Original Article

pISSN, eISSN 0125-5614
M Dent J 2020; 40 (3) : 221-230

Comparison of irrigation techniques on *Enterococcus faecalis* reduction: *in vitro* study

Sirikan Janwattanavej[1], **Lalida Ongchavalit[2]**, Ratchapin Laovanitch Srisatjaluk[3]

[1] *Department of Endodontics, Maha Chakri Sirindhorn Dental Hospital, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Bangkok, Thailand*
[2] *Department of Operative Dentistry and Endodontics, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Bangkok, Thailand*
[3] *Department of Oral Microbiology, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Objectives: To evaluate and compare the antibacterial efficacy of needle irrigation, passive ultrasonic irrigation technique (PUI) and continuous ultrasonic irrigation technique (CUI) in molar teeth

Materials and methods: The mesial roots of 35 mandibular molars were instrumented in a crown-down manner with K3 nickel titanium files to achieve a master apical file size 35/.04. All root canals were contaminated with *Enterococcus faecalis*. The initial bacteriologic samples were collected from all teeth before irrigation. Specimens were randomly assigned to 3 experimental groups: group 1 NaOCl/needle irrigation, group 2 NaOCl/PUI, and group 3 NaOCl/CUI. Bacteriologic samples were collected immediately after irrigation. The percentages of bacterial reduction from 3 experimental groups were compared (*p-value*<.05)

Results: There was a significant difference in the percentages of bacterial reduction between three experimental groups. The PUI group showed the percentage of bacterial reduction greater than the CUI group, however the percentage of bacterial reduction of needle irrigation group was not significantly different from PUI and CUI groups.

Conclusions: All irrigation techniques could reduce a number of bacteria from contaminated root canals. The PUI group produced greater antimicrobial efficacy than the CUI group.

Keywords: *Enterococcus faecalis,* continuous ultrasonic irrigation technique, in vitro, irrigation, molar tooth, passive ultrasonic irrigation technique

How to cite: Janwattanavej S, Ongchavalit L, Srisatjaluk R L. Comparison of irrigation techniques on *Enterococcus faecalis* reduction: *in vitro study*. M Dent J 2020; 40: 221-230.

Correspondence author: Lalida Ongchavalit
Department of Operative dentistry and Endodontics, Faculty of Dentistry, Mahidol University
6 Yothi Street, Rachathewee District, Bangkok 10400, Thailand
Email: lalida.ong@mahidol.ac.th
Received : 1 October 2019 Accepted: 22 September 2020

pISSN, eISSN 0125-5614
M Dent J 2020; 40 (3) : 221-230

การเปรียบเทียบการลดเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ภายหลังการล้างคลองรากฟันด้วยวิธีต่าง ๆ: การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

ศิริกาญจน์ เจนวัฒนาเวช[1], **ลลิดา องค์ชวลิต**[2], รัชชพิน ศรีสัจจะลักษณ์[3]

[1] *วิทยาเอ็นโดดอนต์ โรงพยาบาลทันตกรรมมหาจักรีสิรินธร คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล*

[2] *ภาควิชาทันตกรรมหัตถการและวิทยาเอ็นโดดอนต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล*

[3] *ภาควิชาจุลชีววิทยาช่องปาก คณะทันแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล*

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิสภายหลัง การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์ และวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ และการใช้เข็มล้างแบบปกติ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา: ใช้ฟันกรามล่างจำนวน 35 ซี่ ขยายคลองรากฟัน ทำให้ฟันติดเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส แบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ซี่ ทุกกลุ่มถูกล้างด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ โดย กลุ่ม 1 เข็มล้างแบบปกติ กลุ่ม 2 ใช้วิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ กลุ่ม 3 ใช้วิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์ และตรวจปริมาณเชื้อหลังล้างทันที เพื่อเปรียบเทียบร้อยละผลต่างของปริมาณเชื้อก่อนและหลังล้างระหว่างกลุ่มทดลองที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 5

ผลการทดลอง: ร้อยละผลต่างปริมาณเชื้อก่อนและหลังล้างมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์ ลดจำนวนเชื้อได้มากกว่าวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มเข็มล้างเมื่อเปรียบเทียบวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์ และวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์

บทสรุป: การล้างคลองรากฟันกรามทั้ง 3 วิธี สามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียในคลองรากฟันได้ โดยวิธีแพสซีฟ อัลตราโซนิกส์ มีประสิทธิภาพในการลดเชื้อได้มากกว่าวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์

รหัสคำ: การล้างคลองรากฟัน, การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์, การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์, เอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส, การทดลองในห้องปฏิบัติการ, ฟันกราม

การอ้างอิง: ศิริกาญจน์ เจนวัฒนาเวช, ลลิดา องค์ชวลิต, รัชชพิน ศรีสัจจะลักษณ์, การเปรียบเทียบการลดเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิสภายหลังการล้างคลองรากฟันด้วยวิธีต่างๆ: การศึกษาในห้องปฏิบัติการ. ว ทันต มหิดล 2563; 40: 221-230.

บทนำ

วัตถุประสงค์หลักของการรักษาคลองรากฟันคือการป้องกันการเกิดพยาธิสภาพและรักษาพยาธิสภาพรอบปลายรากฟัน ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย [1, 2] ดังนั้นในการรักษาคลองรากฟันควรกำจัดเนื้อเยื่อในและเนื้อฟันที่ติดเชื้อออกให้ได้มากที่สุด [3] แต่เนื่องจากคลองรากฟันมีลักษณะทางกายวิภาคที่ซับซ้อน [4] จึงมีความจำเป็นที่ต้องใช้การล้างคลองรากฟันด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟันที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย [5] การติดเชื้อในคลองรากฟันแบบปฐมภูมิจะเป็นการติดเชื้อแบบผสม โดยจะพบเชื้อแบคทีเรียร่วมกันหลายชนิด กรณีการติดเชื้อที่ดื้อต่อการรักษาคลองรากฟัน มักพบว่าสัมพันธ์กับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส *(Enterococcus faecalis)* [6, 7] ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวกรูปกลมที่ดำรงชีวิตได้ทั้งในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งเชื้อชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่มีปัจจัยส่งเสริมในการเกิดโรคและยังมีคุณสมบัติทนทาน

ผู้รับผิดชอบบทความ: ลลิดา องค์ชวลิต
ภาควิชาทันตกรรมหัตถการและวิทยาเอ็นโดดอนต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
เลขที่ 6 ถนนโยธี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
อีเมล: lalida.ong@mahaidol.ac.th.
วันรับเรื่อง : 1 ตุลาคม 2563 วันยอมรับการตีพิมพ์: 22 กันยายน 2563

ต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ รวมไปถึงมีความสามารถในการจับกับผิวเนื้อฟัน และเข้าไปอาศัยในท่อเนื้อฟัน และยังเจริญเติบโตเป็นคราบจุลินทรีย์ (biofilm) ได้อีกด้วย [8] คุณสมบัติเหล่านี้จึงทำให้เชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ยากต่อการกำจัดด้วยวิธีการรักษาคลองรากฟันทั่วไป [9-12]

การล้างคลองรากฟันด้วยเข็มล้างตามปกติ โดยใช้เข็มชนิดและขนาดต่างๆ ล้างคลองรากฟัน เป็นวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากอุปกรณ์หาได้ง่าย สามารถควบคุมความลึกของเข็มและปริมาณน้ำยาได้ [13] อย่างไรก็ตาม ในขณะที่การล้างด้วยเข็มปลายเปิด (open ended needle) หากดันน้ำยาแรงเกินไปอาจเกิดการดันน้ำยาออกไปนอกปลายรากทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วยได้ [14, 15] นอกจากนี้ การล้างคลองรากด้วยเข็มล้างในคลองรากฟันที่เป็นระบบปิด จะเกิดฟองอากาศบริเวณปลายรากฟัน ทำให้น้ำยาล้างคลองรากฟันไม่สามารถไหลลงไปยังส่วนปลายของคลองรากฟันได้ (vapor lock) [16]

การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์ (Passive ultrasonic irrigation: PUI) เป็นการใช้ไฟล์สั่นสะเทือนด้วยความถี่ 25-30 kHz โดยไม่มีการสัมผัสของไฟล์กับผนังคลองรากฟัน แต่จะอาศัยพลังงานที่เกิดจากคลื่นความถี่สูง ส่งที่ผ่านไปยังน้ำยาล้างคลองรากฟันในการทำความสะอาดคลองรากฟัน โดยคลื่นพลังงานที่มีความถี่สูงจะทำให้เกิดปรากฏการณ์อะคูสติก สตรีมมิง (acoustic streaming) และคาวิเตชัน (cavitation) สำหรับอะคูสติก สตรีมมิง เป็นการเคลื่อนที่เป็นวงกลมของของเหลวด้วยความเร็วสูง ทำให้เกิดแรงเฉือนและทำให้เศษเนื้อเยื่อและแบคทีเรียหลุดออกจากผนังคลองรากฟัน ซึ่งความแรงในการจะขึ้นอยู่กับความสามารถที่ปลายไฟล์สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระในคลองรากฟันโดยไม่สัมผัสกับผนังคลองรากฟัน และขนาดของปลายไฟล์ ซึ่งถ้าปลายไฟล์ยิ่งมีขนาดเล็กความแรงจะเพิ่มมากขึ้น [17] คาวิเตชัน (cavitation) เป็นการเกิดฟองอากาศในของเหลวซึ่งเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว โดยเมื่อฟองอากาศแตกออกจะเกิดพลังงานที่ช่วยในการทำความสะอาดได้ [17] จากการศึกษาพบว่าการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์พบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายเนื้อเยื่อของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ [18] เพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเศษเนื้อเยื่อและเศษเนื้อฟัน [9] รวมถึงเพิ่มความสามารถในการลดเชื้อแบคทีเรียที่ลอยอยู่ในคลองรากฟัน (planktonic bacteria) [19, 20] เนื่องจากการเกิดอะคูสติก สตรีมมิง ทำให้มีการผลักน้ำยาเข้าไปสัมผัสกับผนังคลองรากฟันส่วนที่ไม่ได้รับการขยายและคลองรากฟันย่อยได้ดีกว่าการล้างตามปกติ [21-24] และยังเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดแคลเซียมไฮดรอกไซด์และเศษเนื้อเยื่อฟันออกจากผนังคลองรากฟันทำให้เพิ่มการแทรกซึมของเรซินซีลเลอร์เข้าไปในท่อเนื้อฟัน [25, 26]

ต่อมาได้มีการพัฒนาระบบ การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ (continuous ultrasonic irrigation: CUI) ขึ้นมาโดยใช้หลักการเดียวกันกับการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์แต่มีข้อดีที่เหนือกว่า เนื่องจากเครื่องมือมีลักษณะเป็นเข็มที่มีการสั่นด้วยความถี่เหนือเสียงพร้อมกับมีการปล่อยน้ำยาออกจากปลายเข็มตลอดเวลา ทำให้มีการเปลี่ยนน้ำยาล้างคลองรากฟันอย่างต่อเนื่อง การศึกษาประสิทธิภาพการทำความสะอาดบริเวณรอยคอดระหว่างรากฟัน โดยการดูจากลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์พบว่า การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์สามารถทำความสะอาดส่วนรอยคอดระหว่างรากฟันที่บริเวณปลายรากฟันได้ดีกว่าเข็มล้างแบบเปิดด้านข้าง นอกจากนั้นมีการศึกษาทางคลินิก พบว่า การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์สามารถกำจัดเชื้อและเศษเนื้อเยื่อที่หลงเหลืออยู่ได้ดีกว่า การใช้เข็มล้างแบบปกติ [27-29]

จากการทบทวนวรรณกรรม พบการศึกษาที่เปรียบประสิทธิภาพของการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์และ การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ในการแพร่ของน้ำยาล้างคลองรากฟันไปยังคลองรากฟันหลักและคลองรากฟันย่อย โดยพบว่า เมื่อล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการแพร่ของน้ำยาล้างคลองรากฟันไปยังคลองรากฟันย่อยได้ดีกว่า [32] แต่ยังไม่พบการศึกษาใดเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ

การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์และการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดเชื้อในคลองรากฟันภายหลังการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์และวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ และ การใช้เข็มล้างแบบปกติโดยใช้เชื้อ เอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิสเป็นแบคทีเรียทดสอบ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมฟัน

ใช้ฟันกรามล่างที่ถูกถอนด้วยเหตุผลจากโรคปริทันต์ จำนวน 35 ซี่ โดยฟันทุกซี่มี 2 รากแยกจากกันปลายรากสมบูรณ์ มีลักษณะรากตรง โดยมีการตรวจสอบลักษณะของคลองรากฟันจากภาพถ่ายรังสีด้านข้างและฟันทุกซี่จะมีการวัดขนาดของปลายรากฟันโดยเป็นฟันที่สามารถสอดเค-ไฟล์ขนาด 20 ผ่านรูเปิดปลายรากและมีความคับแน่น ตัดส่วนตัวฟันบริเวณเหนือรอยต่อของเคลือบรากฟันและเคลือบฟัน จนได้ฟันที่มีความยาว 16 มิลลิเมตร และแบ่งตัวฟันส่วนไกลกลางและใกล้กลางของฟันออกจากกันตามแนวยาว หลังจากนั้นนำส่วนใกล้กลางของฟันที่ตัดออกมาอุดปิดส่วนรอยตัดตัวฟันด้านไกลกลางด้วยเรซินคอมโพสิต และใช้ความยาว ณ ตำแหน่งนี้ลบ 0.5 มิลลิเมตร เป็นความยาวในการทำงาน หลังจากนั้นขยายคลองรากฟันโดยใช้เครื่องมือขยายชนิดตะไบที่หมุนด้วยเครื่องกลชนิดเคทรี (K3®, SybronEndo Corporation, Orange, California, USA) จนถึงขนาด 35/.04 ทำการผนึกรูเปิดปลายรากฟันด้วยวัสดุอุดเรซินคอมโพสิตและเคลือบบริเวณผิวฟันด้านนอกโดยรอบด้วยน้ำยาทาเล็บสีต่างกัน 2 ชั้น (รูปภาพ 1) โดยโครงการวิจัยได้ผ่านการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ประจำคณะทันตแพทยศาสตร์และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Ethic number: Comparison of irrigation techniques on *Enterococcus faecalis* reduction: *in vitro* study COE 2014/016.2703

การทำให้ฟันทดลองปราศจากเชื้อ

นำฟันที่เตรียมแล้วแต่ละซี่ แยกใส่ขวดที่มีฝาปิดซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลว (BHI, Brain Heart Infusion Broth, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยเครื่องอบความดันไอน้ำ (Autoclave) ตรวจสอบการทำให้ปลอดเชื้อ (Sterility test) โดยนำขวดดังกล่าวเข้าตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟันทดลองอยู่ต้องไม่มีการปนเปื้อนจึงจะใช้ในการทดลอง หากมีการปนเปื้อนอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น ฟันตัวอย่างนั้นก็จะไม่นำมาใช้ทดลอง

การทำให้คลองรากฟันทดลองติดเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส

นำเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส สายพันธุ์, มาตรฐาน (ATCC 29212) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลว และปรับความขุ่นของสารละลายเชื้อ ให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland 0.5 ซึ่งได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1.0×10^{8} โคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร

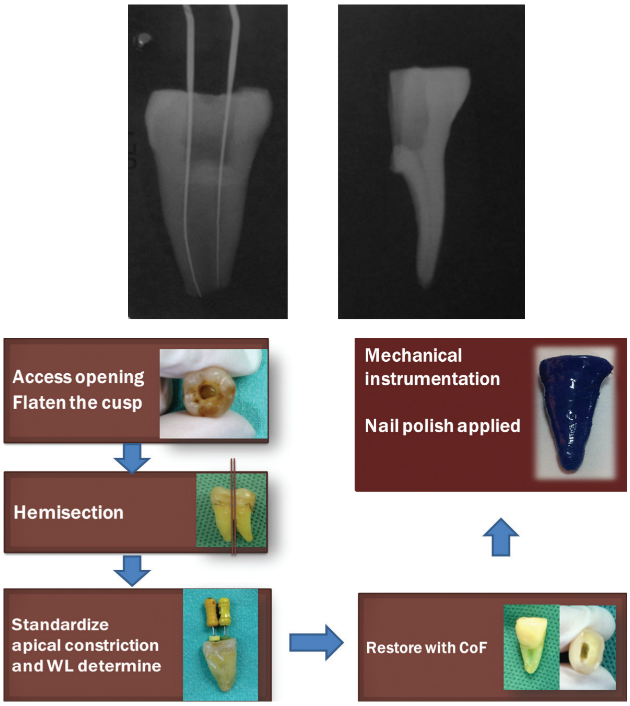

Figure 1

เติมสารละลายเชื้อที่เตรียมข้างต้นลงในขวดที่ใส่ฟันจำนวน 35 ขวด ขวดละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปเข้าตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ทุก 2 วัน โดยมีการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าในขวดออก 2 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ 2 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าที่ดูดออกไปเพาะเลี้ยงและตรวจสอบว่าเป็นเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส โดยการดูลักษณะโคโลนีย้อมสีแกรม และทดสอบการเจริญเติบโตใน 6.5% NaCl และ Bile esculin test

การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นในคลองรากฟัน

ฟันที่ติดเชื้อทุกซี่ นำมาเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นก่อนการล้างคลองรากฟัน (S_1) โดยนำฟันแต่ละซี่มาวางบนผ้าก็อซที่ปราศจากเชื้อ และเช็ดภายนอกด้วยแอลกอฮอลล์ 75% จากนั้นนำไปเสียบในช่องที่อยู่ในกล่องที่ออกแบบไว้ให้ฟันตั้งตรง เพื่อทำการล้างคลองรากฟัน ใช้เครื่องมือเค-ไฟล์ขนาด 35 หมุนไฟล์ด้วยวิธีรีมมิงทั้ง 2 คลองรากฟัน หลังจากนั้นใช้กระดาษซับคลองรากจนแห้ง นำกระดาษซับคลองรากฟันทั้งหมดและตัดปลายเครื่องมือที่ใช้ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารละลายทีละ 10 เท่า (ten-fold dilution) จนถึงหลอดที่ 10^{-6} จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางทุกความเข้มข้นปริมาตร 25 ไมโครลิตร ไปเพาะในอาหารวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันตัวอย่างละ 2 ชุด แล้วนำไปเข้าตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารวุ้น นับจำนวนโคโลนีของเชื้อบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ (โคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร) คำนวณหาปริมาณเชื้อจากคลองรากฟัน

การแบ่งกลุ่มฟันทดลองและการล้างคลองรากฟัน

แบ่งฟันแบบสุ่มเป็น 3 กลุ่มทดลอง กลุ่มละ 10 ซี่ กลุ่มควบคุมจะทำครั้งละ 1 ซี่ ในแต่ละวันที่มีการทำการทดลอง

<u>กลุ่มที่ 1</u> (เข็มล้างแบบปกติ) ล้างคลองรากฟันด้วยน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มขนาด 30 ใส่เข็มล้างห่างความยาวรากฟัน 1 มิลลิเมตรร่วมกับการขยับขึ้นลงสั้นๆ เป็นเวลา 1 นาที

<u>กลุ่มที่ 2</u> (การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์) ล้างคลองรากฟันด้วยน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในคลองรากฟันโดยใช้เข็มขนาด 30 โดยใส่เข็มล้างห่างความยาวราก 1 มิลลิเมตร หลังจากนั้นใช้ไฟล์อัลตราโซนิก (IRRISAFE, Acteon, France) ขนาด 15 ยาว 21 มิลลิเมตร ใส่ลงในคลองรากตามคำแนะนำของบริษัท คือ สั้นจากความยาวรากฟัน 1 มิลลิเมตร ปรับความแรงของเครื่องอัลตราโซนิก(P5 Newtron, Acteon, France) ที่ระดับ 6 และตั้งให้มีการสั่นเป็นเวลา 1 นาที

<u>กลุ่มที่ 3</u> (การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์) ทำการล้างคลองรากฟันด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟันชนิดโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ร่วมกับ Vpro™ StreamClean™ Ultrasonic irrigation system ซึ่งมีปลายเข็มขนาด 30 โดยใส่เข็มล้างห่างความยาวรากราก 1 มิลลิเมตร ตั้งเครื่องอัลตราโซนิกส์ซึ่งเป็นเครื่องเดียวกับที่ใช้ทดลองในกลุ่มการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์ โดยปรับความแรงที่ระดับ 6 และมีอัตราการไหลของน้ำยา 5 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างเป็นเวลา 1 นาที

<u>กลุ่มควบคุม</u> ล้างคลองรากฟันด้วยน้ำเกลือ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มขนาด 30 ใส่เข็มล้างห่างความยาวรากฟัน 1 มิลลิเมตรร่วมกับการขยับขึ้นลงสั้นๆ เป็นเวลา 1 นาที

การตรวจหาปริมาณเชื้อ ภายหลังการล้างคลองรากฟัน

หลังการล้างคลองรากฟันตามวิธีที่ใช้ทดสอบ ล้างตามด้วยน้ำเกลือปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วินาที ใช้กระดาษซับคลองรากจนแห้ง เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงไปในคลองรากฟัน ใช้เครื่องมือเค-ไฟล์ขนาด 40 หมุนไฟล์ด้วยวิธีรีมมิงเล็กน้อย ขยับขึ้นลง

5 ครั้ง ทั้ง 2 คลองรากฟัน แล้วใช้กระดาษซับคลองรากจนแห้ง นำกระดาษซับทั้งหมดและตัดปลายเครื่องมือที่ใช้ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เพื่อเป็นการเก็บตัวอย่างเชื้อหลังการล้างคลองรากฟันทันที (S_2) ตรวจหาปริมาณเชื้อในตัวอย่างโดยจะใช้วิธีเดียวกับการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น

การบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูล

เก็บข้อมูลเป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้น (S_1) ปริมาณเชื้อหลังล้างทันที (S_2) ในหน่วยโคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร และทำข้อมูลให้เปลี่ยนเป็นค่าล็อกฐาน 10 จากนั้นคำนวณร้อยละผลต่างของปริมาณเชื้อก่อนและหลังล้างคลองรากฟันในแต่ละกลุ่มการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทดสอบการกระจายของข้อมูลโดยการทดสอบแชพไพโลวิลค์ (The Shapiro-Wilk Test) และทดสอบความแปรปรวนด้วยการทดสอบเลวีน (Levene's test) จึงนำข้อมูลที่ได้มาทดสอบทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดย

1. เปรียบเทียบปริมาณเชื้อเริ่มต้น (S_1) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยใช้ one way ANOVA
2. เปรียบเทียบปริมาณเชื้อที่ลดลงจากเชื้อตั้งต้นในแต่ละกลุ่มการทดลองโดยใช้สถิติ Paired-t test และ Wilcoxon signed rank test
3. ทดสอบความแตกต่างของร้อยละผลต่างของปริมาณเชื้อก่อนและหลังล้างคลองรากฟันระหว่าง 3 กลุ่มทดลอง โดยใช้ Kruskal-Wallis test และทดสอบหาคู่ของกลุ่มทดลองที่ต่างกัน โดยใช้ Dunn's test

ผลการทดลอง

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในคลองรากฟัน (S_1) ของทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<.05$) และเมื่อล้างคลองรากฟันด้วยวิธีต่างๆ และเก็บเชื้อหลังการล้างคลองรากฟันทันที (S_2) พบว่าทุกกลุ่มการทดลองให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวก ยกเว้นกลุ่ม การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์ 1 ซี่ที่ไม่พบเชื้อ โดยปริมาณเชื้อหลังการล้างคลองรากฟันทันที (S_2) มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อตั้งต้น (S_1) อย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มการทดลอง ($P<.05$) ยกเว้นกลุ่มควบคุม พบว่า มีการลดลงของเชื้อแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>.1$) (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบร้อยละผลต่างค่าล็อกของปริมาณเชื้อก่อนและหลังล้าง พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<.05$) โดยพบว่ากลุ่มที่ล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์ สามารถลดจำนวนเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ได้มากกว่ากลุ่มที่ล้างด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มเข็มล้างเมื่อเปรียบเทียบกับ การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์และกลุ่มการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ (ตารางที่ 2)

บทวิจารณ์

การศึกษานี้ใช้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิสโดยวัดจากปริมาณเชื้อที่ลดลงภายหลังการล้างคลองรากฟันด้วยวิธีต่างๆ การเลือกใช้เชื้อชนิดนี้เนื่องจากเป็นเชื้อ

Table 1: Mean (SD) Log CFU/ml of *Enterococcus faecalis* from root canals before and after irrigation with different methods. (n = 10)

Experimental groups	Before irrigation (S_1)	After irrigation (S_2)	P-value
syringe irrigation	8.52 (0.60)	2.27 (0.99)	0.00
PUI	8.43 (0.59)	1.62 (1.12)	0.00
CUI	8.37 (0.49)	4.97 (1.78)	0.00
Control	7.00 (0.43)	5.40 (1.02)	0.267

Table 2: Percentage (Mean ± SD) of bacteria reduction after irrigation by different irrigation methods. (n = 10)

Experimental groups	Percentage of bacteria reduction	Significant differences
syringe irrigation	73.54±10.77	
PUI	81.08±12.80	PUI and CUI
CUI	59.18±21.20	

ที่ยากต่อการกำจัดด้วยวิธีการรักษาคลองรากฟันทั่วไป นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อที่สามารถเลี้ยงและเติบโตได้ง่าย มีคุณสมบัติทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการทำความสะอาดคลองรากฟันด้วยวิธีการต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ [31]

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการล้างคลองรากฟันด้วยวิธีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดของเชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถทำได้ทั้งทางคลินิกและในห้องปฏิบัติการ โดยเปรียบเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อนและหลังล้างคลองรากฟันด้วยวิธีที่ต้องการทดสอบ ส่วนการตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียในคลองรากฟันมีหลายวิธี ได้แก่ การเพาะเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ (culture) หรือวิธีทางอณูชีววิทยา (molecular biology) เช่น การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรส (Polymerase chain reaction หรือ PCR) [30] การเพาะเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ (culture) เป็นการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งวิธีการนี้มีข้อดีคือสามารถศึกษารูปร่างของแบคทีเรีย ตรวจสอบความไวของเชื้อต่อยา (antimicrobial susceptibility) และสามารถบอกจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต (viable bacteria) จากตัวอย่างได้ มีราคาต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ข้อเสีย คือ ใช้เวลานานและใช้วัสดุอุปกรณ์จำนวนมากในการเพาะเลี้ยง วิธีการเก็บเชื้อในคลองรากฟันในการศึกษานี้ดัดแปลงมา จาก Carver และคณะในปี 2007 [28] โดยการใช้เครื่องมือเค-ไฟล์ใส่ในคลองรากที่มีน้ำยาเลี้ยงเชื้อ หมุนไฟล์ด้วยวิธีรีมมิงเล็กน้อย จนเครื่องมือมีความคับแน่นที่บริเวณปลายรากฟันจากนั้นขยับเครื่องมือขึ้นลงแล้วจึงใช้กระดาษซับคลองรากฟันซับน้ำยาเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อที่อยู่ในคลองรากฟัน ซึ่งวิธีการนี้มีข้อดีคือสามารถเก็บเชื้อที่อยู่ในชั้นเนื้อฟัน อีกทั้งยังเป็นการทำให้น้ำยาเลี้ยงเชื้อแทรกซึมไปยังส่วนต่างๆ ของคลองรากฟันได้ดียิ่งขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อเริ่มต้นและปริมาณเชื้อหลังล้างทันที พบว่าภายหลังการล้างคลองรากฟันมีปริมาณเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มการทดลอง ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งล้างคลองรากฟันด้วยน้ำเกลือพบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นและปริมาณเชื้อหลังล้างทันทีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำยาล้างคลองรากฟันที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลชีพมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อมากกว่าการใช้น้ำเกลือไม่ว่าจะล้างคลองรากฟันด้วยวิธีใดก็ตาม

จากผลการทดลองพบว่าการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์มีประสิทธิภาพมากกว่าการล้างด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างจากการล้างด้วยเข็มล้าง ซึ่งแตกต่างไปจากผลการทดลองของ Castelo-Baz และคณะ [32] ที่พบว่าการล้างคลองรากฟันด้วยวิธีคอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการแพร่ของน้ำยาล้างคลองรากฟันไปยังคลองรากฟันย่อยได้ดีกว่าวิธี การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์และเข็มล้างอย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงการศึกษาของ Jiang และคณะ [33] และ การศึกษาของ Curtis และ Sedgley [34] ที่พบว่าการกำจัดเชื้อและเศษเนื้อเยื่อที่หลงเหลืออยู่ในคลองรากฟันด้วยการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์มีประสิทธิภาพพบว่าประสิทธิภาพในการดีกว่าการล้างด้วยเข็มล้างปกติ อาจเป็นเพราะว่าการศึกษาของ Castelo-Baz

และคณะ [32] และ การศึกษาของ Jiang และคณะ [33] นั้นใช้ฟันรากเดี่ยวที่มีขนาดคลองรากฟันใหญ่ ซึ่งจากหลักการเกิดปรากฏการณ์ อะคูสติก สตรีมมิงและ คาวิเตชัน นั้นจะมีความแรงมากขึ้นเมื่อปลายเครื่องมือสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระในคลองรากฟันโดยไม่สัมผัสกับผนังคลองรากฟัน [17] แต่ในการศึกษานี้ได้ทำการทดลองในฟันกรามที่มีขนาดคลองรากฟันเล็กกว่าอีกทั้งขยายขนาดคลองรากฟันถึงขนาด 35/.04 ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของเข็มล้างในระบบ การล้าคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ซึ่งเป็นเข็มขนาด 30 (เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกเท่ากับ 0.31 มิลลิเมตร) ทำให้มีโอกาสที่เข็มจะสัมผัสกับคลองรากฟันขณะล้าง ซึ่งจะทำให้การเกิดปรากฏการณ์ อะคูสติก สตรีมมิงและ คาวิเตชัน มีความแรงที่ลดลงเมื่อเทียบกับการศึกษาที่ทำในรากเดี่ยวที่มีขนาดคลองรากฟันใหญ่กว่า และเมื่อเปรียบเทียบการล้างด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์และ การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ที่ทำในฟันกรามหรือฟันที่มีคลองรากขนาดเล็ก พบว่าการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์ที่ใช้ไฟล์อัลตราโซนิกส์ขนาด 15 น่าจะมีการเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระในคลองรากฟันโดยไม่สัมผัสกับผนังคลองรากฟันได้สมบูรณ์กว่าระบบการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ซึ่งใช้เข็มขนาด 30 เป็นตัวสั่นสะเทือน

การศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Adcock [35] และ Howard [36] ที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อและเศษเนื้อเยื่อที่หลงเหลืออยู่ในคลองรากฟันกรามล่าง โดยผลพบว่าวิธีเข็มล้าง และการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันซึ่งสาเหตุน่าจะมาจากขนาดของเข็มล้างด้วยวิธี มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดคลองรากฟันกรามที่มีขนาดเล็ก จึงทำให้การเกิดปรากฏการณ์ อะคูสติก สตรีมมิงและ คาวิเตชัน เกิดขึ้นได้น้อยลง ทำให้ประสิทธิภาพในการล้างไม่แตกต่างจากการใช้เข็มล้างตามปกติ

การศึกษานี้ให้ผลขัดแย้งกับการศึกษาทางคลินิกที่ทำในฟันกรามล่างของ Gutarts และคณะ [29] และการศึกษาของ Burleson และคณะ [27] ที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อและเศษเนื้อเยื่อที่หลงเหลืออยู่ในคลองรากฟันกรามล่าง เมื่อเปรียบเทียบการล้างด้วยเข็มล้างแบบปกติกับการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์ซึ่งในการศึกษาดังกล่าวพบว่า การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เข็มล้าง แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาที่กล่าวไม่ได้แสดงขนาดของเข็มล้างที่ใช้ในกลุ่มควบคุมไว้ ซึ่งขนาดของเข็มล้างนั้นมีผลต่อประสิทธิภาพในการล้างคลองรากฟัน [37, 38] จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกับการศึกษานี้ที่ใช้เข็มขนาด 30 ในการล้างคลองรากฟันได้และยังมีการศึกษาของ Carver และคณะ [28] ที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดเชื้อแบคทีเรียเมื่อล้างคลองรากฟันกรามล่างด้วยวิธี การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์และไม่ใช้ พบว่าการใช้ การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์เพิ่มโอกาสในการให้ผลเพาะเชื้อในคลองรากฟันเป็นลบมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้ทำการเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่เป็นการล้างคลองรากฟันด้วยเข็มล้างปกติไว้ด้วย จึงไม่สามารถนำประสิทธิภาพของการล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์และเข็มล้างแบบปกติมาเปรียบเทียบกันได้

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการล้างคลองรากฟันกรามด้วยวิธีเข็มล้างแบบปกติ การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์หรือ การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์สามารถลดจำนวนเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิสภายหลังการล้างได้ แต่ไม่มีวิธีใดที่สามารถกำจัดเชื้อได้ทั้งหมด อาจเนื่องมาจากเป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยมีข้อจำกัดในขั้นตอนการทำความสะอาด หรือการใส่ยาในคลองรากฟัน ซึ่งอาจมีผลในการลดปริมาณเชื้อได้เพิ่มขึ้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการทำการทดลองในมนุษย์ต่อไป

บทสรุป

วิธีการล้างคลองรากฟันกรามคือ การล้างด้วยเข็มแบบปกติ การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี แพสซีฟ อัลตราโซนิกส์หรือ การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์มีประสิทธิภาพในการล้างคลองรากฟัน เพื่อกำจัดเชื้อเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิสแตกต่างกัน โดยการล้างคลองรากฟันด้วยวิธีแพสซีฟ อัลตราโซนิกส์ มีประสิทธิภาพในการลดเชื้อได้มากกว่า การล้างคลองรากฟันด้วยวิธี คอนทินิวอัส อัลตราโซนิกส์

เอกสารอ้างอิง

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20: 340-9.
2. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 475-84.
3. Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990; 16: 498-504.
4. Vertucci FJ. Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 58: 589-99.
5. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55: 307-12.
6. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 85-94.
7. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 86-93.
8. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; 28: 689-93.
9. Lee W, Lim S, Son HH, Bae KS. Sonicated extract of Enterococcus faecalis induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* 2004; 30: 209-12.
10. Love RM. Enterococcus faecalis--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34: 399-405.
11. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill Enterococcus faecalis in vitro. *J Endod* 2004; 30: 218-9.
12. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32: 93-8.
13. Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod* 2009; 35: 791-804.
14. Boutsioukis C, Lambrianidis T, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, Wesselink PR, et al. The effect of needle-insertion depth on the irrigant flow in the root canal: evaluation using an unsteady computational fluid dynamics model. *J Endod* 2010; 36: 1664-8.
15. Hulsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J* 2000; 33: 186-93.
16. Senia ES, Marshall FJ, Rosen S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1971; 31: 96-103.
17. van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 2007; 40: 415-26.
18. Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982; 15: 187-96.
19. Spoleti P, Siragusa M, Spoleti MJ. al evaluation of passive ultrasonic activation. *J Endod* 2003; 29: 12-4.

20. Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod* 2003; 29: 562-4.
21. Al-Jadaa A, Paque F, Attin T, Zehnder M. Acoustic hypochlorite activation in simulated curved canals. *J Endod* 2009; 35: 1408-11.
22. de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Heilborn C, Cohenca N. Effect of EDTA, sonic, and ultrasonic activation on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals: an in vitro study. *J Endod* 2009; 35: 891-5.
23. de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N. Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an in vitro study. *J Endod* 2010; 36: 1216-21.
24. van der Sluis LW, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J* 2006; 39: 472-6.
25. van der Sluis LW, Shemesh H, Wu MK, Wesselink PR. An evaluation of the influence of passive ultrasonic irrigation on the seal of root canal fillings. *Int Endod J* 2007; 40: 356-61.
26. van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink PR. The evaluation of removal of calcium hydroxide paste from an artificial standardized groove in the apical root canal using different irrigation methodologies. *Int Endod J* 2007; 40: 52-7.
27. Burleson A, Nusstein J, Reader A, Beck M. The in vivo evaluation of hand/rotary/ultrasound instrumentation in necrotic, human mandibular molars. *J Endod* 2007; 33: 782-7.
28. Carver K, Nusstein J, Reader A, Beck M. In vivo antibacterial efficacy of ultrasound after hand and rotary instrumentation in human mandibular molars. *J Endod* 2007; 33: 1038-43.
29. Gutarts R, Nusstein J, Reader A, Beck M. In vivo debridement efficacy of ultrasonic irrigation following hand-rotary instrumentation in human mandibular molars. *J Endod* 2005; 31: 166-70.
30. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod* 2005; 31: 488-98.
31. Basmaci F, Öztan MD, Kiyan M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing E. faecalis within root canals. *Int Endod J* 2013; 46: 823-30.
32. Castelo-Baz P, Martin-Biedma B, Cantatore G, Ruiz-Pinon M, Bahillo J, Rivas-Mundina B, et al. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in simulated lateral canals of extracted teeth. *J Endod* 2012; 38: 688-91.
33. Jiang LM, Lak B, Eijsvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LW. Comparison of the cleaning efficacy of different final irrigation techniques. *J Endod* 2012; 38: 838-41.
34. Curtis TO, Sedgley CM. Comparison of a continuous ultrasonic irrigation device and conventional needle irrigation in the removal of root canal debris. *J Endod* 2012; 38: 1261-4.
35. Adcock JM, Sidow SJ, Looney SW, Liu Y, McNally K, Lindsey K, et al. Histologic evaluation of canal and isthmus debridement efficacies of two different irrigant delivery techniques in a closed system. *J Endod* 2011; 37: 544-8.
36. Howard RK, Kirkpatrick TC, Rutledge RE, Yaccino JM. Comparison of debris removal with three different irrigation techniques. *J Endod* 2011; 37: 1301-5.
37. Chow TW. Mechanical effectiveness of root canal irrigation. *J Endod* 1983; 9: 475-9.
38. Sedgley CM, Nagel AC, Hall D, Applegate B. Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real-time imaging in vitro. *Int Endod J* 2005; 38: 97-104.