

Comparing the Antimicrobial Efficacy of Carvacrol, Chlorhexidine and Calcium Hydroxide on *Enterococcus faecalis* in Root Canal Treatment: An In vitro Study

Mamak Adel¹,
Masoud Sharifi²,
Roya Hamedi³,
Nafiseh Rahmani³,
Amir Javadi⁴,
Farogh Jahangiri⁵

¹ Assistant Professor, Department of Endodontics, Dental Caries Prevention Research Center, Faculty of Dentistry, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

² Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

³ Assistant Professor, Department of Orthodontics, Dental Caries Prevention Research Center, Faculty of Dentistry, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

⁴ PhD Student in Medical Informatics, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

⁵ Dentist, Qazvin, Iran

(Received December 20, 2015 ; Accepted July 26, 2016)

Abstract

Background and purpose: Calcium hydroxide and Chlorhexidine are among common intracanal medications. Recently an herbal composition named Carvacrol has been suggested as an intracanal medication. The purpose of this study was to compare antimicrobial effect of Carvacrol, Chlorhexidine and Calcium hydroxide on *Enterococcus faecalis*.

Materials and methods: In this experimental study, 56 single-rooted teeth were extracted and after canal preparation, they were randomly divided into three groups (n= 16) and 2 positive and negative control groups (n= 4 per group). After sterilization by autoclave, all samples except negative control group were contaminated with *Enterococcus faecalis*. The root canals in group 1 were filled by Calcium hydroxide paste. Paper cones impregnated by 0.2% Chlorhexidine and 94% Carvacrol were placed in working length of root canals in group 2 and 3, respectively. Negative control group was assessed without contamination and no medication was used in positive control group. After incubation of specimens for 48 hours and canal irrigation, a sample was taken from each canal and bacterial colony growth was assessed in BHI agar. Data analysis was done in SPSS ver.20 applying Chi-square and Fishers exact test.

Results: All three groups were found effective in eliminating *Enterococcus faecalis* and there were no significant differences in antibacterial effect between these groups (P= 0.99).

Conclusion: Carvacrol can be recommended as an effective herbal medication for intracanal irrigation.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, calcium hydroxide, chlorhexidine, carvacrol

مقایسه اثر ضد میکروبی کارواکرول، کلرهگزیدین و هیدروکسید کلسیم بر انتروکوکوس فکالیس در کانال ریشه دندان در شرایط آزمایشگاهی

مامک عادل^۱
مسعود شریفی^۲
رویا حامدی^۳
نفیسه رحمانی^۳
امیرجوادی^۴
فاروق جهانگیری^۵

چکیده

سابقه و هدف: هیدروکسید کلسیم و کلرهگزیدین از جمله رایج ترین داروهای داخل کانال ریشه می باشند. اخیراً ترکیبی گیاهی به نام کارواکرول نیز به عنوان داروی داخل کانال معرفی شده است. هدف این مطالعه مقایسه فعالیت ضد میکروبی کارواکرول، کلرهگزیدین و هیدروکسید کلسیم بر انتروکوکوس فکالیس می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ۵۶ دندان تک ریشه کشیده شد و پس از آماده سازی کانال ها، به طور تصادفی به ۳ گروه ۱۶ تایی و ۲ گروه کنترل مثبت و منفی ۴ تایی تقسیم شدند. پس از استریل سازی با اتوکلاو تمامی آن ها به جز گروه کنترل منفی با انتروکوک فکالیس آلوده گردیدند. کانال ریشه دندان های گروه ۱ با خمیر هیدروکسید کلسیم پر شد و در کانال های گروه ۲ و ۳ به ترتیب مخروط های کاغذی آغشته به کلرهگزیدین ۰/۲ درصد و کارواکرول ۹۴ درصد تا طول کارکرد قرار گرفتند. گروه کنترل منفی بدون ایجاد آلودگی تحت شرایط مطالعه قرار گرفت و در گروه کنترل مثبت از هیچ دارویی استفاده نشد. پس از انکوباسیون نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت و شست و شوی کانال ها، از هر کانال نمونه گیری شد و رشد کلنی باکتری در محیط کشت BHI آگار بررسی شد. برای آنالیز آماری از نسخه ۲۰ نرم افزار SPSS و آزمون های مجذور کای و تست دقیق فیشر استفاده شد. سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها: هر سه گروه در از بین بردن انتروکوکوس فکالیس موثر بودند و تفاوت معنی داری در اثر ضد باکتریایی آن ها یافت نشد ($p=0/99$).

استنتاج: کارواکرول به عنوان یک داروی گیاهی موثر جهت شست و شوی داخل کانال توصیه می شود.

واژه های کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، هیدروکسید کلسیم، کلرهگزیدین، کارواکرول

مقدمه

با وجود این که برای کانال ریشه از روش های مکانیکی و شیمیایی برای از بین بردن میکروارگانیسم ها استفاده می شود، این احتمال وجود دارد که برخی از این میکروارگانیسم ها همچنان در داخل کانال باقی بمانند،

مؤلف مسئول: نفیسه رحمانی - قزوین: بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات پیشگیری از پوسیدگی دندان
۱. استادیار، گروه اندودانتیکس، مرکز تحقیقات پیشگیری از پوسیدگی دندان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۳. استادیار، گروه ارتودانتیکس، مرکز تحقیقات پیشگیری از پوسیدگی دندان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۴. دانشجوی دکتری بیوانفرماتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۵. دندانپزشک، قزوین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۱۰/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۵/۵

از این رو داروهای مختلفی در بین جلسات درمانی مورد استفاده قرار می گیرند (۲،۱). مطالعه اثرات ضد میکروبی این داروها از اهمیت بالایی برخوردار است تا بتوان موثرترین داروهای داخل کانال را شناسایی و آن‌ها را در بین جلسات درمانی مورد استفاده قرار داد و به این ترتیب به نتایج درمانی مناسب‌تر و قطعی‌تری دست یافت. انتروکوکوس فکالیس شایعترین نوع انتروکوک است که به طور رایج در بیماران مبتلا به پریدونیت و ژنژیویت و موارد شکست درمان کانال ریشه مشاهده می‌شود (۴،۳). توانایی این باکتری در تهاجم به توبول‌های عاجی، مقاومت در برابر شرایط اکولوژیکی مختلف کانال و تطبیق با شرایط نامناسب داخل کانال از جمله عواملی است که باعث گردیده این باکتری به عنوان یک عفونت پاتوژن مقاوم در برابر درمان‌های اندودانتیک معرفی گردد (۵). وجود پمپ پروتون نیز از دیگر عواملی است که انتروکوکوس فکالیس را به یک باکتری مقاوم به درمان‌های ریشه تبدیل کرده است (۶).

مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین‌های سرم، هیدروکسی آپاتیت و کلاژن می‌توانند بر خواص ضد میکروبی شست و شو دهنده‌های کانال تاثیرگذار باشند. بنابراین ما باید به دنبال داروهایی باشیم که در حضور عاج حداکثر فعالیت ضد میکروبی خود را داشته باشند و آن را برای مدت زمان طولانی حفظ نمایند (۷). هیدروکسید کلسیم یکی از رایج‌ترین داروهای داخل کانال ریشه است (۸). اگرچه مکانیسم عمل دقیق آن هنوز نامشخص است ولی یکی از مکانیسم‌های احتمالی آن این است که با آزاد سازی یون‌های هیدروکسیل، PH محیط را بالا می‌برد و بیش‌تر باکتری‌های پاتوژن توان تحمل چنین محیطی را ندارند. هم‌چنین هیدروکسید کلسیم با دناتوره کردن پروتئین‌ها توان انحلال بافت پالپ را نیز دارد (۹-۱۱). استفاده از داروی هیدروکسید کلسیم محدودیت‌هایی به همراه دارد، زیرا این دارو تمامی میکروارگانیسم‌ها را از سیستم کانال ریشه حذف نکرده و به مدت زمان زیادی جهت اعمال اثرات ضد میکروبی

خود نیاز دارد (۱۲،۱۳). این ماده به دلیل pH بالا بالقوه سمی بوده و می‌تواند منجر به تخریب بافت نرم گردد. این امر به نوبه خود می‌تواند در کاربرد بالینی به التهاب مزمن و نکروز سلولی منجر گردد (۱۴). یکی دیگر از محدودیت‌های مهم هیدروکسید کلسیم این است که در محیط کانال ریشه خاصیت بافرکنندگی بالقوه موجود در عاج، باعث کاهش انتشار یون‌های هیدروکسیل در محیط و کاهش تاثیر ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم می‌شود (۱۵). کلر هگزیدین نیز به خاطر رنج گسترده فعالیت‌های ضد میکروبی به عنوان داروی داخل کانال معرفی شده است (۱۶). کلر هگزیدین در غلظت‌های پایین باکتریواستاتیک و در غلظت‌های بالا باکتریوسید است (۱۷). اثر ضد میکروبی آن به مولکول‌های کاتیونیک متصل شونده به جداره‌های سلولی باکتری‌هایی با شارژ منفی مربوط می‌شود که موجب تغییر تعادل سلولی شده و در نهایت منجر به نشت محتویات داخل سلول به محیط خارج سلولی و مرگ سلول می‌شود (۱۸). تاکنون چندین مطالعه جهت مقایسه خواص ضد میکروبی کلر هگزیدین و هیدروکسید کلسیم انجام شده است. در بسیاری از این مطالعات کلر هگزیدین در از بین بردن انتروکوکوس فکالیس موثرتر از هیدروکسید کلسیم گزارش شده است (۱۹-۲۱). به هر حال از بین بردن کامل همه باکتری‌ها با استفاده از کلر هگزیدین به تنهایی قابل دست‌یابی نیست (۱۸). از دیگر محدودیت‌های کلر هگزیدین عدم توانایی آن در انحلال بافت‌های نکروتیک و ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها (۲۲،۲۳). با توجه به عوارض جانبی و محدودیت‌های داروهای شیمیایی، در سال‌های اخیر خواص بیولوژیکی و اثرات ضدباکتری گیاهان دارویی محور بسیاری از کارهای تحقیقاتی شده است. تحقیقات نشان داده است که خاصیت ضد باکتری بسیاری از این گیاهان عمدتاً مربوط به ترکیبات فنلی موجود در عصاره و اسانس این گیاهان از جمله تیمول، کارواکرول و اژنول می‌باشد (۲۴،۲۵). مرزه خوزستانی یکی از گیاهان

مقایسه بین ۳ گروه، حجم نمونه به صورت ذیل تصحیح می‌گردد:

$$n' = (\sqrt{n-1}) \times n = 1.41 \times n \approx 16$$

آماده‌سازی استاندارد نمونه های دندان

تعداد ۵۶ دندان تک ریشه قدامی فک بالا که به دلیل درمان های ارتودنسی یا مشکلات پرئودنتال به تازگی کشیده شده بودند، انتخاب و ارزیابی شدند. ابتدا تمامی دندان‌ها برای ضدعفونی شدن و حذف دبری‌های سطحی به مدت ۲ ساعت در محلول هیپوکلریت سدیم ۲٫۵ درصد قرار داده شدند. سپس تاج تمامی دندان‌ها جهت یکسان‌سازی طول نمونه‌ها قطع گردید. در هر یک از نمونه‌ها طول کارکرد به میزان ۱ میلی‌متر کوتاه‌تر از سوراخ اپیکال تعیین گردید و آماده‌سازی ناحیه اپیکال کانال‌ها با استفاده از k فایل‌ها (شرکت Mani - ژاپن) تا MAF شماره ۴۰ انجام شد. مرحله گشاد سازی و شکل‌دهی (flaring) با روش stepback با k فایل‌های شماره ۴۵ و ۵۰ و گیتس گلیدن شماره ۲ (شرکت Mani - ژاپن) به طول 12 ± 1 میلی‌متر و با گیتس گلیدن شماره ۳ به طول 11 ± 1 میلی‌متر و هم‌چنین با گیتس گلیدن شماره ۴ به طول 10 ± 1 میلی‌متر صورت گرفت. طی مراحل آماده‌سازی و شکل‌دهی کانال ریشه، دندان‌ها در فاصله بین هر دو فایل با ۲ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت سدیم ۲٫۵ درصد به طور مرتب مورد شست و شو قرار گرفتند. در حین شست و شو جهت اطمینان از patency فورامن اپیکال، از k فایل شماره ۲۰ استفاده شد.

برداشت لایه اسمیر

پس از پایان مراحل آماده‌سازی و شکل‌دهی، شست و شوی نهایی کانال ریشه هر یک از دندان‌ها به ترتیب با مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت سدیم ۲٫۵ درصد، ۵ میلی‌لیتر محلول EDTA 17 درصد و مجدداً با ۵ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت سدیم ۲٫۵ درصد انجام شد. به این ترتیب هرگونه دبری و لایه

دارویی است که حاوی درصد بالایی از کارواکرول می‌باشد (۲۶). کارواکرول مایعی با اثر ضدعفونی کننده و فعالیت ضدباکتری و ضدقارچی است و هم‌چنین بر پروستاگلاندین‌ها اثر مهاری دارد (۲۷). نقش باکتری‌سیدال کارواکرول شبیه سایر ترکیبات فنلی است و با آسیب‌غشایی به صورت افزایش نفوذپذیری غشاء به پروتون‌ها و یون‌های پتاسیم و تخلیه ATP داخل سلولی منجر به مرگ سلولی باکتری می‌شود (۲۹، ۲۸). مصرف کارواکرول همراه آنتی‌بیوتیک‌ها اثر سینرژیستیک دارد. کاربرد آن جهت ضدعفونی کردن کف حفره تهیه شده قبل از پر کردن دندان احتمال عفونت مجدد را کاهش می‌دهد. در موارد درمان ریشه نیز به عنوان داروی داخل کانال توصیه شده است (۳۰، ۳۱). کارواکرول در بازار ایران به عنوان داروی ضد درد دندان (دنتول) وجود دارد (۳۲). تحقیق حاضر با هدف تعیین میزان خاصیت آنتی‌باکتریال کارواکرول در مقایسه با کلسیم هیدروکساید و کلرهرگزیدین بر روی باکتری انتروکوکوس فکالیس به صورت آزمایشگاهی صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تعیین حجم نمونه

این تحقیق به صورت آزمایشگاهی روی ۵۶ دندان کشیده شده انسان که تک ریشه و تک کاناله بودند، انجام گرفت. تعیین حجم نمونه بر اساس مطالعات مشابه (۱۰، ۱۱) و با استفاده از فرمول زیر توسط مشاور آمار تعیین گردید:

$$n = \frac{1}{1-f} \times \frac{2 * (Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta}) \times \bar{P} \times (1-\bar{P})}{(P_1 - P_0)^2} = 11.4,$$

$$P_0 = 0.90, P_1 = 0.25, 1 - \alpha = 0.95, 1 - \beta = 0.80, f = 0.20$$

که در رابطه فوق P0 درصد رشد در گروه دارونما و P1 متوسط درصد رشد در گروه‌های آنتی‌باکتریال می‌باشد. ضریب اطمینان ۹۵ درصد و توان آزمون ۸۰ درصد و درصد ریزش ۲۰ درصد می‌باشد. با توجه به

اسمیر ایجاد شده در اثر آماده سازی کانال ها، حذف شد. در مرحله بعد تمام نمونه ها به طور تصادفی به ۳ گروه آزمایشی و ۲ گروه کنترل تقسیم گردید و در داخل یک ظرف فلزی دارای درپوش از جنس استیل ضد زنگ روی یک صفحه آلومینیومی مشبک چیده شد و به صورت زیر کد گذاری گردید:

گروه ۱: ۱۶ دندان از شماره ۱۶-۱، گروه ۲: ۱۶ دندان از شماره ۱۷-۳۲، گروه ۳: ۱۶ دندان از شماره ۴۸-۳۳، گروه ۴: به عنوان گروه کنترل مثبت شامل ۴ دندان از شماره ۴۹-۵۲ و گروه ۵: به عنوان گروه کنترل منفی شامل ۴ دندان از شماره ۵۳-۵۶.

در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی قزوین، ظرف حاوی دندان ها در اتوکلاو (ادیب- ساخت ایران) تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ psi به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید.

تهیه باکتری انتروکوکوس فکالیس

در این تحقیق، به منظور ایجاد عفونت کنترل شده و استاندارد در تمامی نمونه ها، از یک باکتری مقاوم و عامل شکست درمان اندو به نام انتروکوکوس فکالیس استفاده شد. بدین منظور، این باکتری گرم مثبت بی هوازی اختیاری از بخش میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین با شماره شناسه ATCC 33186 تهیه شد.

آلوده سازی نمونه ها

باکتری مورد آزمایش به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در داخل محیط BHI در انکوباتور CO₂ دار کشت داده شد. سوسپانسیون خالص از باکتری انتروکوک فکالیس با غلظت 10⁸ CFU/ml با استفاده از روش اسپکتروفتومتری به میزان معادل لوله استاندارد 0.5 Baso 4 مک فارلند (McFarland) در کنار شعله آماده شد. سپس تمام نمونه ها بجز ۴ نمونه مربوط به گروه کنترل منفی تحت

شرایط آسپتیک با استفاده از مخروط کاغذی استریل شماره ۳۵ (کارخانه آریادنت ایران) توسط سوسپانسیون استاندارد انتروکوکوس فکالیس آلوده شدند. جهت ایجاد رطوبت، بخش تحتانی ظرف دارای درپوش با گاز استریل آغشته به آب مقطر استریل پر شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور WF - binder (ساخت آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

بررسی تأثیر مواد مورد نظر بر نمونه ها

بعد از سپری شدن مدت زمان ۴۸ ساعت جهت رشد باکتری در کانال ریشه دندان ها، نمونه های گروه ۱ بوسیله خمیر هیدروکسید کلسیم (شرکت گلچای ایران Reg no :1,1064) که به نسبت وزنی پودر و مایع ۳ به ۱ با آب مقطر تهیه شده بود، توسط لنتولو شماره ۳ (شرکت Mani ژاپن) پر شد تا حدی که خمیر از سوراخ آپیکال ریشه ها خارج گردید. در کانال هر یک از نمونه های گروه ۲ یک مخروط کاغذی استریل شماره ۳۵ (شرکت آریادنت ایران) آغشته به محلول کلرهگزیدین ۰/۲ درصد (شرکت داروسازی بهسا ایران- اراک- شماره ثبت ۱۲۲۸۰۳۹۸۱۲) تا طول کار کرد قرار گرفت. در کانال هر یک از نمونه های گروه ۳ نیز یک مخروط کاغذی استریل شماره ۳۵ (شرکت آریادنت ایران) آغشته به محلول کارواکرو ۹۴ درصد (شرکت داروسازی خرمان ایران - لرستان- شماره ثبت ۷۳-۱۵۳۶) به عمق طول کار کرد قرار داده شد. کانال نمونه های گروه ۴ به عنوان گروه کنترل مثبت که با انتروکوکوس فکالیس آلوده شده بود، تحت اثر هیچ دارویی قرار نگرفت. کانال نمونه های گروه ۵ به عنوان گروه کنترل منفی بدون آلوده کردن میکروبی و قرار دادن هر گونه داروی داخل کانال، تحت شرایط مطالعه قرار گرفت. در نهایت مدخل تاجی کانال در همه نمونه ها با خمیر Coltsol (شرکت آریادنت ایران) به طور موقت ترمیم گردید.

مورد نظر در محیط مایع Triptic soy borth با ۶/۵ درصد سدیم کلراید (NaCl) و هم‌چنین در محیط Blie Esucline Agar کشت داده شد و محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. برای آنالیز آماری از نسخه ۲۰ نرم افزار SPSS استفاده شد. نتایج توسط آزمون مجذور کای (chi-square) و تست دقیق فیشر (Fishers exact test) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و $p \leq 0/05$ به عنوان حد معنی دار بودن آماری در این مطالعه در نظر گرفته شد.

یافته ها

پس از خارج کردن داروهای داخل کانال از نمونه‌های دندانی مورد آزمایش و تهیه کشت از محیط کانال، نتایج زیر به دست آمد: در هیچ یک از نمونه‌های گروه ۱ که تحت پوشش خمیر هیدروکسید کلسیم قرار گرفته بودند، اثری از رشد کلونی باکتری در محیط کشت BHI agar دیده نشد. در گروه ۲، یعنی نمونه‌هایی که داخل کانال آن‌ها کلرگزیدین ۰/۲ درصد قرار گرفته بود در محیط کشت BHI agar فقط در ۱ مورد از ۱۶ نمونه (شماره ۱۷) کلونی باکتری مشاهده گردید. در مورد نمونه‌های گروه ۳ نیز که کانال‌های آلوده به باکتری در معرض کارواکرول ۹۴ درصد قرار گرفته بودند، در هیچ یک از نمونه‌ها اثری از رشد کلونی باکتری در محیط کشت BHI agar مشاهده نشد (جدول شماره ۱). در تمامی ۴ نمونه گروه کنترل مثبت در محیط کشت BHI agar رشد کلونی باکتری کاملاً مشهود بود. در هیچ یک از نمونه‌های گروه کنترل منفی در محیط کشت BHI agar اثری از رشد کلونی باکتری مشاهده نشد. در نهایت در مورد یک نمونه از گروه ۲ و نمونه‌های گروه کنترل مثبت که رشد کلونی باکتری در محیط کشت BHI agar مشاهده شده بود، برای حصول اطمینان از این که ارگانسیم‌های رشد کرده در محیط‌های کشت، انتروکوکوس فکالیس می‌باشند، به ترتیب زیر عمل شد: ابتدا اسمیر تهیه شد و رنگ آمیزی گرم صورت گرفت. سپس آزمایش کاتالاز انجام شد و سرانجام کلونی‌های

نمونه‌های مورد مطالعه با شرایط ذکر شده درون ظرف فلزی دارای درپوش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۱۰۰ در صد به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور WF-binder (ساخت آلمان) قرار گرفتند. سپس تحت شرایط آسپتیک، پانسمان موقت روی مدخل کانال‌ها با کمک قلم اکسکاویتور استریل برداشته شد. در نمونه‌های گروه ۱ (کد ۱۶-۱)، خمیر هیدروکسید کلسیم با استفاده از k فایل استریل شماره ۴۰ با حرکت چرخشی reaming خارج گردید و هر کانال با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل با سرنگ ۵ cc شست و شو داده شد. در نمونه‌های گروه ۲ (کد ۳۲-۱۷) مخروط‌های کاغذی که به کلرگزیدین ۰/۲ درصد آغشته شده بود، خارج گردید. در نمونه‌های گروه ۳ (کد ۴۸-۳۳) نیز مخروط‌های کاغذی آغشته به کارواکرول ۹۴ درصد از کانال‌ها خارج گردید. در پایان، تمامی کانال‌های گروه‌های آزمایشی به منظور حذف بقایای دارویی، با یک سرنگ استریل جداگانه با مقدار ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل شست و شو داده شدند. کانال نمونه‌های گروه ۴ (کنترل مثبت) و گروه ۵ (کنترل منفی) نیز هر یک با یک سرنگ اختصاصی و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل شست و شو داده شدند. بعد از شست و شوی کانال‌ها، از کانال تمام گروه‌های مورد مطالعه (دندان‌های شماره ۵۶-۱) به کمک مخروط کاغذی استریل نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در سطح محیط کشت BHI agar تلقیح شدند. محیط‌های کشت، مشابه نمونه‌ها کدگذاری شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور WF-binder انکوبه شدند. پس از گذشت مدت زمان فوق محیط‌های کشت از نظر رشد کلونی باکتری مشاهده و بررسی شدند. در صورت مشاهده رشد کلونی باکتری برای حصول اطمینان از این که ارگانسیم‌های رشد کرده در محیط‌های کشت، انتروکوکوس فکالیس می‌باشند به ترتیب زیر عمل شد: ابتدا اسمیر تهیه شد و رنگ آمیزی گرم صورت گرفت. سپس آزمایش کاتالاز انجام شد و سرانجام کلونی‌های

رشد کرده با تهیه اسمیر و رنگ آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، کشت در محیط‌های Triptic soy borth با ۶/۵ درصد سدیم کلراید (NaCl) و محیط کشت Blie Esucline Agar ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که ارگانسیم‌های رشد کرده باکتری انتروکوکوس فکالیس می‌باشند. با توجه به تجزیه و تحلیل آماری هیچ گونه تفاوت معنی‌داری بین اثر ضد میکروبی سه گروه مورد آزمایش وجود نداشت ($p=0/99$).

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی نتیجه کشت در گروه‌های مطالعه

گروه‌های مطالعه	نتیجه کشت مثبت (n=16)	نتیجه کشت منفی (n=16)
گروه ۱ (هیدروکسید کلسیم)	-	۱۶ (۱۰۰)
گروه ۲ (کلرهگزیدین)	۱ (۶/۳)	۱۵ (۹۳/۸)
گروه ۳ (کارواکرول)	-	۱۶ (۱۰۰)

• داده‌ها به صورت فراوانی (و درصد فراوانی) گزارش شده است.
• مقدار ارزش احتمالی (P value) = ۰/۹۹

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در نمونه‌هایی که در معرض هیدروکسید کلسیم و کارواکرول قرار گرفته بودند، باکتری رشد نکرد درحالی که در ۶/۳ درصد از نمونه‌های گروه کلرهگزیدین باکتری رشد نمود. به طور کلی در بین سه ترکیب فوق اختلاف آماری معنی‌داری از جهت اثر ضد باکتریایی یافت نشد. شایع‌ترین گونه باکتری در کانال‌های ریشه درمان شده با ضایعات پری‌اپیکال پایدار، انتروکوکوس فکالیس می‌باشد (۶). انتروکوکوس فکالیس درصد کمی از فلور میکروبی کانال ریشه را تشکیل می‌دهد ولی ممکن است با تغییر شرایط اکولوژیک تکثیر یافته و باعث ایجاد عفونت‌هایی شود که به سختی درمان می‌شوند. از این نظر لزوم بررسی مواد جدید با اثرات ضد میکروبی در ضد عفونی کردن کانال ریشه حائز اهمیت می‌باشد (۳۳). طبیعی است که اثرات ضد میکروبی این مواد باید ابتدا در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شود. به طور کلی روش‌های گوناگونی برای تعیین اثر ضد میکروبی مواد در محیط آزمایشگاهی به کار می‌رود. روش تماس مستقیم به

کارآیی ماده و تماس مستقیم آن با میکروارگانسیم‌ها بستگی دارد. این روش ارتباطی به محلولیت و انتشار ماده ندارد (۳۴). برای بررسی میزان کارایی ضد میکروبی مواد مورد مطالعه در این تحقیق روش تماس مستقیم به کار گرفته شد. در حالت ایده‌آل، داروی مورد استفاده باید حداقل سمیت را داشته باشد و برای بافت‌های اطراف ریشه تحریک کننده نبوده و با کاهش التهاب اطراف آپکس باعث کاهش درد شده و با القای ساخت بافت سخت، موجبات درمان را ایجاد کند. هم‌چنین از تکثیر میکروارگانسیم‌ها که به طور مداوم صورت می‌گیرد، جلوگیری کرده و فعالیت استئوکلستیک را نیز مهار کند و به عنوان سدی علیه ورود مجدد میکروب‌ها عمل کرده و منابع تغذیه‌ای آن‌ها را قطع کند و به این ترتیب مانع عفونت مجدد سیستم کانال ریشه شده یا حداقل شانس عفونت مجدد را کاهش دهد (۵). امروزه هیدروکسید کلسیم شایع‌ترین داروی ضد میکروبی داخل کانال است. با این حال، اختلاف نظرهایی در مورد کارایی هیدروکسید کلسیم علیه انتروکوکوس فکالیس وجود دارد (۱۳). در این تحقیق هیدروکسید کلسیم در حذف انتروکوکوس فکالیس از کانال ریشه نمونه‌ها موثر بود. با این حال گزارش شده است که استفاده از هیدروکسید کلسیم در برخی موارد نتوانسته است گونه‌های انتروکوکوس فکالیس را از کانال ریشه دندان حذف نماید. این موضوع می‌تواند به کلونیزاسیون باکتریایی بیش‌تر در آپکس ریشه و بافت‌های پری‌اپیکال محیطی منجر شده، از پروسهٔ ترمیم پیشگیری نماید و تأثیر منفی در پیش‌آگهی درمان داشته باشد (۱۳). Cogo و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان کردند که کلسیم هیدروکساید به تنهایی اثر ضد میکروبی مناسبی بر علیه انتروکوکوس فکالیس ندارد و افزودن امپرازول که یک مهارکننده پمپ پروتون می‌باشد اثرات ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم را افزایش می‌دهد (۳۵). در سال ۲۰۱۴ نیز یک مرور سیستماتیک جهت بررسی اثر ضد باکتریایی هیدروکسید کلسیم در

ترکیب با کلر هگزیدین بر علیه انتروکوکوس فکالیس انجام شد. با بررسی ۴۵ مقاله مرتبط نتیجه گرفته شد که افزودن کلر هگزیدین به هیدروکسید کلسیم افزایش معنی داری در اثر ضد باکتریایی آن ایجاد نمی‌کند (۳۶).

کی از دلایل مقاومت انتروکوکوس فکالیس در برابر هیدروکسید کلسیم، توانایی نفوذ این باکتری به لایه‌های عمقی تر عاج می‌باشد. در این لایه‌های عمقی، PH در اثر فعالیت بافری عاج خنثی می‌باشد. به این ترتیب انتروکوکوس فکالیس در لایه‌های عمقی عاج از افزایش PH ناشی از هیدروکسید کلسیم و مرگ سلولی در امان می‌ماند (۳۷).

در مطالعه حاضر از بین رفتن انتروکوکوس فکالیس در داخل کانال ریشه ارزیابی شده است نه در عمق توبول‌های عاجی. بنابراین این احتمال وجود دارد که علی‌رغم از بین رفتن انتروکوکوس فکالیس در سیستم کانال ریشه هنوز باکتری‌هایی زنده در توبول‌های عاجی باقی مانده باشند. این مسئله می‌تواند یکی از دلایل تناقض نتیجه مطالعه حاضر با مطالعات قبلی باشد. در رابطه با زمان اثر گذاری هیدروکسید کلسیم نیز در مطالعات مختلف اختلاف نظر هایی مشاهده می‌شود. در برخی مطالعات زمان ۴۸ ساعت برای اعمال اثر ضد میکروبی مناسب هیدروکسید کلسیم بر علیه انتروکوکوس فکالیس ذکر شده است (۳۸،۳۹)، در حالیکه در برخی مطالعات حداقل زمان مورد نیاز جهت اثر ضد میکروبی مناسب هیدروکسید کلسیم یک هفته گزارش شده است (۴۰،۴۱). در مطالعه ما هیدروکسید کلسیم پس از ۴۸ ساعت توانست انتروکوکوس فکالیس را از داخل کانال ریشه حذف نماید. کلر هگزیدین با غلظت‌های پایین‌تر از ۰/۲ درصد در از بین بردن انتروکوکوس فکالیس ناتوان است (۳۴،۱۳). ما در این مطالعه از غلظت ۰/۲ درصد کلر هگزیدین با روش تماس مستقیم استفاده کردیم که در حال حاضر بالاترین غلظت موجود از این دارو در بازار ایران می‌باشد. طبق نتایج تحقیق کنونی فقط در ۶/۳ درصد از نمونه‌های گروه کلر هگزیدین ۰/۲

درصد، انتروکوکوس فکالیس از بین نرفته بود. در یک مرور سیستماتیک در سال ۲۰۱۳ بیان شد که کلر هگزیدین ۲ درصد و هیپوکلریت سدیم فعالیت ضد باکتریایی موثری بر علیه انتروکوکوس فکالیس نشان می‌دهند و میزان فعالیت آن‌ها به‌طور عمده تحت تاثیر عواملی هم‌چون نحوه انجام آزمایش و مدت زمان تماس این مواد با میکروارگانیسم قرار دارد (۴۲). Marickar و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که کلر هگزیدین ۲ درصد برخلاف هیدروکسید کلسیم کاهش معنی داری در تعداد باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس ایجاد می‌کند (۱۹).

در سال ۲۰۱۰، Delgado و همکاران گزارش کردند که هیدروکسید کلسیم و کلر هگزیدین ۲ درصد در حذف انتروکوکوس فکالیس از کانال‌های ریشه آلوده موثر می‌باشند ولی کلر هگزیدین فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری دارد و ترکیب نمودن هیدروکسید کلسیم با کلر هگزیدین هیچ افزایش معنی داری در خاصیت ضد میکروبی کلر هگزیدین ایجاد نمی‌کند (۲۰).

در سال ۲۰۱۴، sonam و همکاران پس از مقایسه کلر هگزیدین ۲ درصد و پروپولیس و هیدروکسید کلسیم گزارش کردند که کلر هگزیدین ۲ درصد بیش‌ترین و هیدروکسید کلسیم کم‌ترین فعالیت ضد میکروبی بر علیه انتروکوک فکالیس را از خود نشان می‌دهد. بر خلاف مطالعات فوق در مطالعه حاضر اختلاف معنی داری در خاصیت ضد میکروبی هیدروکسید کلسیم و کلر هگزیدین ۲ درصد یافت نشد (۲۱). یکی از نقائص مطالعه ما این بود که در این مطالعه روش استفاده از مواد آنتی باکتریال در بین سه گروه متفاوت بود و حجم هیدروکسید کلسیم استفاده شده بیشتر از دو ماده دیگر بود که قطعاً در نتیجه مطالعه موثر است. اخیراً کارواکرول به عنوان یک داروی گیاهی داخل کانال موثر مطرح شده است. تا امروز در رابطه با بررسی خواص کارواکرول مطالعات زیادی انجام نشده است. در مطالعه Pereira و همکاران در سال ۲۰۰۶ فاز

از جمله انتروکوکوس فکالیس موثر می‌باشند (۴۴). در مطالعه حاضر از کارواکرول ۹۴ درصد استفاده شد که به نحو موثری قادر به حذف انتروکوکوس فکالیس از داخل کانال ریشه بود. در این مطالعه خمیر هیدروکسید کلسیم، کلرهگزیدین ۰/۲ درصد و کارواکرول ۹۴ درصد همگی به طور موثری در از بین بردن انتروکوکوس فکالیس از داخل کانال عمل کردند و اختلاف معنی‌داری در بین آن‌ها وجود نداشت. بنابراین کارواکرول به عنوان یک داروی گیاهی موثر جهت شست و شوی داخل کانال می‌تواند مطرح شود. با این حال با توجه به تفاوت‌های زیادی که بین شرایط آزمایشگاهی و کلینیکی وجود دارد، نیاز به انجام مطالعات کلینیکی برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر در این زمینه وجود دارد. هم‌چنین با توجه به این که تاکنون مطالعات محدودی در رابطه با خواص کارواکرول انجام شده است پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیش‌تر و با حجم نمونه بزرگ‌تر بر روی خواص ضد میکروبی و سایر خواص این ترکیب گیاهی انجام شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جهت تامین هزینه‌های این طرح تقدیر و تشکر می‌گردد. این مقاله منتج از پایان‌نامه دکترای دندانپزشکی به شماره ۳۲۷ می‌باشد.

References

1. Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *J Endod* 2002; 28(3): 163-167.
2. Shurrab MY. Antimicrobial efficiency of some antiseptic products on endodontic microflora isolated from gangrenous pulp tissue. *J Contemp Dent Pract* 2006; 7(4): 53-62.
3. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod* 2006; 32(2): 104-109.
4. Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *J Endod* 2006; 32(10): 946-950.

هگزان عصاره برگ *Arctium lappa* به دلیل وجود جزء کارواکرول در ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های شایع حفره دهان از جمله انتروکوکوس فکالیس بسیار موثر بود (۴۳).

در مطالعه Sharifian و همکاران مشاهده شد کارواکرول با غلظت ۰/۳ درصد اثر مهاری بر رشد باکتری انتروکوکوس فکالیس داشته و در غلظت ۰/۶ درصد باعث حذف کامل آن از محیط کشت می‌شود. هم‌چنین میزان کاهش باکتری در گروه کارواکرول با غلظت ۰/۶ درصد تفاوت معنی‌داری با گروه هیدروکسید کلسیم نداشت. بنابراین آن‌ها بیان کردند این ماده می‌تواند به عنوان یک داروی داخل کانال موثر در فواصل جلسات درمان مورد استفاده قرار گیرد که با نتایج مطالعه ما هم خوانی دارد (۳۲).

Samadi و همکارانش در سال ۲۰۱۱ خواص ضد میکروبی کارواکرول و سدیم هیپوکلریت و کلر هگزیدین را به عنوان داروهای داخل کانال بررسی کردند و اختلاف آماری معنی‌داری در بین این مواد نیافتند که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. آن‌ها هم‌چنین گزارش کردند که کارواکرول با حداقل غلظت مهاری ۰/۳۱ mg/ml می‌تواند یک شست و شو دهنده موثر ضد میکروبی باشد (۲۴). Seghatoleslami و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که کارواکرول در غلظت ۰/۳۱ mg/ml بر علیه اکثر پاتوژن‌های دهانی

5. Stojanović N, Krunić J, Popović B, Stojičić S, Zivković S. Prevalence of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis* in infected root canals and their susceptibility to endodontic treatment procedures: a molecular study. *Srp Arh Celok Lek* 2014; 142(9-10): 535-541.
6. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36(1): 1-11.
7. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod* 2007; 33(8): 917-925.
8. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 2011; 44(8): 697-730.
9. Jhamb S, Nikhil V, Singh V. An in vitro study of antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *Indian J Dent Res* 2010; 21(4): 512-514.
10. Dianat O, Saedi S, Kazem M, Alam M. Antimicrobial Activity of Nanoparticle Calcium Hydroxide against *Enterococcus Faecalis*: An In Vitro Study. *Iran Endod J* 2015; 10(1): 39-43.
11. Rahimi S, Janani M, Lotfi M, Shahi S, Aghbali A, Vahid Pakdel M, Salem Milani A, Ghasemi N. A review of antibacterial agents in endodontic treatment. *Iran Endod J* 2014; 9(3): 161-168.
12. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 2003; 36(4): 267-275.
13. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(5): 618-624.
14. Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *J Oral Sci* 2007; 49(2): 161-166.
15. Jorge KM, de Carvalho RF, Vieira VL, Gabardo MC, Gonçalves LM, Deonizio MD. Calcium Hydroxide Dressing Influences the Obturation of Simulated Lateral Canals. *J Contemp Dent Pract* 2015; 16(6): 468-473.
16. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009; 42(4): 288-302.
17. Bazvand L, Aminozarbian MG, Farhad A, Noormohmmadi H, Hasheminia SM, Mobasherizadeh S. Antibacterial effect of triantibiotic mixture, chlorhexidine gel, and two natural materials Propolis and Aleo vera against *Enterococcus feaecalis*: An ex vivo study. *Dent Res J (Isfahan)* 2014; 11(1): 469-474.
18. Kayaoglu G¹, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Gençay Ö, Sorkun K, et al. Antibacterial activity of Propolis versus conventional endodontic disinfectants against *enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *J Endod* 2011; 37(2): 376-381.
19. Marickar RF, Geetha RV, Neelakantan P. Efficacy of contemporary and novel Intracanal medicaments against *enterococcus faecalis*. *J Clin Pediatr Dent* 2014; 39(1): 47-50.
20. Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, Bramante CM,

- Campanelli AP, Bernardineli N. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010; 36(8): 1389-1393.
21. Bhandari S.TSA, Patil CR. An in Vitro Evaluation of Antimicrobial Efficacy of 2% Chlorhexidine Gel, Propolis and Calcium Hydroxide Against *Enterococcus faecalis* in Human Root Dentin. *J Clin Diagn Res* 2014; 8(11): 60-63.
22. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 2010; 54(3): 291-312.
23. Agarwal P, Nagesh L, Murlikrishnan. Evaluation of the antimicrobial activity of various concentrations of Tulsi (*Ocimum sanctum*) extract against *Streptococcus mutans*: An in vitro study. *Indian J Dent Res* 2010; 21(1): 357-359.
24. Samadi N, Zaree R, Bakhtiar H, Salehnia A, Azimi S. Comparative antibacterial efficacy of endemic *Satureja khuzistanica* jamzad essential oil, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate solutions as root canal irrigations. *Dent Res J (Isfahan)* 2011; 8(1): 28-32.
25. Eftekhar F, Raei F, Yousefzadi M, Ebrahimi SN, Hadian J. Antibacterial activity and essential oil composition of *Satureja spicigera* from Iran. *Z Naturforsch C* 2009; 64(1-2): 20-24.
26. Amanlou M, Dadkhah F, Salehnia A, Farsam H, Dehpour AR. An anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Satureja khuzistanica* Jamzad extract. *J Pharm Pharm Sci* 2005; 8(1): 102-106.
27. Farsam H, Amanlou M, Radpour MR, Salehnia AN, Shafiee A. Composition of the essential oils of wild and cultivated *Satureja khuzistanica* Jamzad from Iran. *Flavour Fragr J* 2004; 19(2): 308-310.
28. Pappen FG, Qian W, Aleksejūniene J, Leonardo Rde T, Leonardo MR, Haapasalo M. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of bovine serum albumin. *J Endod* 2010; 36(2): 268-271.
29. Sahraroo A, Mirjalili MH, Corchete P, Babalar M, Fattahi Moghadam MR. Establishment and characterization of a *Satureja khuzistanica* Jamzad (*Lamiaceae*) cell suspension culture: a new in vitro source of rosmarinic acid. *Cytotechnology* 2015; 3(5): 95-103.
30. Nosrat A, Bolhari B, Sharifian MR, Aligholi M, Mortazavi MS. The effect of Carvacrol on *Enterococcus faecalis* as a final irrigant. *Iran Endod J* 2009; 4(3): 96-100.
31. Honório VG, Bezerra J, Souza GT, Carvalho RJ, Gomes-Neto NJ, Figueiredo RC, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1,8-cineole. *Front Microbiol* 2015; 6(3): 12-23.
32. Sharifian MR, Shokouhinejad N, Aligholi M, Emaneini M, Alizadeh J. Antibacterial substantivity of Carvacrol and sodium hypochlorite in infected bovine root dentin. *Iran Endod J* 2009; 4(2): 45-48.
33. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(2): 100-103
34. Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006; 32(2): 138-141.

35. Cogo DM, Oliveirab SD, Antunesb FC, Kopperc PM, Nasáriob JS, Vier-Pelisser FV. Potentiation of the action of calcium hydroxide on *Enterococcus faecalis* by proton pump inhibitor omeprazole. *Revista Odonto Ciencia (Journal of Dental Science)* 2015; 30(3): 76-80.
36. Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci* 2014; 22(5): 356-365.
37. Adl A, Hamedi S, Sedigh Shams M, Motamedifar M, Sobhnamayan F. The ability of triple antibiotic paste and calcium hydroxide in disinfection of dentinal tubules. *Iran Endod J* 2014; 9(2): 123-126.
38. Estrela C, Rodrigues de Araújo Estrela C, Bammann LL, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endod* 2001; 27(12): 720-723.
39. Amorim Lde F, Toledo OA, Estrela CR, Decurcio Dde A, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J* 2006; 17(4): 317-322.
40. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Aust Dent J* 2007; 52(2): 118-121.
41. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(5): 618-624.
42. Luddin N, Ahmed HM. The antibacterial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: A review on agar diffusion and direct contact methods. *J Conserv Dent* 2013; 16(1): 9-16.
43. Pereira JV, Bergamo DC, Pereira JO, França Sde C, Pietro RC, Silva-Sousa YT. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. *Braz Dent J* 2005; 16(3): 192-196.
44. Seghatoleslami S, Samadi N, Salehnia A, Azimi S. Antibacterial activity of endemic *Satureja Khuzistanica* Jamzad essential oil against oral pathogens. *Iranian Endodontic Journal* 2009; 4(1): 5-9.