مجله علوم آزمایشگاهی، دوره پنجم(شماره1) بهار و تابستان 1390

تحقیقی

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

عفونت های بیهوازی در دندانهای نکروتیک(Nonvital) دارای علائم کلینیکی حاد و مزمن

محمد جواد سلطانپور
آزمایشگاه بالینی و تشخیص مولکولی - بیمارستان فوق تخصصی بقیه الله (عج)- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

عباسعلی ایمانی فولادی
مرکز تحقیقات میکروبیو لوژی کاربردی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

قاسم باقرپور
مرکز تحقیقات میکروبیو لوژی کاربردی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

مسعود ملک
آزمایشگاه بالینی و تشخیص مولکولی - بیمارستان فوق تخصصی بقیه الله (عج)- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

نویسنده مسئول: **عباسعلی ایمانی فولادی**

تلفن : 02188068924

پست الکترونیک: imanifoulad@gmail.coml

آدرس : مرکز تحقیقات میکروب شناسی کاربردی- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

چکیده

زمینه و هدف *: میکروارگانیسم‌های بیهوازی در ایجاد بیماری پالپ و پری آپیکال دندانی نقش مهمی دارند و منجر به ایجاد آبسه مزمن می شود، باکتروئیدها از مهمترین آنها در ایجاد بیماری‌اند. هدف از این مطالعه بررسی عفونت‌های بی‌هوازی در دندان‌های نکروتیک (Nonvital) دارای علائم کلینیکی حاد و مزمن می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه تعداد 28 دندان نکروتیک از 28 بیمار به منظور کشت بیهوازی بررسی شدند، که 15 مورد آنها دارای علائم کلینیکی حاد و 13 مورد علائم مزمن بودند. در مجموع 38 کانال ریشه از 28 دندان بررسی و نمونه برداری شد. نمونه‌ها در شرایط بیهوازی در محیط تایو گلیکولات کشت و به آزمایشگاه منتقل شد. در ادامه با روش جار و گاز پک (Gas pak) شناسایی شدند.*

یافته‌ها: *مشخص شد که 76% باکتری‌های جداشده از کانال‌های نکروتیک بیهوازی مطلق و 24% بیهوازی اختیاری هستند. شایع‌ترین میکروارگانیسم‌های جداشده شامل پپتواسترپتوکوک، فوزوباکتریوم و باکتریوئیدها بودند. در مواردی‌که ضایعه پری آپیکال در نمای رادیوگرافی دیده می شد، نیز شایع‌ترین باکتری‌ها پپتواسترپتوکوک و فوزوباکتریوم و باکتریوئیدها شایع‌ترین بودند.*

نتیجه گیری *مطالعه ما نشان داد که باکتریهای بی هوازی اجباری نقش مهم تری از انواع هوازی در ایجاد ضایعات پری آپیکال و پالپ دندان دارند.*

واژه های کلیدی *: عفونت بیهوازی، دندان نکروتیک، بیماری پالپ و پری آپیکال*

وصول مقاله: 90/3/22
اصلاح نهایی: 90/9/29
پذیرش مقاله:90/10/6

آدرس مقاله:
سلطانپور م ج، ایمانی فولادی ع ع، باقرپور ق ، ملک م. عفونت‌های بیهوازی در دندانهای نکروتیک(Nonvital) دارای علائم کلینیکی حاد و مزمن. مجله علوم آزمایشگاهی، 1390دوره پنجم(شماره1) : 37-31

مقدمه

دهان به دلیل شرایط فیزیولوژیک مختص به خود محیط مناسبی جهت رشد میکروب‌های هوازی و بی‌هوازی می باشد ولی فعالیت‌های طبیعی حفره دهان مثل جویدن، ترشح بزاق و وجود ترکیباتی از قبیل آنزیمها و مواد پروتئینی و فعالیت سیستم ایمنی ، محیط را جهت استقرار و تکثیر باکتری‌ها نامناسب می کند، لذا میکروب‌ها عمدتا در مناطقی دور از دسترس سیستم ایمنی ومایعات دهان قرار می گیرند(1). بافت سخت خارجی دندان(مینا، عاج و سمان) بطور طبیعی به عنوان سدی در مقابل تحریکات مضر عمل می کند اما در شرایط خاص مثل آسیبهای فیزیکی ، شیمیایی و میکروبی نسج سخت دندان از بین رفته و نفوذ باکتری‌ها به لایه های زیرین دندان بخصوص پالپ تسهیل می شود. مشخص شده است که شایع-ترین علت آسیب دیدگی مربوط به عفونت‌های باکتریایی است(2). اغلب ضایعات عفونی در دندانها بدلیل فعالیت باکتری‌های فرصت طلبی است که به عنوان فلور نرمال در شیارهای دندانی ساکن هستند. با تولید اسید ناشی از فعالیت‌های متابولیکی این باکتری‌ها به لایه های مختلف دندان صدمه وارد می شود و شرایط را برای نفوذ و تکثیر باکتریها بیهوازی در لایه های زیرین دندان بخصوص نواحی ریشه (پالپ و پری آپیکال) فراهم می کنند (3). با افزایش رشد و تکثیر میکروب-ها، توده های متراکم و پیچیده در سطح و لایه‌های زیرین دندان تشکیل شده و پلاک‌ها و پوسیدگی‌های دندانی در سطح و آبسه های بیهوازی در نواحی ریشه دندان ایجاد می شود. عوامل میکروبی از علل اصلی بیماریهای پالپ و پری آپیکال می باشد(2). اکثر بیماری‌های پالپ و پری آپیکال ناشی از اثرات مستقیم یا غیر مستقیم باکتری‌های موجود در محیط دهان می باشد: پیشنهاد شده است که در صورت عدم وجود باکتری در این نواحی نیازی به درمان ریشه نیست (4). بررسی نتایج مطالعات انجام شده مشخص کرد که عفونت کانال ریشه بصورت مخلوطی از باکتری است. اولین میکروارگانیسم‌های مهاجم استرپتوکوک ها به خصوص استرپتوکوکوس موتانس، کوکسی‌های گرم منفی مثل نایسریا و برانها ملا می باشند که از فلور بزاق که در تماس بادندان‌ها هستند، منشاء می گیرند (2و5). علاوه بر این، باکتری‌های بیهوازی از قبیل ویونلا (Veillonella)، فوزوباکتریوم-ها(Fusobacterium)،پورفیرومونـاس ها (Porphyromonas)،پپتواسترپتوکوک‌ها (Peptostreptococcus) و پروتلا (Prevotella) نیز در عفونت‌های عمقی دهان و دندان نقش دارند. از ارگانیسم‌های بیهوازی مهم در ایجاد ضایعات پالپی و پری آپیکال باکتروئیدها می باشند (6). لذا درمان موفق ریشه دندان در صورتی امکان پذیر است که باکتری‌های موجود در کانال ریشه ازبین رفته یا کاهش یابند و یکی از دلایل شکست دردرمان ریشه دندان، تداوم عفونت‌های باکتریایی خصوصا باکتری‌های بیهوازی می باشد. هدف از این تحقیق مطالعه و بررسی عفونت‌های باکتریایی غالب در بیماری‌های پالپ و پری آپیکال و نقش بی‌هوازی‌ها در این بیماری‌ها می‌باشد. از آنجایی که اکثر مطالعات مرتبط در کشورهای دیگر انجام شده است و ممکن است فلور میکروبی بیماری‌های پالپ و پری آپیکال در جوامع مختلف متفاوت باشد، ضروری است که در داخل کشور نیز مطالعاتی انجام گیرد و تحقیق حاضر نیز در همین راستا می باشد.

روش بررسی

الف: انتخاب بیمار

این مطالعه به روش توصیفی انجام پذیرفت . 28 بیمار (14 زن و 14 مرد بین سنین 11 تا 48 سال با میانگین سنی 29/5 سال) مراجعه کننده به بخش اندودانتیکز دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بابایی قزوین در سال 87-86 که دارای ضایعات در ناحیه ریشه دندان بودند ، بدون در نظر گرفتن جنسیت و با خصوصیات زیر انتخاب شدند :

1-دندان‌های انتخاب شده جهت درمان ریشه همگی غیر زنده(Nonvital)بودند. 2- بیماران فاقد هرگونه بیماری سیستمیک بودند 3- در مورد خانم‌ها هیچ کدام باردار

نبودند. 4- هیچ کدام از بیماران در چند روز گذشته آنتی بیوتیک مصرف نکرده بودند داشتن درد مداوم ، درد بر اثر سرما و گرما و درد بر اثر جویدن غذا، بررسی دندان از نظر وجود تورم موضعی نسج نرم اطراف دندان و یا صورت ، بررسی نمای رادیوگرافی دندان از نظر وجود یا عدم وجود ضایعه پری آپیکال و انجام تست‌های حیاتی دندان جهت اطمینان از نکروز دندان وتعیین بیماری‌های پری آپیکال برای تمام افراد فوق انجام شد.

ب: جمع آوری نمونه

برای نمونه گیری کانال ریشه دندانها کاملا ایزوله شده و تاج آنها بوسیله الکل اتیلیک 70% ضد عفونی شد. در شرایط استریل حفره دسترسی به اتاقک پالپ ایجاد شده و یا در صورت وجود پانسمان ، آن برداشته می شد. در زمان نمونه گیری هیچگونه ماده ضد عفونی کننده وارد کانال باز ریشه نمی‌شد. بوسیله یک باربروچ (Barbed Breach) استریل تا حدود طول ریشه وارد کانال شده و اجازه داده می شد در محل باقی بماند تا ترشحات موجود را جذب نماید. در مواردی که قطر کانال ریشه کم بود و نمی شد بوسیله باربروچ به عمق کانال ریشه وارد شد از فایلهای 10 یا 15 جهت نمونه گیری استفاده می شد. ولی باربروچ بدلیل اینکه دارای سطح مضرس بیشتری در مقایسه با فایل می باشد، میزان ترشحات بیشتری را با خود خارج می کرد بیشتر مورد استفاده قرار می گرفت. به منظور انتقال و غنی سازی ، در شرایط کاملا استریل نمونه ها از کانال ریشه خارج و در کنار شعله به محیط کشت تایوگلیکولات (Merck. Co) منتقل شده و در دمای 37° C بمدت 72- 48ساعت انکوبه گردید (محیط کشت-های میکروبی بدون باکتری جهت استفاده در شرایط بی‌هوازی به مدت 24 ساعت قبل از کشت در شرایط بیهوازی قرار می گرفتند). محیط تایوگلیکولات حاوی مواد مغذی و یک عامل احیاء کننده می باشد که توان اکسیداسیون واحیاء را در محیط کاهش می دهد واکسیژن محیط را جذب می کند و از اثر سمی اکسیژن بر روی باکتری‌های بیهوازی جلوگیری می کند.

ج: تشخیص آزمایشگاهی

-مشاهده میکروسکوپی و کشت

در صورت مشاهده کدورت در محیط تایوگلیکولات بعد از انکوبه گذاری ، به منظور تشخیص و تعیین هویت باکتری‌ها آزمایشات جهت تشخیص باکتریهای هوازی و بیهوازی اختیاری و اجباری به شرح زیر ادامه یافت.:

- تهیه اسمیر و رنگ آمیزی گرم از محیط تایو گلیکولات کشت از محیط تایو گلیکولات بر روی محیط آگار خوندار و انکوبه گذاری در شرایط هوازی بمدت 48 ساعت کشت از محیط تایو گلیکولات بر روی محیط آگار خوندار Lack blood KV (Merck. Co)حاوی کانامایسین و وانکومایسین با استفاده از جار و گازپک (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md) به منظور فراهم نمودن شرایط بیهوازی و انکوبه گذاری در شرایط بیهوازی بمدت 72- 48 ساعت انجام گردید، همچنین از نوار متیلن بلو جهت کنترل شرایط بیهوازی استفاده شد .

- برای ایزولاسیون باکتری‌ها از محیط کشت و تعیین هویت آنها با استفاده از آزمایشات افتراقی بیوشیمیایی از قبیل تخمیر قندی ، کاتالاز، اندول، اکسیداز، تولید سولفید هیدروژن ، آزمایشات حساسیت نسبت آنتی بیوتیک اختصاصی و مرفولوژی کلنی ها استفاده شد.

- بعد از انجام آزمایشات فوق با استفاده از جداول موجود در کتب و مقالات معتبر میکروب شناسی تشخیصی باکتری‌های جدا شده شناسایی گردیدند (7) .

- تست تحمل به اکسیژن (Aerotolerant)

به منظور تشخیص باکتری‌های بی‌هوازی اجباری از باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌هایی مثل هلیکوباکتر پیلوری و غیره از آزمایش تحمل اکسیژن استفاده شد و کلنی های رشد

یافته در شرایط جار بیهوازی به جار حاوی10%- 5% Co_2 و دمای 37درجه سانتی گراد در شرایط هوازی بمدت 24 ساعت منتقل گردید .

د: آزمون آماری

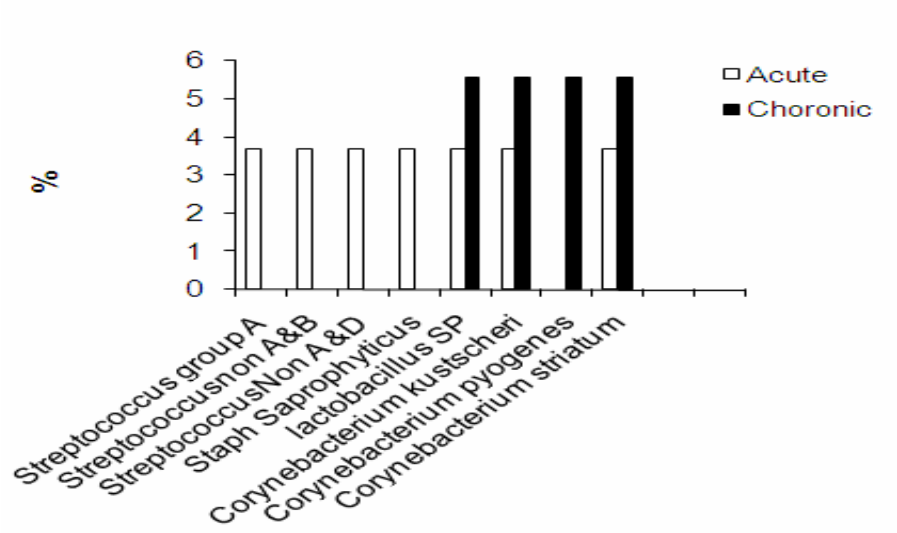
حجم نمونه با سطح اطمینان 95% و ($P < 0.05$) با آزمون آماری Fisher محاسبه و نتایج تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها

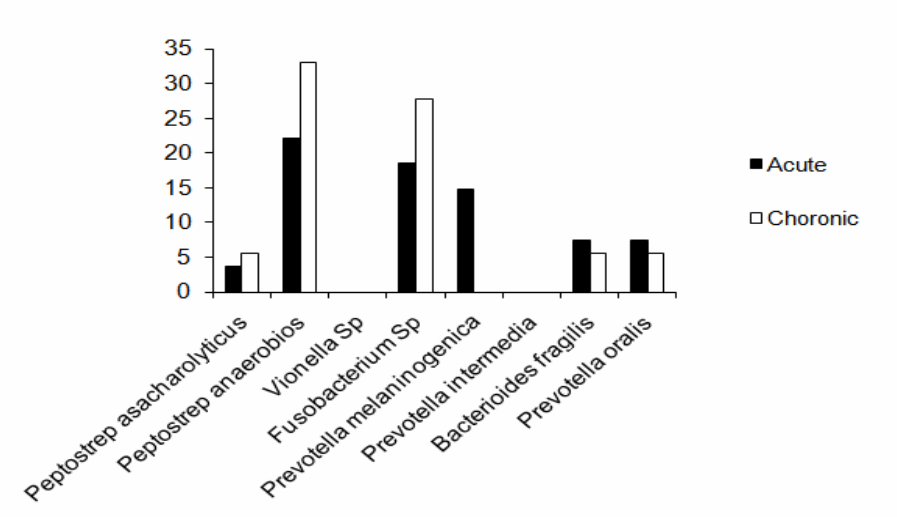
تعداد 28 دندان نکروتیک از 28 بیمار برحسب مراجعه مورد مطالعه قرار گرفتند. از این دندان‌ها تعداد 13 عدد دارای علائم کلینیکی مزمن و 15 عدد دارای علائم حاد بودند. از مجموع 28 دندان قدامی ، پرمولر و خلفی جمعا 38 کانال ریشه مورد بررسی و نمونه برداری شد. 17 ریشه دارای علائم کلینیکی مزمن و 21 ریشه علائم کلینیکی حاد داشتند. از مجموع 38 کشت 36 مورد از نظر رشد میکروبی مثبت بودند و تعداد 45 سوش میکروبی جدا شد، که شامل میکروارگانیسم‌های هوازی – بیهوازی اختیاری و بیهوازی اجباری بودند. در اکثر موارد از یک نمونه بیش از یک نوع باکتری جدا شد که این نکته خود تاییدی بر چند میکروبی بودن (Mix) عفونت‌های کانال ریشه می باشد. آنالیز آماری نشان داد که درمیان گونه های هوازی، میزان فراوانی دو جنس کورینه باکتریوم و لاکتوباسیلوس در عفونتهای مزمن در مقایسه با عفونتهای حاد از اختلاف معنی داری برخوردار است ، و در بین باکتریهای بیهوازی فراوانی باکتریهای پپتواسترپتوکوکوس و فوزوباکتریوم در عفونتهای مزمن در مقایسه با عفونتهای حاد از اختلاف معنی داری برخوردار است ($P < 0.05$) ، و پروتلا ملانینوژنیکا فقط در ایجاد عفونتهای حاد دخالت دارد و در عفونتهای مزمن جدا نشده است(نمودار 1و2).در رابطه با کشت میکروارگانیسم‌ها از کانال‌های نکروتیک و وجود علائم کلینیکی دندان‌ها بدو دسته تقسیم شدند. گروه اول شامل 21 کانال، با علائم کلینیکی حاد بود که همگی از نظر کشت میکروبی مثبت شده و جمعا 27 سوش میکروبی جداشد. گروه دوم شامل 17 کانال دارای علائم کلینیکی مزمن بجز 2 مورد همگی دارای کشت مثبت شدند، که از مجموع 15 کشت مثبت 18 سوش میکروبی بدست آمد. از دسته باکتری‌های هوازی بی‌هوازی اختیاری استرپتوکوک‌های گروه A و استرپتوکوک گروه NonA&D، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، لاکتوباسیلوس‌ها، کورینه باکتریوم‌ها جداشدند ولی هیچ گونه‌ای غالب نبود. اما در بخش باکتری-های بی‌هوازی به ترتیب پپتواسترپتوکوکوس آنئروبیوس (Peptostreptococcus anaerobius)، فوزوباکتریوم‌ها و باکتروئیدس‌ها گونه‌های غالب عامل عفونت بودند. مشخص گردید که پروتلا ملانینوژنیکا (Prevotella melaninogenica) بیشترین گونه بی‌هوازی جداشده از ضایعات حاد پالپ و پری آپیکال می باشد. از مجموع 45 سوش میکروبی جدا شده 24% هوازی بیهوازی اختیاری 76% میکروارگانیسم‌های بیهوازی اجباری بودند , و آنالیز آماری این اختلاف معنی دار را تایید کرد($P < 0.05$) (نمودار 3).

بحث

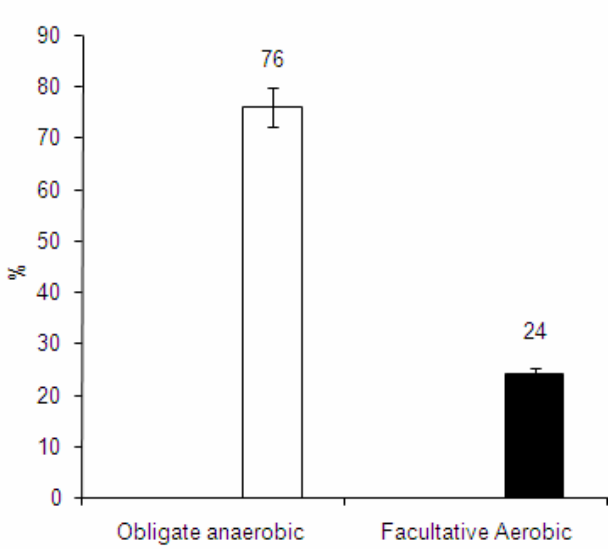
بررسی‌های متعددی جهت تعیین نوع میکروارگانیسم‌های دخیل در عفونت پالپ و پری آپیکال صورت گرفته است در سال 1919 Hartzwell و Henrici اولین بررسی را جهت تعیین فلور میکروبی موجود در کانال ریشه آغاز کردند. درمطالعه آنها 65% استرپتوکوکوس و 20% استافیلوکوکوس‌ها و باقی مانده کورینه باکتریوم‌ها و مخمر گزارش شدند (8).در مطالعات اولیه فلور عمده شامل میکروارگانیسم‌های هوازی و بیهوازی اختیاری بیان می‌شد اما با پیشرفت‌هایی که در زمینه تکنیک‌های رشد و جداسازی میکروارگانیسم‌های بیهوازی صورت گرفت، مشخص گردید که بیهوازی‌های اجباری بطور رایج در انواع بیماریهای پالپ و پری آپیکال دیده می شوند (9)، به طوری‌که در سال 1973 Nord و Berg مشخص کردند که 50% باکتری‌ها، در زمان استفاده از تکنیک‌های هوازی رشد نمی‌کنند و نیاز به استفاده از تکنیک بیهوازی می باشد(10). بر همین اساس در مطالعه حاضر با استفاده از محیط کشت تایوگلیکولات و تکنیک گاز پک و جار، بیهوازی‌ها عامل ضایعه شناسایی شدند.



نمودار 1: میکروارگانیسم‌های هوازی و بیهوازی اختیاری جدا شده از کانال‌های نکروتیک در شرایط حاد ومزمن



نمودار 2: میکروارگانیسم‌های بیهوازی اجباری جدا شده از کانال‌های نکروتیک در شرایط حاد ومزمن



نمودار 3: میزان باکتریهای بیهوازی اجباری و باکتریهای هوازی و بیهوازی اختیاری جدا شده از کانالهای نکروتیک

که مطابق با مطالعه Grifee و همکاران می باشد ، Grifee معتقد است که رشد بیهوازی‌ها با استفاده از تکنیک فوق در 94% موارد مثبت می‌باشد، در حالیکه در روش استفاده از محیط کشت Trypticase soy broth فقط 41% موارد مثبت هستند (11). در تحقیق حاضر میزان شیوع میکروارگانیسم‌های بیهوازی اجباری در کانال‌های نکروتیک 76% بوده است، که شامل پپتواسترپتوکوک، فوزوباکتریوم و باکتروئیدها و غیره می باشد و با نتایج Bystrom و همکاران همخوانی دارد (12). اما در مطالعه ضایعات حاد و مزمن دسته بندی شد که در مطالعه Bystrom انجام نشده است و نیز مشخص شد که بیشترین عامل عفونت حاد دندانی پرووتلا ملانینوژنیکوس می باشد که این بیانگر اهمیت این باکتری در ایجاد عفونت‌های دندانی است که با مطالعه ,Haapasalo همخوانی دارد (13).

Bystrom در مورد رابطه بین میکروارگانیسم‌های ایزوله شده از کانال‌های نکروتیک و وجود تخریب استخوانی در قسمت آپیکال مشخص کرد که باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت بیهوازی اجباری 80% می‌باشد و شایعترین آنها باکتروئیدها، پپتواسترپتوکوک‌ها بوده‌اند(12). در حالیکه در مطالعه ما مشخص شد که علاوه بر دو عامل فوق فوزوباکتریوم‌ها نیز عامل مهمی هستند. ولی میزان شیوع عوامل عفونی در هر مطالعه با هم مطابقت دارد. همین‌طور Sundqvist نشان داد که شایع‌ترین میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی در مورد وجود ضایعه پری آپیکال اوباکتریوم، پپتواسترپتوکوک و فوزوباکتریوم‌ها بودند. در تحقیق ما در موارد وجود ضایعه پری آپیکال شایع-ترین میکروارگانیسم‌ها بی‌هوازی اجباری را پپتواسترپتوکوک، فوزوباکتریوم ، پروو تلا و باکتریوئیدها تشکیل می دهند (14). برانر (Brauner) و دستیارانش میکروفلورای 19 نمونه کانال ریشه که دارای علائم مزمن کلینیکی بودند را با استفاده از روش‌های کشت و رنگ آمیزی گرم مورد مطالعه قرار دادند که پرووتلا اینترمدیا بیشترین درصد کل ارگانیسم ها را شامل می شدند (15). جمیعت و نوع باکتریهای جدا شده در عفونتهای حاد و مزمن دندانهای نکروتیک تفاوت دارند و در مطالعه Santos و همکاران به اثبات رسید که نتایج مطالعه حاضر را تایید می کند ، اما در مطالعه Santos از تکنیک مولکولی استفاده شده است که در تحقیق حاضر از آن استفاده نشده است(16).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر این مطلب است که باکتری‌ها بصورت مخلوط نقش اصلی را در عفونت‌های کانال ریشه بازی می کنند. نقش باکتری‌های بی‌هوازی در مقایسه باکتری‌های هوازی در ضایعات پری آپیکال و پالپ برجسته تر می‌باشد. لذا در درمان اندودنتیکس با توجه به عمقی بودن عفونت بدلیل خاصیت باکتری‌های بی‌هوازی، ضمن تمیز کردن، شکل دادن کامل مکانیکی کانال با استفاده از موادی مثل مشتقات سدیم و کلسیم، باید به طور کامل کانال را ضدعفونی کرد و در صورت نیاز به آنتی بیوتیک از داروهای انتخابی موثر بر باکتری‌های بی‌هوازی و هوازی استفاده نمود. در پایان لازم به ذکر است که آزمایشگاه‌های تشخیص طبی باید در مورد شناسایی باکتری‌های بی‌هوازی توجه بیشتری کرده و امکانات لازم را فراهم آورند و ارتباط بین دندانپزشک و آزمایشگاه در درمان موثرتر ضروری است.

References

1-Bwden GH. *Microbiology of root surface caries*. J Dent Res. 1990; 69(5): 1205-10

2-Robertson D. Smith AJ. *The microbiology of the acute dental abscess* .J of Med Microbiol. 2009; 58: 155– 162

3-Mantzourani M. Fenlon M. Beighton D.*Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions Oral* .Microbiology Immunology. 2009; 24: 32–37

4-Herrera D, Rolda´n S, Gonza´lez I, Sanz M. *The periodontal abscess Clinical and microbiological findings*. J Clin Periodontol. 2000; 27: 387–394

5-Eshraghi S. Salari MH. Kadkhoda Z. Yaghmaei SH.*Isolation and characterization of oral Actinomyces strain from patient with periodontal disease.* J of Dent medical of sciences of theran.1999; 14(3): 21-29

6-Herrera D, Rolda´n S, Gonza´lez I, Sanz M. *The periodontal abscess Clinical and microbiological findings* . J Clin Periodontol. 2000; 27: 387–394

7-Kohneman EW, Allen SD. *Diagnostic Microbiology*.Philadelphia: Lippincott U.S.A. 2006; 79-82

8-Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, etl. *Microbiological examination of infected dental root canals.*Oral Microbiol Immunol. 2004 ;19(2):71-6.

9-Silva G LM, Soares RV, Znobio EG. *Periodontal Abscess during Supportive Periodontal Therapy.* A Review of the LiteratureThe Journal of Contemporary Dental Practice. 2008; 6: 1-7

10-Berg JO, Nord CE. *A method for endodontic specimen*. Scand J Dent Res. 1973; 81:163

11-Griffee MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH, Newton CW. *The relationship of Bacteroides melaninogenicus to symptoms associated with pulpal necrosis*. Oral Surg. 1980; 50: 457-461.

12-Byström A, Sundqvist G. *Bacterial evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy*. Scand J Dent Res. 1981; 89: 321–8.

13-Haapasalo M, Ranta H , Ranta K, Shah H . *Black-Pigmented Bacteroides spp. in Human Apical Periodontitis*. Infect Immun. 1986; 53(1): 149-53

14-Sundqvist G. *Ecology of the root canal flora*. J Endod. 1992;18:427-30.

15-Brauner AW, Conrads G. *Studies into the microbial spectrum of apical periodontitis.* Int Endod J 1995; 28: 244–248.

16-Santos AL, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Jesus EC, Rosado AS, Tiedje JM.*Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections.* PLoS One. 2011;6(11): 280-88.