

مهار رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن کانال ریشه دندان به روش Antibiosis توسط لاکتیک اسید باکتریا، یک مطالعه In vitro

دکتر فرخ اکبری نخجوانی* - دکتر محمد سعید شیخ‌رضایی[†] - دکتر سعید نگهبانی***

*استادیار گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

**دانشیار گروه آموزشی اندودنتیکس دانشکده دندانپزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران
***اندودنتیست

Title: In vitro growth inhibition of intra root canal pathogenic microorganisms by Lactic Acid Bacteria, an Antibiosis method.

Authors: A. Nakhjavani F. Assistant Professor*, Sheikhezraie MS. Associate Professor** Negahbani S. Endodontist

Address: *Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences

**Department of Endodontics, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences

Background and Aim: Elimination of microorganisms and their byproducts from root canal system is one of important aims of root canal therapy. This object is gained by using of many chemomechanical techniques but with noncertain success. A new method is used of nonpathogenic bacteria for growth inhibition of pathogenic bacteria, Antibiosis, in root canal therapy. The aim of this study was in vitro evaluation of antimicrobial effect of probiotics, such as Lactic Acid Bacteria (LAB) on the infected root canal bacteria.

Materials and Methods: Isolated bacteria from infected root canal were grown and then scattered onto the muller Hinton agar plates which contain wells, LAB, extracted from dairy products, were added into these wells, Inhibition effected of LAB was determined. Furthermore the sample taken from the inhibition zone and possible resistant monoclonal bacteria also were identified, then 6 sensitive and 14 resistant samples were selected and E. faecalis species were added to them; Then antimicrobial effects of LAB on these samples was reevaluated.

Results: The results showed that 66.7% of the samples were sensitive at least to one type of LAB, and 33% were resistant to all kind of LAB. Meanwhile the outgrowing anaerobic bacteria inside the inhibition zone were from the low frequency oral bacterial flora. Furthermore, adding E. faecalis to the samples caused more sensitivity of them to LAB. Mc-Neamar test recognized the difference significant.

Conclusion: This study showed that the LAB inhibit growth of the pathogenic root canal bacteriae. Furthermore, presence of E. faecalis reinforces the antimicrobial effect of LAB. It seemed that LAB maybe have potential to use in endodontic practice for elimination of root canal infections.

Key Words: Lactic Acid Bacteria (LAB); Antibiosis; Apical periodontitis; Root canal infection

چکیده

زمینه و هدف: حذف میکروارگانیسم‌های بیماریزا و فراورده‌های آنها از داخل کانال یکی از اهداف درمان کانال ریشه می‌باشد. این دستاورد با استفاده از روش‌های مکانیکی و شیمیایی مختلفی فراهم می‌گردد اما نتایج حاصله موفقیت قطعی را نشان نمی‌دهد. در سالیان اخیر متدهایی جهت استفاده از باکتری‌های غیربیماریزا جهت مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماریزا در علوم پزشکی ارائه شده است (آنتی‌بیوزیس)، اما در درمان‌های اندودنتیک تاکنون این روش‌ها مورد مطالعه قرار نگرفته است. هدف از این مطالعه بررسی آزمایشگاهی اثر ضد باکتریایی لاکتیک اسید باکتریها (LAB) بر روی باکتری‌های کانال ریشه عفونی بود که می‌تواند یکی از موارد استفاده از پروبیوتیک‌ها در دندانپزشکی باشد.

روش بررسی: باکتری‌های جدا شده از کانال‌های ریشه‌های عفونی دندان را رشد داده و بر روی پلیت‌های حاوی محیط Muller Hinton agar دارای چاهک پخش نمودیم، سپس به چاهک‌های موجود LAB اضافه شد. پلیت‌های مذکور در محیط بی‌هوازی نگهداری شدند. سپس رشد و اثر مهارتی لاکتیک اسید

[†] مؤلف مسؤول: نشانی: تهران - خیابان قدس - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران - دانشکده دندانپزشکی - گروه آموزشی اندودنتیکس

تلفن: ۸۸۷۵۲۱۳۸ نشانی الکترونیک: sheykh_r@yahoo.com

باکتری‌ها بررسی شد. همچنین از درون حاله های ایجاد شده اطراف چاهکها نمونه برداری و تک کلونی‌های مقاوم احتمالی تعیین هویت شد. سپس تعدادی از نمونه‌هایی که حساس و یا مقاوم بودند به تفکیک انتخاب و به آنها سوش میکروبی *Enterococcus faecalis* (E.f) اضافه گردید و اثر LAB همانند روش فوق مجدداً بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ۶۶/۷٪ از نمونه‌های میکروبی کانال ریشه حداقل نسبت به یک سری از LAB حساس بودند و ۳۳/۳٪ از نمونه‌ها به تمامی موارد LAB تحت آزمایش مقاوم بودند. ضمن اینکه باکتری‌های بی‌هوازی رشد یافته در حاله مهاری LAB جزء سویه‌های با تواتر پایین فلور نرمال دهان می‌باشند. همچنین اضافه نمودن E.f به نمونه‌های میکروبی باعث افزایش حساسیت این عفونت‌ها به LAB شد. این اختلاف با استفاده از آزمون Mc-Neamar معنی‌دار بود.

بحث و نتیجه‌گیری: بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که LAB می‌توانند رشد باکتری‌های بیماری‌زای کانال ریشه را مهار نمایند. با توجه به اینکه باکتری E.f در عفونت‌های مقاوم به درمان، غالب می‌باشد و از سوی دیگر حضور همین میکروارگانیسم باعث افزایش اثر مهاری LAB بر روی میکروارگانیسم‌های عفونت کانال ریشه می‌شود، می‌توان به نتایج درمانی این روش امیدوار بود.

کلید واژه‌ها: لاکتیک اسید باکتری؛ آنتی بیوزیس؛ پریدونتیت اپیکال؛ عفونت کانال ریشه

وصول: ۸۶/۰۶/۳۰ اصلاح نهایی: ۸۷/۰۵/۰۷ تأیید چاپ: ۸۷/۰۶/۲۰

مقدمه

مصرفی روزانه وجود دارند (پروبیوتیک‌ها)، بررسی صورت گیرد. از این گروه می‌توان به لاکتیک اسید باکتریها اشاره نمود که غالباً باسیل‌های گرم منفی بی‌هوازی هستند و در این مطالعه اثر آنها بر روی میکروارگانیسم‌های پاتوژن کانال ریشه مورد بررسی قرار گرفته است. البته قابل ذکر است که این روش تاکنون در درمان‌های اندودنتیک مورد استفاده قرار نگرفته، اما در دیگر شاخه‌های علوم پزشکی و تا حدودی در برخی رشته‌های دندانپزشکی مورد استفاده قرار گرفته است. این تحقیق می‌تواند یک مطالعه جدید در این زمینه محسوب شود و تا رسیدن به هدف مطلوب ذکر شده نیاز به تحقیقات بیشتر بر روی میکروارگانیسم‌های پاتوژن مختلف، گونه‌های دیگر لاکتوباسیل‌ها، شرایط متفاوت دیگر و نهایتاً مطالعات *In vivo* دارد.

روش بررسی

۱- تهیه و تخلیص *Lactobacillus* (LAB)

نمونه‌های لبنی جمع‌آوری شده از سراسر کشور جهت جداسازی باکتری‌های لاکتیک اسید در محیط‌های کشت *lactobacillus agar* و *MRS broth agar* کشت داده، سپس محیط‌های کشت شده موجود در سه درجه حرارت ۱۵، ۳۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و هر ۲۴ ساعت رشد میکروارگانیسم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنگاه کلونی‌های گرم، قهوه‌ایی یا خاکستری رنگ با قوام خامه‌ای و قطر ۱-۲ میلی‌متر انتخاب و تحت آزمایش‌های تعیین و تایید هویت که شامل رنگ‌آمیزی گرم، بررسی میکروسکوپی و تست کاتالاز بود، قرار گرفتند.

باکتری‌ها علت اصلی بیماری‌های پالپ و پری اپیکال می‌باشند (۱). موفقیت درمان کانال ریشه در گذشته بر پایه ضدعفونی کردن کامل کانال ریشه با پروسه‌های شیمیایی و مکانیکی بود. با این حال ضدعفونی کردن کامل سیستم کانال ریشه با استفاده از روش‌های معمول مکانیکی و شیمیایی بسیار سخت است (۲، ۳). برای ضدعفونی کردن کانال ریشه از موادی همچون هیپوکلرید سدیم با غلظت‌های مختلف و کلروهگزیدین و هیدروکسید کلسیم استفاده شده است. اما بدلیل مختلف از جمله پیچیدگی سیستم کانال ریشه (۴) و عدم دسترسی مواد به بعضی نواحی آن، وجود لایه اسمیر و دبری (۵)، وجود بیوفیلم میکروبی (۶) و غیرفعال شدن مواد ضدعفونی در مجاورت با عاج (۷) و با گذشت زمان و نفوذ بعضی از میکروارگانیسم‌ها به داخل توبول‌های عاجی و عدم دسترسی مواد ضدعفونی کننده به آنها، هیچکدام از این مواد نمی‌توانند سیستم کانال ریشه را به طور کامل ضدعفونی نمایند و همیشه در درصد قابل توجهی از کانال‌های ریشه، عفونت باقی می‌ماند. با توجه به محدودیت‌های عملی موجود و بعضی معایب مواد ضدعفونی کننده مورد استفاده، شاید بهتر باشد روش‌های دیگری بجز استفاده از مواد شیمیایی جهت حذف میکروارگانیسم‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

جهت نیل به این هدف در این تحقیق سعی گردیده بر روی گونه‌ای از باکتری‌های غیر پاتوژن که قابلیت مهار رشد میکروارگانیسم‌ها را دارا می‌باشند و به طور معمول نیز در غذای

۲- نمونه‌گیری

ذکر است که از ۱۴ نوع LAB متفاوت استخراج شده از محصولات لبنی تولید ایران در این تحقیق استفاده شد. بعد از این مدت پلیت‌های حاوی چاهک‌های لاکتوباسیل از جهت وجود یا عدم وجود هاله رشد اطراف هریک از نمونه‌های LAB مورد مشاهده قرار گرفتند. از درون هاله‌های ایجاد شده در صورت وجود یک یا چند تک کلونی مقاوم، این کلونی‌ها جدا شده و از آنها کشت بی‌هوازی در محیط blood agar دارای hemin تهیه و به مدت ۷۲ ساعت دیگر در جار بی‌هوازی تحت همان شرایط بی‌هوازی قبل نگهداری می‌شد. همچنین جهت جداسازی بی‌هوازی‌های اختیاری از بی‌هوازی‌های اجباری، از کلونی‌های جدا شده قبل در محیط muller hinton agar کشت هوازی نیز داده شد.

کلونی‌های بی‌هوازی با استفاده از کیت تشخیص بی‌هوازی RAPID ANA II System (ساخت شرکت remel) طبق پروتکل روش استفاده کارخانه سازنده تعیین هویت شدند.

همچنین جهت بررسی اثر LAB بر E. faecalis به صورت تصادفی ۱۴ نمونه مقاوم و ۶ نمونه حساس از عفونت‌های کانال ریشه را که طی مراحل قبل مشخص شده بودند انتخاب نموده و سوبه‌های E. faecalis را به آنها اضافه و مراحل را همانند روش فوق تکرار و نتایج ثبت شد.

آنالیز آماری:

تشکیل و یا عدم تشکیل هاله در اطراف چاهک‌های حاوی LAB به صورت درصد بیان شد و درخصوص مقایسه نتایج حاصله از گروه قبل و بعد از مخلوط کردن با E. faecalis از تست Mc-Neamar استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج نشان می‌دهد که از مجموع ۷۵ نمونه کار شده در این تحقیق در ۵۰ نمونه آن حداقل در اطراف یکی از چاهک‌های حاوی LAB هاله مهار رشد دیده شد (۶۶/۷٪) و در ۲۵ نمونه دیگر هیچگونه هاله مهار رشد در اطراف چاهک‌های حاوی LAB دیده نشد (۳۳/۳٪). از کلیه کلونی‌های باکتری‌های مقاوم اطراف چاهک‌های LAB در ۷۵ نمونه کار شده توسط کیت تشخیص بی‌هوازی RAPID ANA II System باکتری‌های زیر شناسایی شدند:

(۴ بار) C. innocuum - (۶ بار) C. hastiforme -

تعداد ۷۵ بیمار دارای دندان عفونی با ضایعه پری اپیکال که نیاز به درمان اولیه یا مجدد اندودنتیک داشتند و جهت درمان به بخش تخصصی اندودنتیک دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران مراجعه نموده بودند، انتخاب شدند. پس از برداشت پوسیدگی و ترمیم دندان‌های مذکور توسط فرزند انگل و فرزند الماسی توربین مجهز به سیستم آب استریل، دندان‌های مذکور با رابردم ایزوله شده و سطح دندان و را بردم با بتادین ۱۰٪ اسکراب شد. بعد از آن سطوح مذکور با سرم فیریولوزیک استریل شستشو شده و حفره دسترسی تهیه و تکمیل گردید.

با یک عدد فایل ۱۵، ۲۰ و یا ۲۵ استریل مسیر کانال تا ناحیه اپکس بدون شستشوی کانال بازگردید. سپس با استفاده از مخروط‌های کاغذی استریل سایز ۲۰ از داخل کانال نمونه‌برداری صورت گرفت. مخروط‌های کاغذی بدست آمده در لوله‌های حاوی تیوگلیکولات مدیوم قرار گرفت و بلافاصله جهت انجام مراحل بعدی کار به گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال یافت.

۳- کشت و مجاورت با باکتری‌های لاکتیک اسید

نمونه‌های اخذ شده از کانال‌های عفونی را به محیط کشت تیوگلیکولات دارای معرف انتقال داده و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه جهت رشد میکروارگانیسم‌های موجود نگهداری شدند:

جهت مجاورت میکروارگانیسم‌ها و LAB از پلیت‌های حاوی muller hinton agar استفاده شد. ابتدا بوسیله لوله آزمایش باریک به صورت کاملاً استریل بر روی هریک از این محیط کشت‌ها تعداد ۶ عدد چاهک با فاصله کافی ایجاد شد.

با استفاده از فیلدوپلاتین (Loop) از درون لوله محیط کشت تیوگلیکولات حاوی نمونه‌های میکروبی داخل کانال دو لوپ پر، محتوی نمونه باکتریایی به صورت مخلوط برداشته شده و بر روی محیط‌های کشت تهیه شده که دارای چاهک بودند بخش شدند. بعد از آن در درون چاهک‌های مذکور LAB تخلیص شده ریخته شد. پلیت‌ها در جار مخصوص بی‌هوازی با فشار دی اکسید کربن ۵-۱۰٪ در دمای ۳۷ درجه به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. قابل

از طرفی در مطالعات مختلف دیده شده که در نمونه‌های تهیه شده از کانال در درمان‌های اولیه اندودنتیک، ۹۸٪ از باکتری‌ها، بی‌هوازی اجباری می‌باشند (۲۸). در صورتی که در کانال‌های ریشه که درمان اندودنتیک شده ولی نیاز به درمان مجدد دارند ۷۵٪ موارد بی‌هوازی اختیاری هستند و ۱۷٪ موارد بی‌هوازی اجباری می‌باشند (۲۹). این تحقیقات نشان‌دهنده این مطلب می‌باشد که کانال ریشه دندان‌های درمان ریشه شده محیط مناسبی جهت رشد بی‌هوازی‌های اختیاری می‌باشد.

از مجموع دلایل و قراین فوق چنین استنباط می‌شود که محیط کانال ریشه بعد از درمان اندودنتیک یک محیط ضدعفونی شده و فاقد میکروارگانیسم نمی‌باشد و بر فرض این نکته که بتوان محیط فاقد میکروارگانیسم ایجاد نمود بدلیل وجود راه‌های مختلفی که منجر به عفونت مجدد مجموعه کانال ریشه می‌شود و امکان مسدود کردن تمامی راه‌ها وجود ندارد، نمی‌توان این محیط ضدعفونی و احیاناً استریل را برای مدت زمان طولانی حفظ کرد. بدین ترتیب یک محیط استریل دارای استعداد بالقوه جهت آلودگی مجدد و چه بسا آلودگی توسط یک میکروارگانیسم پاتوژن همانند *E. faecalis* می‌باشد که نهایتاً می‌تواند منجر به شکست درمان و ایجاد یک عفونت مقاوم‌تر از قبل گردد. با توجه به مطالب فوق به نظر می‌رسد در صورت امکان اگر بتوان از میکروارگانیسمی در محیط کانال ریشه استفاده نمود که ضمن غیر پاتوژن بودن و *biocompatible* بودن با بدن انسان (probiotic)، قابلیت زیست در محیط کانال ریشه را نیز داشته باشد و بتواند باعث مهار رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن کانال ریشه شود، می‌تواند تحول بزرگی در درمان‌های اندودنتیک ایجاد نماید.

باتوجه به شرایط خاص سیستم کانال ریشه تحت درمان اندودنتیک، باکتری‌های LAB می‌توانند انتخاب مناسبی جهت بررسی این فرضیه باشند. در این مطالعه این باکتری‌ها را از مواد لبنی که به طور معمول و روزانه توسط انسان مصرف می‌شود (همچون شیر و ماست) و غیر پاتوژن بودن و حتی مفید بودن آنها به اثبات رسیده، استخراج و مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که باکتری‌های پاتوژن کانال ریشه دندان به LAB مورد آزمایش حساس بوده و رشد آنها مهار می‌شود. همچنین نکته جالب توجه دیگر اینکه اضافه کردن باکتری *E. faecalis* به مخلوط

- ۱) *C. botulinum* (بار ۲) - *C. sporogenes* (بار ۲)
 - ۴) *Wolinella* (بار ۱) - *C. bififormentans* (بار ۱)
 - ۲) *Capnocytophaga* (بار ۳) - *mob. cartisii* (بار ۳)
 - ۳) *A. israelii* (بار ۲) - *L. jensenii* (بار ۲)
 - ۲) *Pr. corporis* (بار ۲) - *Prop. acnes* (بار ۲)
 - ۱) *Pr. melanogenicous* (بار ۱) - *Bifidobacterium* (بار ۱)
 - ۲) *L. acidophilus* (بار ۱) - *F. varium* (بار ۱)
- در خصوص بررسی تاثیر افزودن *E. faecalis* به نمونه‌های میکروبی مقاوم و حساس که بطور تصادفی انتخاب شده بودند، دیده شد که در ۱۴ نمونه (۷۰٪) مقاوم و ۶ نمونه (۳۰٪) حساس، پس از اضافه نمودن *E. faecalis* به نمونه‌ها، به ۱۴ نمونه (۷۰٪) حساس و ۶ نمونه (۳۰٪) مقاوم تغییر یافتند که این اختلاف ($p=0/01$) معنی‌دار می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری

لاکتیک اسید باکتری‌ها (لاکتوباسیل‌ها) تقریباً ۱٪ از فلور میکروبی قابل کشت دهان را تشکیل می‌دهند (۸). لاکتیک اسید باکتری (LAB) و محصولاتشان تأثیرات مثبتی بر روی هموستازیس (Homeostasis) میزبان شامل فعال کردن سیستم ایمنی دارا می‌باشند و می‌توانند سلول‌های تولید کننده *IgA* و *IgG* و ماکروفاژها را نیز فعال نمایند. همچنین می‌توانند اثر ضد ویروسی بر علیه ویروس‌های تب خال داشته باشد (۹، ۱۰). LAB می‌توانند با تولید متابولیت‌های مختلف مثل H_2O_2 (۱۱)، اسید لاکتیک (۱۲)، Biosurfactants (۱۴-۱۹)، Immunomodulation (۲۰-۲۲)، مولکول‌های ضد میکروبی شامل باکتریوسین (Bacteriocin) و مواد شبه باکتریوسینی (۲۳)، خاصیت ضد باکتریایی داشته باشند.

به صورت *in vitro* نشان داده شده که بعضی از لاکتوباسیل‌ها و لاکتوکوک‌ها فعالیت ضد میکروبی بر علیه پاتوژن‌های پریدنتال مثل پورفیروموناس ژنژیوالیس و پروتلا اینترمدیا دارا می‌باشند (۲۴، ۲۵) و نیز لاکتوباسیل‌های دهانی (homo و heterofermentative) رشد پاتوژن‌های پریدنتال را سرکوب می‌کنند (۲۶).

همچنین دیده شده که LAB بر روی استرپتوکوک موتانس مؤثر است و باعث مهار آن می‌شود و می‌تواند پوسیدگی حاصل از آن را کاهش دهد (۲۷).

خصوص انتخاب بهترین LAB جهت کمک به درمان عفونت‌های اندودنتیک باز نماید. مطالعه حاضر بعنوان یک مطالعه In vitro و اولیه در این خصوص می‌باشد. لذا جهت رسیدن به یک نتیجه مطلوب و استفاده از LAB در درمان عفونت کانال ریشه نیازمند مطالعات مکمل و گسترده‌تری می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۳۲/۷۹۱۲ می‌باشد.

میکروارگانیسمی حاصل از کانال ریشه عفونی باعث افزایش اثر مهارتی LAB بر روی میکروارگانیسیم‌ها می‌شود. لذا شاید بتوان نتیجه گرفت که عفونت کانال ریشه که بواسطه وجود E. faecalis مقاوم‌تر به درمان‌های معمول اندودنتیک می‌شود به روش جدید حساس‌تر است. از طرفی دیگر براساس مطالعات موجود E. faecalis خود نیز به LAB حساس بوده و LAB می‌تواند مانع رشد E. faecalis شود (۳۰). که این مورد نیز می‌تواند یکی از نقاط قوت LAB در کمک به درمان عفونت‌های کانال ریشه دندان باشد.

همانطور که ذکر شد LAB دارای طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسیم‌ها می‌باشد که میزان متفاوتی از متابولیت‌های ذکر شده تولید می‌نمایند و این موضوع می‌تواند باب مطالعات دیگری را در

منابع:

- 1- Stephen Cohen , Kenneth M. Hargreaves. Pathways of the Pulp. 9th ed. London: mosby,2006. p: 581 – 2
- 2- Shuping, G. Ørstavik, D. Sigurdsson, A. Trope, M. Reduction of Intracanal Bacteria Using Nickel-Titanium Rotary Instrumentation and Various Medications. J Endodon,2000; Volume 26(12), December : p 751–755
- 3- Peters LB, Van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. Int Endod J.2002; 35: 13–21.
- 4- John I.Ingle,Leif K. Bakland. Endodontics. 5th ed.London:Hamiltonp , 2002:p 77
- 5- Clark-Holke D, Drake D, Walton R, Rivera E, Guttmiller JM. Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. Journal of Dentistry 2003; 31: 275–81.
- 6- Gilbert P. , Das J. , Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. Adv Dent Res.1997; U(1),April :160-167.
- 7- Haapasalo HK, SireÅ n EK, Waltimo TMT, érstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. International Endodontic Journal.2000; 33: 126-131.
- 8- Kořil-Klais P, Mařndar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarstrořm L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity.Oral Microbiol Immunol ,2005; 20: p354–361.
- 9- Fernandes C.F., Shahani K.M., Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli, J. Food Prot.1990 ; 53 : 704–710.
- 10- Watanabe T., Saito H., Protection of mice against herpes simplex virus infection by a Lactobacillus casei preparation (LC9018) in combination with inactivated viral antigen, Microbiol. Immunol. 1986;30 : 111–122.
- 11- St Amant, D.C., Valentin-Bon, I.E. and Jerse, A.E. Inhibition of Neisseria gonorrhoeae by Lactobacillus species that are commonly isolated from the female genital tract. Infect. Immun. 2002; 70: 7169–7171.
- 12- Vandenberg, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol. Rev. 1993 ;12 : 221–238.
- 13- Velraeds, M.M., Van Der Mei, H.C., Reid, G. and Busscher, H.J. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic Enterococcus faecalis by biosurfactants from Lactobacillus isolates. Appl. Environ. Microbiol.1996;62: 1958–1963.
- 14- Blum, S. and Schiffrin, E.J. Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: implications for probiotic bacteria? Curr. Issues Intest. Microbiol.2003; 4: 53–60.
- 15- Minja Miettinen, Jaana Vuopio-Varkila, Kari Varkila. Production of Human Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin-6, and Interleukin-10 Is Induced by Lactic Acid Bacteria. Infection and immunity; 1996, Vol. 64, No. 12 : p. 5403–5405
- 16- Klebanoff, S.J., Watts, D.H., Mehlin, C. and Headley, C.M. Lactobacilli and vaginal host defense: activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat, cytokine production, and NF-kappaB. J. Infect. Dis.1999; 179: 653–660.
- 17- Chen, T., Isomaki, P., Rimpilainen, M. and Toivanen, P. Human cytokine responses induced by gram-positive cell walls of normal intestinal microbiota. Clin. Exp. Immunol ,1999 ; 118: 261–267.
- 18- Yasui, H., Shida, K., Matsuzaki, T. and Yokokura, T. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek ,1999 ; 76: 383–389. (abstract)
- 19- Matsuzaki, T. and Chin, J. (2000) Modulating

- immune responses with probiotic bacteria. *Immunol. Cell Biol.* 2000 ; 78: 67–73. (abstract)
- 20-** Kim, T.S., Hur, J.W., Yu, M.A., Cheigh, C.I., Kim, K.N., Hwang, J.K. and Pyun, Y.R. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food Protect.* 2003 ;66: 3–12.
- 21-** Zamfir, M., Callewaert, R., Cornea, P.C., Savu, L., Vatafu, I. and De Vuyst, L. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *J Appl Microbiol* 1999; 87: 923–931.
- 22-** Zamfir, M., Callewaert, R., Cornea, P.C. and De Vuyst, L. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000 ; 190: 305–308.
- 23-** M Silva, N V Jacobus, C Deneke, and S L Gorbach. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987 August; 31(8): 1231–1233.
- 24-** Doran A, Kneist S, Verran J. Ecological control: in vitro inhibition of anaerobic bacteria by oral streptococci. *Microb Ecol Health Dis* 2004; 16: 23–27.
- 25-** Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol* 2001; 90: 172–179.
- 26-** Kořil-Klais P, Mařdar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarstrořm L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 354–361.
- 27-** H. Nikawaa, S. Makihiraa, H. Fukushimaa, H. Nishimuraa, Y. Ozakia, K. Ishidaa, S. Darmawana, T. Hamadaa, K. Harab, A. Matsumotob, T. Takemotob, R. Aimic *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci *International Journal of Food Microbiology*, 2004; 95 : 219–223
- 28-** John I.Ingle, Leif K. Bakland. *Endodontics*. 5th. London: Hamiltonp , 2002 p : 67
- 29-** Adib V, Spratt D, Ng Y-L, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J*, 2004; 37:542–551.
- 30-** A. Nakhdjavani F., Moazami N., Lamea H. Growth inhibition of pathogens by lactic acid bacteria producing inhibitory substances. *Medical Journal of IRI*, 1996; Vol 10, No.2: p159 -163.