
ANALYSIS OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, AND *CANDIDA ALBICANS* IN CAST METAL CORES

ANÁLISIS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *CANDIDA ALBICANS* EN NÚCLEOS COLADOS EN METAL BASE

MARÍA DEL PILAR ANGARITA DÍAZ¹, DIANA FORERO ESCOBAR²,

NERLY FERNANDA GUTIÉRREZ³, FRANCY TATIANA YAÑEZ³, CARLOS ANDRÉS ROMERO³

ABSTRACT. Introduction: all dental treatments should strictly follow aseptic protocols in order to reduce failure, especially when performing endodontic procedures. Despite being a key recommendation in this type of interventions, this statement is generally ignored, as students and clinicians tend to neglect the sterilization of posts prior to their use. To raise awareness on this practice, the objective of this study was to demonstrate the presence of microorganisms that cause failure, such as *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, in non-sterile cores. **Methods:** during the first half of 2016, fabricated cast cores were collected in the dental clinics of Universidad Cooperativa de Colombia at Villavicencio. The cores were immersed in saline solution making dilutions to up to 10⁻⁴, and finally inserted in duplicate into differential mediums for the microorganisms under study. The candidate colonies were then quantified and selected for the microorganisms under study, performing identification and confirmation in a certified clinical laboratory. **Results:** the presence of *E. faecalis* was detected in one of the cores (3.2%) used in the clinic, quantified in 5x10⁴ CFU/ml. The presence of *S. aureus* or *C. albicans* was not identified, but other microorganisms were found, such as *Candida parapsilopsis* (35.5%), *Candida tropicalis* (6.5%), *Kokuria kristinae* (16.1%), *Staphylococcus saprophyticus* (12.9%) and *Stenotrophomona maltophilia* (3.2%). **Conclusion:** out of the microorganisms analyzed in this study, only *E. faecalis* was identified. However, other microorganisms associated with endodontic failure or other type of complications were identified.

Key words: cast core, microbiological analysis, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

RESUMEN. Introducción: el tratamiento odontológico debe considerar rigurosamente la cadena de asepsia para reducir el fracaso, incluso cuando se realizan procedimientos endodónticos. A pesar de ser una recomendación clave en este tipo de intervenciones, esta afirmación no tiene el suficiente alcance, debido a que algunos estudiantes y profesionales no consideran la esterilización de los núcleos antes de utilizarlos. Para generar conciencia en torno a esta práctica, el objetivo de este estudio consistió en demostrar la presencia de microorganismos desencadenantes del fracaso, como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, en los núcleos sin esterilizar. **Métodos:** de las clínicas odontológicas de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede Villavicencio, se recolectaron núcleos colados fabricados durante el primer semestre de 2016. Los núcleos fueron colocados en solución salina y se realizaron diluciones hasta 10⁻⁴, para finalmente sembrarlas por duplicado en medios diferenciales para los microorganismos objeto de estudio. Posteriormente se cuantificaron y seleccionaron las colonias candidatas para los microorganismos estudiados y se realizó la identificación y confirmación en un laboratorio clínico certificado. **Resultados:** en uno de los núcleos utilizados en la clínica se detectó la presencia de *E. faecalis* (3,2%), cuantificado en 5x10⁴ UFC/ml. No se identificó la presencia de *S. aureus* ni *C. albicans*, pero se encontraron otros microorganismos, como *Candida parapsilopsis* (35,5%), *Candida tropicalis* (6,5%), *Kokuria kristinae* (16,1%), *Staphylococcus saprophyticus* (12,9%) y *Stenotrophomona maltophilia* (3,2%). **Conclusión:** de los microorganismos analizados en este estudio, solo se identificó la presencia de *E. faecalis*. Sin embargo, se identificaron otros microorganismos asociados al fracaso endodóntico o a otro tipo de complicaciones.

Palabras claves: perno muñón, análisis microbiológico, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

Angarita-Díaz MP, Forero-Escobar D, Gutiérrez NF, Yañez FT, Romero CA. Analysis of *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus Aureus* and *Candida Albicans* in cast metal posts [Análisis de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* en núcleos colados en metal base]. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2017; 28(2): 292-310. DOI: 10.17533/udea.rfo.v28n2a4 URL: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v28n2a4>

¹ PhD in Biotechnology. Professor of Oral Microbiology, researcher at the GIOMET. School of Dentistry, Universidad Cooperativa de Colombia, Villavicencio. Email: maria.angaritam@campusucc.edu.co
² DMD, Magister in Management. Program Head, School of Dentistry, Universidad Cooperativa de Colombia, Villavicencio.
³ Ninth semester dental students. School of Dentistry, Universidad Cooperativa de Colombia, Villavicencio. This article is one of the requirements to qualify for the title of DMD.

¹ PhD en Biotecnología. Profesora de Microbiología Bucal, Investigadora GIOMET. Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia, Villavicencio. Correo electrónico: maria.angaritam@campusucc.edu.co
² Odontólogo, Magister en Administración. Jefe de programa. Facultad de Odontología. Universidad Cooperativa de Colombia, Villavicencio.
³ Estudiantes de noveno semestre. Facultad de Odontología. Universidad Cooperativa de Colombia, Villavicencio. Trabajo de pregrado como requisito para optar al título de odontólogo.

SUBMITTED: SEPTEMBER 13/2016 - ACCEPTED: JANUARY 24/2017

RECIBIDO: SEPTIEMBRE 13/2016 - ACEPTADO: ENERO 24/2017

INTRODUCTION

In dentistry, asepsis is critical to avoid cross infections, post-treatment failures, unnecessary prescription of antibiotics, and complications that put patient's life at risk.¹⁻³ However, some clinicians and students still neglect this important concept.⁴⁻⁸ This is evident by the use of antibiotics as a preventive measure for inadequate asepsis techniques,^{9, 10} and the absence of protocols for sterilization or disinfection of some materials to be used for the first time, as well as their improper handling before being used in dental procedures.^{8, 11, 12}

During the endodontic therapy, clinicians seek to eliminate the microorganisms present in the root canal and to prevent the settlement of new microorganisms through the production of hostile conditions for such microorganisms.¹³⁻¹⁵ These conditions can be achieved by providing almost non-existent or insufficient amount of nutrients, limiting the space available to the microorganisms, altering the redox potentials, creating a low concentration of oxygen, and promoting the presence of antimicrobial substances.¹⁶ However, some studies show the presence of several microorganisms involved in infectious diseases that are able to adapt to these conditions,^{15, 17, 18} and thus validate the need to use materials and additions in conditions as aseptic as possible.

Among the microorganisms involved in endodontic failure and whose characteristics make them resistant to extreme conditions are *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*.¹⁸⁻²¹ These microorganisms are regarded as the toughest in the oral cavity.^{19, 22} *E. faecalis* is the microorganism most commonly found in high numbers in endodontic failure and usually enters the oral cavity during treatment.^{23, 24} These bacteria are Gram-positive and facultative cocci that can survive in conditions that are commonly lethal for other microorganisms; they can grow in low-nutrient

INTRODUCCIÓN

En odontología, el manejo de la asepsia es fundamental para evitar las infecciones cruzadas, los fracasos post-tratamiento, la innecesaria prescripción de antibióticos y las complicaciones que ponen en riesgo la vida del paciente.¹⁻³ A pesar del manejo de este concepto, existen algunos profesionales y estudiantes que no lo tienen claro.⁴⁻⁸ Esto se evidencia en la utilización de antibióticos como medida preventiva para las inapropiadas técnicas de asepsia,^{9, 10} y en la ausencia de protocolos de esterilización o desinfección de algunos materiales de uso por primera vez, así como en la inadecuada manipulación de estos antes de ser utilizados en procedimientos odontológicos.^{8, 11, 12}

Durante el tratamiento de endodoncia, el especialista busca eliminar los microorganismos presentes en el canal radicular y prevenir el establecimiento de nuevos microorganismos mediante la producción de condiciones inhóspitas para éstos.¹³⁻¹⁵ Estas condiciones se pueden lograr mediante la insuficiente o casi nula cantidad de nutrientes, la limitación de espacio, la alteración de los potenciales redox, la baja concentración de oxígeno y la presencia de sustancias antimicrobianas.¹⁶ Sin embargo, los estudios demuestran que hay varios microorganismos implicados en procesos infecciosos capaces de adaptarse a estas condiciones,^{15, 17, 18} y son prueba de la necesidad de utilizar materiales y aditamentos en las condiciones más asépticas posibles.

Entre los microorganismos implicados en el fracaso endodóntico y cuyas características los hacen resistentes a condiciones extremas, están *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.¹⁸⁻²¹ Estos microorganismos son considerados como los más resistentes en la cavidad oral.^{19, 22} *E. faecalis* es de los microorganismos que se encuentran en alto número en el fracaso endodóntico y se caracteriza por entrar durante el tratamiento.^{23, 24} Estas bacterias son cocos Gram positivos y facultativos, caracterizados por sobrevivir en condiciones que son comúnmente letales para otros microorganismos, como crecer en ambientes con

environments, have a high redox potential, are highly resistant under anaerobic conditions, can survive in a wide range of temperatures, pH, and salt concentrations, and are resistant to substances such as calcium hydroxide.^{18, 20} In addition, they have the ability to invade the dentinal tubule, use collagen dentin, and form biofilm.^{21, 25, 26}

Staphylococcus aureus is another bacterium also found in post-endodontic treatment lesions, although less frequently than *E. faecalis*. They are Gram-positive and facultative anaerobic cocci that can survive in harsh conditions for long periods and resist changes in temperature and dehydration. Most of these bacteria have been able to develop resistance to antimicrobial drugs.^{27, 28}

Candida albicans is a kind of yeast often isolated from infected root canals.^{18, 29} This microorganism has similar characteristics to *E. faecalis*, such as survival in mono-infections and in environments with limited amount of nutrients, as well as extreme pH ranges. In addition, it invades the dentinal tubule, is resistant to several antimicrobial agents, and has the capacity to produce biofilms on different surfaces. This yeast also has collagenolytic enzymes that produce degradation of human dentin collagen.^{29, 30}

The goal of this study was to warn dental students and faculty members at the Universidad Cooperativa de Colombia at Villavicencio about the need to sterilize cast cores before being used in patients. The objective of the study was to identify and quantify the presence of *E. faecalis*, *S. aureus*, and *C. albicans* in cast cores manufactured for the university clinics during the first half of 2016.

MATERIALS AND METHODS

Descriptive study by convenience sampling, consisting of two phases:

bajo contenido de nutrientes, tener un alto potencial redox, poseer resistencia en condiciones anaeróbicas, establecerse en un amplio rango de temperatura, pH y concentraciones de sal, así como presentar resistencia a sustancias como el hidróxido de calcio.^{18, 20} Además, tienen la capacidad de invadir el túbulo dentinal, utilizar el colágeno de la dentina y formar biopelícula.^{21, 25, 26}

Staphylococcus aureus es otra de las bacterias que también se ha encontrado en lesiones después de un tratamiento endodóntico, aunque en menor frecuencia que *E. faecalis*. Son cocos Gram positivos y anaerobios facultativos, que se caracterizan por sobrevivir en condiciones adversas durante periodos prolongados y por resistir a los cambios de temperatura y a la deshidratación. La mayoría de estas bacterias han sido capaces de desarrollar resistencia a los antimicrobianos.^{27, 28}

Una especie de levadura aislada frecuentemente de canales radiculares infectados es *Candida albicans*.^{18, 29} Este microorganismo presenta características similares a *E. faecalis*, como la supervivencia en las mono-infecciones y en ambientes con limitada cantidad de nutrientes, así como en rangos extremos de pH. Además, invade el túbulo dentinal, resiste a varios agentes antimicrobianos y tiene la capacidad de producir biopelículas en diferentes superficies. Esta levadura cuenta también con enzimas colagenolíticas que le permiten degradar el colágeno de la dentina humana.^{29, 30}

Este estudio se realizó con el propósito de intervenir a los estudiantes y profesores de odontología de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede Villavicencio, sobre la necesidad de esterilizar los núcleos colados antes de ser cementados en el paciente. El objetivo del estudio consistió en identificar y cuantificar la presencia de *E. faecalis*, *S. aureus* y *C. albicans* en núcleos colados fabricados para las clínicas de la universidad, durante el primer semestre de 2016.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio descriptivo con muestreo por conveniencia, que consistió en dos fases:

Phase 1. Collection of cast cores

Manufactured cast cores were collected during the first half of 2016 at the clinics of Universidad Cooperativa de Colombia at Villavicencio. The study considered the ethical principles, requesting an informed consent from cast cores owners. 32 cast cores were collected provided that they met the inclusion criteria: manufactured cast metal cores—since this is the alloy most commonly used in this population—from patients who were provided an informed consent. The researchers collected information on the cast cores, such as manufacturing date, dental laboratory, location on the tooth's arch and storage time before the analysis, which was recorded on a form assessed by an endodontist and a microbiologist.

Phase 2. Microbiological analysis

Media and growth conditions

The cast cores were placed in sterile conditions in microtubes containing 1 ml of saline solution.³¹ The microtubes were manually stirred for 30 to 40 s. From this tube, dilutions were made up to 10^{-4} and 100 μ l of dilutions were sown in duplicate, in differential media for the studied microorganisms. CHROMAgar UTI^{®32} was used for *E. faecalis*, Baird Parker^{®33} was used for *S. aureus*, and Chrome Candida for *C. albicans*.³⁴ These media were purchased from a certified company that distributes media with quality control using reference strains. Once the culture was completed, the media were incubated at 35 °C for 24 to 48 hours. Later the cast cores were brought back to the dental clinic, to complete the sterilization process before being cemented in patients.

Fase 1. Recolección de los núcleos

La recolección de núcleos colados fabricados se realizó durante el primer semestre de 2016 en las clínicas de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede Villavicencio. Para el estudio de los núcleos se tuvieron en cuenta los principios éticos, solicitando un consentimiento informado a los propietarios de los núcleos. Se recolectaron 32 núcleos que cumplieran los criterios de inclusión, como estar fabricados en metal base, ya que es la aleación de mayor uso en esta población, y contar con el consentimiento del paciente para quien se elaboró el núcleo. Se recopiló información del núcleo, como fecha de fabricación, laboratorio dental, ubicación de la arcada del diente y tiempo de almacenamiento antes del análisis, en un instrumento valorado por un endodoncista y un microbiólogo.

Fase 2. Análisis microbiológico

Medios y condiciones de crecimiento

Los núcleos fueron colocados en condiciones estériles en microtubos que contenían 1 ml de solución salina.³¹ Se agitaron los microtubos manualmente durante 30 o 40 s. A partir de este tubo se realizaron diluciones hasta 10^{-4} y se sembraron 100 μ l de la dilución por duplicado, en medios diferenciales para los microorganismos estudiados. Para *E. faecalis* se utilizó el medio CHROMAgar UTI^{®32}, para *S. aureus* el medio Baird Parker^{®33} y para *C. albicans* el medio Cromo Candida.³⁴ Estos medios fueron adquiridos en una empresa certificada que distribuye medios con control de calidad mediante cepas de referencia. Una vez realizada la siembra, los medios fueron incubados a 35 °C durante 24 a 48 horas. Posterior a este proceso, los núcleos fueron llevados de nuevo a la clínica odontológica, para realizar el proceso de esterilización y así ser cementados en los pacientes.

Identification and confirmation of microorganisms

To identify the microorganisms, the researchers selected and described the colonies showing the color and characteristics of the microorganisms in the used media (Figure 1). The blue colonies were chosen in the case of CHROMAgar UTI, the black colonies were selected for the Baird Parker medium, and the green ones for the Chromo Candida medium. The colonies' cells' morphology was observed on the microscope by Gram staining. In the CHROMAgar UTI, colonies showing Gram-positive cocci were subjected to the catalase test, searching for negative catalase microorganisms as identifiable candidates (Figure 1). In the Baird Parker medium, the black colonies showing Gram-positive cocci were subjected to the catalase and coagulase tests, even if they did not show a halo around them, seeking positive catalase and coagulase colonies (Figure 1).

Once the colonies of interest were selected, they were brought to blood agar and sent to a certified laboratory to confirm their identification. The same was done with some of the microorganisms that were observed more frequently. The identification technique used in the laboratory was the automated VITEK system.³⁵

Quantification of colonies

Colonies showing the expected stain in the differential medium were quantified, as well as those identified as positive for the studied microorganisms. We calculated the number of CFU/ml of each cast core, by first calculating the average between copies and then transforming the quantification from microliters to milliliters.

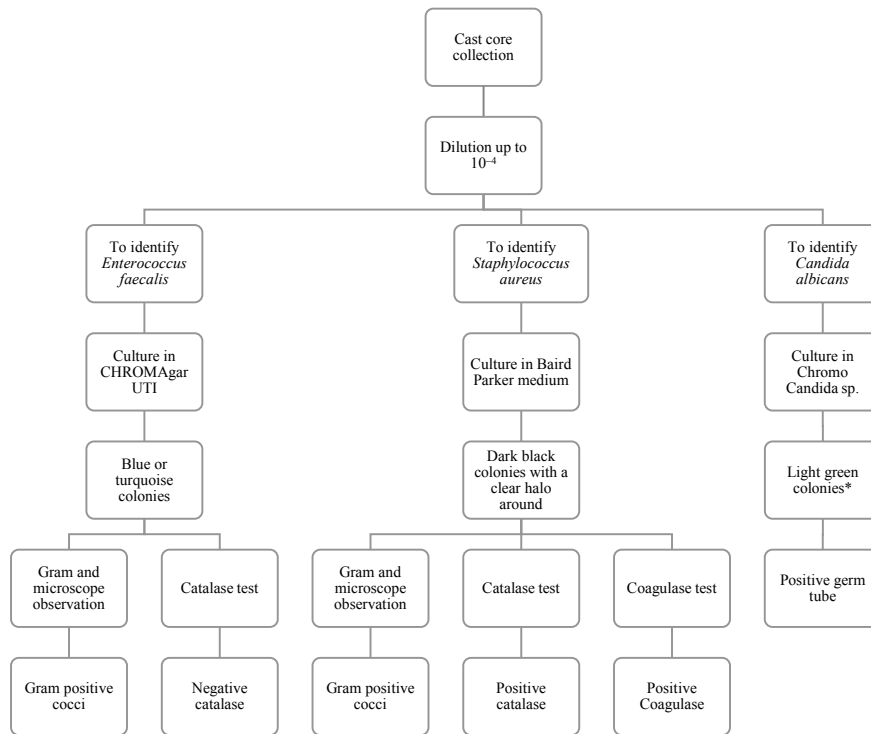
Identificación y confirmación de los microorganismos

Para la identificación de los microorganismos, se seleccionaron y describieron las colonias que presentaban la coloración y característica de estos microorganismos en los medios utilizados (Figura 1). Para el caso del CHROMAgar UTI, se seleccionaban las colonias de color azul, para el medio Baird Parker las colonias negras, y para el medio Chromo Candida se buscaban colonias de color verde. La morfología de las células de las colonias fue observada al microscopio mediante la coloración Gram. En el medio CHROMAgar UTI, las colonias que presentaban cocos Gram positivos se les realizaba la prueba de la catalasa, buscando los microorganismos catalasa negativa como candidatos para identificar (Figura 1). En el medio Baird Parker, las colonias negras que presentaban cocos Gram positivos, y aunque no formaran halo alrededor, se les realizaba la prueba de la catalasa y la coagulasa, buscando las colonias catalasa y coagulasa positivas (Figura 1).

Una vez seleccionadas las colonias de interés, se sembraron en agar sangre y se enviaron a un laboratorio certificado para confirmar su identificación. Esto mismo se realizó con algunos de los microorganismos que fueron observados con mayor frecuencia. La técnica de identificación utilizada en el laboratorio fue el sistema automatizado VITEK.³⁵

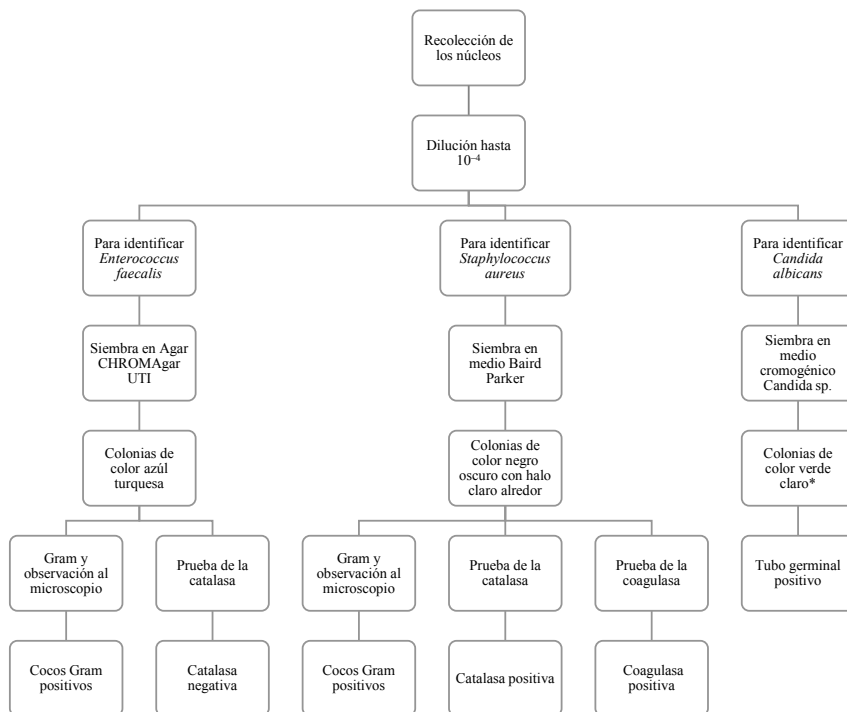
Cuantificación de las colonias

Se cuantificaron las colonias que presentaban la coloración esperada en el medio diferencial, así como las identificadas como positivas para los microorganismos estudiados. Se calculó el número de UFC/ml de cada uno de los núcleos, calculando primero el promedio entre copias y transformando posteriormente la cuantificación de microlitros a mililitros.



* No green stained colonies were observed in this medium

Figure 1. Procedure for the detection of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* in cast cores. Source: The authors' own elaboration.



*En este medio no se detectaron colonias de color verde.

Figura 1. Procedimiento para la detección de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* en núcleos colados. Fuente: Elaboración propia.

Statistical analysis

Univariate descriptive analyses were conducted using the SPSS 20.0 software, including mean and standard deviation of the colonies in the media.

RESULTS

90.6% (n = 29) of the cores analyzed in this study were manufactured in dental laboratory N.º 2. Regarding the position in the dental arch, 59.4% (n = 19) were located in the posterior arch and 40.6% (n = 13) in the anterior arch. 90.6% (n = 29) of cores were analyzed in the laboratory immediately after being brought to the clinic, and 9.4% (n = 3) were stored for 3 to 4 days (Table 1).

Table 1. Characteristics of the cores microbiologically analyzed in this study

Information on cores	Specification	Frequency	Percentage
Laboratory	Laboratory 1	3	9.4
	Laboratory 2	29	90.6
Location on the tooth's arch	Anterior arch	13	40.6
	Posterior arch	19	59.4
Time of storage at the clinic prior to analysis	0 days	29	90.6
	1-2 days	0	0
	3-4 days	3	9.4

Microbiological analysis of *E. faecalis*, *S. aureus*, and *C. albicans*

The use of CHROMAgar UTI, Baird Parker, and Chromo Candida allowed the differentiation of colonies as well as a more selective isolation of the studied microorganisms. The average possible colony for *E. faecalis* in medium CHROMAgar UTI was $3,7 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^5$ and for *S. aureus* in medium Baird Parker was $1,7 \times 10^4 \pm 7,8 \times 10^3$ (Table 2). No *C. albicans* colony was observed.

3. Análisis estadístico

Mediante el programa SPSS 20.0 se llevaron a cabo análisis descriptivos univariados, como la media y desviación estándar de las colonias esperadas en los diferentes medios.

RESULTADOS

El 90,6% (n=29) de los núcleos analizados en este estudio fueron fabricados en el laboratorio dental N.º 2. Respecto a la posición en el arco dental, el 59,4% (n=19) pertenecían a la arcada posterior y el 40,6% (n=13) pertenecían a la anterior. El 90,6% (n=29) de los núcleos fueron analizados en el laboratorio, en el mismo momento que llegaron a la clínica, y el 9,4% (n=3) estuvieron almacenados entre 3 y 4 días (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los núcleos analizados microbiológicamente en este estudio

Información del núcleo	Especificación	Frecuencia	Porcentaje
Laboratorio	Laboratorio 1	3	9,4
	Laboratorio 2	29	90,6
Ubicación de la arcada del diente	Arcada anterior	13	40,6
	Arcada posterior	19	59,4
Tiempo de almacenamiento en la clínica previo al análisis	0 días	29	90,6
	1-2 días	0	0
	3-4 días	3	9,4

Análisis microbiológico de *E. faecalis*, *S. aureus* y *C. albicans*.

La utilización de los medios CHROMAgar UTI, Baird Parker y Chromo Candida permitió la diferenciación de colonias y orientó hacia un aislamiento más selectivo de los microorganismos estudiados. La media de colonias posibles para *E. faecalis* en el medio CHROMAgar UTI fue de $3,7 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^5$ y para *S. aureus* en el medio Baird Parker fue de $1,7 \times 10^4 \pm 7,8 \times 10^3$ (Tabla 2). Respecto a colonias que pudieran ser *C. albicans*, no se observó ninguna.

Table 2. Presence of candidate colonies in the differential media

Medium	Average (CFU/ml)	Standard Deviation
Blue colonies in CHROMAgar UTI medium	3,7x10 ⁴	1,5x10 ⁵
Black colonies in Baird Parker medium	1,7x10 ⁴	7,8x10 ³
Green colonies in Chromo Candida medium	0	0

Cores N° 2, 16, 17, 26, 27, 28, 30 and 32 had a greater number of possible colonies for *E. faecalis* (Figure 2). Gram-negative (short and long) bacilli were predominant among the colonies, followed by Gram-positive cocci (Figure 3). The catalase test applied to colonies presenting Gram-positive cocci showed that the ones corresponding to core #26 was catalase (-) and was identified as *E. faecalis*. The quantity of this bacterium was 5x10⁴ CFU/ml (Table 3). This core was manufactured in Laboratory 2, was located in the posterior arch tooth and was not stored before analysis.

Tabla 2. Presencia de las colonias candidatas en los medios diferenciales

Medio	Media (UFC/ml)	Desviación estándar
Colonias azules en el medio CHROMAgar UTI	3,7x10 ⁴	1,5x10 ⁵
Colonias negras en el medio Baird Parker	1,7x10 ⁴	7,8x10 ³
Colonias verdes en el medio Chromo Candida	0	0

Los núcleos N.º 2, 16, 17, 26, 27, 28, 30 y 32 presentaron un mayor número de colonias posibles para *E. faecalis* (Figura 2). Entre las colonias se observó la predominancia de bacilos Gram negativos (cortos y largos), seguidos por cocos Gram positivos (Figura 3). En la prueba de la catalasa realizada a las colonias que presentaban cocos Gram positivos, se determinó que las correspondientes al núcleo #26 fue catalasa (-) y se identificó como *E. faecalis*. Esta bacteria se cuantificó en 5x10⁴ UFC/ml (Tabla 3). La característica de este núcleo es que fue fabricado en el laboratorio 2, pertenecía a la arcada del diente posterior y no fue almacenado antes del análisis.

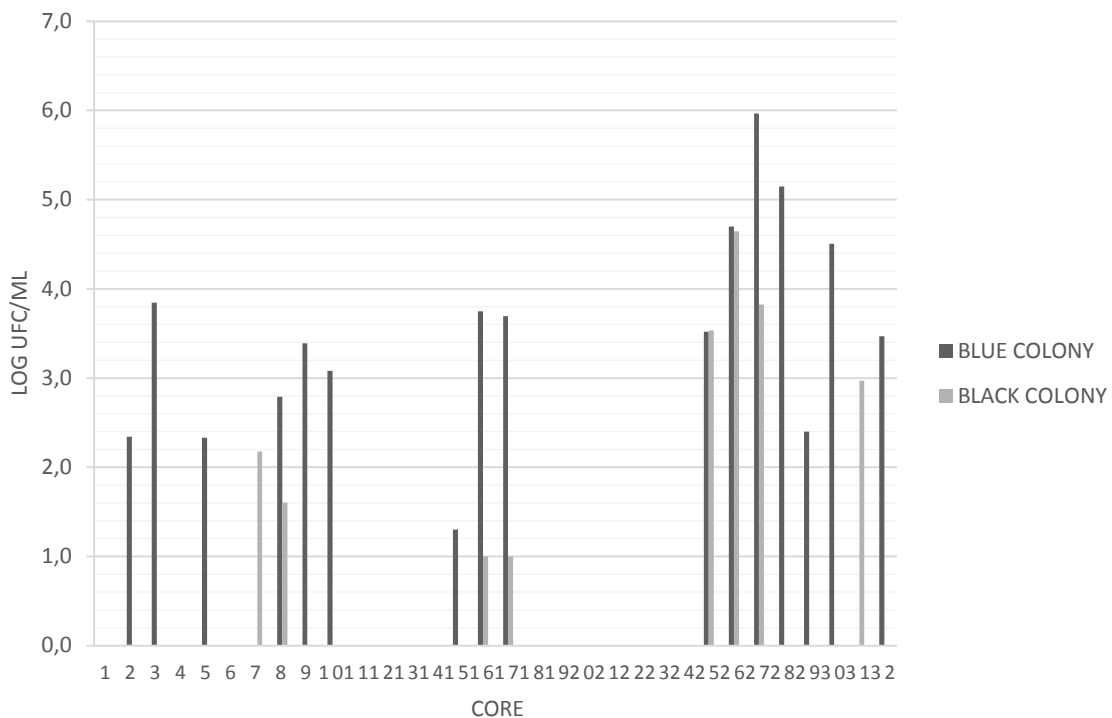


Figure 2. Presence and quantification of possible candidate colonies for the studied microorganisms. Data transformed to log CFU/ml. CHROMAgar UTI medium (blue stained colony) and Baird Parker medium (black stained colony). Source: the author's own elaboration.

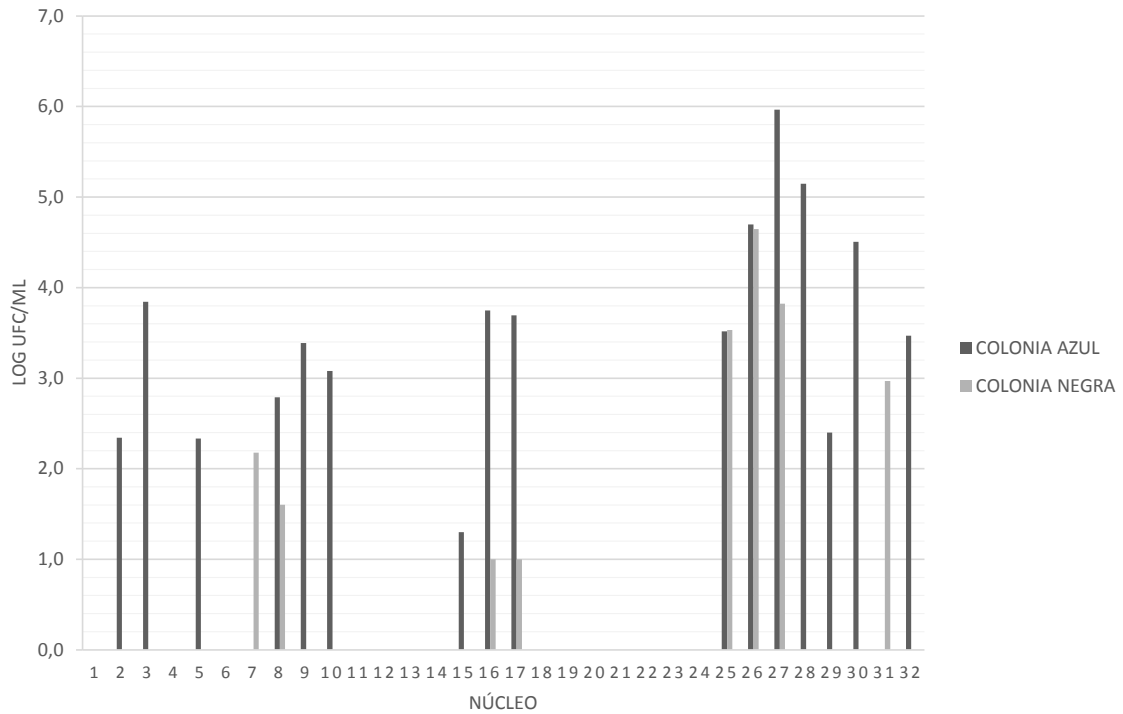


Figura 2. Presencia y cuantificación de las posibles colonias candidatas para los microorganismos estudiados. Datos transformados a log UFC/ml. Medio CHROMAgar UTI (colonia de color azul) y medio Baird Parker (colonia negra). Fuente: Elaboración propia.

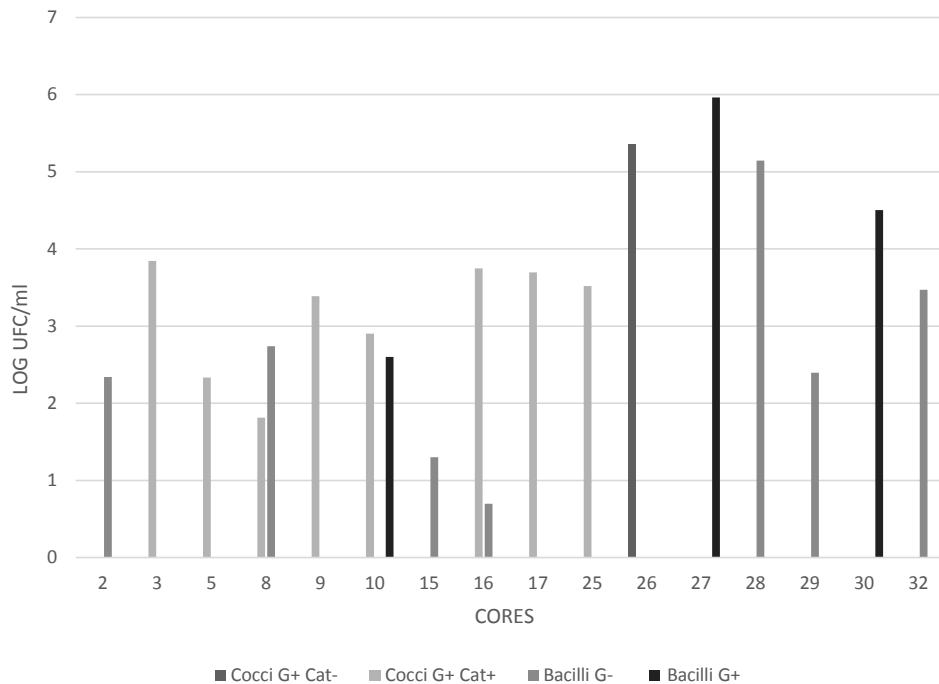


Figure 3. Cell morphology of the blue colonies present in the CHROMAgar UTI medium. Data transformed to log CFU/ml. Observed bacilli showed different characteristics (long, short, with and without spores). Source: the author's own elaboration.

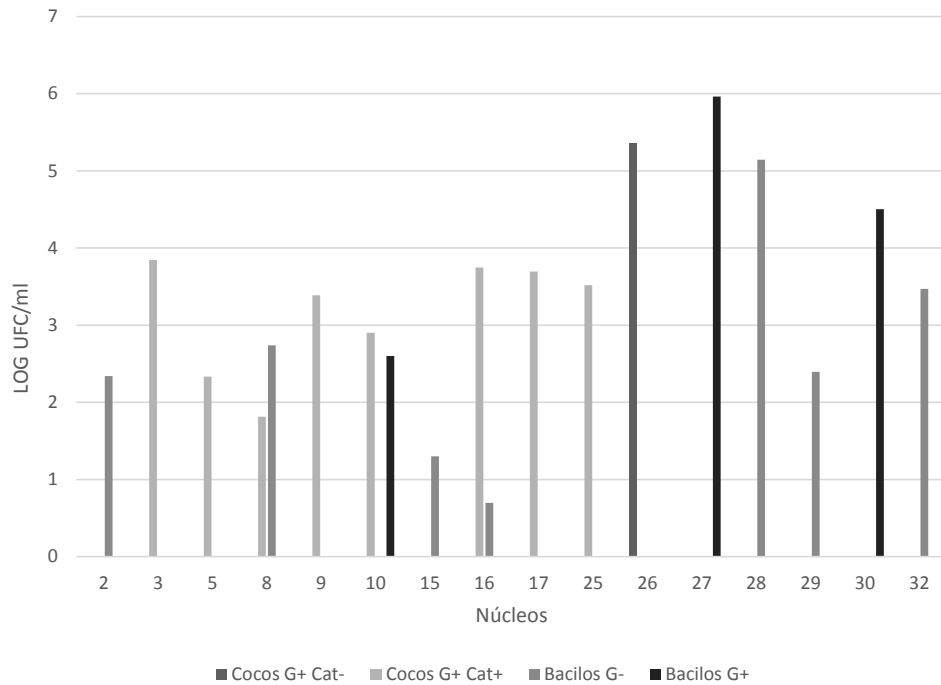


Figura 3. Morfología celular de las colonias azules presentes en el medio CHROMAgar UTI. Datos transformados a log UFC/ml. Los bacilos observados presentaban diferentes características (largos, cortos, con y sin esporas). Fuente: Elaboración propia.

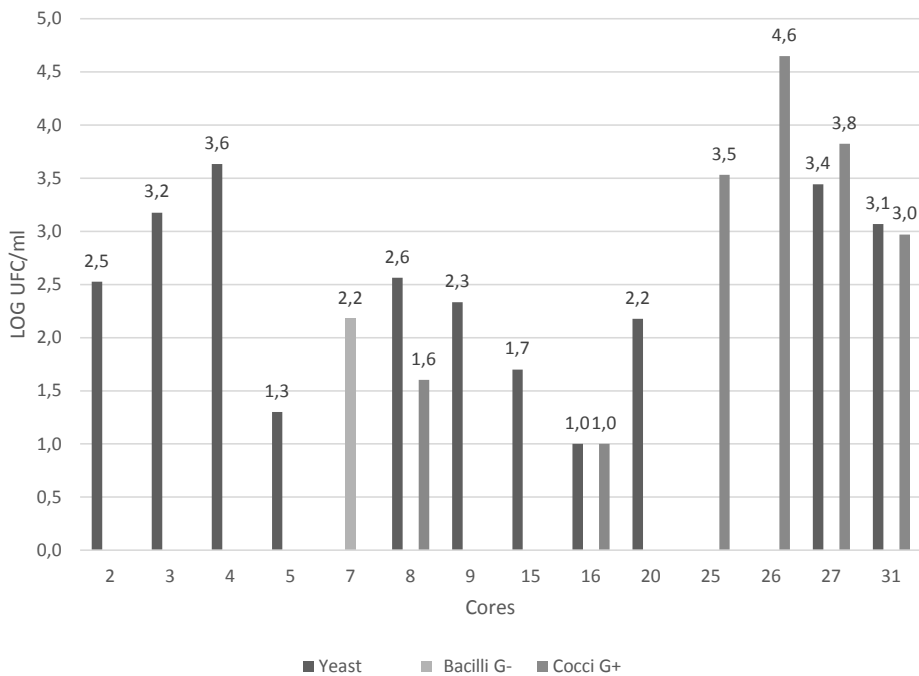


Figure 4. Cell morphology of the colonies present in the Baird Parker medium. Data transformed to log CFU/ml. Source: the author's own elaboration.

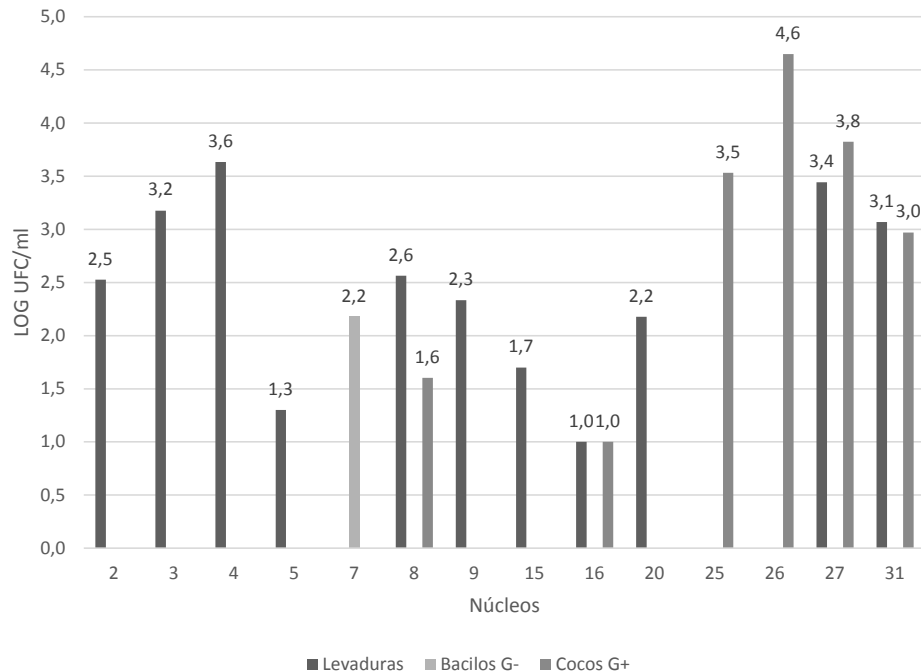


Figura 4. Morfología celular de las colonias presentes en el medio Baird Parker. Datos transformados a log UFC/ml. Fuente: Elaboración propia.

Cores N° 7, 25, 26, 27, and 31 had a greater number of black stained colonies (Figure 2), but with no halo formation. To ensure the absence of *S. aureus*, Gram staining, catalase and coagulase tests were conducted, with the following results: Gram-positive cocci, positive catalase and negative coagulase (Figure 4), which allowed discarding colonies of *S. aureus*.

Other identified microorganisms

In the CHROMAgar UTI medium, in addition to *E. faecalis*, *Kokuria kristinae* was identified in 4 cores (16.1%) with an average concentration of 3.6×10^2 CFU/ml $\pm 1.3 \times 10^3$, and *Stenotrophomona maltophilia* in one core (3.2%) with a concentration of 4.4×10^2 CFU/ml. In the Baird Parker medium, *S. saprophyticus* was detected in 4 cores (12.9%) with an average concentration of 1.7×10^3 CFU/ml $\pm 7 \times 10^3$, and the yeast *Candida parapsilosis* in 11 cores (35.5%) with an average of $3.4 \times 10^2 \pm 9 \times 10^2$ (Table 3).

Los núcleos N.° 7, 25, 26, 27 y 31 presentaron un mayor número de colonias de color negro (Figura 2), aunque sin la formación de un halo. Para asegurar la ausencia de *S. aureus*, se realizó la coloración Gram, la prueba de la catalasa y la coagulasa, resultando cocos Gram positivos, catalasa positiva y coagulasa negativa (Figura 4), lo que permitió descartar que fueran colonias de *S. aureus*.

Otros microorganismos identificados

En el medio CHROMAgar UTI, además de encontrar *Enterococcus faecalis*, se identificó *Kokuria kristinae* en 4 núcleos (16,1%) con una concentración media de $3,6 \times 10^2$ UFC/ml $\pm 1,3 \times 10^3$ y *Stenotrophomona maltophilia* en un núcleo (3,2%) con una concentración de $4,4 \times 10^2$ UFC/ml. En el medio Baird Parker, se detectó en 4 núcleos (12,9%) la presencia de *S. saprophyticus* con una concentración media de $1,7 \times 10^3$ UFC/ml $\pm 7 \times 10^3$, y la levadura *Candida parapsilosis* en 11 núcleos (35,5%) con una media $3,4 \times 10^2 \pm 9 \times 10^2$ (Tabla 3).

Regarding the medium to quantify *C. albicans*, none of the cores presented the formation of green stained colonies, as noted above. However, two cores had dark blue colonies (6.5%), which were identified as *Candida tropicalis* with an average concentration of 3×10^1 CFU/ml $\pm 1 \times 10^2$ (Table 3).

Table 3. Presence of E. faecalis, S. aureus, C. albicans, and other micro-organisms in the cores manufactured for the UCC dental clinic at Villavicencio

Microorganism	Frequency of microorganism	Amount of microorganism
E. faecalis	1 (3.2%)	5×10^4 CFU/ml
S. aureus	0	0
C. albicans	0	0
Other identified microorganisms		
S. saprophyticus	4 (12.9%)	Average: 1.7×10^3 CFU/ml $\pm 7 \times 10^3$
C. parapsilopsis	11 (35.5%)	Average: $3.4 \times 10^2 \pm 9 \times 10^2$
C. tropicalis	2 (6.5%)	Average: 3×10^1 CFU/ml $\pm 1 \times 10^2$
K kristinae	5 (16.1%)	Average: 3.6×10^2 CFU/ml $\pm 1.3 \times 10^3$
S. maltophilia	1 (3.2%)	4.4×10^2 CFU/ml

Source: the author's own elaboration. \pm Standard deviation

DISCUSSION

Several studies have shown that the microbiota present in endodontic-treated root canals differs from the one normally found in untreated teeth.^{36, 37} This suggests the important role of external microorganisms in endodontic treatment failure and therefore the importance of maintaining an asepsis protocol during all treatment steps.³⁸ Otherwise, microorganisms and their derivatives can be transferred to the interior of the canal, reaching the apical area and even the alveolar bone.^{2, 38}

Although microorganisms are expected in cast cores after manufacturing, it became necessary to identify the presence of microorganisms that can cause endodontic failure, in order to show that this type of additives may bring microorganisms capable of producing post-treatment infections, and to educate the academic community on the need for sterilization prior to use on patients.

Respecto al medio para cuantificar *C. albicans*, como se mencionó anteriormente, ninguno de los núcleos presentó la formación de colonias de color verde claro. Sin embargo, dos núcleos presentaron colonias de color azul oscuro (6,5%), que fueron identificadas como *Candida tropicalis* con una concentración media de 3×10^1 UFC/ml $\pm 1 \times 10^2$ (Tabla 3).

Tabla 3. Presencia de E. faecalis, S. aureus, C. albicans y otros microorganismos en los núcleos fabricados para la clínica odontológica UCC, Villavicencio

Microorganismo	Frecuencia del microorganismo	Cantidad del microorganismo
E. faecalis	1 (3,2%)	5×10^4 UFC/ml
S. aureus	0	0
C. albicans	0	0
Otros microorganismos identificados		
S. saprophyticus	4 (12,9%)	Media: $1,7 \times 10^3$ UFC/ml $\pm 7 \times 10^3$
C. parapsilopsis	11 (35,5%)	Media: $3,4 \times 10^2 \pm 9 \times 10^2$
C. tropicalis	2 (6,5%)	Media: 3×10^1 UFC/ml $\pm 1 \times 10^2$
K. kristinae	5 (16,1%)	Media: $3,6 \times 10^2$ UFC/ml $\pm 1,3 \times 10^3$
S. maltophilia	1 (3,2%)	$4,4 \times 10^2$ UFC/ml

Fuente: elaboración propia. \pm Desviación estándar.

DISCUSIÓN

Los estudios han demostrado que la microbiota presente en los canales radiculares de raíces con tratamientos endodónticos difiere de las que normalmente se encuentran en los dientes no tratados.^{36, 37} Esto indica el papel que cumplen los microorganismos de origen externo en el fracaso endodóntico y, por tanto, la importancia de mantener la cadena de asepsia durante todos los pasos del tratamiento.³⁸ De lo contrario, se estarían transfiriendo microorganismos y sus derivados al interior del conducto, que pueden llegar hasta el área apical e incluso hasta el hueso alveolar.^{2, 38}

Aunque es previsible encontrar microorganismos en los núcleos colados después de la fabricación, se hizo necesario identificar la presencia de microorganismos que pueden generar el fracaso endodóntico. Esto con el fin de demostrar que este tipo de aditamentos pueden ser portadores de microorganismos capaces de generar infecciones postratamiento, y concientizar a la comunidad académica sobre la necesidad de su esterilización antes de utilizarlos en el paciente.

In this study, as in the one conducted by Ensinas et al,³⁹ *E. faecalis* was found in cast cores. Although the natural habitat of this microorganism is the gastrointestinal tract, it can also be found in the environment, namely in water, soil, manufactured materials, or fermented products, due to its great resistance to extreme conditions.⁴⁰ It is therefore normal to find this bacterium in cast cores, but if they are not properly sterilized they can be transferred to the treated root canal causing infection.^{20, 24}

E. faecalis was quantified in 5×10^4 CFU/ml, a high concentration that can cause infection. In a study conducted by Melo et al, the authors established that a concentration of 10^1 and 10^2 UFC of *E. faecalis*, in root canals of gnotobiotic mice was sufficient for the settlement of the bacterium in 83.33% of cases.⁴¹ In addition, the literature reports that just a few viable cells of microorganisms capable of settling after endodontic treatment is sufficient to produce failure.⁴²

While *S. aureus* and *C. albicans* were not identified in the cast cores analyzed, Ensinas et al reported them in their microbiological analysis.³⁹ This may be due to the fact that the materials analyzed in this study were not in contact with *S. aureus* and *C. albicans*, or other types of microorganisms could cause their inhibition.^{43, 44} Another reason has to do with the used methodology, since Ensinas et al placed the cores in an enrichment medium before immersing them in common media, thus increasing the concentration of cells of these microorganisms.

This means that, if there is only one cell in the cores, by placing them in the enrichment medium their concentration increases and therefore their identification is more likely. In the present study, in order to determine the quantification of the analyzed microorganisms, dilutions and cultures were performed in the differential media with no prior enrichment.

En este estudio, al igual que en el realizado por Ensinas et al,³⁹ se encontró *E. faecalis* en núcleos colados. Aunque el hábitat natural de este microorganismo es el tracto gastrointestinal, también se puede encontrar en el ambiente, como en agua, suelo, materiales fabricados por el hombre o productos fermentados, debido a su gran resistencia a las condiciones extremas.⁴⁰ Por tanto, es normal encontrar esta bacteria en los núcleos, los cuales, de no ser esterilizados pueden transferirla al conducto tratado y ocasionar una infección.^{20, 24}

E. faecalis fue cuantificado en 5×10^4 UFC/ml, concentración que resultó ser alta para poder ocasionar infección. En un estudio realizado por Melo et al, los autores determinaron que, con una concentración de 10^1 y 10^2 UFC de *E. faecalis*, en canales radiculares de ratones gnotobióticos, fue suficiente para la instauración de la bacteria en el 83,33% de los casos.⁴¹ Además, la literatura reporta que solo unas pocas células viables de microorganismos capaces de establecerse después de realizar los tratamientos endodónticos es suficiente para generar el fracaso.⁴²

Aunque los microorganismos *S. aureus* y *C. albicans* no se identificaron en los núcleos colados analizados, Ensinas et al los reportaron en su análisis microbiológico.³⁹ Esto puede deberse a que los materiales analizados en este estudio no estuvieron en contacto con *S. aureus* y *C. albicans* o que otros tipos de microorganismos pudieron causar su inhibición.^{43, 44} Otra razón es la metodología utilizada, ya que el grupo de Ensinas colocó los núcleos en medio de enriquecimiento antes de sembrarlos en medios comunes, aumentando así la concentración de células de estos microorganismos.

Es decir, si solo hay una célula en los núcleos, al colocarlos en medio de enriquecimiento aumenta la concentración de estas y, por tanto, es más probable su identificación. En este estudio, con el fin de determinar la cuantificación de los microorganismos analizados, se realizaron diluciones y las siembras en los medios diferenciales, sin previo enriquecimiento.

The other microorganisms identified in the cores in this study have also been implicated in endodontic failure or other infections. This study identified two yeasts of the *Candida* genus. This includes *C. tropicalis*, which after *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. krusei* is the yeast most frequently isolated in infected root canals.⁴⁵ This yeast causes infections globally, is the most prevalent after *C. albicans*, and shares many pathogenic traits with this yeast, as the capacity to form biofilms and the resistance to some antifungals such as fluconazole, as well as to calcium hydroxide. In addition, *C. tropicalis* has been associated with fungaemia and meningitis.⁴⁶⁻⁵⁰

Another yeast identified in this study is *Candida parapsilopsis*, which is among the three most frequent etiologic agents of candidiasis worldwide. In Latin America, the frequency of invasive candidiasis because of this yeast has increased recently.⁵⁰ Just as *C. albicans*, *C. parapsilopsis* has the ability to form biofilm, grow in environments with low oxygen content, and show resistance to calcium hydroxide, chlorhexidine gluconate, and fluconazole.^{50, 51} In addition, it has been isolated in infected root canals and in acute apical periodontitis.^{49, 52, 53}

A bacterium found in this study was *K. kristinae*, which is known to cause bacteremia associated with the use of catheters and with infective endocarditis. It has also been identified in samples of acute dental infection in pediatric population.⁵⁴ Another bacteria identified was *Stenotrophomona maltophilia*, which is considered an opportunistic bacterium capable of producing septicemia, endocarditis, meningitis, bacteremia, and abscesses, among other complications. This bacterium has intrinsic resistance to β -lactam antimicrobials.⁵⁵ Finally, *S. saprophyticus* was also identified; this microorganism produces urinary tract infections, but it has also been linked to bacteremia.⁵⁶

Los otros microorganismos identificados en los núcleos de este estudio también han sido implicados en el fracaso endodóntico o en otras infecciones. En este estudio se identificaron dos levaduras pertenecientes al género *Candida*. Entre estas está *C. tropicalis*, la cual, después de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei*, es de las levaduras más frecuentemente aisladas en los canales radiculares infectados.⁴⁵ Esta levadura causa infecciones a nivel global, después de *C. albicans* es la más prevalente, y comparte muchos rasgos patogénicos con esta levadura, como la capacidad de formación de biopelículas y la resistencia a algunos antifúngicos como el fluconazol, así como al hidróxido de calcio. Además, *C. tropicalis* se ha relacionado con fungemias y meningitis.⁴⁶⁻⁵⁰

Otra levadura identificada en este estudio es *Candida parapsilopsis*, la cual está entre los tres agentes etiológicos más frecuentes de candidiasis en el mundo. En América Latina, la frecuencia de candidiasis invasiva debido a esta levadura se ha incrementado recientemente.⁵⁰ Al igual que *C. albicans*, *C. parapsilopsis* tiene la capacidad de formar biopelícula crecer en ambientes con bajo contenido de oxígeno y exhibir resistencia al hidróxido de calcio y al gluconato de clorhexidina, así como al fluconazol.^{50, 51} Además, se ha aislado en canales radiculares infectados y en periodontitis apical aguda.^{49, 52, 53}

Una bacteria encontrada en este estudio fue *K. kristinae*, la cual es conocida por causar bacteremias relacionadas con el uso de catéteres y endocarditis infecciosa. Además, se ha identificado en muestras de infección aguda dental en población pediátrica.⁵⁴ Otra bacteria identificada fue *Stenotrophomona maltophilia*, la cual es considerada como una bacteria oportunista capaz de producir bacteremia, septicemia, endocarditis, meningitis, abscesos, entre otras complicaciones. Esta bacteria tiene resistencia intrínseca a los agentes antimicrobianos β -lactámicos.⁵⁵ Finalmente, también se identificó *S. saprophyticus*, cuya característica es la generación de infecciones del tracto urinario, pero también se ha llegado a relacionar en bacteremias.⁵⁶

Regarding the methodology used in this study, the process of analysis was streamlined for the presence of *E. faecalis*, *S. aureus*, and *C. albicans* in dental materials. The used media allowed the differentiation of colonies and the subsequent identification of one of the studied microorganisms by means of simple inexpensive tests, such as Gram-staining, catalase and coagulase.

CONCLUSIONS

This study identified *E. faecalis* in one of the cast cores (3.2%) manufactured for the dental clinic of Universidad Cooperativa de Colombia at Villavicencio. While *S. aureus* and *C. albicans* were not identified, other microorganisms that can cause endodontic infections or other complications were found, such as *C. parapsilopsis* (35.5%), *C. tropicalis* (6.5%), *K. kristinae* (16.1%), *S. saprophyticus* (12.9%), and *S. maltophilia* (3.2%). Therefore, it is extremely important to establish protocols for the sterilization of these materials prior to use.

RECOMMENDATIONS

It is necessary to optimize procedures in dentistry, not only to secure treatment success, but also to reduce infections that may affect the health and life of patient. In addition, it is important to bear in mind that the strict establishment of asepsis protocols during all the steps of the endodontic treatment will also help reduce the prescription of antibiotics or antifungals. Finally, it is recommended to use the methodology conducted in this study for the analysis of this type of microorganisms in dental materials or other type of materials.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare not having any conflict of interest.

Respecto a la metodología utilizada en este estudio, se agilizó el proceso de análisis para determinar la presencia de *E. faecalis*, *S. aureus* y *C. albicans* en materiales de odontología. Estos medios permitieron la diferenciación de colonias y la posterior identificación de uno de los microorganismos estudiados, mediante pruebas sencillas y económicas, como la coloración de Gram, la catalasa y la coagulasa.

CONCLUSIONES

En este estudio se identificó *E. faecalis* en uno de los núcleos fabricados (3,2%) para la clínica odontológica de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede Villavicencio. A pesar de no encontrar *S. aureus* ni *C. albicans*, se encontraron otros microorganismos que pueden generar infecciones endodónticas u otro tipo de complicaciones, como *C. parapsilopsis* (35,5%), *C. tropicalis* (6,5%), *K. kristinae* (16,1%), *S. saprophyticus* (12,9%) y *S. maltophilia* (3,2%). Por lo tanto, es de gran importancia establecer protocolos de esterilización de estos materiales antes de su utilización.

RECOMENDACIONES

Es necesario optimizar los procedimientos en odontología, no sólo por el éxito del tratamiento sino además por la reducción en las infecciones que puedan comprometer la salud y la vida del paciente. Además, es importante tener presente que el establecimiento estricto de protocolos de asepsia en todos los pasos del tratamiento endodóntico contribuirá también a disminuir la prescripción de antibióticos o antifúngicos. Finalmente, se recomienda utilizar la metodología desarrollada en este estudio para el análisis de este tipo de microorganismos en materiales de odontología o de otro tipo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

CORRESPONDING AUTHOR

Maria del Pilar Angarita Díaz
 Universidad Cooperativa de Colombia at Villavicencio
 (+ 57) 300 898 3524
 maria.angaridad@campusucc.edu.co
 Carrera 35 #36-99 Barrio Barzal, Facultad Ciencias
 de la Salud, Programa de Odontología.
 Villavicencio, Colombia

CORRESPONDENCIA

María del Pilar Angarita Díaz
 Universidad Cooperativa de Colombia, sede Villavicencio
 (+57) 300 898 3524
 maria.angaridad@campusucc.edu.co
 Carrera 35 #36-99 Barrio Barzal, Facultad Ciencias de la
 Salud, Programa de Odontología.
 Villavicencio, Colombia

REFERENCES / REFERENCIAS

- Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(4): 547–558.
- Shweta, Prakash SK. Dental abscess: a microbiological review. *Dent Res J (Isfahan)* 2013; 10(5): 585–591.
- Carrotte P. Endodontics: part 1. The modern concept of root canal treatment. *Br Dent J* 2004; 197(4): 181–183. DOI: 10.1038/sj.bdj.4811565 URL: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4811565>
- Mwangi KJ. Knowledge and practice of aseptic techniques among dental students in the University of Nairobi dental hospital [Internet]. Nairobi: University of Nairobi; 2006. Disponible en: <http://dental-school.uonbi.ac.ke/print/9435>
- Naik S, Khanagar S, Kumar A, Vadavadagi S, Neelakantappa H, Ramachandra S. Knowledge, attitude, and practice of hand hygiene among dentists practicing in Bangalore city - A cross-sectional survey. *J Int Soc Prev Community Dent* 2014; 4(3): 159-163. DOI: 10.4103/2231-0762.142013 URL: <https://doi.org/10.4103/2231-0762.142013>
- Yüzbaşıoğlu E, Saraç D, Canbaz S, Saraç YS, Cengiz S. A survey of cross-infection control procedures: knowledge and attitudes of Turkish dentists. *J Appl Oral Sci* 2009; 17(6): 565–569.
- Helmly SB, Coulton KM, Adams DP. A study of aseptic techniques in a dental hygiene educational clinic. *J Dent Hyg* 2007; 81(4)
- Matsuda JK, Grinbaum RS, Davidowicz H. The assessment of infection control in dental practices in the municipality of São Paulo. *Braz J Infect Dis* 2011; 15(1): 45–51. DOI: 10.1016/S1413-8670(11)70139-8 URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70139-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70139-8)
- Al-Haroni M, Skaug N. Knowledge of prescribing antimicrobials among Yemeni general dentists. *Acta Odontol Scand* 2006; 64(5): 274–280. DOI: 10.1080/00016350600672829 URL: <https://doi.org/10.1080/00016350600672829>
- Fuentes R, Weber B, Flores T, Oporto G. Uso de profilaxis antibiótica en implantes dentales : revisión de la literatura. *Int J Odontostomat* 2010; 4(1): 5–8. DOI: 10.4067/S0718-381X2010000100001 URL: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2010000100001>
- Barzuna M, Lara D. Descripción del manejo aséptico pre-trans colocación de espiga colada/poste prefabricado. *Asociación Costarricense Congresos Odontológicos* 2006; 13: 80-86. Disponible en: <http://www.endobarzuna.com/sites/default/files/art-13.pdf>
- Aslam A, Panuganti V, Nanjundasetty JK, Halappa M, Krishna V. Knowledge and attitude of endodontic postgraduate students toward sterilization of endodontic files: a cross-sectional study. *Saudi Endod J* 2014; 4(1): 18-22. DOI: 10.4103/1658-5984.127982 URL: <http://dx.doi.org/10.4103/1658-5984.127982>
- Abbott PV, Salgado JC. Strategies for the endodontic management of concurrent endodontic and periodontal diseases. *Aust Dent J* 2009; 54(Suppl 1): S70–S85. DOI: 10.1111/j.1834-7819.2009.01145.x URL: <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01145.x>
- Wong AW, Zhang C, Chu CH. A systematic review of nonsurgical single-visit versus multiple-visit endodontic

- treatment. *Clin Cosmet Investig Dent* 2014; 6: 45–56. DOI: 10.2147/CCIDE.S61487 URL: <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S61487>
15. Baumgartner JC, Bakland LK, Sugita EI. Microbiology of endodontics and asepsis in endodontic practice. En: Ingle J, Bakland L (ed). *Endodontics*. 5 ed. London: BC Decker Inc; 2002. 63-93.
 16. Trope M, Bergenholtz G. Microbiological basis for endodontic treatment: can a maximal outcome be achieved in one visit? *Endod Top* 2002; 1: 40–53.
 17. Farber PA, Seltzer S. Endodontic Microbiology . I . Etiology. *J Endod* 1988; 14(7): 363-371. DOI: 10.1016/S0099-2399(88)80200-0 URL: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(88\)80200-0](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(88)80200-0)
 18. Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Rutkunas V. Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatologija* 2008; 10(1): 4–9.
 19. Peciuliene 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(6): 429–434.
 20. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic enterococcus faecalis. *J Endod* 2007; 33(7): 815–818. DOI: 10.1016/j.joen.2007.02.016 URL: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.02.016>
 21. Silva-Herzog D, Garcia CC, Rodríguez MH, González AM. Invasión por *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* en dentina humana. *Rev Nal Odontol Mex* 2011; 3(7): 4–8.
 22. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB et al. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Braz Dent J* 2002; 13(3): 155–161.
 23. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of enterococcus faecalis in previously Root-Filled Canals in a Lithuanian Population. *J Endod* 2000; 26(10): 593–595. DOI: 10.1097/00004770-200010000-00004 URL: <https://doi.org/10.1097/00004770-200010000-00004>
 24. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod*; 2015; 41(8): 1207–1213. DOI: 10.1016/j.joen.2015.04.008 URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.008>
 25. Stevens RH, Grossman LI. Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. *J Endod* 1983; 9(9): 372–374. DOI: 10.1016/S0099-2399(83)80187-3 URL: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(83\)80187-3](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(83)80187-3)
 26. Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(2): 121–126.
 27. Reader CM, Boniface M, Bujanda-Wagner S. Refractory endodontic lesion associated with *Staphylococci aureus*. *J Endod* 1994; 20(12): 607–609. DOI: 10.1016/S0099-2399(06)80087-7 URL: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80087-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80087-7)
 28. Hegde AM, Pallavi L. Prevalence of selected microorganisms in the pulp space of human deciduous teeth with irreversible pulpitis. *Endodontology* 2013; 25(1): 107–111.
 29. Gomes C, Fidel S, Fidel R, de-Moura-Sarquis MI. Isolation and taxonomy of filamentous fungi in endodontic infections. *J Endod* 2010; 36(4): 626–629. DOI: 10.1016/j.joen.2010.01.016 URL: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.01.016>
 30. Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(5): 632–641. DOI: 10.1016/S1079210404000046 URL: <https://doi.org/10.1016/S1079210404000046>
 31. Pan H, Zhang Y, He GX, Katagori N, Chen H. A comparison of conventional methods for the quantification of bacterial cells after exposure to metal oxide nanoparticles. *BMC Microbiol* 2014; 14(1): 222. DOI: 10.1186/s12866-014-0222-6 URL: <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0222-6>
 32. Samra Z, Heifetz M, Talmor J, Bain E, Bahar J. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. *J Clin Microbiol* 1998; 36(4): 990–994.
 33. Kroning IS, Iglesias MA, Sehn CP, Valente Gandra TK, Mata MM, da Silva WP. *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. *Food Microbiol* 2016; 58: 105–111. DOI: 10.1016/j.fm.2016.04.001 URL: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.04.001>
 34. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32(8): 1923–1929.

35. Romeu B, Salazar P, Navarro A, Lugo D, Hernández U; Rojas N et al. Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. *Rev CENIC Ciencias Biol* 2010; 41: 1–9.
36. Lana A, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16(2): 100–105.
37. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(2): 100–103.
38. Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC. *Ingle's endodontics* 6. ed. Bindner P, editor. Hamilton, Ontario: BC Decker; 2008.
39. Ensinas P, Zacca R, Iriarte M. Estudio microbiológico de pernos colados antes de ser cementados en el conducto radicular. *Canal Abierto* 2006; 14-17.
40. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal infection: treatment and antibiotic resistance. En: Gilmore MS. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014.
41. Melo-Maltos SM. Influência da dose infectante na colonização bacteriana do sistema de canais radiculares e na translocação para linfonodos submandibulares em camundongos gnotobióticos. [Trabajo de grado maestría en Endodoncia]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia; 2001.
42. Friedman S. Prognosis in the treatment of teeth with endodontic infections. En: Fouad AF. *Endodontic microbiology*. 1 ed. Singapore: Wiley-Blackwell; 2009. 281-319.
43. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(1): 15–25. DOI: 10.1038/nrmicro2259 URL: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
44. Park B, Nizet V, Liu GY. Role of *Staphylococcus aureus* catalase in niche competition against *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 2008; 190(7): 2275–2278. DOI: 10.1128/JB.00006-08 URL: <https://doi.org/10.1128/JB.00006-08>
45. Slack G. The resistance to antibiotics of microorganisms isolated from root canals. *Br Dent* 1957; 18: 493–494.
46. Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: Its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol* 2010; 59(8): 873–880. DOI: 10.1099/jmm.0.013227-0 URL: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.013227-0>
47. Fernandes T, Silva S, Henriques M. *Candida tropicalis* biofilm's matrix-involvement on its resistance to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 83(2): 165–169. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.015 URL: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.015>
48. Fernández-Ruiz M, Puig-Asensio M, Guinea J, Almirante B, Padilla B, Almela M et al. *Candida tropicalis* bloodstream infection: incidence, risk factors and outcome in a population-based surveillance. *J Infect* 2015; 71(3): 385–394. DOI: 10.1016/j.jinf.2015.05.009 URL: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.05.009>
49. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(2): 288–305. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
50. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1): 133–163. DOI: 10.1128/CMR.00029-06 URL: <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
51. Rossignol T, Ding C, Guida A, d'Enfert C, Higgins DG, Butler G. Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell* 2009; 8(4): 550–559. DOI: 10.1128/EC.00350-08 URL: <https://doi.org/10.1128/EC.00350-08>
52. Singh R, Parija SC. *Candida parapsilosis*: an emerging fungal pathogen. *Indian J Med Res* 2012; 136(4): 671–673.
53. George M, Ivancaková R. Root canal microflora. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2007; 50(1): 7–15.
54. Kutllovcí TA, Iljovska S, Begzati A, Jankulovska M, Popovska M, Rexhepi A et al. Bacteriological identification of selected pathogens in infected primary and young permanent teeth associated with clinical symptoms. *Open J Med Microbiol* 2015; 5(2): 59–68. DOI: 10.4236/ojmm.2015.52007 URL: <http://dx.doi.org/10.4236/ojmm.2015.52007>

55. Garcia DDO, Timenetsky J, Martinez MB, Francisco W, Sinto SI, Yanaguita RM. Proteases (caseinase and elastase), hemolysins, adhesion and susceptibility to antimicrobials of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates obtained from clinical specimens. *Braz J Microbiol* 2002; 33(2): 157–162. DOI: 10.1590/S1517-83822002000200012 URL: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822002000200012>
56. Choi SH, Woo JH, Jeong JY, Kim NJ, Kim MN, Kim YS et al. Clinical significance of *Staphylococcus saprophyticus* identified on blood culture in a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56(3): 337–339. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.08.012 URL: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.08.012>