

## ИНХИБИЦИЈА НА РАСТ НА БАКТЕРИИ КАЈ СРЕДСТВА ЗА КАНАЛНА ОПТУРАЦИЈА ЗА МЛЕЧНИ ЗАБИ

Мери Павлевска<sup>1</sup>, Мира Јанкуловска<sup>1</sup>,  
Елизабета Ѓоргиевска<sup>1</sup>, Соња Апостолска<sup>2</sup>,  
Василка Ренцова<sup>2</sup>

*1Катедра за детска и превентивна стоматологија,  
Стоматолошки факултет, Универзитет „Св. Кирил и  
Методиј“ – Скопје*

*2Катедра за за болести на забите и ендодонтомот,  
Стоматолошки факултет, Универзитет „Св. Кирил и  
Методиј“ – Скопје*

## BACTERIAL GROWTH INHIBITION EFFECT OF ROOT CANAL OBTURA- TION MATERIALS USED IN PRIMARY TEETH

Meri Pavlevska<sup>1</sup>, Mira Jankulovska<sup>1</sup>, Elizabe-  
ta Gjorgievska<sup>1</sup>, Sonja Apostolska<sup>2</sup>, Vasilka  
Renzova<sup>2</sup>

*1Department for Pediatric and Preventive Dentistry, Faculty of  
Dental Medicine, University "Ss Cyril and Methodius" - Skopje*

*2Department for restorative dentistry and endodontics, Faculty of  
Dental Medicine, University "Ss Cyril and Methodius" - Skopje*

### АПСТРАКТ:

Целта на испитувањето беше утврдување на антибактериските својства на средствата за канална оптурација на млечни заби.

Биа испитувани антибактериските својства на 4 пасти за канална оптурација на млечни заби кои се најчесто користени во клиничката пракса: 1. Калциум хидроксид (Калципаст, Галеника), 2. Iodoform paste (PRODUITS DENTAIRE SA) составена од 70% јодоформ, 6% ментол и 8% камфор, 3. Кариофил - Z цинк-оксид еугенол цемент (Галеника) и 4. Резорцин формалин – паста која се подготвува магистрално, а се состои од капка формалин, 2-3 кристали резорцин и прашок од цинк-оксид.

Користени се референтни соеви колонии микроорганизми во лиофилизирана форма произведени од Американскиот институт за собирање типови култури во Манасас, ВА, САД (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) - Streptococcus mutans – ATCC 25175, Lactobacillus casei – ATCC 4646 и

### АПСТРАКТ:

The objective of the study was to determine antibacterial properties of canal obturation materials most frequently used in primary teeth.

We studied the antibacterial properties of the 4 most frequently used root canal filling pastes for primary teeth in clinical practice: Calcium Hydroxide (Calciplast, Galenika), Iodoform paste (PRODUITS DENTAIRE SA), composed of 70% Iodoform, 6% menthol and 8% camphor, Cariophil – Z zinc oxide eugenol cement (Galenika) and Resorcinol formalin paste as magistral preparation, which contained a drop of formalin, 2-3 crystals of resorcinol and zinc oxide powder.

Reference arrays of microorganism colonies in lyophilized form produced by the American Institute for Collection of Culture Types in Manassas, VA, USA (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) - Streptococcus mutans – ATCC 25175, Lactobacillus casei – ATCC 4646 and Actinomyces viscosus – ATCC 19246, were used.

Brain heart infusion broth – BHIB as bacterial substrate,

*Actinomyces viscosus* – ATCC 19246.

Како бактериски подлоги користевме мозочно-срцев инфузионен бујон – BHIB (Brain Heart Infusion Broth) Oxoid, Wesel, Germany и Шедлеров агар со додаток на овчка крв – (Schaedler +SB, Oxoid, Wesel, Germany). Антибактериското инхибиторно дејство на медикаментите кои ги користевме беше испитувано со агар дифузиони тест.

По инкубација од 48 часа, беше мерена зоната на инхибиција на растот на бактериите.

Најдобри антимикробни ефект кон сите испитувани бактерии имаат резорцин- формалин и јодоформ пастата. Цинк-оксид еугенол пастата има подобри антибактериски својства кон испитуваните бактерии од калциум хидроксидот.

**Клучни зборови:** млечни заби, ендодонтски третман, антибактериски својства, пасти за канална оптурација

Oxoid, Wesel, Germany and Schaedler agar with added sheep blood – (Schaedler +SB, Oxoid, Wesel, Germany) were used. The antibacterial inhibitory effect of medications used for obturation of root canals was studied using agar diffusion test.

After 48 hours of incubation, the inhibition zone of bacterial growth was measured.

The best antimicrobial effect to all examined bacteria was presented by resorcinol formalin and iodoform paste. Zinc oxide eugenol paste presented better antibacterial properties over studied bacteria compared to calcium hydroxide.

**Key words:** Primary (deciduous) teeth, endodontic treatment, antibacterial effect, canal obturation pastes.

### ВОВЕД

Развојните, анатомските и физиолошките разлики меѓу млечните и трајните заби укажуваат на разлики во критериумите во ендодонската терапија и употребата на материјали за полнење на каналите.

Идеалниот материјал за полнење на каналите на млечните заби треба да исполнува одредени услови: да се ресорбира слично како и коренот на млечниот заб, да не е штетен за периапикалните ткива и перманентните заби заменици, ако оди преку апексот лесно да се ресорбира, да е антисептичен, со него лесно да се полнат коренските канали, лесно да атхерира на сидовите, да не се контрахира, лесно да се отстранува ако е непоходно, да е рендген контрастен и да не ги обојува забите<sup>1</sup>.

Изборот на материјалот за полнење на коренските канали на млечните заби е многу важен и е во директна зависност со степенот на успех на ендодонската терапија.

Денес постојат голем број материјали кои се употребуваат за полнење на коренските канали на млечните заби, но ниту еден материјал за канална оптурација на коренските канали на млечните заби, кој тековно се употребува, не ги исполнува сите услови<sup>2</sup>.

Бактериите и нивните метаболити се најчести причини за заболувањата на пулпата и периапикалното ткиво и претставуваат главна причина за неуспешното ендодонско лекување<sup>3,4</sup>. Многу неуспешни случаи се резултат на технички проблеми во текот на лекувањето, а понекогаш постапката не е успешна иако треманот се одвивал според пропишаниот метод. Меѓутоа, за неуспешниот ендодонски треман виновни се микроорганизмите кои го преживуваат лекувањето и остануваат во радикуларниот и апикалниот дел на полнетите канали<sup>3,4</sup>. Успехот на ендодонската терапија зависи од елиминацијата на бактериите и нивните токсини од коренскиот канал<sup>5</sup>. Тоа обично се постигнува со механичка инструментација помогната со разни антисептични раствори за испирање и антибактериски влошки во коренскиот канал, во период меѓу два прегледаб.

### INTRODUCTION

The developmental, anatomic and physiological differences between primary and permanent teeth indicate differences in the criteria for endodontic therapy, and the use of filling materials.

The ideal root canal filling material for primary teeth should fulfil certain requirements: it should be resorbing similarly to the root of the primary tooth, not damaging the periapical tissues and permanent replacement teeth, if it spreads over the apex it should be easily resorbable, it should be antiseptic, easily fill root canals, adhere to the walls, non-contractible, easily removed if necessary, opaque and dye the teeth<sup>1</sup>.

The choice for the filling material for the root canals of primary teeth is very important and in correlation to the success rate of the endodontic therapy.

Today, there are numerous materials used for filling root canals of primary teeth, however, none of the materials currently used for canal obturation of root canals of primary teeth fulfill all the conditions<sup>2</sup>.

Bacteria and their metabolites are the most common reasons for diseases of the pulp and periapical tissues and are the main reason for failed endodontic treatments<sup>3, 4</sup>. Many failed cases result from technical issues during treatment, and sometimes the procedure is not successful, despite the fact that the treatment was conducted according to the prescribed methodology. Nevertheless, the reason for the failed endodontic treatment is microorganisms which survive the treatment and remain in the radicular and apical part of the filled root canals<sup>3, 4</sup>. The success of endodontic treatment depends on the elimination of bacteria and their toxins from the root canal<sup>5</sup>. Usually, this is accomplished by mechanical instrumentation aided by various antiseptic washing solutions and antibacterial dressings in the root canal, in between two visits<sup>6</sup>. There are, however, individual cases, resistant to routine therapy and infection may resist for months, even years after canal obturation<sup>5</sup>. Facultative anaerobic bacteria and fungi show in persistent endodontic infections, and in the case of long-term infections may adjust and survive in conditions of weak or non-existent oxygen inflow<sup>7</sup>.

Меѓутоа, поединечни случаи се отпорни на рутинската терапија и инфекцијата може да се задржи со месеци и со години, по каналната оптурација<sup>5</sup>. Факултативно анаеробните бактерии и габичките се забележуваат кај перзистентните ендодонтски инфекции, кои кај долготрајните инфекции може да се приспособат и да преживеат во услови на слаб или никаков дотур на кислород<sup>7</sup>.

Кај заболувањата на пулпата на млечните заби, особено кај авиталните млечни заби, често не може да се направи комплетна механичка обработка, особено во апикалната третина од коренскиот канал. Причините за тоа главно се почнатата ресорпција на млечните заби, можноста да се повреди зачетокот на трајниот заменик, анатомофолошките карактеристики на корените на млечните заби, а особено млечните молари, како и неможноста кај децата да се обезбедат асептични услови за работа. Поради тоа, во ендодонцијата на млечните заби, пастите што се користат, покрај фактот што треба да бидат ресорптивни, треба да поседуваат и антибактериски својства.

Tchaou WE et al.<sup>6</sup> ги споредувале антибактериските својства на десет материјали за полнење на коренски канали и утврдиле дека најсилен антибактериски ефект имаат калциум хидроксид измешан со парахлорфенол камфор, цинк-оксид измешан со парахлорфенол камфор и цинк-оксид со формокрезол.

Kelly J. et al.<sup>8</sup> во in vitro студија ги испитувал антимикробните и цитотоксичните ефекти на Kri1 пастата и цинк-оксид еугенолот и утврдил дека цинк-оксид еугенолот има подобар антимикробен ефект и помала цитотоксичност од Kri1 пастата.

Завршна фаза на ендодонтскиот третман претставува херметичка и трајна оптурација на коренските канали како дефинитивно канално полнење. Основната улога на пастите за канална оптурација е адхезија врз ѕидовите на коренските канали, со цел пополнување на неправилниот канален систем и да се ресорбираат заедно со корените на млечните заби. Пастите за канално полнење на млечните заби според современите тенденции би требало, покрај физичките и хемиски карактеристики, да ги задоволат

In diseases of the pulp of primary teeth, especially avital primary teeth, often, a complete mechanical treatment is not possible, especially in the apical segment of the root canal. The reasons for this are mainly the initial resorption of primary teeth, the possibility of injuring the bud of the replacement permanent tooth, anatomorphological characteristics of primary teeth roots, especially primary molars, as well as the impossibility to provide aseptic working conditions with children. Therefore, in endodontic treatment of primary teeth, in addition to the fact that pastes that are used need to be resorbable, they should also have antibacterial property.

Tchaou WE et al.<sup>6</sup> compared antibacterial effects of ten root canal filling materials and established that the strongest antibacterial effect is presented by calcium hydroxide mixed with parachlorphenol camphor, zinc oxide mixed with parachlorphenol camphor and zinc oxide with formocresol.

Kelly J et al.<sup>7</sup> in an in vitro study examined the antimicrobial and cytotoxic effects of Kri1 paste and zinc oxide eugenol and established that zinc oxide eugenol has a better antibacterial effect and lower cytotoxicity compared to Kri1 paste.

The final phase of endodontic treatment is hermetic and permanent obturation of root canals as a definitive filling. The primary role of root canal filling pastes is adhesion over the root canal walls, in order to fill the irregular canal system and be resorbed together with the roots of the primary teeth. Based on the modern trends, pastes used as canal fillers for primary teeth, apart from their physical and chemical characteristics, should also satisfy certain biological criteria. Along with the position in the root canal, in addition to having to directly seal the pulp, when in direct contact with the vital periapical tissue, they should be neither irritating, nor toxic.

Zinc oxide eugenol, calcium hydroxide and iodoform paste are among the mostly used pastes in endodontics of primary teeth.

Zinc oxide eugenol paste adheres well to the root walls, however, oleum caryophyllorum, despite having an antimicrobial effect, irritated the surrounding tissue<sup>1,9,10,11,12</sup>. Calcium hydroxide pastes have osteogenic potential,

и биолошките критериуми. Со поставеноста во коренскиот канал, покрај тоа што треба директно да го затворат ендодонтот, треба при директниот контакт со виталното периапикално ткиво да не дејствуваат иритирачки, ниту пак да бидат токсични.

Меѓу пастите што најчесто се користат во ендодонцијата на млечните заби, се цинк-оксид еугенол, калциум хидроксид и јодоформ пастата. Цинк-оксид еугенол пастата многу добро атхерира на сидовите на каналот, но олеум кариофилорум, покрај тоа што има антимикробно дејство, дејствува иритирачки и на околното ткиво<sup>1,9,10,11,12</sup>.

Пастите на база на калциум хидроксид се карактеризираат со остеогенетски потенцијал, кој се постигнува со ослободување на Ca<sup>2+</sup> и OH<sup>-</sup> јони, а тоа доведува до репарација на минерализираните ткива. Дополнително, се карактеризира и со силно антибактериско дејство, благодарейќи на високо алкалната рН, која создава неповолни услови за развој на бактериите.

Јодоформот е органско хемиско соединение од групата на алкил халили, формира жолти кристали или прашок со интензивен мирис. Во терапијата е искористено неговото својство за ослободување на слободен јод кој има антисептичко и антибактериско дејство. Бројни автори<sup>8,13,14,15,16</sup> ги препорачуваат пастите на база на јодоформ за дефинитивни полнења на инфицирани млечни коренски канали.

Целта на нашето испитување беше утврдување на антибактериските својства на дел од најчесто користените средства за канална оптурација на млечни заби.

### МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

Беа испитувани антибактериските својства на 4 паста за канална оптурација на млечни заби: 1. Калциум хидроксид (Калципаст од Галеника), 2. Јодоформ паста (Iodoform paste PRODUITS DENTAIRE SA) составена од 70% јодоформ, 6% ментол и 8% камфор, 3. Цинк-оксид еугенол (Кариофил - Z цинк-оксид еугенол цемент, Галеника) и 4. Резорцин формалин – паста, паста која се подготвува магистрално, а се состои од капка

achieved by release of Ca<sup>2+</sup> and OH<sup>-</sup> ions, which results in repair of mineralized tissues. In addition, they also have strong antibacterial effect, as a result of the highly alkaline pH, which creates unfavorable conditions for development of bacteria.

Iodoform is organic chemical compound from the group of alkyl halides; it forms yellow crystals or powder with intensive smell. Its characteristic to release free iodine which has antiseptic and antibacterial effect is used in therapy. Many authors<sup>8,13,14,15,16</sup> recommend iodoform based pastes for definitive fillings of infected primary root canals. The objective of our study was to determine the antibacterial properties of canal obturation materials used in primary teeth.

### METHOD AND MATERIAL

We studied the antibacterial properties of the 4 most frequently used root canal filling pastes for primary teeth in clinical practice: Calcium Hydroxide (Calcipast, Galenika), Iodoform Paste (PRODUITS DENTAIRE SA) composed of 70% iodoform, 6% menthol and 8% camphor, Zinc-oxide eugenol (Cariophil Z zinc oxide eugenol cement, Galenika), Resorcinol formalin paste (paste as magistral preparation, which contained a drop of formalin, 2-3 crystals of resorcinol and zinc oxide powder).

### COLONIES OF MICROORGANISMS

Reference arrays of microorganism colonies in lyophilized form produced by the American Institute for Collection of Culture Types in Manassas, VA, USA (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were used:

*Streptococcus mutans* – ATCC 25175

*Lactobacillus casei* – ATCC 4646

*Actinomyces viscosus* – ATCC 19246

### BACTERIAL SUBSTRATES

- Brain Heart Infusion Broth – BHIB Oxoid, Wesel, Germany, ready-made substrates in vials of 10ml, for refreshment of the lyophilized arrays, to prepare bacterial inoculum and subcultivate the arrays.
- Schaedler agar with added sheep blood – (Schaedler +SB, Oxoid, Wesel, Germany), ready substrates poured

формалин, 2-3 кристали резорцин и прашок од цинк-оксид.

#### КОЛОНИИ МИКРООРГАНИЗМИ

Користени се референтни соеви колонии микроорганизми во лиофилизирана форма произведени од Американскиот институт за собирање типови култури во Манасас, ВА, САД (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA).

*Streptococcus mutans* – ATCC 25175

*Lactobacillus casei* – ATCC 4646

*Actinomyces viscosus* – ATCC 19246

#### БАКТЕРИСКИ ПОДЛОГИ

- Мозочно-срцев инфузионен бујон – BHIB (Brain Heart Infusion Broth) Oxoid, Wesel, Germany, готови подлоги во епрувети од 10мл, за освежување на лиофилизираните соеви, за подготовка на бактериски инокулум и супкултивирање на соевите;
- Шедлеров агар со додаток на овчја крв – (Schaedler +SB, Oxoid, Wesel, Germany), готови подлоги разлиени во петриеви плочки со дијаметар од 90 мм;
- Создавање на анаеробна атмосфера за култивирање – анаеробни лонци, со атмосфера од 10% јаглероддиоксид и 90% азот со употреба на анаеробен систем – „Microbiology Anaerocult A, MERCK“, Дармштат, Германија.

#### МИКРОБИОЛОШКИ ИСПИТУВАЊА

Антибактериски својства на средствата за канална оптурација

Антибактериското инхибиторно дејство на медикаментите кои ги користевме за оптурација на коренските канали (цинк-оксид еугенол, калциум хидроксид, јодоформ паста и резорцин-формалин паста) кон соевите на *Streptococcus mutans* – ATCC 25175, *Lactobacillus casei* – ATCC 4646 и *Actinomyces viscosus* – ATCC 19246 беше испитувано со агар дифузионски тест.

on Petri plates with diameter of 90mm.

- Creating anaerobic environment for cultivation – anaerobic tanks, with atmosphere of 10% carbon dioxide and 90% nitrogen, using anaerobic system - „Microbiology Anaerocult A, MERCK“, Darmstadt, Germany.

#### MICROBIOLOGICAL TESTS

Antibacterial properties of root canal obturation materials  
Agar diffusion test was used to examine the antibacterial inhibiting effect of medications used for root canal obturation (zinc oxide eugenol, calcium hydroxide, iodoform paste and resorcinol formalin paste) on arrays of *Streptococcus mutans* – ATCC 25175, *Lactobacillus casei* – ATCC 4646 and *Actinomyces viscosus* – ATCC 19246.

#### Preparation of the bacterial inoculum

The lyophilized reference arrays were inoculated in BHIB and incubated in anaerobic atmosphere for 48 hours at a temperature of 37°C. The density of the inoculum, according to the McFarland standard was established from the grown bacteria in the liquid substrate using turbidimeter. Afterwards, on the previously labeled Schaedler agar, we smeared 350µL of the bacterial suspension, equally on the whole substrate.

After inoculation, for 15 minutes the bacterial suspension was being absorbed in the substrate and Faculty of Dental Medicine, University “Ss Cyril and Methodius” – Skopje, by using sterile plastic tubes, small pits in the substrate (3mm deep and 3.5mm wide) were created. Eight pits per substrate were created. The distance between the pits was 30mm, and between the pits and the wall of the Petri plate the distance was 15mm. Then, using a sterile syringe, which was previously filled with the tested freshly prepared root obturation paste, the pits were filled with 0.1ml of the paste. The substrates were left at room temperature for 30 minutes, after which they were incubated in an anaerobic atmosphere, during 48 hours, at a temperature of 37°C. In the study 9 Petri plate preparations were used. On each Petri plate two samples of the tested root canal obturation material were added, a total of 72 samples. In this manner, under the same conditions, antibacterial properties of different root canal filling materials

### Подготвување на бактериски инокулум

Лиофилизираните референтни соеви ги инокулиравме во ВНІВ и ги инкубиравме во анаеробна атмосфера за време од 48 часа на температура од 37°C. Од пораснатите бактерии во течната подлога турбидиметриски се постави густината на инокулумот, соодветна на стандардот McFarland. Потоа, на претходно одбележаниот Шедлеров агар, со помош на брис беа разлеани 350 µL од бактериската суспензија рамномерно низ целата полога.

По инокулацијата потребни беа 15 минути за да



**Слика 1.** Шедлеров агар со бактериска суспензија и наполнети бунарчиња со испитуваните средства за канална оптурација

**Image 1:** Schaedler agar with bacterial suspension and filled pits with the studied root canal obturation materials

бактериската суспензија се впие во подлогата и со помош на стерилни пластични цевчиња беа направени бунарчиња во подлогата, длабоки 3мм и широки 3.5мм. На една подлога вкупно беа направени по 8 бунарчиња (Слика 1.). Растојанието меѓу секое бунарче беше 30мм, а меѓу бунарчињата и сидот на Петриевата плоча растојанието беше 15мм. Потоа, со стерилен шприц, кој претходно беше наполнет со испитуваната свежно подготвена паста за канална оптурација, ги полнвме бунарчињата со 0.1мл паста. Подлогите беа оставени на собна температура за време од 30 минути и потоа беа инкубирани во анаеробна атмосфера, за време од 48 часа и на температура од 37°C. Во испитувањето беа употребени 9 подготвени Петриеви плочи. На секоја плочка беа нанесени по два примероци од испитуваното средство за канална оптурација, или вкупно 72 примероци. На овој начин под исти услови беа споредувани антибактериските својства на различните средства за полнење на коренски канали

for primary teeth were compared.

### Determining antibacterial effects of the samples

After 48 hours incubation, the inhibition zone of bacterial growth was measured. The zone was established by measuring its diameter in mm, using a special instrument. In the width of the zone, the 4mm diameter of the sample was also taken in consideration. Thus, in absence of the growth zone, for practical reasons, and for the purpose of statistics, zero (0) was not marked, but 4mm. Measuring each sample was done in two directions, at right angle, and then, the median value of both measurements was

entered. The whole numbers were considered as values, expressed in millimeters, or in case when the width of the zone was between two whole numbers, the whole smaller number plus 0.5mm was taken in consideration.

Microbiological analyses were conducted at the Institute for Microbiology and Parasitology within the Faculty of Medicine at the University of Ss. "Cyril and Methodius" in Skopje.

### MICROBIOLOGICAL ANALYSIS

Table 1. presents the average values of the inhibition zones of studied root canal obturation materials on *Streptococcus mutans*.

The average inhibition zone on *Streptococcus mutans* for resorcinol formalin paste was 22.50mm. The average inhibition zone of zinc oxide eugenol paste on the same bacterium was 11.17mm, and 6.67mm of calcium hydroxide. The average value of the inhibition zone of the iodoform paste on *Streptococcus mutans* was 23.33mm.

на млечни заби.

### Определување на антибактриското дејство на примероците

По инкубација од 48 часа, беше одредена зоната на инхибиција на растот на бактериите преку нејзиниот дијаметар во мм, користејќи специјален инструмент. Во ширина на зоната земен е предвид и дијаметарот на самиот примерок од 4мм. Така што, кога зоната на раст отсутува, од практични причини, поради статистичките пресметки, не се означува како 0, туку како 4мм. Мерењето на секој примерок се изведува

Based on the results obtained, ANOVA testing was conducted for the numerical characteristics of observed average inhibition zone values for the examined root canal obturation materials on *Streptococcus mutans*, which resulted in  $F=83,76$ ;  $DF=3$  и  $p<0,01$ , which means that there are highly statistically significant differences in antibacterial effects of root canal obturation materials. The highest average value of the inhibition zone on *Streptococcus mutans* is presented with Iodoform paste, followed by resorcinol formalin paste, statistically not different one to another, only different to other root canal obturation materials (zinc oxide eugenol paste compared to resorci-

<i>Streptococcus mutans</i> (mm)			
Резорцин формалин паста	Цинк оксид еуенол	Ca(OH) <sub>2</sub>	Јодоформ паста
Просек ± (Ст. дев)			
22.50 (2.95)	11.17 (2.32)	6.67 (0.52)	23.33 (3.67)
ANOVA $F=84.76$ ; $DF=3$ ; $p<0.01$			
Resor. Form : ZnO = $p<0.05$ ; Resor.form.: Ca(OH) <sub>2</sub> = $p<0.05$ ; Resor.form : Jod.pas = $p>0.05$ ; ZnO : Ca(OH) <sub>2</sub> = $p<0.05$ ; ZnO : Jod.pas. = $p<0.05$			

**Табела 1.** Просечни зони на инхибиција на испитуваните сретства за канална оптурација кон *Streptococcus mutans*

**Table 1.** Average inhibition zones of the researched root canal obturation materials on *Streptococcus mutans*

во две насоки, под прав агол, па потоа се запишува средната вредност од двете мерења. Како вредности се земаат цели броеви во милиметри или, во случаи кога ширината на зоната беше помеѓу два цели броја, беше означувана со целиот помал број плус 0.5мм.

Микробиолошките анализи беа спроведени на Институтот за микробиологија и паразитологија при Медицинскиот факултет на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје.

### МИКРОБИОЛОШКА АНАЛИЗА

Табела 1. ги прикажува просечните вредности на зоните на инхибиција на испитуваните средства за канална оптурација кон бактеријата *Streptococcus mutans*.

nol formalin showed statistical significance of  $p<0.05$  and statistical significance  $p<0.05$  for the values obtained with resorcinol formalin with Ca(OH)<sub>2</sub>, zinc oxide eugenol with calcium hydroxide and zinc oxide with iodoform paste).

Table 2. presents the average inhibition zones on *Actinomyces viscosus* bacterium, by the studied root canal obturation materials for primary teeth, whereas, the average inhibition zone by resorcinol formalin paste and zinc oxide eugenol was 32.84mm, and 11.33mm, respectively. Calcium hydroxide to the bacterium of *Actinomyces viscosus* causes an inhibition zone with average value of 6mm, while with iodoform paste, the inhibition zone was 26.17mm in average.

ANOVA for the numerical characteristics was conducted of the observed average values of the inhibition zones of the



## МАКЕДОНСКИ СТОМАТОЛОШКИ ПРЕГЛЕД

Просечната зона на инхибиција кон бактеријата *Streptococcus mutans* за резорцин-формалин пастата изнесува 22.50мм. Просечната зона на инхибиција на цинк-оксид еугенол паста кон истата бактерија изнесува 11.17мм, а на калциум хидроксидот 6.67мм. Просечната вредност на зоната на инхибиција на јодоформ пастата на *Streptococcus mutans* изнесува 23.33мм.

Врз основа на добиените резултати направен е ANOVA тестот за нумеричките карактеристики на набљудуваните просечни вредности на зони на

studied root canal obturation materials on *Actinomyces viscosus*, which showed  $F=99,57$ ;  $DF = 3$  и  $p < 0,01$ , which means that there is high statistical significance between antibacterial effects of the root canal obturation materials, with absolute domination of resorcinol formalin paste over the other types of paste.

According to ANOVA, there was statistical significance of  $p < 0.05$  between resorcinol formalin paste and zinc oxide eugenol, between resorcinol formalin and calcium hydroxide, between resorcinol formalin and iodoform paste,

<i>Actinomyces viscosus</i> (mm)			
Резорцин формалин	Цинк Оксид еугенол	Ca(OH) <sub>2</sub>	Јодоформ паста
Просек ± (Ст.дев)			
32.84 (3.13)	11.33 (3.50)	6 (1.1)	26.17(3.82)
ANOVA $F=99.57$ ; $DF=3$ ; $p < 0.01$			
Resor. form: ZnO = $p < 0.05$ ; Resor.form.:Ca(OH) <sub>2</sub> = $p < 0.05$ ; Resor.form : Jod.pas = $p < 0.05$ ZnO : Ca(OH) <sub>2</sub> = $p < 0.05$ ; ZnO : jod.pas. = $p < 0.05$			

**Табела 2.** Просечни зони на инхибиција на испитуваните средства за канална оптурација кон *Actinomyces viscosus*

**Table 2.** Average inhibition zones of the studied root canal obturation materials on *Actinomyces viscosus*

инхибиција на испитуваните материјали за канална оптурација кон *Streptococcus mutans* кое покажа  $F=83.76$ ;  $DF=3$  и  $p < 0.01$ , што значи дека постојат високо статистички значајни разлики во антибактериското дејство на средствата за канална оптурација. Најголема просечна вредност на зоните на инхибиција кон *Streptococcus mutans* има Јодоформ пастата, а на второ место е резорцин-формалин пастата, а тие меѓусебно статистички не се разликуваат, а се разликуваат со останатите средства за канална оптурација (цинк-оксид еугенол пастата во однос на резорцин-формалин покажува статистичка значајност од  $p < 0.05$  и статистичка значајност  $p < 0.05$  забележавме на вредностите добиени на резорцин-формалин со Ca(OH)<sub>2</sub>, цинк-оксид еугенол со калциум хидроксид, и цинк-оксид со јодоформ паста).

На Табела 2. може да се видат просечните зони на

between zinc oxide eugenol and calcium hydroxide and between zinc oxide eugenol and iodoform paste.

Table 3. presents the average values of the inhibition zones of studied root canal obturation materials on *Lactobacillus casei*. The inhibition zone of resorcinol formalin paste on *Lactobacillus casei* was 29.67mm in average, the average values of the inhibition zone of zinc oxide eugenol paste was 10mm, and 6.83mm for calcium hydroxide. The average value of the inhibition zone of the iodoform paste on *Lactobacillus casei* was 25.5mm.

ANOVA for the numerical characteristics was conducted of the observed average values of the inhibition zones of studied root canal obturation materials on *Lactobacillus casei*, which showed  $F=34,906$ ;  $DF = 3$  и  $p < 0,01$ , which means that there is high statistical significance between antibacterial effects of the root canal obturation materials, with absolute domination of resorcinol formalin paste

инхибиција кон бактеријата *Actinomyces viscosus* предизвикани од испитуваните сретства за канална оптурација на млечните заби каде што, просечната зона на инхибиција од резорцин-формалин пастата изнесува 32.84мм, а од цинк-оксид еугенол пастата 11.33мм. Калциум хидроксидот кон бактеријата *Actinomyces viscosus* предизвикува зона на инхибиција со просечна вредност од 6мм, а додека кај јодоформ пастата, зоната на инхибиција беше просечно 26.17мм. ANOVA за нумеричките карактеристики на

over the other types of researched root canal obturation materials.

ANOVA testing showed that there is also statistical significance of  $p < 0.05$  between resorcinol formalin paste and zinc oxide, resorcinol formalin paste and calcium hydroxide, resorcinol formalin paste and iodoform paste, zinc oxide eugenol and calcium hydroxide and zinc oxide eugenol and iodoform paste.

DISCUSSION

<i>Lactobacillus casei</i> (mm)			
Резорцин формалин	Цинк оксид	Ca(OH) <sub>2</sub>	Јодоформ паста
Просек ± (Ст.дев)			
29.67 (1.51)	10 (1.1)	6.83 (0.98)	25.5 (2.07)
ANOVA $F = 34.906$ ; $DF=3$ ; $p < 0.01$			
Resor. form: ZnO = $p < 0.05$ ; Resor.form.: Ca(OH) <sub>2</sub> = $p < 0.05$ ; Resor.form : Jod.pas = $p < 0.05$ ZnO : Ca(OH) <sub>2</sub> = $p < 0.05$ ; ZnO : jod.pas. = $p < 0.05$			

Табела 3. Просечни зони на инхибиција на испитуваните средства за канална оптурација кон *Lactobacillus casei*  
Table 3. Average inhibition zones of the studied root canal obturation materials on *Lactobacillus casei*

набљудуваните просечни вредности на зоните на инхибиција на испитуваните материјали за канална оптурација кон *Actinomyces viscosus*, покажа  $F=99.57$ ;  $DF = 3$  и  $p < 0.01$  што значи дека постои висока статистичка значајност помеѓу антибактериските дејства на средства за канална оптурација, каде што апсолутно доминира резорцин-формалин пастата над сите останати средства.

Според ANOVA, статистичка значајност  $p < 0.05$  е забележана помеѓу резорцин-формалин пастата и цинк-оксид еугенол, помеѓу резорцин формалин и калциум хидроксид, помеѓу резорцин-формалин и јодоформ паста, помеѓу цинк-оксид еугенол и калциум хидроксид и помеѓу цинк-оксид еугенол и јодоформ паста.

Табела 3. ги прикажува просечните вредности на зоните на инхибиција на испитуваните сретства за канална оптурација кон бактеријата *Lactobacillus casei*.

Infection of root canals is a complex type of infection of the root system which encompasses the main canals, ancillary canals, apical and intraradicular segment and dentin tubules.

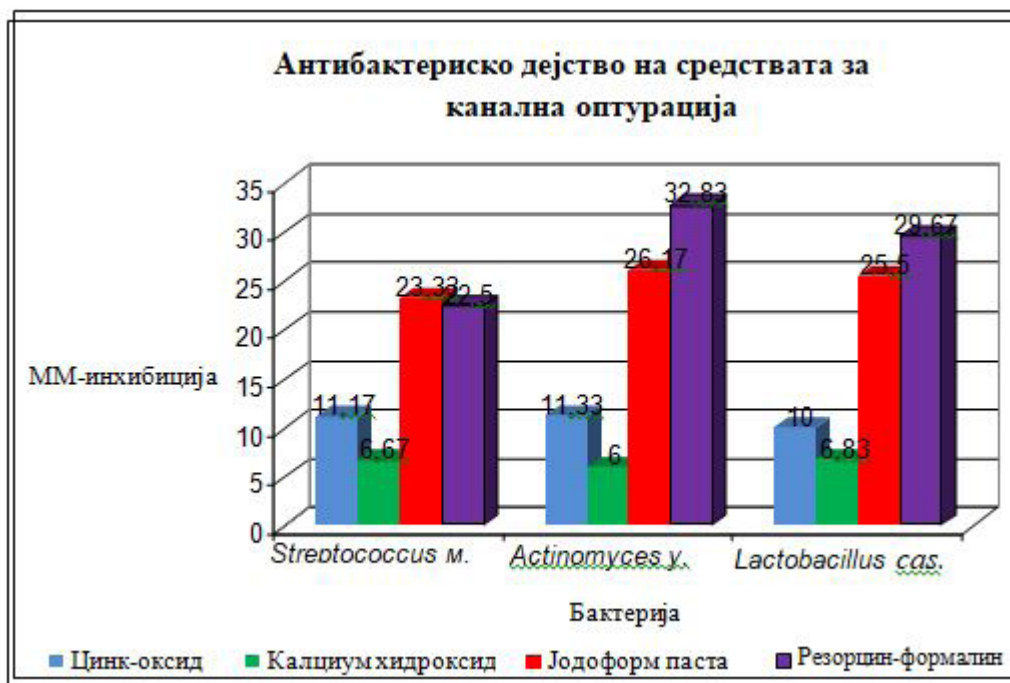
Microorganisms in the canal system occur directly (caries, lesion, fracture), or indirectly (coronary micro permeability, inadequate or resorbed canal fillings and homogeneously)17,18. Microorganisms with bacterial proliferation multiply in the canal system, they form bacterial colonies, and in the present micro-spaces biofilms are formed.

The following are the most frequent bacterial types isolated from the infected canals and periapical processes: *Prevotella* spp., *Tonerella forsythensis*, *Fusobacterium* spp., *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas* spp., *Treponema* spp., *Eubacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp., and *Streptococcus* spp.19,20 most of these are obligate anaerobes: *Actinomyces*, *Propionibacterium* and *Lactobacillus* also cover

Зоната на инхибиција на резорцин-формалин пастата кон *Lactobacillus casei* во просек изнесува 29.67мм, просечните вредности на зоната на инхибиција на цинк-оксид еугенол пастата изнесува 10мм, а на калциум хидроксид 6.83мм. Просечната вредност на

anaerobe and facultative anaerobe arrays, while streptococci are facultative bacteria<sup>21</sup>.

The success of the endodontic treatment depends on several factors, among which, the most important is the reduction or elimination of the bacterial infection, which



**Графикон 1.** Приказ на просечните вредности на зоните на инхибиција кон анализираните бактерии за испитуваните материјали за канална оптурација

**Graph 1.** Average values of the inhibition zones on analyzed bacteria for the studied root canal obturation materials

зоната на инхибиција на јодоформ пастата кон *Lactobacillus casei* изнесува 25.5мм.

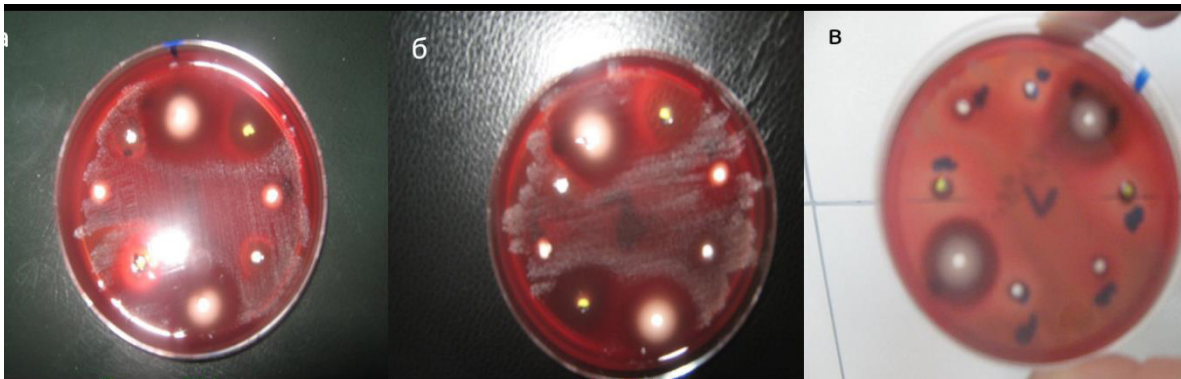
Нумеричките карактеристики на набљудуваните просечни вредности на зоните на инхибиција на испитуваните материјали за канална оптурација кон *Lactobacillus casei* според ANOVA се  $F=34.906$ ;  $DF=3$  и  $p<0.01$ , што значи дека постои висока статистичка значајност помеѓу антибактериските дејства на средствата за канална оптурација, каде што апсолутно доминира резорцин-формалин пастата во однос на другите средства за канална оптурација кои ги испитувавме.

ANOVA тестот покажа дека постои статистичка значајност  $p<0.05$  и помеѓу резорцин-формалин пастата и цинк-оксид, резорцин-формалин пастата и калциум хидроксид, резорцин-формалин пастата и јодоформ пастата, цинк-оксид еугенол и калциум хидроксид и цинк-оксид еугенол и јодоформ пастата.

is polymicrobial, with great number of microorganisms, predominantly, streptococci and anaerobic microorganisms<sup>22,23</sup>.

In the primary teeth it is very difficult to conduct a good treatment of the canal system, which would also mean elimination of most of the microorganisms. Due to presence of the permanent replacement teeth under the roots of the primary teeth, resorption of primary teeth roots, anatomorphological characteristics of primary teeth, the behavior of the child and impossibility to always provide antiseptic working conditions impose the need to use root canal filling paste, which should not only be resorbable, but also have antibacterial properties.

In order to examine the antibacterial properties of root canal obturation pastes used in our study, we also conducted microbiological analyses with reference bacterial arrays. For the microbiological analysis we selected *Streptococcus mutans* – ATCC 25175, *Lactobacillus casei* – ATCC 4646 and *Actinomyces viscosus* – ATCC 19246. These bac-



**Слика 2.** Петриеви плочи со зони на инхибиција на сретствата за канална оптурација кон испитуваните микроорганизми: а. *Streptococcus mutans*, б. *Actinomyces viscosus*, в. *Lactobacillus casei*

**Figure 2.** Petri plates with inhibition zones of the canal obturation materials on examined microorganisms

## ДИСКУСИЈА

Инфекцијата на коренските канали е сложена инфекција на каналниот систем која ги зафаќа главните канали, споредните канали, апикалниот и интрадикуларниот дел и дентинските тубули.

Микроорганизмите во каналниот систем доаѓаат директно (кариозна лезија, фрактура) или индиректно (коронарна микропропустливост, несоодветни или ресорбирани канални полнења и хематогено) <sup>17,18</sup>.

Во каналниот систем микроорганизмите со бактериската пролиферација се размножуваат, се формираат бактериски колонии и во присутните микропростори создаваат биофилмови.

Најчести бактериски видови изолирани од инфицираните канали и периапикалните процеси се следните: *Prevotella* spp., *Tannerella forsythensis*, *Fusobacterium* spp., *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas* spp., *Treponema* spp., *Eubacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp., и *Streptococcus* spp.<sup>19,20</sup> Поголемиот дел од нив се облигантни анаероби: *Actinomyces*, *Propionibacterium* и *Lactobacillus* ги опфаќаат и анаеробните и факултативно анаеробните соеви, додека стрептококите се факултативни бактерии<sup>21</sup>.

Успехот на ендодонскиот третман зависи од повеќе фактори, а како најважен е намалување или елиминација на бактериската инфекција, која е полимикробна, со голем број на микроорганизми, каде што доминираат стрептококите и анаеробните микроорганизми<sup>22,23</sup>.

Кај млечните заби многу е тешко да се направи добра

тера occur in different locations, both in the oral cavity and in the root infected canal. Despite of being able to use isolates from the infected canal of avital primary teeth for the microbiological analysis, which would result in isolating different subtypes of microorganisms, yet literature presents us with the use of laboratory obtained reference arrays of microorganisms and the results have reference values.

Studied root canal obturation materials were freshly mixed, in a plastic condition and as such they were inserted in the pits on the Petri plate with smeared bacteria, to monitor their antibacterial effect in identical condition through which they pass during the phase of stiffening and when applied in the root canal system of the tooth.

The average values of the inhibition zones of the studied root canal obturation materials of primary teeth on each type of bacteria separately by statistical analysis were presented. The obtained inhibition zones were expressed in millimeters, including the diameter of the samples.

We obtained the highest values of the average inhibition zones to the bacterium of *Streptococcus mutans* with iodoform paste with 23.33mm, and resorcinol formalin paste with 22.50mm. The average inhibition zone of zinc oxide eugenol paste to the same bacterium was 11.17mm, and the least antibacterial effect to *Streptococcus mutans* was presented by calcium hydroxide with average inhibition zone of 6.67mm.

The conducted statistical analysis of the observed average values of inhibition zones for the examined root canal obturation materials on *Streptococcus mutans*, resulted in  $p < 0.01$ , which means that there are highly statistically

## МАКЕДОНСКИ СТОМАТОЛОШКИ ПРЕГЛЕД

обработка на каналниот систем на забите, а со тоа и елиминација на најголемиот број на микроорганизми. Поради присуството на трајниот заменик кој што е под корените на млечните заби, ресорпцијата на млечните корени, анатомоморфолошките карактеристики на млечните заби, однесувањето на детето и неможноста секогаш да обезбедиме асептични услови за работа, постои потреба пастите за канални полнења кај млечните заби покрај фактот што треба да бидат ресорптивни, да поседуваат и антибактериски својства. Со цел да ги испитаме антибактериските својства на пастите за канална оптурација кои ги употребивме, во нашето испитување беа спроведени и микробиолошки анализи со референтни соеви на бактерии. За микробиолошка анализа беа избрани *Streptococcus mutans* – ATCC 25175, *Lactobacillus casei* – ATCC 4646 и *Actinomyces viscosus* – ATCC 19246. Овие бактерии се среќаваат во различни локации како во оралната празнина така и во кореновиот инфициран канал. Иако за микробиолошка анализа може да се користат и изолати од инфицираниот канал на авиталните млечни заби, со што би се изолирале различни поттипови на микроорганизми, сепак во литературата се користат референтни соеви на микроорганизми кои се лабораториски добиени, а резултатите имаат референтни вредности.

Испитуваните материјали за канална оптурација беа свежо замешани, во пластична состојба и такви беа внесувани во бунарчињата на Петриевата плоча со засеани бактерии, со цел да го следиме нивниот антибактериски ефект во идентична состојба низ која поминуваат во тек на фазата на стврднувањето и при апликација во каналниот систем на забот.

Со статистичката анализа се прикажани просечните вредности на зоните на инхибиција на испитуваните материјали за канална оптурација на млечните заби кон секој вид на бактерии одделно. Добиените зони на инхибиција се изразени во милиметри, влучувајќи го и дијаметарот на самите примероци.

Највисоки вредности за просечните зони на инхибиција кон бактеријата *Streptococcus mutans* добивме за јодоформ пастатата која изнесува 23.33мм.,

significant differences in antibacterial effects of root canal obturation materials.

The highest average value of the inhibition zone to *Actinomyces viscosus* was yielded by resorcinol formalin paste with 32.84mm, iodoform paste with inhibition zone of an average of 26.17mm, and by zinc eugenol paste 11.33mm. Calcium hydroxide to the bacterium of *Actinomyces viscosus* causes an inhibition zone with average value of 6mm.

We conducted ANOVA for the numerical characteristics of the observed average values of the inhibition zones of studied root canal obturation materials on *Actinomyces viscosus*, which showed  $p < 0.01$ , which means that there is high statistical significance between antibacterial effects of the root canal obturation materials, with absolute domination of resorcinol formalin paste over the other types of paste.

The average values of the inhibition zones of resorcinol formalin paste on *Lactobacillus casei* was 29.67mm, the average value of the inhibition zone of zinc oxide eugenol paste was 10mm, and 6.83mm for calcium hydroxide. The average value of the inhibition zone of the iodoform paste on *Lactobacillus casei* was 25.5mm.

We conducted ANOVA for the numerical characteristics of the observed average values of the inhibition zones of studied root canal obturation materials on *Lactobacillus casei*, which showed  $p < 0.01$ , which means that there is high statistical significance between antibacterial effects of the root canal obturation materials, with absolute domination of resorcinol formalin paste over the other types of studied root canal obturation materials.

Many authors have examined the antibacterial effect of the root canal obturation materials on different arrays of bacteria, whereas, the most used is direct contact test and agar diffusion test.

Our study showed best antibacterial effect with resorcinol formalin paste on *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei* bacteria, while iodoform paste for *Streptococcus mutans*. Many authors agree that these materials show best antibacterial effects автори<sup>5,6,24,25,26,27,28,29</sup>.

It is interesting to mention that in all studies samples of bacteria, the inhibition zones of resorcinol formalin paste

за резорцин-формалин пастата изнесува 22.50мм. Просечната зона на инхибиција на цинк-оксид еугенол пастата кон истата бактерија изнесува 11.17мм, а најмал антибактериски ефект кон *Streptococcus mutans* покажа калциум хидроксидот со просечна зона на инхибиција од 6.67мм.

Направената статистичка анализа на набљудуваните просечни вредности на зони на инхибиција на испитуваните материјали за канална оптурација кон *Streptococcus mutans* покажа  $p < 0.01$  што значи дека постојат висока статистички значајни разлики во антибактериското дејство на средствата за канална оптурација.

Најголема просечната вредност на зоната на инхибиција кон бактеријата *Actinomyces viscosus* имаше резорцин-формалин пастата (32.84мм), кај јодоформ пастата, зоната на инхибиција беше просечно 26.17мм. а кај цинк-оксид еугенол пастата 11.33мм. Калциум хидроксидот кон бактеријата *Actinomyces viscosus* предизвикува зона на инхибиција со просечна вредност од бмм.

Направена е ANOVA за нумеричките вредности на набљудуваните просечни зони на инхибиција на испитуваните материјали за канална оптурација кон *Actinomyces viscosus*, која покажа  $p < 0.01$  што значи дека постои висока статистичка значајност помеѓу антибактериските дејства на средствата за канална оптурација, каде што апсолутно доминира резорцин-формалин пастата над сите останати средства.

Просечните вредности на зоните на инхибиција на резорцин-формалин пастата кон *Lactobacillus casei* изнесуваат 29.67мм, просечните вредности на зоната на инхибиција на цинк-оксид пастата изнесуваат 10мм, а на калциум хидроксид 6.83мм. Просечната вредност на зоната на инхибиција на јодоформ пастата кон *Lactobacillus casei* изнесува 25.5мм

Нумеричките карактеристики на набљудуваните просечни вредности на зоните на инхибиција на испитуваните материјали за канална оптурација кон *Lactobacillus casei* според ANOVA покажа  $p < 0,01$  што значи дека постои висока статистичка значајност помеѓу антибактериските дејства на средства за

and iodoform paste conflated between each other and had a synergistic effect.

Since calcium hydroxide has a very low antibacterial potential, which was confirmed with the clinical results from its application in the studies group of teeth treated with calcium hydroxide, some of the authors suggest that filling the root canals of primary teeth should include materials which will increase antibacterial efficiency 6,24,30. Zinc oxide compared with iodoform paste and resorcinol formalin paste has a lower antibacterial potential. Adding stronger antibacterial materials would increase its efficiency.

## CONCLUSION

- The highest values of average inhibition zones to *Streptococcus mutans* were shown by iodoform paste, and the lowest antibacterial effect to the same bacterium was presented by calcium hydroxide.
- The highest average value of the inhibition zone to *Actinomyces viscosus* was presented by resorcinol formalin paste, and the lowest antibacterial effect to the same bacterium was presented by calcium hydroxide
- The highest average value of the inhibition zone to *Lactobacillus casei* was presented by resorcinol formalin paste, and the lowest antibacterial effect to the same bacterium was presented by calcium hydroxide
- Zinc oxide eugenol paste presented better antibacterial characteristics over examined bacteria compared to calcium hydroxide.
- Iodoform paste showed strong antibacterial effect to *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*.
- The best antimicrobial effect to all examined bacteria was presented by resorcinol formalin and iodoform paste.

## МАКЕДОНСКИ СТОМАТОЛОШКИ ПРЕГЛЕД

---

канална оптурација, каде што апсолутно доминира резорцин-формалин пастата во однос на другите средства.

Многу автори го испитувале антибактериското дејство на средствата за канална оптурација кон различни соеви на бактерии и при тоа најчесто се користени директниот контакт тест и агар дифузиониот тест.

Во нашето испитување најдобри антибактериски својства покажа резорцин формалин пастата за бактериите *Actinomyces viscosus* и *Lactobacillus casei*, додека јодоформ пастата за бактеријата *Streptococcus mutans*. Секако дека овие две средства покажуваат најдобри антибактериски ефект со што се сложуваат и голем број автори<sup>5,6,24,25,26,27,28,29</sup>.

Интересна е забелешката која беше регистриравме дека кај сите испитувани примероци на бактерии зоните на инхибиција на резорцин-формалин пастата и јодоформ пастата меѓу себе конфлуираа и покажаа синергистичко дејство.

Бидејќи калциум хидроксидот има многу мал антибактериски потенцијал, што се потврди и во клиничките резултати при неговата примена кај испитуваната група на заби третирана со калциум хидроксид, некои од авторите предлагаат за полнење на каналите на млечните заби да се додадат средства кои ќе му ја зголемат антибактериската ефикасност<sup>6,24,30</sup>. И цинк-оксидот во споредба со јодоформ пастата и резорцин-формалин пастата има мал антибактериски потенцијал. Со додавање на посилни антибактериски средства би се подобрила неговата ефикасност.

### ЗАКЛУЧОК

- Највисоки вредности за просечните зони на инхибиција кон бактеријата *Streptococcus mutans* добивме за јодоформ пастатата, додека најмал антибактериски ефект кон истата бактерија покажа калциум хидроксидот;
- Најголема просечната вредност на зоната на инхибиција кон бактеријата *Actinomyces viscosus* беше добиена од резорцин формалин-пастата, а најмал антибактериски ефект кон истата бактерија покажа калциум хидроксидот;

- Најголема просечната вредност на зоната на инхибиција кон бактеријата *Lactobacillus casei* добивме од резорцин-формалин пастата, а најмал антибактериски ефект кон истата бактерија покажа калциум хидроксидот;
- Цинк-оксид еугенол пастата има подобри антибактериски својства кон испитуваните бактерии од калциум хидроксидот;
- Јодоформ пастата покажа силни антибактериски ефект кон бактериите *Actinomyces viscosus* и *Lactobacillus casei*.
- Најдобри антимикробни ефект кон сите испитувани бактерии имаат резорцин- формалин и јодоформ пастата.



**ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES**

1. Fuks BA. Pulp therapy for the primary dentition. *Pediatric dentistry: Infancy Through Adolescence; Second Edition* J.R. Pinkham; W. B. Saunders Company 1988: (326-339).
2. Fuks AB, Papagiannoulis L. Pulpotomy in primary teeth: Review of the literature according to standardized criteria. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2006; 7(2):64-71.
3. Brugger et al. Antibakterijski učinak endodontskog uložka na *Enterococcus faecalis* u dentinu zubnog korijena. *Acta Stomatol Croat.* 2007;41(4):326-336.
4. Buneta Jurić L, Jurić H, Tambić Andrašević A, Škaljac G, Miletić I, Karlović Z, Anić I. Antimikrobni učinak različitih medikamentoznih uložaka tijekom endodontskog liječenja *Acta Stomatol Croat.* 2006; 40: 12-18.
5. Vrcek D, Prpic-Mehicic G, Tambic-Andrasevic A, Poljak-Guberina R, Galic N, Katunaric M. Antimikrobni ucinak Calasepta, Superlux calcium hydroxid linera igitaperka stapica presvucenih kalcijevim hidroksidom. *Acta Stomat Croat.* 2002; 203-207.
6. Tchaou WS, Turng BF, Minah CE, Coll JA. In vitro inhibition of bacteria from root canals of primary teeth by various dental materials. *Pediatr Dent.*1995;17:351-55.
7. Ribaric PS, Brekalo I, Abram M, Miletic I, Anic I, Ferreri S, Glavas FL. Antimikrobni ucinak material za punjenje korenskih kanala. *Acta Stomatol Croat.* 2000; 34:51-54.
8. Wright KJ, Barbosa SV, Araki K, Spangberg LSW. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of Kri paste and zinc oxide-eugenol used in primary tooth pulpectomies. *Pediatr Dent.* 1994; 16:102-6.
9. Goerig CA, Camp HJ. Root canal treatment in primary teeth: A review. *Pediatr Dent.* 1983; 5(1): 33-37.
10. Huth KC, Paschos E, Hajek-Al-Khatar R, Crispin A, Hickel R, Folwaczny M. Effectiveness of 4 pulpotomy techniques-randomized controlled trial; *J Dent Res.* 2005; 84(12): 1144-1148.
11. Takushige T, Cruz EV, Asgor Moral A, Hoshino E. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *Int Endod J.* 2004; 37(2): 132-8.
12. Primosch RE, Glamb TA, Jerrel RG. Primary tooth pulp therapy as taught in predoctoral pediatric dental programs in the United States. *Pediatr Dent.*1997; 19: 118-122.
13. Carlos N, Ronly DM, Garcija-Godoy F, Lakshmyya KN. Resorption of a calcium hydroxide-iodoform paste (Vita-pex) in root canal therapy for primary teeth: A case report. *Pediatr Dent.* 2000; 22:517-520.
14. Mass E, Zilberman UL. Endodontic treatment of infected primary teeth, using Maisto's paste. *ASDC J Dent Child.*1989;56(2):117-20.
15. Fuks BA, Holan G, Davis JM, Eidelman E. Ferric Sulfate versus dilute Formocresol in pulpotomized primary molars: long-term follow up. *Pediatr Dent.* 1997; 19:327-330.
16. Thomas AM, Chandra S, Chandra S, Pandey RK. Elimination of infection in pulpectomized deciduous teeth: a short-term study using iodoform paste. *J Endod.* 1994;20(5):233-5.
17. Mitic A. Ultrstrukturno ispitivanje dentinske površine kanala korena zuba posle primene hemomehanicke, ultrazvucne i laserske tehnike. *Doktorska disertacija.* Nis, 2009.
18. orabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod.* 1990; 16: 466-9.
19. Estrela C, Pécora J. A study of the time necessary for calcium hydroxide to eliminate microorganisms in infected canals. *J App Oral Sci.* 2003; 11(2): 133-137.
20. Moore WC, Morre LH, Ranney RR, Smilbert RM, Burmetster JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 729-39.
21. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentin tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 10:171-81.
22. Esterela et al. Antimicrobial potential of medicaments used in healing process in dogs' teeth with apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2004; 15(3):181-185.
23. Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmun MC, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of mikroorganisms in root canals of human deciduous teth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui*

Odontol Bras. 2003; 17(4):367-71.

24. Amorim L, Toledo O, Estela C, Decurcio D, Estela 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.
25. Vujaskovic M, Radosavljevic B. Antimikrobna aktivnost materijala za trajnu opturaciju kanala korena zuba. *Stom Glas S.* 2006; 53.
26. Tanomaru J, Leonardo M, Tanamaru-Filho M, Silva L, Ito I. Microbial distribution in the root canal system after periapical lesion induction using different methods. *Braz Dent J* 2008;19(2): 124-129.
27. Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Cox CF. Bacterial microleakage and pulp inflammation associated with various restorative materials. *Dent Mater.* 2002;18(6):470-8.
28. Lui JF, Chen LR, Chao SY. Laser pulpotomy of primary teeth. *Pediatr Dent.* 1999; 21(2):128-129.
29. Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod* 1990; 16: 331-34.
30. Yoshiyuki Y, Arihide K, Takashi S. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a new resin-based endodontic sealer against endodontic pathogens. *J Oral Sci.* 2008; 50 (3): 309-313.