

بررسی مقایسه‌ای خاصیت ضد میکروبی سه نوع محلول شستشودهنده کانال ریشه بر انتروکوکوس فکالیس در شرایط *In vitro*

دکتر زهره آهنگری^۱، دکتر محمد سمعی^۲، دکتر محمدمین یلمه^۳، دکتر هدیه کوصدقی^۴
^۱دانشیار گروه اندودنتیکس، ^۲دستیار تخصصی اندودنتیکس، ^۳اندودنتیست، ^۴دندانپزشک، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی

مجله پزشکی هرمزگان سال سیزدهم شماره دوم تابستان ۸۸ صفحات ۹۵-۱۰۰

چکیده

مقدمه: یکی از مهمترین علل شکست درمانهای اندودنتیک باقی ماندن و یا ادامه رشد میکروارگانیسمها در سیستم پیچیده کانال ریشه و یا ناحیه پری رادیکلر می باشد. هدف از این مطالعه مقایسه خاصیت ضد میکروبی هیپوکلریت سدیم، کلرگزیدین کلوگونات و MTAD بر انتروکوکوس فکالیس در شرایط *in vitro* بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی هفتاد نمونه دندان انسان یک ریشه و تک کاناله انتخاب شدند. ابتدا با یک فایل متناسب با قطر کانال بقایای پالپی خارج و طول کانال تعیین گردید و پاکسازی شدند. سپس نمونه‌ها در داخل دستگاه اولترا سونیک و بعد از آن در اتوکلاو جهت استریل شدن قرار داده شدند. بعد از این مرحله کانال دندان‌ها به جز ۵ مورد که به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. از سوسپانسیون خالص سلول های انتروکوکوس در شرایط آسپتیک پر شدند. کلیه نمونه‌ها در دستگاه انکوباتور و در دمای ۳۷°C به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. بعد از این مرحله، به ترتیب یک میلی لیتر از محلولهای آزمایشی (MTAD, CHX 2, NaOCl 2.5%)، به وسیله سرنگ انسولین داخل کانال‌ها تزریق شده سپس نمونه‌ها در فلاسک‌های حاوی دو میلی لیتر از محلولهای فوق به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. برای بررسی میکروارگانیسم‌های مورد نظر از محیط کشت اختصاصی *Bile Sculin Agar* استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری به کمک نرم افزار SPSS از آزمون کروسکال-والیس استفاده شد.

نتایج: در گروه MTAD در یک نمونه (۵٪) باکتری رشد کرده بود. این میزان در گروه هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪، ۵ نمونه (۲۵٪) و در گروه مایع کلرگزیدین ۲٪، ۴ نمونه (۲۰٪) بود. مقادیر یاد شده با یکدیگر اختلاف آماری معنی داری نداشتند.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه *in vitro* هر سه محلول آزمایشی به طور قابل توجهی باعث از بین رفتن انتروکوکوس شدند ولی تفاوت معنی داری بین آنها وجود نداشت.

کلیدواژه‌ها: محلولهای شستشودهنده داخل کانال - انتروکوک فکالیس - MTAD - هیپوکلریت سدیم - کلرگزیدین

نویسنده مسئول:
دکتر زهره آهنگری
دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم
پزشکی شهیدبهشتی
تهران - ایران
تلفن: ۰۲۳۰۷۲۳۰۹۸
پست الکترونیکی:
zohrehahangari@gmail.com

دریافت مقاله: ۸۷/۳/۹ اصلاح نهایی: ۸۷/۹/۳ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۰/۲۲

مقدمه: بوضوح مشخص شده است که عفونتهای پالپ و پری اپیکال منشأ میکروبی دارند (۱).

در مطالعه‌ای که توسط Sundqvist و همکارانش انجام شد حضور *Entrococcus Faecalis* (EF) در ۳۸٪ از دندانهایی که درمان قبلی آنها با شکست مواجه شده بود، مشخص گردید. علاوه بر این، فقط ۳۳٪ از دندانهایی که در زمان پر کردن مجدد کانال حاوی EF بودند پس از درمان

یکی از مهمترین علل شکست درمانهای اندودنتیک باقی ماندن و یا ادامه رشد میکروارگانیسمها در سیستم پیچیده کانال ریشه و یا ناحیه پری رادیکلر می باشد و موفقیت درمان ریشه تا حد زیادی به حذف میکروارگانیسمها از سیستم کانال ریشه بستگی دارد. به عقیده محققین در مطالعات متعدد که در زمینه میکروبیولوژی اندودانتیکس

عاج که باعث آهسته رها شدن آن می‌شود، از خصوصیات بارز داکسی‌سایکلین است (۵).

پس از داروهای داخل کانال یکی از مهمترین مراحل کاهش و حذف میکروارگانیسم‌ها در طی درمان ریشه شستشوی کانال با عوامل مؤثر بر میکروارگانیسم است. بنابراین باید داروهای مناسب این مرحله از درمان را مطالعه و بهترین آنها را معرفی نمود. هدف از این مطالعه، بررسی مقایسه‌ای اثرات ضد میکروبی NaOCl ۲/۵٪، کلرهگزیدین ۲٪ و MTAD بر روی EF می‌باشد و امید بر این است که بتوانیم با استفاده از نتایج این تحقیق، اطلاعات بیشتری را در زمینه اثرات ضد میکروبی محلولهای شستشودهنده داخل کانال بدست آوریم تا میزان موفقیت درمانهای اندودونتیک را خصوصاً در دندانهای عفونی همراه با ضایعات پاتولوژیک انتهای ریشه افزایش داده و از صرف وقت و هزینه‌های درمان مجدد و جراحی‌های انتهای ریشه و نهایتاً از دست دادن دندانها و مشکلات متعاقب آن پیشگیری کنیم.

روش کار:

این مطالعه از نوع تجربی بوده و بر روی ۷۰ نمونه دندان انسان تک ریشه و تک کاناله شامل دندانهای قدامی فک بالا و پایین و پرمولرهای تک کاناله پایین سالم که بخاطر درمانهای پریو یا ارتودنسی خارج شده بودند، انجام شده است.

سطح خارجی ریشه دندانها بلافاصله پس از خارج شدن پاکسازی شده و کلیه بافت‌های چسبیده بر آن توسط کورت برداشته شده و جهت ضد عفونی شدن سطحی به مدت ۲۴ ساعت در NaOCl ۰/۵٪ قرار گرفتند (۶). سپس دندانها در داخل سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹٪ در حرارت اتاق تا زمان آزمایش نگهداری شدند (۷). ابتدا تاج دندانها از ناحیه CEJ با استفاده از فرز بلند استوانه‌ای الماسی و توربین تحت شستشوی فراوان آب بطور عمود بر محور طولی دندان قطع شدند بطوریکه طول ریشه‌ها بین ۱۸-۱۲ میلی‌متر قرار گرفتند، سپس با استفاده از فایل K شماره ۱۰ و ۱۵ از تک کاناله بودن ریشه و باز بودن میسر کانال اطمینان حاصل گردید (۸). در این مطالعه تمامی ریشه‌های موجود جهت کاهش متغیرهای مداخله‌گر با یک روش مشابه آماده‌سازی

مجدد با موفقیت همراه بوده‌اند، بنابراین EF یکی از علل مهم شکست درمانهای اندو می‌باشد و حضور آن در زمان پر کردن کانال به میزان قابل توجهی از میزان موفقیت درمان ریشه می‌کاهد. ظاهراً EF نسبت به داروهای داخل سیستم کانال ریشه بسیار مقاوم بوده و یکی از میکروارگانیسم‌هایی است که نسبت به خواص ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم از خود مقاومت نشان می‌دهد (۲) و بصورت تنها و بدون کمک سایر میکروارگانیسم‌ها در داخل کانال رشد می‌کند. از این رو مهمترین عوامل پایدار در بین علل شکست درمانهای اندودونتیک می‌باشد (۳).

داروهای داخل کانال مختلفی جهت تکمیل ضد عفونی کردن سیستم کانال ریشه ارائه شده‌اند که هر کدام معایب و مشکلاتی دارند که از آن جمله می‌توان به طیف ضد میکروبی محدود، غیرانتخابی برای سلولهای میزبان، عدم قابلیت نفوذ به داخل توبول‌های عاجی و خطرات آلرژی و ازدیاد حساسیت در بیماران اشاره کرد و به همین دلیل هنوز یک داروی داخل کانال ایده‌آل در دسترس نمی‌باشد (۴).

هیپوکلریت سدیم NaOCl یک ماده مرسوم برای شستشوی داخل کانال است و خواص ضدباکتریایی این ماده به واسطه وجود اسید هیپوکلرو می‌باشد. کلرهگزیدین (CHX) یک گوانید کاتیونیک وسیع‌الطیف است که بر روی باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی خواص ضد میکروبی دارد.

MTAD نسبت به سایر مواد شستشودهنده محلول جدیدی به شمار می‌رود. MTAD خواص ضدباکتری خود را حتی پس از ۲۰۰ بار رقیق شدن حفظ می‌کند. در حالیکه در مورد NaOCl، این خاصیت تنها تا ۳۲ بار رقیق شدن باقی می‌ماند. داکسی‌سایکلین موجود در MTAD می‌تواند مواد ارگانیک غیرارگانیک را از سطح ریشه بر دارد و به علت اتصال به یون کلسیم (chelating) تا مدت قابل توجهی اثر خود را حفظ می‌کند. وسعت عمل داکسی‌سایکلین در کنار اسید سیتریک و Tween 80 (پلی سوربات) که یک دترژانت است و سبب کاهش کشش سطحی می‌شود، گسترش می‌یابد. PH پایین (کمتر از ۳) فعالیت ضد کلاژنار و توانایی اتصال به

شدند، ابتدا با یک فایل هیدستروم متناسب با قطر کانال بقایای پالپی و دبری‌ها از درون کانال بیرون آورده سپس یک فایل ۱۵ یا ۲۰ وارد کانال گردیده تا نوک آن در سوراخ انتهایی ریشه مشاهده شود، بعد طول کارکرد یک میلی‌متر کوتاه‌تر از طول بدست آمده تعیین و ثبت شد (۵).

برای پاکسازی و شکل‌دهی کانالهای دندانها از روش Passive step back (فرزهای GG و فایل‌های دستی) و وسایل روتاری (فایلهای روتاری Flex-master ۴٪) استفاده گردید، سپس تمامی کانالها بوسیله فایل دستی k شماره ۳۵ به عنوان Master Apical file به طول کارکرد تعیین و ضمناً عمل recapitulation و شستشو با NaOCl ۰/۵٪ در بین بکارگیری فایل‌ها انجام شده و در پایان شکل‌دهی و پاکسازی با ۵cc از سرم فیزیولوژی استریل کامل گردید (۹،۸).

بدنبال آماده‌سازی کانالها به منظور جلوگیری از ریزش باکتریای انتهایی تمامی نمونه‌ها توسط چسبهای سیانوآکریلات سیل شدند (۱۰،۱۱)

به منظور برداشتن کامل لایه اسمیر نمونه‌ها در داخل یک ظرف اولتراسونیک (ultrasonic Bath, Vector 55, Jelfraft, JELENKO) قرار گرفتند و در ابتدا داخل EDTA ۱۷٪ به مدت ۱۰ دقیقه و بدنبال آن در هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه و نهایتاً در آب مقطر استریل به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند (۱۰،۱۲)

برای استریل کردن نمونه‌ها آنها را در داخل لوله‌های آزمایش درپوش‌دار حاوی آب‌گوش (BHI) قرار داده، سپس در داخل اتوکلاو در حرارت ۱۲۱°C و در فشار PS.I ۱۵ به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. از این مرحله به بعد کلیه دستکاری‌ها و جابجایی نمونه‌ها تحت شرایط آسپیتک و با استفاده از وسایل و ابزار استریل صورت گرفت (۸،۱۳).

برای ایجاد عفونت کنترل شده و استاندارد، سوسپانسیون خالص سلولهای EF در شرایط آسپیتک بوسیله سرنگهای استریل انسولین به داخل کانالهای دندانی تزریق گردید، بطوریکه کانال از سوسپانسیون پر شود، نمونه‌ها بطور جداگانه در داخل فلاسکهای مخصوص حاوی ۲ cc BHI که قبلاً استریل شده بودند، قرار داده شدند (۱۴).

از کل نمونه‌ها، پنج نمونه به عنوان کنترل منفی دست نخورده و بدون تزریق باکتری باقی ماند تا صحت استریلیزاسیون و تکنیک کار آزمایشگاه را از نظر عدم آلودگی‌های میکروبی ناخواسته تأیید نماید بعد از این مرحله کلیه نمونه‌ها در داخل فلاسکهای مخصوص در دستگاه انکوباتور در دمای ۳۷°C به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. در طی این مدت تمامی نمونه‌ها تحت کنترل بودند (۱۵).

پس از اتمام دوره انکوباسیون همه نمونه‌ها بطور جداگانه تحت شرایط آسپیتک از داخل فلاسکها خارج شدند، سپس هر نمونه در یک لوله آزمایش حاوی ۳cc سرم فیزیولوژی استریل غوطه‌ور شده و سه مرتبه برای مدت ۲۰ ثانیه بر روی دستگاه Rotator تکان داده شد تا اضافات محیط کشت از روی نمونه‌ها پاک شود. همچنین تعداد زیادی از باکتریهای موجود بر سطح خارجی نمونه‌ها نیز در اثر شستشو جدا و خارج گردید (۱۶).

با مطالعه SEM که بر روی دو عدد از نمونه‌ها انجام شد، میکروارگانیزمها در توبول‌های عاجی مشخص گردید. بعد از این مرحله، محلولهای شستشودهنده مختلف آزمایشی (۲٪ CHX, MTAD, ۲/۵٪ NaOCl) بر روی نمونه‌ها به کار گرفته شدند. برای این کار در گروه اول به هر نمونه آلوده یک میلی‌لیتر از محلول MTAD از طریق سرنگهای مخصوص تولید کمپانی داخل کانال تزریق شد. پس هر نمونه داخل فلاسک‌های مخصوص محتوی دو میلی‌لیتر از محلول MTAD به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند (۵،۱۳).

در نمونه‌های گروه دوم و سوم نیز به ترتیب ۱cc از محلول ۲٪ CHX و ۲/۵٪ NaOCl داخل کانال بوسیله سرنگهای انسولین تزریق و سپس نمونه‌ها در فلاسکهای حاوی ۲cc از محلولهای فوق بمدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. در گروه کنترل مثبت نیز نمونه‌ها به طریقه مشابهی در مجاورت سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹٪ قرار گرفتند و نمونه‌های کنترل منفی که میکروارگانیزمی در آنها تلقیح نشده و استریل مانده بودند، تحت تأثیر هیچ محلولی قرار داده نشدند. پس از طی مدت زمان مورد نظر، محلولهای مورد آزمایش از فلاسکها خارج شده و هر نمونه دندانی سه بار و هر بار با ۳cc از محلول سرم فیزیولوژی استریل و با

Rotator شستشو دادند تا کاملاً محلولهای شستشودهنده از روی نمونه‌ها پاک شود، کارایی این روش توسط Safavi در سال ۱۹۹۰ نشان داده شده است (۸،۱۶). سپس از نمونه‌های دندان‌ی موجود در هر سه گروه و به علاوه گروه کنترل مثبت و منفی بصورت جداگانه برای هر نمونه و در شرایطی آسپتیک توسط فایل هدستروم شماره ۴۰ نمونه‌برداری از کانالها انجام و به لوله‌های آزمایش حاوی BHI منتقل شد و در انکوباتور و دمای ۳۷°C به مدت ۹۶ ساعت نگهداری شدند (۱۳).

برای ارزیابی باکتریولوژیکی محیطهای کشت و تعیین حضور و تعداد میکروارگانیسم‌های موردنظر و تعیین اندازه تعداد واقعی آنها در داخل محیط کشت مایع و مشاهده دقیق کولونیهای مربوطه پس از گذشت مدت زمان موردنظر لوله‌ها از انکوباتور خارج شدند. ضد عفونی کامل بوسیله عدم وجود کدورت در لوله‌ها و نمونه‌هایی که کدورت را نشان دادند در گروه عفونی قرار داده شدند. برای اثبات حضور میکروارگانیسم‌های هدف و اندازه‌گیری تعداد واقعی آنها در داخل محیط کشت از نمونه‌های عفونی بالوپ پلاتینیوم ۰/۰۰۱ استاندارد برداشته و روی محیط کشت Bile Esculin Agar که محیط ویژه و اختصاصی برای رشد EF می‌باشد، کشت داده شدند (۱۶). سپس پلیت‌ها جهت رشد باکتری به انکوباتور CO₂ منتقل و پس از ۲۴ ساعت خارج و جهت اطلاع از حضور باکتری و میزان واحدهای سازنده کلونی آن مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین داده‌ها از آزمون آماری Chi-Square و نرم‌افزار SPSS استفاده شد. از آنجا که در تمام موارد کولونی‌های شمارش شده مساوی یا بالغ بر ۱۰^۵ CFU/ML بودند، تحلیل کمی انجام نشد.

نتایج:

هر ۵ نمونه گروه شاهد مثبت رشد باکتری را نشان داده بودند و در مقابل هیچ کدام از نمونه‌های گروه شاهد منفی نشانه‌ای از رشد باکتری را نداشتند. در هر سه گروه مورد، نمونه‌هایی از رشد باکتری وجود داشت که به شرح زیر می‌باشد: در گروه MTAD در یک نمونه

(۵٪) باکتری رشد کرده بود. این میزان در گروه هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪، ۵ نمونه (۲۵٪) و در گروه مایع کلرهگزیدین ۲٪، ۴ نمونه (۲۰٪) بود. نتایج نشان داد که از نظر آماری مقادیر یاد شده با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. ضمناً در تمام موارد کشت مثبت شماره کولونی‌ها بالاتر یا مساوی ۱۰^۵ CFU/ML بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری:

یک ماده شستشودهنده ایده‌آل برای داخل کانال دندان باید بتواند عاج و توبولهای عاجی را در نخستین جلسه درمان ضد عفونی کرده و اثر ضد میکروبی را تا مدتی پس از مصرف حفظ نماید (۱۷).

EF بدین خاطر برای این مطالعه انتخاب شد که یکی از مقاوم‌ترین باکتری‌های داخل کانال ریشه در مقابله با ریشه‌کنی با مواد ضد عفونی‌کننده است (۱۸).

گشاد کردن کانال تا فایل شماره ۳۵ نیز کمک کردند تا نفوذ بهتری از مواد مورد استفاده حاصل شود و نرسیدن مواد به انتهای کانال به مفهوم نقصان فعالیت ضد میکروبی دانسته نشود. مدت زمان مواجهه با مواد شستشودهنده نیز بر اساس مطالعات Gomes، ترابی‌نژاد و شباهنگ و ترابی‌نژاد انتخاب شد (۵، ۱۷، ۱۹). مدت زمان ۴ هفته برای رشد باکتری نیز بر اساس مطالعه شباهنگ و ترابی‌نژاد انتخاب گردید (۵). برداشت نمونه از دیواره کانال با فایل هداستروم به این منظور انجام شد که نمونه‌ها از توبولهای عاجی باشد زیرا این کار نفوذ مواد به داخل توبولها را نیز ارزیابی می‌کند.

هیپوکلریت سدیم (NaOCL) یک ماده مرسوم برای شستشوی داخل کانال است و خواص ضدباکتریایی این ماده به واسطه وجود اسید هیپوکلرو می‌باشد (۲۰).

Sjogren و همکارانش نشان دادند که حدود ۴۰٪ کانالها پس از دبریمان با NaOCL ۰/۵٪ آلوده باقی می‌مانند (۲۱). بر اساس مطالعه Shuping و همکارانش (۲۰۰) تا ۳۰٪ کانالها پس از شستشو با NaOCL ۱/۲۵٪ آلوده می‌باشند (۲۲). حتی Siqueira و همکارانش نشان دادند که میزان آلودگی پس از استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۴۰٪ نیز بالا (حدود

ضدباکتری خود را حتی پس از ۲۰۰ بار رقیق شدن حفظ می‌کند در حالی که در مورد NaOCL این خاصیت تنها تا ۳۲ بار رقیق شدن باقی می‌ماند (۱۷). داکسی‌سالیکیلین موجود در MTAD می‌تواند مواد ارگانیک غیرارگانیک را از سطح رشیه بردارد و به علت اتصال به یون کلسیم (chelating) تا مدت قابل توجهی اثر خود را حفظ می‌کند. وسعت عمل داکسی‌سالیکیلین در کنار اسید سیتریک و Tween 80 (پلی‌سوربات) که یک دترژانت است و سبب کاهش کشش سطحی می‌شود، گسترش می‌یابد (۱۳). PH پایین (کمتر از ۳) فعالیت ضدکلاژنار و توانایی اتصال به عاج که باعث آهسته رها شدن آن می‌شود، از خصوصیات بارز داکسی‌سالیکیلین است (۵).

ترابی‌نژاد و همکارانش تفاوتی در اثر ضد میکروبی MTAD و هیپوکلریت سدیم ۵٪ بر روی EF مشاهده نکردند (۱۷). Portenier و همکارانش نشان دادند که اثر MTAD و کلرهگزیدین ۲٪ بر از بین بردن EF با هم تفاوت معنی‌داری ندارد (۲۸). این یافته‌ها با نتایج مطالعه ما نیز همخوانی دارند. محدودیت‌های پژوهش، در زمان انجام بررسی تهیه MTAD از طریق مسافر و با مشکلات زیادی انجام شد. بر اساس نتایج این مطالعه *in vitro* هر سه محلول آزمایشی به طور قابل توجهی باعث از بین رفتن *E. faecalis* شدند، ولی تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود نداشت.

۳۰٪ تا ۴۰٪) می‌باشد (۲۳). با این حال بر اساس کتاب والتون و ترابی‌نژاد، مطلوبترین غلظت NaOCL برای مصارف بالینی ۲/۵٪ است (۹) و به همین دلیل ما نیز به این بررسی از این غلظت استفاده کردیم، در مطالعه ما این ماده با غلظت یاد شده در ۷۵٪ موارد مانع رشد باکتری EF شده بود.

کلرهگزیدین (CHX) یک بیس گوانید کاتیونیک وسیع‌الطیف است که بر روی باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی خواص ضد میکروبی دارد (۱۲،۲۰). برخلاف CHX NaOCL (با غلظت ۲٪ هم به صورت ژل و هم به صورت مایع) اثر خود را تا مدتی پس از مصرف حفظ می‌کند (Residual effect or substantivity) ولی قادر به حل کردن بافت نیست (۱۰،۱۲،۲۴). بر اساس نظر Schafer و Bossmann، غلظت ۲٪ CHX نسبت به غلظتهای پایین‌تر مؤثرتر است و در زمان کوتاه‌تری اثر خود را نشان می‌دهد و تأثیر بسیار مناسبی بر روی EF دارد (۲۵). در این مطالعه نیز از این غلظت استفاده کردیم.

Ercan و همکارانش نیز نشان دادند که CHX ۲٪ در ۸۰٪ نمونه‌ها از رشد EF ممانعت می‌کند (۲۶). که در این مطالعه نیز به این نتیجه دست یافتیم.

MTAD نسبت به سایر مواد شستشودهنده محلول جدیدی به شمار می‌رود. این ماده در مقایسه با EDTA لایه اسمیر را با اروژن کمتری بر می‌دارد (۸،۲۷) و بر خلاف آن قادر است EF را در مدت زمان ۵-۲ دقیقه از بین ببرد. MTAD خواص

References

منابع

- Berutti E, Marini R. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod.* 1997;23:727-728.
- Sundqvist G. Taxonomy, Ecology and Pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78:522-530.
- Cohen S, Burns RG. Pathways of the pulp. 8th ed. USA mosby;2006.
- Bufflier p, suchett-kaye G. In vitro evaluation of the antibacterial effects of intracanal microplasma system treatment. *J Endod.* 1997;23:28-31.
- Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on Enterococcus faecalis-contaminated root canals of extracted teeth. *J Endod.* 2003;29:576-579
- Almyroudi A, Mackenzie D, Mcitugh S, Saunders WP. The Effectiveness of various Disinfectants used as endodontic intracanal medications: An in vitro study. *J Endod.* 2002;28:163-167.
- Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, Mcpherson JC. In vitro antimicrobial activity of various medication preparations on E. faecalis in root canal dentin. *J Endod.* 2003;29:187-190.

8. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod.* 2003;29:170-175.
9. Walton RE, Torabinejad M. Principles and practice of endodontics. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders company; 2002.
10. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes B, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99:768-772.
11. Oncag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J.* 2003;36:423-432.
12. Ferraz CCR, Gomes B, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001;27:452-457.
13. Shabahang S, Poursmail M, Torabinejad M. In vitro antimicrobial efficacy of MTAD and sodium hypochlorite. *J Endod.* 2003;29:450-453.
14. Siqueira JF, Rogas IN, Santos LD, Lima KC, Magalhaes AC, Uzeda MD. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod.* 2002;28:181-184.
15. Sen BH, Wesselink PR, Turkun M. The smear layer: A phenomenon in root canal therapy. *Int Endod J.* 1995;28:141-148.
16. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6:142-149.
17. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD an in vitro investigation. *J Endod.* 2003;29:400-403.
18. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:86-93.
19. Gomes B, Ferraz CCR, Viana ME, Berber VB, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001;34:424-428.
20. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil LM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics.* 2005;10:77-102.
21. Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997;30:297-306.
22. Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod.* 2000;26:751-755.
23. Siqueira JF, Machado AG, Silveira RM, Lopez HP, Deuzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite with three irrigation methods in the elimination of the *Enterococcus faecalis* from the root canal: In vitro study. *Int Endod J.* 1997;30:279-282.
24. Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mncini MNG. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J.* 2004;37:311-319.
25. Schafer E, Bossmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2005;31: 53-56.
26. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gui K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: In vivo study. *J Endod.* 2004;30: 84-87.
27. Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S. The effects of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. *J Endod.* 2003;29:233-239.
28. Portenier I, Waltimo T, Orstavik T, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* MTAD and chlorhexidine gluconate with or without Cetrimide in the presence or absence of dentin power or BSA. *J Endod.* 2006;32:138-141.