

## Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных антисептиков

А.В. Зверьков<sup>1</sup>, А.П. Зузова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования»  
Минздрава России, Смоленск, Россия

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия»  
Минздрава России, Смоленск, Россия

Инфекции, вызванные антибиотикорезистентной микрофлорой, представляют собой постоянно растущую угрозу как в стационарах, так и во внебольничных условиях. Нозокомиальные инфекции приводят к снижению эффективности проводимой терапии, увеличению длительности госпитализации и росту летальности. Хлоргексидина биглюконат является катионным бисгуанидином, разработанным в Великобритании в 1950 году. Он является первым международно признанным антисептиком для кожи и ран. Одним из преимуществ хлоргексидина, помимо выраженного антимикробного действия, является его способность связываться

с различными биологическими субстратами при сохранении его антибактериальной активности, а затем медленно высвобождаться, что приводит к сохранению эффективных концентраций препарата. На сегодняшний день отсутствуют сообщения о наличии резистентности к хлоргексидину, несмотря на более чем 60-летний период активного применения препарата в клинике. Хлоргексидина глюконат сохраняет свою значимость в профилактике внутрибольничных инфекций.

**Ключевые слова:** хлоргексидин, нозокомиальные инфекции, антибиотикорезистентность.

## Chlorhexidine: Past, Present, and Future of the Famous Antiseptic Agent

A.V. Zverkov<sup>1</sup>, A.P. Zouzova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal Center of Traumatology and Orthopedics, Smolensk, Russia

<sup>2</sup> Smolensk State Medical Academy, Smolensk, Russia

Infections caused by drug resistant pathogens are ever-increasing problem in hospital and outpatient settings. Nosocomial infections are associated with treatment failures, prolonged length of hospital stay and increased mortality. Chlorhexidine digluconate is a cationic bisguanidine developed in the UK in 1950. It was a first accepted antiseptic agent for skin and wounds worldwide. In addition to high antimicrobial activity, chlorhexidine is able to bind to different biologic substrates while

preserving its antimicrobial activity and then release slowly which result in maintaining effective drug concentrations. Although an over 60-year clinical experience, there has been no evidence of resistance to chlorhexidine to date. Chlorhexidine digluconate remains one of the important antiseptic preparations for prophylaxis of nosocomial infections.

**Key words:** chlorhexidine, nosocomial infections, antimicrobial resistance.

Широкое распространение антисептических методов профилактики и лечения инфекций последовало после публикации работы Джозефа Листера «Антисептический принцип в хирургической практике» в 1867 году. Одновременно «листеровская антисептика» встретила ярых противников, главным аргументом которых была токсичность применяемого ими антисептика (карболовая кислота). Несмотря на наличие многочисленных антисептических средств, вопрос о безопасности и эффективности данной группы препаратов остается постоянно актуальным. «Долголетие» хлоргексидина и перспективы его дальнейшей эксплуатации, как одного из наиболее мощных антисептиков, имеющих широкое распространение в клинической практике – актуальный вопрос для клиницистов.

### Историческая справка

Катионный детергент, названный позже хлоргексидином [1], был синтезирован при разработке противомаларийных (полибигуанидов) препаратов в 1947 году [2]. Это соединение обладает бактерицидной антимикробной активностью, особенно в отношении грамположительных микроорганизмов. Первым соединением, полученным из вещества 10,040, вышедшим на рынок, был хлоргексидина глюконат, зарегистрированный в 1954 году Imperial Chemical Industries Co.LTD (Великобритания) как «Гибитан» – первый признанный во всем мире антисептик для обработки раневых поверхностей и кожи [3, 4]. В 1957 году, только через 3 года после поступления на рынок, были расширены показания для его применения, включившие не только обработку кожи, но и применение в офтальмологии, урологии, гинекологии и оториноларингологии. В 1959 г. хлоргексидин стал использоваться для контроля бактериального налёта, что привело к широкому распространению его в стоматологии [5, 6].

В настоящее время в клинической практике хлоргексидину отдается предпочтение не только при обработке кожи (руки, операционное поле), но и как оральному антисептику, в том числе и для профилактики нозокомиальной инфекции. Наиболее часто используемые концентрации – 0,2% и 0,12% растворы. Помимо влияния на зубной налёт и состояние дёсен (при гингивите), хлоргексидин эффективен в профилактике и лечении кариеса, вторичных инфекций после стоматологических процедур или постановки имплантов. Хлоргексидин снижает бактериальную нагрузку и риск бактериемии после стоматологических манипуляций. Он также применяется при лечении рецидивирующего атрофического стоматита и стоматита, связанного с установкой протезов, прежде всего

в группах пациентов с ортодонтическими аппаратами, нарушениями иммунитета [7].

Одним из основных преимуществ хлоргексидина, помимо мощного антимикробного действия, является его способность при связывании с различными субстратами сохранять свою антимикробную активность. При этом происходит его медленное высвобождение при сохранении эффективной концентрации. Это свойство известно как субстантивность [8]. Хлоргексидин не подвержен действию крови, гноя, слюны.

### Химическая структура

Хлоргексидин является амфипатической молекулой с гидрофильными и гидрофобными группами, представляет собой катион при физиологическом значении pH. Молекула состоит из двух симметричных хлорфеноловых колец (4-хлорофенил) и двух бигуанидовых групп, объединённых в центре гидрофобной гексаметиленовой цепочкой, являясь симметричной молекулой – 1,6-би-4-хлорофенилдигуанидо-гексаном [9, 10].

Как правило, хлоргексидин используется в виде солей, главным образом биацетата, биглюконата или дигидрохлорида [4, 11, 12]. Биглюконат является наиболее растворимым в воде и спиртах, и следовательно эта форма используется в жидкостях для полоскания рта, гелях и лаках [12]. Кроме того, эта форма имеет дополнительное преимущество, так как при физиологическом значении pH высвобождаются активные компоненты с положительным ионным зарядом [13].

### Механизм и спектр антимикробного действия

Хлоргексидин действует на уровне клеточной мембраны, повышая ее проницаемость [14].

Первым этапом действия хлоргексидина является его быстрая адсорбция на микробной стенке [13], что объясняется наличием двух основных и симметричных групп хлорофенилгуанида, прикреплённых к липофильной цепочке гексаметиленовых, которые образуют бикатионную молекулу, взаимодействующую с бактериальной поверхностью [15]. Условия для их связывания наиболее благоприятны в нейтральной или слегка щелочной pH; количество адсорбируемого хлоргексидина зависит от концентрации агента. Внешний слой клеточной стенки бактерий несёт отрицательный заряд, обычно стабилизирующийся в присутствии катионов, таких как  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ ; на этом основано действие большинства катионных антисептиков, в том числе и хлоргексидина, обладающих высоким сродством к клеточной стенке бактерий [10].

Хотя механизм действия бисбигуанидов очень похож на механизм действия четвертичных аммониевых соединений, их связь с фосфолипидами и протеинами бактериальной стенки более выражена; протяженность гидрофобной части бисбигуанида препятствует их разъединению в липидном биослое. Таким образом, хлоргексидин устанавливает «мост» между парами соседних фосфолипидов и вытесняет соответствующие двухвалентные катионы. Катионные молекулы хлоргексидина связывают в основном анионные соединения, такие как свободные сульфаты, липополисахариды, фосфатные группы и карбоксильные группы протеинов [16].

В низких концентрациях хлоргексидин снижает проницаемость цитоплазматических мембран, при этом происходит утечка ионов калия, фосфат-ионов и протонов, торможение дыхательных процессов и транспорта веществ, изменяется содержание, метаболизм, осмотическая активность ферментов [9,17]. Изменение целостности мембран отражает бактериостатический эффект хлоргексидина и является обратимым [11, 14, 18]. При более высоких концентрациях хлоргексидина происходит кристаллизация мембраны, что приводит к потере её структурной целостности и катастрофической потере внутриклеточного вещества. Это является основой бактерицидного действия хлоргексидина, что приводит к преципитации или коагуляции бактериальной цитоплазмы с парадоксальным снижением оттока компонентов через мембрану. Этот процесс в конечном итоге ведёт к гибели клеток [19, 20]. Развитие эффекта зависит от концентрации раствора и pH среды. Хлоргексидин не модифицирует действие пенициллина, стрептомицина, хлорамфеникола, окситетрациклина и хлортетрациклина.

Хлоргексидин является антисептиком с бактерицидным и фунгицидным эффектом. Хотя он не считается вирулицидом, отмечена некоторая активность в отношении липидных оболочек вирусов, таких как ВИЧ, герпес 1 и 2, грипп А [12, 21]. Хлоргексидин может подавлять рост спор и оказывает бактериостатическое действие в отношении некоторых бактерий [12], но не действует на кислотоустойчивые бактерии [13, 22]. При изучении сравнительной активности хлоргексидина в отношении MSSA и MRSA (в том числе с плазмидной устойчивостью к гентамицину, пропамидину изетионату, этидию бромиду) было выявлено отсутствие различий в МПК и киллинг-эффекте. В Университете Кумамото (Япония) был выделен штамм *Pseudomonas aeruginosa*, использующий хлоргексидин в качестве единственного источника азота для своего роста. При этом хлоргексидин

разлагается бактериями до соединений CHDI-B, CHDI-BR, CHDI-D, CHADP-5 и CHDI-C, среди которых CHDI-B и CHDI-C обладают слабой антимикробной активностью (в 5–10 раз слабее хлоргексидина). Вопрос о резистентности микроорганизмов к хлоргексидину достаточно дискуссионен. Внедрение в практику катионных антисептиков, в т. ч. хлоргексидина и четвертичных аммониевых соединений, может сопровождаться селекцией плазмидного гена *qacA/B*, что способствует повышению резистентности.

### Фармакокинетика

#### *Абсорбция, распределение, метаболизм.*

Хлоргексидин практически не всасывается из ЖКТ. После случайного проглатывания 300 мг  $C_{\max}$  достигается через 30 мин ( $t_{\max}$ ) и составляет 0,206 мкг/л. Через 12 ч препарат в крови не определяется. В экспериментах на животных и на здоровых добровольцах установлено, что при пероральном приеме биодоступность хлоргексидина составляет менее 1%.

Благодаря катионной природе хлоргексидин хорошо связывается с кожей и слизистыми. Всасывание хлоргексидина при местном применении исследовалось в экспериментах на новорожденных макаках-резус при использовании в течение 90 дней моющего средства, содержащего 8% хлоргексидина глюконата. Незначительные количества хлоргексидина были выявлены в пробах жировой ткани (15–19 мкг/кг), почек (18–44 мкг/кг), в одной пробе ткани печени (14 мкг/кг). Заметные концентрации хлоргексидина (70–200 мкг/кг) обнаруживались в коже. В пробах крови хлоргексидин не определялся. Системное всасывание препарата при интактной коже невелико (не более 5%), однако при повреждении кожи системное всасывание может возрастать в 100 раз. Хлоргексидин не инактивируется белками крови и плазмы. Хлоргексидин распределяется местно при накожном применении и практически не участвует в метаболизме.

### Лекарственные взаимодействия

Хлоргексидин фармацевтически несовместим с мылом и моющими средствами (например, содержащими лаурилсульфат), щелочами и другими анионными соединениями (коллоиды, гуммиарабик, карбоксиметилцеллюлоза), с йодом. Совместим с этиловым спиртом, бензалкония хлоридом (содержится в противозачаточных средствах для местного применения Фарматекс и Бенатекс). Этанол усиливает эффективность препарата. Бактерицидное действие усиливается с повышением температуры.

При температуре выше 100°C препарат частично разлагается. Применяется в нейтральной среде; при рН 5-8 разница в активности невелика; при рН более 8 выпадает в осадок. Применение жесткой воды снижает бактерицидные свойства. Совместим с ЛС, содержащими катионную группу (бензалкония хлорид, цетримония бромид).

### Токсичность

Токсичность хлоргексидина для человека и млекопитающих достаточно низкая. Низкая степень токсичности, прослеженная в десятидневный срок после применения однократной дозы хлоргексидина подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно или перорально, а также после года непрерывного применения внутрь наблюдалась в экспериментальных исследованиях на белых мышах. Отмечено выраженное раздражающее действие в отношении кожи и глаз. В качестве побочных эффектов важно учитывать возможность возникновения у пациентов гиперчувствительности немедленного типа и анафилактического шока при применении препаратов хлоргексидина.

Не считается канцерогеном, отсутствуют мутагенный и генотоксический эффекты, тератогенный и эмбриотоксический эффекты, хлоргексидин слабо влияет на репродуктивную функцию, слабо цитотоксичен.

Описан случай развития метгемоглобинемии и цианоза у недоношенных детей, находившихся в инкубаторе, вследствие отравления 4-хлоранилином. Отмечена повышенная концентрация метгемоглобина в крови (от 6,5 до 45,5% при норме до 2,3% и фатальном уровне – свыше 70%).

### Показания к применению

Хлоргексидин широко применяется в медицине как антисептик и дезинфицирующее средство для поверхностей и инструментов. При заболеваниях в хирургии, стоматологии, гинекологии, урологии, дерматовенерологии, отоларингологии хлоргексидин используется местно. Является основным антисептиком для обработки операционного поля, рук хирурга, рук медперсонала в послеоперационном уходе за больными в отделениях ЛОР и стоматологии, дезинфекции съемных протезов. Хлоргексидин можно встретить в косметологии.

### Противопоказания к применению

Повышенная чувствительность к препарату. Нельзя допускать попадания хлоргексидина в глаза (за исключением специальной лекарственной формы, предназначенной для промывания глаз), а также контакта с мозговыми оболочками и слу-

ховым нервом (например при черепно-мозговой травме).

### Формы выпуска

Хлоргексидин выпускается в следующих формах:

- 20% раствор-концентрат – предназначен для разведения перед использованием, используется в медицинских учреждениях;
- 0,05% раствор в пластмассовых и стеклянных флаконах по 70 и 100 мл – используется без разведения, в том числе в домашних условиях;
- свечи (суппозитории) вагинальные «Гексикон» с содержанием 0,016 г хлоргексидина, в упаковке 1 или 10 свечей;
- свечи (суппозитории) вагинальные «Гексикон-Д» с содержанием 0,008 г хлоргексидина – предназначены для детей, в упаковке 10 свечей;
- гель, содержащий 0,5% хлоргексидина.

Хлоргексидин входит в состав следующих препаратов:

- растворы для полоскания полости рта при стоматологических заболеваниях и манипуляциях (удаление зубов, вскрытие абсцессов, профессиональная чистка и т.п.) – Эльгидиум, Амидент, Элюдрил;
- гели для десен, предназначенные для лечения стоматологических заболеваний и снятия болевых ощущений в полости рта (например при привыкании к зубным протезам), один из компонентов которых хлоргексидин – Диклоран Дента, Элюгель, Метрогекс, Пародиум, Эльгифлюор, Дентамет, Метрогил дента;
- зубная паста Эльгидиум;
- растворы с другими антисептиками – Бактеродерм (с бензалкония хлоридом), Хлоргексидин-спрей спиртовой – для лечения инфекций кожи, Цитеал (с гексамидином и хлорокрезолом) – для местного применения в гинекологии, дерматологии;
- мази Бепантен плюс и Депантол (с пантенолом – ранозаживляющее действие), Бемилон (с бетаметазоном – противовоспалительное действие);
- суппозитории вагинальные Депантол (с пантенолом) – применяются в гинекологии после хирургических вмешательств;
- хлоргексидин в сочетании с лидокаином для местноанестезирующего действия в спреях Лидокаин-Асепт и гелях Инстиллагель и Катеджель с лидокаином;
- таблетки для рассасывания при болях в горле, стоматите и других заболеваниях ротоглотки и ротовой полости – Гексорал табс, Анти-Ангин формула, Себидин.

## Хлоргексидин при профилактике нозокомиальных инфекций

**Противомикробная активность хлоргексидина в ротовой полости.** Исследование антибактериальной активности антисептиков *in situ* включает в себя анализ их немедленных эффектов и субстантивности. Субстантивность определяется как длительное нахождение антисептика на поверхностях полости рта (слизистых, зубов) и его медленное высвобождение в эффективных дозах, которые гарантируют сохранение его противомикробной активности [8].

Хлоргексидин характеризуется наиболее выраженным антибактериальным эффектом *in situ* и субстантивностью, по сравнению с другими антисептиками, применяемыми для обработки полости рта [23–26]. Активность хлоргексидина в полости рта зависит от концентрации, продолжительности и частоты воздействия, температуры, наличия или отсутствия зубов/зубных протезов, органических материалов, рН слюны и приёма пищи/напитка [27–29]. В сравнительных исследованиях для оценки микробиологической активности использовались 0,12% или 0,2% растворы хлоргексидина [30–32].

**Антибактериальная активность хлоргексидина в слюне.** Слюна является «средством распространения» микроорганизмов ротовой полости от одной экологической ниши к другой [33]. В связи с этим эффективность антимикробного действия хлоргексидина и его субстантивность можно оценивать в отношении микрофлоры [34, 35]. R. Weiger et al. [36] предположили, что микробная колонизация чистых поверхностей зубов происходит за счёт адгезии бактерий слюны. Ряд других авторов считают, что однократное определение микробной нагрузки слюны не демонстрирует её связь с количеством зубного налёта [31]. В 2003 году S. Sekino et al. [37] продемонстрировали, что без гигиенической обработки количество бактерий в слюне после воздействия хлоргексидина в различных режимах может повлиять на количество образующегося зубного налёта.

Несмотря на глубокие знания о противомикробной активности различных агентов в биоплёнке *in vitro* [38, 39], в литературе существует несколько публикаций, в которых эффекты антимикробных веществ в биоплёнке были изучены *in situ* [40, 41].

При обработке хлоргексидином наблюдались следующие средние значения жизнеспособности бактерий в биопленке: через 6 часов (35% против 18% в контроле), через 1 сутки (наружный слой — 49% против 34%, средний слой — 67% против

42%, внутренний слой — 50% против 48%), через 2 суток (наружный слой — 52% против 33%, средний слой — 63% против 42%, внутренний слой — 54% против 48%). В результате был сделан вывод, что при биоплёнках толщиной менее 65 мкм получен лишь незначительный поверхностный бактерицидный эффект хлоргексидина. В то же время все исследуемые пациенты чистили зубы дважды в день с использованием фторсодержащей зубной пасты [41], что могло также повлиять на полученные результаты.

Хлоргексидин значительно снижал жизнеспособность бактерий (67% в контрольной биоплёнке против 2% и 0,7% в обработанных хлоргексидином биоплёнках в течение 1 и 10 мин соответственно) [41]. Тем не менее, лечение хлоргексидином лишь незначительно уменьшило общее потребление кислорода, так как даже после 10-минутной экспозиции хлоргексидина биоплёнки сохраняли физиологическую активность, демонстрируя неполную гибель, и отмечалось переселение микроорганизмов вглубь биоплёнки. Хлоргексидин инактивировал бактерии во всех слоях биоплёнки, с наиболее высокой эффективностью — во внешних её слоях. Авторы объясняли это комбинацией нескольких механизмов: (1) — более глубокое проникновение кислорода, что снижает появление анаэробных процессов; (2) — с нарастанием концентрации хлоргексидина и повышением токсических эффектов нарушаются ферментативные процессы в более глубоких слоях биоплёнки; (3) — различная восприимчивость к хлоргексидину функциональных групп микроорганизмов (например, аэробные гетеротрофы по сравнению с анаэробными ферментирующими бактериями). Хлоргексидин оказывает более выраженное действие на закисление среды, чем на дыхательные процессы, создавая тем самым более аэрированную среду со сниженной кислотопродукцией, меняя микроэкологию на менее патогенный вариант [40].

Многочисленные работы продемонстрировали непосредственный антибактериальный эффект хлоргексидина и его субстантивность в слюне в течение не менее 7 часов после однократной обработки полости рта. Кроме того, продолжается изучение особенностей антибактериальной активности хлоргексидина в полости рта *in situ* и взаимодействие антисептика с различными внутренними и внешними факторами в экосистемах полости рта.

**Применение хлоргексидина для обработки кожных покровов.** Использование хлоргексидина для предоперационной обработки снижает риск инфекции в области хирургического вмешательства (ИОХВ) наполовину по сравнению с использо-

ванием 10% повидона-йода; отмечены различия в эффективности эрадикации микроорганизмов.

В результате сравнения эффективности хлоргексидина с плацебо или другими антисептиками в снижении частоты ИОХВ оказалось, что предоперационное применение хлоргексидина снижает частоту возникновения ИОХВ почти в два раза по сравнению с использованием 10% раствора повидона-йода (отношение шансов 0,54, 95% доверительный интервал 0,37–0,8,  $p=0,002$ ). Применение хлоргексидина не приводило к статистически достоверному снижению частоты ИОХВ, вызванных грамположительными микроорганизмами, по сравнению с мытьём рук обычным мылом (отношение шансов 0,53, 95% ДИ 0,37–0,78,  $p=0,15$ ).

Наиболее частыми нежелательными явлениями, связанными с использованием любого из антисептиков, были экзема и зуд, однако статистически достоверных различий по частоте возникновения нежелательных лекарственных явлений между сравниваемыми группами отмечено не было.

## Литература

- Davies G.E., Francis J., Martin A.R., Rose F.L., Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane): laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Brit J Pharmacol Chemotherapy* 1954; 9:192-6.
- Lang N.P., Brex M. Chlorhexidine digluconate: an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodont Research* 1986; 21:74-89.
- Bascones A., Manso F.J. Clorhexidina en Odontostomatología: Conceptos actuales y revisión de la literatura. *Avances en Odontostomatología* 1994; 10:685-708.
- Ruppert M., Schlagenhaut U. La clorhexidina en Odontología. Aspectos generales. Quintessence (Ed. Española) 2005; 18:12-23.
- Löe H., Schiött C.R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodont Research* 1970; 5:79-83.
- Löe H., Schiött C.R., Karring G., Karring T. Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects. *J Periodont Research* 1976; 11:135-44.
- Enrile de Rojas F.J., Alemany A.S., Burguera A.C., Dios P.D. Aplicaciones clínicas adicionales de colutorios anti-sépticos. *Periodoncia* 2006; 16:95-104.
- Manau-Navarro C., Guasch-Serra S. Métodos de control de placa bacteriana. In: Cuenca E., Manau C., Serra L.L. *Odontología Preventiva y Comunitaria. Principios Métodos y Aplicaciones*. Barcelona: Masson; 2003:69-88.
- Al-Tannir M.A., Goodman H.S. A review of chlorhexidine and its use in special populations. *Special Care in Dentistry* 1994; 14:116-22.
- Gilbert P., Moore L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* 2005; 99:703-15.
- Franch M., Pascual A., Santos A. Colutorios en periodoncia. Parte II. *Arch Odontostomatología* 2005; 21:471-87.
- Arévalo J.M., Arribas J.L., Calbo L., Hernández M.J., Lizán M., Herruzco R. Guía del grupo de trabajo sobre desinfectantes y antisépticos. Revisión 1998. *Medicina Preventiva* 1998; 4:38-43.
- Albertos J.M., Junquera L.M., Albertos M.T., Olay S., López-Arranz E. La clorhexidina. Perspectiva actual. *Ann Odontostomatología* 1996; 5:217-23.
- Hugo W.B. Disinfection mechanisms. In: Russell A.D., Hugo W.B., Ayliffe G.A.J., eds. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. Oxford: Blackwell; 1992:187-210.
- Musteata F.M., Pawliszyn J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction. *J Pharm Biomedical Analysis* 2005; 37:1015-24.
- Rölla G., Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dental Research* 1975; 54:57-62.
- Hugo W.B., Longworth A.R. 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; 18:569-78.
- Fardal O., Turnbull R.S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J American Dental Association* 1986; 112:863-9.
- Longworth A.R. Chlorhexidine. In: Hugo W.B., ed. *Inhibition and destruction of the bacterial cell*. New York, N.Y.: Academic Press; 1971:95-106.

20. Chawner J.A., Gilbert P. A comparative study of the bactericidal and growth inhibitory activities of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine. *J Applied Bacteriology* 1989; 66:243-52.
21. Bernimoulin J.P. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontology* 2003; 30:7-9.
22. Junco-Lafuente M.P., Baca-García P., Mesa-Aguado F.L. Utilización de la clorhexidina en la prevención oral de pacientes de la tercera edad. *Revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España* 2001; 6:81-9.
23. Moran J., Addy M., Wade W.G., Maynard J.H., Roberts S.E., Aström M., Møvert R. A comparison of delmopinol and chlorhexidine on plaque regrowth over a 4-day period and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontology* 1992; 19:749-53.
24. Jenkins S., Addy M., Wade W., Newcombe R.G. The magnitude and duration of the effects of some mouth-rinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontology* 1994; 21:397-401.
25. Elworthy A., Greenman J., Doherty F.M., Newcombe R.G., Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontology* 1996; 67:572-6
26. Balbuena L., Stambaugh K.I., Ramirez S.G., Yeager C. Effects of topical oral antiseptic rinses on bacterial counts of saliva in healthy human subjects. *Otolaryngology and Head and Neck Surgery* 1998; 118:625-9.
27. Bonesvoll P., Lökken P., Rølla G. Influence of concentration, time, temperature, and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouthrinses. *Arch Oral Biology* 1974; 19:1025-9.
28. Bonesvoll P., Olsen I. Influence of teeth, plaque and dentures on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *J Clin Periodontology* 1974; 1:214-21.
29. Tsuchiya H., Miyazaki T., Ohmoto S. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine in saliva after mouthrinsing. *Caries Research* 1999; 33:156-63.
30. Fernandes-Naglik L., Downes J., Shirlaw P., Wilson R., Challacombe S.J., Kemp G.K., Wade W.G. The clinical and microbiological effects of a novel acidified sodium chlorite mouthrinse on oral bacterial mucosal infections. *Oral Disease* 2001; 7:276-80.
31. Rosin M., Welk A., Kocher T., Majic-Todt A., Kramer A., Pitten F.A. 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 Periodontology* 2002; 29:392-9.
32. van der Mei H.C., White D.J., Atema-Smit J., van de Belt-Gritter E., Busscher H.J. A method to study sustained antimicrobial activity of rinse and dentifrice components on biofilm viability *in vivo*. *J Clin Periodontology* 2006; 33:14-20.
33. Collaert B., Edwardsson S., Attström R., Hase J.C., Aström M., Møvert R. Rinsing with delmopinol 0.2% and chlorhexidine 0.2%: short-term effect on salivary microbiology, plaque, and gingivitis. *J Periodontology* 1992; 63:618-25.
34. Roberts W.R., 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 Periodontology* 1981; 8:295-310.
35. Addy M., Jenkins S., Newcombe R. Toothpastes containing 0.3% and 0.5% triclosan. II. Effects of single brushings on salivary bacterial counts. *Americ J Dentistry* 1989; 2:215-9.
36. Weiger R., Netuschil L., Wester-Ebbinghaus T., Brex M. An approach to differentiate between antibacterial and antiadhesive effects of mouthrinses *in vivo*. *Arch of Oral Biology* 1998; 43:559-565.
37. Sekino S., Ramberg P., Uzel N.G., Socransky S., Lindhe J. Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and de novo plaque formation. *J Clin Periodontology* 2003; 30:919-25.
38. Shen Y., Stojicic S., Qian W., Olsen I., Haapasalo M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. *J Endodontics* 2010; 36:100-4.
39. Corbin A., Pitts B., Parker A., Stewart P.S. Antimicrobial penetration and efficacy in an *in vitro* oral biofilm model. *Antimicrob Ag Chemotherapy* 2011; 55:3338-44.
40. von Ohle C., Gieseke A., Nistico L., Decker E.M., DeBeer D., Stoodley P. Real-time microsensor measurement of local metabolic activities in ex vivo dental biofilms exposed to sucrose and treated with chlorhexidine. *Appl Environment Microbiol* 2010; 76:2326-24.
41. Zaura-Arite E., van Marle J., ten Cate J.M. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dental Research* 2001; 80:1436-40.
42. 51<sup>st</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). 2011; Abstract K-480.