana en la zona de aplicación (*Benigni et al, 1989*). Borer et al (*Borer et al, 1978*) y Legaz Mellado et al (*Legaz Mellado et al, 2006*) estudiaron las concentraciones de CHX residual en muestras de saliva hasta 2 horas después de una única aplicación, confirmando que estos niveles eran mayores con los

colutorios que con los geles. Estas aportaciones podrían justificar nuestros resultados de viabilidad bacteriana salival después de la aplicación de la CHX en gel.

La reducida actividad antibacteriana inmediata y sustentividad asociadas a los sprays y a la aplicación en gasa comparadas a las obtenidas con los colutorios, probablemente obedecen a las bajas dosis de CHX aplicadas y por consiguiente a las menores concentraciones salivales de CHX (*Legaz Mellado et al, 2006*). Coincidiendo con estas aportaciones, *Stoecken et al (Stoecken et al, 2007)*, en un estudio sobre formación de placa *de novo* durante 3 días, demostraron que el spray de CHX (0,2% y 0,12%) no resultó tan eficaz en la inhibición de la placa como los enjuagues de CHX al 0,2%.

En conclusión, el colutorio de CHX al 0,2% fue el que ejerció el mayor efecto antimicrobiano sobre la flora salival hasta 7 horas después de su aplicación, confirmando la influencia de la concentración y de la forma de aplicación sobre su sustentividad. La determinación de este parámetro probablemente permitiría ajustar la posología según la forma de presentación de la CHX con la finalidad de garantizar un efecto antibacteriano más persistente en aquellas situaciones clínicas en las que el principal objetivo es reducir la carga bacteriana presente en la cavidad oral.

BIBLIOGRAFÍA

- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. The effect of some chlorhexidine-containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 90-93.
- Benigni A, Paolantonio M, Di Murro C, Cattabriga M. Efficacy of chlorhexidine as a gel and as a mouthwash. *Prev Assist Dent* 1989; 15: 9-15.
- Borer G, Schait A, Muhlemann HR. The oral clearance of chlorhexidine solutions and gels. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 1978; 88: 619-621.
- Ciancio SG, Lauciello F, Shibly O, Vitello M, Mather M. The effect of an antiseptic mouthrinse on implant maintenance: plaque and peri-implant gingival tissues. *J Periodontol* 1995; 66: 962-965.

- Francis JR, Addy M, Hunter B. A comparison of three delivery methods of chlorhexidine in handicapped children. II. Parent and house-parent preferences. *J Periodontol* 1987; 58: 456-459.
- Gehlen I, Netuschil L, Berg R, Reich E, Katsaros C. The influence of a 0.12% chlorhexidine mouthrinse on plaque regrowth in orthodontic patients. A randomised prospective study. Part I: clinical parameters. *J Orofac Orthop* 2000; 61: 54-62.
- Gelskey S, Brex M, Netuschil L, MacDonald L, Brownstone E, Stoddart M. Vital fluorescence: a new measure of periodontal treatment effect. *J Can Dent Assoc* 1993; 59: 615-618.
- Kalaga A, Addy M, Hunter B. Comparison of chlorhexidine delivery by mouthrinse and spray on plaque accumulation. *J Periodontol* 1989; 60: 127-130.
- Legaz Mellado AB, Sánchez A, García-Teresa G, Alcázar M. Comparative study of salivary chlorhexidine concentrations after oral application of different pharmaceutical forms. *J Clin Periodontol* 2006; 33 (Suppl 7): 106-107.
- Logothetis DD, Martinez-Welles JM. Reducing bacterial aerosol contamination with a chlorhexidine gluconate pre-rinse. *JADA* 1995; 126: 1634-1639.
- Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM. Efficacy of two antiplaque and antigingivitis treatments in a group of young mentally patients. *Med Oral* 2002; 7: 136-143.
- Navazesh M, Christensen CM. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res* 1982; 61: 1158-1162.
- Powell CA, Mealey BL, Deas DE, McDonnell HT, Moritz AJ. Post-surgical infections: prevalence associated with various periodontal surgical procedures. *J Periodontol* 2005; 76: 329-333.
- Stoeken JE, Versteeg PA, Rosema NA, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Inhibition of *de novo* plaque formation with 0.12% chlorhexidine spray compared to 0.2% spray and 0.2% chlorhexidine mouthwash. *J Periodontol* 2007; 78: 899-904.
- Tomás I, Álvarez M, Limeres J et al. A chlorhexidine mouthwash reduces the risk of post-extraction bacteraemia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28: 577-582.
- Vianna ME, Gomes B, Berber VB, Zaia A, Ferraz CC, De Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 79-84.
- Weiger R, Netuschil L, Wester-Ebbinghaus T, Brex M. An approach to differentiate between antibacterial and antiadhesive effects of mouthrinses *in vivo*. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 559-565.
- World Health Organization. Oral health surveys, basic methods, 4th edn. Geneva: WHO, 1997.

4.4. SUSTANTIVIDAD DE UN ENJUAGUE DE CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL: INFLUENCIA DE FACTORES INTRÍNSECOS Y EXTRÍNSECOS.

Journal of Dentistry (enviado).

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue analizar la influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre la actividad antimicrobiana *in vivo* de un enjuague de digluconato de Clorhexidina (CHX) sobre la flora salival, aplicando una técnica de microscopía de epifluorescencia con la solución de tinción dual LIVE/DEAD® BacLight™.

A 10 voluntarios adultos se les recogieron muestras de saliva en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de realizar bajo supervisión un único enjuague (UE) con: 10 ml/30 segundos con CHX al 0,12%; 10 ml/30 segundos con CHX al 0,2%; 15 ml/30 segundos con CHX al 0,12%; 15 ml/30 segundos con CHX al 0,2%; 10 ml/1 minuto con CHX al 0,12%; 10 ml/1 minuto con CHX al 0,2%; 10 ml/30 segundos con CHX al 0,2% y a continuación comer un bocadillo; 10 ml/30 segundos con CHX al 0,2% y a continuación beber un vaso de agua; 10 ml/30 segundos con CHX al 0,2% y a continuación masticar un chicle sin azúcar; 10 ml/30 segundos con CHX al 0,2% y a continuación fumar un cigarillo. Las muestras salivales de todos los participantes obtenidas en los diferentes momentos de recogida se mezclaron para obtener una "muestra pool". La suspensión bacteriana se mezcló con la tinción dual SYTO 9/yoduro de propidio y las observaciones se efectuaron con un microscopio Olympus BX51. Se calculó el porcentaje medio de viabilidad bacteriana de cada "muestra pool" de saliva resultante de las 3 ocasiones en las que se efectuó cada experimento.

Al comparar los enjuagues con CHX al 0,12% (10 ml *versus* 15 ml), las mayores diferencias en la prevalencia de viabilidad bacteriana se detectaron a la hora y 3 horas post-enjuague mientras que con la CHX al 0,2% no se detectaron diferencias entre ambos volúmenes. Al comparar el UE-CHX al 0,12% (15 ml) con el UE-CHX al 0,2% (10 ml), la 0,12% se asoció a una mayor frecuencia de viabilidad que la 0,2%. Al comparar los enjuagues con la CHX al 0,12% (30 segundos *versus* 1 minuto), se detectaron diferencias en la prevalencia de viabilidad a la hora, 3 horas y 5 horas post-enjuague, mientras que con la CHX al 0,2% se detectaron a las 5 horas y 7 horas post-enjuague. Al comparar el UE-CHX al 0,12% (1 minuto) con el UE- CHX al 0,2% (30 segundos), la concentración al 0,12% se asoció a una mayor frecuencia de viabilidad que la 0,2%. Al comparar la sustentividad del UE exclusivo con la del UE y las actividades, las mayores diferencias en la prevalencia de viabilidad se detectaron con "comer" y "masticar",

seguido de la de “beber”, alcanzándose los porcentajes basales entre las 3 horas-7 horas post-enjuague.

En conclusión, a una determinada concentración de CHX (0,12% o 0,2%), el incremento del volumen aplicado en el enjuague (15 ml frente a 10 ml) no condiciona la duración de la actividad antimicrobiana sobre la flora salival hasta 7 horas después de su aplicación, mientras que el incremento de la duración del enjuague (30 segundos frente a 1 minuto) aumenta notablemente su sustentividad. Al comparar ambas concentraciones, el colutorio de CHX al 0,2% fue el que ejerció la mayor sustentividad. La sustentividad de la CHX al 0,2% disminuye notablemente con la práctica de actividades cotidianas como comer, beber o masticar un chicle.



INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que la Chlorhexidina (CHX) provoca un mayor efecto antibacteriano inmediato y presenta una mayor sustentividad *in vivo* que otros antisépticos empleados en la cavidad oral (Moran *et al*, 1992; Jenkins *et al*, 1994; Elworthy *et al*, 1996; Balbuena *et al*, 1998). Por ello, además de su actividad antiplaca y antigingivitis, la CHX resulta especialmente eficaz en la prevención de complicaciones infecciosas locales y focales de origen oral (Caso *et al*, 2005; Tomás *et al*, 2007; Tanlipong *et al*, 2008). Sin embargo, hasta el momento no se ha concretado ningún protocolo de administración de CHX en el que se describa la posología más eficaz en aquellas situaciones clínicas en las que se requiere una gran actividad antibacteriana en aplicaciones a corto plazo, probablemente debido a la ausencia de evidencia científica sustentada en estudios microbiológicos y clínicos.

La retención de la CHX en la cavidad oral depende no sólo de la naturaleza del producto, si no también de factores intrínsecos asociados al antiséptico (como la concentración, el tiempo y la temperatura) y de factores extrínsecos (como la presencia de dientes, prótesis dentarias o materia orgánica y el pH, así como la ingesta de comida o bebida) (Bonesvoll *et al*, 1974; Bonesvoll y Olsen, 1974; Tsuchiya *et al*, 1999), lo que podría condicionar su actividad antibacteriana. Sin embargo, pocos autores han estudiado la actividad antibacteriana *in vivo* de una única aplicación de CHX sobre la flora salival, analizando la influencia de factores intrínsecos y extrínsecos al enjuague. Recientemente, nuestro grupo demostró que la concentración al 0,2% (frente al 0,12%) y la aplicación en forma de colutorio (frente a spray, gel y gasa impregnada) provocaban el mayor efecto antibacteriano inmediato y la mayor sustentividad sobre la flora salival (Tomás *et al*, 2008; García-Caballero *et al*, 2009).

En la mayoría de las series publicadas, la determinación de la actividad antimicrobiana de la CHX en saliva se efectuó con técnicas microbiológicas de cultivo en

placa (*Moran et al, 1992; Jenkins et al, 1994; Elworthy et al, 1996; Balbuena et al, 1998*). Sin embargo, se ha cuestionado la fiabilidad de estas técnicas, proponiendo como alternativa los métodos de fluorescencia que emplean fluorocromos específicos para el marcaje de bacterias viables y no-viables (*Weiger et al, 1998, Tomás et al, 2009*). Recientemente, nuestro grupo demostró que la microscopía de epifluorescencia empleando la solución de tinción dual SYTO 9/yoduro de propidio (LIVE/DEAD® BacLight™) es una técnica eficaz para cuantificar la actividad antibacteriana de la CHX sobre la flora salival en “tiempo real” (*Tomás et al, 2009*).

El objetivo del presente estudio fue analizar la influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre el efecto antibacteriano inmediato y la sustentividad de un enjuague de digluconato de CHX sobre la flora salival, aplicando una técnica de microscopía de epifluorescencia con la solución dual LIVE/DEAD® BacLight™.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Selección del grupo de estudio y recogida de las muestras salivales**

El grupo de estudio lo constituyeron 10 voluntarios adultos con edades comprendidas entre 20 y 45 años que presentaban un buen estado de salud oral: mínimo de 24 dientes permanentes, sin evidencia de gingivitis ni periodontitis (Índice Periodontal Comunitario= 0) (*World Health Organisation, 1997*), y ausencia de caries. Los criterios de exclusión aplicados fueron: fumar, ser portador de prótesis dentales o aparatos ortodóncicos, haber recibido antibióticos o utilizar de forma rutinaria antisépticos orales durante los últimos 3 meses, y padecer alguna enfermedad sistémica que pueda alterar la producción y/o composición de la saliva. Previamente al inicio del estudio, a todos los voluntarios se les practicó una tartrectomía.

De cada voluntario, se recogieron muestras de saliva no estimulada (1 ml) en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de realizar bajo supervisión un único enjuague con:

- 1) 10 ml de CHX al 0,12% durante 30 segundos.
- 2) 10 ml de CHX al 0,2% durante 30 segundos.
- 3) 15 ml de CHX al 0,12% durante 30 segundos.
- 4) 15 ml de CHX al 0,2% durante 30 segundos.
- 5) 10 ml de CHX al 0,12% durante 1 minuto.
- 6) 10 ml de CHX al 0,2% durante 1 minuto.
- 7) 10 ml de CHX al 0,2% durante 30 segundos y a continuación comer un bocadillo durante 15 minutos ("comer").
- 8) 10 ml de CHX al 0,2% durante 30 segundos y a continuación beber un vaso de agua (200 c.c.) ("beber").
- 9) 10 ml de CHX al 0,2% durante 30 segundos y a continuación masticar un chicle sin azúcar durante 15 minutos ("masticar").
- 10) 10 ml de CHX al 0,2% durante 30 segundos y a continuación fumar un cigarillo completo durante 10 minutos ("fumar").

Las diferentes actividades cotidianas se efectuaron después de la recogida de las muestras de saliva a los 30 segundos post-enjuague de CHX. La CHX al 0,12% que se utilizó fue Paroex®, (DistriFarma, Barcarena, Portugal) y la CHX al 0,2% fue Oraldine Perio® (Johnson and Johnson, Barcelona, España). Ambos colutorios se presentan en solución acuosa.

Los participantes en el estudio no practicaron ninguna técnica de higiene oral desde la noche anterior; el día del experimento, se les prohibió ingerir alimentos o bebidas, desde 1 hora antes de la primera recogida de saliva y durante el transcurso del experimento. La recogida de las diferentes muestras salivales se realizó desde las 11:50 a.m. (muestra basal) hasta las 7 p.m. (última muestra obtenida 7 horas después de

finalizar el enjuague). Las muestras de saliva no estimulada se recogieron aplicando métodos previamente descritos ("spitting method") (Navazesh y Christensen, 1982).

Las muestras salivales de todos los participantes obtenidas en los diferentes momentos de recogida se mezclaron para obtener una muestra única común ("muestra pool") de 10 ml (1 ml de cada voluntario). Todos los voluntarios efectuaron de forma aleatoria el mismo protocolo de aplicación de la CHX, estableciéndose un "período de descanso" de 2 semanas entre las diferentes aplicaciones. Cada protocolo de aplicación de la CHX se repitió en 3 ocasiones. Previamente, los porcentajes de viabilidad bacteriana observados en 5 participantes hasta 7 horas después de la aplicación de un enjuague de CHX al 0,2% se contrastaron con los detectados en una "muestra pool" de esos mismos participantes después de la aplicación del protocolo anterior. Los resultados obtenidos revelaron que los porcentajes medios de viabilidad bacteriana procedentes del análisis de "muestras individuales" son similares a los obtenidos del análisis de una "muestra pool" (datos no publicados).

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela. En todos los casos se obtuvo por escrito el consentimiento informado de los participantes en el estudio.

- **Procesamiento de las muestras salivales**

La solución de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™ se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante en 5 ml de agua esterilizada y filtrada mediante un filtro de membrana Millipore de 0,22 µm (Millipore Ibérica S.A., Madrid, España), alcanzando una proporción 1:1 de ambos fluorocromos y se conservó a -20 °C.

Las muestras de saliva (1 ml de "muestra pool") se centrifugaron a 2000 rpm durante 6 minutos. El sobrenadante se desechó y el material sedimentado obtenido fue resuspendido en 100 µl de agua estéril. Después de agitar la suspensión bacteriana para

homogeneizarla, se mezcló con 100 μ l de la solución de fluorescencia y se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La observación microscópica la realizaron 2 investigadores que desconocían el diseño del estudio, empleando un microscopio Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japón) equipado con un set de filtros para fluoresceína y Texas Red. El conteo de bacterias viables y no-viables se realizó a gran aumento (100x) en 20 campos microscópicos (10 campos por porta) que presentaban un mínimo de 100-150 bacterias sobre células epiteliales, excluyéndose los agregados bacterianos. Se calculó el porcentaje medio de viabilidad bacteriana de cada “muestra pool” de saliva resultante de las 3 ocasiones en las que se efectuó cada experimento.

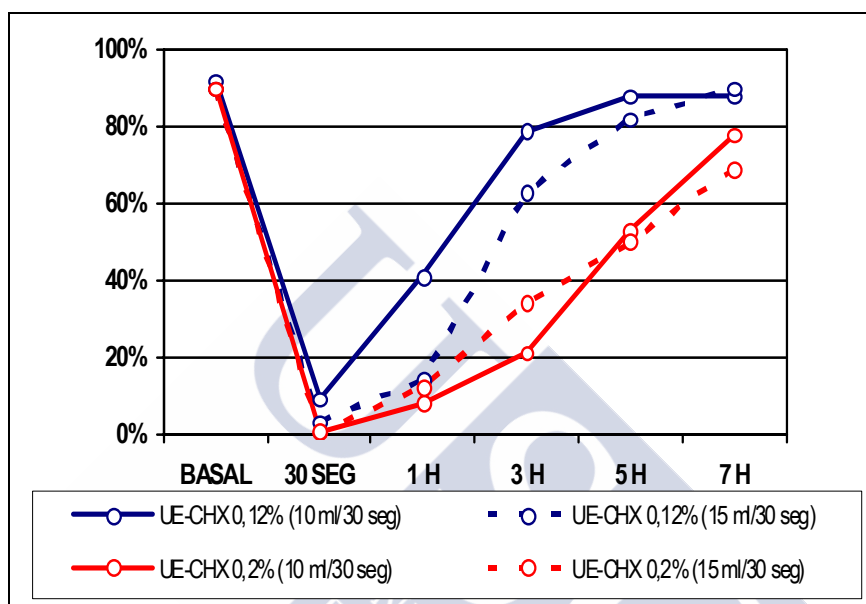
RESULTADOS

• Factores intrínsecos

En la Figura 1 se muestran los porcentajes medios de viabilidad bacteriana salival en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación de un enjuague durante 30 segundos de: CHX al 0,12% (10 ml), CHX al 0,12% (15 ml), CHX al 0,2% (10 ml) y CHX al 0,2% (15 ml).

El porcentaje de bacterias viables obtenido en condiciones basales osciló entre el $90,40\% \pm 4,56\%$ y el $93,70\% \pm 3,13\%$. Al comparar los 2 enjuagues de CHX al 0,12% (10 ml *versus* 15 ml), las mayores diferencias en la viabilidad bacteriana se detectaron a la hora ($40,80\% \pm 11,94\%$ *versus* $14,33\% \pm 8,50\%$) y 3 horas post-aplicación ($79,40\% \pm 10,16\%$ *versus* $63,33\% \pm 9,60\%$). Al comparar los 2 enjuagues de CHX al 0,2% (10 ml *versus* 15 ml), el porcentaje de bacterias viables resultó similar. Al comparar el enjuague de CHX al 0,12% (15 ml) y el de CHX al 0,2% (10 ml), la concentración al 0,12% se asoció a una mayor viabilidad bacteriana que al 0,2%, especialmente a las 3 horas ($63,33\% \pm 9,60\%$ y $21,60\% \pm 7,89\%$ respectivamente) y 5 horas post-enjuague ($82,33\% \pm 2,08\%$ y $53,00\% \pm 19,45\%$ respectivamente). A las 7 horas después de la aplicación, con el enjuague de CHX al 0,12% (15 ml) se alcanzaron los valores basales de viabilidad bacteriana.

Figura 1. Porcentajes de viabilidad bacteriana en saliva en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación del único enjuague de clorhexidina al 0,12% (10 ml/30 seg), de clorhexidina al 0,12% (15 ml/30 seg), de clorhexidina al 0,2% (10 ml/30 seg) y de clorhexidina al 0,2% (15 ml/30 seg).



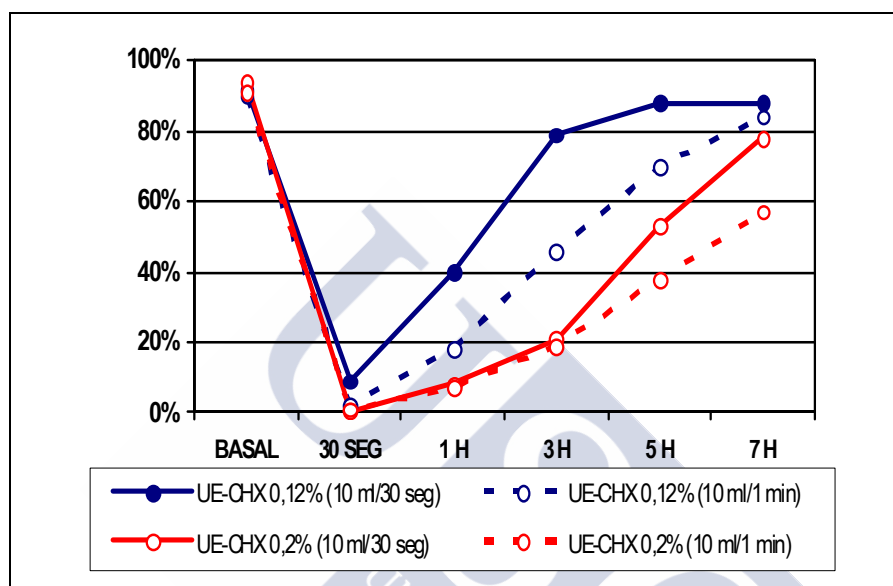
VIABILIDAD BACTERIANA (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-CHX 0,12% (10 ml/30 seg)	92,35 ± 5,90	9,80 ± 11,03	40,80 ± 11,94	79,40 ± 10,16	88,40 ± 4,27	88,80 ± 6,01
UE-CHX 0,12% (15 ml/30 seg)	90,50 ± 2,59	3,16 ± 2,75	14,33 ± 8,50	63,33 ± 9,60	82,33 ± 2,08	90,33 ± 5,85
UE-CHX 0,2% (10 ml/30 seg)	90,40 ± 4,56	0,40 ± 0,54	8,00 ± 3,16	21,60 ± 7,89	53,00 ± 19,45	78,80 ± 11,51
UE-CHX 0,2% (15 ml/30 seg)	93,70 ± 3,13	0,66 ± 0,57	12,33 ± 3,05	34,50 ± 0,70	50,33 ± 3,05	68,66 ± 6,65

BASAL= Muestra de saliva recogida en condiciones basales; 30 SEG= Muestra de saliva recogida a los 30 segundos después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 1 H= Muestra de saliva recogida 1 hora después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 3 H= Muestra de saliva recogida 3 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 5 H= Muestra de saliva recogida 5 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 7 H= Muestra de saliva recogida 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; UE= único enjuague; DE= doble enjuague; CHX= clorhexidina

En la Figura 2 se muestran los porcentajes medios de viabilidad bacteriana salival en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación de un enjuague de 10 ml de: CHX al 0,12% (durante 30 segundos), CHX al 0,12% (durante 1 minuto), CHX al 0,2% (durante 30 segundos) y CHX al 0,2% (durante 1 minuto).

El porcentaje de bacterias viables obtenido en condiciones basales osciló entre el $90,40 \pm 4,56$ y el $92,35 \pm 5,90$. Al comparar los 2 enjuagues de CHX al 0,12% (30 segundos *versus* 1 minuto), las mayores diferencias en la viabilidad bacteriana se detectaron a la hora ($40,80\% \pm 11,94\%$ *versus* $18,00\% \pm 2,64\%$), 3 horas ($79,40\% \pm 10,16\%$ *versus* $45,66\% \pm 7,02\%$) y 5 horas post-enjuague ($88,40\% \pm 4,27\%$ *versus* $70,00\% \pm 20,88\%$). Al comparar los 2 enjuagues de CHX al 0,2% (30 segundos *versus* 1 minuto), las mayores diferencias en la viabilidad bacteriana se detectaron a las 5 horas ($53,00\% \pm 19,45\%$ *versus* $37,66\% \pm 2,51\%$) y 7 horas post-enjuague ($78,80\% \pm 11,51\%$ *versus* $57,50\% \pm 0,70\%$). Al comparar el enjuague de CHX al 0,12% (1 minuto) y el de CHX al 0,2% (30 segundos), el porcentaje de viabilidad bacteriana fue mayor con la concentración al 0,12% que al 0,2%, especialmente a las 3 horas ($45,66\% \pm 7,02\%$ y $21,60\% \pm 7,89\%$ respectivamente) y 5 horas post-enjuague ($70,00\% \pm 20,88\%$ y $53,00\% \pm 19,45\%$ respectivamente)

Figura 2. Porcentajes de vitalidad bacteriana en saliva en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación del único enjuague de clorhexidina al 0,12% (10 ml/30 seg), de clorhexidina al 0,12% (10 ml/1 min), de clorhexidina al 0,2% (10 ml/30 seg) y de clorhexidina al 0,2% (10 ml/1 min).



VIABILIDAD BACTERIANA (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-CHX 0,12% (10 ml/30 seg)	92,35 ± 5,90	9,80 ± 11,03	40,80 ± 11,94	79,40 ± 10,16	88,40 ± 4,27	88,80 ± 6,01
UE-CHX 0,12% (10 ml/1 min)	91,50 ± 2,13	2,00 ± 0,00	18,00 ± 2,64	45,66 ± 7,02	70,00 ± 20,88	84,00 ± 10,81
UE-CHX 0,2% (10 ml/30 seg)	90,40 ± 4,56	0,40 ± 0,54	8,00 ± 3,16	21,60 ± 7,89	53,00 ± 19,45	78,80 ± 11,51
UE-CHX 0,2% (10 ml/1 min)	90,50 ± 1,05	1,00 ± 1,00	6,66 ± 3,05	19,00 ± 4,58	37,66 ± 2,51	57,50 ± 0,70

BASAL= Muestra de saliva recogida en condiciones basales; 30 SEG= Muestra de saliva recogida a los 30 segundos después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 1 H= Muestra de saliva recogida 1 hora después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 3 H= Muestra de saliva recogida 3 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 5 H= Muestra de saliva recogida 5 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 7 H= Muestra de saliva recogida 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; UE= único enjuague; DE= doble enjuague; CHX= clorhexidina

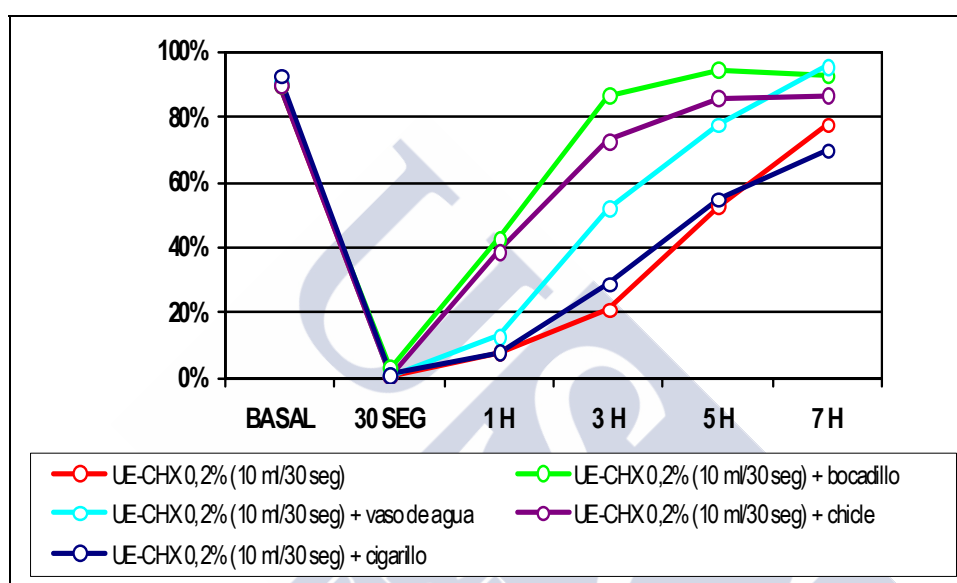
- **Factores extrínsecos**

En la Figura 3 se muestran los porcentajes medios de viabilidad bacteriana salival en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación de un enjuague independiente de CHX al 0,2% (10 ml/30 seg) y complementado con la práctica de las siguientes actividades de la vida diaria: “comer”, “beber”, “masticar” y “fumar”.

El porcentaje de bacterias viables obtenido en condiciones basales osciló entre el $89,24\% \pm 2,13\%$ y el $91,70\% \pm 4,05\%$. El porcentaje de bacterias viables detectado a los 30 segundos después del enjuague con CHX al 0,2% (previamente al inicio de las actividades de la vida diaria) osciló entre el $0,40\% \pm 0,54\%$ y el $3,15\% \pm 1,40\%$.

Al comparar la sustentividad del enjuague independiente con la del enjuague complementado con las diferentes actividades de la vida diaria, las mayores diferencias en la viabilidad bacteriana se detectaron al “comer” (a la hora post-enjuague: $43,00\% \pm 15,55\%$; a las 3 horas post-enjuague: $87,50\% \pm 12,02\%$) y “masticar” (a la hora post-enjuague: $29,51\% \pm 3,45\%$; a las 3 horas post-enjuague: $73,62\% \pm 7,23\%$) seguido de la de “beber” (a la hora post-enjuague: $13,20\% \pm 3,17\%$; a las 3 horas post-enjuague: $52,31\% \pm 5,62\%$). Con la práctica “comer” se alcanzó los porcentajes de viabilidad bacteriana presente en condiciones basales a las 3 horas post-enjuague ($87,50\% \pm 12,02\%$), con la práctica “masticar” a las 5 horas post-enjuague ($86,42\% \pm 5,10\%$) y con la práctica “beber” a las 7 horas post-enjuague ($96,25\% \pm 3,72\%$). “Fumar” se asoció a porcentajes de viabilidad bacteriana similares (a la hora, 3 horas, 5 horas y 7 horas post-aplicación) a los obtenidos tras el enjuague de CHX al 0,2% independiente, ya que las diferencias entre ambos fueron inferiores al 10% en todas las tomas.

Figura 3. Porcentajes de vitalidad bacteriana en saliva en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación del único enjuague de clorhexidina al 0,2% (10 ml/30 seg), de clorhexidina al 0,2% (10 ml/30 seg) y “comer” un bocado de clorhexidina al 0,2% (10 ml/30 seg) y “beber” un vaso de agua, de clorhexidina al 0,2% (10 ml/30 seg) y “masticar” un chicle y de clorhexidina al 0,2% (10 ml/30 seg) y “fumar” un cigarrillo.



VIABILIDAD BACTERIANA (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-CHX*	90,40 ± 4,56	0,40 ± 0,54	8,00 ± 3,16	21,60 ± 7,89	53,00 ± 19,45	78,80 ± 11,51
UE-CHX* y bocado	90,50 ± 4,30	3,15 ± 1,40	43,00 ± 15,55	87,50 ± 12,02	95,10 ± 1,41	93,20 ± 3,15
UE-CHX* y vaso de agua	89,24 ± 2,13	0,60 ± 0,40	13,20 ± 3,17	52,31 ± 5,62	78,02 ± 1,48	96,25 ± 3,72
UE-CHX* y chicle	91,70 ± 4,05	0,50 ± 1,20	29,51 ± 3,45	73,62 ± 7,23	86,42 ± 5,10	87,13 ± 3,15
UE-CHX* y cigarrillo	90,32 ± 1,23	1,00 ± 0,00	8,00 ± 2,35	29,55 ± 4,10	55,32 ± 2,10	70,60 ± 6,30

BASAL= Muestra de saliva recogida en condiciones basales; 30 SEG= Muestra de saliva recogida a los 30 segundos después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 1 H= Muestra de saliva recogida 1 hora después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 3 H= Muestra de saliva recogida 3 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 5 H= Muestra de saliva recogida 5 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; 7 H= Muestra de saliva recogida 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; UE= único enjuague; CHX= clorhexidina

* El enjuague se efectuó con clorhexidina al 0,2% (10 ml/durante 30 segundos)

DISCUSIÓN

A pesar de la repercusión atribuida a los factores intrínsecos a la CHX (como la concentración, el tiempo y la temperatura) sobre su retención en la cavidad oral (Bonesvoll *et al*, 1974), pocos autores han analizado la influencia de estos factores en la actividad antibacteriana *in vivo* de una única aplicación de CHX sobre la flora salival. Aplicando técnicas de cultivo en placa, Addy *et al* (Addy *et al*, 1991) y Harper *et al* (Harper *et al*, 1995) estudiaron la sustentividad de varias colutorios de CHX aplicados durante 1 minuto a diferentes concentraciones y volúmenes, y cuantificaron la concentración de bacterias salivales a los 30 minutos, 1, 3, 5 y 7 horas post-enjuague. La importante actividad antimicrobiana detectada a los 30 minutos post-enjuague (descenso de $\geq 1 \log_{10}$ UFC/ml) se observó tanto con la CHX al 0,2% (10 ml) como al 0,12% (15 ml) y persistió hasta las 7 horas, lo que permitió a estos autores concluir que la actividad de la CHX es dosis-dependiente. Por el contrario, en la presente serie, con la CHX al 0,12% el incremento del volumen (15 ml *versus* 10 ml) se asoció a una mayor sustentividad sólo en las primeras horas post-enjuague (hora y 3 horas). Con la CHX al 0,2% el incremento del volumen (15 ml *versus* 10 ml) no conllevó una mayor sustentividad sobre la flora salival.

La mayoría de los estudios *in vivo* sobre sustentividad de la CHX al 0,12% en saliva, evaluaron el efecto antibacteriano después de la aplicación de un enjuague durante 30 segundos (Yates *et al*, 1997; Fernandes-Naglik *et al*, 2001; Herrera *et al*, 2003), mientras que con la CHX al 0,2% el enjuague se aplicaba durante 1 minuto (Reynolds *et al*, 1991; Simonsson *et al*, 1991; Moran *et al*, 1995). No hemos encontrado ningún trabajo en el que se compare el efecto antibacteriano sobre la flora salival de enjuagues de CHX con diferentes tiempos de aplicación: 30 segundos *versus* 1 minuto. En la presente serie, con ambas concentraciones de CHX, al incrementar el tiempo de aplicación (30 segundos *versus* 1 minuto) se observó una mayor persistencia de la sustentividad (hasta las 5 horas post-enjuague con la CHX al 0,12%, y hasta las 7 horas post-enjuague con la CHX al 0,2%).

Recientemente, en varios estudios *in vivo* sobre la actividad antibacteriana de un enjuague de CHX al 0,12% y 0,2% (ambos con 10 ml/durante 30 segundos) realizados por nuestro grupo aplicando técnicas microbiológicas de cultivo en placa y de microscopía de epifluorescencia con la solución SYTO 9/yoduro de propidio, los resultados revelaron la influencia de la concentración sobre su actividad antimicrobiana inmediata y su sustentividad (Cousido *et al*, 2006; Tomás *et al*, 2008). Estos resultados confirmaron que la actividad antibacteriana de la CHX es concentración-dependiente, tal y como describieron previamente otros autores que investigaron otras concentraciones de CHX (Addy *et al*, 1991, Sreenivasan *et al*, 2004). Sin embargo, al aplicar enjuagues de un mismo volumen (10 ml de CHX al 0,12% y 0,2%), no sólo estamos analizando la influencia de la concentración, sino también de la dosis administrada (12 mg *versus* 20 mg). En la presente serie, al comparar las 2 concentraciones utilizadas, el enjuague de CHX al 0,12% (15 ml) presentó una menor sustentividad sobre la flora salival que el enjuague al 0,2% (10 ml), lo que ratifica la mayor importancia de la concentración que la de la dosis aplicada en la sustentividad sobre la flora salival. Al comparar las 2 concentraciones utilizadas, el enjuague de CHX al 0,12% (1 minuto) presentó una menor sustentividad sobre la flora salival que el enjuague al 0,2% (30 segundos), lo que también confirma la mayor importancia de la concentración que la del tiempo de aplicación en la sustentividad sobre la flora salival.

Después de revisar la literatura, hemos comprobado como el impacto de los factores intrínsecos del enjuague de CHX sobre los resultados microbiológicos obtenidos en la presente serie no se correlacionan con los descritos en modelos clínicos de recrecimiento de placa *de novo* con la aplicación de la CHX durante 3 o 4 días (Smith *et al*, 1995; Keijser *et al*, 2003; Van der Weijden *et al*, 2005). Esta falta de concordancia podría deberse a que estos hallazgos microbiológicos no tuvieran repercusión en el efecto antiplaca a corto plazo y/o a las limitaciones inherentes a la aplicación de índices clínicos que dificultan la expresión de diferencias microbiológicas.

A pesar de la repercusión atribuida a los factores extrínsecos a la CHX (como la presencia de dientes, prótesis dentarias o materia orgánica y el pH, así como la ingesta de comida o bebida) sobre su retención en la cavidad oral (*Bonesvoll y Olsen, 1974; Tsuchiya et al, 1999*), no hemos encontrado ningún trabajo que analizara la influencia de estos factores en la actividad antibacteriana *in vivo* de una única aplicación de CHX sobre la flora salival. Sin embargo, en nuestra opinión el análisis de estos factores resulta esencial para establecer la "sustantividad real" ejercida por la CHX en situaciones clínicas en las que los pacientes realizaran actividades cotidianas en los periodos inter-enjuagues. En la presente serie, la práctica de las actividades "comer", "masticar" o "beber" disminuyeron notablemente la sustentividad de la CHX al 0,2%, detectándose una recuperación total de la flora salival a las 3 horas-7 horas post-enjuague. Estos resultados permitirían cuestionar la posología clásica de administración de la CHX cada 12 horas (2 veces/al día), replanteando la conveniencia de incrementar el número de aplicaciones al día para garantizar la máxima cobertura antiséptica en aquellas situaciones clínicas en la que se precisa prevenir complicaciones infecciosas orales. Por el contrario, "fumar" no condiciona la sustentividad de la CHX al 0,2%, aunque hay que señalar que los participantes no eran fumadores habituales.

En conclusión, a una determinada concentración de CHX (0,12% o 0,2%), el incremento del volumen aplicado en el enjuague (15 ml frente a 10 ml) no condiciona la duración de la actividad antimicrobiana sobre la flora salival hasta 7 horas después de su aplicación, mientras que el incremento de la duración del enjuague (30 segundos frente a 1 minuto) aumenta notablemente su sustentividad. Al comparar ambas concentraciones, el colutorio de CHX al 0,2% fue el que ejerció la mayor sustentividad. La sustentividad de la CHX al 0,2% disminuye notablemente con la práctica de actividades cotidianas como comer, beber o masticar un chicle. Estos resultados microbiológicos pueden ser útiles para definir cuál sería la posología de CHX más eficaz en aquellas situaciones clínicas en las que se requiere un descenso significativo de la carga bacteriana durante un corto plazo, aunque deben ser corroborados en futuras investigaciones microbiológicas y de eficacia clínica.

BIBLIOGRAFÍA

- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. The effect of some chlorhexidine-containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 90-93.
- Balbuena L, Stambaugh KI, Ramirez SG, Yeager C. Effects of topical oral antiseptic rinses on bacterial counts of saliva in healthy human subjects. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 118: 625-629.
- Bonesvoll P, Lokken P, Rolla G. Influence of concentration, time, temperatura, and pH on the retention of chlorhexidine in the human. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 1025-1029.
- Bonesvoll P, Olsen I. Influence of teeth, plaque and dentures on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *J Clin Periodontol* 1974; 1: 214-221.
- Caso A, Hung LK, Beirne OR. Prevention of alveolar osteitis with chlorhexidine: a meta-analytic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99: 155-159.
- Cousido C, García-Caballero L, Tomás I, Limeres J, Diz Dios P. Evaluación de la sustantividad en saliva de un colutorio de clorhexidina al 0,2%. XIII Congreso de la Sociedad Española de Epidemiología y Salud Pública Oral. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; S1: 67.
- García-Caballero L, Carmona IT, González MC, Posse JL, Taboada JL, Dios PD. Evaluation of the substantivity in saliva of different forms of application of chlorhexidine. *Quintessence Int* 2009; 40: 141-144.
- Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol* 1996; 67: 572-576.
- Fernandes-Naglik L, Downes J, Shirlaw P et al. The clinical and microbiological effects of a novel acidified sodium chlorite mouthrinse on oral bacterial mucosal infections. *Oral Dis* 2001; 7: 276-280.
- Greene JC, Vermillion JR. The simplified oral hygiene index. *JADA* 1964; 68: 7-13.
- Harper PR, Milsom S, Wade W, Addy M, Moran J, Newcombe RG. An approach to efficacy screening of mouthrinses: studies on a group of French products (II). Inhibition of salivary bacteria and plaque *in vivo*. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 723-727.
- Herrera D, Roldan S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 307-314.
- Jenkins S, Addy M, Wade W, Newcombe RG. The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 397-401.

- Keijser JA, Verkade H, Timmerman MF, Van der Weijden FA. Comparison of 2 commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Periodontol* 2003; 74: 214-218.
- Moran J, Addy M, Wade W, Milson S, McAndrew R, Newcombe RG. The effect of oxidising mouthrinses compared with chlorhexidine on salivary bacterial counts and plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 750-755.
- Moran J, Addy M, Wade WG et al. A comparison of delmopinol and chlorhexidine on plaque regrowth over a 4-day period and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 749-753.
- Navazesh M, Christensen CM. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res* 1982; 61: 1158-1162.
- Reynolds S, Moran J, Addy M, Wade WG, Newcombe R. Taurolin as an oral rinse. I. Antimicrobial effects *in vitro* and *in vivo*. *Clin Prev Dent* 1991; 13: 13-17.
- Simonsson T, Hvid EB, Rundegren J, Edwardsson S. Effect of delmopinol on *in vitro* dental plaque formation, bacterial acid production and the number of microorganisms in saliva. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 305-309.
- Smith RG, Moran J, Addy M, Doherty F, Newcombe RG. Comparative staining *in vitro* and plaque inhibitory properties *in vivo* of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 613-617.
- Sreenivasan PK, Gittins E. Effects of low dose chlorhexidine mouthrinses on oral bacteria and salivary microflora including those producing hydrogen sulfide. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 309-313.
- Tanlipong H, Morkchareonpong C, Jaiyindee S, Thamlikitkul V. Randomized controlled trial and meta-analysis of oral decontamination with 2% chlorhexidine solution for the prevention of ventilator-associated pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 131-136.
- Tomás I, Álvarez M, Limeres J et al. A chlorhexidine mouthwash reduces the risk of post-extraction bacteraemia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28: 577-582.
- Tomás I, Cousido MC, Tomás M, Limeres J, García-Caballero L, Diz P. *In vivo* bactericidal effect of 0.2% chlorhexidine but not 0.12% on salivary obligate anaerobes. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 1186-1191.
- Tomás I, García-Caballero L, Cousido MC, Limeres J, Álvarez M, Diz P. Evaluation of chlorhexidine substantivity on salivary flora by epifluorescence microscopy. *Oral Dis* 2009 (in press).
- Tsuchiya H, Miyazaki T, Ohmoto S. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine in saliva after mouthrinsing. *Caries Res* 1999; 33: 156-163.
- Van der Weijden GA, Timmerman MF, Novotny AG, Rosema NA, Verkerk AA. Three different rinsing times and inhibition of plaque accumulation with chlorhexidine. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 89-92.

- Weiger R, Netuschil L, Wester-Ebbinghaus T, Brex M. An approach to differentiate between antibacterial and antiadhesive effects of mouthrinses *in vivo*. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 559-565.
- Weiger R, Von Ohle C, Decker E, Axmann-Krcmar D, Netuschil L. Vital microorganisms in early supragingival dental plaque and in stimulated human saliva. *J Periodontol Res* 1997; 32: 233-240.
- World Health Organization. Oral health surveys, basic methods, 4th edn. Geneva: WHO, 1997.
- Yates R, Moran J, Addy M, Mullan PJ, Wade WG, Newcombe R. The comparative effect of acidified sodium chlorite and chlorhexidine mouthrinses on plaque regrowth and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 603-609.





5. CONCLUSIONES



Metodología

1. Para evaluar la actividad antimicrobiana de la CHX mediante cultivos convencionales u otras técnicas que exijan un procesamiento diferido o prolongado en el tiempo, es imprescindible incorporar un agente neutralizador, como la combinación de tween 80 al 3%, lecitina al 0,3% y cisteína al 0,1%.
2. La microscopía de epifluorescencia con la solución SYTO 9/yoduro de propidio es una técnica que permite la cuantificación en “tiempo real” de la viabilidad bacteriana de la flora salival.

Actividad antimicrobiana y sustentividad de la CHX

3. Aplicando técnicas de cultivo convencionales y microscopía de epifluorescencia comprobamos que los colutorios de CHX al 0,12% y al 0,2% disminuyen significativamente la población bacteriana salival total. Esta actividad antimicrobiana es mayor con la CHX al 0,2% hasta 7 horas después de su aplicación, confirmando la influencia de la concentración sobre su actividad antibacteriana inmediata y su sustentividad.
4. Aplicando microscopía de epifluorescencia comprobamos que la forma de aplicación de la CHX condiciona su actividad antimicrobiana sobre la flora salival. El efecto antibacteriano inmediato y la sustentividad de un colutorio de CHX al 0,2% es mayor que si se aplica en forma de gel, spray o mediante una gasa impregnada.
5. Aplicando microscopía de epifluorescencia comprobamos que a una determinada concentración de CHX (0,12% o 0,2%), el incremento del volumen del enjuague no condiciona la duración de la actividad antimicrobiana sobre la flora salival, mientras que el incremento de la duración del enjuague aumenta notablemente su sustentividad. El incremento de la concentración de CHX es el factor intrínseco que más condiciona su sustentividad. La práctica de actividades cotidianas como comer, beber o masticar un chicle, disminuye notablemente la sustentividad de la CHX.

Aplicaciones potenciales

6. La aplicación de la microscopía de epifluorescencia con la solución SYTO 9/yoduro de propidio podría resultar particularmente útil para analizar simultáneamente la actividad de antimicrobianos que alteran la integridad de la membrana citoplasmática sobre diferentes ecosistemas orales.

7. Estos resultados podrían contribuir a optimizar los protocolos antisépticos con CHX aplicados en situaciones clínicas en las que se precise una reducción significativa de la carga bacteriana durante un corto periodo de tiempo.

