

مقایسه آزمایشگاهی اثر آنتی باکتریال دو دهانشویه نانوسیل و کلرهگزیدین

دکتر وحید اصفهانیان^۱- دکتر فریدا محمدی^۲- دکتر شهرام امینی^۱

۱- استادیار گروه آموزشی پریودنتمولوزی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان

۲- دندانپزشک

چکیده

زمینه و هدف: در میان روش‌های شیمیایی کنترل پلاک استفاده از دهانشویه‌ها نسبت به سایر روش‌ها رایجتر است. هدف از این مطالعه مقایسه اثر ضد باکتریال دهانشویه نانوسیل با دهانشویه کلرهگزیدین به عنوان نمونه استاندارد می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی از پلاک بالای لثه‌ای و زیر لثه‌ای ۱۵ بیمار نمونه‌گیری شد و تعداد باکتریها در دو محیط مایع هوایی و بی‌هوایی به وسیله اسپکتروفتومتر تعیین گردید و نمونه‌ها به محیط کشت مایع هوایی و بی‌هوایی منتقل شدند، سپس نمونه‌ها از محیط کشت مایع به صورت مخلوط با دهانشویه‌های نانوسیل و کلرهگزیدین و دارونما به محیط کشت جامد مورد نظر منتقل شده و تعداد کلنی‌های رشد یافته در محیط کشت جامد در هر گروه شمارش و از طریق آزمون مقایسه گردیدند.

یافته‌ها: از نظر تعداد کلنی‌های رشد یافته در هر دو شرایط هوایی و بی‌هوایی به ترتیب (از کم به زیاد) گروه‌های کلرهگزیدین، نانوسیل و دارونما قرار گرفتند. در مورد کلرهگزیدین بین کلنی‌های رشد یافته در دو محیط هوایی و بی‌هوایی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت که این امر نشان‌دهنده اثر آنتی باکتریال مطلق این دهانشویه است و دهانشویه نانوسیل نسبت به دارونما در هر دو محیط هوایی و بی‌هوایی برتری آماری معنی‌داری داشت و اثر این دهانشویه در محیط بی‌هوایی بیشتر بود، گرچه دارونما نیز در محیط بی‌هوایی اثر پیشتری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: دهانشویه نانوسیل می‌تواند به عنوان یک ماده آنتی باکتریال مؤثر به ویژه در محیط بی‌هوایی به کار رود. اگرچه همچنان کلرهگزیدین به عنوان دهانشویه استاندارد دارای بیشترین اثر در این زمینه است.

کلید واژه‌ها: پلاک دندانی - دهانشویه - نانوسیل - کلرهگزیدین دی‌گلوكونات

وصول مقاله: ۱۳۹۰/۳/۲۵ اصلاح نهایی: ۱۳۹۰/۱۲/۱۷

نویسنده مسئول: دکتر فریدا محمدی، دندانپزشک

مقدمه

عمدتاً در حال رشد و نمو، سلول‌های اپی تیال، لکوسیت‌ها و ماکروفازهایست که در یک ماتریکس داخل سلولی چسبنده قرار گرفته‌اند. باکتری‌ها تقریباً ۷۰-۸۰٪ پلاک را تشکیل می‌دهند. (۳)

حذف پلاک به روش مکانیکی همچنان به عنوان مهمترین روش استفاده شده در پیشگیری از بیماری‌های دندانی و حفظ سلامت دهانی به حساب می‌آید ولی با پیشرفت دانش در مورد طبیعت عفنی بیماری‌های پریودنتمال علاقه به روش‌های شیمیایی کنترل پلاک به میزان زیادی مجدداً احیا گردیده است. روش مکانیکی شامل استفاده از مسوک و

امروزه کاملاً مشخص شده است که پلاک دندانی در بروز پوسیدگی‌های دندانی و بیماری‌های پریودنتمال نقش مهمی به عهده دارد. تحقیقاتی کلینیکی و اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که ارتباط مستقیمی بین تجمع پلاک میکروبی بر روی دندانها و پیشرفت ژنژیوت و پریودنتمیت وجود دارد. (۱)

از نظر بالینی پلاک دندانی به عنوان یک ماده زرد رنگ متمایل به خاکستری، قابل انعطاف و دارای ساختار مشخص تعریف می‌شود که اتصال قوی به سطوح سخت داخل دهانی از جمله رستوریشن‌های متحرک و ثابت دارد. (۲)، پلاک دندانی محتوی مجموعه پیچیده‌ای از میکروارگانیسم‌های

اثرات مضر برای محیط زیست است، زیرا جزء اصلی آن که پراکسیدهیدروژن است به آب و اکسیژن که آلوده کننده محیط زیست نمی‌باشد تجزیه می‌گردد. (۸)

تاکنون اثر آنتی باکتریال دهانشویه کلرهگزیدین با بسیاری از دهانشویه‌های دیگر بررسی شده است (۱۲-۹).

هدف از این مطالعه مقایسه اثر ضد باکتریایی دهانشویه نانوسیل با دهانشویه کلرهگزیدین (به عنوان نمونه استاندارد) در هر دو محیط هوایی و بی‌هوایی می‌باشد.

روش بررسی

در این بررسی تجربی آزمایشگاهی جهت مقایسه اثر آنتی باکتریال این دو دهانشویه از ۱۵ بیمار نمونه‌گیری شد و نمونه‌های پلاک به آزمایشگاه منتقل شدند. معیار ورود مطالعه، بیمار مبتلا به پریودنتیت مزمن متوسط تا شدید و معیارهای خروج شامل مواردی بودند که موجب اختلال در نمونه‌گیری می‌شدند. به عنوان مثال عدم امکان ایزوولیشن، آگشته شدن نمونه با خون و یا عدم امکان مجاورت نمونه با شعله حین نمونه برداری پلاک زیر لثه‌ای (نمونه بی‌هوایی). جهت نمونه‌گیری از هر بیمار از سایتهايی که شرایط نمونه‌گیری را دارا بودند نمونه مورد نظر انتخاب می‌شد. به این ترتیب که برای نمونه هوایی از پلاک بالای لثه‌ای موجود در هر دندان ممکن و برای نمونه بی‌هوایی از پلاک زیر لثه‌ای در دندانی که عمق پاکت در آن دندان چهار میلی‌متر یا بیشتر بود نمونه‌گیری انجام گردید.

از هر بیمار دو نمونه هوایی و بی‌هوایی گرفته شد، به این ترتیب که پس از انتخاب بیمار ناجیه مورد نظر توسط آب شسته شد تا از بزاق و بقایای احتمالی غذا پاک شود. ایزوولیشن ناجیه توسط رول پنبه صورت گرفت. پیش از هر گونه درمان با استفاده از کورت از پلاک بالای لثه‌ای جهت نمونه هوایی نمونه‌گیری شد. سپس نمونه هوایی به محیط کشت مایع تریپتیکازسویابرات که داخل لوله در پیچ دار بود انتقال داده شد. همچنین توسط کورت از پلاک زیر لثه‌ای به نحوی که پلاک با خون آلوده نشود نمونه گرفته شد و در مجاورت شعله به محیط کشت مایع تایوگلیکولات سدیم

وسایل تمیز کننده بین دندانی می‌باشد و روش شیمیایی عبارت است از کاربرد انواع مختلف ترکیبات دارویی و ضد باکتری برای از بین بردن و یا کاهش فعالیت باکتری‌ها. استفاده از دهانشویه‌های آنتی‌سپتیک به عنوان متدائلترین روش شیمیایی کنترل پلاک به شمار می‌رود. (۲) ماده‌ای که در این زمینه مورد مطالعات بسیار قرار گرفته، کلرهگزیدین می‌باشد که یک دی‌گوانیدوهگزان با خصوصیات آنتی سپتیک مشخص می‌باشد. کلرهگزیدین به سه شکل دی گلوکونات، استات و نمکهای هیدروکلراید در دسترس می‌باشد. نمکهای دی گلوکونات و استات محلول در آبند ولی هیدروکلراید به میزان خیلی کم در آب حل می‌شود. (۴ و ۲)، محلول کلرهگزیدین گلوکونات به صورت محلول در الكل ۱۱٪، کلیسیرین، آب، ساخارین و مواد معطر تهیه می‌شود. این محلول یک ضد عفونی کننده وسیع الطیف است که در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و منفی، بی‌هوایی‌ها، قارچها، مخمرها و برخی ویروس‌ها نظیر HIV و HBV فعال است. (۵) دهانشویه نانوسیل (سانوسیل)، (تولید شرکت دارویی کیمیا فام) یک فرمولاسیون ترکیبی از پراکسیدهیدروژن و به میزان جزئی یون نقره است. (۶-۷)

پراکسیدهیدروژن به دلیل خواص آنتی میکروبیال و نیز آزاد سازی اکسیژن از تکثیر جمعیت میکروبی غیرهوایی مؤثر در بیماری‌های پریودنتال جلوگیری می‌نماید. اکسیژن آزاد شده از پراکسیدهیدروژن غشای حفاظتی باکتری‌ها و ویروس‌ها را تخریب کرده و نانوسیل را قادر به نفوذ به داخل آن و از بین بردن میکروارگانیسم‌ها می‌نماید. (۸) یون نقره در دهانشویه نانوسیل به صورت نانو ذرات نقره است که به دلیل تبدیل شدن به ابعاد کوچکتر در حد نانومتر خاصیت میکروب کشی آن بیش از ۹۹٪ افزایش می‌باید. (۶-۷)، اثر ضد باکتریایی یون نقره به دلیل ایجاد پیوندهای کووالانت بسیار محکم با پروتئین‌های باکتریایی می‌باشد که منجر به رسوب پروتئین‌ها و در نتیجه غیرفعال شدن باکتری‌ها می‌گردد. این دو ترکیب (پراکسیدهیدروژن و یون نقره) در کنار یکدیگر اثر سینیرژیستیک نیز نشان می‌دهند. شرکت سازنده نانوسیل ادعا کرده است که نانوسیل قادر

مجاورش با دستگاه خوانده شد و تعداد باکتری‌ها با استفاده از جدول مربوطه تعیین گردید. (۱۲)

جهت استانداردسازی غلظت محیط کشت از محلول شماره ۵/۰ مک فارلند استفاده شد. به این ترتیب که جذب نوری محلول شماره ۵/۰ مک فارلند با استفاده از دستگاه اسپکترو فوتومتر مشخص شد که در طول موج ششصد و پنجاه نانومتر مقدار آن $10^{-0.8}$ می‌باشد، در این جذب نوری غلظت باکتری‌ها $C_{UF/ml} = 10^{1.5}$ می‌باشد. سپس جذب نوری محیط کشت حاوی باکتری را با استفاده از دستگاه مشخص کرده که مقدار آن باید $10^{-0.8}$ باشد. چنانچه جذب نوری محیط کشت از این مقدار کمتر بود محیط کشت به انکوباتور انتقال داده شد تا باکتری‌ها رشد کنند و در نتیجه کدورت محیط کشت افزایش یابد و اگر جذب نوری محیط کشت از این مقدار بیشتر بود محیط کشت را با مقدار معینی از محیط کشت فاقد باکتری مخلوط کرده تا کدورت آنها کاهش یابد و به جذب نوری مورد نظر برسد.

یک میلی لیتر از تمام رقت‌های تهیه شده محیط کشت مایع تایوگلیکولات برات و تریپتیکازوسیوبرات به درون لوله‌های حاوی دهان‌شویه با مقدار مصرفی توصیه شده برای هر یک (ده میلی لیتر برای نانوسیل و ده میلی لیتر برای کلرهگزیدین) انتقال داده شد و طی سی ثانیه هموژن گردید. سپس $1/0$ میلی لیتر از هر کدام از لوله‌ها به محیط کشت جامد بلاذرگار منتقل و در محیط کشت جامد پخش شد. پلیت‌های محیط‌های کشت حاوی باکتری‌های بی‌هوایی داخل کندل جار قرار گرفت و کندل جار به همراه محیط‌های کشت حاوی باکتری‌های هوایی به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

بعد از ۴۸ ساعت از روی تعداد کلنی‌ها در تمام رقت‌ها، رقت مناسب جهت هر کدام از دهان‌شویه‌ها و سرم فیزیولوژی مشخص گردید. به این صورت که در هر دو محیط هوایی و بی‌هوایی رقت دو تا چهار برای دهان‌شویه‌ی نانوسیل، رقت سه تا پنج برای سرم فیزیولوژی، رقت صفر تا دو برای کلرهگزیدین انتخاب گردید.

در نهایت یک میلی لیتر از هر کدام از رقت‌های انتخاب شده

داخل لوله در پیچ دار انتقال داده شد. (در صورت آلوودگی نمونه با خون از مکان دیگری جهت نمونه‌گیری استفاده می‌شود). جهت رشد بهتر باکتری‌ها، محیط‌های کشت مایع به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد (درجه حرارت بدن انسان) قرار داده شد.

گروه‌های مطالعه در این بررسی شامل سه گروه بود:

۱- گروه کلرهگزیدین ۲/۰ (ساخت شرکت بهسا)

۲- گروه نانوسیل

۳- گروه دارونما (سرم فیزیولوژی)، که پس از انتقال نمونه‌ها به محیط کشت مایع مورد نظر، تعداد کلنی‌های رشد یافته در هر گروه به صورت جاذگانه بررسی گردید. برای اینکه تعداد کلنی‌ها باید در حد قابل شمارش باشند از محیط‌های کشت مایع رقت‌های مختلف تهیه گردید. از آنجایی که نمونه‌های محیط هوایی و بی‌هوایی از دو محل مقاومت (زیر لثه و بالای لثه) برداشته شد، برای اینکه بتوان اثر دهان‌شویه را در دو محیط مقایسه کرد باید از عدم وجود تفاوت تعداد باکتری‌ها در دو محیط اطمینان حاصل کرد. بنابراین با استفاده از روش کدورت سنجی توسط اسپکترو فوتومتر تعداد باکتری‌ها در دو محیط کشت مایع هوایی و بی‌هوایی قبل از آغازته شدن به دهان‌شویه‌ها شمارش گردید و یکسان شد.

برای تعیین میزان کدورت محیط کشت مایع از دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده گردید. به این ترتیب که ابتدا دستگاه با محیط کشت مایع فاقد باکتری صفر گردیده و میزان کدورت محیط کشت مایع حاوی باکتری‌های پلاک توسط دستگاه مشخص و عدد آن تعیین گردید. سپس با روش چشمی لوله استاندارد مک فارلندی که از نظر کدورت مشابه کدورت محیط کشت حاوی پلاک بود مشخص گردید و میزان کدورت آن با دستگاه تعیین شد و این عدد با عدد کدورت محیط کشت مایع حاوی باکتری‌ها مقایسه شد و در صورت تطابق با توجه به شماره لوله استاندارد مک فارلند از روی جدول مک فارلند تعداد باکتری‌های موجود در محیط کشت حاوی باکتری‌ها مشخص گردید. در صورت عدم تطابق میزان کدورت لوله‌های استاندارد مک فارلند

تقریباً در تمام رقت‌های مناسب جهت شمارش صفر بود. از آنجایی که رقت 10^{-4} برای شمارش تعداد کلنی‌ها در دهانشویه نانوسیل و سرم فیزیولوژی (گروه شاهد) رقت مشترک بود، جهت مقایسه اثر دهانشویه نانوسیل و سرم فیزیولوژی از این رقت استفاده شد و از گروه کلرهگزیدین جهت مقایسه آماری صرف نظر شد.

بر اساس آزمون t بین تعداد کلنی‌های رشد یافته در مجاورت دهانشویه نانوسیل و دارونما در هر دو شرایط هوایی و بی هوایی اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت. ($p < 0.001$)

همچنین بین تعداد کلنی‌های رشد یافته در حضور دهانشویه نانوسیل در شرایط هوایی و بی هوایی اختلاف معنی‌دار وجود داشت. ($p > 0.004$)

بین تعداد کلنی‌های رشد یافته در حضور دارونما نیز در محیط کشت هوایی و بی هوایی اختلاف معنی‌دار وجود داشت. ($p < 0.001$) نتایج به دست آمده پس از تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه تعداد کلنی‌ها بین دو گروه نانوسیل و دارونما در جدول ۱ بیان شده است.

محیط‌های کشت مایع به وسیله سمپلر در مجاورت شعله و در شرایط استریل به داخل لوله‌های حاوی دهانشویه‌های موردنظر (نانوسیل و کلرهگزیدین) انتقال داده شد. بعد از هموزن کردن آن به مدت سی ثانیه $1/0$ میلی‌لیتر از آن در شرایط استریل به پلیت‌های حاوی بلادآگار اضافه شده و در محیط پخش گردید.

پلیت‌های حاوی محیط کشت بلادآگار برای رشد نمونه‌های بی هوایی داخل کندل جار قرار گرفته و به همراه پلیت‌های حاوی محیط کشت بلادآگار برای رشد نمونه‌های هوایی به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور 37°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت تعداد کلنی‌ها در هر پلیت به روش چشمی شمارش شد. سپس میانگین تعداد کلنی‌ها در رقت‌های مختلف برای هر یک از دهانشویه‌ها و سرم فیزیولوژی در دو محیط هوایی و بی هوایی محاسبه گردید.

برای مقایسه میانگین تعداد کلنی‌های رشد یافته بین گروه‌ها در دو محیط هوایی و بی هوایی از آزمون t مستقل استفاده شد.

یافته‌ها

تعداد کلنی‌های رشد یافته در حضور دهانشویه کلرهگزیدین

جدول ۱: مقایسه تعداد کلنی‌های رشد یافته در شرایط هوایی و بی هوایی در مجاورت نانوسیل و دارونما

		محیط کشت بی هوایی			محیط کشت هوایی				
		حداکثر	حداقل	انحراف معیار \pm میانگین	حداکثر	حداقل	انحراف معیار \pm میانگین	نانوسیل	دارونما
۱۲	۳۹			$22/6 \pm 6/9$	۱۰	۱۵۰	$49/6 \pm 34/7$		
۱۰۲	۲۵۲			$222/5 \pm 70/6$	۳۰۰	۱۹۲۵	$891/5 \pm 530/6$		

قبل و بعد از اضافه کردن دهانشویه‌ها بررسی شد.

دهانشویه کلرهگزیدین تا به امروز نسبت به سایر دهانشویه‌ها دارای بیشترین برتری می‌باشد و تحقیقهایی که تاکنون درباره این دهانشویه صورت گرفته نیز بیانگر این مطلب می‌باشند. اکثر مطالعات انجام شده جهت مقایسه کلرهگزیدین و سایر دهانشویه‌ها برتری کلرهگزیدین را

بحث

هدف اصلی این مطالعه بررسی بر روی اثر ضد باکتریایی دهانشویه نانوسیل در مقایسه با کلرهگزیدین به عنوان نمونه استاندارد در یک پژوهش آزمایشگاهی می‌باشد. در طی این مطالعه از پلاک بالای لثه‌ای و زیر لثه‌ای ۱۵ بیمار نمونه برداشی شد و پس از کشت تعداد کلنی‌های رشد یافته

هوای و بی‌هوای) منطقی نیست و نیز با توجه به اینکه تعداد کلنی‌های رشد یافته در هر دو محیط هوای و بی‌هوای در مجاورت دهان‌شویه کلرهگزیدین صفر بود، لذا از گروه کلرهگزیدین جهت مقایسه آماری صرف نظر شد و مقایسه تعداد کلنی‌ها بین دو گروه نانوسیل و دارونما در دو محیط هوای و بی‌هوای به صورت جداگانه صورت گرفت، بنابراین از آزمون χ^2 مستقل جهت مقایسه داده‌ها استفاده گردید. طبق تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد که دهان‌شویه نانوسیل نسبت به دارونما (سرم فیزیولوژی) در هر دو محیط هوای و بی‌هوای برتری آماری معنی‌داری دارد و این اثر در محیط بی‌هوای بیشتر بود که به دلیل وجود پراکسیدهیدروژن در این دهان‌شویه این نتیجه مورد انتظار است. پراکسیدهیدروژن به دلیل آزادسازی اکسیژن از تکثیر جمعیت میکروبی غیرهوایی مؤثر در بیماری‌های پریودنتال جلوگیری می‌کند.

کاهش رشد کلنی‌ها در مجاورت دارونما نسبت به محیط کشت خالص بیانگر این است که افزودن یک محلول ایزوتوپیک نیز به محیط کشت میکروبی می‌تواند باعث کاهش رشد میکرووارگانیسم‌ها گردد. کاهش تعداد کلنی‌ها در مجاورت دارونما در محیط بی‌هوای نسبت به شرایط هوایی بیشتر بود که توجیه خاصی برای آن وجود ندارد. بنابراین پژوهش فرضیه‌های این مطالعه مبنی بر دارا بودن اثر ضدبacterیایی این دو دهان‌شویه (نانوسیل و کلرهگزیدین) و نیز تفاوت اثر ضد بacterیایی این دو دهان‌شویه پذیرفته می‌شود.

نتیجه‌گیری

دهان‌شویه نانوسیل می‌تواند به عنوان یک ماده آنتی‌bacterیال مؤثر بهویژه در محیط بی‌هوای به کار رود. اگرچه همچنان کلرهگزیدین به عنوان دهان‌شویه استاندارد دارای بیشترین اثر در این زمینه است.

نشان داده‌اند و تنها در برخی مطالعات فرآورده‌های مورد بررسی توانسته‌اند از نظر خاصیت آنتی‌bacterیال با کلرهگزیدین رقابت نمایند. (۱۵-۱۶)، البته مطالعاتی که برتری سایر موارد را نسبت به کلرهگزیدین در این زمینه نشان داده‌اند انگشت شمارند. (۱۶)

در تحقیقات Moran و همکارانش (۱۱)، مطالعه Gusberti و Menendez (۱۴) اثر ضد بacterیایی دهان‌شویه کلرهگزیدین با دهان‌شویه‌های اکسیدکننده بررسی شده که در این پژوهشها نیز دهان‌شویه کلرهگزیدین نسبت به دهان‌شویه‌های اکسید کننده مؤثرتر بوده است. در مطالعه‌ای که توسط Kazemi و همکارانش (۱۵) تحت عنوان مقایسه اثر دهان‌شویه کلرهگزیدین و نانوسیل بر التهاب لثه صورت گرفت، اثر کلرهگزیدین در کاهش میزان شاخص پلاک و شاخص لثه‌ای نسبت به نانوسیل بیشتر بود و تفاوت آماری معنی‌داری بین دو دهان‌شویه وجود داشت ولی از لحاظ کاهش شاخص خونریزی بین دو دهان‌شویه تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت. همچنین میزان رنگپذیری دندانها متعاقب استفاده از نانوسیل به طور معنی‌داری کمتر از کلرهگزیدین بود. مطالعه مذکور اثر دهان‌شویه کلرهگزیدین و نانوسیل را به صورت بالینی مقایسه کرد. در صورتی که در مطالعه حاضر اثر آنتی‌bacterیال این دو دهان‌شویه به صورت آزمایشگاهی بررسی و مشخص شد که کلرهگزیدین اثر آنتی‌bacterیال قویتری نسبت به دهان‌شویه نانوسیل در هر دو محیط هوای و بی‌هوای دارد.

در مطالعه حاضر دهان‌شویه کلرهگزیدین در هر دو محیط هوای و بی‌هوای اثر ضد بacterیایی قویتری نسبت به دو گروه نانوسیل و دارونما داشت. در مورد کلرهگزیدین تفاوت آماری معنی‌داری بین کلنی‌های رشد یافته در دو محیط هوای و بی‌هوای وجود نداشت که این امر نشان‌دهنده اثر مطلق آنتی‌bacterیال این دهان‌شویه است. از آنجایی که اثر آنتی‌bacterیال گروه‌ها در هر محیط به صورت جداگانه بررسی می‌شود و مقایسه توام (به عنوان مثال اثر کلرهگزیدین با نانوسیل در دو محیط متفاوت

REFERENCES

1. Aliakbari E. An invitro comparison of antimicrobial effect of irsha and chlorhexidine mouthrinses. [Thesis]. Isfahan: School of dentistry, Khorasgan University of Medical Science; 2004.
2. Newman M, Takei H, Carranza F. Carranza's clinical periodontology, 10thed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2011, 249-451-225.
3. Zare Bidaki M. Microbiology of plaque and dental caries, 1thed. Mashhad: Mashhad Publishing Co; 1997,52.
4. Linde J, Karring T, Plang N. Clinical periodontology and implant dentistry. 4thed. Copenhagen: Munksgaard; 2003, 148.
5. Linde J, Karring T, Plang N. Clinical periodontology and implant dentistry. 3thed. Copenhagen: Munksgaard; 1998, 468, 475, 476, 479, 480.
6. <http://www.ngdir.ir/Minemineral chapter Detail.asp?PID=2750>.
7. <http://www.Forum.niksalehi.com.showthread.php?t=25083>.
8. <http://www.sanosil.com/-disinfectants-m.htm>.
9. Moran J, Addy M, Wade W. The effect of oxidising mouthrinses compared with chlorhexidine on salivary bacterial counts and plaque regrowth. *J Clin Periodontal*. 1995 Oct; 22(10):750-5.
10. Gusberti FA, Sampathkumar P, Siegrist BE, Lang NP. Microbiological and clinical effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide mouthrinses on developing plaque and gingivitis. *J Clin Periodont*. 1988Jan; 15(1):60-7.
11. Menendez A, Li F, Michalek S, kirk k, Makhlja S, Childers N. Comparative analysis of antibacterial effects of combined mouthrinses on Strep toccoccus mutans. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Feb; 20(1): 31-34.
12. <http://www.irden.com/articles/summary-doc/section.php?ELEMENT-ID=104604>.
13. Baron E, Peterson R, Fine gold S. Baily and Scott's diagnostic microbiology. 9thed. St Louis: Mosby; 1994, 170.
14. Bajaj N, Tandon S. The effect of Triphala and Chlorhexidine mouthwash on dental plaque, gingival inflammation, and microbial growth. *Int J Ayurveda Res*. 2011Jan;2(1):29-36.
15. Zelic O,Cakic S,Lukovic N.The effect of two different oral antiseptics on dental plaque formation(de novo biofilm)and on gingival inflammation.*Srp Arh Celok Lek*.2009Jan-Feb; 137(1-2):6-9.
16. Koban I,Holtfreter B,Hubner NO,Matthes R.Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparision to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro-proof of principle experiment. *J Clin Periodontal*. 2011 Oct;38(10):956-65.
17. Clayden N, Smith S, Stiller S, Newcombe RG, Addy M. A comparision of the plaque-inhibitory properties of stannous fluoride and low-concentration chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontal*. 2002Dec; 29(12):1072-7.