

LIDIA PIJANKOWSKA-BEKSA<sup>1</sup>, AGNIESZKA KIRYSZEWSKA<sup>2</sup>, JANINA ŁUCJA GRZEGORCZYK<sup>2</sup>,  
\*JOANNA SZCZEPAŃSKA<sup>3</sup>

# Ocena wpływu ozonoterapii i profilaktyki fluorkowej z zastosowaniem preparatu Fluor Protector na liczebność bakterii *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* spp. płytki nazębnej u dzieci

The evaluation of the impact of ozone therapy and Fluor Protector fluoride prevention on the number of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp., in children dental plaque

<sup>1</sup>PhD, Department of Paediatric Dentistry, Medical University of Łódź

Head of Department: prof. Joanna Szczepańska, MD, PhD

<sup>2</sup>Department of Paediatric Dentistry, Medical University of Łódź

Head of Department: prof. Joanna Szczepańska, MD, PhD

<sup>3</sup> Department of Microbiology and Laboratory Medical Immunology, Medical University of Łódź

Head of Department: prof. Janina Łucja Grzegorzczak, MD, PhD

## SŁOWA KLUCZOWE

próchnica, ozon, fluorowanie kontaktowe, płytka nazębna

## STRESZCZENIE

**Wstęp.** Paciorkowce z rodzaju *Streptococcus* (głównie *Streptococcus mutans* oraz *Streptococcus sobrinus*) uznawane są za najważniejsze bakterie wywołujące próchnicę. Właściwości kwasotwórcze posiadają również występujące w płytce nazębnej G(+) pałeczki z rodzaju *Lactobacillus*. Powszechnie w profilaktyce próchnicy stosuje się fluorki, które głównie poprzez mechanizmy miejscowe (hamowanie enzymów bakteryjnych oraz wspomaganie procesów remineralizacji) działają przeciwpróchnicowo. W ostatnim czasie wzrosło zainteresowanie ozonem, który uznawany jest za niezawodny środek przeciwbakteryjny.

**Cel pracy.** Celem pracy była ocena półrocznego wpływu ozonoterapii oraz fluoryzacji kontaktowej na liczebność bakterii próchnicotwórczych płytki nazębnej.

**Materiał i metody.** Badania mikrobiologiczne płytki nazębnej przeprowadzono u 56 dzieci. Płytke nazębną pobierano podczas badania wstępnego, przed wykonaniem zabiegów profilaktycznych pierwszych stałych zębów trzonowych, a następnie po 6 miesiącach podczas badania kontrolnego. Przed zabiegiem profilaktycznym przeprowadzano ankietę wśród rodziców, oceniano stan zębów mlecznych i stałych oraz higieny jamy ustnej. Wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya, testu Wilcozona oraz współczynnika korelacji rang Spearmana, przy poziomie istotności  $p \leq 0,05$ .

**Wyniki.** U wszystkich badanych dzieci wyhodowano bakterie *S. mutans* z płytek nazębnych pobranych podczas pierwszej wizyty, a pałeczki kwasu mlekowego obecne były u ok. 63% dzieci poddawanych ozonoterapii i ok. 67% w grupie lakieru fluorkowego. W badaniu kontrolnym po 6 miesiącach występowanie paciorkowców w grupie ozonoterapii obniżyło się do 88% przypadków, a w grupie fluoryzacji kontaktowej do 84,6%. Obecność bakterii *Lactobacillus* spp. uzyskano u podobnej liczby pacjentów jak w badaniu wstępnym. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w liczebności bakterii pomiędzy badaniem wstępnym a ba-

daniem kontrolnym zarówno w grupie osób poddanych ozonoterapii, jak i w grupie preparatu fluorkowego.

**Wnioski.** Półroczna analiza działania zabiegów ozonoterapii oraz fluoryzacji kontaktowej wykazała, że liczebności bakterii *Streptococcus mutans* uległy zmniejszeniu w płytce nazębnej u około 1/4 badanych dzieci, chociaż wyniki te nie były istotne statystycznie. Długoterminowy potencjał bakteriobójczy gazowego ozonu i preparatu fluorkowego Fluor Protector kształtują się na podobnym poziomie.

## KEYWORDS

caries, ozone, topical fluoridation, dental plaque

## SUMMARY

**Introduction.** *Streptococci* (especially *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*) are considered to be the most important bacteria causing caries. G-positive bacilli, such as *Lactobacillus* present in the dental plaque, also have acidogenic properties. Fluorides are commonly used in the prevention of caries and have anticariogenic effects mainly via local mechanisms (bacterial enzyme inhibition and supporting remineralisation process). The interest in ozone, which is considered a reliable antibacterial agent, has increased recently.

**Aim.** The aim of the study was to evaluate the long-term impact of ozone and topical fluoridation on the number of cariogenic plaque bacteria.

**Material and methods.** Microbiological plaque testing was performed in a group of 56 children. Dental plaque was collected during the preliminary examination, prior to preventive treatments of the first permanent molars and after 6 months, during a follow-up evaluation. Before preventive treatment, a survey was conducted among parents, the state of the deciduous and permanent teeth as well as oral hygiene were evaluated. The results were analyzed statistically using the Mann-Whitney test, Wilcoxon test and Spearman rank correlation coefficient, with a significance level of  $p \leq 0.05$ .

**Results.** *Streptococcus mutans* were isolated from plaque collected from all children during the first visit. Lactic acid bacteria were present in approx. 63% of patients treated with ozone and approx. 67% subjects in the fluoride varnish group. Follow-up after 6 months revealed that the occurrence of *S. mutans* in the ozone group decreased to 88% of the cases and to 84.6% in the fluoridated group. *Lactobacillus* spp. were present in similar numbers of patients as in the preliminary test. There were no statistically significant differences in the number of bacteria during first or second evaluation between patients treated with ozone therapy and those undergoing fluoride therapy.

**Conclusions.** A 6-month assessment of the effectiveness of ozone therapy and topical fluoridation showed that the numbers of plaque *Streptococcus mutans* decreased in approx. 1/4 of children, however, the results were not statistically significant. Long-term microbicide potential of both ozone gas and Fluor Protector fluoride are at similar level.

## WSTĘP

Próchnica zębów dotyka ludzkość od zarania dziejów i nadal stanowi jedną z najczęstszych chorób zakaźnych występujących w różnych częściach świata. Na podstawie licznych badań epidemiologicznych i doświadczalnych przeprowadzanych na zwierzętach oraz ludziach ustalono, że paciorkowce z rodzaju *Streptococcus* (głównie *Streptococcus mutans* oraz *Streptococcus sobrinus*) są najważniejszymi bakteriami wywołującymi próchnicę. Jest to spowodowane ich zdolnością do szybkiego wytwarzania kwasu mlekowego z węglowodanów zawartych w diecie, głównie sacharozy i glukozy (1-4). Właściwości kwasotwórcze posiadają również występujące w płytce nazębnej G(+) pałeczki z rodzaju *Lactobacillus*, które w przeciwieństwie do *Streptococcus mutans* nie uczestni-

## INTRODUCTION

Caries has affected humans since the dawn of time and still is one of the most common infectious human diseases in different parts of the world. It was considered based on numerous epidemiological and experimental studies in both animals and humans that streptococci (mainly *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*) are the most important bacteria causing caries. This is probably due to their ability to rapidly produce lactic acid from carbohydrates contained in food products, mainly glucose and sucrose (1-4). Gram-positive bacilli from the genus *Lactobacillus*, which, as opposed to *Streptococcus mutans*, are not involved in carious process initiation, but

czą w inicjowaniu procesu próchnicowego, ale biorą udział w progresji zmiany próchnicowej zębów. Obecność paciorkowców zmiennych i produkcja przez te mikroby kwasu mlekowego stymuluje wzrost pałeczek *Lactobacillus*. Wykazano, że bakterie *Streptococcus mutans* mogą samodzielnie wytwarzać płytkę nazębną, zaś przedstawiciele z rodzaju *Lactobacillus* nie posiadają tej zdolności (5, 6). Charakterystyczne dla pałeczek kwasu mlekowego są silne właściwości zakwaszające środowisko. Występują powszechnie w jamie ustnej, jednak stanowią zaledwie 1% składu bytującej tam mikroflory, przy czym liczebność ich wzrasta w aktywnych procesach próchnicowych (7).

Aby bakterie mogły być zakwalifikowane do grupy próchnicotwórczych, muszą posiadać pewne cechy: produkować kwasy w procesie fermentacji cukrów, tworzyć zewnątrzkomórkowe wielocukry oraz posiadać zdolność bytowania w kwaśnym środowisku. Istotne jest również wytwarzanie glukanów (dekstranu i mutanu). nierozpuszczalny w wodzie mutan odpowiada za adsorpcję bakterii do powierzchni zęba, a następnie umożliwia agregację i koagregację bakterii. Rozpuszczalny w wodzie dekstran stanowi rezerwę energetyczną w sytuacjach niedoboru węglowodanów w pożywieniu (2, 8).

Celem większości zabiegów profilaktycznych obecnie stosowanych jest eliminacja bakterii lub zahamowanie ich zjadliwości, poprzez neutralizację kwasów wytwarzanych przez ww. bakterie próchnicotwórcze w procesie fermentacji węglowodanów (9). Związki fluoru wpływają na obniżenie liczebności bakterii *S. mutans* oraz *Lactobacillus* spp. poprzez zaburzenie metabolizmu komórki bakteryjnej, inhibicję wytwarzania kwasów oraz wielocukrów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Jednym z mechanizmów działania fluoru jest blokowanie enzymu bakteryjnego – enolazy, odgrywającego istotną rolę w przemianie węglowodanów. Jony F<sup>-</sup> wzmacniają również twarde tkanki zęba, przekształcając hydroksyapatyty w stabilniejsze chemicznie fluoroapatyty (10).

Innym środkiem w walce z bakteriami okazał się ozon, zarówno w fazie wodnej, jak i gazowej (11). Budowa komórek bakteryjnych sprawia, że są one wrażliwe na działanie O<sub>3</sub>. Brak cholesterolu w strukturze bakteryjnej błony komórkowej powoduje, że tlen atomowy, powstały z rozpadu ozonu, reaguje z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi, fosfolipidami i białkami, prowadząc do prawie natychmiastowej destrukcji mikroorganizmów (12, 13). Już 10-sekundowa aplikacja powoduje 99% eliminację bakterii *S. mutans* i *S. sobrinus* (14). Ze względu na te mikrobiologiczne właściwości zainteresowanie ozonem w leczeniu stomatologicznym w ostatnich latach wzrosło.

## CEL PRACY

Celem pracy była ocena długoterminowego wpływu ozonoterapii oraz fluoryzacji kontaktowej przeprowadzanej w warunkach *in vivo* na liczebność bakterii *Streptococcus mutans* oraz *Lactobacillus* spp. zawartych w płytce nazębnej u dzieci.

in the progression of dental caries, also have acidogenic properties. The presence of mutans streptococci and their ability to produce lactic acid promotes the growth of *Lactobacillus*. It was shown that *Streptococcus mutans* are able to independently produce dental plaque, whereas bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* do not have this ability (5, 6). Lactic acid bacteria are characterised by strong acidifying properties. Although common in the oral cavity, they account for only 1% of the oral microflora, though their number increases during active carious processes (7).

Certain criteria must be met in order to classify bacteria as carcinogenic: the ability to produce acids via carbohydrate fermentation, the ability to form extracellular polysaccharides as well as the ability to live in the acidic environment. Production of glucans (dextran and mutan) is also important. Water-insoluble mutan is responsible for bacterial adsorption onto dental surface, followed by bacterial aggregation and co-aggregation. Water-soluble dextran is an energy reserve material in case of dietary carbohydrate deficiency (2, 8).

Most currently used preventive methods aim to eliminate bacteria or inhibit their virulence by neutralising acids produced by the above mentioned cariogenic bacteria in the process of carbohydrate fermentation (9). Fluorine compounds reduce the numbers of *S. mutans* and *Lactobacillus* spp. by impairing bacterial cell metabolism as well as inhibiting the production of acids and extra/intracellular polysaccharides. The ability to block enolase, a bacterial enzyme involved in carbohydrate metabolism, is one of the mechanisms of fluoride action. Furthermore, the F<sup>-</sup> ions strengthen the hard tooth tissue by transforming the hydroxyapatites into more chemically stable fluoroapatites (10).

Ozone is another tool against bacteria, both in the aqueous and gaseous phase (11). The structure of bacterial cells renders them susceptible to O<sub>3</sub>. Due to the lack of cholesterol in bacterial cell membranes, the atomic oxygen formed during ozone decomposition reacts with unsaturated fatty acids, phospholipids and proteins, leading to almost immediate microbial destruction (12, 13). A 10-second application is sufficient for 99% elimination of *S. mutans* and *S. sobrinus* (14). The interest in ozone dental treatment has increased recently due to the above mentioned microbiological properties.

## AIM

The aim of the study was to evaluate the long-term impact of ozone and *in vivo* topical fluoridation on the number of plaque *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. in children.

## MATERIAŁ I METODY

### Charakterystyka grupy badanej

Badaniami objęto łącznie 129 dzieci w wieku 6-10 lat zgłaszających się do Zakładu Stomatologii Wieku Rozwojowego UM w Łodzi w latach 2011-2014. Po wykonaniu badania podmiotowego przeprowadzono wśród opiekunów ankietę dotyczącą stanu zdrowia, świadomości prozdrowotnej rodziców, nawyków żywieniowych oraz stylu życia dzieci. Następnie dzieci kwalifikowano do dwóch różnych zabiegów profilaktycznych pierwszych stałych zębów trzonowych: zabiegu ozonoterapii lub kontaktowej profilaktyki fluorkowej z zastosowaniem preparatu Fluor Protector zgodnie z opisem zamieszczonym niżej. U 56 dzieci wykonano badania mikrobiologiczne płytki nazębnej. Charakterystykę grup badanych pacjentów przedstawia rycina 1.

Kryterium włączenia do badań: dzieci ogólnie zdrowe, w wieku 6-10 lat.

Kryterium wyłączenia z badań: dzieci z ostrą lub przewlekłą chorobą ogólnoustrojową, przyjmujące antybiotyki lub do miesiąca po antybiotykoterapii, dzieci poniżej 6. i powyżej 10. roku życia.

Przed przystąpieniem do zabiegów u wszystkich dzieci wykonano badanie wstępne, określając stan zębów mlecznych i stałych oraz stan higieny jamy ustnej za pomocą wskaźnika OHI wg Greene'a i Vermiliona. Dla każdego dziecka obliczono wskaźnik puw, puwp, PUW oraz PUWp. Do oceny stanu zębów wykorzystano urządzenie laserowe DIAGNOdent pen 2190 firmy Kavo oraz standardową skalę wizualno-dotykową po uprzednim oczyszczeniu zębów

## MATERIAL AND METHODS

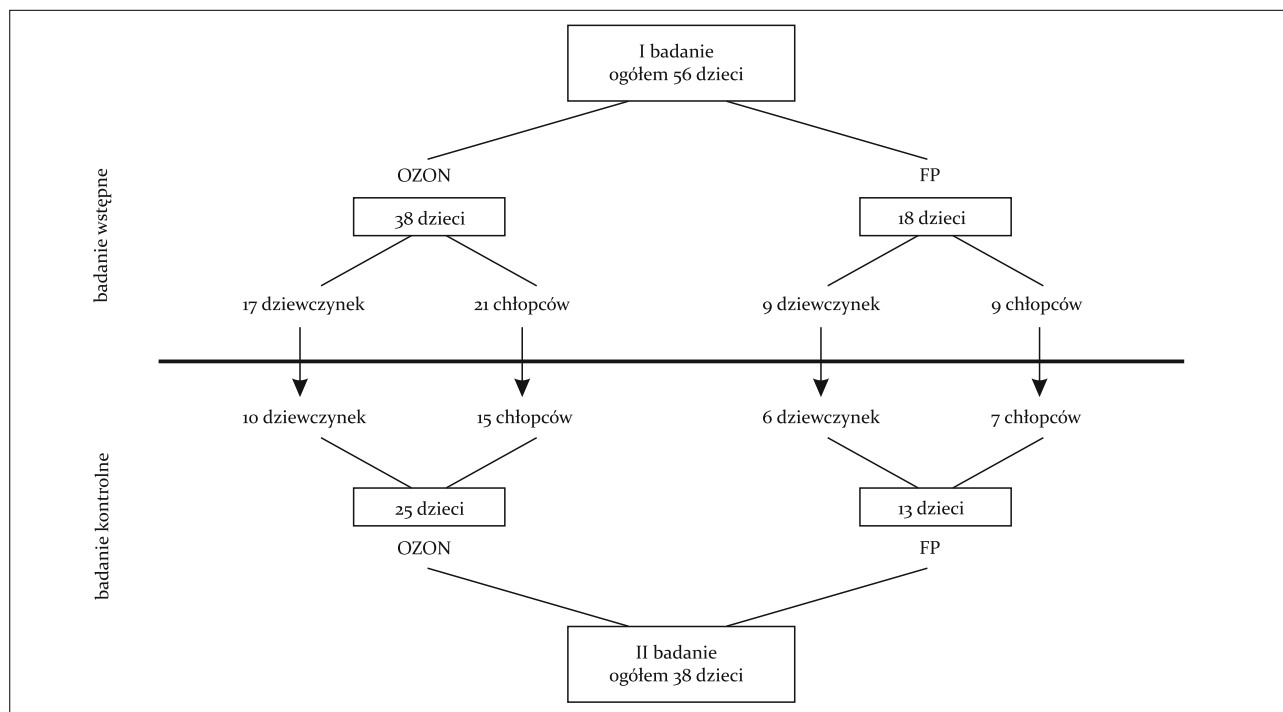
### Characteristics of the study group

A total of 129 children aged 6-10 years presenting at the Department of Developmental Dentistry, Medical University in Łódź between 2011-2014 were included in the study. After collecting medical history, a questionnaire on health status, health awareness, eating habits and the lifestyle of children was completed by their parents. The children were then classified for two different preventive treatments of the first permanent molars: ozone therapy or topical fluoride treatment using Fluor Protector in accordance with the below description. Microbiological evaluation of the dental plaque was performed in 56 children. The diagram below presents the characteristics of subjects (fig. 1).

Inclusion criteria: good general health, age 6-10 years.

Exclusion criteria: children with acute or chronic systemic disease, currently receiving antibiotic therapy or a month after antibiotic therapy, children below 6 years or over 10 years old.

Prior to procedures, all children underwent a preliminary examination to determine the state of deciduous and permanent teeth as well as oral hygiene using Green and Vermillion Oral Hygiene Index (OHI). For each patient, dmft, dmfts, DMFT, DMFTS were calculated. DIAGNOdent pen 2190 (Kavo) and standard visual-tactual scale were used for dental assessment, after cleaning the teeth with a prophylactic toothbrush (with a micromotor).



Ryc. 1. Charakterystyka grup badanych uczestniczących w badaniach mikrobiologicznych płytki nazębnej  
FP – Fluor Protector

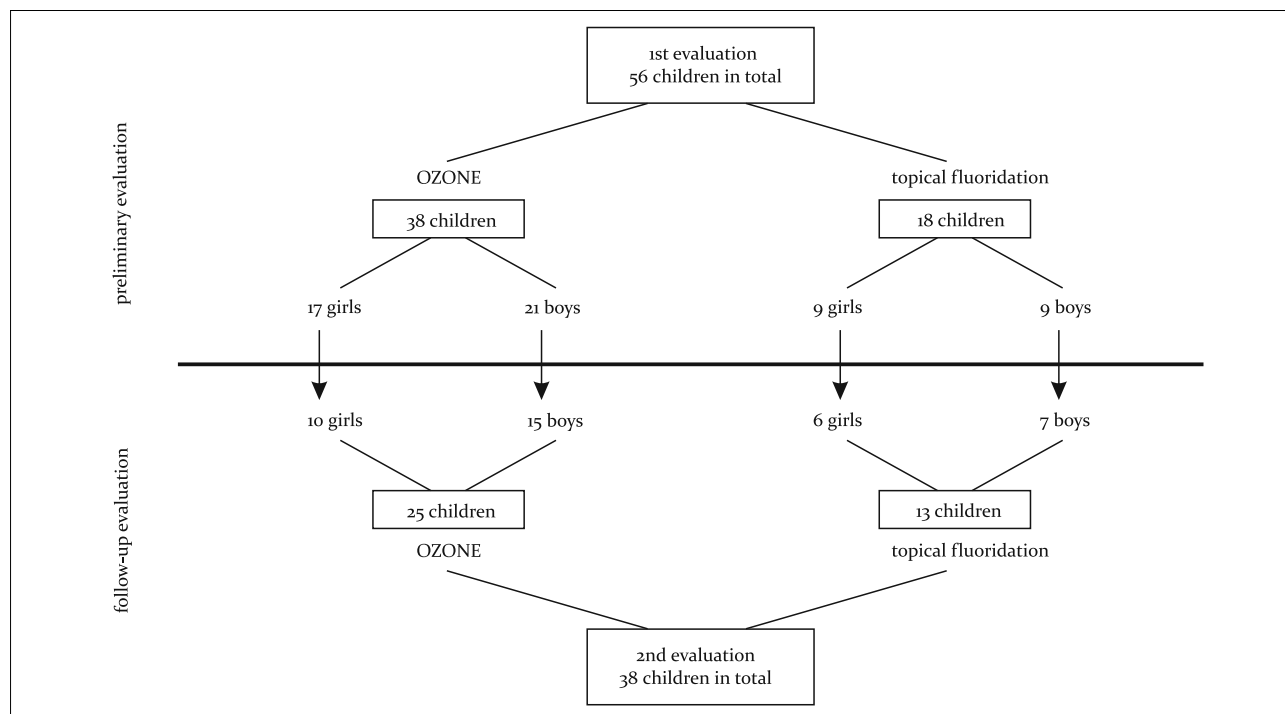


Fig. 1. Characteristics of study groups participating in dental plaque microbiological testing

profilaktyczną szczoteczką na mikrosilnik. Po dokładnym osuszeniu zębów oceniano obecność ogniska próchnicowego za pomocą końcówki A, przeznaczonej do badania powierzchni zużywających. Oceny dokonywano na powierzchniach okluzyjnych zębów bez wypełnień oraz bez obecności laku szczelinowego. Końcówkę urządzenia zbliżano do zęba w taki sposób, aby wiązka promieniowania była prostopadła do długiej osi zęba. W karcie pacjenta odnotowano najwyższą wartość wskazaną przez urządzenie. Do interpretacji wyników posłużono się skalą Hibsta i Paulusa, obejmującą cztery przedziały wartości:

I (0-13) – brak konieczności przeprowadzania zabiegów profilaktycznych,

II (14-20) – potrzeba wykonywania zintensyfikowanych zabiegów profilaktycznych przez pacjenta w domu,

III (21-29) – konieczność wdrożenia profesjonalnych zabiegów profilaktycznych lub minimalnej interwencji stomatologicznej w zależności od czynników ryzyka rozwoju próchnicy,

IV (> 30) – wymagana interwencja stomatologiczna, jak również wykonywanie profesjonalnych zabiegów profilaktycznych (15).

Klinicznej oceny stanu zębów dokonywano przy użyciu lusterka stomatologicznego i tępego zgłębnika. Bruzdy uznawano za objęte procesem próchnicowym, gdy wykryto zmianę charakteryzującą się destrukcją tkanek twardych zęba. Do obowiązującej oceny bruzd wg skali DIAGNOdentu wprowadzono pewną modyfikację własną. W przypadku, gdy za pomocą DIAGNOdentu odnotowano wartość powyżej 30 jednostek, jednak w badaniu klinicznym zmia-

After thorough drying of the teeth, the presence of caries was determined using tip A for an assessment of chewing surfaces. The assessment was performed on the occlusal dental surfaces without fillings or fissure sealant. The tip of the device was brought closer to the tooth in such a way that the radiation beam be set perpendicular to the long tooth axis. The highest value indicated by the device was documented in patient's records. The values were interpreted by Hibst and Paulus scale, which includes 4 ranges of values:

I (0-13) – no need for preventive treatment,

II (14-20) – the need for intensified preventive treatment performed at home by the patient,

III (21-29) – the need for professional preventive treatment or minimal dental intervention, depending on risk factors for caries,

IV (> 30) – the need for dental intervention as well as professional preventive treatment (15).

Clinical assessment of dental state was performed using a dental mirror and a blunt probe. Dental fissures were considered as affected by carious process if a lesion characterised by hard dental tissue damage was identified. The current DIAGNOdent Scale for dental fissure assessment was modified by the authors. If DIAGNOdent indicated a value above 30 units, yet the clinical assessment classified the lesion as initial or arrested caries (chalky white or brown spots without enamel interruption), the tooth was denoted as requiring checking during the next follow-up visits after 3, 6 and 12 months or more fre-

nę kwalifikowano do próchnicy początkowej lub zatrzymanej (kredowobiała lub brunatna plama bez przerwania ciągłości szkliwa), wówczas ząb oznaczano jako wymagający jedynie obserwacji na kolejnej wizycie kontrolnej, przeprowadzanej po 3, 6 i 12 miesiącach, a w wybranych przypadkach części. Do obydwu zabiegów kwalifikowano wyłącznie zęby z wyrzniętą powierzchnią żującą, pozwalającą na ocenę stanu twardych tkanek zęba. Profilaktykę fluorkową z zastosowaniem lakieru Fluor Protector wykonywano u dzieci, których stan powierzchni okluzyjnych należał do I lub II przedziału wg skali Hibsta i Paulusa. Zabiegiem ozonoterapii obejmowano zęby zdrowe, jak również z wyższymi wartościami pomiaru DIAGNOdentem, wskazującymi na obecność próchnicy początkowej.

Wśród dzieci i ich opiekunów przeprowadzono także, przed zabiegiem oraz podczas każdej wizyty kontrolnej, indywidualny instruktaż higieny jamy ustnej. Rodziców zapoznano z planem badań, wyjaśniono oraz przekazano pisemną informację na temat przeprowadzanego zabiegu, zwrócono uwagę na istotność przestrzegania higieny jamy ustnej i właściwej diety, uświadamiano o znaczeniu podjętych działań profilaktyczno-leczniczych oraz poproszono o uzupełnienie ankiety. Wyniki badań odnotowano w karcie badania klinicznego własnego projektu.

Badania zatwierdzono przez Lokalną Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – Uchwała Nr RNN/63/11/KE.

### Pobieranie próbek i ich przygotowanie do analizy

Do badań mikrobiologicznych pobierano płytkę nazębną z powierzchni zgryzowych zębów trzonowych oraz bruzd przedsionkowych i podniebiennych. Ogółem uzyskano 94 próbki. Pełnym badaniem (wstępnym i kontrolnym po 6 miesiącach od pierwszego zabiegu) objęto 38 osób: 25 poddanych ozonoterapii i 13, u których wykonywane było lakierowanie preparatem Fluor Protector. Przed planowanym badaniem zachowanie pacjentów nie odbiegało od dotychczasowych nawyków higieniczno-żywnościowych. Płytkę nazębną pobierano w trakcie badania wstępnego, przed wykonaniem zabiegów profilaktycznych pierwszych stałych zębów trzonowych. Następnie trzy miesiące od pierwszej wizyty przeprowadzano wizytę kontrolną, w trakcie której powtarzano określony zabieg profilaktyczny zębów stałych. Podczas kontroli po 6 miesiącach, również przed przystąpieniem do zabezpieczenia powierzchni zgryzowych, pobierano płytkę bakteryjną do kontrolnego badania mikrobiologicznego.

Płytkę nazębną zbierano jałowym zgłębnikiem na folię aluminiową, uprzednio zważoną i wyjałowioną, znajdującą się w płytkach Petriego, oznaczonych numerami charakterystycznymi dla każdego pacjenta. Próbki w ciągu 10 minut przenoszono do Zakładu Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej UM w Łodzi. Do zabiegu ozonoterapii wykorzystano urządzenie OzonyTron firmy Mymed, emitujące ozon w systemie otwartym za pomocą końcówki CA (caries) z dołączoną elektrodą uziemiającą. Ozon był

quently in certain cases. Only teeth with erupted chewing surface, allowing for an assessment of hard dental tissue, were qualified for both procedures. Prevention using Fluor Protector varnish was performed in children with occlusal dental surfaces classified into range I or II according to Hibst and Paulus scale. Ozone therapy was used in healthy teeth as well as teeth with higher DIAGNOdent values, indicating initial caries.

Children as well as their parents received instructions on oral hygiene prior to treatment and during each follow-up visit. Parents were acquainted with the study plan, provided with an explanation and written information on the treatment performed, highlighting the importance of compliance with oral hygiene and proper diet, informed about the importance of these preventive/therapeutic measures and asked to complete a questionnaire. Test results were documented in the clinical assessment record of our own design. The study was approved by the Local Bioethical Committee of the Medical University of Łódź (Resolution No. RNN/63/11/KE).

### Sample collection and preparation for analysis

Dental plaque from occlusal molar surfaces as well as vestibular and palatal furrows was sampled for microbiological testing. In total, 94 samples were collected. Full evaluation (preliminary and follow-up 6 months after the first procedure) was performed in 38 patients: 25 children receiving ozone therapy and 13 children receiving Fluor Protector varnishing. Before the study, the hygiene and dietary habits of children were as usual. Dental plaque was sampled during the preliminary examination, prior to prophylactic treatment of the first permanent molars. Then, three months after the first visit, a follow-up visit took place, during which preventive dental treatment was repeated. During a follow-up visit after 6 months, also prior to occlusal surface preventive treatment, dental plaque was collected for a follow-up microbiological testing. Dental plaque was collected using a sterile probe and placed on previously weighed and sterile aluminium foil lining Petri dishes labelled with patient's individual number. Samples were transferred to the Department of Microbiology & Immunology Laboratory Medicine of the Medical University of Lodz within 10 minutes. OzonyTron (Mymed) emitting ozone via an open system using CA probe (caries) with a ground electrode was used for ozone therapy. Ozone was applied topically. Treatment duration and intensity were determined by the doctor individually for every patient, based on the induction table developed by the manufacturer. Ozone emission lasted from 30 to 120 seconds per tooth surface using medium ozone concentration, and was followed by topical application of Fluor Protector. After dental plaque collection, Fluor Protector varnish was applied using

aplikowany miejscowo, a czas oraz intensywność zabiegu ustalał lekarz indywidualnie dla każdego pacjenta, w oparciu o tabelę indukcyjną opracowaną przez producenta. Emisja ozonu trwała od 30 do 120 sekund na powierzchnię zęba, wykorzystując średnią koncentrację ozonu, a następnie stosowano miejscową aplikację preparatu fluorkowego Fluor Protector.

W grupie osób poddawanych fluoryzacji kontaktowej, po pobraniu płytki aplikowano pędzelkiem na wszystkie powierzchnie szklivi zębów stałych lakier Fluor Protector, nie odbiegając od standardowego postępowania przy wykonywaniu tego zabiegu.

### Opracowanie mikrobiologiczne płytki nazębnej

Dostarczoną próbkę płytki nazębnej na folii aluminiowej ważono i po uwzględnieniu wagi samej folii uzyskiwano tzw. mokrą wagę płytki nazębnej. Materiał przenoszono następnie do 7 ml 0,85% w/v jałowego roztworu NaCl zredukowanego chlorowodorkiem cysteiny. Zawieszoną próbkę płytki nazębnej rozbijano przez 30 sekund w dezintegratorze ultradźwiękowym o mocy 100 W przy amplitudzie fali 5  $\mu\text{m}$  (Measuring & Scientific Equipment, Ltd). Uzyskaną zawiesinę płytki nazębnej rozcieńczano seryjnie od  $10^0$  do  $10^{-3}$  w jałowym roztworze 0,85% NaCl. Na podłożu TSY20B (Becton-Dickinson, USA) wykonywano posiew z wyżej wymienionych rozcieńczeń i inkubowano 48 godzin w 37°C w warunkach beztlenowych. Na podłożu M.R.S. Agar (Graso) posiewano nierozcieńczoną zawiesinę próbki płytki nazębnej i również inkubowano 48 godzin w 37°C w warunkach beztlenowych. Po tym czasie wyrosłe kolonie na podłożu TSY20B (Becton-Dickinson, USA) spryskiwano 10% roztworem mannitolu i inkubowano 3 godziny w temp. 37°C w atmosferze powietrza. Po inkubacji z mannitolem kolonie spryskiwano 4% roztworem TTC (chlorek 2,3,5-trójfenylotetrozolinowy) i inkubowano w tych samych warunkach przez jedną godzinę. Następnie liczono kolonie *Streptococcus mutans* wyrosłe na podłożu TSY20B (Becton-Dickinson, USA) zabarwione na różowo i kolonie *Lactobacillus* spp. wyrosłe na podłożu M.R.S. Agar (Graso). Uwzględniając rozcieńczenie badanej próbki, ustalano dla poszczególnych drobnoustrojów liczbę CFU (ang. *colony forming units* – liczba jednostek koloniotwórczych) w przeliczeniu na 1 g mokrej wagi płytki nazębnej.

### Analiza statystyczna

W celu statystycznego opracowania, uzyskane wyniki – dla cech mierzalnych – poddano analizie. Podano ich wartości minimalne i maksymalne, obliczono średnie arytmetyczne i parametry określające zróżnicowanie analizowanych zmiennych – odchylenia standardowe. Dla cech jakościowych określone zostały odsetki (częstości) występowania poszczególnych ich kategorii. Do oceny istotności różnic wartości przeciętnych badanych zmiennych w dwóch grupach wykorzystano test Manna-Whitneya, a do porównania różnic w tej samej grupie w dwóch okre-

a suitable brush on all enamel surfaces of permanent teeth in patients undergoing topical fluoridation, without departing from the standard management for this type of procedure.

### Microbiological analysis of the dental plaque

The delivered plaque samples placed on aluminium foil were weighed to obtain the wet weight of the dental plaque after subtracting the weight of the foil. The material was then transferred to 7 ml of 85% sterile NaCl reduced with cysteine hydrochloride. The suspension of the dental plaque was disrupted for 30 seconds in 100 W ultrasonic disintegrator at a wave amplitude of 5  $\mu\text{m}$  (Measuring & Scientific Equipment, Ltd). The obtained plaque suspension was serially diluted from  $10^0$  to  $10^{-3}$  in sterile 0.85% NaCl solution. The dilutions were inoculated onto TSY20B agar (Becton-Dickinson, USA) and incubated for 48 hrs at 37°C under anaerobic conditions. Undiluted suspension of dental plaque sample was inoculated on M.R.S. Agar (Graso) and also incubated for 48 hrs at 37°C under anaerobic conditions. After this time, colonies grown on TSY20B agar (Becton-Dickinson, USA) were sprayed with 10% mannitol solution and incubated for 3 hrs at 37°C under atmospheric conditions. After incubation with mannitol, the colonies were sprayed with 4% TTC solution (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) and incubated under the same conditions for 1 hour. The colonies of *Streptococcus mutans* (pink) grown on TSY20B agar (Becton-Dickinson, USA) and *Lactobacillus* spp. grown on M.R.S. Agar (Graso) were counted. The number of CFU (Colony Forming Units) per 1 g of wet weight of dental plaque was calculated for each microorganism, taking into account the dilution of a given sample.

### Statistical analysis

The obtained results were analysed (for measurable characteristics) statistically. Their minimum and maximum values were shown, the arithmetic means as well as parameters determining the differentiation of the analysed variables: standard deviations, were calculated. For qualitative characteristics, percentages (rates) of the occurrence of their categories were determined. The Mann-Whitney test was used to assess the significance of differences between the mean values in the two groups, while the Wilcoxon test for paired data ranks was used to compare differences in the same group but at different time points (distribution of the characteristics differed from normal distribution). Correlations between qualitative characteristics were assessed using the Spearman's rank correlation coefficient. The level of significance  $p \leq 0.05$  was used for all comparisons. Calculations were performed using STATISTICA v. 10 software.

sach czasu test Wilcoxon rang różnic dla par (gdyż rozkład cech odbiegał od rozkładu normalnego). Zależności pomiędzy cechami ilościowymi ocenione zostały przy pomocy współczynnika korelacji rang Spearmana. We wszystkich porównaniach przyjęto poziom istotności  $p \leq 0,05$ . Obliczenia wykonano przy pomocy programu STATISTICA v. 10.

## WYNIKI

W tabelach 1 i 2 zestawiono liczebności bakterii *Streptococcus mutans* oraz *Lactobacillus* spp. uzyskanych w płycie nazębnej podczas badania wstępnego oraz kontrolnego w grupach poddanych dwóm różnym zabiegom profilaktycznym. U wszystkich badanych wyhodowano bakterie *S. mutans* z płytek nazębnych pobranych podczas pierwszej wizyty. Przed przeprowadzaniem zabiegów pałeczki kwasu mlekowego wykrywalne były u 63,16% dzieci poddawanych ozonoterapii i 66,67% w grupie lakieru fluorkowego. W badaniu kontrolnym po 6 miesiącach występowanie paciorkowców zmiennych w grupie ozonoterapii obniżyło się do 88% przypadków, a w grupie fluoryzacji kontaktowej do 84,6%. Obecność bakterii *Lactobacillus* spp. uzyskano u podobnej liczby pacjentów jak w badaniu wstępnym. Spadek liczebności bakterii *S. mutans* w badaniu kontrolnym w stosunku do I badania otrzymano w 64% przypadków w grupie ozonoterapii oraz 38,46% wśród osób, u których wykonano lakierowanie zębów preparatem fluorkowym. Pół roku od pierwszego badania obniżenie liczebności pałeczek kwasu mlekowego zaobserwowano w 52% badanych płytek po zabiegu ozonoterapii oraz w 61,5% w grupie lakieru fluorkowego.

Na rycinie 2 przedstawiono średnie liczebności bakterii *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* spp. w I i II badaniu w grupie osób poddanych ozonoterapii. W badaniu wstępnym uzyskano wyższe wartości średnich liczebności zarówno paciorkowców, jak i pałeczek kwasu mlekowego w stosunku do badania kontrolnego, jednak otrzymane wyniki nie były istotne statystycznie (tab. 3). Podobne wyniki otrzymano wśród osób, u których wykonywano zabieg fluoryzacji kontaktowej (ryc. 3, tab. 4). Porównując zmiany liczebności oznaczanych bakterii z uwzględnieniem podziału na płeć badanych osób, uzyskano znamienne statystycznie spadek liczby bakterii *Lactobacillus* spp. wśród chłopców poddanych fluoryzacji kontaktowej.

W tabeli 5 zamieszczono wartości wskaźników: OHI, puw, puwp, PUW oraz PUWp, wykorzystane do analizy statystycznej korelacji pomiędzy higieną jamy ustnej oraz stanem zębów mlecznych i stałych a liczebnością bakterii próchnicotwórczych.

Badając zależność pomiędzy występowaniem próchnicy zębów mlecznych i zębów stałych a liczebnością bakterii *S. mutans* i *Lactobacillus* spp., znamienne statystycznie okazał się wpływ obecności próchnicy zębów stałych na liczbę bakterii kwasu mlekowego w badaniu wstępnym przed zabiegiem ozonoterapii ( $p = 0,0485$ ,  $R$  Spearman =  $-0,3984$ ). Natomiast w grupie fluoryzacji kontaktowej uzyskano istotną statystycznie zależność pomiędzy liczebnością

## RESULTS

Tables 1 and 2 summarise the numbers of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. from dental plaques obtained during the preliminary and follow-up examination in the groups receiving two different types of preventive treatment. *Streptococcus mutans* was grown from the dental plaques collected from all evaluated children during their first visit. Before the treatment, lactic acid bacteria were detected in 63.16% of children receiving ozone therapy and 66.67% of children receiving fluoride varnish. During the follow-up after 6 months, the presence of mutans streptococci decreased to 88% of cases in the ozone therapy group and to 84.6% in the topical fluoridation group. The presence of *Lactobacillus* spp. was observed in a similar number of patients as during the preliminary evaluation. A reduced number of *S. mutans* during follow-up compared to the first evaluation was reported in 64% of patients in the ozone-treatment group and 38.46% in the fluoride varnish group. Six months after the first evaluation, reduced number of lactic acid bacteria was observed in 52% of the evaluated plaques after ozone therapy and 61.5% in the fluoride varnish group. Figure 2 shows mean numbers of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. during 1st and 2nd evaluation in the ozone therapy group. In the initial evaluation, higher mean values for the numbers of both, streptococci and lactic acid bacteria compared to follow-up were obtained, however, the results were not statistically significant (tab. 3). Similar results were obtained in children receiving topical fluoridation (fig. 3, tab. 4). A comparison between the changes in the numbers of the evaluated bacteria, which took into account gender-based division, showed a statistically significant reduction in the number of *Lactobacillus* spp. among boys who underwent topical fluoridation.

Table 5 contains the values of the following indicators: OHI, dmft, dmfts, DMFT, DMFTS, used for statistical analysis of correlations between the oral hygiene and the state of deciduous and permanent teeth and the number of cariogenic bacteria. Assessment of the relationship between deciduous and permanent dental caries and the number of *S. mutans* and *Lactobacillus* spp. showed statistically significant effects of permanent dental caries on the number of lactic acid bacteria during preliminary evaluation prior to ozone therapy ( $p = 0.0485$ ,  $R$  Spearman =  $-0.3984$ ). In the group receiving topical fluoridation, statistically significant relationship was found between the number of *S. mutans* and the DMF index during a follow-up evaluation ( $p = 0.0013$ ,  $R$  Spearman =  $-0.7896$ ). When analysing the relationship between dmft, dmfts, DMFT and DMFTS and the numbers of bacteria in the sampled plaques it was shown in the follow-up that there was a statistically



**Tab. 1.** Liczebności bakterii *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* spp. w I i II badaniu w grupie osób poddanych zabiegowi ozonoterapii

Nr pacjenta	Liczba bakterii			
	badanie wstępne		badanie kontrolne	
	<i>S. m.</i>	<i>L. spp.</i>	<i>S. m.</i>	<i>L. spp.</i>
1	50 705	0	40	39
2	374	93	75 500	2133
3	10 033	9334	98 000	0
4	63 951	6740	8777	0
5	27 300	630	1853	54 253
6	4362	21 228	1400	0
7	4826	0	175	66
8	700	2380	448 000	798
9	303 800	70	357	0
10	35 353	0	13 299	93
11	73 684	180 526	1591	11 879
12	9000	300	62	21
13	18 472	0	0	1615
14	24 547	280	10 891	0
15	90 000	0	572	0
16	57	4541	11 200	0
17	2171	0	3620	0
18	3850	0	21 539	54
19	121 154	0	140 761	152
20	467	15 944	0	90
21	318	3500	0	54
22	1400	1680	34 364	0
23	53 472	1471	525	163
24	3768	0	344	24
25	125 464	34	11 771	236
26	283 500	0	-	-
27	3854	33	-	-
28	4600	1600	-	-
29	175	0	-	-
30	59 874	0	-	-

**Tab. 1.** The number of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. during the first and second evaluation in the group of patients receiving ozone therapy

Patient no.	Number of bacteria			
	preliminary evaluation		follow-up	
	<i>S. m.</i>	<i>L. spp.</i>	<i>S. m.</i>	<i>L. spp.</i>
1	50 705	0	40	39
2	374	93	75 500	2133
3	10 033	9334	98 000	0
4	63 951	6740	8777	0
5	27 300	630	1853	54 253
6	4362	21 228	1400	0
7	4826	0	175	66
8	700	2380	448 000	798
9	303 800	70	357	0
10	35 353	0	13 299	93
11	73 684	180 526	1591	11 879
12	9000	300	62	21
13	18 472	0	0	1615
14	24 547	280	10 891	0
15	90 000	0	572	0
16	57	4541	11 200	0
17	2171	0	3620	0
18	3850	0	21 539	54
19	121 154	0	140 761	152
20	467	15 944	0	90
21	318	3500	0	54
22	1400	1680	34 364	0
23	53 472	1471	525	163
24	3768	0	344	24
25	125 464	34	11 771	236
26	283 500	0	-	-
27	3854	33	-	-
28	4600	1600	-	-
29	175	0	-	-
30	59 874	0	-	-

Nr pacjenta	Liczba bakterii			
	badanie wstępne		badanie kontrolne	
	S. m.	L. spp.	S. m.	L. spp.
31	81 667	0	-	-
32	2520	420	-	-
33	26 415	17 170	-	-
34	733 541	12 943	-	-
35	21 353	424	-	-
36	18 421	1510	-	-
37	29 379	297	-	-
38	86 667	0	-	-

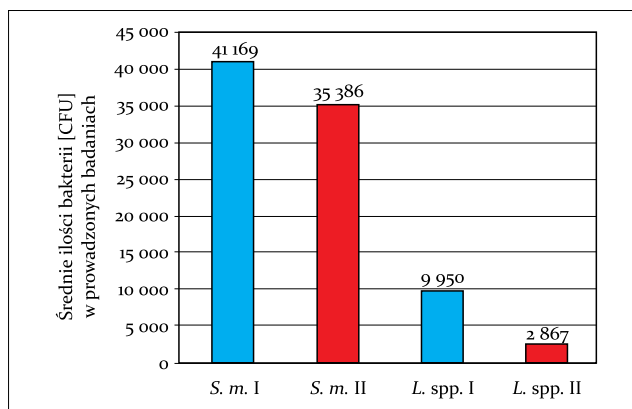
Patient no.	Number of bacteria			
	preliminary evaluation		follow-up	
	S. m.	L. spp.	S. m.	L. spp.
31	81 667	0	-	-
32	2520	420	-	-
33	26 415	17 170	-	-
34	733 541	12 943	-	-
35	21 353	424	-	-
36	18 421	1510	-	-
37	29 379	297	-	-
38	86 667	0	-	-

Tab. 2. Liczebności bakterii *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* spp. w I i II badaniu w grupie osób poddanych zabiegowi fluoracji kontaktowej

Tab. 2. The number of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. during the first and second evaluation in the group of patients undergoing topical fluoridation

Nr pacjenta	Liczba bakterii			
	badanie wstępne		badanie kontrolne	
	S. m.	L. spp.	S. m.	L. spp.
1	3285	54	4837	0
2	47 374	257 374	32 200	33 600
3	84 000	105	0	89
4	560	644	6198	0
5	77 000	0	79 800	1225
6	82	0	1 634	0
7	500	0	0	21
8	17 889	623	87 500	22
9	12 314	0	65 334	23
10	3704	0	8667	2500
11	302 272	397	1728	130
12	875 000	4243	12 963	0
13	109 667	467	129 078	372
14	645	37	-	-
15	81 200	420	-	-
16	58 840	0	-	-
17	59 231	183	-	-
18	5167	450	-	-

Patient no.	Number of bacteria			
	preliminary evaluation		follow-up	
	S. m.	L. spp.	S. m.	L. spp.
1	3285	54	4837	0
2	47 374	257 374	32 200	33 600
3	84 000	105	0	89
4	560	644	6198	0
5	77 000	0	79 800	1225
6	82	0	1 634	0
7	500	0	0	21
8	17 889	623	87 500	22
9	12 314	0	65 334	23
10	3704	0	8667	2500
11	302 272	397	1728	130
12	875 000	4243	12 963	0
13	109 667	467	129 078	372
14	645	37	-	-
15	81 200	420	-	-
16	58 840	0	-	-
17	59 231	183	-	-
18	5167	450	-	-



Ryc. 2. Średnie liczebności bakterii *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* spp. w I i II badaniu w grupie osób poddanych ozonoterapii

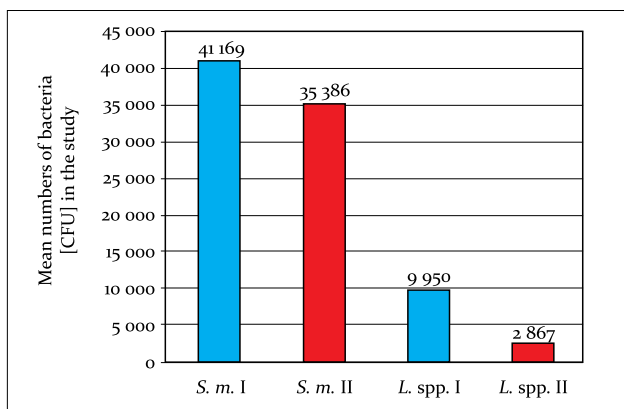


Fig. 2. Mean numbers of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. during the first (I) and second (II) evaluation in the group of patients receiving ozone therapy

Tab. 3. Porównanie wartości przeciętnych liczebności bakterii *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* spp. pomiędzy I i II badaniem w grupie osób poddanych zabiegowi ozonoterapii

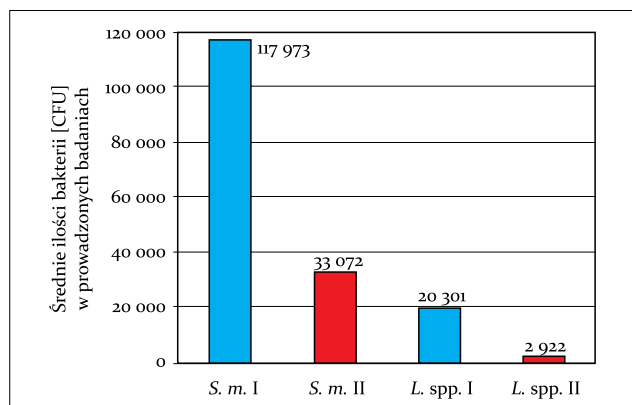
Rodzaj bakterii	n	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch. std.
<i>S. m.</i> I badanie	25	41 169,12	10 033	57	303 800	66 642,8
<i>S. m.</i> II badanie	25	35 385,64	1853	0	448 000	92 830,8
<i>L. spp.</i> I badanie	25	9950,04	280	0	180 526	35 937,5
<i>L. spp.</i> II badanie	25	2866,8	54	0	54 253	10 967,7

Rodzaj bakterii	Wartość statystyki Z w teście Manna-Whitneya	Istotność statystyczna p
<i>S. m.</i>	1,304	0,191
<i>L. spp.</i>	1,733	0,082

Tab. 3. Comparison of the average number of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. between 1st and 2nd evaluation in the group of patients receiving ozone therapy

Type of bacteria	n	Mean	Median	Minimum	Maximum	SD
<i>S. m.</i> 1st evaluation	25	41 169.12	10 033	57	303 800	66 642.8
<i>S. m.</i> 2nd evaluation	25	35 385.64	1853	0	448 000	92 830.8
<i>L. spp.</i> 1st evaluation	25	9950.04	280	0	180 526	35 937.5
<i>L. spp.</i> 2nd evaluation	25	2866.8	54	0	54 253	10 967.7

Type of bacteria	The value of Z statistics in the Mann-Whitney test	Statistical significance (p value)
<i>S. m.</i>	1.304	0.191
<i>L. spp.</i>	1.733	0.082



Ryc. 3. Średnie liczebności bakterii *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* spp. w I i II badaniu w grupie osób poddanych fluoryzacji kontaktowej

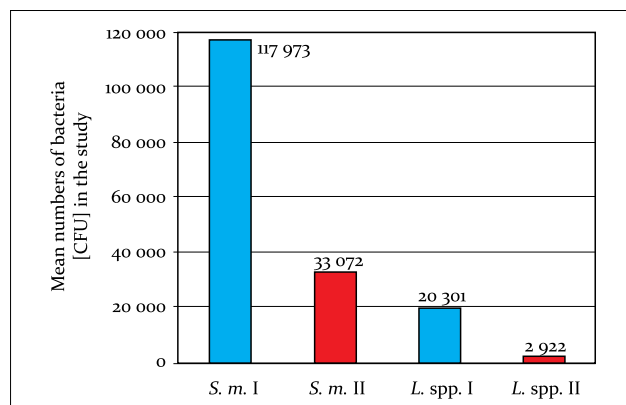


Fig. 3. Mean numbers of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. during the first (I) and second (II) evaluation in the group of patients undergoing topical fluoridation

Tab. 4. Porównanie wartości przeciętnych liczebności bakterii *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* spp. pomiędzy I i II badaniem w grupie osób poddanych zabiegowi fluoryzacji kontaktowej

Rodzaj bakterii	n	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch. std.
S. m. I badanie	13	117 972,8	17 889	82	875 000	242 181
S. m. II badanie	13	33 072,2	8667	0	129 078	42 897,5
L. spp. I badanie	13	20 300,5	105	0	257 374	71 240,9
L. spp. II badanie	13	2921,7	23	0	33 600	9246,2

Rodzaj bakterii	Wartość statystyki Z w teście Manna-Whitneya	Istotność statystyczna p
S. m.	0,104	0,916
L. spp.	1,176	0,239

Tab. 4. Comparison of the average number of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. between 1st and 2nd evaluation in the group of patients undergoing topical fluoridation

Type of bacteria	n	Mean	Median	Minimum	Maximum	SD
S. m. 1st evaluation	13	117 972.8	17 889	82	875 000	242 181
S. m. 2nd evaluation	13	33 072.2	8667	0	129 078	42 897.5
L. spp. 1st evaluation	13	20 300.5	105	0	257 374	71 240.9
L. spp. 2nd evaluation	13	2921.7	23	0	33 600	9246.2

Type of bacteria	The value of Z statistics in the Mann-Whitney test	Statistical significance (p value)
S. m.	0.104	0.916
L. spp.	1.176	0.239

Tab. 5. Wartości wskaźników puw, puwp, PUW, PUWp, OHI w grupie ozonoterapii oraz fluoryzacji kontaktowej w I i II badaniu

Wskaźnik	n		Średnia		Mediana		Minimum		Maksimum		Odch. std.	
	O	FP	O	FP	O	FP	O	FP	O	FP	O	FP
puw I	37	17	4,8378	4,8824	5	4	0	0	15	12	3,6478	3,5511
puw II	25	12	5,0400	5,8333	4	7,5	0	0	14	11	4,0361	3,6639
puwp I	37	17	10,7568	8,0000	7	8	0	0	45	16	11,1091	5,9477
puwp II	25	12	11,5600	11,0833	9	14	0	0	53	21	13,0610	8,1292
PUW I	38	18	0,3684	0,5556	0	0	0	0	3	5	0,7857	1,1991
PUW II	26	13	0,2692	0,6923	0	0	0	0	2	4	0,6038	1,2506
PUWp I	38	18	0,3684	0,5556	0	0	0	0	3	5	0,7857	1,1991
PUWp II	26	13	0,2692	0,6923	0	0	0	0	2	4	0,6038	1,2506
OHI I	38	18	0,6958	0,6983	0,67	0,67	0,17	0	1,33	2	0,2963	0,5058
OHI II	26	13	0,6062	0,7954	0,67	0,67	0	0,33	1,67	1,67	0,3606	0,3813

Tab. 5. The values of dmft, dmfts, DMFT, DMFTS and OHI in ozone therapy and topical fluoridation groups during 1st (I) and 2nd (II) evaluation

Index	n		Mean		Median		Minimum		Maximum		SD	
	O	FP	O	FP	O	FP	O	FP	O	FP	O	FP
dmft I	37	17	4.8378	4.8824	5	4	0	0	15	12	3.6478	3.5511
dmft II	25	12	5.0400	5.8333	4	7.5	0	0	14	11	4.0361	3.6639
dmfts I	37	17	10.7568	8.0000	7	8	0	0	45	16	11.1091	5.9477
dmfts II	25	12	11.5600	11.0833	9	14	0	0	53	21	13.0610	8.1292
DMFT I	38	18	0.3684	0.5556	0	0	0	0	3	5	0.7857	1.1991
DMFT II	26	13	0.2692	0.6923	0	0	0	0	2	4	0.6038	1.2506
DMFTS I	38	18	0.3684	0.5556	0	0	0	0	3	5	0.7857	1.1991
DMFTS II	26	13	0.2692	0.6923	0	0	0	0	2	4	0.6038	1.2506
OHI I	38	18	0.6958	0.6983	0.67	0.67	0.17	0	1.33	2	0.2963	0.5058
OHI II	26	13	0.6062	0.7954	0.67	0.67	0	0.33	1.67	1.67	0.3606	0.3813

paciorkowców *S. mutans* a wartościami wskaźnika PUW podczas badania kontrolnego ( $p = 0,0013$ ,  $R$  Spearman =  $-0,7896$ ). Analizując zależność między wskaźnikami puw, puwp, PUW i PUWp a liczebnościami bakterii uzyskanych w pobranych płytkach, w badaniu kontrolnym stwierdzono istotny statystycznie związek pomiędzy PUW i PUWp a liczebnością bakterii *Streptococcus mutans* wśród osób poddanych fluoryzacji kontaktowej (w obu zależnościach  $p = 0,0007$ ,  $R$  Spearman =  $-0,8131$ ).

Analizą statystyczną objęto również pytania ankietowe dotyczące stanu zdrowia dzieci, świadomości prozdrowotnej rodziców, terminów wyrzynania zębów mlecznych i stałych, nawyków żywieniowych, wykonywanych pro-

significant relationship between DMFT and DMFTS and the number of *Streptococcus mutans* among children receiving topical fluoridation ( $p = 0.0007$ ,  $R$  Spearman =  $-0.8131$  for both correlations). Questions included in the questionnaire on the health status of children, health awareness of their parents, the timing of deciduous and permanent teeth eruption, eating habits, the used preventive treatment as well as lifestyle were also analysed statistically in relation to the achieved changes in the number of bacteria between microbiological evaluations of the plaque. Statistically significant differences in the number of *S. mutans* between preliminary and

fesjonalnych zabiegów profilaktycznych oraz stylu życia w powiązaniu z uzyskanymi zmianami liczebności bakterii pomiędzy badaniami mikrobiologicznymi płytki nazębnej. Różnice istotne statystycznie w liczbie bakterii *S. mutans* pomiędzy badaniem wstępnym a kontrolnym uzyskano u dzieci w zależności od terminu wyrzynania zębów mlecznych. Najwyższy wzrost paciorkowców w II badaniu obserwowano w grupie pacjentów, których zęby mleczne zaczęły wyrzynać się przed ukończeniem 6. miesiąca życia.

Znamienny statystycznie okazał się również wpływ przeprowadzanej przed przystąpieniem do badań profesjonalnej profilaktyki fluorkowej zębów mlecznych na zmiany liczebności *Streptococcus mutans* w prowadzonych badaniach. Najwyższy wzrost bakterii otrzymano w grupie dzieci, których zęby mleczne nie były wcześniej zabezpieczane preparatami fluorkowymi. Oceniając znaczenie wpływu pomocy osoby dorosłej podczas mycia zębów na liczebność paciorkowców, paradoksalnie uzyskano najwyższy wzrost w grupie dzieci, którym rodzice często towarzyszyli w czasie wykonywania tej czynności. Istotny statystycznie wzrost liczby *S. mutans* w II badaniu odnotowano wśród wszystkich badanych dzieci oraz w podgrupie pacjentów poddanych fluoryzacji kontaktowej, pozostających pod opieką jednego stomatologa (dla grupy lakieru fluorkowego  $p = 0,031$ , a dla wszystkich pacjentów  $p = 0,016$ ).

Analizując korelację odpowiedzi uzyskanych w badaniu podmiotowym ze zmianami liczebności bakterii *Lactobacillus* spp. w prowadzonych badaniach, różnice istotne statystycznie uzyskano pomiędzy dziećmi, u których wykonywano profesjonalną profilaktykę fluorkową zębów mlecznych, a tymi, których rodzice nieświadomi byli, czy tego rodzaju zabieg był kiedykolwiek wykonywany. Stwierdzono również większą liczebność pałeczek kwasu mlekowego w II badaniu u dzieci, które używają szczoteczki elektryczną, w stosunku do praktykujących ręczne techniki czyszczenia zębów.

## DYSKUSJA

Powstawanie i rozwój próchnicy jest procesem złożonym i dynamicznym ze względu na zachodzące naprzemiennie procesy demineralizacyjne i remineralizujące. Bakterie z grupy *Streptococcus mutans* oraz *Lactobacillus* spp. odgrywają zasadniczą rolę w powstawaniu próchnicy, gdyż łatwo metabolizują cukry, tj.: sacharozę, glukozę i fruktozę zawarte w diecie, do kwasów organicznych, które obniżając pH płytki nazębnej przyczyniają się do demineralizacji twardych tkanek zęba (5, 16). Stąd też stosowane zabiegi profilaktyczne mają m.in. na celu obniżenie liczebności bakterii próchnicotwórczych. Skuteczność tych działań może być oceniana w krótkim czasie od ich zakończenia, np. po jednym tygodniu – wówczas jest to ocena efektu natychmiastowego, lub w perspektywie długoterminowej – w okresie od 3 do 6 miesięcy od zabiegu, pozwalająca na uzyskanie informacji o przedłużającym się działaniu zastosowanej metody profilaktycznej (17).

follow-up evaluation were shown in children depending on the timing of deciduous teeth eruption. The highest growth of streptococci during second evaluation was observed in patients with deciduous teeth eruption before the age of 6 months.

The effects of the pre-study fluoride-based caries prevention for primary teeth on the number of *Streptococcus mutans* were also statistically significant. The highest bacterial growth was obtained in the group of children who did not receive any fluoride treatment for primary teeth. An assessment of the impact of parental assistance during tooth brushing on the number of streptococci paradoxically showed that the highest bacterial growth occurred among children frequently accompanied by their parents during this activity. Statistically significant increase in the number of *S. mutans* during the second evaluation was reported in all children as well as in the subgroup of patients receiving topical fluoridation, who were under the care of one dentist ( $p = 0.031$  for fluoride varnish group;  $p = 0.016$  for all patients). Analysis of the correlation between the collected medical history and the number of *Lactobacillus* spp. showed statistically significant differences between children who underwent professional deciduous teeth fluoride prophylaxis and those whose parents were unsure whether such a procedure had ever been performed. Increased numbers of lactic acid bacteria were also observed during the second evaluation in children who use electric toothbrush compared to those using manual toothbrushes.

## DISCUSSION

The formation and development of dental caries is a complex and dynamic process due to alternating processes of demineralisation and remineralisation. *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. play a crucial role in the pathogenesis of dental caries since they easily metabolise sugars such as dietary saccharose, glucose and fructose producing organic acids, which reduce dental plaque pH and contribute to dental hard tissue demineralisation (5, 16). Therefore, preventive treatment aims to e.g. reduce the number of cariogenic bacteria. Its efficacy can be assessed shortly after treatment completion, e.g. after one week, to evaluate the immediate effects or after 3-6 months to evaluate long-term efficacy and obtain data on the prolonged effects of the used prophylactic method (17). The microflora of molar occlusal fissures consists mainly of Gram-positive bacteria, with the dominance of streptococci, and the fissure biofilm is less varied compared to contact surfaces and the physiological sulcus (3). The conducted analyses showed that during the preliminary evaluation stage, *Streptococcus mutans* reached very high levels in

Mikroflora bruzd powierzchni żujących zębów trzonowych składa się głównie z bakterii G(+), wśród których dominują paciorkowce, a biofilm szczelin jest mniej zróżnicowany niż powierzchni stycznych oraz fizjologicznej kieszonki dziąsłowej zęba (3). W wyniku przeprowadzonych analiz, szczególnie poziom bakterii *Streptococcus mutans* u wszystkich dzieci w badaniu wstępnym osiągał wartość bardzo wysoką (mediana oznaczanych bakterii wyniosła 15 101). Wysokie miano tych mikroorganizmów wskazuje na duże prawdopodobieństwo wystąpienia choroby próchnicowej. Zatem dzieci te wymagają wdrożenia zdecydowanego postępowania profilaktycznego obniżającego liczebność bakterii próchnicotwórczych (18).

W prowadzonych badaniach własnych wykryto obecność bakterii *S. mutans* we wszystkich płytkach nazębnych uzyskanych od dzieci podczas pierwszej wizyty. Występowanie bakterii *Lactobacillus* spp. stwierdzono u ok. 60% przypadków. Badania prowadzone przez Proc i wsp. (19) wśród dzieci w wieku 2-5 lat z zastosowaniem standardowego testu CRT bacteria (Vivadent) wykazały wysoki poziom występowania bakterii *S. mutans* u 68%, a bakterii *Lactobacillus* spp. u 46%, ale niższy niż w obecnych badaniach. Należy jednak zaznaczyć, że laboratoryjne badania mikrobiologiczne oraz przeprowadzanie ich w przypadku jamy ustnej w oparciu o płytkę nazębną są bardziej czułymi metodami niż standardowe testy ślinowe. Dlatego też w wykonywanych obecnie badaniach mikroorganizmy te były wykrywane nawet przy niewielkim poziomie ich obecności. Istotny jest również wiek badanych, gdyż flora bakteryjna rozwija się wieloetapowo i jama ustna młodszych dzieci mogła jeszcze nie zostać kolonizowana przez ww. bakterie.

Niewiele jest publikacji odnośnie leczenia początkowych zmian próchnicowych powierzchni okluzyjnych z zastosowaniem ozonoterapii, a dodatkowo raporty na ten temat nie są zgodne. Jeszcze trudniej ocenić jest wpływ ozonu na mikroflorę jamy ustnej, gdyż większość badań prowadzona była w warunkach *in vitro*, a liczbę bakterii oceniano zazwyczaj w wiórkach zębinowych. Bardzo rzadko prowadzi się również kontrolę długoterminową jakichkolwiek działań profilaktycznych i leczniczych z wykorzystaniem tego gazu.

Teoretycznie, ozon zmniejsza liczbę bakterii w aktywnych zmianach próchnicowych, a tym samym co najmniej tymczasowo może hamować postęp próchnicy. Jednak wyniki badań, szczególnie prowadzonych w warunkach *in vivo*, pozostają kontrowersyjne. Hauser-Gerspach i wsp. (20) oceniali skuteczność gazowego ozonu, jako środka dezynfekującego, w redukcji mikroorganizmów znajdujących się w zmianach próchnicowych powierzchni zgryzowych zębów mlecznych, bez usuwania zainfekowanych tkanek oraz po wstępnym oczyszczeniu ekskawatorem, porównując ze skutecznością żelu chlorheksydynowego stosowanego w tych samych warunkach. Zarówno zastosowany ozon, jak i 1% chlorheksydyna okazały się nieskuteczne w walce z bakteriami otwartych ubytków powierzchni zgryzowych,

all children (the median for the assayed bacteria was 15,101). High titres for these microbes indicate high risk of caries. Therefore, these children definitely need preventive measures aimed to reduce the number of cariogenic bacteria (18).

In this study we have detected *S. mutans* in all dental plaques sampled from children during their first visit. *Lactobacillus* spp. was found in about 60% of cases. Proc et al. (19) conducted their study among children aged 2-5 years using standard CRT bacteria test (Vivadent) and showed high levels of *S. mutans* in 68%, and *Lactobacillus* spp. in 46% of patients, which was still lower compared to our study. It should be noted, however, that laboratory microbiological testing and its use for oral cavity evaluation in terms of dental plaque is a more sensitive method compared to standard saliva testing. Therefore, in the present study, microorganisms were detected even at low levels. The age of subjects is also important as the development of bacterial flora involves a number of stages, thus the oral cavity in younger children may not be colonised by the above mentioned bacteria.

Publications on the treatment of initial occlusal carious lesions using ozone therapy are sparse, and the reports on this subject are divergent. Demonstrating the effects of ozone on oral microflora is even more difficult as most research was conducted *in vitro*, and the number of bacteria was usually assessed in dentin chips. Long-term follow-up of any type of preventive or therapeutic treatment using ozone is very rare.

Theoretically, ozone reduces the number of bacteria present in active carious lesions, and thus it may temporarily inhibit caries progression. However, study results, especially *in vivo* findings, remain controversial. Hauser-Gerspach et al. (20) assessed the efficacy of gaseous ozone as a disinfectant for reducing the number of microbes present in deciduous occlusal surfaces without the removal of infected tissue and following a pre-treatment with an excavator, comparing it with a chlorhexidine gel used under the same conditions. Neither ozone, nor 1% chlorhexidine proved efficacious in the elimination of bacteria present in open occlusal cavities, and a previous removal of softened tissue had no effects on the number of cariogenic bacteria.

No statistically significant differences in the number of bacteria between baseline and follow up (6 months after first ozone treatment) were observed in our study. Similarly, Baysan and Beighton (21) did not observe any reduction in the number of living microbes after an exposure of dentine affected by initial caries to ozone. The obtained results indicate, according to the above mentioned authors, that gaseous ozone is ineffective in bacterial elimination. The authors believe that this is due to

a uprzednie usunięcie rozmiękłych tkanek również nie miało wpływu na zmiany liczby bakterii próchnicotwórczych.

W półrocznym odstępie od pierwszej aplikacji ozonu w prowadzonych badaniach własnych także nie uzyskano różnic istotnych statystycznie w liczebności bakterii pomiędzy badaniem wstępnym a badaniem kontrolnym. Podobnie Baysan i Beighton (21) nie zaobserwowali zmniejszenia liczby żywych mikroorganizmów pod wpływem ozonu w zębinie zębów, w których występowała próchnica początkowa. Uzyskane wyniki wskazują według ww. autorów, że gazowy ozon nie jest skuteczny w eliminacji bakterii. Tłumaczą to silnym związkiem macierzy biofilmu z tkankami zęba oraz zbyt małą rozpuszczalnością gazowego ozonu w wodzie. Odmienne wyniki otrzymali Sadatullah i wsp. (11). Autorzy badali płytki nazębne pobrane od 40 osób, z których połowa pacjentów uprzednio płukała jamę ustną przez 30 sekund wodą destylowaną, a druga połowa badanych 0,1 ppm wodą ozonowaną. W grupie osób stosujących wodę ozonowaną redukcja całkowitej puli bakterii wyniosła 51,7%, a liczba paciorkowców została zmniejszona o 56,4%. Badanie to wykazało, że zastosowane stężenie ozonu skutecznie wpłynęło na zmniejszenie liczby mikroorganizmów płytki nazębnej, ale nie wyeliminowało całej populacji drobnoustrojów biofilmu.

Knight i wsp. (22) przeciwpróchnicowe właściwości ozonu tłumaczą nie obniżeniem liczby bakterii, ale jego wpływem na zaburzenia działania enzymów odpowiedzialnych za syntezę rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych glukanów oraz zmniejszeniem zwilżalności powierzchni zęba, które może hamować powstawanie płytki nazębnej. Jednak jak wykazano, skuteczność ozonoterapii zależy od obecności „barier dyfuzji”. Wielu autorów wskazuje na potrzebę usunięcia biofilmu przed rozpoczęciem zabiegu. Płytką bakteryjną, ślina, opilki zębiny, biofilm bakteryjny uniemożliwiają kontakt gazu z bakteriami, a tym samym zmniejszają skuteczność ozonu (23, 24). Holmes (25) wykazał znaczącą remineralizację próchnicy korzenia po dokładnym oczyszczeniu i zastosowaniu ozonu. Wskazuje to na istnienie innych mechanizmów działania przeciwpróchnicowego  $O_3$  poza właściwościami bakteriobójczymi. Biorąc pod uwagę te doniesienia, w obecnych badaniach po pobraniu płytki nazębnej, ale przed zabiegami ozonoterapii, dokładnie oczyszczano powierzchnie zębów.

Przeprowadzona analiza statystyczna oceniająca wzrost bakterii po zastosowaniu preparatu fluorkowego nie wykazała istotnych różnic w liczebności mikroorganizmów pomiędzy wizytami. Podobne wyniki uzyskali Płuciennik-Stronias i wsp. (26) oraz Zaura-Arite i ten Cate (27). Pierwsi autorzy badali liczebność *Lactobacillus* spp. w płytce nazębnej zebranej przed wtarciem i 3 dni od wtarcia żelu fluorkowego Fluormex w szkliwo zębów. Zaura-Arite i ten Cate analizowali wzrost *S. mutans* i *Lactobacillus* spp. w warunkach *in vitro* na dyskach zębinowych pokrywanych odpowiednio w I grupie preparatem chlorheksydynowym (Cervitec), w II grupie preparatem fluorkowym (Fluor Protector), w III grupie mieszaną

a strong adhesion of the biofilm matrix to dental tissue as well as insufficient solubility of gaseous ozone in water. Different results were obtained by Sadatullah et al. (11). The authors investigated dental plaques from 40 patients, including 50% of patients who had previously rinsed their mouths with distilled water for 30 seconds, and the other half who used 0.1 ppm ozonated mouth rinse. In the group of patients using ozonated water, reduction of the overall amount of bacteria was 51.7%, while the number of streptococci was reduced by 56.4%. The study showed that although the use of ozone effectively reduced the number of microorganisms, it failed to eliminate the entire microbial population of the biofilm.

Knight et al. (22) believe that the anticariogenic properties of ozone are not related to its ability to reduce the number of bacteria, but its ability to impair the function of enzymes responsible for synthesis of soluble and insoluble glucans as well as reduced wettability of dental surface, which may inhibit plaque formation. However, as shown, the effectiveness of ozone therapy depends on the presence of diffusion barriers. A number of authors point to the need of removing biofilm prior to treatment. Bacterial plaque, saliva, dentin chips and bacterial biofilm prevent the contact between the gas and bacteria, and thus reduce the efficiency of ozone (23, 24). Holmes (25) showed significant remineralisation of root caries following thorough cleaning and the use of ozone. This points to the existence of other anticariogenic mechanisms of  $O_3$ , other than bactericidal properties. Considering findings from these reports, we also thoroughly cleaned dental surfaces following plaque sampling, but prior to ozone therapy.

The conducted statistical analysis assessing bacterial growth following the use of fluoride preparation did not show significant differences between the numbers of microorganisms during subsequent visits. Similar results were obtained by Płuciennik-Stronias et al. (26) and Zaura-Arite and ten Cate (27). The first author investigated the number of *Lactobacillus* spp. in dental plaque sampled prior to as well as 3 days after applying fluoride gel (Fluormex) on the enamel. Zaura-Arite and ten Cate analysed the *in vitro* growth of *S. mutans* and *Lactobacillus* spp. on dentin disks covered with chlorhexidine preparation (Cervitec), fluoride preparation (Fluor Protector), mixture of both, and placebo in groups 1, 2, 3, and 4, respectively, and showed no differences between the study groups with respect to the growth of *S. mutans* and *Lactobacillus* spp. Unfortunately, the available literature lacks data with uniform management schemes, from studies in index groups and under *in vivo* conditions that would allow for a fully reliable comparison of the obtained results, especially those related to ozone.



obydwu środków oraz w IV grupie związkiem placebo. Nie wykazali oni różnic we wzroście *S. mutans* i *Lactobacillus* spp. pomiędzy badanymi grupami. Niestety w dostępnym piśmiennictwie brak jest danych z ujednoliconymi schematami postępowania z badań prowadzonych w grupach indeksowych oraz w warunkach *in vivo*, pozwalających na w pełni wiarygodne porównanie otrzymanych wyników z pracami innych autorów, zwłaszcza dotyczących ozonu.

Uzyskiwane odpowiedzi na pytania ankietowe wyglądają dość optymistycznie, jeśli chodzi o świadomość prozdrowotną rodziców/opiekunów badanych dzieci, jednak często stoją w sprzeczności z wynikami otrzymanymi w analizie statystycznej. W prowadzonych badaniach uzyskano istotny statystycznie wzrost bakterii *S. mutans* w grupie dzieci, których rodzice deklarowali częstą pomoc swoim dzieciom w czasie codziennego szczotkowania zębów. Być może pewnym wytłumaczeniem jest fakt, że rodzice mimo znajomości teorii, mają kłopoty z praktycznym stosowaniem propagowanej powszechnie wiedzy na temat profilaktyki u dzieci i wybrana odpowiedź nie do końca odzwierciedlała stan faktyczny.

Wiadomo, że bakterie próchnicotwórcze istnieją w środowisku jamy ustnej prawie zawsze, ale dopiero ich wysokie miana stanowią zagrożenie rozwojem procesu próchnicowego. Dlatego też ważne jest obniżenie ich liczebności do poziomu, przy którym produkcja kwasów będzie mniejsza i możliwa efektywna ich neutralizacja przez systemy buforowe śliny. Być może ozon posiada jeszcze inne właściwości działania przeciwpróchnicowego poza mechanizmem antybakteryjnym, dzięki któremu aplikacja tego gazu może być skuteczna w ograniczeniu rozwoju i postępu próchnicy, a nie jest bezpośrednio związana z hamowaniem flory bakteryjnej. Zawsze należy więc wiązać skuteczność działania środków stosowanych w profilaktyce i leczeniu procesu próchnicowego nie tylko z bezpośrednim wpływem na poziom bakterii w płytce nazębnej lub ślinie, ale ostatecznie na intensywność próchnicy.

## WNIOSKI

1. Półroczna analiza działania zabiegów ozonoterapii oraz fluoryzacji kontaktowej wykazała, że liczebności bakterii *Streptococcus mutans* uległy zmniejszeniu w płytce nazębnej u około 1/4 badanych dzieci, chociaż wyniki te nie były istotne statystycznie.
2. Doniesienia wstępne wskazują, że potencjał bakterio-bójczy gazowego ozonu i preparatu fluorkowego Fluor Protector kształtują się na podobnym poziomie.
3. Systematyczne wykonywanie profesjonalnych zabiegów profilaktycznych może być skutecznym sposobem obniżenia liczebności bakterii będących istotnym czynnikiem powstawania i rozwoju próchnicy.

Although the questionnaire findings seem quite optimistic with regard to health awareness of parents/guardians of the evaluated children, they are often in contradiction with the obtained results of statistical analysis. In our study, we have obtained statistically significant growth of *S. mutans* in children whose parents declared frequent tooth-brushing assistance. Perhaps this may be explained by the fact that despite theoretical knowledge, parents have difficulty in the practical use of the widely propagated information on caries prevention in children, thus the selected answer does not fully reflect the actual state.

It is a known fact that cariogenic bacteria are almost always present in the environment of oral cavity, but only their high titres pose the risk of developing caries. Therefore, it is important to reduce their numbers to a level at which both, acid production is lower and effective acid neutralisation by salivary buffer systems is possible. Perhaps ozone has other anticariogenic properties, other than the antibacterial mechanism, which will allow for an effective use of this gas to inhibit the development and progression of caries, and which is not directly related to bacterial flora inhibition. Thus, the efficacy of agents used in the prophylaxis and treatment of dental caries should be always linked not only to direct effects on the levels of bacteria present in the plaque or saliva, but also on the severity of caries.

## CONCLUSIONS

1. A 6-month assessment of the effectiveness of ozone therapy and topical fluoridation showed that the numbers of plaque *Streptococcus mutans* decreased in approx. 1/4 of children, however, the results were not statistically significant.
2. Reports preliminarily indicate that the bactericidal potential of gaseous ozone and fluoride varnish (Fluor Protector) is at similar level.
3. Regular and professional prophylactic treatment may prove a good way to reduce the number of bacteria, which play a key role in the formation and development of caries.

## KONFLIKT INTERESÓW

### CONFLICT OF INTEREST

Brak konfliktu interesów  
None

### ADRES DO KORESPONDENCJI CORRESPONDENCE

\*Joanna Szczepańska  
Zakład Stomatologii  
Wieków Rozwojowego  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź  
tel.: +48 (42) 675-75-16  
joanna.szczepanska@umed.lodz.pl

## PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

1. Al-Mudallal NHA, Al-Jumaily EFA, Muhimen NAA, Al-Shaibany AA: Isolation and identification of *Mutans Streptococci* bacteria from human dental plaque samples. *JNUS* 2008; 11: 98-105.
2. Chandrabhan D, Hemlata R, Renu B, Pradeep V: Isolation of dental caries bacteria from dental plaque and effect of tooth pastes on acidogenic bacteria. *OJMM* 2012; 2: 65-69.
3. Marsh PD, Bradshaw DJ: Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995; 15: 169-175.
4. Forssen SD, Björklund M, Ouwehand AC: *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients* 2010; 2: 290-298.
5. Gębska A, Kędzia A, Kochańska B et al.: Effectiveness of incipient caries induction in microaerophilic and/or aerobic conditions using *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*. *In vitro* studies. *J Stoma* 2012; 65(3): 344-358.
6. Marczuk-Kolada G, Jakoniuk P, Łuczaj-Cepowicz E et al.: Liczba bakterii z rodzaju *Streptococcus* i *Lactobacillus* w ubytkach próchnicowych przed i po opracowaniu metodą chemo-mechaniczną z użyciem systemu Carisolv. *J Stoma* 2006; LIX(6): 380-387.
7. Szponar E, Ślebioda Z, Kieliszczuk W et al.: Stan jamy ustnej u młodych dorosłych bez chorób układowych a współwystępowanie *Candida*, *Lactobacillus* i *Streptococcus*. *Dent Forum* 2009; XXXVII(1): 39-44.
8. Wójtowicz A, Malm A: Mikrobiologiczne podłoże próchnicy w aspekcie jej profilaktyki. *Mikrobiol* 2009; 65(5): 327-330.
9. Barira I, Shahper NK, Asad UK: Dental caries: From infection to prevention. *Med Sci Monit* 2007; 13(11): 196-203.
10. Dąbrowska E, Balunowska M, Letko M et al.: Wpływ preparatów fluorkowych i chlorheksydynowych używanych do codziennej higieny na środowisko jamy ustnej. *Annales UMCS* 2005; LX(73): 333-336.
11. Sadatullah S, Mohamed NH, Razak FA: The antimicrobial effect of 0.1 ppm ozonated water on 24-hour plaque microorganisms *in situ*. *Braz Oral Res* 2012; 26(2): 126-131.
12. Gopalakrishnan S, Parthiban S: Ozone – a new revolution in dentistry. *J Bio Innov* 2012; 1(3): 58-69.
13. Kogut A: Ozonoterapia w praktyce stomatologicznej. *Mag Stomatol* 2007; 9: 112-118.
14. Stübinger S, Sader R, Filippi A: The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: A review. *Quintessence Int* 2006; 37: 353-359.
15. Skomro P: Współczesna diagnostyka laserowa w ocenie zaburzeń mineralizacji na powierzchniach gładkich zębów u pacjentów po leczeniu stałym aparatem ortodontycznym. *Implantoprotetyka* 2008; IX(4): 47-49.
16. Kaczmarek U: Aspekt bakteryjny próchnicy zębów mlecznych. *Dent Med Probl* 2004; 41(3): 509-514.
17. Strużycka I, Rucińska K, Radziejewska M: Wybrane metody oceny występowania bakterii z gatunku *Streptococcus mutans* w środowisku jamy ustnej. *Nowa Stomatol* 2001; 2: 11-14.
18. Manowiec J, Lisiecka K, Suszczewicz A: Wpływ programu profilaktycznego realizowanego u dzieci przedszkolnych na liczbę *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* w ślinie. *Dent Med Probl* 2003; 40(2): 281-286.
19. Proc P, Filipińska-Skapska R, Wochna-Sobańska M: Is a bacterial factor crucial in caries development of the youngest children? *Nowa Stomatol* 2004; 2: 51-55.
20. Hauser-Gerspach I, Pfäffli-Savtchenko V, Dähnhardt JE et al.: Comparison of the immediate effects of gaseous ozone and chlorhexidine gel on bacteria in cavitated carious lesion in children *in vivo*. *Clin Oral Invest* 2009; 13: 287-291.
21. Bay-san A, Beighton D: Assessment of the ozone-mediated killing of bacteria in infected dentine associated with non-cavitated occlusal carious lesions. *Caries Res* 2007; 41: 337-341.
22. Knight GM, McIntyre JM, Craig GG et al.: The inability of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* to form a biofilm *in vitro* on dentine pretreated with ozone. *Aust Dent J* 2008; 53: 349-353.
23. Klepacz J, Łęski M: Możliwości wykorzystania ozonu w endodoncji. *Dent Med Probl* 2008; 45(2): 194-198.
24. Schneider HG: Skuteczność zależy od tego, czy uda nam się pokonać bariery dyfuzji. *TPS* 2006; 4: 50-51.
25. Holmes J: Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology* 2003; 20: 106-114.
26. Płuciennik-Stronias M, Zarzycka B, Bołtacz-Rzepkowska E: Wpływ fluoryzacji kontaktowej szkliwa na wzrost bakterii płytki nazębnej. *Med Dośw Mikrobiol* 2013; 65: 129-132.
27. Zaura-Arite E, ten Cate JM: Effects of fluoride- and chlorhexidine-containing varnishes on plaque composition and on demineralization of dental grooves *in situ*. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 154-161.

### nadesłano/submitted:

27.01.2016

### zaakceptowano do druku/accepted:

12.02.2016