

Roberto Gerosa
Matteo Bonuzzi
Lorenzo Comin Chiaramonti
Caterina Signoretto
Giacomo Cavalleri

Università degli Studi di Verona
Dipartimento di Scienze Biomediche
Istituto di Clinica Odontoiatrica
e di Chirurgia Maxillo Facciale
Direttore: Prof. Pierfrancesco Nocini
Cattedra di Odontoiatria Conservatrice
Titolare: Prof. Giacomo Cavalleri

Corrispondenza:
Dott. Roberto Gerosa, Verona
Università degli Studi di Verona
Clinica Odontoiatrica e di Chirurgia
Maxillo Facciale
Policlinico di Verona
P.le L. Scuro, 10
37100 Verona
E-mail: robertogerosa@univr.it

Ruolo dell'*Enterococcus faecalis* nelle infezioni endodontiche: revisione della letteratura

The role of *Enterococcus faecalis* in endodontic infections: a literature review

RIASSUNTO

L'*Enterococcus faecalis* è un microrganismo comunemente individuato in infezioni endodontiche asintomatiche e persistenti ed è considerato il principale agente eziologico delle lesioni periradicolari croniche.

Questo può essere spiegato dal fatto che *E. faecalis* possiede vari fattori di virulenza (patogenicità: vedere note generali) e di sopravvivenza, inclusa la sua abilità di competere con altri microrganismi, di invadere i tubuli dentinali e resistere anche in condizioni di ridotto apporto nutrizionale.

L'uso di una buona tecnica asettica, l'incremento mediante alesatura del diametro apicale, l'inclusione del 2% di clorexidina in combinazione con l'ipoclorito di sodio nelle procedure di detersione, sono attualmente i metodi più efficaci per cercare di eradicare l'infezione da *E. faecalis* nel sistema canale radicolare degli elementi dentari. In questo articolo, gli Autori descriveranno le caratteristiche inerenti l'*Enterococcus faecalis*, agente ritenuto fra i maggiori responsabili del fallimento di una terapia canalare. Gli Autori analizzeranno inoltre il meccanismo che consente a tale organismo di sopravvivere e di causare un'infezione radicolare persistente. Saranno infine descritte ed illustrate le attuali metodiche in grado di eliminare *E. faecalis* dal sistema dei canali radicolari.

Parole chiave:

Infezioni endodontiche, *Enterococcus faecalis*, lesioni apicali,

Key words:

Endodontic infections, *Enterococcus faecalis*, apical lesions.

ABSTRACT

Enterococcus faecalis is a micro-organism commonly found in persistent asymptomatic endodontic infections; it is considered the main etiological agent that causes chronic lesions in the root canal system of teeth. This is due to the fact that *E. faecalis* has several pathological and survival aspects, including its ability to compete with other micro-organisms, to invade the dentinal tubules of the teeth and to resist even in conditions of reduced nutrition.

The use of good asepsis practices, the enlargement of the apex diameter by means of drilling, and the application of 2% chlorhexidine combined with sodium hypochlorite are the most efficient methods used today to get rid of an *E. faecalis* infection in the root canals of teeth.

In this article - the Authors describe the inherent features of *Enterococcus faecalis*, one of the agent responsible for a failed root canal therapy, they describe the mechanisms due to his way to survive and cause a persistent radicular infection, as well as present-day treatment methods able to successfully eliminate *E. faecalis* from root canal systems.

INTRODUZIONE

L'*Enterococcus faecalis*, riconosciuto come principale causa di lesioni periradicolari croniche, è un microrganismo frequentemente associato ad infezioni endodontiche asintomatiche e persistenti. La correlazione fra la presenza di *E. faecalis* e il fallimento di una terapia canalare può essere spiegata considerando i fattori di patogenicità e di sopravvivenza tipici di questo patogeno, tra i quali spiccano la sua abilità nel competere con altri microrganismi, di invadere i tubuli dentinali e di sopravvivere anche in condizioni di carenza nutrizionale.

Tra le metodiche attualmente indirizzate all'eradicazione dell'infezione da *E. faecalis* dal sistema dei canali radicolari, le più efficaci sono ritenute l'utilizzo di una buona tecnica asettica, l'incremento del diametro apicale ottenuto mediante alesatura, e l'utilizzo di irriganti canalari quali ipoclorito di sodio combinato con il 2% di clorexidina.

Le innovazioni nelle tecniche inerenti le cure dentali attuabili oggi, la continua ricerca specifica sull'*E. faecalis* e sulla sua eliminazione dall'apparato dentale, possono ben definire il futuro della specialità endodontica.

A differenza delle lesioni endodontiche

primarie, che sono di natura polimicrobica e sostenute principalmente da batteri bastoncellari Gram negativi anaerobi, le infezioni secondarie sono sostenute da una o poche specie batteriche (1-4).

E. faecalis è un microrganismo persistente che, nonostante costituisca una piccola percentuale della flora dei canali non trattati, gioca un ruolo molto importante nella eziologia delle lesioni periradicolari dopo il trattamento del canale radicolare.

Esso è ritrovato in un'alta percentuale di fallimenti di terapie canalari ed è in grado di sopravvivere nel canale radicolare come un microrganismo singolo, o come il maggior componente della flora (5).

In questo articolo vengono descritte le caratteristiche inerenti all'*E. faecalis*, ritenuto uno degli agenti eziologici maggiormente responsabili del fallimento del trattamento endodontico, indicando i meccanismi che permettono all'enterococco di sopravvivere e causare una persistente patologia periradicolare e le attuali modalità di trattamento che sono efficaci nell'eradicare *E. faecalis* dal sistema canalare radicolare.

Gli enterococchi sopravvivono ad ambienti molto severi, inclusi valori di pH alcalini - (ad esempio pH 9.6) ed elevate concentrazioni saline (4,6); resistono ai sali biliari, ai detergenti, ai metalli pesanti, ad etanolo, azide ed alla disidratazione (4).

Possono crescere a temperature comprese tra 10 e 45°C e sono in grado di sopravvivere a temperature di 60°C per 30 minuti (6).

ANALISI DELLA LETTERATURA

E. faecalis è stato trovato in presenza di infezioni endodontiche primarie con una percentuale variabile dal 4 al 40% (7).

Studi investigativi sul verificarsi di infezioni di natura endodontica in denti con lesioni periradicolari trattati endodonticamente hanno dimostrato una prevalenza oscillante tra il 24 e il 77% di *E. faecalis* (1-3,7-13).

In alcuni casi *E. faecalis* è stato individuato come il solo organismo (cultura pura) presente in radici otturate di denti con lesioni periradicolari (2-4, 6-21). La maggior parte di questi studi è stata

eseguita utilizzando le convenzionali tecniche colturali; tuttavia, tecniche di biologia molecolare ed in particolare metodiche che prevedono l'uso della PCR, rappresentano attualmente i sistemi più affidabili per la determinazione e l'individuazione di tale microrganismo (22, 23).

La tecnica di PCR, infatti, è più veloce, più sensibile e più accurata dei metodi colturali (23).

A testimonianza di ciò, infatti, con il metodo colturale *E. faecalis* è stato ritrovato nel 24-70% dei casi, mentre applicando la PCR questo valore si è assestato attorno al 67-77%.

Recentemente inoltre è stato messo a punto un sistema basato sull'uso di uno spettroscopio per rilevare *E. faecalis* (24). Questo sistema sembra possa essere utilizzato per monitorare rapidamente la presenza o l'assenza dell'*E. faecalis* nel sistema canalare radicolare (24).

E. faecalis possiede numerosi fattori di virulenza (patogenicità) quali enzimi litici, citolisina, sostanza di aggregazione, ferormoni e acido lipoteicoico (7); è in grado di aderire alle cellule dell'ospite, di esprimere proteine che gli permettano di competere con altri batteri ed alterare la risposta dell'ospite (7, 22).

E. faecalis è in grado di sopprimere l'azione dei linfociti che potenzialmente contribuiscono al fallimento endodontico (23).

E. faecalis supera le difficoltà di sopravvivenza all'interno del sistema dei canali radicolari in diversi modi. Infatti, è stato suggerito che la patogenicità dell'*E. faecalis* potrebbe essere collegata alla resistenza alle medicazioni intracanalari (25) ed all'abilità di sopravvivere in un canale radicolare come unico organismo senza il supporto di altri batteri (26).

Inoltre è stato dimostrato che batteri vivi sono stati trovati nel sistema di canali radicolari dopo che questo era stato trattato con un'efficace strumentazione chemio-meccanica (27).

E. faecalis può abilmente invadere i tubuli dentinali (28), ed è inoltre probabile che i microrganismi in grado di sopravvivere alla strumentazione chemio-meccanica ed alle medicazioni intracanalari possano colonizzare i tubuli e reinfectare i canali radicolari otturati.

Nonostante la costituzione del fluido

dentinale in una dentina radicolare non vitale non sia stata chiaramente delucidata, è possibile che il fluido interstiziale che origina dall'osso alveolare e dal legamento parodontale assomigli al siero (29) e possa quindi sostenere la vitalità e la crescita dell'enterococco. A tutt'oggi poco è conosciuto sui meccanismi batterici coinvolti nell'invasione batterica dei tubuli dentinali, però *E. faecalis* è piccolo a sufficienza per poter sopravvivere al loro interno.

È stato inoltre dimostrato che possiede la capacità di tollerare prolungati periodi di privazioni di risorse nutrizionali fino a quando un adeguato rifornimento diventa disponibile (30); a quel punto diventa in grado di utilizzare fluido interstiziale simil-siero come risorsa nutrizionale.

E. faecalis è in grado di resistere alle medicazioni all'idrossido di calcio, e questo è dovuto principalmente alla sua capacità di sopravvivere a condizioni ambientali difficili, se non impossibili, per molti microrganismi.

L'idrossido di calcio ha un pH di circa 12.4, la maggior parte delle cellule batteriche che si possono isolare da canali infetti sono sensibili alla sua azione e sono eliminate in un breve periodo di tempo quando sono a diretto contatto con questa sostanza.

L'idrossido di calcio si è dimostrato efficace a uccidere *E. faecalis*, specialmente quando non è mantenuto un pH elevato (31-33).

Le proprietà biologiche dell'idrossido di calcio, così come la sua attività antibatterica e la capacità di indurre la formazione di tessuto duro (dentina di reazione), sono riconducibili al modello di dissociazione ionica (a contatto con l'acqua questa base si dissocia producendo ioni negativi OH⁻ e ioni positivi).

Sono state proposte le seguenti ragioni per spiegare la sopravvivenza dell'*E. faecalis* alle medicazioni intracanalari di idrossido di calcio.

1) *E. faecalis* mantiene passivamente l'omeostasi del pH.

2) *E. faecalis* ha una pompa protonica che provvede anch'essa a mantenere l'omeostasi del pH. Questo fenomeno si realizza pompando protoni all'interno della cellula per ridurre il pH interno. È stato dimostrato il ruolo fondamentale della pompa antiporto, in cui

Buona tecnica asettica, sciacquo con clorexidina, disinfezione dei denti e della diga di gomma, disinfezione dei coni di guttaperca con ipoclorito di sodio

Strumentazione adeguata

Irrigazione dei canali

Ipoclorito di sodio al 6% Edta 17%
Clorexidina 2%

Medicazioni intracanalari

2% gel di clorexidina o gel di clorexidina + idrossido di calcio
Prendere in considerazione ah plus o il cemento di grossman
Una buona ricostruzione coronale sigillante è essenziale

Tab. 1 - Procedura consigliata per eradicare *enterococcus faecalis*.

avviene uno scambio sodio-potassio intra-extracellulare, essenziale per la sopravvivenza del microrganismo in un ambiente alcalino fino al raggiungimento di valori di 11.5, al di sopra dei quali il meccanismo diventa insufficiente a garantire la sopravvivenza del microrganismo.

3) A pH ≥ 11.5 *E. faecalis* non è in grado di sopravvivere (5, 32). Tuttavia come risultato della capacità tamponante della dentina, è difficile che un pH di 11.5 possa essere mantenuto nei tubuli dentinali usando le attuali medicazioni all'idrossido di calcio.

Nella dentina radicolare, l'alcalinità può raggiungere valori di pH pari a 10.3 dopo medicazione con idrossido di calcio (34).

Un efficace irrigante nei confronti di *E. faecalis* è rappresentato dall'ipoclorito di sodio. La temperatura ha un effetto positivo sull'efficacia battericida e come dissolvente tissutale (35).

Anche un nuovo irrigante canalare, costituito dall'insieme di un isomero di tetraciclina (doxiciclina), un acido (acido citrico) e un detergente (twin80) denominato MTAD ha dimostrato in studi preliminari, successo nella sua capacità a distruggere *E. faecalis* (35-38). La sua efficacia è attribuibile alla sua attività anti-collagenasica, al basso pH e all'abilità di essere rilasciato gradualmente per tutto il tempo che viene utilizzato nel canale (38). Gli effetti dell'MTAD sono accresciuti quando viene usato 1.3% di ipoclorito di sodio come irrigante durante la strumentazione (39).

La Clorexidina al 2%, in gel o liquida, è efficace a ridurre o a eliminare com-

pletamente *E. faecalis* dallo spazio canalare radicolare e dai tubuli dentinali (40, 41). Risciacqui di 2 minuti con clorexidina liquida al 2% possono essere usati per rimuovere *E. faecalis* dal fango superficiale dei tubuli dentinali per 100 μ m (Tab. 1). La clorexidina gel al 2% è completamente efficace a eliminare *E. faecalis* dai tubuli dentinali fino a 15 giorni (40). Questo potrebbe essere attribuito alla sua considerevole attività antimicrobica (42).

Sono stati condotti studi per valutare la possibile efficacia dell'utilizzo dei coni di guttaperca impregnati di clorexidina, e l'uso di nuovi cementi - (AH Plus Dentsply DeTrey GmbH D-78467 Konstanz, Roth 811 Roth intl. Limited dental prod. Div. Chicago).

I coni di guttaperca impregnati di clorexidina e iodoformio hanno dimostrato una buona azione inibente nei confronti di *E. faecalis* (43, 44), anche se *in vitro* non hanno mostrato un'attività inibitoria abbastanza forte da eliminare *E. faecalis* dai tubuli dentinali infetti.

Roth 811, cemento a base di ossido di zinco e eugenolo, ha dimostrato possedere un'attività più efficace contro *E. faecalis* rispetto agli altri cementi (45). Anche AH Plus, cemento a base di resina di epossido, e Sultan, cemento a base di ossido di zinco ed eugenolo, hanno dimostrato buoni effetti antibatterici, paragonabili all'idrossido di calcio, nei confronti di *E. faecalis* (46).

I cementi di AH Plus e Grossman sono efficaci nell'eradicare *in vitro* *E. faecalis* nei tubuli dentinali infetti all'interno di una zona di 300 μ m attorno al ca-

nale radicolare (46). Basandoci sugli studi sopra riportati si può concludere che una combinazione adeguata di strumentazione, uso di irriganti appropriato, medicazioni e cemento può aumentare le possibilità di eradicare *E. faecalis* durante il ritrattamento di casi di fallimento di una terapia dei canali radicolari.

Successivamente dovrebbe essere prevenuto il reingresso da parte di *E. faecalis* nello spazio canalare radicolare. Questo risultato può essere ottenuto mediante sciacqui con clorexidina prima del trattamento, disinfezione dei denti e della diga di gomma con clorexidina o ipoclorito di sodio durante il trattamento, e disinfezione dei coni di guttaperca con ipoclorito di sodio prima di inserirli nel canale (34) nella fase finale di obturazione. I fattori che possono contribuire al persistere di un'infezione periradicolare dopo il trattamento canalare radicolare sono:

- un'infezione intraradicolare
- un'infezione extraradicolare
- una reazione da corpo estraneo
- una cisti contenenti cristalli di colesterolo (5).

La maggior causa del fallimento del trattamento sembra essere dovuta alla sopravvivenza dei microrganismi nella porzione apicale della radice obturata dell'elemento dentale (5).

Come già accennato in precedenza, a differenza delle lesioni endodontiche primarie, che sono di natura polimicrobica e dominate da batteri bastoncellari Gram negativi anaerobi, le infezioni secondarie sono sostenute da una o poche specie batteriche (1-3).

Questo dato è comunemente riscontrabile in un'alta percentuale di fallimenti di terapie canalari. L'*Enterococcus faecalis* è in grado di sopravvivere nel canale radicolare come microrganismo singolo, o risultare come il maggior componente della flora.

Recenti lavori (47-49) che hanno preso in considerazione denti con fallimenti endodontici, hanno riportato la presenza di un numero ristretto di microrganismi a livello dei canali radicolari. Tra questi microrganismi *E. faecalis*, anaerobio facoltativo Gram positivo, si presenta in modo predominante.

Batteri anaerobi facoltativi Gram positivi sono presenti in quantità predomi-

nante in canali con fallimento del trattamento endodontico; questi canali di solito ospitano solo una specie o due specie batteriche diverse.

La capacità di *E. faecalis* di sopravvivere ad ambienti estremi e la sua esigua esigenza nutrizionale, assieme alla sua capacità di moltiplicarsi facilmente in

coltura, fanno sì che questo microrganismo sia di facile reperimento.

La difficoltà di rilevare la presenza di batteri coltivabili nei canali radicolari (circa un 10% dei prelievi risulta privo di flora batterica) pone diversi interrogativi sulla possibilità che *E. faecalis* sia l'unico agente eziologico delle lesioni

endodontiche secondarie.

È auspicabile pertanto un miglioramento delle tecniche di ricerca che permettano di rilevare la presenza di microrganismi anaerobi obbligati che siano concause o direttamente coinvolti assieme ad *E. faecalis* nell'eziologia delle lesioni endodontiche secondarie.

BIBLIOGRAFIA

1. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.
2. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86-93.
3. Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North Am population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:579-86.
4. Gilmore MS. The *Enterococci*: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. *Washington: ASM Press*, 2002
5. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35:221-8.
6. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic *Enterococci*: new development in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2622-36.
7. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KR N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-20.
8. Engström B. The significance of *Enterococci* in root canal treatment. *Odontol Revy* 1964;15:87-106.
9. Möller AJR. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr* 1966;74(Suppl):1-380.
10. Peculiene V, Balciuniene I, Eriksen H, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000;26:593-5.
11. Peculiene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001;34:429-34.
12. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1-11.
13. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.
14. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 2004;22:822-30.
15. Teixeira LM, Facklam RR. *Enterococcus*. In: Murray PR, ed. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. *Washington: ASM Press*, 2003:422-33.
16. Facklam RR, Carvalho MGS, Teixeira LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of *Enterococci*. In: Gilmore MS, ed. *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. *Washington: ASM Press*, 2002:1-54.
17. Dautle MP, Ulrich RL, Hughes TA. Typing and subtyping of 83 clinical isolates purified from surgically implanted silicone feeding tubes by random amplified polymorphic DNA amplification. *J Clin Microbiol* 2002;40:414-21.
18. Nallapareddy SR, Duh RW, Singh KV, Murray BE. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2002;40:868-76.
19. de Melo Maltos SM, Ribeiro Sobrinho AP, Silva FV, et al. Bacterial concentrations determine the ability to implant in the root canal system and translocate to lymph nodes in germ-free mice. *J Endod* 2003;29:24-7.
20. Novias C, Vital C, Ribeiro G, Coque TM, Peixe LV. First characterization of vancomycin-resistant *Enterococci* from a Portuguese hospital. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:215-7.
21. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype, and genotype of oral *Enterococci*. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:95-101.
22. Molander A, Lundquist P, Papapanou PN, Dahlen G, Reit C. A protocol for polymerase chain reaction detection of *Enterococcus faecium* from the root canal. *Int Endod J* 2002;35:1-6.
23. Siqueira JF, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent* 2003;31:333-9.
24. Kishen A, Chen NN, Tan L, Asundi A. Chairside sensor for rapid monitoring of *Enterococcus faecalis* activity. *J Endod* 2004;30:872-5.
25. Nerwich A, Figdor D, Messer H. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod* 1993;19:302-6.
26. Haapasalo M., Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dental Research* 1987; 66: 1375-9.
27. Fabricius L, Dahlén G, Holm SE., Møller AJR Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1982;90:200-6.
28. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriological evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1981;89:321-8.
29. Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. *Journal of Dental Research* 1982;61:435-8.
30. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:234-9.
31. Lin Y, Mickel A, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: Part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2003;29:565-6.
32. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod* 2004;30:218-9.
33. Tronstad L, Andreassen J, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981;7:17-21.
34. Senia E, Marraro RV, Mitchell J, Lewis A, Thomas L. Rapid sterilization of gutta-

- percha cones with 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 1975;1:136-40.
35. Barroso Ldos S, Habitante SM, Jorge AO, Faria Ida S. Microorganisms growth in endodontic citric-acid solutions with and without microbiological stabilizer. *J Endod* 2004;30:42-4.
36. Torabinejad M, Shabahang S, Apécio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. *J Endod* 2003;29:400-3.
37. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18:35-40.
38. Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis* – contaminated root canals of extracted human teeth. *J Endod* 2003;29:576-9.
39. Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S. The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. *J Endod* 2003;29:233-9.
40. Gomes B, Souza S, Ferraz C, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J* 2003;36:267-75.
41. Basrani B, Santos J, Tjaderhane L, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine- treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:240-5.
42. White R, Hays G, Janer L. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997;23:229-31.
43. Shur A, Sedgley C, Fenno J. The antimicrobial efficacy of “MGP” gutta-percha *in vitro*. *Int Endod J* 2003;36:616-21.
44. Lui J, Sae-Lim V, Song K, Chen N. *In vitro* antimicrobial effect of chlorhexidineimpregnated gutta percha points on *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004;37:105-13.
45. Mickel A, Nguyen T, Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2003;29:257-8.
46. Saleh I, Ruyter IE, Haapasalo M, Orstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers *in vitro*. *Int Endod J* 2004;37:193-8.
47. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected root canals. *Oral Microbiology and Immunology. Volume 19 Issue 2 Page 71 - April 2004*.
48. JF Siqueira Jr, IN Rôças, C.D. Cunha, A.S. Rosado. Novel Bacterial Phylotypes in Endodontic Infections Research reports clinical. *Journal Dental Res* 2005;84(6):565-569.
49. Daniel Saito, Renato de Toledo Leonardo, Jorge Luiz Mazza Rodrigues et al. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J. Med Microbiol Jan* 2006; 55:101-107.