

Dört Farklı Kalsiyum Hidroksit İçerikli Karışımın Kök Kanal Dentinindeki *Enterococcus faecalis*'e Karşı Antibakteriyel Etkinliği: Bir İn Vitro Çalışma

ANTIBACTERIAL EFFECT OF FOUR DIFFERENT CALCIUM HYDROXIDE CONTAINING MEDICAMENTS AGAINST ENTEROCOCCUS FAECALIS IN ROOT (CANAL) DENTINE: AN IN VITRO STUDY

Dr. Ertuğrul ERCAN,^a Dt. Mehmet DALLI^b

^aDiş Hastalıkları ve Tedavisi AD, Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, KIRIKKALE

^bDiş Hastalıkları ve Tedavisi AD, Dicle Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, DİYARBAKIR

Özet

Amaç: Bu çalışmanın amacı, kalsiyum hidroksit içerikli kök kanal antiseptiklerinin *Enterococcus faecalis*'e karşı antibakteriyel etkilerini in-vitro ortamda değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmada yeni çekilmiş 50 adet tek köklü maksiller ön grup diş kullanıldı. Kök kanalları K-tipi eğelerle genişletilerek, otoklavda sterilize edildikten sonra *E. faecalis* ile enfekte edildi. Daha sonra dişler rastgele 5 gruba (n: 10) ayrıldı: **1. grup;** Ca(OH)₂ + distile su; **2. grup;** Ca(OH)₂ + gliserin; **3. grup;** Ca(OH)₂ + %0.12 klorheksidin glukonat (2:1); **4. grup;** Ca(OH)₂ + %2 klorheksidin glukonat (2:1); **5. grup;** kontrol gurubu herhangi bir materyal yerleştirilmedi. Kalsiyum hidroksit patları bir lentüloyle kanala yerleştirilerek 1. gün, 7. gün ve 30. günde antibakteriyel etkinlikleri değerlendirildi. Her periyot sonunda (1. gün, 7. gün ve 30. gün) kanal antiseptiklerini uzaklaştırmak amacıyla kök kanalları izotonik solüsyonla yıkandı ve paper pointle kurutuldu. Düşük devirli mikromotora steril frez kullanılarak kök kanallarından dentin parçacıkları toplandı. Toplanan bu dentin parçacıkları BHI dolu tüplerde toplandı. Mikrobiyal örnekler bu tüplerde 37°C'de 24 saat inkübe edildi ve petri kutusunda oluşturdukları CFU hesaplandı.

Bulgular: Dört farklı tipteki kalsiyum hidroksit karışımı kanal patının *E. faecalis*'e karşı antibakteriyel etkinliğinin değerlendirildiği bu çalışmada Ca(OH)₂ + %2 klorheksidin glukonat karışımı en yüksek antibakteriyel etkinlik gösterirken, bunu sırasıyla Ca(OH)₂ + %0.12 klorheksidin glukonat, Ca(OH)₂ + distile su ve Ca(OH)₂ + gliserin takip ettiği tespit edilmiştir.

Sonuç: *E. faecalis* ile enfekte kök kanallarında in vitro ortamda yapılan çalışmada Ca(OH)₂ + %2 klorheksidin glukonat karışımın en etkili olduğu saptanmıştır. Bu patın antibakteriyel etkinliğini in vivo ortamda da değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Kalsiyum hidroksit, kanal antiseptikleri, *E. faecalis*

Türkiye Klinikleri J Dental Sci 2006, 12:37-42

Geliş Tarihi/Received: 27.09.2005

Kabul Tarihi/Accepted: 06.03.2005

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Ertuğrul ERCAN
Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi,
Diş Hastalıkları ve Tedavisi AD, 71100, KIRIKKALE
ertugrulercan@hotmail.com

Copyright © 2006 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Dental Sci 2006, 12

Abstract

Objective: The purpose of this study was to evaluate the efficiency of four intracanal medications in the root dentin of teeth with *Enterococcus faecalis*.

Material and Methods: Fifty freshly extracted, single-rooted maxillary anterior teeth were used. After, the root canals were hand-instrumented and autoclave-sterilized they were infected with *E. faecalis*. The roots were divided into five groups of 10 each. Subsequent intracanal medicament placement were follows: **Group 1:** calcium hydroxide/distilled water solution; **Group 2:** calcium hydroxide/glycerin; **Group 3:** calcium hydroxide/0.12% chlorhexidine gluconate; **Group 4:** calcium hydroxide/2% chlorhexidine gluconate; **Group 5:** control group, wet canal (distilled water) without medication. After filling the root canals with the used medicaments, their antibacterial efficiencies were evaluated after 1 day, 7 day and 30 days respectively. After each period, irrigation with sterile saline to remove the medicament was performed and the canals were dried with sterile paper points. Dentine chips were removed from the canals with sequential sterile round burs at low speed. The samples obtained with each bur were immediately collected in separate test tubes containing BHI broth. The tubes were incubated at 37°C for 24 hours and samples were plated to count the colon-forming units (CFU).

Results: Among four different types of intracanal medicaments, it was found that Ca(OH)₂ + 2% chlorhexidine gluconate had the highest antibacterial efficiency followed by Ca(OH)₂ + 0.12% chlorhexidine gluconate, Ca(OH)₂ + distile water and Ca(OH)₂ + glycerin.

Conclusion: Ca(OH)₂ mixed 2% chlorhexidine gluconate was found the most effective in eliminating *E. faecalis* cells from dentinal specimens in vitro. We believe further evaluations in vivo should be considered.

Key Words: Calcium hydroxide, intracanal medicaments, *E. faecalis*

Mikroorganizmaların pulpa ve periapikal doku hastalıklarının gelişmesinde en önemli neden olduğu bilinmektedir.¹⁻³ Günümüzde normal ağız florasında 300'den fazla bakteri çeşidi olduğu tespit edilmiştir.^{4,5} Kök ka-

nallarında ve periapikal bölgede hastalıkların gelişmesinde bu bakteriler önemli rol oynamaktadır.⁶ Enfekte kök kanallarında ise bakterilerin büyük çoğunluğu anaerobiktir.^{7,8} Bu nedenle başarılı bir kanal tedavisi için tüm mikroorganizmaların kök kanal sisteminden elimine edilmesi gerekmektedir.⁹ Bununla birlikte, kök kanallarındaki inatçı bakterilerin yok edilememesi kanal tedavisinde başarısızlıklara sebep olabilmektedir.¹⁰ Bu nedenle, kanalların mekanik preparasyonla birlikte kimyasal dezenfeksiyondan da yararlanması gerekmektedir.^{11,12}

Günümüzde enfekte kök kanalının tedavisinde dezenfeksiyon amacıyla en sık kullanılan pansuman ilacı kalsiyum hidroksittir.¹³ Ca(OH)_2 antibakteriyel etkinliğini, hidroksil (OH^-) iyonlarının difüzyon yeteneği ile mekanik preparasyon ve irrigasyon solüsyonuyla ulaşılamayan alanlardaki organik materyali eriterek gösterir. Böylece kanal temizliğini sağlayabilmektedir.¹⁴ Tüm alkalilerde olduğu gibi, hücre membranı ve protein yapıları üzerinde yıkım yaparak etkisini gösterir.^{15,16}

Bununla birlikte, dentin kanalları içerisindeki özellikle *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans* gibi inatçı bakterilerin Ca(OH)_2 'e dirençli olduğu belirtilmektedir.¹⁷⁻¹⁹ Klorheksidin'in dentin tübüllerini dezenfekte etmesi ve diş sert dokularına bağlanarak yavaş salınım yapmasından dolayı, endodontik tedavide hem irrigasyon solüsyonu olarak hem de kanal dezenfektanı olarak kullanılmaktadır.²⁰⁻²² Klorheksidin, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere, mayalara ve mantarlara karşı önemli düzeyde antibakteriyel etkilidir.^{23,24} Klorheksidin'in ayrıca *E. faecalis* gibi inatçı bakteriler karşısında da etkili bir antibakteriyel aktivite gösterdiği bilinmektedir.²⁵

Bu çalışmanın amacı, Ca(OH)_2 'in dört farklı formunun enfekte dentin tübüllerinde *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinliğini in vitro şartlarda değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntemler

Bu çalışmada, periodontal nedenlerle çekimi yapılan, 50 adet çürüksüz ve restorasyonsuz üst kesici diş kullanıldı. Dişler kavite preparasyonları

yapılıncaya kadar, %10'luk formol solüsyonu içerisinde saklandı. Yumuşak doku artıklarını temizlemek amacıyla, %5'lik sodyum hipoklorit (Winzard, Rehber Kimya-Türkiye) solüsyonu içerisinde 30 dk. bekletilen dişler, mikromotora takılan fırça ve lastiklerle ponza kullanılarak temizlendi.

Dişlerin kronları mine-sement birleşim bölgesinden kesilerek uzaklaştırıldı. Kök kanallarının preparasyonu K-tipi (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) eğeyle 40 nolu eğeye kadar step-back tekniği ile yapıldı. Preparasyonu esnasında her eğe değişiminde 1 cc, son yıkama solüsyonu olarak 4 cc toplam 9 cc %5.25'lik NaOCl irrigasyon solüsyonu kullanılarak kanallar yıkandı. Smear tabakasını ve kök kanal duvarındaki yüzeyel debrisini uzaklaştırmak için %17'lik EDTA uygulandı.

Daha sonra dişler otoklav da 121°C'de 30 dk. inkübe edildi. *E. faecalis* ile enfekte etmek için önce beyin kalp infüzyonlu buyyona ekildi, 37°C' de 5 gün inkübe edildi. Beş gün sonunda beyin kalp infüzyonlu buyyondan çıkarılan kökler %0.92'lik izotonik solüsyonu ile yıkama yapılarak steril kağıt konularla kurutuldu.

Çalışma esnasında dişler rastgele 5 gruba (n: 10) ayrıldı: **1. grup;** Ca(OH)_2 + distile su; **2. grup;** Ca(OH)_2 + gliserin; **3. grup;** Ca(OH)_2 + %0.12 klorheksidin glukonat (2:1, Peridex® gargara); **4. grup;** Ca(OH)_2 + %2 klorheksidin glukonat (2:1 Drogosan İlaç-Ankara); **5. grup;** kontrol grubu herhangi bir materyal yerleştirilmedi. Bu beş grupta 35°C'de %100 nemli bir ortamda 1 hafta süreyle inkübe edildi.

Birinci, 7. ve 30. gün petri kutusundan çıkartılan dişlerin içine yerleştirilmiş olan patları uzaklaştırmak amacıyla dişler, 2 mL izotonik solüsyonla yıkandı. Test bakterisinin kanalda yaşayıp yaşamadığını öğrenmek için kök kanalı düşük devirli mikromotora (Gates giyleden frezle) prepare edildi ve dentin parçaları toplandı. Eşit miktarda dentin parçası toplanması için yaklaşık olarak 0.4 mm (400 µm) genişliğinde kök kanalında aşındırma yapıldı. Her bir frez yaklaşık olarak 0.1 mm ve 4 mg dentin uzaklaştırdı. Kanaldan uzaklaştırılan

Tablo 1. Kalsiyum hidroksit karışımlarının 1. gün, 7. gün ve 30. günde oluşturdukları inhibisyon çapları (mm).

Çalışmada Kullanılan Kalsiyum Hidroksit İçerikli Karışımlar	1. Gün İnhibisyon çapları (mm)	7. Gün İnhibisyon çapları (mm)	30. Gün İnhibisyon çapları (mm)
Ca(OH) ₂ + distile su	3	6	12
Ca(OH) ₂ + gliserin	3	6	8
Ca(OH) ₂ + %0.12 klorheksidin glukonat	6	11	19
Ca(OH) ₂ + %2 klorheksidin glukonat	8	14	28
Kontrol gurubu	0	0	0

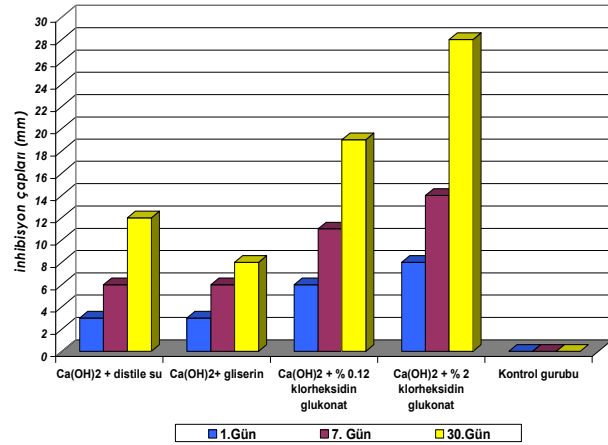
dentin parçacıklarını standardize etmek amacıyla beyin BHI (kalp infüzyonlu buyyona) ağırlığı dentin toplanmadan önce ve sonraki ağırlığı tartıldı. Aseptik şartlarda kanallardan toplanan dentin parçacıkları yeni hazırlanmış 3.0 mL BHI ve kanal antiseptiğinin etkisini nötralize etmek için hazırlanan nötralizer (Ca(OH)₂ için 0.5% sitrik asit, Klorheksidin (Chx) ve karışımları için %0.5 Tween 80 + %0.07 lesitin) içeren tüplere yerleştirildi.

Toplanan dentin parçaları beyin kalp infüzyonlu buyyona ekim yapıldı. Kanlı agarda anaerobik ortamda 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan inhibisyon zonları hesaplanarak belirlendi. Pozitif kültür için Gram boyama, katalaz enzimi, koloni morfolojisi BHI kanlı agarda yapıldı ve biyomekanikal belirleme için de kit olarak API 20 Strep (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) kullanıldı.

Bulgular

Tek kör, rastgele, karşılaştırmalı olarak planlanan bu çalışmada kanal antiseptiklerinin *E. faecalis* üzerinde oluşturdukları inhibisyon çapları tek bir araştırmacı tarafından kaydedilmiştir. Tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizi kullanarak 1. gün, 7. gün ve 30. gündeki veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Kalsiyum hidroksit karışımı 1. gün, 7. gün ve 30. günde oluşturdukları inhibisyon çapları (mm) Tablo 1'de gösterilmektedir. Kalsiyum hidroksit karışımının in vitro şartlarda değerlendirildiğinde, antibakteriyel etkinliğini bakteri ile temasta olduğu sürece arttırdığı görülmüştür (Grafik 1). Ortalama inhibisyon çapları ölçüldüğünde Ca(OH)₂ + %2

**Grafik 1.** Kalsiyum hidroksit karışımlarının antibakteriyel etkinlikleri.

klorheksidin glukonat karışımının tüm ölçümlerde üstün bir antibakteriyel etki gösterdiği tespit edildi ($p < 0.05$). Bununla birlikte 1. günde 8 mm ve 30. günde 28 mm ölçülen inhibisyon çapların istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği görüldü ($p < 0.05$). Ölçülen inhibisyon çaplarına göre en etkili Ca(OH)₂ + %2'lik klorheksidin glukonat karışımı bunu sırasıyla Ca(OH)₂ + %0.12'lik klorheksidin glukonat, Ca(OH)₂ + distile su ve Ca(OH)₂ + gliserin karışımı takip etmektedir. Kontrol grubunda ise herhangi bir inhibisyon çapı ölçülemedi ($p = 0.05$).

Tartışma

Kalsiyum hidroksitin kanal antiseptiği olarak antibakteriyel etkinliğini değerlendirdiğimiz bu çalışmada, Orstavik & Haapasalo'nun geliştirdiği, dentin kanallarının enfeksiyon ve dezenfeksiyonunda kullanılan in vitro test modeli kullanıldı.¹⁷

Kalsiyum hidroksit, enfekte kök kanallarının pansumayı patı olarak sıklıkla kullanılmaktadır.^{13,26} Bununla birlikte, kalsiyum hidroksitin kök kanalı içinde yer alan bakterilerin tamamına yakın etkili bir biçimde elimine edebilmesine karşın, bu etkisini dentin tübülleri içinde bulunan bakterilerde, özellikle *E. faecalis* üzerinde gösteremediği iddia edilmektedir.^{17,18}

Bu nedenlerden dolayı, endodontik tedavide mekanik preparasyonun yanı sıra, kök kanallarında antibakteriyel etkili patların da kullanılması gerekebilmektedir.¹¹ Başarısızlıkla sonuçlanan endodontik tedavilerde ise, kullanılan antibakteriyel solüsyona karşı dirençli bir ortam olduğu düşünülmektedir.²⁷ Bu tip olguların %20-40'ında etken olarak *E. faecalis* bulunmuştur. Enfekte kök kanallarından en fazla izole edilen mikroorganizmalar, fakültatif anaeroblardır.^{27,28} Bunlar içerisinde *E. faecalis* gibi dirençli bakteriler, endodontik tedavide başarısızlığa sebep olabilmektedirler.²⁹ Çalışmamızda *E. faecalis*, kök kanalında yıkama solüsyonlarına direnç göstermesi ve kanal tedavisinde başarısızlıklara yol açmasından dolayı test bakterisi olarak kullanılmıştır.^{30,31}

Kanal tedavisinde bakteriyel enfeksiyona bağlı olarak periapikal lezyonların görülmesi sık karşılaşılan bir durumdur.³² Bu tip olgularda, dişlerin çekim ya da apikal rezeksiyon yerine, kanal tedavisinin yenilenmesi tercih edilmektedir.³³ Periapikal lezyonlu dişlerde yapılan çalışmalarda, kanallara Ca(OH)₂ patı yerleştirilerek dezenfeksiyon sağlandığında lezyonun küçülerek iyileştiği tespit edilmiştir.^{34,35} Bununla beraber, kalsiyum hidroksitin hem enterekokların hem de mantarların bulunduğu bazı enfeksiyonlarda etkisiz kaldığı belirtilmektedir.^{12,36,37} Çalışmamızda da in vitro ortamda enfekte insan dişlerinin dentin tübüllerinde, Ca(OH)₂+ distile su karışımının *E. faecalis*'e karşı antibakteriyel etkinliğinin, Ca(OH)₂+ %2'lik klorheksidin glukonat karışımına oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük çıktığının görülmesi bu savı desteklemektedir. Araştırmamızın bulguları; Siqueira ve ark., Sukawat ve ark., Gomes ve ark.'nın çalışma sonuçlarıyla uyum gösterirken, Estrela ve ark., Lynne ve ark., Schäfer ve ark.'nın sonuçlarıyla çelişmektedir.^{13,37-41}

Yine benzer şekilde Heling ve ark. yaptıkları çalışmada, *E. faecalis* enfekte ettikleri sığır dentin tübülleri üzerinde, kontrollü salınım apareyi ile uygulanan klorheksidin glukonat ve pat formundaki Ca(OH)₂'in etkisini karşılaştırmışlar, klorheksidinin kullanıldığı örneklerde bakteri popülasyonunda bariz bir azalma gözlenirken, Ca(OH)₂'de böyle bir etki saptanamamıştır. Siqueira ve Uzeda, farklı kanal pansuman materyallerinin antibakteriyel etkilerini karşılaştırdıkları in vitro çalışmada, %0.12'lik klorheksidin jelin pat formundaki Ca(OH)₂'den çok daha etkili olduğunu bulmuşlardır.^{18,42}

Klorheksidin glukonatin diş sert dokularına bağlanarak yavaş salınım yapması, endodontide kullanımı açısından büyük bir avantajdır. White ve ark.; %2'lik klorheksidin glukonat ile yıkanan kanallarda antibakteriyel etkinliğin 72 saat sonra bile devam ettiğini, ancak %0.12'lik klorheksidin glukonatin etkinliğinin 6-24 saat arası sürdüğünü bildirmişlerdir.⁴³

Klorheksidin glukonatin, Gram (-) ve Gram (+) bakterilerden, dermatitlere kadar olan geniş spektrumu; düşük konsantrasyonlarında bakteriyostatik, yüksek konsantrasyonlarında ise bakterisit etki göstermektedir. Ayrıca, asidik proteinlerin yüzeylerine absorpsiyonu ve aktif katyonik yüzeylerden derece derece salınımı gibi özelliklerinde mevcut olduğu bildirilmektedir.²⁰⁻²²

Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuca göre, *E. faecalis* ile enfekte olan dişlerde Ca(OH)₂ + klorheksidinin kanal antiseptiği olarak kullanımı Ca(OH)₂ + distile suya karşı üstün bir antibakteriyel etkinlik göstermektedir. Kalsiyum hidroksit ile klorheksidin glukonatin karıştırılması, enfekte kök kanallarında antibakteriyel etkinliği arttırmaktadır. Bununla birlikte, yapılan çalışmanın in vitro olmasından dolayı ilacın etkinliğini olumlu veya olumsuz yönde etkileyebilecek çeşitli faktörlerin olmaması çalışmamızın eksik tarafıdır. Bu çalışmanın in vivo şartlarda yapılması durumunda daha kesin sonuçlar alınabilecektir. Kanımızca, Ca(OH)₂'nin klorheksidin ile karıştırılarak etkinliğinin artırılması ancak uzun yıllar başarıyla kullanılmış olan Ca(OH)₂'in antibakteriyel etkinliğini tek başına yetersiz kaldığı durumlarda düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ: The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *J South Calif Dent Assoc* 34: 449, 1966
2. Möller AJ, Fabricius L, Dahle'n G, Ohman AE, Heyden G: Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 89: 475, 1981
3. Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Möller AJR: Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 90: 200, 1982
4. Siren EK, Haapasalo MPP, Waltimo TMT, Orstavik D: In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci* 112: 326, 2004
5. Moore WE, Moore LV: The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 5: 66, 1994
6. Sundqvist G: Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78: 522, 1994
7. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U: Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod* 15: 13, 1989
8. Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M: Evaluation of root canal bacteria and their susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol* 12: 318, 1997
9. Briseno BM, Wirth R, Hamim G, Standhartinger W: Efficacy of different irrigation methods and concentrations of root canal irrigation solution on bacteria in root canal. *Endod Dent Traumatol* 8: 6, 1992
10. Lin LM, Skribner JE, Gaengler P: Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod* 18: 625, 1992
11. Chong BS, Pitt Ford TR: The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J* 25: 97, 1992
12. Byström A, Claesson R, Sundqvist G: The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1: 170, 1985
13. Siqueira FF Jr, Lopes HP: Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: A critical review. *Int Endod J* 32: 361, 1999
14. Foreman PC, Barnes LE: A review of calcium hydroxide. *Int Endod J* 23: 283, 1990
15. Spangberg LSW. Intracanal medication. In: Ingle JI, Bakland LK, eds. *Endodontics* 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, p.627
16. Estrela C, Rodrigues de Araujo Estrela C, Bammann LL, Pecora JD: Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endod* 27:720, 2001
17. Orstavik D, Haapasalo M: Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 6: 142, 1990
18. Heling I, Sommer M, Steinberg D, Friedman M, Sela MN: Microbiological evaluation of efficacy of chlorhexidine in sustained-release device for dentine sterilization. *Int Endod J* 25: 15, 1992
19. Waltimo T, Orstavik D, Siren E, Haapasalo M: In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 32: 421, 1999
20. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW: The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 53: 518, 1982
21. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol* 9: 243, 1993
22. Jeansonne MJ, White RR: A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 20: 276, 1994
23. Waler SM: Further in vitro studies on the plaque inhibiting effect of chlorhexidine and its binding mechanisms. *Scand J Dent Res* 98: 422, 1990
24. Şen BH, Safavi ES, Spangberg LSW: Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod* 25: 235, 1999
25. Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M: Efficacy of a sustained release device containing chlorhexidine and Ca(OH)₂ in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J* 25:20, 1992
26. Siquera JF, Uzeda M: Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod* 24: 663, 1998
27. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB: Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent* 29: 47, 1996
28. Cavalleri G, Cuzzolin L, Urbani G, Benoni G: Root canal microflora: Qualitative changes after endodontic instrumentation. *J Chemotherapy* 1: 101, 1989
29. Haapasalo M, Orstavik D: In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*. 66: 1375, 1987
30. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T: Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 31: 1, 1998
31. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M: Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 26: 593, 2000
32. Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Selbst AG, Levy BM: Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. *J Endod* 7: 117, 1981
33. Chivan N: Surgical treatment- A conservative approach, *JNJ Dent Soc* 40: 234, 1969
34. Weiger R, Axmann-Krcmar D, LoËst C: Prognosis of conventional root canal treatment reconsidered. *Endod Dent Traumatol* 14: 1, 1998
35. Sjoegren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G: Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30: 297, 1997
36. Waltimo T, Siren E, Torkko H, Olsen I, Haapasalo M: Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 30: 96, 1997

37. Sukawat C, Srisuwan T: A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. J Endod 28: 102, 2002
38. Gomes BPFA, Souza SEC, Ferraz CCR, et al: Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. Int Endod J 36: 267, 2003
39. Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD: Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. Int Endod J 34: 341, 2001
40. 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 29: 187, 2003
41. Schäfer E, Bössmann K: Antimicrobial effect of camphorated chloroxylenol (ED 84) in the treatment of infected root canals. J Endod 25: 547, 1999
42. Siqueira JF, Uzeda M: Intracanal medicaments: Evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. J Endod 23: 167, 1997
43. White RR, Hays GL, Janer LR: Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod 23: 229, 1997