



PUESTA
AL DÍA



Pérez Alfayate, Ruth
Odontóloga. Master Universitario en Endodoncia Avanzada. Profesora de Odontología Integrada Adultos. Universidad Europea de Madrid.

Díaz-Flores García, Víctor
Licenciado en Odontología. Profesor del Máster Universitario en Endodoncia Avanzada. Universidad Europea de Madrid.

Algar Pinilla, Juan
Doctor en Odontología. Profesor de Odontología Integrada Adultos. Universidad Europea de Madrid.

Valencia de Pablo, Oliver
Doctor en Odontología. Profesor del Master Universitario en Endodoncia Avanzada. Universidad Europea de Madrid.

Estévez Luaña, Roberto
Odontólogo. Profesor del Master Universitario en Endodoncia Avanzada. Universidad Europea de Madrid.

Cisneros Cabello, Rafael
Doctor en Medicina y Cirugía. Director del Master Universitario en Endodoncia Avanzada. Universidad Europea de Madrid.

Indexada en / Indexed in:

- IME
- IBECS
- LATINDEX
- GOOGLE ACADÉMICO

Correspondencia:

Ruth Pérez Alfayate
Urbanización San Diego, 35.
San Cristóbal de La Laguna. S/C.
38208 Tenerife.
ruthip.alfayate@gmail.com

Fecha de recepción: 28 de diciembre de 2012.
Fecha de aceptación para su publicación:
22 de marzo de 2013.

ACTUALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA ENDODÓNTICA

Pérez Alfayate R., Díaz-Flores García V., Algar Pinilla J., Valencia de Pablo O., Estévez Luaña R., Cisneros Cabello R.
Actualización en microbiología endodóntica. *Cient. Dent.* 2013; 10; 1: 27-39.

RESUMEN

Los agentes microbiológicos son esenciales en la progresión y perpetuación de la patología inflamatoria perirradicular. Dentro de éstos, las bacterias constituyen la flora más prevalente. Para que un conducto se infecte, la pulpa debe estar necrótica y los microorganismos deben adherirse a los tejidos y multiplicarse en cantidad suficiente, siendo por tanto importante la interacción entre el hospedador y la dosis de infección. Las asociaciones específicas que están implicadas en la patogénesis de la enfermedad perirradicular aún son desconocidas, pero se acepta que las especies aisladas más frecuentemente deben tener una mayor contribución en el grado de patogenicidad. Las diferentes formas de enfermedad perirradicular pueden tener etiologías microbianas distintas. Los tipos de infección endodóntica (primaria, secundaria y persistente) se asocian con diferentes condiciones clínicas. Las infecciones extrarradiculares pueden catalogarse como cualquiera de las anteriores, y están cobrando mucha importancia, por la resistencia que presentan al tratamiento debido a la existencia de biofilms.

Enterococcus faecalis se ha considerado uno de los principales factores etiológicos del fracaso del tratamiento endodóntico, pero aún no existe una evidencia clara sobre qué microorganismos lo provocan.

Se han empleado muchas técnicas microbiológicas para la evaluación de la microbiota del conducto radicular. En los últimos años las técnicas de amplificación PCR han obtenido la mayor sensibilidad y especificidad cuando se han comparado con cultivos. Sin embargo, aún tienen desventajas.

UPDATE IN ENDODONTIC MICROBIOLOGY

ABSTRACT

Microbiological agents are essential in the progression and perpetuation of periradicular inflammatory pathologies. Within these, bacteria constitute the most prevalent flora. For a canal to become infected, the pulp must be necrotic and the microorganisms must adhere to the tissues and multiply in sufficient quantity, with the interaction being important, therefore, between the host and the infectious dose. The specific associations that are implied in the pathogenesis of the periradicular disease are still unknown, but it is accepted that the most frequently isolated species should have a greater contribution in the degree of pathogenicity. The different forms of periradicular disease may be classified as different microbial aetiologies. The types of endodontic infections (primary, secondary and persistent) are associated with different clinical conditions. Extraradicular infections can be classified as any of the previous ones and are gaining importance, because of the resistance that they present to the treatment due to the existence of biofilms.

Enterococcus faecalis has been considered one of the principal aetiological factors in the failure of the endodontic treatment, but there is still no clear evidence on what microorganisms provoke it.

Many microbiological techniques have been used for the evaluation of the microbiota of the radicular canal. In recent years the PCR amplification techniques have obtained greater sensitivity and specificity when compared with cultures. However, there are still disadvantages.

PALABRAS CLAVE

Microbiología endodóntica; Reacción en cadena de la polimerasa; *Enterococcus faecalis*; Infección primaria; Infección secundaria; Fracaso; Infección perirradicular; Calidad de vida; Salud oral.

KEY WORDS

Endodontic microbiology; Chain reaction of the polymerase; *Enterococcus faecalis*; Primary infection; Secondary infection; Failure; Periradicular infection; Quality of life; Oral health.

INTRODUCCIÓN

Aunque existan factores químicos y físicos que puedan inducir inflamación perirradicular, la evidencia indica que los agentes microbiológicos son esenciales en la progresión y perpetuación de patología inflamatoria perirradicular¹. Miller (1890) fue el primero en demostrar la invasión de los túbulos dentinarios de dentina cariada y no cariada e informó de que la microflora tubular constaba de cocos y bacilos. Pero no fue hasta finales de los 50 cuando la evidencia experimental estableció el rol de las bacterias en las caries y en la enfermedad pulpar y perirradicular². El conducto infectado constituye el principal motivo de irritación persistente a los tejidos perirradiculares³. Además, la evidencia científica muestra que los microorganismos implicados en las infecciones intraradiculares y extraradiculares son los que producen la mayoría de fracasos de la terapia endodóntica⁴ y generalmente es el resultado de la persistencia de microorganismos en la porción apical del sistema de conductos, incluso en los dientes bien tratados⁴.

Los microorganismos se sitúan en posiciones estratégicas y privilegiadas en conductos con tejido necrótico. En estas localizaciones, se encuentran protegidos de la acción de las células de defensa del hospedador (fagocitos) y moléculas (anticuerpos, complemento). Por otro lado, la microbiota localizada en la zona apical del sistema de conductos se encuentra normalmente delimitada por los tejidos perirradiculares inflamados compuestos por una acumulación densa de polimorfonucleares en o cerca del foramen apical. En algunas circunstancias, algunas especies bacterianas pueden llegar y establecerse en los tejidos perirradiculares. Así, aunque la infección no es eliminada por los mecanismos de respuesta del hospedador, éste forma una respuesta adyacente al foramen apical, impidiendo la propagación de la infección. Generalmente se obtiene un equilibrio entre la agresión y la defensa, que produce el desarrollo de una enfermedad crónica en los tejidos circundantes a las puertas de salida bacterianas. Si la infección endodóntica se erradica con el tratamiento de conductos, el hospedador se verá favorecido y se producirá la reparación tisular³. El fracaso del tratamiento de endodoncia, que es atribuible a los microorganismos remanentes, sólo se producirá si estos microorganismos poseen suficiente patogenicidad, se encuentran en número suficiente y llegan a los tejidos perirradiculares³.

Para infectar a un hospedador, un microorganismo tiene que adherirse a los tejidos y multiplicarse en cantidad adecuada,

resistiendo los mecanismos de defensa². Para que la colonización ocurra, no sólo son importantes las características de la bacteria, sino también cómo tiene lugar la interacción; es decir, la puerta de entrada y la dosis de infección. Una vez que una cantidad suficiente de microorganismos ha penetrado por la ruta adecuada en el hospedador, para establecer una colonización debe fijarse a los tejidos o a algún sustrato y proliferar. De este modo se produce una interacción específica entre dos moléculas, una microbiana (adhesiva) y otra del hospedador (receptor). Los microorganismos tienen que ser capaces de utilizar los nutrientes disponibles, competir o cooperar con el resto de las especies presentes y proliferar para producir infección. Cuando esto ocurre, los microorganismos han colonizado al hospedador.

La invasión bacteriana de los túbulos dentinarios se produce por un mecanismo similar a lo señalado (Figura 1). La matriz intertubular contiene grandes cantidades de fibras de colágeno tipo I no mineralizado. Los estreptococos orales poseen antígenos polipeptídicos I y II en superficie, que reconocen el colágeno que les sirve como sustrato de adhesión y se absorben en la superficie de hidroxiapatita⁵. Esta capacidad de los estreptococos de unirse al colágeno facilita la adhesión bacteriana a la dentina o al cemento, regula la producción de antígenos polipeptídicos I y II e induce la proliferación bacteriana que se manifiesta como largas cadenas de estreptococos, facilitando así la invasión tubular⁵.

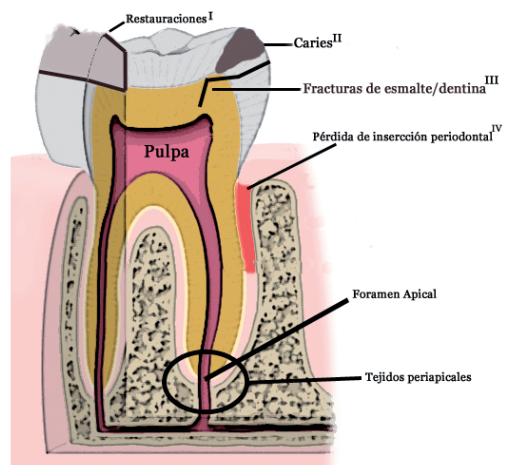


Fig. 1. Localizaciones habituales de la invasión bacteriana de la dentina. Las bacterias procedentes de la cavidad oral colonizan (I, II, III y IV) y se extienden a través de la espacio pulpar, dando lugar a una enfermedad inflamatoria e infecciosa de los tejidos pulpares y periapicales.

La profundidad que alcanzan las bacterias en los túbulos dentinarios depende del grado de permeabilidad de los mismos y éste varía en función del área del diente, del número y diámetro de los túbulos dentinarios, y del contenido tubular⁶. Los túbulos dentinarios obliterados o escleróticos impiden físicamente la invasión que difiere entre las distintas regiones de la dentina. Así, la invasión es mayor en los tercios cervical y medio, y menor en el apical donde la esclerosis dentinaria es más pronunciada a cualquier edad⁷.

La permeabilidad depende también del contenido tubular. La composición del fluido dentinario en la dentina radicular vital no es bien conocida. Parece que contiene suero, proteínas como la albúmina y la inmunoglobulina G (IgG) y proteínas sanguíneas como el fibrinógeno⁸. En la dentina radicular no vital (de dientes que han recibido tratamiento endodóntico) existe un fluido constituido por moléculas similares que provienen del hueso alveolar, ligamento periodontal y la saliva. Los componentes del fluido dentinario intervienen en los procesos de defensa del hospedador, interactuando con las bacterias y reduciendo la permeabilidad de la dentina². Por otro lado, hay estudios⁹ que demuestran que las bacterias orales involucradas en la caries y en la patología endodóntica pueden utilizar el fluido de los túbulos dentinarios no vitales como fuente de nutrientes, favoreciendo de esta manera su supervivencia.

El conocimiento de las infecciones endodónticas ha aumentado significativamente en las últimas décadas, pero aun existen problemas sin resolver.

I. RELACIÓN CAUSAL

Desde hace más de cien años, los postulados de Koch se han utilizado para establecer una relación causal entre especies bacterianas concretas y una patología infecciosa dada³. Los postulados de Koch, han servido como guía en un intento de establecer una relación causal: los microorganismos pueden causar una enfermedad y se crean criterios rigurosos para establecer un agente etiológico de una enfermedad concreta.

Los postulados de Koch pueden resumirse en los siguientes, desde su presentación en el X Congreso Internacional de Medicina celebrado en Berlín en 1890:

1. El agente debe estar presente en cada caso de la enfermedad en las condiciones apropiadas y ausente en las personas sanas.
2. El agente no debe aparecer en otra enfermedad de manera fortuita o saprófita.
3. El agente debe ser aislado del cuerpo en un cultivo puro a partir de las lesiones de la enfermedad.
4. El agente debe provocar la enfermedad en un animal susceptible al ser inoculado.
5. El agente debe ser aislado de nuevo de las lesiones producidas en los animales de experimentación.

Se han realizado algunas modificaciones de estas bases. Incluso se han propuesto nuevos criterios para establecer la causalidad microbiológica de la patología infecciosa. Socransky y Haffajee¹⁰ han propuesto algunos criterios para el

establecimiento de la relación causal entre microorganismos y enfermedad periodontal. La mayoría de sus criterios pueden aplicarse a las infecciones endodónticas.

II. ASOCIACIÓN

El patógeno sospechoso debería encontrarse más frecuentemente y en mayor número en casos de infección más que en individuos sin manifestación de la enfermedad o con una forma diferente de patología.

Mientras la pulpa está vital, es un tejido estéril. La infección acontece sólo cuando la pulpa se necrosa. Teóricamente, cualquier especie microbiana que colonice la pulpa necrótica puede participar en la patogénesis de la enfermedad perirradicular¹⁰. La evidencia sugiere que un pequeño grupo de especies microbianas son más prevalentes en las diferentes formas de enfermedad perirradicular¹¹.

III. ELIMINACIÓN

La eliminación de la especie microbiana debería completarse con una remisión paralela de la enfermedad. Se debería eliminar el patógeno sospechoso, hasta cuando se trata de una infección mixta del conducto asociada con lesiones perirradiculares y determinar si la enfermedad se resuelve. Sin embargo, este criterio presenta serios problemas ya que el tratamiento de conductos nunca elimina una sola especie bacteriana de una vez. En algunos casos, las especies que no son eliminadas pueden llevar al fracaso del tratamiento. Sin embargo, aunque muchos casos de fracaso endodóntico se han asociado a un determinado grupo de especies, en los cuales *Enterococcus faecalis* es el más prevalente¹² existen otros casos de fracaso en los cuales estas especies no estaban presentes o no se podían detectar³.

IV. RESPUESTA DEL HOSPEDADOR

Si las especies microbianas consiguen un acceso al tejido conectivo y le causa daño, el hospedador formará una respuesta inmunológica específica, produciendo anticuerpos, o una respuesta celular inmunológica que es específica para esas especies. Algunos estudios han informado que existe una producción de anticuerpos específicos contra algunos patógenos endodónticos putativos en las lesiones perirradiculares¹³. Esto indica que el hospedador produce una respuesta humoral contra patógenos específicos que colonizan el sistema de conductos. Aunque se ha demostrado la existencia de una respuesta inmunológica específica en las lesiones perirradiculares¹⁴, no existen estudios que demuestren su especificidad contra los patógenos endodónticos.

V. VIRULENCIA

Los factores de virulencia pueden dar pistas importantes en la patogenicidad. Los productos potencialmente perjudiciales liberados o las propiedades que poseen ciertas especies pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la

enfermedad. Los patógenos putativos endodónticos tienen una producción potencial de factores de virulencia, pero no se sabe si estos factores se producen *in vivo*. Algunos estudios han informado del descubrimiento de factores de virulencia en los conductos radiculares infectados, incluyendo lipopolisacáridos, enzimas y metabolitos y se han asociado con signos y síntomas de enfermedad¹⁵. Sin embargo, aún no se conoce qué especies, dentro del sistema de conductos, producen esos factores.

VI. ANÁLISIS DEL FACTOR DE RIESGO

El avance tecnológico puede permitir el desarrollo de estudios prospectivos en los cuales se evalúe el riesgo de progresión de enfermedad dependiente de la presencia de un microorganismo a un nivel dado. Este criterio sólo puede aplicarse a infecciones experimentales de los conductos en modelos animales. Existe una escasez de información en lo que respecta a este tema³. Los estudios animales han demostrado que existe un cambio en la microbiota del sistema de conductos, pasando del predominio de facultativos durante los primeros días a un aumento de Gram-negativos y anaerobios tras un corto periodo de tiempo (de semanas a meses)¹⁶. Se decía que estos cambios ocurrían durante el periodo de una rápida expansión¹⁶. Los resultados de estos estudios han indicado que sólo un grupo limitado de especies está implicado en la patogénesis de las lesiones perirradiculares.

Aunque ningún microorganismo solo o ninguna asociación de ellos, ha cumplido todos los criterios de Koch, los resultados de algunos estudios realizados en diferentes lugares geográficos sugieren que la presencia de una agrupación limitada de especies microbianas está asociada con la patogénesis de la enfermedad perirradicular. Por el momento parece que no se descubrirá ninguna especie como la principal productora de enfermedad endodóntica. Sin embargo, muchos estudios demuestran una mayor prevalencia de determinadas especies, en su mayoría, potencialmente patogénicas, particularmente en infecciones mixtas, y pueden estar implicadas en otras enfermedades en humanos, principalmente en la cavidad oral. Así, las especies encontradas frecuentemente se pueden considerar patógenos endodónticos.

VII. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

La evidencia indica que tan solo una pequeña proporción de microorganismos de la naturaleza ha podido ser aislada^{17,18}. La identificación de microorganismos que son capaces de resistir el tratamiento de endodoncia y sobrevivir en el ambiente del conducto radicular, podría contribuir a la determinación de terapias microbianas efectivas. Estos microorganismos podrían causar fracaso del tratamiento de conductos, sobre todo si las vías microscópicas que llegan hasta la región periapical no se incluyen en la obturación¹⁹.

Tradicionalmente se han utilizado los cultivos para estudiar las bacterias productoras de enfermedad pulpar y perirradicular. Estos métodos dependen del aislamiento, crecimiento e identificación morfológica y bioquímica en el laboratorio²⁰ y han demostrado presentar ciertas limitaciones.

En la década pasada se han producido muchos avances en diagnóstico molecular microbiológico. Las técnicas utilizadas han sido la hibridación DNA-DNA y la PCR (Polymerase Chain Reaction) y sus derivados, que ha sustituido a los métodos de cultivo y ha expandido el conocimiento sobre la microbiota endodóntica²⁰.

VII.1 MÉTODOS TRADICIONALES

1) Cultivo

En microbiología, un cultivo es un método para la multiplicación de microorganismos, tales como bacterias, hongos y parásitos en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado.

Un microorganismo se puede sembrar en un medio líquido o en la superficie de un medio sólido de agar. Los medios de cultivo contienen distintos nutrientes que van desde azúcares simples hasta sustancias complejas como la sangre o el extracto de caldo de carne. Para aislar o purificar una especie bacteriana a partir de una muestra formada por muchos tipos de bacterias, se siembra en un medio de cultivo sólido donde las células que se multiplican no cambian de localización; tras muchos ciclos reproductivos, cada bacteria individual genera, por escisión binaria, una colonia macroscópica compuesta por decenas de millones de células similares a la original. Si esta colonia individual se siembra a su vez en un nuevo medio crecerá como cultivo puro de un solo tipo de bacteria. Algunas bacterias pueden ser muy difíciles o incluso imposibles de cultivar y se necesita un conocimiento previo de las condiciones que precisan para crecer²⁰. Esto hace que en los estudios se utilicen las bacterias fáciles de cultivar, demostrando cierta parcialidad²⁰. A día de hoy, la etiología de muchas enfermedades inflamatorias crónicas que sugieren infección (artritis reumatoide, arteriosclerosis, diabetes mellitus) no se identifica claramente²¹. Se debe aceptar que, bajo estas condiciones, existen muchas especies que deben identificarse aún²¹.

La mayor ventaja de los cultivos es que, con una sola muestra, pueden identificarse un gran número de especies microbianas. Además puede estudiarse su susceptibilidad, su fisiología y su patogenicidad. Sin embargo, presenta limitaciones tales como el tiempo necesario para el crecimiento (incluso de días o semanas), su baja sensibilidad y especificidad o la dependencia del modo de transporte. Su mayor desventaja es que no todas las bacterias pueden ser cultivadas y muchas de ellas, aunque cultivadas, pueden ser difíciles de identificar.

2) Microscopía

La microscopía puede sugerir un agente etiológico, pero raramente muestra evidencia definitiva de una infección producida por un agente determinado. La identificación morfológica puede ser engañosa, ya que es evaluada por un observador y por tanto se aplica la subjetividad. Muchas

de las bacterias pueden ser pleomórficas²⁰. Además, antes de poder observarlas bajo microscopía deben existir en gran número en la muestra.

3) Métodos Inmunológicos

El test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay o Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o algún otro tipo. Sus ventajas son que es un método realizable en varias horas, pueden encontrar microorganismos muertos, se pueden estandarizar y son de bajo coste²². Sus desventajas son que tan solo pueden detectar especies concretas, presentan baja sensibilidad y especificidad variable²².

VII.II. MÉTODOS GENÉTICOS MOLECULARES

1) "Gene Target" para la identificación microbiológica

El enfoque molecular para la identificación microbiana se basa en el hecho de que algunos genes contienen información relevante sobre la identidad microbiana. Idealmente, para usar un gen como objetivo (gene target) para la identificación, éste debe contener regiones únicas para cada especie. Siguiendo los estudios de Woese²³ los genes que codifican las moléculas de rRNA, presentes en todas las células, se han utilizado extensamente para la identificación de los organismos vivos.

Los ribosomas son partículas intracelulares compuestas por rRNA y proteínas. Los tamaños de los ribosomas se dan en unidades Svedburg, que representa una medida de cómo de rápido las partículas o las moléculas sedimentan en un ultracentrífugado. Tanto las bacterias como las Archaea presentan ribosomas de 70S, compuestos por las subunidades 30S y 50S. La subunidad 30S presenta moléculas 16S rRNA (menor número de nucleótidos, subunidad genética pequeña) y las 50S, 23S rRNA (mayor número de nucleótidos, subunidad genética grande). Tanto el 16S rRNA como el 23S rRNA se han utilizado para la identificación, caracterización y clasificación microbiana. A día de hoy, existen más de 90.000 secuencias de 16SrRNA bacteriana en bases de datos públicas, mientras que son menos de 1400 las indicadas para el 23S rRNA. Es por esto que en la mayoría de los estudios se utiliza el 16S rRNA.

2) PCR (Polymerase Chain Reaction)

Kary Mullis (1983) fue el inventor de la PCR, revolucionando la biología molecular, pudiendo amplificar una sola copia de un gen a billones de copias del mismo. Hoy en día es posible aislar cualquier gen de cualquier organismo.

Recientemente, estos métodos moleculares se han utilizado para investigar la microbiota de las infecciones endodónticas²⁴. Estas técnicas moleculares tienen la capacidad de identificar especies de *enterococos* más rápido y adecuadamente. La mayoría de estos métodos se basan en los ácidos nucleicos e incluyen PCR y análisis electroforético de los productos de esta²⁵.

El método de PCR se basa en la replicación in vitro del DNA a través de ciclos repetidos de desnaturalización (separa-

ción de las dos hebras del DNA), hibridación del cebador (unión del cebador a su secuencia complementaria en el DNA molde), extensión (la DNA polimerasa, tomando el DNA molde, sintetiza la cadena complementaria) y elongación (cualquier DNA de cadena simple restante se amplía).

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de DNA previsto, se emplean técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de DNA generados de acuerdo a su carga, esto es, longitud, y, en menor medida y dependiendo de la matriz empleada, a su tamaño. El tamaño de los productos de la PCR viene determinado por un marcador de peso molecular de DNA, el cual contiene fragmentos de DNA de tamaño conocido, y que se corre en el gel junto con los productos de PCR.

La PCR es muy sensible y permite la identificación fiable de especies y cepas microbianas que son muy difíciles o incluso imposibles de cultivar²⁴. Las técnicas moleculares pueden mejorar la sensibilidad en la detección microbiana cuando se compara con los cultivos y puede permitir la identificación de enterococos con mayor precisión. En un estudio de Siqueira y cols. que utilizó primers (cebadores) específicos del gen 16S rDNA, se identificó al *Enterococcus faecalis* en un 77% de 22 muestras de endodoncias refractarias²⁴. La aplicación de los métodos moleculares para detectar e identificar microorganismos, que se basan en marcadores moleculares seguros, como el 16S rDNA, se han usado más, y con mayor frecuencia para superar los problemas inherentes asociados a la identificación fenotípica y para dar un análisis más fiable de la composición y la estructura de las comunidades microbianas²⁶.

Los métodos basados en la detección con PCR permiten una rápida identificación de especies microbianas cultivables y no cultivables con una alta especificidad y sensibilidad²⁰. Sin embargo, la PCR convencional, sólo detecta la presencia o ausencia más que la cantidad del organismo problema, y no puede distinguir entre los microorganismos viables y no viables. Además, la PCR estándar necesita un proceso de postampliación para separar e identificar los productos individuales del PCR.

Se han desarrollado muchas variantes de la PCR entre las que se incluyen la Nested PCR, RT-PCR, Multiplex PCR, PCR-Based Microbial Typing, Real-Time PCR y el Broad-Range PCR.

Recientemente han surgido modificaciones de la PCR estándar para salvar estas limitaciones²⁰. La qPCR (Real-time quantitative PCR), que se basa en la liberación y detección de una señal fluorescente tras la división de una sonda marcada con fluorescencia por la actividad de la 5'-exonucleasa de una Taq polimerasa. La liberación de color durante cada amplificación permite detectar los productos y medirlos en el tiempo real del ciclo, cuando la amplificación se detecta por primera vez. Las referencias, que corren paralelamente con las reacciones test, pueden utilizarse para estimar el número de células bacterianas en muestras clínicas. La qPCR se ha utilizado para evaluar *Enterococcus faecalis* en muestras de enjuagues orales^{27,28}, raspados linguales²⁸ y el surco gingival²⁸.

Otra modificación es la RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) en la que se utiliza el RNA (en forma de RNA

mensajero o mRNA como plantilla de amplificación). El mRNA sirve como un marcador de viabilidad y replicación activa²⁹.

VIII. CAUSALIDAD MICROBIANA DE LA ENFERMEDAD PERIRRADICULAR

Hace más de un siglo Miller escribió: *"asumimos, de una manera general, que las bacterias deben estar asociadas de alguna manera con este proceso (enfermedad pulpar). Existen entonces, como ya he dicho, diferentes especies bacterianas en la enfermedad pulpar que no se han podido cultivar aún en medios artificiales y de su patogénesis no conocemos nada definitivo. Su gran número en algunas pulpas, y específicamente la aparición repetida de espiroquetas, justifican la suposición de que, bajo ciertas circunstancias, pueden jugar un papel en los procesos supurativos."*

La mayoría de sus planteamientos no obtuvieron respuesta por muchas décadas. Desde los descubrimientos clásicos de Kakehashi y cols. en 1965³⁰ hasta la actualidad, se han resuelto muchas cuestiones importantes. Sin embargo, algunos aspectos de las infecciones endodónticas son aún confusos.

Miller planteó la hipótesis de que las bacterias son la causa de las enfermedades de origen endodóntico. En su tiempo, reconoció que algunas bacterias de las muestras de conductos, que él había visto con microscopía de luz, no se podían cultivar con la tecnología disponible en ese momento. La mayoría de esas bacterias, probablemente, eran anaerobias. Sin embargo, a pesar de los avances tecnológicos durante el último siglo, se acepta que la mayoría de especies microbianas que viven en la tierra no se pueden cultivar³¹. Esto debe ser cierto también para los microorganismos intraconducto.

Se conoce gran parte de los mecanismos de patogenidad de la mayoría de los patógenos humanos conocidos, aunque aún hay muchos microorganismos que se consideran patógenos putativos por el hecho de que sus mecanismos de patogenidad no se comprenden completamente.

Aunque Miller informó en 1894 sobre la incidencia de bacterias en el conducto radicular y su asociación con condiciones patológicas, la relación causal entre los microorganismos y la enfermedad perirradicular se demostró en 1960³² a través de estudios en monos y humanos. La búsqueda de agentes etiológicos específicos se ha mantenido hasta ahora. Los estudios epidemiológicos han demostrado la existencia de más de 200 especies microbianas diferentes en los conductos infectados, normalmente en combinaciones de cuatro a siete especies por conducto³¹. Teóricamente, cualquiera de estas especies podría tener la capacidad de ser un patógeno endodóntico.

La evidencia sugiere que no son especies particulares las causantes de la enfermedad perirradicular, sino asociaciones que poseen los requerimientos fisiológicos necesarios para causar daño en el tejido perirradicular. Además, diferentes asociaciones microbianas del conducto radicular pueden tener la misma habilidad para producir daño tisular. Esto no necesariamente confirma la hipótesis no específica. Las asociaciones específicas que están implicadas en la patogénesis de la enfermedad

perirradicular aún son desconocidas, pero se acepta que las especies aisladas más frecuentemente deben tener una mayor contribución en el ecosistema de la comunidad que coloniza el sistema de conductos radiculares y, en consecuencia, al grado de patogenidad de la asociación. Muchas de estas especies, no todas, ejercen un papel importante en la patogenidad, y así actúan como patógenos clave.

Aunque la carga microbiana es importante en la patogenidad, datos recientes de laboratorio han sugerido que las diferentes formas de presentación de la enfermedad perirradicular pueden tener etiologías microbianas diferentes. Quizá sólo se han detectado frecuentemente unas 15 ó 30 especies en el conducto infectado, de las más de 500 que colonizan la cavidad oral, y posiblemente son las responsables de la mayoría de lesiones perirradiculares en humanos. Otras especies deben estar implicadas en esta enfermedad en un pequeño porcentaje de casos. Particularmente, en los casos fracasados, el número de especies microbianas implicadas debe ser incluso menor. Esto indica que la hipótesis de la microbiota semiespecífica es más coherente en la explicación de la patogénesis de la enfermedad perirradicular³. Así, algunos grupos bacterianos, probablemente estén más implicados en la etiología de algunas formas de enfermedad perirradicular, normalmente formando una asociación. En los últimos años se ha observado que la estructura de la microbiota puede ser la responsable de las diferentes presentaciones clínicas de la periodontitis apical³³.

Aparecen algunas dificultades en la interpretación de los resultados obtenidos en varios estudios de prevalencia. La mayor dificultad se refiere a los problemas conceptuales sobre infecciones mixtas y especies microbianas oportunistas. Las especies oportunistas deben crecer en el sistema de conductos como consecuencia de la necrosis pulpar y no ser la causa de las lesiones perirradiculares. Además, las condiciones medioambientales permiten el aumento de especies oportunistas. Así, su aparición, algunas veces en un número elevado, puede hacer que sea difícil su distinción de las especies patógenas. En estudios más recientes se ha observado que las infecciones endodónticas son en su mayoría infecciones endógenas que han surgido a partir de la microbiota oral normal bajo ciertas circunstancias (necrosis pulpar o al eliminar este tejido). En estados avanzados del proceso infeccioso, se ha podido observar cómo estas bacterias se asocian en biofilms adheridos a las paredes de dentina. Así pues, existe evidencia para incluir a las periodontitis apicales como infecciones humanas producidas por biofilms bacterianos³³.

Demostrar una alta prevalencia de una especie microbiana no asegura, necesariamente, una relación causal entre ésta y la enfermedad perirradicular. Indicaría que la especie microbiana coloniza el sistema de conductos con un mayor éxito. Si la especie más prevalente presenta factores de virulencia demostrables, al menos in vitro e idealmente in vivo, si es patogénico en modelos animales y si está implicado en la etiología de otras enfermedades en humanos, se puede considerar un patógeno endodóntico.

IX. REQUISITOS PARA EL PATÓGENO ENDODÓNTICO

Los siguientes requisitos son necesarios para que un microorganismo dado se establezca por él mismo en el sistema de conductos y participe en la patogénesis de la enfermedad perirradicular:

- 1) El microorganismo debe presentarse en número suficiente para iniciar y mantener la enfermedad perirradicular.
- 2) El microorganismo debe presentar factores de virulencia, que deben ser expresados durante la infección del conducto radicular.
- 3) El microorganismo debe estar localizado espacialmente en el sistema de conductos desde el cual él o sus factores de virulencia puedan llegar a los tejidos perirradiculares.
- 4) El ambiente del conducto debe permitir la supervivencia y crecimiento del microorganismo y proporcionarle señales que estimulen la expresión de los genes de virulencia.
- 5) La inhibición de los microorganismos debe estar ausente o presente en bajo número en el ambiente del conducto radicular.
- 6) El hospedador debe montar una estrategia defensiva en los tejidos perirradiculares, inhibiendo la propagación de la infección. Este proceso tendrá como resultado el daño tisular.

X. TIPOS DE INFECCIÓN ENDODÓNTICA

Generalmente, los microorganismos infectan el sistema de conductos radiculares penetrando desde la cavidad oral a través de caries o restauraciones deficientes. El complejo pulpo-dentinario puede reaccionar de muchas maneras ante la presencia de microorganismos, pero los cambios inflamatorios irreversibles ocurrirán con el desarrollo de un frente inflamatorio del tejido perirradicular, causando una periodontitis perirradicular crónica³⁴.

Existen diferentes tipos de infección endodóntica que, generalmente, se asocian con diferentes condiciones clínicas. La infección del conducto es la primera causa de enfermedad perirradicular aguda o crónica. Las infecciones secundarias o persistentes son la causa de lesiones perirradiculares secundarias o crónicas, las cuales tienen como resultado síntomas persistentes, exudado o el fracaso del tratamiento de endodoncia³⁵. La composición de la microbiota varía dependiendo de los tipos de infección y las lesiones perirradiculares. De hecho, la estructura microbiológica debe ser la responsable de las diferentes presentaciones clínicas de la periodontitis apical³³ y, además los perfiles de las comunidades bacterianas parecen seguir unos patrones relacionados a las diferentes presentaciones de periodontitis apical³⁶.

1) Infección primaria del conducto radicular

La infección primaria del conducto está causada por microorganismos que colonizan el tejido pulpar necrótico. La

microbiota implicada cambia normalmente dependiendo del momento de infección. Se ha sugerido que la microbiota puede diferir en relación al tipo de enfermedad perirradicular. Según Sundqvist³⁷, los conductos de dientes sintomáticos con pulpas necróticas y destrucción ósea periapical contienen un mayor número de bacterias y una flora bacteriana anaeróbica más compleja que los dientes asintomáticos con periodontitis apical. Este mismo autor dice que el hecho de que aparezca dolor espontáneo, debe ser el resultado de un aumento de la virulencia de los microorganismos en el conducto radicular. También se han encontrado diferencias específicas en la microbiota de las infecciones endodónticas primarias con y sin tracto sinusal³⁸

La evidencia actual sugiere que algunas bacterias Gram-negativas anaerobias se asocian con la etiología de lesiones perirradiculares sintomáticas, incluyendo casos de abscesos perirradiculares agudos³⁹. No obstante, las mismas especies asociadas a casos sintomáticos, también se han observado en casos asintomáticos. Esto podría atribuirse a los diferentes sinergismos o al número de células bacterianas presentes. También podría depender de la respuesta del hospedador o de las condiciones ambientales. Las bacterias pueden cambiar su conducta y hacerse virulentas debido a los cambios ambientales generados por condiciones como la inanición, la densidad poblacional, el pH y la temperatura.

En general, las infecciones primarias son mixtas y predominan las bacterias anaerobias estrictas⁴⁰ y bacterias Gram-negativas⁴¹. Las especies predominantes generalmente pertenecen al género *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* y *Campylobacter*. Los estreptococos facultativos o microaerófilos también suelen encontrarse en este tipo de infección.

2) Infección secundaria del conducto radicular

Las infecciones secundarias intrarradiculares son causadas por microorganismos que no estaban presentes en la infección primaria y han entrado en el conducto durante el tratamiento, entre citas o al finalizar el tratamiento de conductos⁴². Se establecerá una infección secundaria si los microorganismos sobreviven y colonizan el sistema de conductos.

Un artículo reciente de Roth y cols.⁴³ informa que las limas nuevas están contaminadas con microorganismos viables y recomiendan su esterilización antes de su uso clínico.

3) Infección persistente del conducto radicular

Aunque las infecciones extrarradiculares se han propuesto como posible causa de periodontitis periapical post-tratamiento⁴⁴ se ha establecido que las infecciones persistentes o secundarias intrarradiculares son los agentes etiológicos más implicados en el fracaso del tratamiento^{24,26,45}.

El fracaso del tratamiento de conductos se caracteriza por la persistencia o la aparición de una lesión apical⁴ y está relacionado, generalmente, con problemas durante la instrumentación. Los conductos mal obturados han mostrado

contener un mayor número de especies que aquellos aparentemente bien instrumentados y obturados⁴⁶. En un estudio de Siqueira y cols.²⁴ sobre dientes con endodoncias fracasadas, encontraron que cuando el término de la obturación estaba a 2 mm o menos del ápice, el número de especies era significativamente menor que cuando ésta se encontraba a más de 2 mm del ápice. La calidad de la obturación está directamente relacionada con la calidad de la instrumentación, y si esta última es mala, puede permitir una continuación mayor de los microorganismos en el conducto radicular.

Sin embargo y, ocasionalmente, las bacterias pueden resistir una terapia de buena calidad⁴⁷. Los microorganismos que de alguna manera resisten los procedimientos de desinfección intraconducto, causan infecciones persistentes³. Los microorganismos causales pueden ser los de la infección primaria o los de la secundaria. Las especies microbianas que tienen la habilidad de sobrevivir a estos procedimientos son pocas y deben estar involucradas en el fracaso del tratamiento de conductos⁴.

La microbiota asociada con la infección secundaria persistente, normalmente está compuesta por una especie o un bajo número de estas, comparado con las infecciones primarias. Las bacterias Gram positivas son las predominantes⁴⁸.

Aunque los estudios informan de una tasa de éxito del 85-96% en casos de tratamiento de conductos⁴⁵, la literatura indica que el éxito del retratamiento de conductos de dientes con periodontitis apical es inferior, con una tasa de éxito del 66%⁴⁹. Molander y cols.⁴⁸ sugieren que este pobre pronóstico debe estar asociado con la dificultad en la eliminación de la microflora particular en los casos de retratamiento.

4) Infecciones extrarradiculares

Las infecciones extrarradiculares pueden ser primarias, secundarias o persistentes. La forma más frecuente de infección extrarradicular es el absceso perirradicular agudo. La fuente de infección extrarradicular es, generalmente, la infección intrarradicular. Es una forma rara de infección.

Últimamente existe un alto interés sobre el papel de los microorganismos persistentes extrarradiculares en el fracaso de los tratamientos de conductos. Como los microorganismos se encuentran en el tejido perirradicular, son inaccesibles mediante procedimientos endodónticos y pueden hacer que el tratamiento de conductos fracase⁵⁰.

Algunos microorganismos pueden vencer los mecanismos defensivos del hospedador e inducir una infección extrarradicular. Se piensa que microorganismos como *Actinomyces* y *Propionibacterium propionicus* pueden estar implicados en las infecciones extrarradiculares⁵¹. Un estudio de 2001 de Siqueira y cols.⁴, realizado con microscopía electrónica de barrido, muestra que un pequeño porcentaje de dientes no tratados, asociados con lesiones perirradiculares mostraban evidencia de infección extrarradicular.

Otro factor clave para la infección persistente periapical⁵⁰ es la presencia de una matriz gelatinosa o matriz extracelular que protege a los microorganismos y permite que se organicen como un biofilm. El biofilm apical constituye una barrera mecánica contra la acción de sustancias antimicrobianas y contra los mecanismos de defensa del hospedador⁵².

Debido a los métodos de identificación, *Enterococcus faecalis* es la especie encontrada con mayor frecuencia en los conductos de dientes endodonciados, con prevalencias que rondan el 90% de los casos^{45,53-55}. Los conductos de dientes con tratamientos de conductos albergan nueve veces más *Enterococcus faecalis* que los conductos de infecciones primarias⁵⁶. El hecho de que esta bacteria se haya encontrado habitualmente en dientes tratados o cuando se han realizado varias visitas, o cuando se ha dejado abierto el diente para drenaje⁵⁷, sugiere que esta especie invade y coloniza de manera secundaria el conducto y resiste al tratamiento. Es decir, que invade secundariamente el conducto y luego se hace persistente. Mientras que la asociación de *Enterococcus faecalis* con la enfermedad post-tratamiento se ha sugerido por estudios epidemiológicos y se ha fundamentado en las capacidades de dicha bacteria para permanecer y sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables, la relación causal aun no se ha probado.

La lista de patógenos putativos endodónticos se ha expandido hasta incluir bacterias que no habían sido cultivadas todavía³⁴. Sin embargo, *Enterococcus faecalis* sigue siendo la más encontrada en dientes con endodoncias fracasadas²⁴. Sin embargo, un estudio de Zoletti y cols.⁵⁸ encontró que no existía diferencia estadísticamente significativa entre la existencia de *Enterococcus faecalis* en dientes con o sin lesión periapical, poniendo en cuestión si en realidad esta bacteria es la principal causante de fracaso de endodoncia.

XI. ENTEROCOCCUS FAECALIS

Los enterococos son cocos Gram-positivos que pueden encontrarse individualmente, en parejas o como cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, pudiendo crecer en medios en presencia o ausencia de oxígeno²⁶. Pueden sobrevivir en ambientes desfavorables, incluyendo medios con pH extremadamente alcalino (9.6)⁵⁹. Son resistentes a las sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol, ácidos y desecación⁵⁹. Pueden crecer a una temperatura de 10-45° y sobreviven a un aumento de esta a 60° durante 30 minutos⁵⁹. Existen veintitres especies de Enterococos que se dividen en cinco grupos basándose en su interacción con manitol, sorbosa y argina. *Enterococcus faecalis* pertenece al mismo grupo que *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, y *E. gallinarum*. Estas cinco especies forman ácido en caldos de manitol y argina hidrolí-

zada, sin embargo no forman ácido en caldo de sorbosa⁵⁹. *Enterococcus faecalis* es arabinosa-negativo y, excepto para algunas variantes atípicas, es el único miembro del grupo que utiliza piruvato y tolera telurito⁶⁰.

Además es responsable de la amplia mayoría de enfermedades enterocócicas en humanos. Generalmente se encuentran en el intestino, ya que son comensales normales humanos, adaptados a depleciones de oxígeno y ambientes ecológicos complejos⁶¹, pero pueden colonizar otros tejidos del cuerpo causando infecciones serias y ocasionalmente, que impliquen la vida del paciente⁶². La incidencia de enfermedades enterocócicas ha aumentado en los últimos años debido a las resistencias generalizadas de las cepas a los antibióticos y al aumento de *Enterococcus faecalis* en enjuagues bucales con una mayor prevalencia de la encontrada hasta ese momento. También encuentra en la lengua y en el surco gingival utilizando técnicas moleculares^{27,28}.

El *Enterococcus faecalis* posee factores de virulencia entre los que se incluyen encimas líticas, citolisina, sustancia de agregación, feromonas y ácido lipoteicoico²⁵. Ha mostrado adherirse a las células del hospedador y expresa proteínas que le permiten competir con otras células bacterianas y alterar la respuesta del hospedador²⁵. Puede suprimir la acción de los linfocitos, contribuyendo al fracaso de la endodoncia⁶⁴. Además puede compartir estas características de virulencia entre especies, contribuyendo a su virulencia y habilidad para producir enfermedad⁶¹.

Es capaz de superar los retos que presenta el conducto radicular de muchas maneras, colonizando los túbulos y reinfectando los conductos obturados⁹:

- Ha mostrado polimorfismo genético generalizado⁶³.
- Posee proteasa serina, gelatinasa y cubierta proteica de colágeno, que ayuda a que esta bacteria se una a la dentina⁶³.
- Es suficientemente pequeño para invadir, competentemente, los túbulos dentinarios y vivir en ellos⁹.
- Tiene la capacidad de soportar periodos prolongados de inanición hasta que aparezcan los suplementos nutricionales adecuados⁶⁶.
- El suero que se origina en el hueso alveolar y el ligamento periodontal, también ayuda a *Enterococcus faecalis* a unirse al colágeno tipo I⁹.
- Esta bacteria ha mostrado sobrevivir al hidróxido de calcio durante 10 días⁶⁷.
- Puede formar biofilm, lo cual la ayuda a resistir a la destrucción, ya que son 1.000 veces más resistentes a la fagocitosis, anticuerpos, y antimicrobianos que los organismos que no forman biofilm⁹.

En este sentido, existen varias razones por las que *Enterococcus faecalis* es capaz de resistir el tratamiento con hidróxido de calcio:

- Mantiene la homeostasis pasivamente. Esto sucede como resultado de la penetración de iones en la membrana, así como la capacidad tampón citoplasmática.
- Tiene una bomba de protones que le otorga una capacidad adicional para mantener la homeostasis del pH.
- A un pH de 11.5 o mayor, no sobrevive⁶⁸. Sin embargo, el pH de 11.5 no puede mantenerse en los túbulos dentinarios debido a la capacidad tampón de la dentina⁶⁹.

La capacidad de *Enterococcus faecalis* de producir enfermedad se debe, no sólo a los factores de virulencia, sino a su habilidad para sobrevivir al tratamiento del conducto radicular y persistir en este y en los túbulos dentinarios como un patógeno. Se postula que su capacidad para producir patogenicidad en los tratamientos de endodoncia fracasados debe relacionarse con su habilidad para mantener la capacidad de invadir los túbulos dentinarios y unirse al colágeno en presencia de suero humano⁹. Posee la habilidad para sobrevivir en ambientes con una baja disponibilidad de nutrientes y prosperar o crecer bien cuando se restablezcan las fuentes nutricionales⁷⁰.

Enterococcus faecalis muestra un alto nivel de resistencia a un amplio rango de agentes antimicrobianos⁷¹ y es una de las pocas bacterias facultativas asociadas con la periodontitis periapical persistente⁶⁷. Las infecciones endodónticas con esta bacteria, normalmente suponen un problema en el tratamiento, ya que esta bacteria es difícil de eliminar³⁵.

1) *Enterococcus Faecalis* y su relación con el tratamiento de conductos

Los enterococos están implicado en las infecciones del sistema de conductos radiculares; sin embargo, aún no se conoce cuál es su papel²⁴. Constituyen una pequeña proporción de la flora inicial, la cual está determinada por especies Gram-negativas^{9, 39, 72}. Por otro lado, se ha descrito que los enterococos se aíslan frecuentemente en los conductos obturados de dientes que muestran patología periapical crónica^{9, 19, 48, 58}. Por lo tanto, *Enterococcus faecalis* es la especie que se encuentra con más frecuencia en las infecciones intrarradiculares, persistentes y secundarias, asociadas con el tratamiento de endodoncia fracasado^{9, 19, 48, 58}. Su habilidad para invadir los túbulos dentinarios y adherirse al colágeno, en presencia de suero humano, debe explicar por qué las células de *Enterococcus faecalis* dentro de los túbulos actúan como un patógeno en los dientes tratados con endodoncia y fracasados⁹. También se ha asociado con conductos abiertos y citas frecuentes^{46,73}. *Enterococcus faecalis* es la especie dominante de *Enterococcus* y muchas veces la única aislada (monocultivo)⁷⁴. Sin embargo, el hecho de atribuir a *Enterococcus faecalis* la capacidad de ser el principal causante de fracaso de tratamiento endodóntico se ha puesto en duda³³. Estudios recientes defienden esta idea basándose en los siguientes argumentos³³:

- *Enterococcus faecalis* no se ha detectado en todos los estudios en los que se ha evaluado la microbiota de los conductos tratados con lesión post-tratamiento^{57,75}.
- Incluso cuando está presente en dientes tratados, *Enterococcus faecalis* no suele ser la especie dominante de la comunidad bacteriana²⁶.

- *Enterococcus faecalis* no es más recuente en los dientes tratados con lesión apical que en los tratados sin lesión^{58,76}.

2) *Enterococcus Faecalis* y los métodos de identificación

La evidencia indica que tan solo una pequeña proporción de microorganismos de la naturaleza ha podido ser aislada^{17,18}. La identificación de microorganismos que son capaces de resistir el tratamiento de endodoncia y sobrevivir en el ambiente del conducto radicular, podría contribuir a la determinación de terapias microbianas efectivas. Estos microorganismos podrían causar fracaso del tratamiento de conductos, sobre todo si las vías microscópicas que llegan hasta la región periapical, no se incluyen en la obturación¹⁹. El papel de *Enterococcus faecalis* en las infecciones refractarias y primarias no se ha definido claramente.

Las técnicas de cultivo han sido utilizadas tradicionalmente para investigar la microbiota asociada a las infecciones endodónticas y han mostrado que *Enterococcus faecalis* es la especie que se encuentra con más frecuencia en las infecciones intrarradiculares, persistentes y secundarias, asociadas con el tratamiento de endodoncia fracasado⁴⁸. También se ha asociado con conductos abiertos y citas frecuentes⁴⁶. Debido a las restricciones físicas del sistema de conductos, la obtención de una muestra significativa del lugar, no es una tarea fácil. Esta dificultad se acentúa en pacientes de retratamiento de endodoncia, en los cuales el número de microorganismos accesibles en el conducto puede ser menor, y el número de células puede perderse durante los procedimientos de remoción del material de obturación. Como consecuencia, el número de células que se utilizan como muestra puede caer en un rango de detección bajo del método de identificación, y la prevalencia de una especie dada, subestimada^{24,44}. Los cultivos necesitan mucho tiempo, requieren unas condiciones controladas durante la toma de muestras y el transporte, para asegurar la viabilidad de los microorganismos, y pueden llevar a resultados variables dependientes de la experiencia del microbiólogo²⁰.

Enterococcus faecalis es por tanto, el organismo que se encuentra con mayor prevalencia en los cultivos de tratamientos fracasados. Sin embargo, no es un hallazgo universal¹⁹. La habilidad de una bacteria de producir enfermedad, se escapa de la detección mediante cultivo y ha llevado al concepto de estado VBNC (viable-no cultivable)⁷⁷. En este estado, las bacterias no pueden ser cultivadas, ya que no pueden crecer en medios de cultivo, pero aún están vivas, metabólicamente activas y capaces de producir patogenicidad⁷⁷. Las bacterias pueden volver a crecer una vez se restablezcan las condiciones ambientales favorables⁵⁸. La importancia clínica de las células con lisis en los biofilms, es que poseen el potencial para actuar como donantes de cromosomas o plásmidos de ADN aumentando la probabilidad de una transferencia genética horizontal a otras bacterias. Así se transfiere la resistencia a antibióticos y factores de virulencia²⁸. Este estado es detectable mediante técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction); sin embargo, con estas técnicas es necesario producir la lisis celular para poder acceder al material cromosómico. Sin cultivo no se pueden evaluar los factores de virulencia²⁸.

Recientemente, dichos métodos moleculares se han utilizado para investigar la microbiota de las infecciones endodónticas²⁴. Estas técnicas moleculares tienen la capacidad de identificar especies de enterococos de forma más rápida y adecuada. La mayoría de estos métodos se basan en los ácidos nucleicos e incluyen PCR y análisis electrofo-

rético de los productos de ésta²⁵. La recopilación bacteriológica de la ATCC (American Type Culture Collection) cuenta con 69 aislamientos de *Enterococcus faecalis* actualmente y se encuentran comercializados. Cada uno tiene un número ATCC y designación diferente.

XII. ESTADO ACTUAL DE LA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

La literatura sugiere que las infecciones intrarradicular (primaria, secundaria o persistente) y extrarradicular son la causa más frecuente de enfermedad perirradicular⁷⁸.

Han sido muchos los métodos utilizados para identificar la microbiota de los conductos radiculares, entre ellos el cultivo y las técnicas de PCR introducidas más recientemente. Hasta el momento de la introducción de estos métodos moleculares, se utilizaron los cultivos con fines taxonómicos y de identificación obteniendo con ellos respuestas parciales sobre la etiología de la enfermedad perirradicular.

La diversidad bacteriana se ha subestimado³⁴. Son muchos, como se ha dicho anteriormente, los inconvenientes de los cultivos. De hecho, la mayoría de los estudios de la microbiota del conducto radicular de dientes con fracaso de tratamiento de endodoncia han utilizado esta técnica para la identificación⁷⁹ y todos ellos han mostrado diferentes porcentajes de cultivos negativos, manifestando las dificultades de la técnica^{45,79}. Estos estudios están condicionados por muchos factores que pueden afectar a la muestra, incluso pueden depender de la manera en la que se toman estas. En algunos estudios las muestras se toman colocando el dique antes de la apertura^{24,43} y en otros se coloca una vez realizada⁴⁵. También son muchos los estudios en los que se ha intentado comparar el cultivo con las técnicas de PCR^{8, 58, 74, 79, 80, 81}. En un estudio de Zoletti y cols.⁵⁸ se comparó la presencia de *Enterococcus faecalis* en dientes endodonciados con presencia o ausencia de lesión periapical utilizando cultivo y PCR y encontraron porcentajes mucho mayores con la técnica molecular tanto en dientes con lesión, en los que obtuvieron con PCR un 81,5% y con cultivo un 18,5%, como en aquellos sin lesión, en los que encontraron *Enterococcus faecalis* en un 78% con PCR y 13% con cultivo, demostrando que esta técnica molecular es más sensible y específica que los cultivos. Esto mismo habían demostrado Sedgley y cols.²⁸ en un estudio de prevalencia de la misma bacteria en enjuagues bucales, surco gingival, placa y conducto radicular concluyendo que *Enterococcus faecalis* podía determinarse con mayor sensibilidad mediante PCR. Sedgley y cols. también demostraron esto en estudios en los que utilizaban qPCR^{74,81} en vez de PCR convencional. Incluso, utilizando estas técnicas, se ha conseguido observar *Enterococcus faecalis* en lugares como la lengua, donde se subestimaba su existencia²⁸. Una posible razón para que la PCR sea capaz de detectar más es que puede incluir el ADN de células lisadas. De todas maneras, es improbable que este ADN permanezca intacto, ya que el ataque de otras bacterias y hongos a los nucleótidos puede contribuir al daño de éste con el tiempo

Respecto al tipo de técnica de PCR, en un estudio de Williams y cols. (2006)⁸⁰, se compararon el cultivo, la RT-PCR y la qPCR, y tan solo llegaron a la conclusión de que ambos tipos

de técnica molecular son más sensibles que el cultivo. Por otro lado, en un estudio de Nandakumar y cols.⁶², donde comparaban la sensibilidad de los diferentes tipos de cebadores usados habitualmente para la técnica de PCR, encontraron que la identificación mediante amplificación PCR con el gen *tuf* como primer, es más sensible que con los otros evaluados. Algunos estudios de prevalencia de *Enterococcus faecalis* en infecciones endodónticas mediante PCR, han utilizado cebadores para la amplificación del gen 16SrRNA. Estos estudios han mostrado una amplia variabilidad en la prevalencia de esta bacteria, detectada mediante PCR, en dientes con tratamiento endodóntico y enfermedad persistente. Las razones para la variabilidad pueden incluir la localización geográfica, el grado de asepsia durante el tratamiento o tratamientos previos, el estado de la restauración coronal y el consumo dietético. Sin embargo, esta variabilidad también podría deberse a las diferencias en la sensibilidad del cebador utilizado⁶². Las especies seleccionadas están basadas en estudios de cultivo y no cuentan con ninguna especie no cultivada o biotipos no cultivados de especies conocidas. Ninguna técnica puede utilizarse para determinar la diversidad real de los patógenos endodónticos.

El papel de *Enterococcus faecalis* en el fracaso del tratamiento de conductos, no se conoce bien. En los estudios de prevalencia de esta bacteria en la que se utilizaba el cultivo, se podía observar que constituían una pequeña proporción de la flora inicial, que se formaba principalmente por bacterias Gram-negativas^{9,39} y que se aislaban frecuentemente de los conductos obturados que mostraban patología periapical crónica⁴⁸ concluyendo que *Enterococcus faecalis* tenía un papel patogénico importante en el fracaso del tratamiento de conductos. Pinheiro y cols.⁴⁵ demostraron que la bacteria más frecuente en dientes con tratamiento fracasado era *Enterococcus faecalis* (36,7%), seguido de *Peptostreptococcus spp.* (23,4%), empleando qPCR.

Otros estudios han cuestionado el papel de *Enterococcus faecalis* como la principal especie causante de fracaso. Zoletti y cols.⁵⁸ observaron que aparecía en dientes sin lesión, pero podría estar asociado con la mala restauración coronal de la muestra evaluada. Por otro lado no todos los tipos clonales tienen por qué producir patología y quizá los clones más patogénicos estaban en los dientes con lesión perirradicular. Otros afirman que existe una infección específica de *Enterococcus faecalis* asociada con infecciones secundarias, pero sugieren que existe una etiología bacteriana compleja⁸². Recientemente se ha mostrado que esta bacteria está presente en dientes con necrosis y en dientes tratados endodónticamente pero sin lesión apical⁷⁷, aunque esto último puede deberse al estado óseo y la incapacidad de las radiografías de determinar este estado en algunos casos. También se ha visto que las comunidades bacterianas asociadas a los dientes obturados pueden variar en su composición en cada caso²⁶. En un estudio de Pinheiro y cols.⁴⁵ concluyeron que la flora de los conductos con fracaso del tratamiento de conduc-

tos se compone de un limitado número de especies microbianas predominantemente Gram-negativas y que los anaerobios facultativos, especialmente *Enterococcus faecalis* fueron los más frecuentes, pero que en conductos sintomáticos de dientes obturados, fueron los anaerobios estrictos los más encontrados. En otro estudio de Foschi y cols.⁸³ asociaron *Treponema denticola* con enfermedad endodóntica sintomática en presencia de reabsorción ósea apical.

Se ha demostrado que la diabetes mellitus está asociada con un éxito menor del tratamiento en casos de lesiones perirradiculares preoperatorias¹⁹. El hecho de que el resultado del tratamiento no fuera diferente en diabéticos y no diabéticos cuando los dientes eran vitales, hizo que se pensara que la diferencia entre los dos grupos se relacionara con el proceso infeccioso en casos con lesión. Sin embargo, el mismo autor, en un estudio posterior realizado con PCR encuentra que no existe diferencia estadísticamente significativa en los recuentos de *Enterococcus faecalis* en los pacientes diabéticos y no diabéticos.

En un artículo de Gomes y cols.⁷⁹ donde evalúan la existencia de *Enterococcus faecalis* encuentran que en las infecciones primarias el número de estas bacterias es mayor que en las infecciones secundarias. Los autores atribuyen estos resultados a las discrepancias en los métodos utilizados en otros estudios ya que las restauraciones de los dientes evaluados eran deficientes. Segley y cols.²⁸ observan que también se encuentra en la placa, lengua y surco gingival más prevalentemente que en los conductos radiculares observados. Sin embargo esto puede atribuirse a que el número de muestras de los conductos era menor. Estos mismos autores encuentran una relación entre la presencia de esta bacteria, y la historia de tratamiento endodóntico anterior en enjuagues²⁷.

Todos estos estudios ponen en evidencia muchas de las conclusiones a las que se había llegado en los estudios en los que se evaluaba *Enterococcus faecalis* mediante cultivo. Sin embargo, estos datos analizados mediante PCR, evalúan casi de manera única la existencia de esta bacteria y quizá sea importante la carga bacteriana q no puede detectarse con PCR.

CONCLUSIONES

El estudio de la microbiota relacionada con la patología pulpar y perirradicular ha sido un tema recurrente en la bibliografía científica de las últimas décadas. Las nuevas técnicas de identificación molecular para la identificación microbiana han supuesto una revolución en el conocimiento de la microbiota oral, donde el que se creía el principal causante de fracaso en endodoncia, *Enterococcus faecalis*, ha sido puesto en cuestión, encontrando bacterias y otros microorganismos que no se habían podido aislar debido a las limitaciones de las técnicas de cultivo tradicionales.



BIBLIOGRAFÍA

1. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [Tesis Doctoral]. Umea, Sweden: University of Umea, 1976.
2. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13 (2): 171-183.
3. Siqueira, JF. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:281-293.
4. Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001; 34(1):1-10.
5. Love RM, McMillan MD, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun* 1997; 65(12): 5157-5564.
6. Pashley DH. Clinical considerations in microleakage. *J Endod* 1990; 16(2):70-77.
7. Love RM, Chandler NP, Jenkinson HF. Penetration of smeared or nonsmeared dentine by *Streptococcus gordonii*. *Int Endod J* 1996;29: 2-12.
8. Knutsson G, Jontell M, Bergenholtz G. Determination of plasma proteins in dentinal fluid from cavities prepared in healthy young human teeth. *Arch Oral Biol* 1994; 39: 185-190.
9. Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34: 399-405.
10. Socransky SS, Haffajee AD. Microbiology of periodontal disease. In: 3rd ed. Lindhe J, Karring T, Lang NP editor. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Copenhagen: Munksgaard; 1997; 138-188.
11. Baumgartner JC, Falkler WA, Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991;17(8):380-383.
12. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000;26:593-595.
13. Kettering JD, Torabinejad M, Jones SL. Specificity of antibodies present in human periapical lesions. *J Endod* 1991;17:213-216.
14. Stashenko P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:89-96.
15. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71:492-495.
16. Tani-Ishii N, Wang C-T, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:129-135.
17. Ward JH. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Am Stat Assoc* 1963;58:236-244.
18. Relman DA, Strauss E. Microbial genomes: blueprints for life. American Academy of Microbiology, Washington, DC, 2000.
19. Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS, Conn F. molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99: 112-128.
20. Siqueira JF, Jr, Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 1-current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod* 2005;31:411-423.
21. Fredricks DN, Relman DA. Infectious agents and the etiology of chronic idiopathic diseases. *Curr Clin Top Infect Dis* 1998;18:180-200.
22. Sixou M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis Suppl* 2003;1:54-62.
23. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987;51:221-271.
24. 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.
25. 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 (2): 93-98.
26. Roças IN, Siqueira JF, Aboim MCR, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 771-749.
27. Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol* 2005;50:575-583.
28. Sedgley C, Guck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod* 2006;32:104-109.
29. Sheridan GE, Masters CI, Shallcross JA, MacKey BM. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:1313-1318.
30. 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;18:340-348.
31. Relman DA. The identification of uncultured microbial pathogens. *J Infect Dis* 1993;168:1-8.
32. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol* 1960; 1: 304-320.
33. Siqueira JF, Roças IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *J Oral Microb* 2009: 1-12.
34. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Sanders wp, Mackenzie d, Coldero , Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3282-3289.
35. Siqueira JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, De Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J* 1997; 30: 279-282.
36. Siqueira JF, Jr, Roças IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107: 870-878.
37. Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjögren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun* 1979 25(2):685-693.
38. Sassone LM, Fidel R, Faveri M, Fidel S, Figueiredo L, Feres M. Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. *Int Endod J* 2008; 41: 508-515
39. Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12:318-322.
40. Gomes BPPA, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of

- specific bacteria. *Int Endod J* 1996; 29: 69-75.
41. Möller AJR. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontologisk Tidskrift*. 1966; 74 (suppl): 1-380.
 42. Siqueira JF. Tratamento das infeções endodónticas. Rio de Janeiro: MEDSI; 1997.
 43. Roth TP, Whitney SI, Walker SG, Friedman S. Microbial contamination of endodontic files received from the manufacturer. *J Endod* 2006; 32 (7): 649-651.
 44. Sakamoto M, Siqueira JF, Roças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 275-281.
 45. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36: 1-11.
 46. Sundqvist G, Figdor D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford T editor. *Essential endodontology*. Oxford (England): Blackwell Science Ltd; 1998;p. 242-277.
 47. Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997; 30: 91-95.
 48. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.
 49. Hepworth MJ, Friedman S. Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures. *J Can Dent Assoc* 1997; 63(5):364-371.
 50. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990; 16(12):580-588.
 51. Nair PNR, Schroeder HE. Periapical actinomycosis. *J Endod* 1984;12:567-570.
 52. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 21;284(5418):1318-1322.
 53. Roças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF, Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod* 2004; 30: 504-508.
 54. Siqueira JF, Jr, Roças 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.
 55. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren 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.
 56. Roças IN, Siqueira JF, Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30: 315-320.
 57. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3282-3289.
 58. Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches. *J Endod* 2006;32(8):722-726.
 59. Gilmore MS. *The Enterococci (pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance)*. Washington: ASM Press; 2002
 60. Facklam RR, Carvalho MGS, Teixeira LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of *Enterococci*. In: Gilmore MS editors. *The Enterococci (pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance)*. Washington: ASM Press; 2002;p. 1-54
 61. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(4):462-478.
 62. Nadakumar R, Mirchandani R, Fouad A. Primer sensitivity: can it influence the results in *Enterococcus faecalis* prevalence studies? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: 429-432.
 63. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell D. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 95-101.
 64. Lee W, Lim S, Son H, Bae K. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* 2004;30:209-212.
 65. Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:121-126.
 66. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:234-239.
 67. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-1379.
 68. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35: 221-228.
 69. Tronstad L, Andreasen J, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981;7:17-21.
 70. Figdor D. Microbial aetiology of endodontic treatment failure and pathogenic properties of selected species [Tesis Doctoral]. Umeå University Odontological Dissertations No. 79. Umeå (Sweden): Umeå University; 2002.
 71. Heath CH, Blackmore TK, Gordon DL. Emerging resistance in *Enterococcus* spp. *Med J Aust* 1996;15;164(2):116-120.
 72. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992;18:427-430.
 73. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 2006;32 (3): 173-177.
 74. Dahlen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 309-312.
 75. Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 332-337.
 76. Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus* spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod* 2005; 31:851-856.
 77. Bloomfield SF, Stewart GS, Dodd CE, Booth IR, Power EG. The viable but non-culturable phenomenon explained? *Microbiology* 1998; 144(Pt 1):1-3.
 78. Siqueira JF, Jr, Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces* species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J Endod* 2002; 28:168-172.
 79. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 247-253.
 80. William JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *Enterococcus faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod* 2006; 32 (8):715-721.
 81. Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol* 2005; 50(6):575-583.
 82. Blome b, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 384-390.
 83. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 289-295.