

Stefano Accorsi  
 Giorgio Lavagnoli  
 Stefano Frigeri  
 Luigino Fiamminghi

Università degli Studi di Parma  
 Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi dentale  
 Cattedra di Odontoiatria Conservatrice  
 Direttore: Prof. L. Fiamminghi

# Significato della flora batterica nell'eziologia delle periodontiti apicali

## Aspetti qualitativi, quantitativi e topografici

Parola chiave: microbiologia endodontica

Key word: endodontic microbiology

**D**all'analisi dei maggiori studi epidemiologici condotti negli ultimi anni sulla patologia periapicale, emerge come essa costituisca un reperto assai frequente nell'uomo, a prescindere dai diversi tipi di popolazione, di razza, di classi socio-economiche, di età prese in esame.

Per meglio quantificare le dimensioni del problema possiamo brevemente analizzare alcuni dati forniti al riguardo dalla scuola scandinava (9). Secondo questi studi, la percentuale di denti non trattati endodonticamente che presentano una patologia periapicale varia dallo 0,3 al 4,1%, con la tendenza all'aumento parallelamente all'età dei soggetti esaminati.

Considerando invece i denti trattati endodonticamente, la percentuale sale notevolmente, attestandosi attorno a valori variabili dal 5,8 al 25,6%; in pratica ogni 5-6 elementi trattati endodonticamente, uno risulta affetto da patologia periapicale.

L'importanza della ricerca microbiologica in endodonzia è stata legata per molti anni alle possibili complicanze a distanza delle periodontiti apicali. La cosiddetta malattia focale di origine dentale, alla quale in passato sono state attribuite gravi quanto spesso infondate responsabilità nella genesi delle più svariate malattie, ha indubbiamente il merito di aver posto in primo piano lo studio della flora batterica dei canali radicolari. Si è tuttavia trattato di studi condotti tra notevoli difficoltà, facilmente comprensibili se si pensa alle condizioni del tutto particolari nelle quali ci si trova ad operare.

Tra queste ricordiamo le principali: la facilità enorme di contaminazione dei prelievi e quindi il problema dei falsi positivi, la necessità di sistemi di coltura e di identificazione molto sensibili per adattarsi a cariche batteriche molto ridotte, la difficoltà tecnica nell'esecuzione dei prelievi in particolari punti, la necessità di mantenere condizioni di anaerobiosi stretta per la maggior parte dei batteri coinvolti nell'infezione canale, la difficoltà di reperire modelli animali tanto affidabili da poter considerare i risultati estendibili all'uomo, la difficoltà di definire distinzioni anatomiche costanti tra tessuto pulpare e periapicale (almeno fin quando la polpa è vitale).

Tab. 1 - Da Moller e coll. (13)

Gruppo	N. denti per gruppo	Cond. polpa necrotica	Casi pos.* es. clin.	Casi pos. es. rx.	Casi pos. es. istol.
A	26	non infetta	0/26	0/26	2/24
B	52	infetta	12/52	47/52	10/10

\* Segni clinici evidenti di flogosi periapicale

Tutto ciò non ha comunque impedito enormi progressi: la microbiologia endodontica si è rapidamente arricchita di nuove e importanti conoscenze che già hanno in parte rivoluzionato metodi e concetti della pratica clinica.

Scopo di questo lavoro è illustrare ed analizzare, tramite l'esame della letteratura internazionale, lo stato attuale delle conoscenze sui rapporti eziologici e patogenetici tra la flora batterica dei canali radicolari e lo sviluppo di patologie periapicali, con le implicazioni locali e sistemiche ad esse correlate.

L'importanza dell'azione batterica nella eziopatogenesi delle flogosi periapicali fu compresa già molti anni or sono.

Nel 1894 Miller, uno dei pionieri della microbiologia endodontica, era riuscito a dimostrare la presenza di microorganismi all'interno dei canali radicolari di denti necrotici.

Ciò nonostante per molti anni si è vivacemente discusso sull'effettiva rilevanza della componente microbica nella patologia periapicale, soprattutto a causa dell'assenza di quei sofisticati mezzi tecnici che in questo campo sono necessari per condurre ricerche di sicuro valore scientifico. Oggi questi problemi sono stati in gran parte superati, ed i numerosi dati acquisiti hanno chiarito molte questioni rimaste per molto tempo oscure.

Uno dei chiarimenti più rilevanti si è regi-

Tab. 2

Microrganismi	514 casi	709 casi	4000 e più
S. alfa-emolitico	25*	5	23
S. beta-emolitico	3	7	4
S. gamma-emolitico	23	45	1
Enterococchi	= =	= =	19
S. anaerobi	= =	= =	4
Staf. aureus	12	**	**
Staf. epidermidis	12	19	17
Pneumococco	2	= =	= =
Lactobacilli	5	5	6
B. subtilis	= =	7	= =
Difteroidi	2	= =	5
Neisseriae	7	= =	= =
E. coli	2	= =	= =
Pseudomonas	0,6	= =	= =
Candida	5	2	= =
Altri	1	4	20
	Slack '58 (20)	Shay '47 (17)	Winkler e coll. '59 (29)

\* I dati si intendono riferiti in percentuale

\*\* Non è specificata la percentuale riferita

ai singoli ceppi, che risultano quindi sommati in un unico valore



strato nel campo della ricerca dei fattori eziologici delle lesioni periapicali.

Un lavoro del 1981 di Moller e coll. (13) evidenzia con estrema precisione l'importanza della flora batterica nella genesi di questa patologia. L'esperienza in questione fu condotta su scimmie di razza *Macaca Fascicularis*, reputata dagli AA il migliore modello animale utilizzabile a questo scopo, a causa della similitudine in termini di anatomia dentale e di composizione della flora batterica orale rispetto all'uomo. Furono utilizzati 78 denti, esenti da ogni tipo di patologia, suddivisi in due gruppi rispettivamente di 26 e 52 unità. Con l'animale adeguatamente anestetizzato, si è proceduto all'applicazione della diga di gomma ed alla disinfezione del campo operatorio tramite  $H_2O_2$  al 35% e tintura di Iodio al 5%. L'efficacia del trattamento antisettico veniva immediatamente controllata, ed i risultati ottenuti in seguito sui terreni di coltura dimostravano la completa assenza di contaminazione. Successivamente i denti venivano aperti, utilizzando frese diamantate, in modo da creare un'ampia via d'accesso alla camera pulpare. La polpa veniva quindi amputata utilizzando lime di Hedstrom (15 e 30) fino a 2 mm dall'apice radiografico, che venivano poi rimosse ruotandole in senso antiorario allo scopo di lasciare il tessuto pulpare nella sua sede canalare.

A questo punto i due gruppi seguivano un diverso protocollo: nel gruppo di 26 denti (gruppo A) la camera pulpare veniva immediatamente chiusa e lasciata in queste condizioni; nell'altro (gruppo B) i 52 denti venivano invece lasciati aperti per 7 giorni, ottenendo così un contatto con la flora batterica orale, dopo di che venivano otturati il più possibile ermeticamente.

Dopo 6-7 mesi, rimosse le otturazioni, si eseguivano i prelievi microbiologici e veniva condotta un'accurata valutazione clinica e radiografica ed un esame istologico dei tessuti periapicali.

I risultati ottenuti, illustrati nella Tab. 1, dimostrano inequivocabilmente il ruolo centrale ricoperto dall'infezione canalare nella genesi delle lesioni periapicali. Il tessuto pulpare necrotico sterile si è dimostrato del tutto incapace di determinare reazioni flogistiche nel periapice. Queste evidenze speri-

Tab. 3 - Da Zavitowski e coll., 1980 (32)

N.	Peso	Aerobi	Anaerobi
1	3,74	Streptococchi Gram - non ident. Corinebatteri	<i>Lactobacillus crispatus</i> <i>B. melaninogenicus</i> ss. <i>intermedius</i> <i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>Lactobacillus</i> sp.
2	0,51	Enterococchi	<i>B. melaninogenicus</i> ss. <i>intermedius</i> <i>Bifidobacterium ruminicola</i> <i>Eubacterium</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp.
3	3,74		<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>Veillonella</i> sp. <i>Bifidobacterium dentium</i>
4	0,22	<i>S. alfa-emolitico</i> Strepto. gr. D	
5	4,28	Corinebatteri Strepto. gr. D Bacillus sp.	<i>Eubacterium</i> sp. <i>B. oralis</i> <i>Eubacterium lentum</i>
6	0,21	Enterococchi Bacillus sp. Staf. epiderm.	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>B. corrodens</i> Gram + non ident.
7	8,69	<i>S. alfa-emolitico</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>Eubacterium</i> sp. <i>B. corrodens</i> <i>B. melaninogenicus</i>
8	3,79	Corinebatteri <i>S. gamma-emolitico</i> Enterococchi <i>S. alfa-emolitico</i>	<i>Actinomyces israeli</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
9	5,10	Enterococchi	<i>Eubacterium</i> sp. <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
10	0,10	<i>S. alfa-emolitico</i>	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Bacteroides</i> sp. <i>B. melaninogenicus</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>

mentali sono d'altronde ben confermate anche da uno studio (7) sull'attività endotossica rilevabile nel tessuto pulpare di denti ne-

crotici che dimostra con precisione il ruolo svolto dalla flora batterica nell'eziologia delle flogosi periapicali. Anche in questa ricer-



Tab. 4 - Da Ogunteby e coll. (15)

Caso		Condizione clinica del dente	N. Ceppi	Microorganismi isolati
1	46	Corona prov.	2	Streptococcus mitis Peptos. anaerobius
2	25	Carie	4	Streptococcus mitis Fusob. nucleatum B. melaninog ss int Peptos. anaerobius
3	46	Otturazione amalgama infiltrata	3	Streptococcus mitis Actinomyces visc. Fusob. nucleatum
4	46	Ott. can. incompleta	2	Fusob. nucleatum Peptos. micros
5	26	Otturazione amalgama infiltrata	3	Streptococcus mitis Fusob. nucleatum B. melaninog ss int
6	37	Esp. pulp. da carie	2	Streptoc. faecalis Actinomyces visc.
7	24	Ott. am. infiltrata	2	Streptoc. faecalis Fusob. nucleatum
8	36	Esp. pulp. da carie	2	Streptoc. faecalis Actinomyces visc.
9	11	Corona intatta trauma	3	Streptococcus mitis Staf. epidermidis Fusob. nucleatum
10	11	Corona intatta trauma	2	Streptococcus mitis Fusob. nucleatum

ca infatti, nei denti con tessuto pulpare necrotico sterile non si è osservata alcuna reazione infiammatoria periapicale.

Il fatto di trovare anche con una certa frequenza denti intatti con lesioni periapicali, è da considerarsi dovuto all'infezione batterica per via anacoretica, che si è dimostrata essere un evento non infrequente nei canali con polpa in necrosi asettica da pregressi eventi traumatici.

Diverse ricerche degli anni scorsi riportano casi di periodontiti apicali in denti non infetti. Questo oggi può esser spiegato in vari modi:

- falso negativo negli esami batteriologici a causa della difficoltà di isolamento degli anaerobi obbligati

- l'azione batterica può avere a suo tempo determinato l'eterogeneizzazione di componenti del tessuto pulpare che può così aver acquisito potere antigenico nei confronti dei tessuti periapicali

- un'altra possibilità, forse la più frequente nella pratica clinica, è che la periodontite apicale sia dovuta all'uso di determinati antisettici canalari aventi la capacità di fissare il tessuto pulpare, di renderlo quindi "non-self" e di conseguenza riconosciuto come antigene dal sistema immunitario.

Possiamo quindi affermare che il tessuto pulpare infetto e quello fissato chimicamente possono esser causa di periodontite apicale, mentre ciò non si verifica per il tessuto pulpare necrotico sterile.

Una volta posti questi fondamentali concetti sulla importanza della componente infettiva nell'eziologia delle periodontiti apicali, si tratta di vedere quali sono le possibili vie di arrivo dei batteri e dove essi vanno più frequentemente a stabilirsi.

La via attraverso la quale i batteri più spesso raggiungono i tessuti periapicali è certamente costituita dalle lesioni cariose a carico della corona del dente.

Studi in proposito (18, 19) hanno dimostrato come, nella maggior parte dei casi, una barriera dentinale superiore ai 0,2-0,3 mm impedisca il passaggio diretto dei batteri in polpa (pur non impedendo che si generi una flogosi pulpare attraverso i prodotti del metabolismo batterico o i componenti della cellula batterica); al di sotto di questi valori i batteri vi sono quasi sempre reperibili. Ov-

viamente la via di entrata si fa ancor più comoda quando la barriera dentinale viene completamente abbattuta e si genera così una comunicazione diretta tra polpa e flora batterica orale.

È interessante ricordare come l'azione a distanza da parte della flora batterica possa manifestarsi anche nel caso delle flogosi periapicali. Non deve quindi sorprendere la possibilità di periodontiti apicali associate a tessuto pulpare in gran parte ancora vitale e con una colonizzazione batterica relativamente poco estesa. Infatti si può presumere che i prodotti batterici elaborati a livello della polpa camerale possano raggiungere il periapice e determinarvi flogosi attraverso i vasi sanguigni e linfatici. L'invasione batterica pulpare può verificarsi a partire da carie radicolari, anche se queste sono spesso lesioni a progressione piuttosto lenta e che quindi danno buone possibilità ai sistemi di difesa (dentina sclerotica, dentina terziaria) di intervenire efficacemente.

Più frequentemente la contaminazione pulpare avviene attraverso le fratture coronali e corono-radicolari.

Altra possibile via d'accesso alla polpa è costituita dalla via parodontale: i batteri presenti nelle tasche parodontali possono arri-

vare alla polpa tramite i canali laterali o, quando la tasca raggiunge profondità notevoli, tramite il forame apicale ed il canale principale. Questa possibilità di invasione batterica pulpare a partire dai tessuti parodontali è da tener presente soprattutto in situazioni anatomiche particolari come ad esempio quelle dei primi molari inferiori.

Uno studio condotto da Vertucci e Williams nel 1974 (26) sull'anatomia endodontica di questo elemento ha evidenziato la presenza di canali accessori, presenti a livello della biforcazione, nel 46% dei casi esaminati.

Già in precedenza abbiamo accennato alla possibilità d'infezione pulpare per via anacoretica, che consiste nell'invasione della polpa ad opera di batteri presenti nel circolo sanguigno o linfatico. Particolarmente soggette a questo fenomeno sono le polpe sterili infiammate o parzialmente necrotiche, nelle quali i microrganismi si fissano facilmente a causa delle lesioni vascolari e del ristagno circolatorio.

L'importanza dello stato infiammatorio e delle lesioni vascolari anche di minima entità nel favorire l'invasione batterica pulpare per via anacoretica, è ben dimostrata anche da un lavoro di Tziafas del 1989 (24). Lo studio in questione dimostra come anche le



Tab. 5 - Da Williams e coll. (27)

Caso	Microrganismi isolati	%
1	<i>S. milleri</i>	98
2	Cocchi anaerobi Gram+	52
	<i>Bacteroides</i> sp.	11
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	11
	<i>Bacteroides oralis</i>	10
	<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	6
3	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	89
	<i>Fusobacterium</i> sp.	8
	<i>Streptococcus sanguis</i>	2
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
4	Difteroidi anaerobi	30
	<i>Bacteroides</i> sp.	41
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	26
5	<i>Streptococcus intermedius</i>	47
	<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	21
	<i>Bacteroides disastonis</i>	12
	<i>Bacteroides oralis</i>	2
	<i>Bacteroides corrodens</i>	2
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1
6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	66
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	17
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	15
	<i>Bacteroides</i>	2
7	<i>Peptostreptococcus micros</i>	35
	<i>E. lentum</i>	14
	<i>Bacteroides ruminicola</i>	13
	<i>Bacteroides corrodens</i>	9
8	<i>Peptostreptococcus micros</i>	34
	<i>Bacteroides</i> sp.	35
	<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	11
	<i>Bacteroides asaccharoliticus</i>	3
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	7
	<i>Lactobacillus</i> sp.	5
9	<i>Peptostreptococcus micros</i>	38
	<i>Lactobacillus</i> sp.	22
	<i>Bacteroides oralis</i>	14
	<i>Bacteroides ruminicola</i>	12
10	<i>Peptostreptococcus micros</i>	53
	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27
	<i>Bacteroides corrodens</i>	9
	<i>Capnocytophaga</i>	6

alterazioni infiammatorie e l'aumento della permeabilità vascolare dovute ad esposizioni pulpari di minima entità trattate con  $\text{Ca(OH)}_2$ , siano in condizione di favorire in modo determinante l'infezione pulpare anaerobica.

Secondo alcuni AA esiste anche la possibilità di una invasione anaerobica che potrebbe definirsi "locale", dovuta alla diffusione per via ematica di batteri provenienti da una lesione periapicale verso una polpa sterile vicina.

Oggi questa possibilità viene comunque unanimemente negata anche in base a studi (13) che hanno dimostrato come denti vicini con polpa infetta e polpa necrotica sterile non si condizionino in alcun modo e possano coesistere come tali per molti anni.

Abbiamo parlato fino a questo punto di vie d'accesso ai tessuti pulpo-periapicali; in realtà il definire la zona esatta di localizzazione dei batteri riveste una notevole importanza sia dal punto di vista microbiologico che dal punto di vista clinico.

Un punto fondamentale, dibattuto per molti anni, ed oggi in buona parte chiarito, è quello relativo alla presenza o meno di batteri all'interno delle lesioni periapicali. A questo proposito però è necessario distinguere tra periodontiti apicali acute e croniche.

Nelle periodontiti acute, ed in particolare nell'ascesso periapicale acuto, la presenza di batteri nei tessuti periapicali è ormai ampiamente dimostrata dalle ricerche svolte sull'argomento che peraltro analizzeremo in seguito nella trattazione delle caratteristiche della flora dei canali radicolari.

Diverso è il discorso riguardante le periodontiti croniche, su cui esistono dati non sempre concordanti.

In un lavoro del 1972, Winkler e coll. (28) esaminarono 26 denti estratti con patologia periapicale cronica produttiva. Si trattava di denti con necrosi pulpare dovuta in parte ad invasione batterica per via coronale ed in parte per altre vie non meglio identificate dagli AA. Furono eseguiti controlli per verificare l'assenza di contaminazione durante l'intervento di prelievo e vennero esclusi 11 denti. Sui 15 rimasti si eseguirono sezioni per l'esame istologico ed esami batteriologici: questi ultimi evidenziarono la presenza

di una carica batterica minima ma costante all'interno di tutte le lesioni periapicali.

Una ricerca condotta a questo proposito in Italia (6) esamina l'eventuale presenza di batteri in 30 cisti radicolari e 30 periodontiti apicali croniche produttive con questi risultati: su 30 cisti 14 risultavano infette e su 30 periodontiti croniche ne risultavano infette ben 22.

Un'altra ricerca italiana (4) sulla componente batterica delle lesioni periapicali evidenzia una percentuale di positività pari al 48% delle lesioni esaminate (100).

Manca però un dato fondamentale rappre-

sentato dal metodo di prelievo del tessuto, senza il quale risulta difficile dare un giudizio sui risultati ottenuti. Infatti l'obiezione principale che può esser mossa nei confronti delle ricerche di Winkler e Cicciù ed altre analoghe, è che il metodo di prelievo del materiale da esaminare, e cioè l'estrazione del dente (utilizzata in tutti i casi da Winkler ed in numero non specificato da Cicciù), comporta un rischio di contaminazione molto elevato (2, 3, 5). Con un metodo diverso è stato invece condotto il lavoro di Langeland e coll. (12), il quale per prelevare le lesioni periapicali utilizza la chirurgia



Questa specie di rappresentazione biologica illustra quella che è la situazione di equilibrio che si viene a creare tra la flora batterica del canale radicolare e le difese dell'organismo organizzate nella periodontite apicale cronica, che i batteri alimentano tramite le loro eso ed endotossine. Non si tratta però di un equilibrio assolutamente stabile, e la sua rottura può determinare il passaggio di germi nei tessuti periapicali creando il quadro clinico dell'ascesso ricorrente o di "Phoenix abscess", secondo gli AA anglosassoni.

C'è inoltre da chiedersi quante volte i batteri penetrati nel periapice vengano bloccati

mi anni risultati molto importanti, in buona parte legati ai progressi delle tecnologie biomediche utilizzate per questo tipo di indagini. Può essere interessante paragonare i risultati di alcune ricerche degli anni '50 rispetto a quelli degli ultimi 15-20 anni, e, a questo proposito, riportiamo nella Tab. 2 i dati relativi ad un gruppo di ricerche condotte tra il 1947 ed il 1959 da alcuni autorevoli ricercatori (20, 17, 29), sul cui significato torneremo in seguito.

Veniamo ora a considerare studi più recenti. Il lavoro di Zavitowski e coll. (32) studia, dal punto di vista sia qualitativo che quantitativo, la flora batterica canalare di 10 denti

periapicale. Lo studio considera 230 lesioni, analizzate dal punto di vista clinico, radiografico, istologico e batteriologico.

L'esame batteriologico evidenziò la presenza di batteri in 23 casi sui 230 esaminati; inoltre sui 23 positivi, in un solo caso i batteri vennero riscontrati all'interno della lesione, mentre nei rimanenti 22 si trovarono in superficie o all'interno della dentina radicolare inclusa nel prelievo.

Risultati sostanzialmente analoghi hanno riportato nelle loro ricerche numerosi altri AA (8, 1). Oggi possiamo considerare questi dati i più vicini alla realtà.

Se quindi i batteri non sono quasi mai presenti nel periapice, essi mantengono lo stato di flogosi periapicale rimanendo all'interno dei canali radicolari, laddove cioè non possono essere aggrediti efficacemente dalle difese dell'organismo per mancanza di vascolarizzazione.

Un aspetto particolare del problema è costituito dalla possibile localizzazione batterica a livello della superficie dentinale esterna in zona apicale. Per quanto già evidenziata dal sopracitato lavoro di Langeland (12), questa possibilità è stata definita con maggior precisione da due studi di Tronstad e coll. (22,23). In entrambi i lavori si riportano casi di infezioni endodontiche con localizzazione batterica "extraradiculare". Nello studio più recente è stato possibile anche stabilire un preciso collegamento tra questo tipo di disposizione topografica della flora batterica e l'insuccesso della terapia endodontica intrapresa. Si tratta quindi di una possibilità da tenere in considerazione, sia in campo clinico che sperimentale, ma non da generalizzare.

Infatti, secondo quanto finora riportato in letteratura sull'argomento, ciò costituisce un'eccezione alla regola. Rimane quindi sostanzialmente valido il concetto del "passo di montagna" di Kronfeld, il quale paragona i batteri presenti all'interno del canale ad un esercito di invasori che tenta di invadere una pianura costituita dai tessuti periapicali. Questo esercito di batteri si trova in una posizione inespugnabile, paragonata a montagne inaccessibili, ma per raggiungere la pianura deve superare un passo, il forame apicale, al di là del quale le difese sono estremamente organizzate e decise a resistere.

Tab. 6 - Da Keudell e coll., 1976 (10)

<b>Totale denti esaminati batteriol.: 55</b>	43 positivi (78%)	
	12 negativi (22%)	
<b>Condizioni della polpa all'apertura</b>	necrosi pulpare (42)	33 casi batter. pos. (79%)
		9 casi batter. neg. (21%)
	polpa vitale in flogosi acuta (13)	10 casi batter. pos.
		3 casi batter. neg.

dalle difese prima di dar luogo ad una sintomatologia clinicamente evidenziabile. A proposito della presenza batterica nel phoenix abscess, dati interessanti emergono da uno studio (14) in cui vengono esaminate al microscopio ottico ed elettronico la flora canalare e le lesioni periapicali di 31 elementi dentali. Dei 31 casi, 5 risultavano in fase acuta. L'esame al microscopio elettronico dei tessuti periapicali evidenziava la presenza batterica esclusivamente nei 5 casi di periodontite apicale acuta, con localizzazione batterica sia extra che intracellulare, a testimonianza di un'attività fagocitaria piuttosto intensa. Questi 5 casi batteriologicamente positivi erano costituiti da 1 cisti radicolare, 1 actinomicosi periapicale, 3 phoenix abscesses. Occorre quindi usare molta cautela nel definire in modo assoluto lo stato microbiologico delle lesioni periapicali; esse sono sì, nella maggior parte dei casi, sterili, ma in condizioni di equilibrio dinamico e quindi suscettibili all'infezione da parte della flora batterica canalare.

Da queste considerazioni emerge ancora una volta il significato curativo della detersione chemo-meccanica del sistema dei canali radicolari nei confronti delle periodontiti apicali croniche produttive; riducendo drasticamente la carica batterica dei canali non si fa altro che "indurre l'esercito dei difensori a rompere le fila per venuta meno del nemico".

Dopo aver visto dove si localizzano i batteri, andiamo ora ad analizzare un altro punto essenziale del nostro discorso: quali sono i batteri responsabili della patologia periapicale.

Sull'argomento si sono registrati negli ulti-

infetti.

Un primo prelievo veniva effettuato, previo isolamento del campo tramite diga e sua disinfezione, sulla superficie esterna del dente per verificare l'assenza di contaminazione. In seguito veniva creata un'adeguata via d'accesso utilizzando una fresa sterile, dopodiché si procedeva all'introduzione di coni di carta sterili per il prelievo batteriologico. Per determinare il valore quantitativo globale di ogni singolo prelievo, le singole punte di carta venivano pesate prima e dopo l'introduzione nei canali, usando naturalmente bilance ad altissima sensibilità, e si sottraeva il primo valore dal secondo. Venivano poi effettuate le colture in diversi terreni a diverse concentrazioni di O, evidenziando i risultati che riportiamo nella Tab.3. Si può osservare che il peso medio dei prelievi è di circa 3.07 mg. La carica batterica media è risultata essere di  $10^7$ .

Tutti i prelievi hanno evidenziato la presenza di flora mista con media di 6 diverse specie per dente.

I batteri anaerobi rappresentavano il 63% di tutte le specie isolate.

Tra i batteri aerobi (37%) sono presenti in maggior numero gli Streptococchi alfa-emolitici (4 o 5 casi, in quanto nel caso 1 non è specificata la sottospecie di Streptococco), gli Enterococchi (4 casi) e i Corinebatteri (3 casi).

Tra gli anaerobi, i Bacteroides sono presenti in 5 casi, il Peptostreptococcus anaerobius in 6, i Lactobacilli e gli Eubacterium in 4.

Interessante può essere il confronto di questi dati con quelli ottenuti da Ogunteby e coll. (15) e da Williams e coll. (27), relativi a prelievi batteriologici eseguiti sugli asces-



gione, oltrepassa i limiti periapicali diffondendosi attraverso l'osso fino a raggiungere i tessuti molli. Dal punto di vista cronologico si tratta comunque in entrambi i casi di eventi successivi alla periodontite apicale acuta; il rilievo cronologico riveste una certa importanza a causa delle variazioni nel tempo a cui è soggetta la flora batterica canalare.

Il protocollo della ricerca è praticamente sovrapponibile a quello di Ogunteby (15). I risultati degli esami batteriologici condotti sui 10 prelievi effettuati sono riportati alla Tab. 5. I germi anaerobi sono presenti in 9 casi su 10 e costituiscono il 70% del totale

la più importante differenza è rappresentata dal decremento del numero di anaerobi facoltativi e dall'incremento del numero di anaerobi obbligati. Si evidenzia inoltre con molta maggiore frequenza la presenza di *Bacteroides*; questo dato è confermato da quanto emerge da un altro importante studio sulla componente batterica degli ascessi periapicali condotto da Van Winkelhoff e coll. nel 1985 (25). Gli AA riscontrarono la presenza di *Bacteroides* (lo studio era principalmente rivolto alla dimostrazione dei B-P *Bacteroides*) in tutti i 17 casi di ascessi odontogeni di origine endodontica.

Risultati invece in gran parte simili a quelli

si periapicali, che di solito rappresentano un momento antecedente rispetto all'infezione canalare cronica.

Nel lavoro di Ogunteby e coll. vengono studiati dal punto di vista batteriologico 10 ascessi periapicali in denti sani dal punto di vista parodontale, ciò per evitare possibili contaminazioni attraverso questa via. Venivano inoltre esclusi dallo studio i pazienti con storie di malattia reumatica, cardiopatie, diabete, alterazioni immunologiche e soggetti sottoposti nei due mesi precedenti a terapia antibiotica. I prelievi batteriologici venivano eseguiti tramite l'aspirazione con ago direttamente dal periapice attraverso l'osso alveolare, previa disinfezione della mucosa sovrastante. I denti esaminati presentavano cause di periodontite piuttosto diverse.

A questo proposito è da notare come, secondo tali dati, a prescindere dalle diverse cause, la flora batterica non presenti variazioni qualitative degne di nota.

Tuttavia altri AA affermano il contrario, ritenendo che la flora anaerobia obbligata sia presente più spesso nei canali infettati per via anacoretica. I risultati a Tab. 4. In tutte le aspirazioni si sono ottenute colture positive, con una media di 2,5 ceppi batterici per caso. Sono stati isolati sia anaerobi facoltativi che anaerobi obbligati, per un totale di 25 diverse specie. In 7 casi erano presenti sia anaerobi facoltativi che obbligati, in 2 casi (6 e 8) erano presenti solo anaerobi facoltativi, mentre in 1 caso (4) solamente anaerobi obbligati. Le specie presenti nel maggior numero di casi erano rappresentate dallo *Streptococcus mitis* (6 casi) e dal *Fusobacterium nucleatum* (7 casi). Da notare infine la sostanziale similitudine tra la flora isolata nei casi 9 e 10, con probabile invasione per via anacoretica, e quella isolata negli altri casi, con invasione per via coronale.

Williams e coll. nel 1983 (27) condussero uno studio sulla componente batteriologica negli ascessi di origine endodontica. La casistica comprendeva 10 casi di ascessi già diffusi attraverso l'osso alveolare. L'ascesso alveolare acuto rappresenta in pratica la vittoria dell'"invasore" sulle difese, per cui l'ascesso periapicale, anziché evolvere verso una periodontite apicale cronica con l'infezione confinata nel canale o verso la guarigione,

Tab. 7 - Da Keudell e coll. (1°)

ANAEROBI OBBLIGATI	
Polpa in necrosi: positivi n. 33 (isol. 21) - Polpa vitale: positivi n. 10 (isol. 0)	
Ceppi più frequentemente isolati	
<b>BASTONCELLI GRAM+</b> <i>Actinomyces</i> <i>Eubacterium</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	<b>COCCHI GRAM+</b> <i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>Peptococcus magnus</i>
<b>BASTONCELLI GRAM-</b> <i>Bacteroides</i> sp. <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides oralis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>	<b>COCCHI GRAM-</b> <i>Veillonella parvula</i>
ANAEROBI FACOLTATIVI	
Polpa in necrosi: positivi n. 33 (isol. 0) - Polpa vitale: positivi n. 10 (isol. 10)	
Ceppi più frequentemente isolati	
<i>Streptococchi alfa-emolitici</i> <i>Streptococchi gamma-emolitici (anemolitici)</i> <i>Stafilococcus epidermidis</i>	

dei germi isolati. Tranne il caso 1 (infezione monobatterica da *S. milleri*), si tratta sempre di flore miste con una media di 4,5 specie per caso. I bastoncelli anaerobi Gram-costituiscono il gruppo maggiormente rappresentato (37%) e tra essi i più spesso isolati sono il *Fusobacterium nucleatum* e i *Bacteroides*. Rilevante anche la percentuale di cocchi anaerobi Gram+, tra i quali la specie più spesso presente è il *Peptostreptococcus micros*, mentre il *Peptostreptococcus anaerobius* è presente solo nel caso N.10 in cui rappresenta però il 27% della flora totale. Tra i cocchi Gram+ anaerobi facoltativi sono stati isolati: *S. sanguis*, *S. milleri*, *S. intermedius* e *Staf. epidermidis*, ognuno di essi in una sola lesione tranne lo *Stafilococco* (2). C'è comunque da rilevare che, ad eccezione dello *S. sanguis*, essi costituivano quasi sempre la specie predominante nella lesione da cui venivano isolati. In pochissimi casi sono stati isolati bastoncelli anaerobi Gram+ quali *Lactobacilli* ed *Eubatteri*. Rispetto ai dati forniti da Ogunteby e coll.,

di Ogunteby sono quelli forniti da Dahlen e Bergenholz in un lavoro del 1980 (7), nel quale viene esaminato il contenuto di 13 canali radicolari. Di questi, 9 risultarono infetti, con una flora costantemente di tipo misto, ed una media di 4 specie per canale; i germi più frequentemente isolati furono *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus viridans* (alfa emolitico) e *Bacteroides*. In due soli casi venne isolato il *Fusobacterium nucleatum*, che si è invece dimostrato uno dei germi più frequenti in assoluto nelle lesioni periapicali di tipo ascessuale, il cui ambiente sembra favorirlo in misura maggiore di quello canalare.

È però da sottolineare che in questo studio tutti i denti esaminati erano indenni da carie e presentavano storie di traumi, dal che si può dedurre la probabile infezione per via anacoretica; il fatto va tenuto presente nonostante le dimensioni del problema siano abbastanza contenute.

Esiste tuttavia un'ulteriore conferma della tendenza a reperire un maggior numero di



anaerobi obbligati nei denti non infettatisi per via coronale. Dati significativi in proposito sono forniti da uno studio di Kobaiyashi e coll. del 1990 (11), intrapreso allo scopo di paragonare le flore batteriche parodontali ed endodontiche di denti coronalmente intatti, con polpa necrotica ed affetti da malattia parodontale. In esso si evidenzia una concentrazione di anaerobi obbligati all'intero dei canali di oltre l'85%, mentre gli anaerobi facoltativi si attestano su percentuali mediamente non superiori al 10-12%. Un altro studio (31) analizza la flora canalare di denti affetti da periodontiti apicali acute. Le specie più largamente rappresentate erano costituite da *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Propionibacterium acnes*, *Bacteroides*, *Streptococchi* anaerobi facoltativi. La specie tuttavia isolata nel maggior numero di casi era costituita da *Peptococcus*, la cui presenza si dimostrava più strettamente correlata ai casi di periodontite con dolore spontaneo e fuoriuscita di essudato purulento.

Risalendo idealmente dal periapice e dai canali radicolari, vediamo ora alcuni dati relativi a studi microbiologici sulla popolazione batterica isolata dalle camere pulpari.

I lavori di Keudell e coll. del 1976 (10) e di Wittgow e Sabiston del 1975 (30), rivestono notevole importanza ai fini dell'identificazione dei germi presenti nelle camere pulpari e della possibilità di comparare la flora batterica di denti invasi per via coronale e quella di denti invasi per via anacoretica. Lo studio di Keudell comprendeva 55 denti da sottoporre a terapia canalare, nei quali venivano effettuati i prelievi utilizzando coni di carta sterile. In precedenza, ai fini di ridurre al massimo la possibilità di contaminazione, i denti venivano detersi con ponice, isolati tramite diga di gomma, e disinfettati con Nitromersol per 3 minuti; in seguito un getto di CO<sub>2</sub> (97%) e H<sub>2</sub> (3%) veniva diretto verso la camera pulpare per qualche istante. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab. 6. Su 55 denti esaminati, 12 risultavano quindi non infetti; di questi, 9 presentavano necrosi pulpare e 3 polpa vitale. Le ipotesi, speculative ma verosimili, che possiamo fare sulle cause di ciò, sono che il gruppo di 9 fosse costituito da denti con necrosi pulpale asettica di origine traumatica, mentre la

condizione del gruppo di 3 elementi era probabilmente legata ad una flogosi acuta da causa batterica senza che però i batteri stessi avessero direttamente invaso la polpa: l'infiammazione cioè si era determinata a causa delle tossine batteriche giunte in polpa attraverso i tubuli dentinali.

Contrariamente a ciò, nei rimanenti 10 casi con polpa vitale in flogosi acuta, i batteri avevano già superato la barriera dentinale ed erano penetrati direttamente in polpa. L'analisi microbiologica quantitativa è riportata alla Tab. 7. Le specie batteriche isolate risultano sostanzialmente analoghe a quelle viste in precedenza, il che dimostrerebbe le

negativi erano costituiti da tessuti pulpari rivelatisi vitali al momento dell'apertura. In 31 casi dei 32 positivi fu riscontrata la presenza di anaerobi obbligati, mentre gli anaerobi facoltativi furono reperiti in 15 casi. I ceppi isolati sono elencati alla Tab. 8. Il dato che più colpisce è la massiccia presenza di anaerobi obbligati (31 su 32), il cui numero, se confrontato con quello ottenuto da Keudell (21 su 42), avvalorava l'ipotesi secondo cui i germi anaerobi obbligati, pur essendo protagonisti in tutte le infezioni canalari, lo sono in misura ancora maggiore in quelle dovute ad infezione per via anacoretica. Il motivo potrebbe essere rappresentato dal

Tab. 8 - Da Wittgow e Sabiston (30)  
sulla flora batterica delle camere pulpari

in denti infettati presumibilmente per via anacoretica

ANAEROBI OBBLIGATI (31/32)	
BASTONCELLI GRAM+	COCCHI GRAM+ (9/32)
Eubacterium (4)*	Peptostreptococcus micros (3)
Lactobacillus (1)	Peptostreptococcus intermedius (1)
Propionibacterium acnes (1)	Peptostreptococcus anaerobius (1)
	Specie non ident. (6)
BASTONCELLI GRAM-	COCCHI GRAM- (4/32)
Bacteroides ruminicola (8)	Veillonella parvula (4)
Bacteroides oralis (7)	
Bacteroides sp. (4)	
Bacteroides intermedius (2)	
ANAEROBI FACOLTATIVI (15/32)	
Lactobacillus sp. (1)	
Actinomyces sp. (1)	
Streptococcus sp. (8)	
Staphylococcus aureus (1)	
Non identificati (10)	

\* Il valore si riferisce al numero di casi in cui sono state isolate le specie in questione

Evidentemente nei Bastoncelli Gram+ non è sempre stato possibile definire con precisione la specie

scarse differenze esistenti tra la flora batterica della camera pulpare e quella dei canali radicolari. Vedremo comunque in seguito che ciò è vero solo in parte, in quanto altri AA hanno dimostrato la tendenza da parte dei batteri anaerobi obbligati a localizzarsi in quantità maggiore nelle zone più apicali dei canali radicolari.

Keudell e coll. (10) osservano inoltre che, secondo le loro casistiche, i batteri anaerobi obbligati pur essendo presenti in elevate concentrazioni in tutti i denti infetti, sono maggiormente rappresentati in quelli infettatisi per via anacoretica.

A questo proposito analizziamo gli interessanti risultati dello studio di Wittgow e Sabiston (30) sulla flora batterica delle camere pulpari di denti infettati presumibilmente per via anacoretica. Furono inclusi nello studio 40 denti, tutti incisivi, con corona intatta e segni evidenti di necrosi pulpare; in 30 casi era inoltre presente una lesione periapicale visibile ai Rx.

Di 40 prelievi effettuati, 32 risultavano positivi per la presenza di germi, e 4 degli 8 casi

fatto che nell'anacoresi gli anaerobi obbligati vengono a trovarsi in un ambiente (polpa necrotica con tensione di O<sub>2</sub> molto ridotta) a loro assolutamente favorevole già dall'inizio, per cui le interferenze da parte della flora anaerobica facoltativa sono molto minori rispetto ai casi di infezione per via coronale dove quest'ultima è, almeno nei casi iniziali, una protagonista di eguale se non maggiore importanza. Quest'ultima considerazione è ben dimostrata dai dati di Keudell in cui osserviamo l'assenza (in realtà e quasi certo che non si tratti di assenza totale, ma di presenza in concentrazioni talmente basse da impedirne l'isolamento) di anaerobi obbligati nelle polpe vitali e la sua contemporanea massiccia presenza di anaerobi facoltativi (10 su 13).

Un lavoro del 1975 di Rosengren e Winblad (16) evidenzia la possibilità da parte di un anaerobio facoltativo, lo *Streptococcus mutans*, di determinare flogosi apicali acute. Ciò è comunque enormemente facilitato dalle modalità della ricerca, che prevedono tra l'altro massicce inoculazioni di un parti-

Tab. 9 - Caratteristiche microbiologiche qualitative maggiormente costanti

nelle infezioni endodontiche

ANAEROBI OBBLIGATI	
BASTONCELLI GRAM+	COCCHI GRAM+
Eubacterium sp.	Peptostreptococcus anaerobius
Lactobacillus sp.	Peptostreptococcus micros
Difteroidi anaerobi	Peptococcus intermedius
BASTONCELLI GRAM-	COCCHI GRAM-
Bacteroides sp.	Veillonella sp.
Bacteroides melaninogenicus (3 ss.)	
Bacteroides oralis	
Bacteroides corrodens	
ANAEROBI FACOLTATIVI	
BASTONCELLI GRAM+	COCCHI GRAM+
Actinomyces viscosus	Streptococcus sp.
Lactobacillus sp.	Streptococcus milleri
	Streptococcus mitis
BASTONCELLI GRAM- (*)	COCCHI GRAM- (*)

colare ceppo di *S. mutans*, addestrato su determinati terreni di coltura a distruggere le fibre collagene che possono venire, in questo modo, alterate fino a divenire antigeniche.

Esiste quindi l'evenienza remota, sebbene possibile (caso 1 di Williams), di avere periodontiti apicali da anaerobi facoltativi senza intervento di anaerobi obbligati.

Abbiamo cercato di illustrare in questa prima parte le caratteristiche microbiologiche quantitative e qualitative relative alla flora endodontica. Sono stati presi in considerazione dati relativi a prelievi eseguiti in ascessi alveolari, ascessi periapicali, canali radicolari e camere pulpari. Ne sono emersi dati in gran parte simili, indicanti una flora batterica di tipo misto, una carica batterica media di 10, un numero medio di ceppi isolati di 3,9, con elevate percentuali di anaerobi obbligati e minori, seppure abbastanza costanti, percentuali di anaerobi facoltativi. È comunque da sottolineare come il numero di 3,9 specie mediamente isolate per ogni infezione mista, per quanto ottenuto dalla media dei valori espressi nei vari studi riportati, probabilmente non risponde alla realtà. Infatti, prendendo in considerazione soltanto i lavori della seconda metà degli anni '80, condotti con tecniche sempre più sofisticate e sensibili, il numero medio di specie tende ad essere più elevato.

Ad esempio lo studio di Sundquist e coll. del 1989 (21) evidenzia una media di 8,5 specie nei canali di denti con periodontite periapicale acuta. Sono state però evidenziate anche alcune differenze: gli ascessi alveolari hanno fatto registrare una maggior presenza di anaerobi obbligati e minore di anaerobi facoltativi rispetto agli ascessi periapicali.

A loro volta ascessi alveolari e periapicali hanno mostrato elevate percentuali di presenza di due particolari ceppi batterici, il *Fusobacterium nucleatum* ed i B-P *Bacteroides*, rispetto a quanto riscontrato nella flora canalare e della camera pulpare. La flora dei canali radicolari si è dimostrata sostanzialmente simile a quella delle camere pulpari ma con la particolarità di una maggiore concentrazione di anaerobi obbligati. La flora batterica delle polpe vitali in flogosi acute ha dimostrato contenuti quasi irrile-

vanti di germi anaerobi obbligati.

I tessuti pulpari invasi per via anacoretica hanno mostrato una leggera ma significativa maggior predisposizione ad ospitare germi anaerobi obbligati, rispetto ai tessuti pulpari infettati per via coronale.

Infine ci sembra interessante riproporre un'analisi della Tabella 2 che riteniamo illustri meglio di ogni commento il rivoluzionamento del pensiero in microbiologia endodontica verificatosi negli ultimi vent'anni. Questo grazie alle brillanti ricerche svolte di cui abbiamo analizzato i passi fondamentali. Alla luce di quanto visto, riassumiamo nella Tab. 9 le caratteristiche microbiologiche qualitative maggiormente costanti delle infezioni endodontiche.

## RIASSUNTO

Dall'analisi della letteratura internazionale risulta inequivocabilmente il ruolo centrale ricoperto dall'infezione canalare nella genesi delle lesioni periapicali. È stato infatti dimostrato (13) che il tessuto pulpare necrotico sterile è del tutto incapace di determinare reazioni flogistiche nel periapice. L'infezione endodontica, con rare eccezioni, si estende ai tessuti di sostegno dei denti solo nel caso di infiammazione acuta degli stessi (periodontite apicale acuta, ascesso alveolare acuto, ascesso ricorrente), mentre nelle infiammazioni croniche rimane confinata nello spazio endodontico. Si tratta di un'infezione mista, data da una popolazione batterica composta da batteri anaerobi obbligati e da batteri anaerobi facoltativi.

Tra gli anaerobi obbligati, i ceppi di più fre-

\* Isolati molto raramente e comunque scarsamente significativi

quente riscontro sono i *Bacteroides* e i *Fusobacterium* (*Bastoncelli* Gram-), i *Difteroidi* anaerobi (*Bastoncelli* Gram+), i *Peptostreptococcus* (*Cocchi* Gram+) ed infine le *Veillonella* (*Cocchi* Gram-). Gli anaerobi facoltativi sono maggiormente rappresentati dagli *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Streptococchi* e *Stafilococchi*.

## SUMMARY

In the international literature it is shown the central role of root canal infection in the etiology of periapical lesions. As a matter of fact it has been proved (13) that sterile necrotic pulp tissue is completely unable to cause inflammatory reactions at the periapex.

Infection of endodontic origin extends to the supporting tissues of the tooth only in the case of their acute inflammation (e.g. acute apical periodontitis, acute alveolar abscess, phoenix abscess). On the other hand in chronic inflammation bacteria remain confined in the endodontic space. Only few exceptions to this general rule have been experimentally proved.

In endodontics we deal with a mixed infection which is composed by obligate anaerobes and by facultative anaerobes.

The most frequently found obligate anaerobes are *Bacteroides* sp. and *Fusobacterium* sp. (Gram- rods) Anaerobic *Diphtheroides* (Gram+ rods) *Peptostreptococcus* sp. (Gram+ cocci) and *Veillonella* sp. (Gram-cocci).

*Actinomyces* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., and *Staphylococcus* sp. are the facultative anaerobes most frequently found.



## BIBLIOGRAFIA

- 1 - *Andreasen J O, Rud J*: "A histobacteriological study of dental and periapical structures after endodontic surgery". *Int J Oral Surg* 1972; 1: 272-81
- 2 - *Appleton J T L*: "Clinical dental bacteriology". *Dent Cosmos* 1924; 3: 251-53
- 3 - *Blayney J R*: "Tissue reaction in the apical region to known types of treatment". *J Dent Res* 1929; 9: 221-3
- 4 - *Bologna G, Marcolina D*: "La componente batterica nella periodontite cronica apicale". *Min Stom* 1981; 30: 505-10
- 5 - *Burket L W, Burn C G*: "Bacteriemias following dental extraction". *J Dent Res* 1937; 16: 521-3
- 6 - *Cicciù D, Rossetti B, Greco S, Gismondo M R, Romeo M A*: "Correlazione batteriologica fra granulomi apicali e cisti radicolari". *Min Stom* 1983; 32: 659-62
- 7 - *Dahlen G, Bergenholtz G*: "Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps". *J Dent Res* 1980; 59: 1033-40
- 8 - *Grossman L I*: "Bacteriologic status of periapical tissue in 150 cases of infected pulpless teeth". *J Dent Res* 1959; 38: 101-49
- 9 - *Hugoson A, Koch G*: "Oral health in 1000 individuals aged 3-70 years in the community of Jonkoping, Sweden". *Swed Dent J* 1979; 3: 69-87
- 10 - *Keudell K, Conte M, Fujimoto L, Ernest M, Berry H G*: "Microorganisms isolated from pulp chambers". *J Endodon* 1976; 2: 146-48
- 11 - *Kobayashi T, Hajashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K*: "The microbial flora from root canals and periodontal pockets of nonvital teeth associated with advanced periodontitis". *Int Endod J* 1990; 23: 100-6
- 12 - *Langeland K, Rodrigues H, Bushell A, Block R*: "A histopathologic, histobacteriologic and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42: 656-75
- 13 - *Moller A J R, Fabricius L, Dahlen G, Ohman A E, Heyden G*: "Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys". *Scand J Dent Res* 1981; 89: 475-84
- 14 - *Nair P N R*: "Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions". *J Endodon* 1987; 13: 29-39
- 15 - *Ogunteby B, Slee A M, Tanzer J M, Langeland K*: "Predominant microflora associated with human dental periapical abscesses". *J Clin Microbiol* 1982; 15: 964-6
- 16 - *Rosengren L, Winblad B*: "Periapical destructions caused by experimental pulpal inoculation of *Streptococcus mutans* in rats". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1975; 39: 479-87
- 17 - *Shay D E*: "The selection of a suitable medium for culturing root canals". *J Dent Res* 1947; 26: 327
- 18 - *Shovelton D S, Sidway D A*: "Infection in root canals". *Brit Dent J* 1960; 108: 115-8
- 19 - *Shovelton D S*: "The presence and distribution of microorganisms within non vital teeth". *Brit Dent J* 1964; 117: 101-7
- 20 - *Slack G L*: "The bacteriology of infected root canals and in vitro penicillin sensitivity". *Brit Dent J* 1958; 95: 211
- 21 - *Sundquist G, Johansson E, Sjogren U*: "Prevalence of Black-Pigmented *Bacteroides* species in root canal infections". *J Endodon* 1989; 15: 13-9
- 22 - *Tronstadt L, Barnett F, Cervone F*: "Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment". *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 73-7
- 23 - *Tronstadt L, Barnett F, Riso K, Slots J*: "Extraradicular endodontic infections". *Endod Dent Traumatol* 1987; 3: 86-90
- 24 - *Tziafas D*: "Experimental bacterial anachoresis in dog dental pulps capped with calcium hydroxide". *J Endodon* 1989; 15: 591-5
- 25 - *Van Winkelhoff A J, Carlee A W, De Graaf J*: "*Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses". *Infect Immunol* 1985; 49: 494-7
- 26 - *Vertucci F J, Williams R G*: "Furcation canals in the human mandibular first molars". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 38: 308
- 27 - *Williams B L, McCann G F, Schoenknecht F D*: "Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin". *J Clin Microbiol* 1983; 18: 770-4
- 28 - *Winkler T F, Mitchell D F, Healey H I*: "A bacterial study of human periapical pathosis employing a modified Gram tissue stain". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972; 34: 109-15
- 29 - *Winkler K C, Van Amerongen J*: "Bacteriologic results from 4000 root canal cultures". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1959; 12: 857
- 30 - *Wittgow W, Sabiston C B*: "Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps". *J Endodon* 1975; 11: 168-71
- 31 - *Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T, Sagawa H*: "Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals in teeth with periapical pathosis". *J Endodon* 1987; 13: 24-8
- 32 - *Zavitosky J, Dzink J A, Onderdonk A, Bartlett J*: "Quantitative bacteriology of endodontic infections". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 49: 171-4