

Trabajos Originales:

DETECCIÓN DE *Enterococcus faecalis* EN DIENTES CON FRACASO EN EL TRATAMIENTO ENDODÓNTICO

Recibido para arbitraje: 12/06/2008

Aceptado para publicación: 19/06/08

- **Germán Pardi.** Profesor Titular, Jefe de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología, U.C.V.
- **Carolina Guilarte.** Profesora Asociado de la Cátedra de Microbiología. Jefe del Departamento de Ciencias Básicas II, Facultad de Odontología, U.C.V.
- **Elba Inés Cardozo.** Profesora Asociado de la Cátedra de Farmacología y Terapéutica Odontológica, Facultad de Odontología, U.C.V.
- **Elsi Natalí Briceño.** Profesora Asistente de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología, U.C.V.

RESUMEN

Enterococcus faecalis es una bacteria en forma de coco dispuesta en cadenas o pares, Gram positiva, anaerobia facultativa, inmóvil y no esporulada que en años recientes, ha atraído la atención de diversos investigadores porque ha sido identificada como una causa frecuente de infección del sistema de conductos radiculares en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. Una característica notable de esta especie la constituye su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para otras bacterias, entre estos en presencia de Hidróxido de Calcio. Se ha sugerido que la resistencia de *E. faecalis* al Hidróxido de Calcio permite a esta bacteria sobrevivir en presencia del medicamento y proliferar cuando la acción de este finaliza, resultando en la colonización e infección del conducto radicular, y es por ello que el objetivo del presente estudio fue detectar e identificar a este microorganismo en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. Para este fin, se seleccionaron 20 dientes obturados con conos de gutapercha y cemento a base de Hidróxido de Calcio y que presentaban tratamiento endodóntico con fracaso, y como grupo control, 20 dientes con patología pulpar y/o periapical y que no habían sido tratados endodónticamente. Las muestras de los conductos radiculares fueron tomadas con conos de papel esterilizados, los cuales fueron colocados en caldo tioglicolato una vez que se tomaron estas y luego se sembraron en el medio Agar Enterococcus. Los medios fueron incubados en la estufa a 37°C por 72 horas en condiciones de microaerofilia. La identificación definitiva de *E. faecalis* se realizó a través del sistema de identificación rápida API Rapid Strep. Los resultados obtenidos reflejaron que en 12 (60%) de los 20 dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico se pudo detectar a *E. faecalis*, lo que permitió evidenciar la alta frecuencia con la cual se pudo encontrar a este microorganismo. No obstante, en el otro grupo de 20 dientes, también se encontró la bacteria en 5 de estos (25%).

Palabras Clave: *Enterococcus faecalis*, dientes, tratamiento endodóntico, fracaso.

ABSTRACT

Enterococcus faecalis is a coccal-shaped, Gram positive, facultative anaerobic and non motile bacteria. In recent years, several researchers have been interested in *E. faecalis* because this species has been identified like a frequent microorganism in endodontic treatment with failure. *E. faecalis* can grow and survive in presence of calcium hydroxide. Resistant capacity of *E. faecalis* to calcium hydroxide into root-filled teeth results in proliferation of this bacteria and subsequently colonization and infection of root canal. The aim of this study was detect and identify this microorganism in teeth with failure in endodontic treatment. Twenty (20) root-filled teeth with guttapercha points and calcium hydroxide cement were selected. These teeth had endodontic treatments with failure. Control group was conformed by twenty (20) pulpar and/or periapical infection teeth without endodontic treatment. Samples of root canals were taken using sterile paper points, inoculated in tioglycolate broth media and growth obtained in this media were transferred to Agar Enterococcus plates and incubated at 37°C for 72 hours in microaerofilical conditions. Identification of *E. faecalis* was possible by using API Rapid Strep identification kit. *E. faecalis* was isolated in 12 out of 20 teeth (60%) with endodontic failure, and also was found in 5 out of 20 teeth (25%) with pulpar and/or periapical infection. These findings reflected the high frequency that *E. faecalis* was detected and identified in root-filled teeth with endodontic failure.

Key words: *Enterococcus faecalis*, teeth, endodontic treatment, failure.

INTRODUCCIÓN

El Género *Enterococcus* engloba un conjunto de especies morfológicamente semejantes a los estreptococos. Las más frecuentemente aisladas en clínica son *Enterococcus faecalis* (80-90%) y *Enterococcus faecium* (5-10%). Causan infecciones muy diversas y poseen un creciente interés en el caso de los procesos oportunistas. Se asocian en parejas y cadenas cortas y si bien, su hábitat natural es el intestino, se han podido aislar a veces como microbiota normal en la mucosa bucal y dorso de la lengua. También se han descrito aislamientos de infecciones pulpo-periapicales y de bolsas periodontales(1).

El factor principal asociado con los fracasos en el tratamiento endodóntico es la persistencia de la infección microbiana en el sistema de los conductos radiculares(2). Los microorganismos implicados pueden haber sobrevivido a los efectos de la aplicación de los procedimientos biomecánicos que se realizan durante la ejecución de dicho tratamiento(3) o pueden haber invadido los conductos como consecuencia de las filtraciones que se suscitan en la corona de los dientes con tratamientos de conducto obturados(4,5).

Diversos estudios han revelado que la microbiota de los dientes con fallas en el tratamiento endodóntico difieren de la microbiota encontrada normalmente en los conductos de dientes no tratados(6,7,8,9). La microbiota que se encuentra en los dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico es predominantemente anaerobia facultativa y Gram positiva, siendo *E. faecalis* la especie que se aísla con mayor frecuencia(10).

E. faecalis es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado. El tamaño de cada célula oscila entre 0,5 y 0,8 micrómetros y es habitante normal del tracto gastrointestinal humano. Esta bacteria ha atraído recientemente la atención de diversos investigadores porque ha sido identificada como una causa frecuente de infecciones periapicales persistentes(6,7,11,12,13,14).

La temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de este microorganismo es de 35°C, no obstante, se ha observado crecimiento entre 10°C y 45°C. Todas las cepas pueden crecer en medios que contengan esculina, la cual hidrolizan en presencia de sales biliares al 40% (medio agar bilis-esculina). Casi todas las cepas son homofermentativas, siendo el ácido láctico el producto final principal de la fermentación de la glucosa, no producen gas y no contienen enzimas citocrómicas(15,16).

E. faecalis posee una pared celular con antígenos del grupo D, el cual es un ácido lipoteicoico que se encuentra asociado con la membrana citoplasmática de la bacteria y que contiene residuos de glicerol. Además, posee gran cantidad de mureina y ácido teicoico(16).

Una característica notable de *E. faecalis* la constituye su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para muchas bacterias, en particular zonas con altas concentraciones de sales (6,5% de Cloruro de Sodio), temperaturas extremas (15-60°C) y puede resistir además a la acción de colorantes como Azul de Metileno al 0,1%. Esta capacidad de resistencia por parte de *E. faecalis* en microambientes tóxicos está relacionada con su capacidad de supervivencia en los conductos radiculares de dientes que han sido sometidos a tratamiento endodóntico y en los cuales los nutrientes son limitados, añadiéndose a esta situación el hecho de que algunos agentes antimicrobianos pudieran influir en que esta especie permanezca en los conductos de los dientes afectados. Debido a su excelente acción bactericida, el Hidróxido de Calcio es el agente antimicrobiano que se emplea de elección como medicamento intrarradicular(11).

Un aspecto importante relacionado con la actividad antimicrobiana del Hidróxido de Calcio es su habilidad para mantener el pH del medio (conducto radicular obturado) en valores cercanos a 12. Algunos estudios han demostrado la supervivencia de *E. faecalis* en el ambiente alcalino generado por el Hidróxido de Calcio(17,18,19,20,21,22,23,24). Se ha sugerido que la resistencia de *E. faecalis* al Hidróxido de Calcio permite a esta bacteria sobrevivir en presencia del medicamento y proliferar cuando la acción de este finaliza. Ello resulta en la colonización e infección del conducto radicular(25).

Algunas investigaciones han reportado la presencia de biopelículas (biofilms) de *E. faecalis* en el sistema de conductos de dientes monorradiculares extraídos y que habían sido obturados con cemento a base de Hidróxido de Calcio(19). La formación de la biopelícula constituye una evidencia contundente de que *E. faecalis* puede colonizar los conductos radiculares medicados(26,27,28). Cuando esta especie crece en las biopelículas, puede ser hasta mil veces más resistente a la acción de los antimicrobianos que cuando se halla como bacteria planctónica (suspendida en un medio líquido y no adherida a ninguna superficie)(29). Si la formación de biopelículas que contienen *E. faecalis* ocurre *in vivo*, ello pudiera considerarse como un mecanismo que permite a este microorganismo resistir al tratamiento antimicrobiano(19).

También se han realizado otras investigaciones dirigidas a aclarar el papel que juegan los factores de virulencia de *E. faecalis* en la colonización por parte de esta bacteria en un medio tan pobre en nutrientes como el conducto radicular medicado. La adhesión a la superficie de la dentina constituye un paso esencial que determina el potencial patógeno de este microorganismo en el conducto radicular medicado(30,31). Puesto que la dentina contiene colágeno y otras proteínas, se sugiere que las proteasas sintetizadas por *E. faecalis*, así como la proteína de unión al colágeno (Ace) pudieran participar o por lo menos influir en la adhesión bacteriana, y por lo tanto permitir que la bacteria colonice el conducto radicular(30).

La identificación de cepas de enterococos se puede realizar bien sea por métodos convencionales o mediante el empleo de sistemas de identificación rápida utilizando las galerías para estreptococos Rapad Strep (Biomerieux), pudiéndose obtener resultados similares en lo que a frecuencia de detección de especies de *Enterococcus* se refiere, por lo que ambos métodos son ampliamente recomendados para identificar a estos microorganismos(32).

En base a todo lo anteriormente expuesto, el objetivo fundamental de esta investigación fue detectar a *E. faecalis* en pacientes que tenían dientes con tratamiento endodóntico concluido (obturados con cemento a base de Hidróxido de Calcio) y que presentaban fallas en el mismo, así como demostrar que esta bacteria se encontró en un mayor número de casos de dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico en comparación con la frecuencia con la que se encontró en casos de dientes no tratados endodónticamente y que presentaban patología pulpar y/o periapical, más aún si se toma en consideración por una parte, la importancia que en los últimos años ha recobrado esta especie como un patógeno importante en los conductos radiculares re-infectados y por la otra, el hecho de es resistente a una amplia variedad de agentes antimicrobianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y DIENTES.

Para la ejecución de este estudio, se seleccionaron dos grupos de dientes provenientes de pacientes adultos de ambos sexos que acudían a la Sala Clínica del Post-Grado de Endodoncia, ubicada en el Piso 6 de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela: a) Grupo Experimental o de estudio: Conformado por 20 dientes mono o multirradiculares con tratamiento endodóntico concluido (conductos radiculares obturados con gutapercha cementada con material a base de Hidróxido de Calcio) y que presentaban fallas en el mismo, corroboradas tanto clínica como radiográficamente. El tratamiento endodóntico de estos dientes tenía una duración de 4 años post-obturación; y b) Grupo Control: Constituido por 20 dientes mono o multirradiculares que presentaban patología pulpar y/o periapical y que no habían sido tratados endodónticamente. No se incluyeron en este estudio aquellos pacientes que estaban médicamente comprometidos o que hubiesen recibido tratamiento con antimicrobianos en los últimos 3 meses. Se elaboró un documento de consentimiento informado, a fin de que cada paciente, una vez que se le explicara las razones por las que había sido seleccionado para realizarle la toma de muestra, así como la finalidad de este estudio, autorizara a través de su firma la participación en el mismo.

2. PREPARACIÓN DE LA CÁMARA DE ACCESO.

Todas las restauraciones de la corona de los dientes seleccionados, así como las caries que podían presentar estos, fueron previamente eliminadas, a fin de poder acceder a l sistema de conductos radiculares. Luego de realizar la cámara de acceso (previo aislamiento total del diente con dique de goma y desinfección del mismo con agua oxigenada al 30% y con solución de hipoclorito de sodio al 2,5%), se procedió a la desobturación de los conductos (en los dientes incluidos en el grupo experimental). La desobturación de cada conducto se realizó por procedimientos mecánicos, empleando para ello fresas Gates Glidden a baja velocidad y bajo ninguna circunstancia mediante el uso de solventes químicos (Xilol). Después de la desobturación, los conductos se irrigaron con solución salina estéril para remover restos de material de obturación que pudieran haber quedado en las paredes de los mismos y para humedecerlos, previo a la toma y recolección de las muestras. La irrigación de los conductos con solución salina se realizó de igual forma en los dientes del grupo control con la finalidad de remover restos necróticos de pulpa que pudieran interferir a la hora de tomar la muestra. El exceso de solución salina que quedaba en los conductos, se eliminó, empleando para ello puntas de papel absorbente previamente esterilizadas.

3. TOMA, RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS.

La toma de las muestras se realizó en cada caso introduciendo dentro del conducto radicular una punta de papel estéril hasta la longitud que indicaba la conductometría y dejándolo por 1 minuto, empleando para ello pinzas algodonerías previamente esterilizadas. Luego se retiró la punta de papel y se introdujo en el medio de transporte para ser llevado al laboratorio (caldo tioglicolato previamente reducido): En los casos de dientes monorradiculares, se tomaron dos muestras por cada diente, debido a que el conducto era más ancho y por lo tanto, había que asegurarse de tomar la mayor cantidad de muestra posible. En los dientes multirradiculares, se introdujo una punta de papel por cada conducto, ya que en estos casos, los conductos eran más estrechos.

4. SIEMBRA DE LAS MUESTRAS E INCUBACIÓN DE LOS MEDIOS.

Una vez que los medios de transporte conteniendo las muestras fueron llevados al Laboratorio de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, se procedió en primer lugar a mezclarlos por 1 minuto en el agitador a fin de homogeneizar el contenido. Posterior a esto, se tomaron con la micropipeta 50 µl del medio conteniendo el inóculo (sin diluir y con dilución de 10⁻¹) y se colocaron sobre la superficie del medio selectivo Agar *Enterococcus*, extendiendo el inóculo por toda la superficie del medio con una varilla de vidrio previamente esterilizada. Luego se incubaron los medios a la estufa a 37°C por 72 horas en condiciones de microaerofilia.

5. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA.

Esta se hizo al visualizar las colonias que crecieron sobre la superficie del medio de cultivo Agar *Enterococcus*, y se

tomaron en consideración los aspectos relacionados con la forma, tamaño, color, consistencia y aspecto de sus bordes, empleando para ello el microscopio estereoscópico ZM modelo 160 A (Digystem Laboratory Instruments Inc., Taiwán).

6. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA.

A partir de las colonias que crecieron sobre la superficie del medio Agar *Enterococcus*, se tomó una pequeña porción de inóculo con un asa de platino previamente esterilizada, se colocó en la lámina portaobjeto y se procedió a realizar la coloración de Gram, a fin de visualizar con el lente de inmersión (100x) del microscopio de luz marca Leitz los morfotipos característicos sugerentes de pertenecer al Género *Enterococcus*.

7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.

Para la detección de *E. faecalis* se utilizó el sistema de identificación rápida de estreptococos API Rapid Strep (Biomerieux), de la siguiente manera:

- Se preparó una suspensión de colonias puras, provenientes del medio Agar *Enterococcus* en agua destilada estéril, a una turbidez equivalente al patrón N° 4 de la escala de Mc Farland, empleando para ello un densitómetro digital (Biomerieux).
- Se añadió dicha dilución a cada una de las microcúpulas de la tira, con la ayuda de una micropipeta.
- Se realizaron dos incubaciones en la estufa a 37°C, una durante 4 horas (para la prueba de hidrólisis de la esculina), y la otra durante 12 horas para las pruebas de fermentación de carbohidratos (manitol, glucosa, arabinosa, lactosa, trehalosa, rafinosa y almidón).
- La interpretación y lectura de las galerías se realizó luego transcurrido el tiempo requerido de incubación en la estufa de acuerdo a esquemas que acompañan al equipo. Como control de calidad se empleó una cepa conocida de *E. faecalis*.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LAS COLONIAS:

Las colonias presentes sobre la superficie del medio Agar *Enterococcus* en los casos que resultaron positivos, se caracterizaron por ser de color crema o marrón claro, redondas, con un tamaño que oscilaba entre 1 y 2 mm de diámetro, ligeramente elevadas, de aspecto cremoso y con bordes continuo (FIGURA 1).

IDENTIFICACIÓN DE MORFOTIPOS BACTERIANOS:

Al realizar las observaciones microscópicas luego de realizar la coloración de Gram, se visualizaron cocos en pares o en cadenas Gram positivos (color morado), sugerentes de pertenecer al Género *Enterococcus*. Los morfotipos bacterianos fueron observados a partir de las colonias que crecieron en el medio Agar *Enterococcus* en los casos que resultaron positivos.

DETECCIÓN DE *E. faecalis*:

Luego de identificar aquellos morfotipos bacterianos sugerentes de pertenecer al Género *Enterococcus* y en base a ello, sembrar cada inóculo proveniente de las colonias donde hubo crecimiento bacteriano en las galerías del sistema de identificación rápida Rapid Strep (Biomerieux), *E. faecalis* se detectó en 12 (60%) de los 20 dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico, considerándose estos casos como positivos, mientras que en el medio de cultivo (Agar *Enterococcus*) donde se sembraron las muestras provenientes de los 8 dientes restantes (40%), no se evidenció crecimiento microbiano, siendo por lo tanto estos casos negativos (FIGURA 2). Este microorganismo también se detectó en 5 (25%) de los 20 dientes que presentaban patología pulpar y/o periapical sin tratamiento endodóntico, en tanto que no se encontró en las muestras tomadas de los 15 dientes restantes (75%) que presentaban esta condición (FIGURA 3).

FIGURA 1: Colonias de *E. faecalis* en el medio Agar *Enterococcus*.

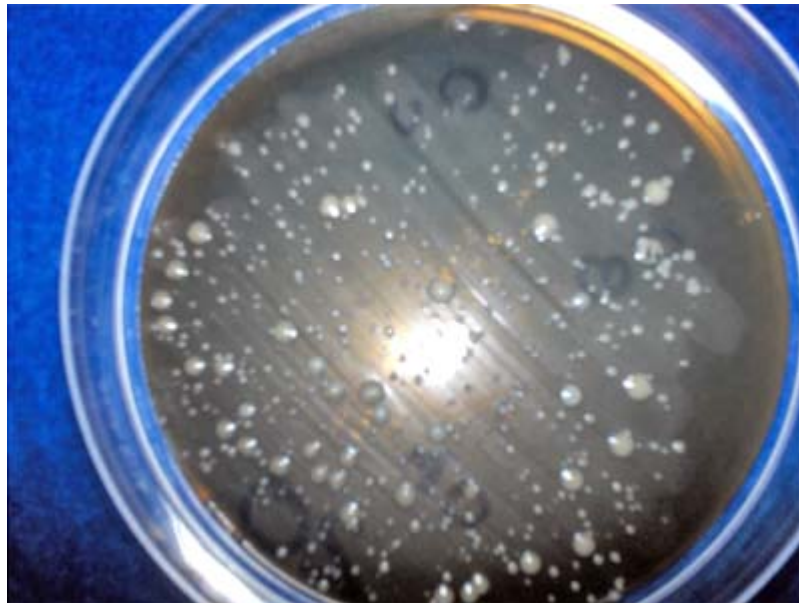


FIGURA 2: Frecuencia de E. faecalis en dientes con tratamiento endodóntico fracasado

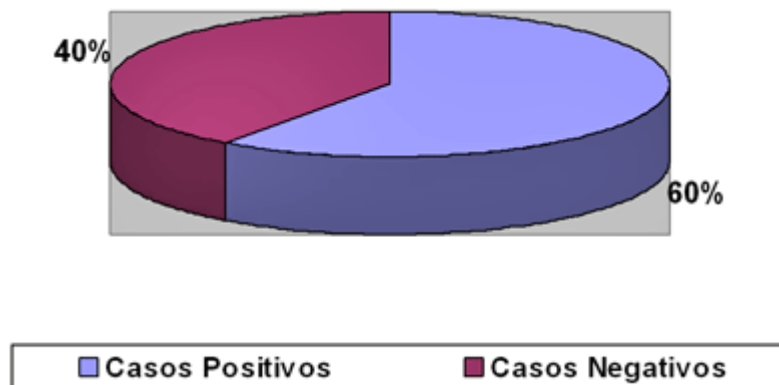
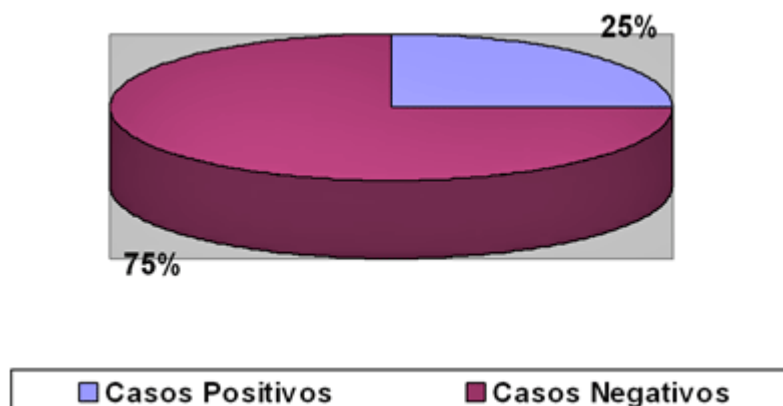


FIGURA 3: Frecuencia de E. faecalis en dientes con patología pulpar y/o periapical sin tratamiento endodóntico



DISCUSIÓN

Los enterococos son microorganismos que forman parte de la microbiota normal de la cavidad bucal y del tracto gastrointestinal y han sido reconocidos como potenciales patógenos humanos causando el 12% de las infecciones nosocomiales, incluyéndose entre estas las infecciones del tracto urinario, infecciones intraabdominales y endocarditis infecciosa (16,33). Estas bacterias pueden crecer y sobrevivir en ambientes áridos y es así como se pueden encontrar en suelo, alimentos, agua, plantas y animales como pájaros e insectos(15).

Hasta mediados de 1980, los enterococos no eran considerados como un Género bacteriano separado, a pesar de sus características particulares que lo diferenciaban de los estreptococos. Algunas características como su forma, disposición celular y tinción, así como la ausencia de catalasa, lo ubicaban dentro del Género *Streptococcus*. Con la clasificación serológica de Lancefield y el descubrimiento del antígeno del grupo D, los enterococos fueron clasificados como estreptococos del grupo D tolerantes al cloruro de sodio. Sin embargo, el antígeno del grupo D es un ácido lipoteicoico, uno de los componentes que se encuentra en casi todas las bacterias Gram positivas y difiere del antígeno de los carbohidratos de la pared celular de los otros estreptococos(16).

Fue en 1984 cuando los enterococos fueron reclasificados como un Género independiente, luego de los estudios de hibridación ADN-ADN o ADN-ARN demostrando mayores diferencias en comparación con los estreptococos y es en ese momento que se introdujeron dos nuevos Géneros: *Enterococcus* y *Lactococcus*(16).

Para que los enterococos puedan actuar como patógenos primero deben adherirse a los tejidos del hospedero; estos pueden hacerlo a través de ligandos adhesivos específicos a la matriz extracelular de los mismos. Durante el proceso de invasión a los tejidos, los enterococos deben encontrarse en un medio ambiente con potenciales de óxido reducción elevados, nutrientes esenciales limitados, leucocitos fagocíticos y otras defensas del hospedero. Todos estos factores ayudan a que se expresen genes que favorecen el crecimiento de estos microorganismos(34).

Existen 23 especies pertenecientes al Género *Enterococcus* y éstas a su vez se dividen en 5 grupos basados en su interacción con el manitol, el sorbitol y la arginina. *E. faecalis* pertenece al mismo grupo de *E. faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundtii* y *Enterococcus gallinarum*. *E. faecalis* responde negativamente a la arabinosa y excepto por algunas variantes atípicas, es el único miembro del grupo que utiliza el piruvato y tolera el telurito(6).

Está claramente establecido el hecho de que *E. faecalis* se encuentra presente en infecciones del sistema de conductos radiculares, sobretodo en aquellas asociadas con el fracaso del tratamiento endodóntico y es por ello que en el presente estudio se decidió demostrar la frecuencia con la que esta especie se encontraba en dientes con tratamiento endodóntico fracasado (obturados con conos de gutapercha y cemento a base de hidróxido de calcio), en comparación con la frecuencia con la que se detectó ésta, en dientes que presentaban infección pulpar y/o periapical sin haber sido tratados endodónticamente, ya que en nuestro país, son pocos los estudios que se han realizado al respecto y los datos que se tienen, provienen fundamentalmente de investigaciones realizadas y publicadas en el extranjero.

Los resultados de esta investigación reflejaron que *E. faecalis* se detectó e identificó en una alta proporción del grupo de pacientes con dientes que presentaban fracaso en el tratamiento endodóntico, y en este sentido, coinciden con lo expresado en diversos estudios los cuales señalan a esta especie como el microorganismo mayormente implicado en la reinfección del sistema de conductos radiculares en dientes con tratamientos endodónticos fracasados, con porcentajes que varían entre 12 y 77%(7,8,9,10,35,36,37,38).

La habilidad por parte de *E. faecalis* de causar enfermedades periapicales y fracasos crónicos en dientes tratados endodónticamente puede deberse a su capacidad de invadir los túbulos dentinarios y mantenerse viable dentro de estos. Es por ello que se ha tratado de identificar el posible mecanismo que explique como esta bacteria puede sobrevivir y crecer dentro de los túbulos dentinarios, y a la vez reinfectar un conducto radicular obturado. En este sentido, Love(39) realizó un estudio en el cual colocó muestras conteniendo *E. faecalis* en caldo de infusión cerebro-corazón que contenía distintas cantidades de suero humano por un período de 56 días. Los resultados de este estudio permitieron demostrar que las células de este microorganismo se mantenían viables y eran capaces de penetrar en los túbulos dentinarios y de adherirse al colágeno tipo I presente en la dentina en presencia de suero humano.

Otro aspecto importante en relación con la alta frecuencia con la que se detectó *E. faecalis* en los dientes con fracaso endodóntico obturados con gutapercha y cemento a base de Hidróxido de Calcio es el relacionado con su habilidad para crecer en medios con pH ácido y alcalino, donde este último inhibe habitualmente el crecimiento y supervivencia de muchos otros microorganismos. Con respecto a esto, Mc Hugh y col.(40), evaluaron el pH necesario para inhibir *in vitro* su crecimiento y demostraron que se necesita un pH mayor de 11,0 para la erradicación de este microorganismo.

Estos investigadores refieren que el cemento a base de Hidróxido de Calcio como medicación intraconducto puede alcanzar un pH crítico dentro del sistema de conductos radiculares. Sin embargo, la ubicación de *E. faecalis* dentro de los túbulos dentinarios es incierta. Aparentemente, el pH crítico mayor de 11,0, también conocido como umbral de erradicación no se logra en la dentina luego de la aplicación del Hidróxido de Calcio. Esto hace suponer que esta especie puede persistir en los túbulos dentinarios y quizás reinfectar el conducto radicular(40).

En este mismo sentido, Nakajo y col.(41), evaluaron las propiedades bioquímicas de *E. faecalis* que le confieren la resistencia ácido-alcalina, comparándola con la de *Streptococcus mutans*. *E. faecalis* mostró una ácido-resistencia similar a *S. mutans* y una mayor alcalino-resistencia. Estos autores sugieren que la resistencia al pH por parte de *E. faecalis* se puede atribuir a la resistencia de la membrana citoplasmática frente a medios ácidos o alcalinos junto con el sistema de transporte de protones vinculado al ATP.

Molander y col.(6) señalan que los microorganismos anaerobios facultativos son más resistentes a las terapias antimicrobianas que los microorganismos anaerobios estrictos, y gracias a esto persisten con mayor frecuencia en el sistema de conductos radiculares luego de procedimientos endodónticos inadecuados. Estos microorganismos pueden sobrevivir, en una fase inactiva, con una actividad metabólica baja por un período determinado de tiempo, y factores como la filtración coronal durante o después del tratamiento de conducto pudiesen cambiar las condiciones nutricionales y desencadenar el crecimiento bacteriano. Ello también pudiera explicar la alta frecuencia con la que se encontró a *E. faecalis* en los dientes que presentaban fracaso en el tratamiento endodóntico.

Llama la atención la baja proporción de casos en los cuales se pudo aislar a *E. faecalis* en el grupo de dientes que presentaban patología pulpar y/o periapical y que no habían sido tratados endodónticamente. Si bien es cierto que los resultados de la presente investigación en cuanto a este particular se refiere, son similares a los obtenidos por algunos investigadores(35,37,42), también resulta cierto el hecho de que los resultados obtenidos por otros investigadores difieren de los de este estudio, ya que en el caso de la investigación realizada por Baumgartner y Falkler(43), *E. faecalis* se detectó con una frecuencia superior (40%) a la reflejada en la presente investigación y en los casos de los estudios realizados por Gomes y col.(44) y Lana y col.(45), la frecuencia con la que se encontró esta especie fue inferior a la del presente estudio (4 y 10% respectivamente).

Es importante destacar que las infecciones endodónticas primarias o los dientes no tratados endodónticamente con necrosis pulpar, se caracterizan por presentar una microbiota mixta, compuesta principalmente por microorganismos anaerobios estrictos tanto Gram negativos como Gram positivos. Generalmente se pueden encontrar más de tres especies distintas de microorganismos dentro de un conducto radicular(37,44,46).

Tomando como referencia lo expresado en el párrafo anterior, sería lógico suponer que la baja proporción de casos en los cuales se detectó a *E. faecalis* en casos de dientes con patología pulpar y/o periapical sin tratamiento endodóntico, pueda deberse en buena parte a que se presenten situaciones de antagonismo microbiano dentro del conducto radicular, generadas bien sea por la competencia entre especies por los nutrientes del medio, o por la producción de sustancias producidas por parte de los microorganismos anaerobios estrictos (bacteriocinas) que inhiban el crecimiento de *E. faecalis* en el sistema de conductos radiculares o que impidan su permanencia en el mismo.

E. faecalis posee un gran número de factores de virulencia que le permiten la colonización del hospedero y de la matriz extracelular, la competencia con otros microorganismos, resistencia en contra de los mecanismos de defensa del hospedero, y la producción de cambios patológicos generados directamente a través de la producción de enzimas tóxicas o indirectamente a través de la inflamación(16,33).

Entre los factores de virulencia más importantes presentes en *E. faecalis* se encuentran: Sustancia de agregación (adhesina bacteriana que convierte la superficie de la bacteria donadora en una superficie adherente potencial para las células receptoras, causando agregación)(16,33), adhesinas o proteínas de superficie (Esp y Ace, ambas relacionadas con la

formación de biopelículas y con la adherencia del microorganismo a las proteínas de la matriz extracelular y al colágeno tipo I y IV)(30,47,48), feromonas sexuales (péptidos que promueven la transferencia conjugativa de plásmidos de ADN entre las cepas)(33,34), ácido lipoteicoico (polímeros asociados a la pared celular que estimulan a los leucocitos a liberar mediadores de la respuesta inflamatoria)(33), superóxido extracelular (radicales de oxígeno altamente reactivos relacionados con el daño tisular y celular)(33), gelatinasa (metaloproteinasa extracelular que hidroliza gelatina, colágeno, fibrinógeno, caseína, hemoglobina e inulina)(33,34), hialuronidasa (enzima que degrada el ácido hialurónico)(33) y hemolisina (codificada por plásmidos, la cual es producida por cepas β -hemolíticas de *E. faecalis* y produce lisis total de los eritrocitos, además de destruir polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos)(16). Gracias a la presencia de estos factores, *E. faecalis* es capaz de sobrevivir en medios con pocos o escasos nutrientes, así como de invadir espacios o aberraciones anatómicas donde acciones como la preparación biomecánica, la colocación de medicación intraconducto o el uso de irritantes no son capaces de actuar y eliminarlo(14,16,33).

En base a los resultados obtenidos en este estudio, así como en los resultados obtenidos por otros investigadores, éstos deberían poner en alerta al Odontólogo a la hora de realizar un tratamiento endodóntico, ya que como es bien conocido, el cemento a base de Hidróxido de Calcio (que es el que se emplea con mayor frecuencia para la obturación de los conductos radiculares), constituye como tal un medio excelente para el crecimiento de *E. faecalis*, aún siendo el pH del medio de aproximadamente 12, por lo que podría sugerirse el empleo de otro tipo de cemento para obturar los conductos radiculares tratados y que a su vez tuviera efecto letal sobre este microorganismo.

CONCLUSION

E. faecalis se encontró en una alta proporción en el grupo de dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico y que habían sido obturados con gutapercha y cemento a base de Hidróxido de Calcio, en tanto que fue detectado en una baja proporción en el grupo de dientes que presentaban patología pulpar y/o periapical y que no habían sido tratados endodónticamente.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento otorgado para la ejecución del Proyecto de Grupo N° PG 10-00-5572-2004 titulado: "Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fallas en el tratamiento endodóntico".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LIÉBANA UREÑA J. Microbiología Oral. 2 ed. Madrid. Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.; 2002.
2. SIQUEIRA JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth fail. Int Endod J 2001; 34: 1-10.
3. SJÖGREN U, FIDGOR D, PERSSON S, SUNDQVIST G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1997; 30: 297-306.
4. CHEUNG GSP. Endodontic failures-changing the approach. Int Dent J 1996; 46: 131-8.
5. RAY HA, TROPE M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. Int Endod J 1995; 28: 12-8.
6. MOLANDER A, REIT C, DAHLEN G, KVIST T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1998; 31: 1-7.
7. PECULIENE V, BALCIUNIENE I, ERIKSEN HM, HAAPASALO M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. J Endod 2000; 26: 593-5.
8. 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.
9. SUNDQVIST G, FIDGOR D, SJÖGREN U. Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1998; 85: 86-93.
10. PINHEIRO ET, GOMES BPFA, FERRAZ CCR, TEIXEIRA FB, ZAIA AA, SOUSA-FILHO FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial

- susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 100-3.
11. SJÖGREN U, FIDGOR D, SPANDBERG I, SUNDQVIST G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24: 119-25.
 12. SLOTS J, TAUBMAN M. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. St Louis U.S.A. Mosby Year Book Inc.; 1992.
 13. HANCOCK HH, SIGURDSSON A, TROPE M, MOISEWITSCH J. Bacteria isolated after unsuccessful treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 579-86.
 14. STUART C, SCHWARTZ S, BEESON T, OWATZ C. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32: 93-8.
 15. FACKLAM R, SAHM D, MARTINS L. *Enterococcus*. En: MURRAY P, BARON E, PFALLER M, TENOVER F, YOLKEN R editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th edition. American Society of Microbiology 1999: 297-305.
 16. PORTENIER I, WALTIMO T, HAAPASALO M. *Enterococcus faecalis*: -the root canal survivor and "star" in post treatment disease. *Endod Tropics* 2003; 6: 135-59.
 17. BYSTROM A, CLAESSESON R, SUNDQVIST G. The antimicrobial effect of paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985; 1: 170-5.
 18. MOLANDER A, REIT C, DAHLEN G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide in root canals with 5% iodine potassium iodide. *Endod Dent Traumatol* 1999; 15: 205-9.
 19. DISTEL J, HATTON J, GILLEPSIE MJ. *Enterococcus faecalis* colonization and biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2001; 28: 689-93.
 20. ROACH P, HATTON J, GILLEPSIE MJ. Prevention of the ingress of a known virulent bacterium into the root canal system by intracanal medicaments. *J Endod* 2001; 27: 657-60.
 21. BASRANI B, TJADERHANE L, SANTOS M, PASCON E, GRAD H, LAWWRNCE H et al. Efficacy of chlorhexidine-and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 618-24.
 22. GOMES B, SOUZA S, FERRAZ C, TEIXEIRA F, ZAIA A, VALDRIGHI L 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.
 23. 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.
 24. SCHAFER E, BOSSMAN K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005; 31: 53-6.
 25. DAHLEN G, SAMUELSON W, MOLANDER A, REIT C: Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 309-12.
 26. GEORGE S, KISHEN A, SONG K. The Role of Environmental Changes on Monospecies Biofilm Formation on Root Canal Wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005; 31: 867-72.
 27. DUGGAN J, SEDGLEY C. Biofilm formation of Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007; 33: 815-8.

28. GIARDINO L, AMBU E, SAVOLDI E, RIMONDINI R, CASSANELLI C, DEBBIA E. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of NaOCl, MTAD and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. J Endod 2007; 33: 852-5.
29. COSTERSON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms; a common cause of persistent infections. Science 1999; 284: 1.318-22.
30. HUBBLE TS, HATTON JF, NALLAPAREDDY SR, MURRAY BE, GILLEPSIE MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. Oral Microbiol Immunol 2003; 18: 121-6.
31. BRÄNDLE N, ZEHNDER M, WEIGER R, WALTIMO T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. J Endod 2008; 34: 579-82.
32. HERNÁNDEZ C, GÓMEZ M, MUÑOZ F, ZAMORA F, VILLARROEL M, MEDINA G. Identificación de cepas de enterococos utilizando el método convencional y el sistema automatizado ATB-Plus. Boletín Soc Venezol Microbiol 1999; 19: 58-60.
33. KAYAOGLU G, ORSTAVIK D. Virulence factors on *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15: 308-20.
34. JETT B, HUYSCKE M, GILMORE M. Virulence of enterococci. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 462-78.
35. ROCAS I, SIQUEIRA J, SANTOS K. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod 2004; 30: 315-20.
36. KAUFMANN B, SPANGBERG L, BARRY J, FOUAD A. Enterococcus spp. In Endodontically Treated Teeth with and without Periradicular Lesions. J Endod 2005; 31: 851-6.
37. SIQUEIRA J, ROCAS I. Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic infections: Part 2 - Redefining the Endodontic Microbiota. J Endod 2005; 31: 488-98.
38. SHIN S, JEE S, SONG J, JUNG I, CHA J, KIM E. Comparison of Regrowth of *Enterococcus faecalis* in Dentinal Tubules after Sealing with Gutta-Percha or Resilon. J Endod 2008; 34: 445-8.
39. LOVE R. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J 2001; 34: 399-405.
40. MC HUGH C, ZHANG P, MICHALEK S, ELEAZER P. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. J Endod 2004; 30: 218-9.
41. NAKAJO K, KOMORI R, ISHIKAWA S, UENO T, SUZUKI Y, IWAMI Y, TAKAHASHI N. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. Oral Microbiol Immunol 2006; 21: 283-8.
42. FOUAD A, ZERELLA J, BARRY J, SPANGBERG L. Molecular detection of *Enterococcus faecalis* in root canals of therapy - resistant endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; 99: 112-8.
43. BAUMGARTNER J, FALKLER W. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. J Endod 1991; 17: 380-3.
44. GOMES B, PINHEIRO E, GADE-NETO C, SOUSA E, FERRAZ C, ZAIA A et al. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol 2004; 19: 71-6.
45. LANA M, RIBEIRO-SOBRINHO A, STEHLING R, GARCÍA G, SILVA B, HAMDAN J et al. Microorganism isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. Oral Microbiol Immunol 2001; 16: 100-5.

46. PINHEIRO E, GOMES F, FERRAZ C, SOUSA E, TEIXEIRA F, SOUZA-FILHO F. Microorganism from canals of root - filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36: 1-11.
47. SHANKAR V, BAGHDAYAN A, HUYCKE M, LINDAHL G, GILMORE M. Infection - Derived *Enterococcus faecalis* Strains are Enriched in Esp, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infect Immun* 1999; 67: 193-200.
48. TOLEDO-ARENA A, VALLE J, SOLANO C, ARRIZUBIETA M, CUCARELLA C, LAMATA M et al. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4.538-45.