

## مقایسه ی اثر ضد باکتریایی محلول کلر هگزیدین - کلسیم هیدروکساید و کلر هگزیدین - سالیین بر باکتری انتروکوکوس فیکالیس

مریم زارع جهرمی\*، مسیح اثنا عشری اصفهانی\*\*

\* استادیار گروه آموزشی اندودنتیکس دانشکده ی دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان  
\*\* دندانپزشک

### چکیده

**بیان مساله:** استفاده از ترکیب پودر کلسیم هیدروکساید- نرمال سالیین به عنوان داروی درون کانال رایج بوده است. از سوی دیگر، به تازگی به استفاده از کلر هگزیدین به عنوان شست و شو دهنده و داروی درون کانال در درمان های اندو توجه ویژه ای شده است.  
**هدف:** هدف از انجام بررسی کنونی، ارزیابی اثر دو محلول کلر هگزیدین و سالیین بر خاصیت ضد باکتریایی کلسیم هیدروکساید و مقایسه ی آن با اثر ضد باکتریایی کلر هگزیدین به تنهایی بود.

**مواد و روش:** در این بررسی تجربی آزمایشگاهی، از ۴۰ دندان تک کاناله ی انسان استفاده شد. پس از قطع تاج و آماده سازی کانال ها با استفاده از روش استپ بک لایه ی اسمیر برداشته شده و دندان ها در اتوکلاو سترون شدند. سپس، نمونه ها به باکتری انتروکوکوس فیکالیس آلوده و به سه گروه دوازده تایی بخش گردید. در مرحله ی بعد در شرایط آسپتیک، توسط سرنگ دارو به درون کانال ها تزریق شد (گروه ۱: خمیر کلسیم هیدروکساید- نرمال سالیین، گروه ۲: کلر هگزیدین، گروه ۳: کلسیم هیدروکساید- کلر هگزیدین). همه ی نمونه ها به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوبه و سپس، با استفاده از کن کاغذی از کانال ها نمونه گیری انجام گردید. پس از انکوباسیون نمونه ها، کلونی شماری انجام شد و نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر نورسنجی گردیدند. داده های به دست آمده با استفاده از آزمون واریانس و مجذور کای مورد سنجش قرار گرفت.

**یافته ها:** نتایج گویای آن بود، که کلر هگزیدین به تنهایی خاصیت ضد باکتریایی بیشتری در مقایسه با گروه های کلسیم هیدروکساید- کلر هگزیدین و کلسیم هیدروکساید- سالیین داشت، که این اختلاف از نظر آماری معنادار بود ( $p=0/06$ ).  
**نتیجه گیری:** این بررسی نشان می دهد، که کلر هگزیدین حداکثر خاصیت ضد باکتریایی بر ضد انتروکوکوس فیکالیس را در کانال ریشه در میان جلسه های درمان ریشه داراست. در واقع این بررسی گویای آن است، که اضافه کردن کلر هگزیدین به کلسیم هیدروکساید سبب افزایش خاصیت ضد باکتریایی کلسیم هیدروکساید و کاهش خاصیت ضد باکتریایی کلر هگزیدین می شود.

**واژگان کلیدی:** کلر هگزیدین، کلسیم هیدروکساید، انتروکوکوس فیکالیس

## درآمد

اصول اساسی اندودنتیک شامل، اینسترومنتیشن مکانیکی دندان، دبریدمان و پرکردن کانال است. در میان این اصول دبریدمان کانال از اهمیتی ویژه برخوردار است. دبریدمان، به معنای از میان بردن مواد محرک و ریزجانداران موجود در درون کانال ریشه است، که با استفاده از وسایل دستی و چرخشی به همراه محلول‌های شوینده و داروهای ضد باکتریایی در میان جلسه‌های درمان انجام می‌شود.<sup>(۱)</sup>

در بررسی‌های گوناگونی ثابت شده است، که بی‌شک باکتری‌ها نقش قطعی در شکل‌گیری بیماری‌های پالپ و پری‌اپیکال بازی می‌کنند.<sup>(۲)</sup> نزدیک به صد سال است، که از کلسیم هیدروکساید به عنوان داروی درون کانال در کانال‌های با پالپ نکروتیک برای کاهش و مهار ریزجانداران کانال استفاده می‌شود. مکانیسم عمل کلسیم هیدروکساید هر چند هنوز ناشناخته است، اما این موضوع را به PH بالا و داشتن یون هیدروکسیل آن مربوط می‌دانند. از سوی دیگر، پژوهشگرانی همچون ساتورن و همکاران، گزارش‌های ضد و نقیضی از خواص ضد باکتریایی کلسیم هیدروکساید مبنی بر اثر فراوان این ماده به عنوان موثرترین داروی درون کانال ارایه کرده‌اند، که استفاده از این ماده را به عنوان سرگروه داروهای درون کانال در هاله‌ای از ابهام فرو برده است.<sup>(۳، ۴ و ۵)</sup>

از سوی دیگر، کلرهگزیدین یک کلرفنل بی‌گوانید با فعالیت شدید ضد میکروبی است، که استفاده‌ی اصلی آن به صورت ضد سپتیک است. کلرهگزیدین یک ترکیب کاتیونیک است، که از طریق اتصال به ترکیبات آنیونیک غشاء باکتری عمل کرده و باعث به هم خوردن تعادل اسمزی در باکتری می‌شود. غلظت‌های متفاوتی از کلرهگزیدین وجود دارد، که غلظت ۰/۲ درصد رایج‌ترین و موثرترین آنها به ویژه در درمان ریشه است. بررسی‌های گوناگونی در مورد مقایسه‌ی خاصیت ضدباکتریایی کلرهگزیدین با کلسیم هیدروکساید انجام گرفته است، که از آن جمله می‌توان به بررسی آزمایشگاهی ارکان (Ercan) و همکاران اشاره کرد. آنها خاصیت ضد باکتریایی کلرهگزیدین را با خمیر کلسیم هیدروکساید - کلرهگزیدین و خمیر کلسیم هیدروکساید - نرمال سالین در عمق توپول‌های عاجی بر کاندیدا آلبیکانس و انتروکوک فیکالیس مقایسه کردند. آنها به این نتیجه رسیدند، که در میان این سه ترکیب کلرهگزیدین بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را

داشته و همچنین، سبب تقویت خاصیت ضد باکتریایی کلسیم هیدروکساید نیز شده بود.<sup>(۶)</sup> لین (Lin) و همکاران به بررسی و مقایسه‌ی قدرت آنتی‌باکتریال کلرهگزیدین و کلسیم هیدروکساید پرداخته و دریافتند، که کلرهگزیدین به ویژه در فرم آزاد سازی تدریجی دارای خواص ضد باکتریایی بیشتری نسبت به کلسیم هیدروکساید است.<sup>(۷)</sup>

ایوانز (Evans) و همکاران، در پژوهشی با عنوان درجه‌ی اثر خمیر کلسیم هیدروکساید و کلرهگزیدین به عنوان داروی درون کانال در عاج دندان جلویی گاو دریافتند، که خمیر کلسیم هیدروکساید با کلرهگزیدین ۰/۲ درصد در از میان بردن انتروکوکوس فکالیس در توپول‌های عاجی نسبت به کلسیم هیدروکساید با آب بسیار مؤثرتر است.<sup>(۸)</sup>

لین (Lin) و همکاران، با بررسی اثر ضد باکتریایی کلسیم هیدروکساید و کلرهگزیدین بر روی انتروکوکوس فکالیس دریافتند که آمارها تفاوتی میان کلرهگزیدین و ترکیب کلسیم هیدروکساید و کلرهگزیدین نشان نمی‌دهد.<sup>(۹)</sup> گومز (Gomes) و همکاران، اثر ضد میکروبی کلسیم هیدروکساید و ژل کلرهگزیدین ۲ درصد در عاج ریشه دندان جلویی گاو را بر روی انتروکوکوس فکالیس بررسی کردند و دریافتند، که ژل کلرهگزیدین به تنهایی بسیار مؤثرتر از ترکیب این ماده با کلسیم هیدروکساید و کلرهگزیدین است.<sup>(۱۰)</sup>

هانی (Haenni) و همکاران، خاصیت شیمیایی و ضد میکروبی کلسیم هیدروکساید در ترکیب با محلول‌های گندزدا را بررسی کردند. در این بررسی آنها دریافتند، که ترکیب کلسیم هیدروکساید با محلول‌های ضد میکروبی همانند ترکیب این ماده با سالین است و اثر ضد باکتریایی برخی محلول‌ها همچون، کلرهگزیدین در ترکیب با کلرهگزیدین کاهش می‌یابد.<sup>(۱۱)</sup>

سیرن (Siren) و همکاران، اثر ضد میکروبی ترکیب کلسیم هیدروکساید با کلرهگزیدین یا یدین پتاسیم را بر روی انتروکوکوس فکالیس بررسی کردند و دریافتند، که این دو محلول ضد باکتریایی اثری بر افزایش خواص قلیایی کلسیم هیدروکساید نداشته، اما به افزایش قدرت ضد باکتریایی کلسیم هیدروکساید در بلند مدت قادر هستند.<sup>(۱۲)</sup>

از آنجا که استفاده از پودر کلسیم هیدروکساید به همراه نرمال سالین یا محلول بی‌حسی استفاده روز افزونی یافته است، به طراحی پژوهشی پرداخته تا اثر دو ماده‌ی کلرهگزیدین و

## مواد و روش

در این بررسی تجربی-آزمایشگاهی از ۴۰ دندان جلویی تک کاناله‌ی بالغ انسان که دارای ریشه‌های سالم و بی‌ترک و کلسیفیکاسیون بود، استفاده شد. برای برداشت دبری‌های سطحی ریشه، دندان‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد (داروگر-ایران) قرار گرفته و سپس در سرم فیزیولوژی (شرکت فرآورده‌های تزریقی-ایران) قرار داده شدند. پس از آن، دندان‌ها عکسبرداری شد، تا نبود انحنا ی شدید و کلسیفیکاسیون آن‌ها تایید گردد. در مرحله‌ی بعدی با هدف سهولت دسترسی و تمیز کردن کانال‌ها، تاج دندان‌ها به وسیله‌ی دیسک الماسی همانند (D-Z آلمان) در ناحیه‌ی مینا-سمان (CEJ) قطع شده (طول ریشه‌ها: ۱۵ میلی‌متر) و همه‌ی کانال‌ها توسط فایل‌های نوع K و با روش استپ بک تا فایل شماره ۲۵ پاکسازی و تا فایل شماره‌ی ۶۰ (مانی-ژاپن) و فرزهای گیتس گلیدن ۳، ۲ و ۴ (مانی-ژاپن) و پیژوریمر ۳ و ۴ شکل‌دهی شدند. سپس، انتهای ریشه‌ها برای پیشگیری از خروج محیط کشت مایع از آپکس هر کانال مهر و موم گردید. به این صورت، که انتهای ریشه‌ها توسط اسید فسفریک ۱۰ درصد (کریستالین-آلمان) به مدت سی ثانیه کاندیشن شد. آنگاه پرایمر را بر سطح ریشه قرار داده و پس از گذشت سی ثانیه از افشانه‌ی هوا بر روی سطح ریشه استفاده شده و سپس باندینگ را به پرایمر اضافه کرده و با افشانه‌ی هوا به آرامی بر سطح ریشه پخش کرده و به مدت بیست ثانیه کیورینگ انجام شد. پس از آن با قرار دادن سرنگ مخصوص کامپوزیت فلو (کریستالین-آلمان) به ضخامت یک میلی‌متر در ناحیه به مدت چهل ثانیه کیورینگ انجام شد. آنگاه کانال‌ها توسط ۱۰ سی سی نرمال سالین شست و شو داده شد. در مرحله‌ی بعدی نمونه‌ها توسط ۱۰ سی سی محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد و ۱۰ سی سی EDTA ۱۷ درصد هر یک به مدت ۴ دقیقه شست و شو داده شد، تا لایه‌ی اسمیر آن از میان رود. سپس، هر دندان توسط ۱۰ سی سی نرمال سالین شست و شو داده شد. دندان‌ها در فویل آلومینیوم پیچیده و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۳۰ دقیقه دو بار سترون شدند.

برای اثبات سترون بودن کانال‌ها از دو عدد از آنها با کن کاغذی (آریادنت-ایران) نمونه‌گیری و در محیط کشت BHI (Brain Heart Infusion) (مرک-آلمان) استریل به مدت یک هفته در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از گذشت یک هفته هیچ‌گونه تیرگی در محیط دیده نشد و کلنی نیز رشد نکرد، که نشان‌دهنده‌ی سترون بودن نمونه‌ها بود (گروه شاهد منفی).

پس از حصول اطمینان از سترون بودن نمونه‌ها، آنتروکوک (ATCC29212) در شرایط بی‌هوازی به درون کانال‌ها اضافه شد. در مرحله‌ی بعدی برای تغذیه‌ی آنتروکوک محیط کشت BHI توسط دستگاه سانتریفیوژ با فرکانس ۶۰ هرتز به درون کانال‌ها و توبول‌های عاجی نفوذ داده شد. همچنین هر سه روز یکبار نمونه‌ی میکروبی با تیرگی ۰/۵ مک فارلند فراهم شده و به درون کانال‌ها تزریق شد. پس از گذشت یک هفته از آلوده‌سازی، نمونه‌ها هر یک با ۱۰ سی سی نرمال سالین شسته شده، سپس به سه گروه بخش شدند و داروهای موردنظر در نزدیکی هر سه گونه نمونه قرار گرفتند.

گروه اول: ترکیب کلسیم هیدروکساید (مرک-آلمان)-نرمال سالین (۱۲ عدد دندان)

گروه دوم: کلرگزیدین ۰/۲ درصد (شرکت شهر دارو-ایران) (۱۲ عدد دندان)

گروه سوم: ترکیب کلسیم هیدروکساید-کلرگزیدین ۰/۲ درصد (۱۲ عدد دندان)

داروها در شرایط آسپتیک (در نزدیکی هود) توسط سرنگ به درون کانال‌ها تزریق شده و توسط فایل شماره ۲۵ به همه‌ی نقاط کانال هدایت گردید. آنگاه دهانه‌ی کانال‌ها با زونالین (کمدنت-آلمان) به ضخامت سه میلی‌متر مهر و موم شده و با دو لایه‌ی لاک ناخن پوشیده گردید و همه‌ی نمونه‌ها یک هفته در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پس از یک هفته انکوباسیون و رشد کلنی‌ها در محیط آگار، نمونه‌ها در شرایط کاملاً آسپتیک باز شده و توسط فایل داروهای درون کانال خارج گردید. کانال‌ها توسط ۱۰ سی سی نرمال سالین کاملاً شسته و با کن کاغذی از هر دندان در شرایط بی‌هوازی و کاملاً آسپتیک نمونه فراهم و به محیط BHI انتقال داده شدند. در مرحله‌ی بعد نمونه‌ها در محیط بی‌هوازی قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. پس از ۲۴ ساعت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در

نرمال سالین (گروه ۱) و پس از آن ترکیب کلسیم هیدروکساید - کلرهگزیدین (گروه ۳) بود (نمودار ۲). بیشترین شمار نمونه‌های شفاف مربوط به کلرهگزیدین ۰/۲ درصد (گروه ۲) بوده (نمودار ۲) که اختلاف مشاهده شده در گروه‌های سه‌گانه یعنی گروه‌های ۱ و ۲ و ۳ از لحاظ آماری معنادار بود ( $p < 0/05$ ).

### بحث

در درمان ریشه، یکی از مراحل که پس از آماده‌سازی حفره‌ی دسترسی و پیش از پر کردن کانال بایستی انجام پذیرد، پاکسازی کانال‌های ریشه است، که عموماً از طریق وسایل دستی، مواد شست و شو دهنده و داروهای درون کانال گوناگون انجام می‌گیرد<sup>(۱)</sup>. نزدیک به صد سال است، که از کلسیم هیدروکساید به عنوان داروی درون کانال در کانال‌های با پالپ نکروتیک برای کاهش و مهار ریزجانداران کانال استفاده می‌شود. بررسی کنونی با هدف ارزیابی اثر دو محلول کلرهگزیدین و سالین بر خاصیت ضد باکتریایی کلسیم هیدروکساید و مقایسه‌ی آن با اثر ضد باکتریایی کلرهگزیدین به تنهایی طراحی شد. روش آزمایشگاهی مورد استفاده در این بررسی بر مبنای روش مولر گزارش شد<sup>(۱۳)</sup>. باکتری مورد استفاده در این بررسی انتروکوکوس فیکالیس بود. این باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری و از گروه D استرپتوکوک‌هاست. این باکتری در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها از خود مقاومت نشان می‌دهد و به صورت سریع و موثر به درون توبول‌های عاجی نفوذ می‌کند و می‌تواند شرایط نامطلوب محیط را به خوبی تحمل کند<sup>(۱۴)</sup>.

وجود این باکتری به صورت فراوان در دندان‌هایی که درمان ریشه‌ی آنها با شکست روبه رو شده گزارش شده است<sup>(۱۴)</sup>. ایوانز (Evans) و همکاران<sup>(۸)</sup>، در بررسی خود مشاهده کردند، که خمیر کلسیم هیدروکساید با کلرهگزیدین ۰/۲ درصد در از میان بردن انتروکوکوس فیکالیس در توبول‌های عاجی نسبت به کلسیم هیدروکساید با آب بسیار موثر است. بررسی کنونی نیز، تاییدی بر بررسی انجام شده به وسیله‌ی ایوانز است. خاصیت ضد میکروبی بیشتر، خمیر کلسیم هیدروکساید - کلرهگزیدین ۰/۲ درصد را می‌توان به خاصیت ضد میکروبی کلرهگزیدین ۰/۲ درصد نسبت داد. بررسی کنونی با بررسی گومز (Gomes) و همکاران<sup>(۱۰)</sup>، یافته‌هایی همانند را نشان داده است. در بررسی گومز، ژل کلرهگزیدین ۰/۲ درصد به تنهایی بیشترین اثر

همچنین، نمونه‌های به دست آمده از کانال‌ها از محیط مایع با نسبت یک میکروگرم بر میلی لیتر به محیط جامد انتقال و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون کلونی شماری انجام شد و تعداد کلنی باکتری‌ها مشخص گردید. محیط کشت استفاده شده در این بررسی شکلات آگار، بلاداآگار و روش نمونه‌گیری در این بررسی روش ابداعی آقای مولر بود<sup>(۱۳)</sup>. میانگین شمار کلنی‌ها پس از شمارش در هر سه گروه با استفاده از آزمون واریانس و تیرگی و شفافیت نمونه‌ها توسط آزمون مجذور کای مورد سنجش قرار گرفت.

### یافته‌ها

با توجه به یافته‌های این بررسی در گروه شاهد مثبت که از کانال‌ها بی هیچ دارویی نمونه‌گیری شد، همه نمونه‌ها (۱۰۰ درصد) دارای رشد باکتری بودند. در حالی که در گروه شاهد منفی، که ریشه‌ها به باکتری انتروکوکوس فیکالیس آلوده نشده بودند، هیچگونه رشدی در کانال‌ها دیده نشد، که موید سترون بودن محیط‌ها و درستی روش کار بود. یافته‌های به دست آمده از گروه‌های آزمایش نشان داد، که کلرهگزیدین ۰/۲ درصد به تنهایی در مدت هفت روز بیشترین اثر ضد میکروبی را دارا بود. کمترین میانگین شمار کلنی‌ها (۲/۲۵) و کمترین شمار نمونه‌های تیره (صفر عدد) مربوط به این گروه بود (نمودار ۱ و ۲). در حالی که ترکیب کلسیم هیدروکساید - نرمال سالین به مهار کامل رشد باکتری‌ها قادر نبود و بیشترین میانگین شمار کلنی‌ها (۵۱۲/۰۸۳۳) و بیشترین شمار نمونه‌های تیره (۶ عدد) مربوط به این گروه بود (نمودار ۱).

بر پایه‌ی نمودار اختلاف آماری معناداری میان هر سه گروه وجود داشت. کمترین میانگین شمار کلنی مربوط به کلرهگزیدین (گروه ۲) و پس از آن مربوط به کلسیم هیدروکساید - کلرهگزیدین (گروه ۳) بود. بیشترین میانگین شمار کلنی در گروه کلسیم هیدروکساید - نرمال سالین (گروه ۱) مشاهده شد ( $p < 0/05$ ).

در مقایسه‌ی تیرگی نمونه‌ها در میان گروه‌های آزمایش، یافته‌ها بر روی محیط کشت مایع BHI نشان داد، که بیشترین شمار نمونه‌های تیره مربوط به ترکیب کلسیم هیدروکساید -

روی هم رفته عوامل زیادی همچون، روش و زمان انجام بررسی، ترکیب شیمیایی مواد و گونه‌ی ریزجانداران مورد بررسی می‌تواند بر یافته‌های بررسی‌های میکروکروبی شناختی اثر گذار باشد. به طور کلی، بر پایه‌ی نتایج این پژوهش و بررسی‌های همانند شاید بتوان گفت، در صورتی که از کلرهگزیدین ۰/۲ درصد به عنوان یک داروی درون کانال استفاده شود، کمترین میزان انتروکوکوس فکالیس و ریزجاندار برجای مانده را در سیستم کانال ریشه خواهیم داشت.

### نتیجه‌گیری

- ۱- کلرهگزیدین ۰/۲ درصد به تنهایی در مدت هفت روز بیشترین اثر ضد میکروبی را دارا بود ( $p = ۰/۰۱$ ).
- ۲- تأثیرگذاری کلرهگزیدین هنگامی که با کلسیم هیدروکساید ترکیب شد کاهش یافت.
- ۳- اثر ضد میکروبی کلسیم هیدروکساید در ترکیب با کلرهگزیدین افزایش یافت.
- ۴- خمیر کلسیم هیدروکساید- نرمال سالین کمترین اثر ضد میکروبی را بر ضد انتروکوکوس فکالیس دارا بود.

### سپاسگزاری

پژوهش کنونی، با همکاری آزمایشگاه دکتر مهاجری اصفهان انجام شده است. به این وسیله از زحمات این مرکز و کارکنان محترم آن به ویژه سرکار خانم محمودی سپاسگزاری می‌گردد.

در بررسی‌هایی (Haenni) و همکاران<sup>(۱۱)</sup>، تأثیرگذاری کلرهگزیدین هنگامی که با کلسیم هیدروکساید ترکیب شد کاهش یافت. بررسی کنونی نیز، این موضوع را تایید می‌کند. در این مورد شاید بتوان گفت، که کلسیم هیدروکساید به عنوان یک ناخالصی برای کلرهگزیدین به شمار می‌آید و باعث کاهش غلظت و اثر آن شده است. یافته‌های پژوهش کنونی نشان داد، که کلرهگزیدین ۰/۲ درصد به تنهایی اثر ضد میکروبی قوی‌تر نسبت به دو ترکیب کلسیم هیدروکساید- نرمال سالین و کلسیم هیدروکساید- کلرهگزیدین در دوره زمانی بررسی شده (۷ روز) داشت. کمترین اثر ضد میکروبی، مربوط به ترکیب کلسیم هیدروکساید- نرمال سالین بود. بیشترین میانگین شمار کلنی در طی دوره‌ی زمانی بررسی مربوط به همین ترکیب گزارش شد و همچنین، بیشترین شمار نمونه‌های تیره نیز، مربوط به همین ترکیب بود، که این میزان بالای باکتری‌ها در طی هفت روز به احتمال ناشی از مهار نکردن باکتری‌ها به وسیله‌ی ترکیب کلسیم هیدروکساید- نرمال سالین است.

در بررسی بیکر (Baker) و همکاران<sup>(۱۵)</sup>، در اثر ضد میکروبی کلسیم هیدروکساید در ترکیب با کلرهگزیدین افزایشی مشاهده نشد، در بررسی کنونی نتایجی متفاوت با بررسی بیکر به دست آمده است.

## References

1. Walton R, Torabinejad M. Principles and practice of endodontic. 4th ed., St. Louis; Mosby: 2008. p. 38-49.
2. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20: 340-349.
3. Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod* 2007; 33: 114-118.
4. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J* 2007; 40: 2-10.
5. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995; 6: 85-90.
6. Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: e27-31.
7. Lin S, Levin L, Weiss EI, Peled M, Fuss Z. In vitro antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow-release device. *Quintessence Int* 2006; 37: 391-394.
8. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod* 2003; 29: 338-339.
9. 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: 565-566.
10. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 2003; 36: 267-275.
11. Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Int Endod J* 2003; 36: 100-105.
12. Sirén EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Ørstavik D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 326-331.
13. Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 475-484.
14. Seltzer S, Naidorf I. Flare-ups in endodontics. *J Endod* 2004; 30: 482-481.
15. Baker NE, Liewehr FR, Buxton TB, Joyce AP. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide, iodine potassium iodide, betadine, and betadine scrub with and without surfactant against *E faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 359-364.