

مقایسه تأثیر ترکیب مواد مختلف با هیدروکسید کلسیم بر خاصیت ضد میکروبی آن "در شرایط آزمایشگاهی"

دکتر معصومه دیباج ** دکتر زهره خلیفک ** دکتر حسین رستگاریان *** دکتر هنگامه اخوان ** دکتر دنا کلاتری ****

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت بکارگیری مواد ضد میکروبی در درمانهای اندودانتیکس و خاصیت ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم و اینکه این ماده با مواد واسطه ای ترکیب و بکار گرفته میشود و نظر به اینکه تأثیر این مواد واسطه ای همراه هیدروکسید کلسیم متفاوت گزارش شده، علیهذا به منظور مقایسه تأثیر ضد میکروبی سه ماده کلرهگزیدین، زایلوکائین و نرمال سالین توام با هیدروکسید کلسیم این تحقیق انجام گرفت.

مواد و روش ها: این تحقیق به روش تجربی و در شرایط (in vitro) انجام گرفت. تعداد ۲۰ پلیت حاوی آگار خونی آماده گردید. در هر پلیت ۵ حفره ایجاد شد. در ۳ حفره خمیرهای مورد آزمایش شامل پودر هیدروکسید کلسیم با سه ماده کلرهگزیدین، نرمال سالین و زایلوکائین قرار داده شد. در دو حفره دیگر آمپی سیلین و آب مقطر بعنوان شاهد مثبت و منفی قرار داده شد. پلیت ها به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق و سپس ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. فعالیت ضد میکروبی با روش ADT بر روی پلیت های حاوی آگار خونی که به سوسپانسیون خالص انتروکوک فکالیس آغشته بودند، مشخص شد. پس از ۴۸ ساعت قطر مناطق مهار میکروبی اندازه گیری شد. جهت تحلیل یافته ها، از روش آماری ANOVA و LSD استفاده شد.

یافته ها: تحقیق روی ۲۰ پلیت و تعداد ۱۰۰ حفره انجام گرفت. در همه پلیت ها در هر ۳ گروه تجربی و آمپی سیلین، مهار میکروبی دیده شد. میزان قطر مهار میکروبی در گروه شاهد مثبت (آمپی سیلین) برابر ۱۱ میلی متر و از همه گروهها بیشتر بود. گروه شاهد منفی (آب مقطر) در هیچکدام از محیط های کشت، مهار میکروبی ایجاد نکرد. میزان مهار با واسطه کلرهگزیدین برابر $0/92 \pm 7/61$ و با نرمال سالین برابر $1/12 \pm 5/69$ و در گروه زایلوکائین برابر $1/7 \pm 5/32$ میلیمتر بود ($P < 0/05$). گروه هیدروکسید کلسیم/کلرهگزیدین از دو گروه دیگر مهار میکروبی بیشتری ایجاد کرد ($P < 0/05$). هیدروکسید کلسیم/نرمال سالین و هیدروکسید کلسیم/زایلوکائین تأثیر مشابه داشتند ($P < 0/4$).

نتیجه گیری: به نظر میرسد کلرهگزیدین واسطه مناسب تری نسبت به زایلوکائین و نرمال سالین در جهت افزایش فعالیت ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم باشد.

کلید واژه ها: هیدروکسید کلسیم، مواد واسطه ای، کلرهگزیدین، زایلوکائین، اثر ضد میکروبی، روش ADT، داروی داخل کانال

وصول مقاله: ۸۷/۷/۱۳ اصلاح نهایی: ۸۷/۱۰/۲۸ پذیرش مقاله: ۸۸/۱/۲۲

Email: dibaj3000@yahoo.com

مقدمه

هستند به ۳ دسته آبکی، ویسکوز و چرب تقسیم می شوند (۶). در اکثر مراکز دندانپزشکی، آب مقطر یا سالین شایعترین واسطه هایی هستند که مصرف می شوند (۷). از آنجاییکه هیدروکسید کلسیم به علت خاصیت قلیایی قوی حداقل تأثیر را از اسیدها می پذیرد، محلولهای بی حسی با وجود PH اسیدی، ماده مناسبی برای ترکیب با هیدروکسید کلسیم هستند (۸). ماده دیگر کلرهگزیدین ۲٪ است که با بافتهای پری اپیکال سازگار بوده و دارای طیف ضد میکروبی وسیع همراه با مدت زمان تأثیر طولانی است و در توبولهای عاجی منتشر می شود (۷).

Gomes و همکارانش نشان دادند که نوع واسطه بکار رفته، اثر ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم را تحت تأثیر قرار می

هیدروکسید کلسیم اولین بار در سال ۱۹۲۰ توسط Hermann بعنوان ماده pulp cap معرفی شد. سپس استفاده از آن رو به فزونی گذاشت و امروزه یکی از بحث انگیزترین داروها در دندانپزشکی به عنوان داروی داخل کانال می باشد (۱). از خصوصیات بارز این ماده میتوان به اثر ضد میکروبی (۲) تحریک و معدنی شدن بافت (۳ و ۴) و تجزیه کنندگی بافتی اشاره نمود (۲). این ماده عموماً خواص مطلوب خود را مدیون PH قلیایی (۱۲/۵) خود است (۵). طبق نظر Fava و Saunders واسطه ها (Vehicles) مهمترین نقش را در عمل بیولوژیک هیدروکسید کلسیم دارند که با سرعت تجزیه یونی Ca^{2+} و $-OH$ - سنجیده میشود (۶). مواد واسطه ای که در ترکیب با هیدروکسید کلسیم به منظور تغییر خواص آن مطرح

تحقیق روی ۱۰۰ حفره انجام گرفت. در سه حفره خمیرهای هیدروکسید کلسیم مورد آزمایش و در دو حفره دیگر، در یکی آمپی سیلین (۲/۵ در صد) کارخانه سبحان، تهران، ایران) و در دیگری آب مقطر ریخته شد. تمامی پلیت ها ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق قرار داده شدند تا مواد از طریق آگار منتشر شوند و سپس به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO₂ در اتمسفر ۱۰ در صد نگهداری شدند.

بعد از ۴۸ ساعت منطقه مهار رشد میکروبی در اطراف حفره حاوی مواد مورد آزمایش از کوتاهترین فاصله از حاشیه حفره های حاوی مواد مورد آزمایش تا منطقه اولیه رشد میکروبی بوسیله کولیس اندازه گیری شد. در ضمن جهت تأیید وجود میکروارگانیزم مورد آزمایش در محیط کشت آگار خونی، از روش کشت مجدد بر روی محیط آگار استفاده شد (subculture). بدین منظور ۰/۱ ml از محیط کشت حاوی میکروب با استفاده از لوپ استاندارد استریل برداشت و بر روی ظرف آگار خونی کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت کلونی های *Enterococcus Faecalis* مورد بررسی قرار گرفت.

خاصیت ضد میکروبی هر یک از سه خمیر هیدروکسید کلسیم مشخص و ضریب تغییرات (C.V) محاسبه و اختلاف سه گروه با آماره ANOVA مورد قضاوت آماری قرار گرفت و در صورت وجود اختلاف با آزمون LSD مقایسات چندگانه نیز انجام گرفت.

یافته ها

تحقیق روی تعداد ۲۰ نمونه برای هر گروه انواع مواد واسطه ای با هیدروکسید کلسیم و جمعاً روی تعداد ۶۰ نمونه انجام گرفت. ضمناً ۲۰ نمونه شاهد مثبت و ۲۰ نمونه شاهد منفی نیز بررسی شدند.

در تمام گروه ها بجز شاهد منفی (آب مقطر)، مناطق مهار رشد میکروبی بر روی محیط های کشت میکروبی دیده شد. میزان مهار میکروبی ایجاد شده در گروه شاهد مثبت (آمپی سیلین) ۱۱ میلیمتر بود. خاصیت ضد میکروبی خمیرها در جدول شماره ۱ ارائه گردیده است و نشان میدهد که در گروه هیدروکسید کلسیم/کلر هگزیدین منطقه مهار میکروبی برابر ۰/۹۲ ± ۷/۶۱ میلیمتر و از حداقل ۵/۸ تا حداکثر ۹/۲ میلیمتر متفاوت بود و ضریب تغییرات آن ۱۲ بود. این منطقه در گروه هیدروکسید کلسیم/نرمال سالین برابر ۱/۱۲ ± ۵/۶۹ میلیمتر و از حداقل ۳ تا ۷/۸ میلیمتر و ضریب تغییرات آن ۲۰ بود. وبالاخره در گروه هیدروکسید کلسیم با زایلوکائین برابر ۱/۷ ± ۵/۳۲ میلیمتر و از حداقل ۱/۷ تا ۷ میلیمتر و ضریب تغییرات آن ۳۲ بود.

با توجه به اینکه متغیر کمی پیوسته بود و نیز آزمون کلموگراف-اسمیرنوف (Kolmogrove-Smirnove) نشان داد که میزان ضد میکروبی گروهها دارای توزیع نرمال بودند از آزمون ANOVA استفاده شد و آزمون نشان داد که اختلاف سه گروه به لحاظ آماری معنی دار است (P < ۰/۰۵).

دهد و هیدروکسید کلسیم به همراه ترکیبات روغنی، ناحیه مهار میکروبی بزرگتری را در مقایسه با ترکیبات محلول نشان می دهند (۷).

Estrela و همکارانش اثر ضد میکروبی خمیر هیدروکسید کلسیم را به همراه سه واسطه یعنی سالین، پلی اتیلن گلیکول و Camphorated paramonochloro phenol بررسی کردند و نشان دادند که تأثیر هیدروکسید کلسیم/سالین بیشتر از سایر خمیرها بود. وی همچنین نشان داد که اتر و کوکوس فکالیس در اثر تماس مستقیم با هیدروکسید کلسیم در سالین در مدت یک ساعت از بین رفت (۹). همچنین خاصیت درمانی هیدروکسید کلسیم ممکن است با ترکیب با کلر هگزیدین و یا دید پتاسیم تقویت شود (۱۰). برخی مطالعات دیگر کفایت ناکافی هیدروکسید کلسیم را در حذف اتر و کوکوس ها نشان دادند بطوریکه در مقابل PH بالا مقاومت کردند (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳). به هر حال اتفاق نظر کاملی در رابطه با اثر ضد میکروبی این ماده به همراه واسطه های مختلف وجود ندارد.

لذا این تحقیق بر مبنای مقایسه اثر ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم با سه واسطه نرمال سالین، زایلوکائین و کلر هگزیدین و شناسایی مؤثرترین خمیر هیدروکسید کلسیم با قابلیت ضد میکروبی در آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان نیروی دریایی در سال ۱۳۸۴ انجام گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق با طراحی تجربی (Experimental) در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) انجام گرفت. خمیرهای هیدروکسید کلسیم با قوام خمیری مشابه شرایط کلینیکی تهیه شد. برای اینکار ۰/۱ گرم پودر هیدروکسید کلسیم (Merk, Damstadt, Germany) با ۴ ml نرمال سالین، کلر هگزیدین (شرکت لابراتوارهای شهر دارو، تهران، ایران) و زایلوکائین ۲٪ + اپی نفرین ۱/۸۰۰۰۰ (شرکت کارخانه جات دارویش، تهران، ایران) بطور جداگانه مخلوط شدند، بطوریکه سه خمیر با قوام مشابه بدست آمد. میکروارگانیزم مورد آزمایش در این تحقیق، یک باکتری بیهوازی اختیاری بنام *Enterococcus Faecalis* بود که از آزمایشگاه بیمارستان نیروی دریایی تهیه شد. سوش های میکروبی بطور اختصاصی داخل لوله هایی که شامل ۵ ml نرمال سالین بود، تلقیح شدند. سوسپانسیون میکروبی به روش اسپکترو فتومتری برای یکی شدن غلظت میکروب در لوله های آزمایش با مقیاس ۰/۵ مک فارلند، استفاده شد.

در این مطالعه از روش ADT (Agar Diffusion Test) جهت بررسی اثر ضد میکروبی خمیرهای مورد آزمایش هیدروکسید کلسیم استفاده شد. تعداد ۲۰ پلیت حاوی آگار خونی تهیه شد. سپس با سواب استریل از سوسپانسیون، نمونه میکروبی برداشته و به روی پلیت ها منتقل شد (۹). درون هر پلیت ۵ حفره توسط پانچ ایجاد شد. به این ترتیب

جدول شماره ۱: قطر مهار میکروبی بر حسب نوع ماده واسطه ای با هیدروکسید کلسیم (تعداد نمونه هر گروه ۲۰)

قطر مهار میکروبی		
مواد واسطه ای با هیدروکسید کلسیم	میزان	ضریب تغییرات
کلرگزیدین	$7/61 \pm 0/92$	۱۲
نرمال سالین	$5/69 \pm 1/12$	۲۰
زایلوکائین	$5/32 \pm 1/7$	۳۲

خاصیت ضد میکروبی در گروه کلرگزیدین به میزان $1/92$ میلیمتر یا حدود $25/2$ درصد از گروه نرمال سالین بیشتر بود و آزمون LSD نشان داد که این اختلاف به لحاظ آماری معنی دار است ($P < 0/001$) و خاصیت ضد میکروبی در گروه زایلوکائین به میزان $2/29$ میلیمتر یا حدود 30 درصد کمتر از گروه کلرگزیدین بود و این اختلاف به لحاظ آماری معنی دار بود ($P < 0/001$). خاصیت ضد میکروبی نرمال سالین و زایلوکائین به لحاظ آماری معنی دار نبود ($P < 0/4$). ضمناً همگنی تأثیر در واسطه کلرگزیدین (12) خیلی بیشتر از همگنی تأثیر واسطه نرمال سالین (20) و همگنی تأثیر واسطه زایلوکائین (32) بود.

بحث

تحقیق نشان داد که ترکیب هیدروکسید کلسیم/کلرگزیدین از نظر وسعت منطقه مهار میکروبی، تفاوت معنی داری با هیدروکسید کلسیم/نرمال سالین و هیدروکسید کلسیم/زایلوکائین داشت. اما هیدروکسید کلسیم/نرمال سالین تفاوت معنی داری با هیدروکسید کلسیم/زایلوکائین نداشت.

نتیجه مطالعه حاضر در زمینه خاصیت ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم/کلرگزیدین با تحقیق Lin و همکارانش (2003) هماهنگی دارد. در تحقیق Lin به بررسی اثر ضد میکروبی خمیرهای مختلف هیدروکسید کلسیم/کلرگزیدین و ترکیب آنها بر روی انتروکوکوس فکالیس پرداخته شد و مشخص شد که اثر ضد میکروبی Predix $0/12$ درصد و ترکیب هیدروکسید کلسیم و Predix $0/12$ درصد، اثر مهاری بیشتری از Pulpdent/Steril water و پودر هیدروکسید کلسیم / Steril water داشتند. در این مطالعه نیز خمیر حاصل از ترکیب پودر هیدروکسید کلسیم/کلرگزیدین 2 درصد اثر

ضد میکروبی بیشتری از ترکیب این پودر با نرمال سالین و زایلوکائین نشان داد (14).

بخشی از نتایج تحقیق حاضر با تحقیقات Estrela (2001) ، Gomes (2002) ، Molander (2003) همخوانی دارد. زیرا این محققین در مجموع به خاصیت ضد باکتریال هیدروکسید کلسیم اشاره کرده اند ($7,9,15$). اما در تحقیق Estrela و همکارانش تأثیر هیدروکسید کلسیم/سالین بیش از سایر ترکیبات بود (9). Gomes و همکارانش در سال 2002 به مقایسه اثر ضد میکروبی خمیرهای هیدروکسید کلسیم در مقابل میکروبهای مختلف پرداختند و ترکیب هیدروکسید کلسیم / CMCP + گلیسرین را در حذف باکتریها مؤثرتر شناختند و خواص ضدباکتریال سالین و داروی بی حسی در ترکیب با هیدروکسید کلسیم را نزدیک به هم پیدا کردند (7)، که قسمتی از این نتیجه گیری نیز مشابه تحقیق ما است، زیرا در تحقیق ما نیز تفاوت معنی داری بین اثر ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم/نرمال سالین و هیدروکسید کلسیم/زایلوکائین پیدا نشد ولی باید پذیرفت که اگر چه در تحقیق Gomes و همکارانش CMCP و گلیسرین در حذف باکتریها مؤثرتر شناخته شد، اما اثرات محرک این ترکیب روی نسوج پری آپیکال به اثبات رسیده است. لذا در این تحقیق سعی شد که از ترکیباتی استفاده شود که محرک انساج پری آپیکال نباشد.

همچنین تحقیق ما مجدداً تأیید کرد که نوع واسطه استفاده شده بر قدرت ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم اثر می گذارد. این تحقیق با نظر Fava و Saunders که به نقش موثر واسطه ها در عمل هیدروکسید کلسیم اشاره می کند نیز همخوانی دارد (6). باید در نظر گرفت که تفاوت ویسکوزیته، خاصیت اسیدی-بازی و میزان حلالیت مواد واسطه ای و اثر آنها روی تجزیه یونی میتواند روی خواص هیدروکسید کلسیم اثر بگذارد. مواد واسطه ای که در ترکیب با هیدروکسید کلسیم مطرح هستند به سه دسته آبکی، ویسکوز و چرب تقسیم می شوند (6). بر اساس مطالعات Fava و همکارانش ترکیبات آبکی (Aqueous) مواد مناسب تری برای ترکیب با هیدروکسید کلسیم شناخته شده اند (6). لذا در این تحقیق نیز از سه ماده کلرگزیدین، نرمال سالین و زایلوکائین استفاده شد که هر سه جزو مواد واسطه ای آبکی تقسیم بندی می شوند. کاربرد اصلی کلرگزیدین در اندودنتیکس به عنوان یک ماده شوینده کانال می باشد. این ماده با وجود طیف ضد میکروبی وسیع همراه با مدت زمان تأثیر طولانی (ساعتها) فاقد اثرات توكسیك می باشد (14). از طرفی زایلوکائین به عنوان بی حسی دهنده موضعی، جزو نمکهای اسیدی محسوب می شود (10). اگر چه این ماده PH پایین دارد ولی دانشمندان معتقدند به دلیل PH قوی هیدروکسید کلسیم PH آن با زایلوکائین دچار تغییرات مختصری می شود (8).

در این مطالعه ترکیب هیدروکسید کلسیم با کلرگزیدین بیشترین اثر ضد میکروبی بر روی انتروکوکوس فکالیس که یکی از مقاومترین باکتریهای داخل کانال است، را داشت. Sandquist

انجام میدهد و نشان میدهد که آیا درمان، پتانسیل حذف باکتریها از سیستم داخل کانال را دارد یا خیر؟ اگر چه اثر باکتریوسیدی یا باکتریو استاتیکی را مشخص نمی کند (۷).

بطور کلی این مطالعه برخی اطلاعات در مورد اثرات ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم در ترکیب با مواد مختلف را مجدداً ثابت کرد و اطلاعات جدیدی هم در مورد حساسیت *Enterococcus Faecalis* در مقابل اثر ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم در ترکیب با کلرگزیدین، نرمال سالین و زیلوکابین را ارائه داد. بنظر می رسد که نوع ماده واسطه ای استفاده شده بر قدرت انتشار و فعالیت ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم تأثیر میگذارد.

با توجه به خصوصیات بارز و کاربرد وسیع هیدروکسید کلسیم در اندودانتیکس، در نهایت میتوان نتیجه گیری نمود که چنانچه در طی درمان اثر ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم مد نظر باشد، ترکیب آن با کلرگزیدین مناسبترین میباشد. با توجه به اینکه هیدروکسید کلسیم جزو مواد ضد میکروبی کند اثر محسوب می شود و علاوه بر آن توانایی پخش شدن آن در محیط کشت و وجود مواد بافری در محیط کشت میتواند در قطر منطقه مهار رشد میکروبی تأثیر بگذارند، اتخاذ راههای مطالعه طولانی مدت، مطالعه *in vivo* و تأثیر همزمان این ماده بر روی میکروب های مختلف کانال و در مجموع تحقیقات برای ارزشیابی کلینیکی تأثیر این ماده به عنوان داروی داخل کانال پیشنهاد میشود.

و همکارانش نشان دادند که انتروکوکوس فکالیس، باکتری است که اکثراً بعد از شکست درمان ریشه در کانال ریشه دندان باقی می ماند (۱۶).

مرحله اول در بررسی کارایی یک داروی داخل کانال امتحان آزمایشگاهی است (۷). بعضی از تحقیقات از مدل های تجربی جهت بررسی کارایی ضد میکروبی مواد دندانپزشکی بر روی میکروبهای موثر در روند درمان در شرایط آزمایشگاهی بهره گرفته اند (۹).

برای ارزیابی طیف ضد میکروبی مواد ۳ روش *in vitro* وجود دارد:

۱- (Dilution Method) روش رقیق سازی که نتایج کمی برای میزان لازم از ماده ضد میکروبی را بیان میکند.

۲- روش ADT (Agar Diffusion Test) که قطر مهار میکروبی در اطراف منبع حاوی ضد میکروبی را نشان میدهد.

۳- روش DET (Direct Exposure Test) که اطلاعات کیفی در باره ماده ضد میکروبی به ما می دهد (۹).

در این مطالعه از یک مدل تجربی بنام ADT جهت ارزیابی خاصیت ضد میکروبی مواد مورد آزمایش استفاده شد. روش ADT بطور وسیع و گسترده ای برای انجام تستهای تعیین فعالیت ضد میکروبی در درمانهای اندودنتیک و سیلرها استفاده می شود و مقایسه مستقیمی بین درمانهای داخل کانال بر علیه میکروارگانیزم ها

Archive

REFERENCES:

1. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*, 2002; 35(3): 221-8.
2. Estrela C, Pecora JD, Souza-Neto MD, Estrela CR, Baummann LL. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide. *Braz Dent J*, 1999; 10: 63-72.
3. Oztan MD. Endodontic treatment of teeth associated with a large periapical lesion. *Int Endod J*, 2002; 35(1): 73-80.
4. Kim M, Kim B, Yoon S. Effects on the healing of periapical perforations in dogs of the addition of growth factors to calcium hydroxide. *Int Endod J*, 2001; 27(12): 734-7.
5. Beltes PG, Pissiotis E, Koulaouzidou E, Kortsaris AH. In vitro release of hydroxyl ions from six types of calcium hydroxide non setting pastes. *J Endod*; 1997; 23(7): 413-5.
6. Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*, 1999; 32: 267-82.
7. Gomes BPFA. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicle against selected microorganisms. *Braz Dent J*, 2002; 13(3): 155-61.
8. Statmos DG, Haasch GG, Gerstein H. The PH of local anesthetic/calcium hydroxide solutions. *J Endod*, 1985; 11: 264-5.
9. Estrela C, Estrela CR, Bammann LL, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide pates. *J Endodon* , 2001; 27: 720-3.
10. Cohen S, Hargreaves KM. *Pathways of the pulp*. 9th ed : Mosby; 2006, 325-62, 621-35, 835-65.
11. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic micro flora to biomechanical procedures. *Int Endod J*, 1996; 29: 235-41.
12. Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J*, 1992; 25(2): 97-106.
13. Estrela C, Pimenta FC, Ito II, Baummann LL. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J Endod*, 1998; 24: 15-7.
14. Lin YH, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: Part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* , 2003; 29: 565-6.
15. Molander A, Dahlen G. Evaluation of the antibacterial potential of Tetracycline or Erythromycin mixed with calcium hydroxide as intracanal dressing against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 2003; 96(6): 744-50.
16. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbial analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1998; 85: 86-93.