

# Identificación molecular y asociación causal de microorganismos presentes en lesiones periapicales refractarias al tratamiento endodóncico

Molecular identification and causal association of microorganisms present in refractory periapical lesions to endodontic treatment

Recibido: 2015/12/02. Aceptado: 2016/01/20. Publicado: 2016/03/01

**María Elisa Galárraga Vinuesa**<sup>1</sup>  
**Valeri Paredes**<sup>2</sup>  
**Gabriela Vasco**<sup>3</sup>  
**Johanna Monar**<sup>4</sup>  
**Gabriel Trueba**<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias de la Salud, Escuela de Odontología, Clínica Odontológica, Campus Cumbayá, oficina CO 106, casilla postal 17-1200-841. Quito-Ecuador.  
Correo electrónico: [mariaelisa\\_galarraga@hotmail.com](mailto:mariaelisa_galarraga@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias de la Salud, Escuela de Odontología, Clínica Odontológica, Campus Cumbayá, oficina CO 106, casilla postal 17-1200-841. Quito-Ecuador.  
Correo electrónico: [valeripk@yahoo.com](mailto:valeripk@yahoo.com)

<sup>3</sup> Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias de la Salud, Escuela de Odontología, Clínica Odontológica, Campus Cumbayá, oficina CO 106, casilla postal 17-1200-841. Quito-Ecuador.  
Correo electrónico: [piavas\\_rc@hotmail.com](mailto:piavas_rc@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias de la Salud, Escuela de Odontología, Clínica Odontológica, Campus Cumbayá, oficina CC 100, casilla postal 17-1200-841. Quito-Ecuador.  
Correo electrónico: [jmonar@usfq.edu.ec](mailto:jmonar@usfq.edu.ec)

<sup>5</sup> Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias de la Salud, Escuela de Odontología, Clínica Odontológica, Campus Cumbayá, oficina NP 109, casilla postal 17-1200-841. Quito-Ecuador.  
Correo electrónico: [gtrueba@usfq.edu.ec](mailto:gtrueba@usfq.edu.ec)





## Resumen

La periodontitis apical refractaria es una lesión periapical persistente en los tejidos perirradiculares de una pieza dental tratada con endodoncia. El origen infeccioso de la persistencia de las lesiones periapicales es un tema controversial y desafiante en odontología. El punto de vista tradicional sobre este tema defiende la escasa presencia o ausencia de microorganismos en los tejidos. Sin embargo, existe evidencia de la presencia de bacterias, levaduras y virus en dichas lesiones. El objetivo de esta investigación es realizar un estudio de casos y controles para comprobar la presencia de microorganismos viables en las lesiones y asociar esta presencia a la causalidad de las mismas. Utilizando microscopía y métodos moleculares se pudo comprobar la presencia de microorganismos en 16 (80%) de 20 muestras de casos de lesión persistente (OR: 136, IC 95%: 14-317) y en 1 (3%) de 35 muestras de tejido sano (OR: 0,074, IC 95%: 0,0008-0,071), de esta manera asociando a los microorganismos identificados como un factor causal de la fisiopatología de la periodontitis apical refractaria.

**Palabras clave:** Reacción en cadena de la polimerasa, tecnología molecular, gen 16 S, periodontitis, microbiología endodóntica, periodontitis periapical refractaria, infección perirradicular.

## Abstract

Refractory apical periodontitis is a periradicular infection which persists in periapical tissues even though root canal treatment is performed. The infectious origin of persistent periradicular disease is controversial and an important challenge in dentistry. The traditional point of view regarding this theme defends that diseased tissues should be free from microorganisms or sparsely populated by them. However, there is evidence of presence of bacteria, viruses and fungi in periapical tissues of refractory cases. The aim of this investigation is to perform a case and control study to corroborate the presence of viable microorganisms and associate this presence as a causal factor. Through microscopy and molecular methods, this investigation was able to evidence the presence of microorganisms in 16 (80%) of 20 samples from refractory cases (OR: 136, IC 95%: 14-317) and in 1 (3%) of 35 samples corresponding to the control group (OR: 0,074, IC 95%: 0,0008-0.071). The results obtained in this study can associate the identified microorganisms as a causal factor of persistent apical periodontitis.

**Key words:** Polymerase chain reaction (PCR), molecular technology, 16 S rRNA genes, endodontic microbiology, periradicular infection, refractory apical periodontitis.

## Introducción

La periodontitis periapical es una infección de alta prevalencia en el ser humano, los estudios indican que alrededor del 20% de casos con lesión periapical previa al tratamiento son persistentes o refractarios a la endodoncia. Esto señala que la presencia de periodontitis periapical antes de realizar la endodoncia es un factor de riesgo para el fracaso del tratamiento y la persistencia de la lesión. El proceso periapical empieza cuando la pulpa dental es invadida por microorganismos y consecuentemente se producen una serie de cambios fisiológicos y respuestas adaptativas en el cuerpo humano. Seguidamente a la respuesta inflamatoria causada por la invasión de microbiota, se forma tejido de granulación a nivel apical de la raíz que esta infiltrado por neutrófilos, linfocitos y macrófagos los cuales actúan para combatir las bacterias causantes de la inflamación y posteriormente de la infección periapical. Cabe recalcar que la meta de una terapia endodóncica es eliminar todos los microorganismos que se encuentran dentro de los conductos radiculares, sin embargo, en ciertos casos las lesiones refractarias se manifiestan y no ocurre la regeneración de los tejidos perirradiculares después de un tiempo considerable de haber tratado al diente. El fracaso de la terapia endodóncica convencional se atribuye a varios factores siendo uno de ellos la colonización de microorganismos en los tejidos periapicales, en el que estos microorganismos tienen la facultad de adaptarse de tal manera que se vuelven resistentes al tratamiento endodóncico, por lo que la lesión se hace persistente y no cede <sup>2</sup>. Sin embargo, este es un tema de gran controversia en endodoncia ya que muchas teorías afirman que en la mayoría de casos los tejidos perirradiculares con lesión están libres de microorganismos y que por lo tanto la presencia de microbiota no debe ser considerada como uno de los principales factores causales de la persistencia de la lesión <sup>3</sup>. Es importante tomar en cuenta que al no ceder la lesión periapical con

el tratamiento endodóncico conservador se remite la pieza dental afectada a cirugía periapical el cual es el tratamiento indicado para eliminar el factor etiológico causante de la de la lesión refractaria <sup>4,5</sup>. En el momento de realizar la cirugía perirradicular se puede tomar una muestra del tejido enfermo con el fin de realizar un análisis molecular y poder verificar la presencia y qué tipo de microorganismos son los causantes de la persistencia de la enfermedad. A pesar de que el punto de vista tradicional establece que los tejidos perirradiculares no deben estar invadidos por microorganismos, se ha reportado en investigaciones previas la presencia de virus, levaduras y bacterias principalmente anaerobias Gram positivas en este tipo de lesiones <sup>6</sup>.

El objetivo de este estudio fue comprobar la presencia e identificar el tipo de microorganismos en las lesiones periapicales refractarias al tratamiento endodóncico que han sido resecaadas en cirugías perirradiculares realizadas de marzo a octubre del 2014 en Quito-Ecuador por medio de tinción Gram y análisis molecular de ADN bacteriano extraído de las muestras tomadas de tejido.

## Método

Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito. Los participantes fueron explicados sobre los procedimientos y aceptaron el consentimiento informado para poder formar parte del estudio.

Participaron 55 pacientes, el grupo experimental estuvo conformado por 20 pacientes que presentaron periodontitis periapical refractaria al tratamiento endodóncico y el grupo control estuvo conformado por 35 pacientes que fueron sometidos a extracción de piezas saludables.

En el grupo experimental fueron incluidos pacientes tanto sintomáticos como asintomáticos remitidos a cirugía perirradicular que presentaron periodontitis periapical refractaria. Se excluyó del



**Imagen 1.** Radiografía periodontitis periapical refractaria en piezas dentales 21 y 22 con retratamiento endodóncico.

estudio las piezas dentales con lesión periapical que presentaron: caries, fracturas, restauraciones inadecuadas, bolsas periodontales, extrusión de materiales en apical y tratamientos endodóncicos mal realizados. El grupo control incluyó pacientes remitidos a extracción de piezas dentales superiores que estén sin ninguna alteración, es decir completamente saludables. Se excluyó en el grupo control las piezas dentales que presenten: caries, fracturas, bolsas periodontales, restauraciones defectuosas y tratamientos de conducto. También se excluyó las piezas dentales inferiores por la contaminación de las mismas con el medio oral como la saliva al momento de tomar la muestra. En el grupo experimental y control se incluyó a todos los pacientes que tomaron antibiótico previamente a la cirugía sin embargo se excluyó a pacientes con alteraciones inmunológicas y diabetes.

Se tomó las muestras siguiendo los siguientes protocolos:

**Protocolo Pre-quirúrgico para grupo control y experimental:**

Los pacientes realizaron un enjuague oral antes del procedimiento quirúrgico con gluconato de clorhexidina al 0,12% y posteriormente se realizó la limpieza de la zona quirúrgica antes de la incisión con una gaza estéril con gluconato de clorhexidina 0,2%.

**Protocolo quirúrgico para grupo experimental:**

Se anestesió la zona involucrada de forma regional e infiltrativa, se realizó las incisiones correspondientes de acuerdo al diseño del colgajo indicado. Posteriormente se levantó el colgajo muco-periostico cuidadosamente para que no se contamine el campo quirúrgico con saliva y los microorganismos del medio oral. Al exponerse la lesión periapical se tomó todas las precauciones para evitar la contaminación del tejido, se utilizó succión de alta potencia y se evitó contacto de la lengua y labios del paciente con el área quirúrgica. Se tomó la muestra de la lesión periapical con una cureta estéril y se colocó la misma en un tubo (estéril) con solución de etanol al 70% (grado molecular). Se conservó las muestras tomadas a -20 grados Celsius. Después se procedió a la resección del ápice afectado y a la remoción de la lesión periapical por medio de curetaje. Simultáneamente a la remoción del tejido infectado se realizó un hisopado de la lesión, con el que se hizo un frotis en un porta-objetos el cual fue fijado con calor para la posterior tinción. Finalmente, se retrobturó el ápice resecaado con MTA y se reposicionó el colgajo por medio de puntos simples de sutura.

**Protocolo quirúrgico para el grupo control:**

se evitó la contaminación de la muestra de la misma forma que se describió anteriormente, se realizó el hisopado del alveolo para el frotis y se tomó la muestra del tejido sano que rodea a la raíz del diente que fue extraído, se colocó la muestra de tejido en un tubo (estéril) con solución de etanol al 70% (grado molecular) y se conservaron las muestras a la a -20 grados Celsius de la misma forma.

### Protocolo postquirúrgico para grupo control y experimental:

Se realizó la tinción Gram del frotis de cada muestra y se procedió a la extracción de ácidos nucleicos (ADN) contenidos en la muestra de tejido por medio de la técnica CTAB. Se realizó la cuantificación de ácidos nucleicos y se realizó el PCR (Polymerase Chain reaction) para la amplificación de b-Actina, gen 16 S (ADN bacteriano) y genes específicos de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*. El volumen para todas las reacciones de PCR fue 25µl las cuales se colocaron en el termociclador Biorad 100 según sus condiciones. La Tabla 1, 2 y 3 presenta los primers utilizados y las condiciones de PCR aplicadas.

**Selección de Microorganismos:** la selección de los microorganismos para ser identificados en este estudio se basó en los siguientes criterios: Factores de virulencia y patogenicidad que presenta el microorganismo, número de estudios que asocian al microorganismo con la persistencia de la periodontitis apical y el fracaso endodóncico y el porcentaje del microorganismo encontrado en los estudios realizados.

**Electroforesis:** Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con buffer 1X TBE y 0,5mg/mL de bromuro de etidio para ser fotografiados en un fotodocumentador de luz UV y posteriormente



**Imagen 2.** Remoción de lesión periapical durante cirugía

visualizar las bandas.

**Microscopía:** Se observó con el microscopio la tinción Gram de los porta-objetos pertenecientes a cada muestra, se dividió cada muestra en 50 campos de observación y se realizó un conteo de la presencia de microorganismos en cada campo. El conteo se realizó en base a los siguientes parámetros: Presencia de Microorganismos: Cocos Gram +, Cocos Gram -, Bacilos Gram +, Bacilos Gram -, Levaduras o en caso ausencia de microorganismos en todos los campos.

Primer Pair o Microorganismo	Secuencia (5' a 3')	Amplicón (bp)	Temp. Annealing (°C)
<b>Beta Actina</b>	F: CGG AAC CGC TCA TTG CC R: ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA	297	45
<b>16S Universal<sup>a</sup> (Bacteriano)</b>	27F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 1429R: GGT TAC CTT GTT ACG ACTT	1,500	57
<b><i>Candida albicans</i><sup>a</sup></b>	F: GCC GGT GAC GAC GCT CCA AGA GCT G R: CCG TGT TCA ATT GGG TAT CTC AAG GTC	158	59
<b><i>Enterococcus faecalis</i><sup>b</sup></b>	F: GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG R: CCG TCA GGG GAC GTT CAG	310	59

**Tabla 1.** Primers utilizados para identificar ADN de microorganismos seleccionados en el estudio.

<sup>a</sup> Primers utilizados en el estudio de Siqueira y Rocas 7

<sup>b</sup> Primers utilizados en el estudio de Fouad y col. 8,9.

Reactivos Beta actina	PCR beta actina	Reactivos 16 s	PCR 16s
<b>Concentración</b>	Volumen 1 rxn (25 µl)	<b>Concentración</b>	Volumen 1 rxn (25 µl)
<b>H2O</b>	6,7 µl		12,88 µl
<b>Buffer Promega 1 X</b>	4 µl	Buffer Promega 1 X	2,5 µl
<b>MgCl2 1,5 mM</b>	1,2 µl	MgCl2 2,5 mM	2,2 µl
<b>dNTPs 0,2 mM</b>	2 µl	dNTPs 0,25 mM	1,5 µl
<b>Primer F 1 µM</b>	2 µl	Primer F 0,2 µM	0,4 µl
<b>Primer R 1 µM</b>	2 µl	Primer R 0,2 µM	0,4 µl
<b>Go Taq 0,50 U</b>	0,1 µl	Go taq 2,5 U	0,12 µl
<b>ADN</b>	7,5 µl		7,5 µl

**Tabla 2.** Reactivos y condiciones PCR beta-Actina y 16 S.

Análisis estadístico: Se analizaron los resultados entre los diferentes parámetros clínicos involucrados y la frecuencia de microorganismos presentes en las muestras por medio de asociaciones con el análisis OR (odds ratio), Prueba T y Prueba exacta de Fisher.  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Los programas de estadística utilizados fueron Epiinfo y SPSS.

## Resultados

De los 20 pacientes con enfermedad, 16 (80%) fueron de género femenino y 4 (20%) fueron de género masculino. En cuanto a la presencia de síntomas como consecuencia de la periodontitis

periapical refractaria, 6 (30%) de ellos fueron sintomáticos y 14 (70%) fueron asintomáticos. Los 20 (100%) pacientes de este grupo recibieron sultamicilina antes de la cirugía periapical, de los cuales 6 (30%) la tomaron de forma profiláctica y 14 (70%) recibió una dosis por un tiempo igual o mayor a 24 horas previa a la cirugía.

De los 35 pacientes correspondientes al grupo control, 18 (51,4%) fueron de género femenino y 17 (48,6%) fueron de género masculino. En este grupo ningún paciente presentó síntomas previos a la extracción de la pieza dental ya que se trataba de piezas totalmente sanas sin ninguna alteración. En cuanto a la administración de sultamicilina como antibiótico previo a la

Reactivos <i>C. albicans</i>	PCR <i>C. albicans</i>	Reactivos <i>E. faecalis</i>	PCR <i>E. faecalis</i>
<b>Concentración</b>	Volumen 1 rxn (25 µl)	<b>Concentración</b>	Volumen 1 rxn (25 µl)
<b>H2O</b>	7,25 µl		9,3 µl
<b>Buffer Promega1 X</b>	5 µl	Buffer Promega 1 X	5 µl
<b>MgCl2 2.5 mM</b>	1,5 µl	MgCl2 2,5 mM	1,5 µl
<b>dNTPs 0.2 mM</b>	2,5 µl	dNTPs 0,2 mM	2,5 µl
<b>Primer F 0.2 µM</b>	0,5 µl	Primer F 0,2 µM	0,8 µl
<b>Primer R 0.2 µM</b>	0,5 µl	Primer R 0,2 µM	0,8 µl
<b>Go Taq 1.25U</b>	0,25 µl	Go taq 1,25 U	0,125 µl
<b>ADN</b>	7,5 µl		5 µl

**Tabla 3.** Reactivos y condiciones PCR *C. albicans* y *E. faecalis*.

extracción, 6 (17,1%) no recibió ninguna dosis, 17 (48,5%) recibió profilaxis antibiótica y 12 (34%) recibió una dosis por un tiempo igual o mayor a 24 horas.

La observación microscópica de la tinción Gram de 50 campos por muestra, es decir 1000 campos en el grupo experimental y 1750 campos en el grupo control dio los siguientes resultados: En las muestras de tejidos con periodontitis periapical refractaria se observó presencia de microorganismos en 539 campos de 1000 es decir el 54%, de los cuales 104 campos (10%) revelaron la presencia de cocos Gram -, 504 campos (50%) de cocos Gram +, 5 campos (1%) de bacilos Gram -, 129 campos (13%) de bacilos Gram + y un campo (0,1%) de levaduras. De las 20 muestras observadas pertenecientes a este grupo (tabla 4), 16 (80%) reveló presencia de microorganismos en la tinción, mientras que 4 (20%) no presentó evidencia de ningún microorganismo. La presencia de cocos Gram + fue observada en 16 muestras lo que equivale al (80%), se encontraron cocos Gram - en 14 de las muestras (70%), bacilos Gram - en 3 (15%) de las muestras, bacilos Gram + en 13 (65%) de las muestras y levaduras en 1 (5%) de las muestras. Por otro lado, en las muestras de tejido sano pertenecientes al grupo control, se observó la presencia de microorganismos en 4 campos de 1750 es decir el 0,23%, de los cuales 3 campos (0,3%) mostraron la presencia de coco Gram + y 1 campo (0,1%) de cocos Gram -. De las 35 muestras observadas pertenecientes a este grupo, solo la muestra SPE31 reveló presencia de microorganismos, es decir 1 de 35 lo que equivale al 3% (Las imágenes 3, 4 y 5 revelan la comparación entre presencia y ausencia de microorganismos del grupo experimental y control).

### Análisis Molecular

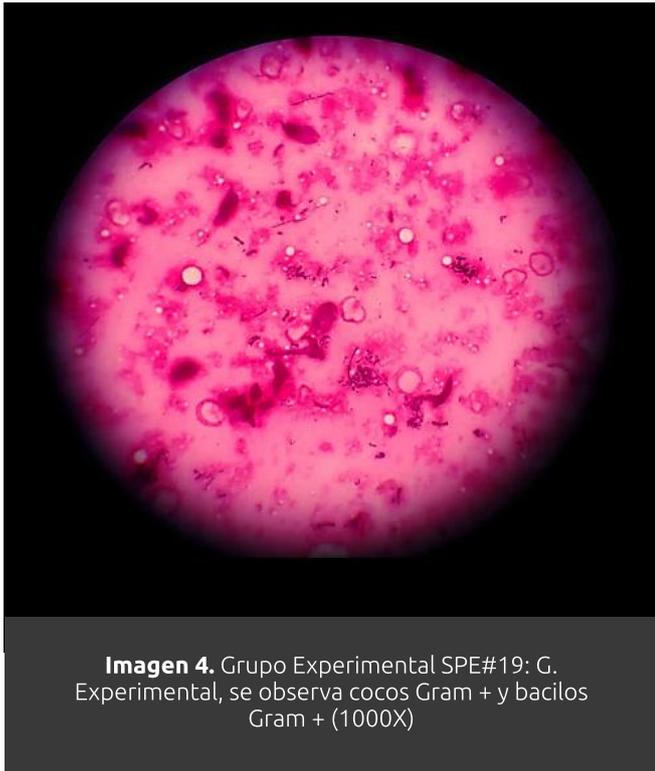
En el análisis molecular del ADN, en 55 muestras recolectadas se realizó la amplificación de beta-Actina para corroborar la presencia de ADN en los tejidos tanto sanos como enfermos, el 100% de



**Imagen 3.** G. Control, SPE#30, se observa ausencia de microbiota en campo microscópico (1000X)

las muestras dieron como resultado beta-Actina positivo en la electroforesis. Consiguientemente se realizó el PCR para la amplificación del gen 16s el cual determina la presencia de ADN bacteriano en los tejidos. En el grupo experimental 16 (80%) de las muestras SPE1, SPE2, SPE3, SPE4, SPE5, SPE6, SPE8, SPE9, SPE10, SPE11, SPE12, SPE14, SPE16, SPE18, SPE19 Y SPE20 dieron positivo mientras que en el grupo control una muestra SPE31 (3%) dio positivo para esta amplificación.

Se realizó posteriormente el PCR para la amplificación del gen correspondiente a la bacteria *Enterococcus faecalis* en todas las muestras que dieron positivo en el 16s, de las cuales SPE2, SPE 9 y SPE12 es decir 3 muestras o el 15% correspondientes al grupo experimental dieron positivo. La única muestra que dio positivo para el 16s del grupo control SPE31 dio resultado negativo para la amplificación del gen de esta bacteria. Se procedió después a realizar el PCR para la amplificación del gen perteneciente a *Candida albicans* en las 55 muestras de tejidos sanos y enfermos. En el grupo experimental, las 4 muestras SPE5, SPE11, SPE12 Y SPE16 o 20% dieron positivo para esta amplificación mientras



que en el grupo control 0% de las muestras presentaron resultados positivos para *Candida albicans*.

En cuanto al número de tipo de microorganismos identificados en cada muestra. En el grupo experimental se estableció que 4 (20%) correspondiente a las muestras SPE7, SPE13, SPE15 y SPE17 no presentó microbiota, 4 o 20% correspondientes a las muestras SPE2, SPE9, SPE18 y SPE20 presentó dos tipos de microorganismos, 8 o 40% de las muestras SPE1, SPE3, SPE4, SPE5, SPE6, SPE8, SPE10 y SPE19 presentó 3 tipos de microorganismos, 2 o 10% correspondiente a las muestras SPE12 y SPE14 presentó 4 tipos de microorganismos y 2 o 10% de las muestras SPE11 y SPE16 reveló 5 tipos de microorganismos. Por otro lado, el grupo control presentó en una única muestra (3%) correspondiente a SPE31, 2 tipos de microorganismos.

Los resultados obtenidos en base al análisis OR fueron los siguientes: se determinó que la presencia bacteriana en los tejidos perirradiculares aumenta la probabilidad o riesgo en 136 veces de desarrollar la persistencia de la

lesión perirradicular ( $p < 0,05$ ) (OR=136) (IC95%=14,6-317), siendo estadísticamente significativo. En cuanto al OR de microorganismos específicos asociados a la persistencia de la lesión se estableció que la presencia de *C. albicans* en los tejidos aumenta en 19,36 veces la probabilidad ( $p < 0,05$ ) (OR=19,36), la presencia de *E. faecalis* aumenta en 14,22 veces la probabilidad de desarrollar la misma enfermedad ( $p = 0,043$ ) (OR=14,22), consiguientemente la presencia de cocos Gram + incrementa en 136 la probabilidad ( $p < 0,05$ ) (OR=136), de cocos Gram - aumenta la probabilidad en 79 veces ( $p < 0,05$ ) (OR=79), de bacilos Gram + aumenta la probabilidad en 127,8 veces ( $p < 0,05$ ) (OR=127,8) y de bacilos Gram - incrementa en 14,22 veces la probabilidad ( $P = 0,043$ ) (OR=14,22) de desarrollar la periodontitis perirradicular refractaria. Siendo  $P < 0,05$  en todos los casos mencionados, hace que sean estadísticamente significativos. Se asoció también que la probabilidad de que los tejidos sanos presenten microorganismos es de 0,0074 veces ( $p < 0,05$ ) (OR=0,0074) (IC95%=0,0008-0,0712) lo cual también es estadísticamente significativo. Adicionalmente, se realizó el análisis OR para asociar la presencia bacteriana en pacientes sintomáticos del grupo experimental. Se determinó que la presencia bacteriana determinada por el 16 S positivo en los tejidos perirradiculares aumenta la probabilidad en 2 veces para que los pacientes presenten síntomas ( $p = 0,51$ ) (OR=2), lo cual no fue estadísticamente significativo. Adicionalmente se realizó un análisis OR para la asociación de los microorganismos identificados con la manifestación de síntomas en los pacientes. La presencia de *C. albicans* aumentó en 0,733 veces la probabilidad ( $p = 0,65$ ) (OR=0,733) de presentar síntomas, de *E. faecalis* aumentó en 6.5 veces la probabilidad ( $p = 0,201$ ) (OR=6,5) para desarrollar síntomas, de cocos Gram + aumentó en 1,36 veces la probabilidad ( $p = 0,657$ ) (OR=1,36), de cocos Gram - aumentó en 0,27 veces la probabilidad ( $p = 0,225$ ) (OR=0,27), de bacilos Gram + aumentó en 1,11 veces la probabilidad ( $p = 0,66$ ) (OR=1,11) y de

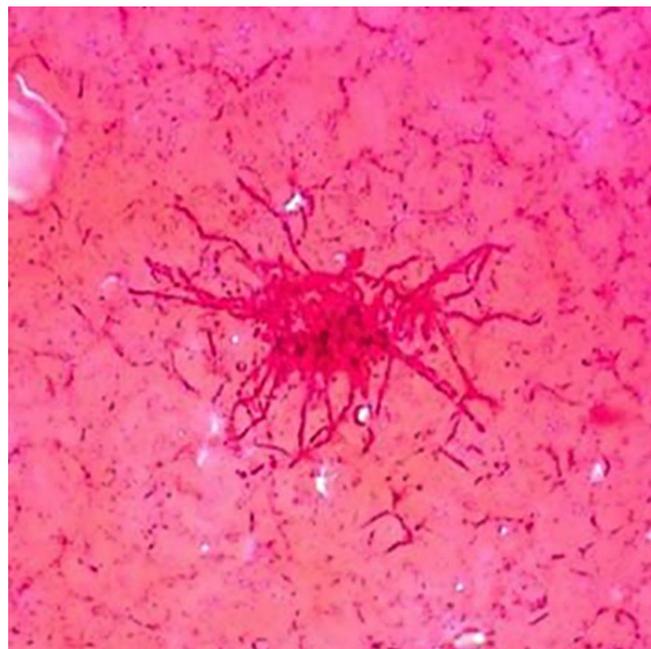
bacilos Gram – aumentó en 1,2 veces la probabilidad ( $p=0,68$ ) ( $OR=1,2$ ). De los valores de  $p$  mencionados todos fueron mayores a 0,05 por lo que no fueron estadísticamente significativos. Se asoció de la misma manera la presencia bacteriana con la dosis antibiótica que recibieron los pacientes previamente a la intervención quirúrgica. En este análisis se determinó que los pacientes con profilaxis antibiótica presentan 1,36 veces más probabilidad de presentar microorganismos en los tejidos perirradiculares enfermos que los pacientes que recibieron una dosis igual o mayor a 24 horas, sin embargo ( $P=0,65$ ) ( $OR=1,36$ ) por lo que esta asociación no fue estadísticamente significativa.

Se calculó la media de tipo de microorganismos identificados en entre las muestras de tejido enfermo y sano. El promedio en tejidos sanos fue 2,5 y en tejido sano fue 0,057 lo cual analizado con la prueba T presentó ( $P=0,000001$ ) siendo estadísticamente significativo. Se calculó también la media de tipo de microorganismos entre las muestras de pacientes asintomáticos y sintomático, la cual fue 2,53 y 2,47 respectivamente.  $P=0,7$  por lo que no fue estadísticamente significativo.

Además, se calculó la sensibilidad especificidad de los métodos realizados en este estudio para identificar la presencia de microbiota, en cuanto a la presencia bacteriana reconocida en la tinción Gram y en el análisis molecular por medio de PCR, se estableció una sensibilidad de 80% y especificidad del 97%. Por otro lado, al comparar la identificación de levaduras por medio de la tinción Gram y el análisis molecular de *C. albicans* se estableció 5% de sensibilidad y 100% de especificidad.

## Discusión

En el presente estudio se tomaron 55 muestras divididas en 20 de tejido con lesión periapical persistente y 35 de tejidos sanos. Las muestras fueron sometidas a análisis molecular y tinción Gram para verificar presencia bacteriana y de



**Imagen 5.** Grupo Experimental SPE#11: se observa bacilos Gram - (1000X)

levaduras. Cabe recalcar que a pesar de la controversia existente sobre la presencia de microbiota en los tejidos perirradiculares y su asociación causal a la persistencia de la periodontitis apical, este estudio corrobora la presencia positiva de microorganismos en 16 de las 20 muestras es decir el (80%) de los tejidos periapicales con lesión de pacientes tanto sintomáticos como asintomáticos con dosis antibiótica previa. De la misma manera presenta en 4 muestras o (20%) la presencia de *C. albicans* y en 3 muestras (15%) la presencia de *E. faecalis*. La presencia de microorganismos en el 80% de las muestras se apoya en varios estudios similares que encontraron microorganismos, por ejemplo, el estudio de Stewart y Corteson que 35 de 36 muestras o (97%) presentaron microorganismos <sup>10</sup> en el estudio de Subramanian y Mickel 27 de 33 muestras o (81%) <sup>11</sup>, en el estudio de Sunde 34 de las 34 muestras o (100%) de lesiones asintomáticas <sup>12</sup> y en el estudio de Saber 7 de las 15 muestras o (54%) de lesiones sintomáticas y asintomáticas <sup>4</sup>. Adicionalmente, la identificación de *E. faecalis* en las lesiones periapicales refractarias es referida por otros estudios como el de Subramanian y Mickel <sup>11</sup> que reportó que *E.*

SPE#	Dosis Antibiótico	Síntomas	T. Gram	Cocos G +	Cocos G-	Bacilos G -	Bacilos G+	Levaduras	* M'	16 s	C. albicans	E. faecalis
SPE1	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	3	(+)	(-)	(-)
SPE2	profiláctica	si	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	(+)	(-)	(+)
SPE3	profiláctica	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	3	(+)	(-)	(-)
SPE4	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	3	(+)	(-)	(-)
SPE5	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	3	(+)	(+)	(-)
SPE6	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	3	(+)	(-)	(-)
SPE7	≥ 24h	si	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	(-)	(-)	(-)
SPE8	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	3	(+)	(-)	(-)
SPE9	≥ 24h	si	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	2	(+)	(-)	(+)
SPE10	≥ 24h	si	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	3	(+)	(-)	(-)
SPE11	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	5	(+)	(+)	(-)
SPE12	profiláctica	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	4	(+)	(+)	(+)
SPE13	profiláctica	no	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	(-)	(-)	(-)
SPE14	≥ 24h	no	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	4	(+)	(-)	(-)
SPE15	≥ 24h	no	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	(-)	(-)	(-)
SPE16	≥ 24h	si	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	5	(+)	(+)	(-)
SPE17	≥ 24h	no	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	(-)	(-)	(-)
SPE18	profiláctica	no	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	2	(+)	(-)	(-)
SPE19	profiláctica	No	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	3	(+)	(-)	(-)
SPE20	≥ 24h	Si	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	2	(+)	(-)	(-)
Porcentaje	≥ 24h = 70%(14)	si= 30% (6)	(+)=80% (16)	(+)=80% (16)	(+)=70% (14)	(+)=15% (3)	(+)=65% (13)	(+)=5% (1)		(+)=80% (16)	(+)=20% (4)	(+)=15% (3)
	prof =30% (6)	no=70% (14)	(-)=20% (4)	(-)=20% (4)	(-)= 30% (6)	(-)=85% (17)	(-)=35% (7)	(-)=95% (19)		(-)=20% (4)	(-)=80% (16)	(-)= 85% (17)

**Tabla 4.** Grupo Experimental: resultados y asociación de microorganismos presentes en tinción Gram y PCR  
 (+): resultado positivo, (-): resultado negativo, #M\*: número de microorganismos identificados)

Microorganismo	OR (Intervalo de confianza IC95%)	Prueba exacta de Fisher	Estadísticamente significativo P < 0.05
<i>C. albicans</i>	19,36	0,014	0,014 < 0.05 (+)
<i>E. faecalis</i>	14,22	0,043	0,043 < 0.05 (+)
Cocos Gram +	136 IC=14-317	0,0000000025	0,0000000025 < 0.05 (+)
Cocos Gram -	79 IC=8,7-720	0,000000115	0,000000115 < 0.05 (+)
Bacilos Gram +	127,8	0,000000053	0,000000053 < 0.05 (+)
Bacilos Gram -	14,22	0,043	0,0435 < 0.05 (+)

**Tabla 5.** Análisis OR: asociación de los microorganismos identificados como factor causal de la periodontitis periapical refractaria. + estadísticamente significativo.

*faecalis* fue la especie de mayor incidencia en las muestras con el 14,6%, también el estudio de Siqueira y Rocas <sup>7</sup> señaló a *E. faecalis* como el mayor responsable de la persistencia de la lesión periapical y fue identificado en 64% de las muestras. Igualmente, otros estudios reportan la presencia de esta bacteria como el de Socransky en el 75%, el de Stewart en el 64% <sup>10</sup> en el de Sunde en el 75% <sup>12</sup> y en el de Sedgley en el 74% de las muestras.

En cuanto a la presencia de *C. albicans*, esta especie también está identificada en varias investigaciones de lesiones periapicales refractarias. En el estudio de Zang y col. se manifiesta en 80% de las muestras, en el estudio de Sunde y col. <sup>13</sup> en el 75%, en el estudio de Socransky y col. en el 75% de las muestras, en el estudio de Peciulienė y col. en el 50% y en el 9% de las muestras en el estudio de Siqueira & Rocas <sup>7</sup>. A pesar de los estudios mencionados, otros como el de Baumgartner <sup>14</sup> y Waltimo y col. no encontraron presencia de esta levadura en las muestras de lesiones periapicales refractarias. Esto se contradice con el presente estudio en el que se identificó en el 20% de las muestras presencia de *C. albicans*. Aparte de lo mencionado, la presencia de *C. albicans* y *E. faecalis* en este tipo de lesión es referida por el estudio de Stewart y Corterton <sup>10</sup> que manifiesta que en 5 de 8 muestras de tejidos periapicales de

pacientes que recibieron antibiótico previo a la cirugía se identificaron *C. albicans*, *E. faecalis*, especies de *Pseudomonas* y *Estafilococos*. Esto hace referencia a la investigación presente ya que todas las muestras positivas tanto para *E. faecalis* como para *C. albicans* fueron tomadas de pacientes que recibieron antibiótico previo a la intervención quirúrgica. Además de las referencias que enfatizan y mencionan el rol de *C. albicans* y *E. faecalis* en la persistencia de la lesión periapical refractaria, es importante destacar que su presencia y resistencia se debe a sus factores de virulencia por lo que también fueron seleccionados para ser identificados en este estudio. También se presentó *E. faecalis* en 3 muestras de tejido con lesión a pesar de que los pacientes recibieron antibiótico y también se asoció esta especie con la presencia de bacilos Gram + en todas las muestras lo cual verifica su capacidad de coagregarse con otra microbiota <sup>15</sup>. Adicionalmente, una muestra del estudio correspondiente a tejido con lesión (SPE12) dio resultados positivos para *C. albicans* y *E. faecalis* en el análisis molecular y la tinción Gram reflejó la asociación de estos microorganismos con cocos Gram +, cocos Gram – y bacilos Gram + demostrando nuevamente la capacidad de coagregarse de las dos especies (tabla4).

Por otro lado, 4 o el 20% de muestras de tejido enfermo no amplificaron para el 16 S ni para el

gen de *C. albicans*, tampoco revelaron presencia de microorganismos en la tinción Gram lo cual puede deberse a que la persistencia de la lesión se haya provocado por otros factores que no involucren microorganismos en los tejidos periapicales. Estos como se mencionan anteriormente pueden ser por la presencia de cristales de colesterol en los tejidos apicales, por la presencia de un quiste verdadero o por la presencia microbiana dentro de los conductos obturados lo cual causa el fracaso del tratamiento endodóncico <sup>3</sup>. Siguiendo con el análisis de los resultados, al comparar la presencia de microorganismos entre las muestras de tejido sano y tejido enfermo se pudo establecer que la manifestación de microbiota en los tejidos perirradiculares lesionados es un factor causal de la enfermedad. Esto se revela en el análisis OR que asocia la presencia bacteriana y de *Candida albicans* en los tejidos enfermos con el incremento de riesgo para la persistencia de la lesión. Se estableció consiguientemente que la presencia bacteriana aumenta en 136 veces la probabilidad de desarrollar la periodontitis periapical refractaria. Además, la presencia bacteriana específica aumentó la probabilidad de desarrollar la enfermedad de la siguiente manera: *E. faecalis* en 14,22 veces, cocos Gram + en 136 veces, cocos Gram – en 79 veces, bacilos Gram + en 127,8 veces, bacilos Gram – en 14,22 veces y *C. albicans* que es una levadura en 19,36 veces. Como se detalló anteriormente en los resultados todas estas asociaciones fueron estadísticamente significativas ya que  $P < 0,05$ . Con lo mencionado anteriormente se puede establecer que la presencia de microorganismos en los tejidos perirradiculares es un factor de riesgo para la persistencia de la periodontitis periapical, esto involucra a los microorganismos encontrados en la fisiopatología de la enfermedad. En estudios similares no se comparó la presencia de microbiota entre tejidos sanos y enfermos, es decir no se tomó en cuenta un grupo control por lo que no se estableció la relación causal antes mencionada. En general los otros estudios establecen la frecuencia de

microorganismos encontrados, pero en los mismos se detalla que no se ha establecido el rol de la microbiota encontrada con la etiopatogenia de la enfermedad. Al ser uno de los objetivos de este estudio identificar la presencia de bacterias y levaduras en los tejidos enfermos para asociarla como un factor causal de la lesión, se optó por agregar el grupo control de tejidos sanos el cual da el parámetro de comparación para realizar el análisis OR y establecer el factor de riesgo de la enfermedad.

Al comparar las muestras de tejido sano con las de tejido enfermo también se consiguió verificar que el protocolo seguido a fin de evitar la contaminación de la muestra con la microbiota del medio oral fue correcto ya que 97% de las muestras de tejido sano no presentaron presencia de microorganismos tanto en la tinción Gram como en la identificación molecular con PCR. El 3% o 1 muestra de las 35 del grupo control reveló la presencia de microorganismos, esto de acuerdo a los otros resultados de la investigación se puede deducir que fue por un error en el momento de tomar la muestra en la que pudo contaminarse al tener contacto con saliva, dientes, lengua o mucosa del paciente.

Se hizo también un análisis sobre la toma de antibiótico previo a la cirugía, uno de los objetivos del estudio fue determinar si la dosis de antibiótico recibido ya sea profilaxis antibiótica o una dosis igual o mayor a 24 horas podría afectar la presencia e índice de microorganismos en las muestras. En 20 o 100% de las muestras de tejido enfermo los pacientes recibieron antibiótico antes de la cirugía, de las cuales 16 presentaron microorganismos. Se hizo un análisis de la dosis antibiótica frente a la presencia bacteriana y se determinó que la toma profiláctica de antibiótico tiene una probabilidad 1,36 veces mayor de presentar bacterias en las muestras de tejidos enfermos que la toma de antibiótico por un tiempo mayor o igual a 24 horas. Sin embargo, esta probabilidad no fue estadísticamente significativa. En varios estudios similares como el

de Saber y col., Signoretti y col., Fouad, entre otros <sup>2,4</sup> el criterio de exclusión de la muestra fueron pacientes que hayan recibido dosis antibiótica previa a la cirugía perirradicular), sin embargo el presente estudio incluyó pacientes con toma de antibiótico y como los resultados lo demuestran igual se pudo identificar presencia bacteriana en los tejidos enfermos de todos los pacientes que tomaron sultamicilina antes de la intervención. Estos resultados se ven apoyados en otros estudios semejantes que también incluyeron en las muestras pacientes con toma de antibiótico previa como el de Sunde <sup>12</sup> y el mencionado por Fouad lo cuales presentaron presencia de microbiota. Para determinar el número de microorganismos identificados en las muestras, se calculó también la media de tipos de microorganismos en los tejidos enfermos la cual fue 2,57. Este valor fue estadísticamente significativo con lo que se puede establecer que en las lesiones periapicales refractarias se presentó más de un tipo microorganismo y se observó de 2 a 5 tipos de microorganismos, pertenecientes a la familia de cocos Gram +, cocos Gram -, bacilos Gram +, bacilos Gram - y levaduras. De estos predominó la presencia de cocos Gram + en 80% de los casos, cocos Gram - en el 70%, bacilos Gram + en el 65%, bacilos Gram - en el 15% y *C. albicans* en 15% de los casos. De acuerdo a lo anterior, 40% de las muestras asoció 3 tipos de microorganismos, 20% presentó 2 tipos, 10% presentó 4 tipos y 10% reveló 5 tipos de microorganismos. Lo establecido anteriormente determina la naturaleza poli-microbiana de la lesión periapical refractaria lo cual tiene una gran relevancia clínica tanto en el tratamiento intraconducto como en el antibiótico. Se calculó también la media de microorganismos en pacientes asintomáticos y sintomáticos, las cuales fueron 2,53 y 2,47 respectivamente. Sin embargo, estos valores no fueron estadísticamente significativos ya que  $p > 0.05$ .

En cuanto a los pacientes sintomáticos, se realizó un análisis OR para establecer la asociación de los

microorganismos identificados con la presencia de síntomas. Todos los microorganismos aumentaron la probabilidad de presentar síntomas, sin embargo, ninguna de estas probabilidades fue estadísticamente significativa con lo que no se pudo establecer que la presencia de microbiota específica es un factor causal de síntomas.

Se analizó también la especificidad y sensibilidad de las técnicas utilizadas en este estudio para identificar los microorganismos, se relacionó la tinción Gram con el análisis molecular por medio de PCR y se estableció que la tinción Gram en cuanto a la presencia bacteriana presentó una sensibilidad de 80% lo cual demuestra la capacidad de la tinción Gram de identificar la presencia de bacterias en tejidos enfermos es decir los verdaderos positivos. La especificidad del 97% demuestra la capacidad de la técnica de identificar los tejidos sanos es decir los verdaderos negativos. Al ser los dos valores altos se puede decir que la validez de la tinción Gram frente al PCR es aceptada como prueba de identificación de bacterias. Por otro lado, al comparar la identificación de levaduras por medio de la tinción Gram con el análisis molecular de *C. albicans* se estableció 5% de sensibilidad y 100% de especificidad. Esto demuestra que la capacidad de la técnica de identificar levaduras en los tejidos enfermos fue baja es decir no identificó adecuadamente los verdaderos positivos. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica fue del 100% lo cual demuestra la alta capacidad de identificar los tejidos sanos sin presencia de levaduras es decir los verdaderos negativos. La sensibilidad tan baja en cuanto al reconocimiento de levaduras en los tejidos enfermos puede deberse a que el observador no identificó la presencia de este microorganismo en las muestras, como se conoce *C. albicans* es polimórfica lo cual hace que no sea tan fácil determinar una forma constante de la levadura. Esto hace que se pueda presentar de diversas maneras dificultando el reconocimiento de la misma en el estudio.

Con lo discutido anteriormente, a pesar de que en el año 1939 el investigador Kronfeld mencionó que “un granuloma no es un área donde las bacterias viven, sino un lugar en el que son destruidas”, en la actualidad las avanzadas técnicas moleculares han logrado identificar no solo un tipo de microorganismo sino varios en las lesiones refractarias con lo que se determina la naturaleza polimicrobiana de la persistencia de la lesión. Sin embargo, a pesar de los estudios que corroboran la presencia bacteriana en los tejidos enfermos y consecuentemente su capacidad de adaptación y de causar inflamación en los tejidos, varios autores se niegan a aceptar estos resultados sosteniendo su posición en que los estudios que muestran presencia de microorganismos no seleccionaron los casos adecuadamente, contaminaron las muestras con el medio oral, no se diferenciaron microorganismos viables con las técnicas moleculares y que ciertas bacterias pudieron ser trasladadas del interior de los conductos hacia los tejidos durante la intervención quirúrgica. Entre estos autores se destacan Iwy, Wasfy, Vigil, Abou-Rass, Bogen, Zuolo y Nair <sup>3,16</sup>. Nair publica en varios artículos su posición e incluso es citado por autores como Zuolo en su libro “Reintervención en Endodoncia” en el que destaca que Nair “considera válido aun el concepto de que generalmente las lesiones apicales no albergan bacterias en su interior” <sup>3,14</sup>. Se establece en esta posición que solo en las siguientes situaciones se puede encontrar presencia de microorganismos en los tejidos periapicales: contaminación de los tejidos perirradiculares por fístulas o bolsas periodontales, casos de exacerbaciones en las que el proceso crónico se agudiza presentando síntomas, por materiales extruidos en la región apical y por presencia de *Actinomyces* y *Propionibacterium* por su habilidad de adaptarse y colonizar los tejidos perirradiculares <sup>17</sup>. Con lo establecido según la posición de Nair <sup>16</sup> se enmarca aún más la controversia sobre este tema, en el que diversos autores y estudios tienen posiciones diferentes en cuanto a la

presencia de microorganismos en los tejidos perirradiculares y su rol fisiopatológico con la enfermedad. Por lo tanto, el presente estudio se realizó con los siguientes criterios para comprobar la presencia de microbiota en los tejidos periapicales y darle a esta una relación causal con la enfermedad:

- Se excluyó de las muestras piezas dentales con caries, fracturas, restauraciones inadecuadas, lesiones periodontales, materiales extruidos en la región apical y fístulas lo cual puede contaminar la muestra como lo establece Nair.
- Los pacientes realizaron enjuagues con gluconato de clorhexidina al 0.12% y también se realizó limpieza de la zona quirúrgica con la misma sustancia al 0,2% a fin de evitar la contaminación de la muestra con el medio oral como establecen otros autores que fue la falla en la toma de muestras.
- Se incluyó las muestras de pacientes tanto asintomáticos como sintomáticos a fin de comprobar que no hay presencia bacteriana solo en exacerbaciones o agudizaciones de la enfermedad.
- Se determinó la viabilidad de los microorganismos identificados con el PCR por medio de la tinción Gram la cual revela microorganismos vivos ya que conservan sus membranas celulares, esto se hizo a fin de contrarrestar la posición que las técnicas moleculares no pueden identificar entre el ADN de microorganismos vivos y muertos.
- Se identificó molecularmente microorganismos específicos como *C. albicans* y *E. faecalis* para comprobar que no solo especies como *Actinomyces* y *Propionibacterium* son lo suficientemente

patógenas para adaptarse y establecerse en un medio como los tejidos perirradiculares.

- Se incluyó en el estudio un grupo control de tejidos sanos con el objetivo de compararlos con los tejidos enfermos y establecer así que la presencia microbiana en estos tejidos es un factor de riesgo para el desarrollo y persistencia de la enfermedad.

## Conclusiones

En conclusión, con lo anteriormente expuesto se demuestra que a pesar de que todos los parámetros de Nair <sup>14,18</sup> fueron respetados y que se modificó el protocolo del estudio en base a las críticas de varios autores en la toma de muestra y proceso de las mismas, se reconoció la presencia de microorganismos en la mayoría de casos periapicales refractarios tanto sintomáticos como asintomáticos. Adicionalmente, se identificó la naturaleza polimicrobiana de esta infección y se estableció que la presencia de microbiota es un factor causal para la persistencia de la lesión. Cabe recalcar que varias investigaciones de autores como Saber, Signoretti, Siqueira, Wang entre muchos otros apoyan los resultados y análisis de este estudio <sup>1,2,4,7</sup>. La controversia sobre este tema seguramente continuará, sin embargo, más relevante que defender una posición es seguir con la investigación en este campo por medio de las nuevas técnicas moleculares las cuales nos presentaran un nuevo panorama sobre la verdadera microbiología relacionada a las infecciones de origen endodóncico.

## Referencias Bibliográficas

1. Fouad A. Endodontic Microbiology, Iowa: Wiley-Blackwell, 2009.
2. Signoretti F. y col. Persistent Extraradicular Infection in Root Filled Asymptomatic

Tooth: Scanning Electron Microscopic Analysis and Microbial Investigation after Apical Microsurgery. *JOE*, 2011; 37(12) pp. 1696-1700

3. Zuolo M. y col. Reintervención en Endodoncia. Sao Paulo: Santos. 2012.
4. Saber M. y col. Bacterial Flora of Dental Periradicular lesions analyzed by the 454 Pyrosequencing Technology. *JOE*. 2012;38(11)50-65.
5. Von Arx T., Peñarrocha M., Jensen S. Prognostic Factors in Apical Surgery with Root-end Filling: A meta-analysis. *JOE*. 2010:957-962.
6. Noiri Y. y col. Participation of Bacterial Biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *JOE*. 2002:679-683.
7. Siqueira J. & Rocas I. Polymerase chain reaction analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral surg Oral med Oral pathol*. 2004:85-94.
8. Siqueira F. & Rocas, I. Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 2-Redefining the Endodontic Microbiota. *JOE*. 2005:488-456.
9. Fouad A. y col. PCR-based Identification of Bacteria Associated with Endodontic Infections. *Journal of Clinical Microbiology*.2002:3223-3231.
10. Stewart P. y Costerson J. Antibiotic Resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*.2001:358(9276) 135-138
11. Subramanian K. & Mickel A. Molecular Analysis of Persistent Periradicular Lesions. *JOE*. 2003;35(7) 950-965.



12. Sunde O. & Trnstad L. Assesment of periradicular microbiota by DNA hybridization. *JOE* 2000:191-196.
13. Sunde PT. Microbiota of Periapical Lesions refractory to Endodontic Therapy. *JOE*, 28 (4)pp. 304-310
14. Baumgartner JC. Antibiotic Susceptibility of Bacteria associates with endodontic abscesses. *JOE*. 2003:44-47.
15. Cheung G. y col. Microbial flora of root canal treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 2003:332-337, 2003.
16. Nair P. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *International Journal of Endodontics*. 2006:249-281.
17. Xia T. & Baumgartner. Occurrence of Actinomyces in Infections of Endodontic Origin. *JOE*.2003:549-552.
18. Nair PNR. & Figdor U. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral sur Oral med Oral patho*. 1999:617-627, 1999.