

## FRECUENCIA DE AISLAMIENTO Y SUSCEPTIBILIDAD DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EN PACIENTES ENDODÓNTICOS

María A. Rivas<sup>1</sup>, Shadia Yulany<sup>2</sup>, Ingrid Daboin<sup>2</sup>, Clara Díaz<sup>3</sup>, Elaysa Salas O.<sup>4</sup>,  
Leonidas E. Urdaneta P.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Odontóloga. Práctica privada. <sup>2</sup>Grupo de Investigaciones Biopatológicas de la Facultad de Odontología (GIBFO). <sup>3</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. <sup>4</sup>Departamento de Biopatología, GIBFO. Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. E-mail: lurdanet@ula.ve

### RESUMEN

La microbiología endodóntica estudia los microorganismos asociados a enfermedad pulpar relacionados a lesiones inflamatorias de los tejidos periapicales. Los estudios realizados a microorganismos aislados de muestras de canales radiculares buscan transferir los hallazgos de laboratorio para mejorar el manejo clínico de las infecciones pulpo-periapicales. El objetivo de esta investigación fue determinar la prevalencia de *Enterococcus faecalis* en muestras de pacientes endodónticos y su perfil de susceptibilidad a la ampicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, eritromicina y vancomicina. A través de una investigación de tipo observacional-descriptiva se realizó un muestreo probabilístico, que incluyó 32 pacientes que acudieron al área de endodoncia de la Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, (ULA) obteniéndose 32 muestras de conductos radiculares, las cuales fueron analizadas en el laboratorio “Roberto Gabaldón” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA. Las cepas de *Enterococcus faecalis* recuperadas fueron evaluadas en su resistencia a antimicrobianos. Los resultados demuestran crecimiento de *E. faecalis* en 12,5% de las muestras. La mayoría de las cepas aisladas demostraron resistencia a la ciprofloxacina y sensibilidad a la vancomicina lo que indica que al usar de forma indiscriminada estos antimicrobianos se podría agravar el cuadro clínico del paciente, evitando el éxito del tratamiento endodóntico.

**Palabras Clave:** Microbiología endodóntica, *Enterococcus faecalis*, conductos radiculares, infección endodóntica.

### FREQUENCY OF ISOLATION AND SUSCEPTIBILITY OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS* IN ENDODONTIC PATIENTS

### ABSTRACT

This is a microbiological study of the bacteria in endodontic disease that is associated with inflammation in the periapical tissues. The goal of the microbiological analysis of samples (taken from root canals) was to improve the clinical management of pulp-periapical infections. Specifically, the investigators sought to determine the prevalence of *Enterococcus faecalis* in samples taken from endodontic patients and its susceptibility profile to ampicillin, tetracycline, ciprofloxacin, erythromycin and vancomycin. Data for this observational-descriptive study was co-

llected via probabilistic sampling from patients undergoing endodontic treatment at the Faculty of Dentistry, University of Los Andes (ULA). Thirty-two (32) samples obtained from root canals were analyzed in the Roberto Gabaldón laboratory at the Faculty of Pharmacy and Bioanalysis, ULA. The recovered strains of *Enterococcus faecalis* were then tested to determine their resistance profile. The results showed a 12.5% prevalence of *E. faecalis*, with an observed high resistance to ciprofloxacin but susceptibility to vancomycin. The results indicate that indiscriminate or improper use of these agents may cause complications in patients due to antimicrobial-resistant strains of *Enterococcus faecalis* that may compromise the efficacy of endodontic treatment.

**Key words:** Endodontic microbiology, *Enterococcus faecalis*, root channels, endodontic infection.

## Introducción

Fue en 1984 cuando aparece *Enterococcus* como género independiente (1). Este comprende cocos Gram positivos anaerobios facultativos que habitan el tracto gastrointestinal y poseen características biológicas y de cultivo que reflejan su hábitat. Pueden crecer en soluciones salinas hipertónicas (6,5%) o en bilis y no son destruidos por la bencilpenicilina. Causan infecciones oportunistas del tracto urinario, heridas y tejidos blandos y son responsables de la endocarditis bacteriana entre el 5 y 15% de los casos (2, 3). Para combatir los enterococos es necesario combinar sinérgicamente penicilina con un aminoglucósido (como gentamicina). También puede utilizarse vancomicina, pero se ha descrito la resistencia a la misma en conocidos como VRE (del inglés Vancomycin Resistant Enterococci), siendo una temida causa de infecciones nosocomiales mortales que presentan resistencia a gran variedad de antibacterianos (4). Las especies clínicamente más importantes son *E. faecalis* y *E. faecium*, con frecuencias de aislamiento en infecciones de 80-90% y de 10-15% respectivamente (5).

La resistencia de los enterococos a los fármacos antibacterianos puede ser relativa y absoluta (6). Pueden presentar resistencia intrínseca a  $\beta$ -lactámicos, principalmente cefalos-

porinas y penicilinas resistentes a  $\beta$ -lactamasas, clindamicina, fluoroquinolonas, trimetoprim sulfametoxazol y resistencia adquirida a  $\beta$ -lactámicos a altas concentraciones, debido a alteraciones de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), aminoglucósidos a altas concentraciones, glucopéptidos, tetraciclinas, eritromicina, fluoroquinolonas, rifampicina, cloranfenicol y nitrofurantoína (7).

Especies de *Enterococcus* pueden recuperarse a nivel de los conductos radiculares infectados cuando la infección produce necrosis pulpar con periodontitis apical crónica, conllevando a fracaso endodóntico (8). Se han encontrado piezas dentales con signos clínicos y radiográficos de periodontitis apical cuyo tratamiento de conducto se ha iniciado en una o en varias sesiones previas a la recolección de la muestra, con una prevalencia que sobrepasa a la flora anaerobica Gram negativa que es hallada con frecuencia en este tipo de infecciones (9).

A pesar de ser fundamental la preparación del conducto radicular con instrumentos endodónticos, resulta innegable el uso de sustancias químicas en procedimientos auxiliares. El empleo de soluciones irrigadoras, productos que favorezcan la conformación de conductos atrésicos y de fármacos que contribuyen con la

desinfección del sistema de conductos, constituye lo que desde el punto de vista didáctico se denomina “preparación química” del conducto radicular. Para elegir una medicación intraconducto entre sesiones es necesario seguir los mismos criterios que para la aplicación de cualquier fármaco en otra región del organismo humano (10).

*E. faecalis* es la especie aislada con mayor frecuencia de dientes que no han sanado bien luego de tratamientos de conductos (11, 12). Esta infección predomina entre 56 y 77% de los casos con fallas endodónticas (13). Sus múltiples factores de virulencia contribuyen en su capacidad de sobrevivir a la terapia convencional. Su persistencia en los túbulos dentinarios de los canales radiculares a menudo resulta en periodontitis periapical crónica (14). También es resistente a los medicamentos utilizados entre sesiones del tratamiento endodóntico incluyendo el hidróxido de calcio (15). A su vez puede residir en los canales radiculares como única especie sin el apoyo de otros microorganismos (16).

La trascendencia de esta investigación en la formación de los profesionales y estudiantes de la odontología se debe a que la mayoría de los datos existentes con respecto al tema provienen de investigaciones realizadas en otros países, por tanto surge la interrogante de conocer la prevalencia y la susceptibilidad antimicrobiana de *E. faecalis* recuperado de conductos radiculares en pacientes que acuden al área de endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes (FOULA), ante antibacterianos de uso común. Para ello se planteó determinar la prevalencia de *E. faecalis* y evaluar su resistencia antimicrobiana en pacientes que acuden al área clínica de endodoncia de la FOULA, Mérida. Los resultados lograrían una aplicación clínica para beneficio del tratamiento de conductos radiculares en pacientes afectados y la prevención de infecciones endodónticas persistentes asociadas (9).

## Materiales y métodos

La presente investigación es observacional - descriptiva, de tipo transversal, no experimental (17). Posterior a la obtención del consentimiento informado, se recolectaron muestras de conductos radiculares en 32 sujetos, adultos y adolescentes, que acudieron al área de endodoncia de la FOULA, sin instrumentación previa de los conductos y sin estar recibiendo tratamiento antibacteriano. Se les realizó aislamiento del campo con dique goma y clamps estériles, introduciendo secuencialmente 2 conos de papel estériles Nº 20 en el interior de cada conducto durante 60 segundos cada uno, según el procedimiento descrito en Liébana en el 2002 (18) y adaptado por los autores. Los conos de papel fueron colocados en microtubos de 1,5 mL (Eppendorf®) con medio RTF (19), y transportados al Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica “Roberto Gabaldón” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA. Las muestras fueron resuspendidas haciendo uso de un agitador mecánico y se procedió a realizar la tinción de Gram y el cultivo en Agar Sangre y Agar Bilis Esculina (HiMedia, India) a 37°C en microaerofilia por 24-48 horas.

Las colonias bacterianas aisladas fueron caracterizadas macroscópicamente, y confirmadas por coloración como cocos Gram positivos. Se aplicaron pruebas bioquímicas convencionales para identificación del género *Enterococcus*; y se utilizó el sistema de identificación rápida Strepto System 9R para determinar la especie, siguiendo las indicaciones señaladas por la casa comercial.

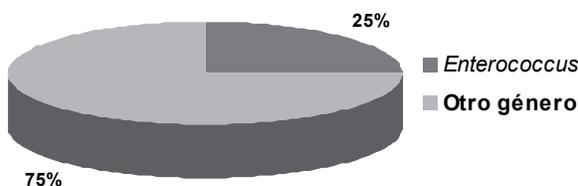
Las cepas identificadas como *Enterococcus faecalis* fueron resuspendidas en solución salina estéril hasta obtener una densidad equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc Farland y fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad por el método de Kirby Bauer de acuerdo a lo especificado por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico de las siglas en inglés CLSI

(20). Fueron ensayados: tetraciclina, ampicilina, eritromicina, ciprofloxacina y vancomicina. Se incubó a 37°C durante 18-24 horas y se midieron los diámetros del halo de inhibición, comparando los resultados con las tablas del CLSI.

## Resultados

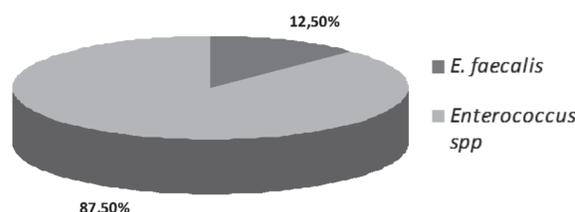
La literatura endodóntica señala la importancia de identificar correctamente a los microorganismos que invaden los canales radiculares y que participan en el desarrollo de lesiones inflamatorias, así como su perfil de susceptibilidad a agentes químicos selectivos. En la presente investigación se analizaron muestras de conductos radiculares de 32 individuos, con la finalidad de determinar la frecuencia de aislamiento de *Enterococcus faecalis* y evaluar la susceptibilidad de los aislados clínicos ante antibacterianos de uso común en odontología.

Bacterias del género *Enterococcus* fueron recuperadas de 8/32 (25%) de las muestras estudiadas (Figura 1).



**Figura 1.** Aislamiento de bacterias del género *Enterococcus* en las muestras de conductos radiculares

*E. faecalis* fue identificado por medio de las pruebas de identificación rápida Strep-to System 9R en 4 (12,5%) de las 32 muestras (Figura 2).



**Figura 2.** Identificación de *Enterococcus faecalis* en las muestras de conductos radiculares.

Las pruebas de susceptibilidad realizadas a las 4 cepas de *E. faecalis* demostraron que 2 (50%) fueron sensibles a la eritromicina y 2 (50%) presentaron sensibilidad intermedia a este antibacteriano. Tres de las cepas (75%) fueron sensibles a la ampicilina y 1 (25%) resistente. A la vancomicina 3 (75%) demostraron sensibilidad y 1 (25%) presentó sensibilidad intermedia. En cuanto a la ciprofloxacina y tetraciclina, se observó el mismo patrón frente a los dos antimicrobianos con 1 cepa sensible (25%), 1 cepa resistente (25%) y 2 de sensibilidad intermedia (50%) (Tabla 1).

Se observó que la cepa con resistencia ante ampicilina, ciprofloxacina y tetraciclina fue la misma que presentó sensibilidad intermedia a eritromicina y vancomicina (datos no mostrados)

## Discusión

En las últimas cinco décadas se ha demostrado que la presencia de microorganismos en los canales radiculares está relacionada con lesiones pulpares irreversibles y secuelas inflamatorias, agudas o crónicas, en los tejidos periapicales (21, 22, 23). Se ha logrado inferir que “la total eliminación de bacterias de los conductos radiculares es de crucial importancia para un exitoso tratamiento de conducto” (9). Debido a la especificidad y selectividad del medio ambiente pulpar, los microorganismos que se aíslan de allí, deben contar con mecanismos de

**Tabla 1.** Perfiles de susceptibilidad observados para las cepas de *E. faecalis* aisladas.

Antimicrobiano	Nº de cepas sensibles	Nº de cepas de sensibilidad intermedia	Nº de cepas resistentes	Total
Ampicilina	3	0	1	4
Eritromicina	2	2	0	4
Vancomicina	3	1	0	4
Tetraciclina	1	2	1	4
Ciprofloxacina	1	2	1	4

adaptación a las condiciones particulares. Las bacterias reportadas con más frecuencia son: *Prevotella* sp, *Veillonella* sp, *Fusobacterium* sp, *Peptostreptococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Porphyromonas* sp, *Eubacterium* sp, *Actinomyces* sp y *Streptococcus* sp, entre otros (8).

De las cepas aisladas en este estudio, se encontró una prevalencia de *Enterococcus* spp en 25%. Sin embargo, Chávez de Paz en el 2006 (9) hace referencia a un estudio realizado en el año 2004, en el cual se aislaron cocos y bacilos anaerobios facultativos Gram positivos en 87% de un total de 183 casos, y entre ellos se encontraban *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. Es importante destacar que debido a la gran variedad de especies que residen en la microbiota oral, se abre la posibilidad de que la microbiota bacteriana que afecta los canales radiculares sea igual de variable, es decir que los mecanismos de adaptación bacteriana individuales son exponencialmente aumentados en una comunidad bacteriana (9). El haber recuperado un porcentaje relativamente alto de *Enterococcus* spp, antes de iniciar el tratamiento endodóntico, nos sugiere la posibilidad de fracaso de la endodoncia a menos que se tomen las medidas necesarias de localización y preparación del conducto radicular, medicación intraconducto entre sesiones, correcta medicación del paciente en caso de requerirlo y buena obturación.

*Enterococcus faecalis*, fue identificado en el presente trabajo en 4/32 de las muestras (12,5%). Al respecto otros autores lo han recuperado con prevalencia de 4, 10 ó hasta 25% (1, 24, 25), porcentajes que sin distar considerablemente de lo observado en el presente estudio, podrían depender estas variaciones de las características propias de cada población estudiada y del número de individuos incluidos en cada uno. *E. faecalis* se ha descrito en infecciones del sistema de conductos radiculares asociadas con el fracaso del tratamiento (26-29). A pesar de ello, con un estudio en piezas dentales que no han sido instrumentadas previamente, hace considerar el posible origen de la infección que además de incluir contaminación de la muestra, puede ser por anacoresis o por la proximidad de otras lesiones como focos infecciosos potenciales. Técnicas más sensibles podrían refinar la detección de este microorganismo, tal como lo señalan estudios realizados por Pirani, Bertacci, Cavrini, Foschi, Acquaviva, Prati y Sambri en 2008 (30), quienes haciendo uso de Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real detectaron *E. faecalis* en 6 de 79 muestras con lesión endodóntica primaria (7.6%), y en 9 de 23 con lesión secundaria (39.1%). Aún cuando autores como Cogulu, Uzel, Oncag, Aksoy y Eronat en 2007 (31) señalan que no existe diferencia significati-

va en la identificación de *E. faecalis* por medio de cultivo en comparación con el uso de PCR.

En cuanto a las pruebas de susceptibilidad, Molander, Reit, Dahlen y Kvist en 1998 (32), señalan que los microorganismos anaerobios facultativos son más resistentes que los microorganismos anaerobios estrictos, por lo que persisten en el sistema de conductos radiculares luego de procedimientos endodónticos inadecuados. En ésta investigación no se encontraron cepas de *E. faecalis* resistentes a la vancomicina, lo cual es de gran interés epidemiológico, ya que podría indicar una baja diseminación de este tipo de cepas y garantizar una alternativa de tratamiento efectivo. Resultado similar fue reportado por Ronconi y Merino en el 2000 (33), quienes detectaron cepas de *E. faecalis* no resistentes a vancomicina; sin embargo observaron una alta resistencia a los aminoglucósidos. La aparición de VRE, como agentes causales de infecciones intrahospitalarias implica la aplicación de una cascada de costosas y laboriosas medidas de control de infección. El número de cepas de VRE se estima que irá en aumento debido probablemente al uso de vancomicina en el tratamiento de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) y por el mal uso de cefalosporinas, clindamicina y metronidazol (34).

Los antimicrobianos recomendados por la CLSI para *Enterococcus* sp son: ampicilina o penicilina y vancomicina. En cepas aisladas de muestras invasivas se deben probar también gentamicina y estreptomina. En el caso de cepas de VRE se deben hacer pruebas de susceptibilidad con cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina y rifampicina (32). En este estudio fueron ensayadas las 4 cepas identificadas con: ampicilina, vancomicina, eritromicina, tetraciclina y ciprofloxacina; demostrando susceptibilidades variables que permitieron caracterizarlas y generalizar las observaciones. Pinto en el 2002 (32), encontró que 5/47 cepas de *E. faecalis* ensayadas eran resistentes a ampicili-

na (23%), 2/47 a vancomicina (4,26%), 44/47 a eritromicina (93%) y 47/47 a ciprofloxacina (100%). Resultados con pocas semejanzas a los obtenidos en la presente investigación en donde 1/4 cepas resultaron resistentes a la ampicilina (25%), 0/4 a vancomicina, 0/4 a eritromicina y 1/4 a ciprofloxacina (25%), diferencia que puede deberse a la cantidad de cepas ensayadas; igualmente demuestra la persistencia de sensibilidad en estos microorganismos por la ampicilina y la vancomicina, aún cuando en una de las cepas de nuestro estudio su perfil de susceptibilidad hace pensar en la necesidad de utilizar los antibióticos evaluados a dosis posiblemente tóxicas o en combinación sinérgica, lo cual se habría desconocido de no haberse realizado el antibiograma respectivo. Muchos de estos antibióticos son utilizados de forma empírica en el área odontológica, por lo cual se debe concienciar a estos profesionales en el adecuado uso de los antibacterianos, considerando que la microbiota bacteriana que puede infectar los canales radiculares necesita especial vigilancia para eliminarla y prevenir complicaciones. No obstante, en infecciones endodónticas se debe conocer la susceptibilidad ante agentes químicos selectivos de las bacterias involucradas, y manejar adecuadamente la dosificación de los fármacos empleados para controlar la infección del canal radicular.

## Conclusiones

El identificar *Enterococcus* spp en 8/32 (25%) y particularmente *E. faecalis* en 4/32 (12,5%) de las muestras, nos lleva a reflexionar acerca de la importancia de estos patógenos en cavidad bucal y en su transmisión como patógeno nosocomial en la atención odontológica, para así tomar las medidas necesarias para su combate y evitar la diseminación del mismo, asegurando un tratamiento óptimo que llene las expectativas de los pacientes y haciendo

siempre uso de una herramienta de laboratorio, tan valiosa, como resulta el antibiograma y de esta manera elegir la terapia adecuada. Se recomienda fomentar la utilización de antibacterianos siguiendo una política de restricción, rotación, diversificación y siempre en respuesta a lo observado en el antibiograma. A pesar de los resultados obtenidos, se considera apropiado ampliar el número de muestras analizadas.

## Referencias

1. Pardi G, Guilarte C, Cardozo E, Briceño E. Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. *Acta Odontol Venez*. 2009;47(1):110-121.
2. Sherris J. Microbiología médica. Introducción a las enfermedades infecciosas. Barcelona-España: Editorial Doyma; 1993.
3. Levinson W. Microbiología e inmunología médica. 8ª ed. Ciudad de México-México: Editorial McGraw Hill; 2006.
4. Nolte W. Microbiología odontológica. Ciudad de México-México: Editorial Panamericana; 1974.
5. Rojas N, Chaves E, García F. Microbiología: bacteriología diagnóstica. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica; 2006.
6. Moellering R. Género *Enterococcus*, *Streptococcus bovis* y género *Leuconostoc*. En Mandell, G, Douglas R, Bennet, J. Enfermedades infecciosas: Principios y práctica 6ª ed. Madrid-España: editorial Elsevier; 2006.
7. Centiyaka Y, Falk P, Mayhall G. Vancomycin-resistant enterococci. *CMR* 2000 13(4):687-707.
8. Merino. R, Guilarte. C, Pardi. G. Actualización taxonómica de la microbiota implicada en infecciones endodónticas. *Acta Odontol Venez* 2007; 43: 327-329.
9. Chávez de Paz L. Microbiología endodóntica: últimos avances. *Visión Dental* 2006; 9(3):79-96.
10. Soares I, Goldberg F. Endodoncia: técnicas y fundamentos. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2002.
11. Peculienė V, Balculienė I, Eriksen H, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in lithuanian population. *J Endod* 2000; 26(10): 593-595.
12. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 1ª ed. Madrid-España: Editorial Panamericana; 2009.
13. Siqueira J, Rocas I. Polymerase chain-reaction based of microorganism associated with failed endodontic treatment. *OSOMOPORE* 2004; 97(1):85-94.
14. Stuart C, Shwartz S, Beeson T, Owan, C. *Enterococcus faecalis*: it's role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment *J Endod* 2006; 32(2): 93-98.
15. Estrela C, Pimenta F, Ito I, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod* 1999.; 25(6):416-418.
16. Fabricius L, Dahlen G, Holm S, Möller A. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Eur J Oral Sci* 1982; 90(3):200-206.
17. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 3ª ed. Ciudad de México-México: Editorial McGraw-Hill; 1998.
18. Liébana J. Microbiología oral. 2ª ed. Madrid-España: Editorial Interamericana-McGraw Hill; 2002.
19. Syed S, Loesche W. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Aptl Microbiol* 1972; 24(4):638-644.
20. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement 2011; 31(1):84-87.
21. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20:340-349.
22. Möller A. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies*. *Odontol Tidskr* 1966; 74:1-380.

23. Sundqvist G. Microbiología endodontológica. en Guldener P. & Langeland, K. Endodoncia. Diagnóstico y tratamiento. Ciudad de México-México: Editorial Springer y Cuellar 1995;81-83.
24. Gómez B, Pinheiro E, Gadeneto C, Sousa E, Ferraz C, Zaia A. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:71-76.
25. Lana M, Ribeiro-Sobrinho A, Stehling R, Garcia G, Silva B, Hamdan J. Microorganism isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16: 100-105.
26. Siqueira J, Rô as I. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 2. Redefining the Endodontic Microbiota. *J Endod* 2005; 31:488-498.
27. Pinheiro E, Gómez B, Ferraz C, Teixeira F, Zaia A, Sousa-filho F. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100-103.
28. Peculienė V, Reynaud A, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *J Endod* 2001; 34:429-434.
29. Sundqvist G, Fidgor D, Sjögren U. Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998; 85:86-93.
30. Pirani Ch, Bertacci A, Cavrini F, Foschi F, Acquaviva GL, Prati C, Sambri V. Recovery of *Enterococcus faecalis* in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. *New Microbiol* 2008; 31, 235-240,
31. Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Aksoy SC, Eronat C. Detection of *Enterococcus faecalis* in Necrotic Teeth Root Canals by Culture and Polymerase Chain Reaction Methods. *Eur J Dent* 2007;1(4): 216–221.
32. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *J Endod* 1998; 31:1-7.
33. Ronconi M, Merino L. Prevalencia de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos en las ciudades de Resistencia y Corrientes, República Argentina. *EIMC* 2000;18(2): 71-73.
34. Pinto M. Resistencia antimicrobiana en Chile hoy. *Rev Chil Infectol* 2002;19: 213-218.