

Mikrobiološka studija periapikalnih ostitičkih procesa kod zuba s otvorenim i zatvorenim korijenskim kanalom

Marko Krmpotić¹
Darko Mačan¹
Jasenska Škrilin²
Berislav Perić¹

¹Klinički zavod za oralnu kirurgiju Kliničke bolnice "Dubrava", Zagreb
²Zavod za mikrobiologiju i hospitalne infekcije Kliničke bolnice "Dubrava", Zagreb

Sažetak

Svrha ove studije bio je istražiti mikrobnu floru periapikalnih ostitičkih lezija kod jednokorijenskih zuba. Posebno su analizirani periapikalni procesi kod kojih je kanal zuba bio otvoren i oni kod kojih je kanal bio zatvoren (nadogradnja). Uzorci za mikrobiološku raščlambu uzimani su tijekom operativnoga zahvata - apikotomije. Dobiveni rezultati većim se dijelom uklapaju u dosadašnje spoznaje o mikrobnoj flori odontogene infekcije. Polimikrobijalni sastav flore sa znatnim udjelom anaerobnih bakterija te reducirana mikrobna flora u zatvorenim ostitičkim lezijama osnovne su značajke periapikalne infekcije. Najčešći izolati bili su iz skupine streptokoka, a najčešći anaerob Veillonela. Utvrđeno je da se streptokoki češće javljaju u zatvorenim ostitičkim procesima.

Ključne riječi: odontogena infekcija, mikrobiologija, periapeks.

Acta Stomat Croat
2002; 369-374

IZVORNI ZNANSTVENI
RAD
Primljeno: 10. lipnja 2001.

Adresa za dopisivanje:

Marko Krmpotić
Klinički zavod za oralnu kirurgiju
Klinička bolnica "Dubrava"
Av. G. Šuška 6, 10000 Zagreb

Uvod

Usna je šupljina po mnogo čemu specifična regija čije osobitosti uvjetuju raznolikost mikrobnih vrsta. Okružje u usnoj šupljini sa svojom mikroklimom, raznolikošću tkiva te mnogim mikrolokalitetima čini vrlo pogodnu sredinu za razvitak oralne mikroflore. Mikrobiološka populacija u usnoj šupljini jednako je raznovrsna kao i supstrat na kojemu živi. Od mikroorganizama u fiziološkoj flori usta postoje bakterije, gljivice, virusi, mikoplazme i protozoe (1).

Unutar usne šupljine postoje mikrolokaliteti koji se među se razlikuju po kvalitativnom i kvantitativnom sastavu mikrobne flore: slina, zubi, zubni plak, gingivni sulkus, obrazna sluznica, sluznica jezika (2).

Održavanje mikrobne flore u usnoj šupljini dinamičan je i kontinuiran proces koji se odvija nepre-

kidno, a mikrobna se flora mijenja ovisno o fiziološkim i patološkim stanjima kroz koja prolazi cijeli organizam (3). Upotreba antibiotika također može biti uzrokom alteracija normalne flore (4, 5), a posljedica toga može biti podložnost određenim tipovima infekcija i suprainfekcija (6).

Istraživanjem fiziološke i patološke mikrobne flore u usnoj šupljini do sada su se bavili mnogi autori, ali rezultati njihovih istraživanja ostavljaju mogućnosti i za daljnja ispitivanja s obzirom na to da se u slučaju mikrobne flore u odontogenoj upali radi o kvalitativno i kvantitativno vrlo varijabilnom entitetu. Rezultati istraživanja također veoma ovise i o skupini ispitanika, o metodi uzimanja uzoraka (7), te o fazi upale u kojoj se uzima uzorak.

Prema dostupnoj literaturi, iz usne šupljine do sada je izolirano više od 50 vrsta mikroorganizama, pretežito bakterija za koje se smatra da su uzročnici odontogene infekcije. Taj broj niti približno ne odgovara stvarnomu stanju mikrobne flore usne šupljine. Smatra se da u usnoj šupljini postoji između 300 do 500 vrsta bakterija (16), ali metodologija i tehnologija uzimanja uzoraka, kultivacije i identifikacije i dalje se razvijaju te donose nove spoznaje o mikroorganizmima usne šupljine.

U usnoj šupljini razlikujemo odontogene i neodontogene infekcije. Odontogene su infekcije češće i nastaju u pulpi, periapeksu ili u parodontu zuba. Neodontogene infekcije nastaju prodorom mikroorganizama kroz kožu ili sluznicu.

Infekcija periapeksa zuba nastaje širenjem infekcije iz korijenskoga kanala - endodontski put, ili prodorom mikroorganizama kroz parodont - parodontni put. Moguć je i nastanak infekcije *per continuitatem* sa susjednoga zuba.

Iako se u gotovo u svim istraživanjima nađe i manji broj sterilnih uzoraka periapeksnoga tkiva, zna se da periapikalni ostitički proces ne može nastati kao posljedica sterilnoga pulpitisa nego je uzrokovan bakterijskom infekcijom kroz apikalni foramen (9, 10). Prodor bakterija kroz apikalni foramen događa se samo u akutnoj fazi upale.

U periapikalnoj upali nastaju jednake promjene koje se događaju i u pulpalnoj infekciji. Ovisno o obrambenim snagama organizma te o broju i virulenciji mikroorganizama, upala može imati kroničan ili akutan tijek.

Najčešće se radi o mješovitim infekcijama sa znatnim udjelom anaerobnih bakterija.

Prijašnje studije mikrobne flore periapikalnih lezija radile su se kultivacijom mikroorganizama iz uzorka tkiva dobivenog nakon ekstrakcije zuba. Poslije se prešlo na uzimanje mikrobiološkog uzorka izravno iz periapeksnoga područja, za vrijeme operativnog zahvata - apikotomije.

I u periapeksnim lezijama izolirane su gljivice. Kao i u endodontskoj infekciji, najčešće se nalazi kandida, premda ima slučajeva kultivacije i drugih gljivica.

Zabilježen je i slučaj izolacije protozoa iz periapikalne lezije (11).

U dostupnoj literaturi broj izoliranih mikrobnih vrsta u pojedinim mikrobiološkim uzorcima iz periapikalne lezije varira od 1 do 6, a postotak zastupljenosti striktnih anaeroba kreće se između 30% i 80%. Najvjerojatniji uzrok nepodudarnosti svih istraživanja jest u različitosti metoda uzimanja, prijenosa i kultivacije uzoraka. Objašnjenje se također može naći u činjenici da se mikrobna flora u odontogeno upali mijenja s protokom vremena, i to u korist anaerobnih bakterija (12) te o fazi upale u kojoj se uzima uzorak ovisi i mikrobiološki nalaz.

Za promjene koje nastaju u periapeksnom prostoru osobito je važan stanični zid gram-pozitivnih bakterija. Sastavni dijelovi staničnoga zida odgovorni su za procese koji dovode do resorpcije kosti i nastanka ciste ili granuloma (13).

Ispitanici i postupci

Ispitanici

U istraživanju je obrađeno 60 bolesnika Zavoda za oralnu kirurgiju Klinike za kirurgiju lica čeljusti i usta u Kliničkoj bolnici "Dubrava", Zagreb.

Ispitanici su upućeni najvećim dijelom iz područnih stomatoloških ambulanti s dijagnozom kroničnog ostitičkog procesa na incizivima, ocnjacima i premolarima gornje i donje čeljusti. Kliničkim pregledom i rtg obradbom verificirana je dijagnoza te su ispitanici naručivani na operativni zahvat - resekciju vrška korijena.

Prvu skupinu ispitanika činilo je 40 bolesnika s kroničnim ostitičkim procesom na jednom zubu u kojih endodontska terapija nije dala rezultata. Muških je ispitanika bilo 16, ženskih 24. Prosječna životna dob ispitanika bila je 33,1 godinu.

Svi ispitanici za koje se je planirala apikotomija prošli su kod svojih primarnih stomatologa pripremu od najmanje 3 tretmana mehaničke obradbe zuba - čišćenje i širenje korijenskoga kanala te ispiranje Na-hipokloritom i fiziološkom otopinom. Po dolasku na naš zavod, na dan operativnog zahvata svi su podvrgnuti posljednjoj preoperativnoj obradbi korijenskoga kanala s ciljem da se eliminira možebitni preostali infektivni materijal. Tom je prigodom učinjena završna biomehanička instrumentacija Kerr proširivačima i ispiranje 2,5 %-tnim Na-hipoklori-

tom, uz obvezatnu upotrebu koferdama. Korijenski kanal osušen je sterilnim papirnim štapićem i punjen za apikotomiju standardnim postupkom - fosfatni cement i dobro lateralno komprimirana gutaperka koja prolazi kroz apikalni foramen.

Ispitanici su nakon takve preoperativne pripreme podvrgnuti planiranom operativnom zahvatu. Tijek operacije nije se razlikovao od uobičajenoga postupka. Iz upalnoga periapeksnog područja uzet je materijal za mikrobiološku raščlambu. Uzorak se je ubacivao u prijenosno hranilište i dostavljao u mikrobiološki laboratorij u roku 2 sata. Operativni zahvat nastavljen je kako je uobičajeno.

Drugu skupinu ispitanika činilo je 20 bolesnika s periapeksnim ostitičkim procesom na zubu koji ima cementiranu metalnu nadogradnju. U toj skupini bilo je 14 žena. Prosječna životna dob bila je 42,3 godine. U te skupine ispitanika nije provedena uobičajena preoperativna priprema i punjenje kanala već se primijenila tehnika resekcije vrška korijena s retrogradnim ispunom. Pristup periapeksnom području i uzimanje uzorka za mikrobiološku raščlambu istovjetni su prvoj skupini ispitanika, a razlika u zahvatu samo je u postupku retrogradnoga punjenja kanala zuba. Svi su zubi retrogradno zabrtvljeni amalgamom.

Ispitanici iz obiju skupina nisu uzimali antibiotik terapiju najmanje 7 dana prije uzimanja uzoraka za mikrobiološku pretragu.

Materijal za mikrobiološku raščlambu

Za mikrobiološku dijagnostiku uporabljeni su sljedeći instrumenti: automatizirani termostat, Mini-API, svjetlosni mikroskop, termostat soba +35°C, hladnjak +4°C.

Od pribora za mikrobiološku dijagnostiku uporabljeni su ubrisi s prijenosnom podlogom (Venturi Transystem, Copan), API identifikacijski ubrisi za anaerobe, *Corynebacterium spp.*, *Candida spp.* i anaerobni antibiogram, plastične Petrijeve ploče za jednokratnu uporabu, staklene Petrijeve ploče, te sljedeća hranilišta: krvni agar-Columbia Blood Agar, CDC Anaerobic Blood Agar, McConkey agar.

Sve mikrobiološke pretrage učinjene su u Zavodu za mikrobiologiju i hospitalne infekcije Kliničke bolnice "Dubrava".

Statistička raščlamba

Primijenjene su univerzalne metode statističke raščlambe da bi se ispitalo postoje li znatne razlike u distribucijama izolata između dviju skupina ispitanika (bolesnika ili mjesta uzimanja uzoraka). Za ispitivanje razlika u distribucijama varijabli upotrijebio se je χ^2 -test i Fisherov egzaktan test kod razmjerno maloga broja pojavljivanja određene varijable.

Za ispitivanje razlike u distribuciji zavisnih uzoraka upotrijebljen je McNemarin test.

Za testiranje razlike u srednjim vrijednostima upotrijebljena je univerzalna raščlamba varijance (ANOVA). Svi su testovi rađeni uz razinu znatnosti od 0,05. U statističkoj raščlambi upotrijebljen je programski paket SAS system na Windows 95 platformi.

Rezultati

U prvoj skupini ispitanika uzeto je 40 mikrobioloških uzoraka, drugoj skupini 20 uzoraka.

U ukupnom broju od 60 uzoraka izolirano je 103 izolata (prosječno 1,71 izolata po uzorku).

Od ukupnog broja izolata 19,4 % otpada na striktno anaerobne bakterije.

Ukupno je izolirano 27 vrsta mikroorganizama, od čega 26 bakterija i jedna gljivica- *Candida albicans*.

Striktno anaerobnih vrsta izolirano je 14 (51,8 %).

Tablica 1 prikazuje mikroorganizme izolirane u periapeksu ispitanika prve skupine (otvoreni kanal) i druge skupine (zatvoreni kanal) te broj pojavljivanja pojedinih izolata.

Izolirano je ukupno 103 izolata od čega 101 bakterija i 2 gljivice- *Candida albicans*.

U prvoj skupini pronađen je 71 izolat - 70 bakterija i kandida. Ukupno su izolirane 22 različite bakterije.

U drugoj skupini pronađena su 32 izolata - 31 bakterija i kandida. Radi se o 9 različitih bakterija.

Iz tablice je vidljivo da se neke bakterijske vrste pojavljuju vrlo rijetko pa su one izostavljene iz dalj-

Tablica 1. Svi izolati (103) iz ukupnoga broja uzoraka (60) i njihova distribucija po skupinama ispitanika

Table 1. All isolates (103) from the total number of samples (60) and their distribution according to the groups of subjects

	Izolati / Isolates		Skupina 1 / Group 1		Skupina 2 / Group 2	
			n	%	n	%
1	<i>Nonenterococcus species</i>	G+ AE K	2		1	
2	<i>Streptococcus species</i>	G+ AE K	17		15	
3	<i>Streptococcus viridans</i>	G+ AE K	16		6	
4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	G+ AE K	0		1	
5	<i>Streptococcus alpha haemolit.</i>	G+ AE K	1		0	
6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G+ AE K	10		4	
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	G+ AE K	0		1	
8	<i>Enterococcus species</i>	G+ AE K	3		0	
9	<i>Bacillus species</i>	G+ AE B	1		0	
10	<i>Pseudomonas species</i>	G- AE K	1		0	
11	<i>Neisseria species</i>	G- AE K	0		1	
12	<i>Escherichia coli</i>	G- AE B	1		0	
13	<i>Gemmella morbillorum</i>	G+ ANAE K	2		0	
14	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	G+ ANAE K	2		0	
15	<i>Peptostreptococcus prevoti</i>	G+ ANAE K	1		0	
16	<i>Peptostreptococcus micros</i>	G+ ANAE K	1		1	
17	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	G+ ANAE K	0		1	
18	<i>Lacidobacillus acidophilus</i>	G+ ANAE B	1		0	
19	<i>Bifidobacterium species</i>	G+ ANAE B	1		0	
20	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	G+ ANAE B	1		0	
21	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	G+ ANAE B	1		0	
22	<i>Eubacterium lentum</i>	G+ ANAE B	1		0	
23	<i>Veillonela species</i>	G- ANAE K	4		0	
24	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	G- ANAE B	1		0	
25	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	G- ANAE B	1		0	
26	<i>Bacteroides ureolyticum</i>	G- ANAE B	1		0	
27	<i>Candida albicans</i>		1		0	
Ukupno / Total			71		32	

nje statističke obradbe. Statistički su obrađeni i među se uspoređeni samo oni mikroorganizmi koji se u ukupno 60 uzoraka pojavljuju barem 3 puta. U tu skupinu spadaju: *Nonenterococcus species*, *Streptococcus species*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Veillonela species*, *Peptostreptococcus species* i *Enterococcus species*.

Tablica 2. Usporedba čestote pojavljivanja pojedinih izolata u skupini 1 i u skupini 2

Table 2. Comparison of the frequency of occurrence of some isolates in Group 1 and Group 2

Izolati / Isolates	Skupina 1 / Group 1		Skupina 2 / Group 2		p*
	n	N=40 %	n	N=20 %	
<i>Nonenterococcus species</i>	2	5,0	1	5,0	NS
<i>Streptococcus species</i>	17	42,5	15	75,0	0,017
<i>Streptococcus viridans</i>	16	40,0	6	30,0	NS
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	25,0	4	20,0	NS
<i>Veillonela species</i>	4	10,0	0	0,0	NS
<i>Enterococcus species</i>	3	7,5	0	0,0	NS
<i>Peptostreptococcus species</i>	4	10,0	2	10,0	NS

*p - vrijednost dobivena χ^2 ili Fischer testom

Tablica 2 prikazuje usporedbu pojavljivanja pojedinih izolata u ispitanika prve skupine (otvoren kanal) i druge skupine (zatvoren kanal).

Samo za *Streptococcus spp.* utvrđena je statistički znatna razlika u pojavljivanju i to u druge skupine (75% - 42%).

Rasprava

Broj mikrobnih vrsta u usnoj šupljini danas se procjenjuje na 300 do 500 (14, 15). Mnoge od tih bakterija klasificirane su tek nedavno, a mnoge tek treba točno identificirati i klasificirati.

Svi mikroorganizmi koji postoje u usnoj šupljini teoretski su mogući uzročnici infekcije. O ulozi virusa, gljiva i protozoa i dalje postoje podijeljena mišljenja (9, 11, 16-18) te je o njihovoj ulozi u etiologiji odontogene upale sve više novih istraživanja.

Bakterije su nesumnjivo glavni uzročnici odontogenih infekcija. U mnoštvu raznih bakterijskih sojeva i pojedinih bakterijskih vrsta neke se bakterije često pojavljuju u rezultatima istraživanja mikrobne flore u odontogenoj upali, a neke se ne javljaju nikad ili tek povremeno kao usputni nalaz.

Iz dostupne literature (19-26) može se zaključiti da su periapikalne lezije rijetko sterilne te da izolirani mikroorganizmi predstavljaju oportuniste koji se naseljavaju kroz kanal zuba.

U usporedbi sa stranom literaturom naši su rezultati nešto "slabiji" što se tiče broja izolata i udjela anaeroba.

Iwu (25) navodi prosječno 3,4 izolata po uzorku i 45% striktnih anaeroba. U njegovu istraživanju od anaeroba također je najčešća *Veillonella spp.*

Virgil (27) u svojem istraživanju ima čak 21% sterilnih nalaza. Na anaerobe otpada 50% izolata, a najčešće se javlja *Peptostreptococcus micros*.

Brauner (21) dobiva čak 6, 8 bakterija po uzorku. Najčešće su izolirani *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella* i *Bacteroides*.

Samaranayake (23) ima 22% sterilnih nalaza, 2,1 bakteriju po uzorku i 20% striktnih anaeroba. Najčešći izolati bili su iz skupine *Streptococcus viridans*- 40%.

Wayman (28) navodi 12% sterilnih uzoraka, 2,3 izolata po uzorku, 65% izolata bili su striktni anaerobi.

Brook (26) u svojem istraživanju ima 17,9% sterilnih uzoraka, 2 izolata po uzorku. 70,5% su striktni anaerobi, a najčešći su izolati *Bacteroides* i *Streptococcus*.

Kobler (29) dobiva čak 36,9% negativnih nalaza, 19 različitih bakterijskih vrsta i 10,9% striktnih anaeroba.

Kako se iz citirane literature vidi, ne postoje dva sasvim podudarna istraživanja. Rezultati se razlikuju od autora do autora, ali postoje zajednička obilježja mikrobne flore u koja se uklapaju i rezultati našeg istraživanja. To se u prvome redu odnosi na polimikrobijalni sastav i znatnu zastupljenost anaerobnih uzročnika.

Različitosti u zastupljenosti pojedinih mikrobnih vrsta mogu se protumačiti zemljopisnim i vremenskim čimbenikom te sve raširenijom uporabom antibiotika u liječenju raznih infektivnih bolesti (3, 6). Veliki utjecaj na krajnji ishod istraživanja ima faza upale u kojoj se uzima uzorak te metodologija prigodom uzimanja uzoraka, prijenosa i kultivacije koja mora pogodovati anaerobnom dijelu mikrobne flora (14, 30, 31).

U našem istraživanju iz 20 zatvorenih periapektnih lezija izoliran je 31 izolat koji spadaju u 9 bakterijskih vrsta + *Candida*. Samo 2 izolata spadaju u striktnu anaerobe- *Peptostreptococcus anaerobius* i

Lactobacillus acidophilus. Najčešći izolati bili su iz skupine streptokoka, najviše *S. viridans*.

Manji broj bakterijskih vrsta podudaran je s rezultatima nama dostupnih istraživanja stranih autora (21, 22, 25, 26, 28) i razumljiv s obzirom na nutricionalne i respiratorne uvjete u periapeksu zuba koji pogoduju manjem rastu bakterija.

Naš je rezultat zbujujući kada se radi o udjelu striktnih anaeroba u ukupnoj mikrobnoj flori zatvorene periapikalne lezije.

Gore navedena istraživanja koja se bave mikrobnom florom zatvorenih periapikalnih procesa donose podatke o mnogo većoj zastupljenosti anaerobnih bakterija u zatvorenim periapikalnim procesima. To i jest logično s obzirom na anaerobne uvijete koji prevladavaju u periapeksu zuba sa zatvorenim korijenskim kanalom. U našem istraživanju kriterij zatvorenosti bilo je jedino postojanje cementirane nadogradnje. Nismo obraćali pozornost na postojanje eventualne fistule, periradikularne lezije ili uzdužne frakture korijena zuba, postojanje kojih može poremetiti anaerobne uvijete u periapeksu. Mali udio anaeroba u našem istraživanju može se objasniti tom činjenicom, tj. poremećenim anaerobnim uvjetima. Ono što tome usprkos ne možemo objasniti jest manja zastupljenost anaeroba u zatvorenom periapikalnom procesu kada se uspoređi s otvorenim periapikalnim procesom, a uporabljena je istovjetna metoda uzimanja uzorka, prijenosa i kultivacije kod svih zuba koji su apikotomirani u našem istraživanju.

Zaključci

1. Ukupan broj izolata u našem istraživanju - 103, broj različitih vrsta mikroorganizama - 27, od čega više od pola striktnih anaeroba - 14, te jedna gljivica (*Candida*) dobro odražavaju mikrobnu floru u periapikalnoj infekciji.
2. Kod periapikalne upalne lezije u zuba s otvorenim korijenskim kanalom radi se o miješanoj polimikrobijalnoj infekciji, a udio striktnih anaeroba bio je 25,3%. Najčešće smo izolirali bakterije iz skupine streptokoka, a od anaeroba *Veillonelu* i *Peptostreptococcus*.
3. Raščlamba mikrobne flore zatvorenih periapikalnih procesa dala je nešto užu spektar bakterijskih vrsta. Suprotno očekivanju, udio anaeroba

bio je manji nego kod otvorenih periapikalnih lezija. Ponovno su najčešće bile bakterije iz skupine streptokoka.

4. Za *Streptococcus spp.* je utvrđeno statistički znatno češće pojavljivanje u periapeksu zuba s otvorenim korijenskim kanalom.
5. Pojava *Candida albicans* u periapeksu može se protumačiti kao kontaminacija iz usne šupljine. Smatra se da nema patološkog utjecaja u razvoju odontogene infekcije.

Literatura

1. NAJŽAR-FLEGAR D. Studij mikrobiološke flore korijenskog kanala zuba u ovisnosti sa zahvatima na endodontu. Zagreb: Stomatološki fakultet 1978. Disertacija.
2. SCHUSTER GS. The microbiology of oral and maxillofacial infections. In: Topazian RG, Goldberg MH (ed.) Oral and maxillofacial infections. Philadelphia, London W.B. Saunders Co. 1994; 39-78.
3. KANNAGARA DW, THADEPALLI H, MCQUIRTER JL. Bacteriology and treatment of dental infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1980; 50: 103-9.
4. COCO JW, PANKEY GA. The use of antimicrobials in dentistry. Comp Contin Educ Pract Dent 1989; 10: 664-70.
5. NEWMAN M, KORMAN K. Antibiotic/antimicrobial use in dental practice. Chicago, Berlin: Quintessence Publishing Co, 1990.
6. NORD CE, HEIMDAHL A, KAGER L. Antimicrobial induced alterations of the human oropharyngeal and intestinal microflora. Scand J Infect Dis 1986; 49: 64-72.
7. HOLDEMAN LV, CATO EP, MOORE WEC. Anaerobes: laboratory manual. 4th ed. Blacksburg, Virginia: Polytechnic institute and State University, 1977.
8. SUNDQVIST G. Ecology of the root canal flora. J Endod 1992; 18: 427-30.
9. SEN BH, PISKIN B, DEMIRICI T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals. Endod Dent Traumatol 1995; 11: 6-9.
10. YARED GM, DAUGHER FE. Influence of apical enlargement on bacterial infection during treatment of apical periodontitis. J Endod 1994; 20: 535-7.
11. PEPE RR, BERTOLOTTI C. The first isolation of *Turulopsis glabrata* (Anderson) Lodder from dental granulomas. Minerva Stomatol 1992; 41: 431-4.
12. TANI-ISHII N, WANG CY, TANNER A, STASHENKO P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. Oral Microbiol Immunol 1994; 9: 129-35.
13. STABHOLZ A, SELA MN. The role of microorganisms in the pathogenesis of periapical pathosis. 1. Effects of *Streptococcus mutans* and its cellular constituents on the dental pulp and periapical tissue of cats. J Endodont 1983; 9: 171-5.
14. SUNDQVIST G. taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78: 522-30.
15. BAUMGARTNER JC. Microbiologic and pathologic aspects of endodontics. Curr Op Dent 1991; 1: 737-43.
16. NAIR PNR, SJÖGREN U, KREY G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long term light and electron microscopic follow-up study. J Endod 1990; 16: 580-8.
17. WALTIMO TM, SIREN EK, TORKKO HL, OLSEN I, HAAPASALO MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. Int Endodont J 1997; 30: 96-101.
18. SEN BH, SAFAVI KE, SPANGBERG LS. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont 1997; 84: 68-73.
19. MOLANDER A, REIT C, DAHLEN G, KVIST T. Microbial status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endodont J 1998; 31: 1-7.
20. ACCORSI S, LAVAGNOLI G, FRIGERI S, FIAMMINGHI L. Mixed infections: specific canal aspects. Giorn Ital Endodon 1990; 4: 14-25.
21. BRAUNER AW. Studies of microbial spectrum of apical periodontitis. Int Endodont J 1995; 28: 244-8.
22. ABOU-RASS M, BOGEN G. Microorganisms in closed periapical lesions. Int Endodont J 1998; 31: 39-47.
23. SAMARANAYAKE LP, STASSEN LF, STILL DM. A microbiological study of pre- and postoperative apicoectomy sites. Clin Oral Investig 1997; 1: 77-80.
24. WASFY MO, MCMAHON KT, MINAH GE, FALKER WA Jr. Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. Oral Microbiol Immunol 1992; 7: 100-5.
25. IWU C, MACFARLANE TW, MACKENZIE D, STENHOUSE D. The microbiology of periapical granulomas. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol 1990; 69: 502-5.
26. BROOK I, FRAZIER EH, GHER ME. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. Oral Microbiol & Immunol 1991; 6: 123-5.
27. VIRGIL GV, WAYMAN BE, DAZEY SE, FOWLER CB, BRADLEY DV jr. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria from periapical lesions. J Endodont 1997; 23: 110-4.
28. WAYMAN BE, MURATA SM, ALMEIDA RJ, FOWLER CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. J Endodont 1992; 18: 152-5.
29. KOBLER D. Anaerobi korijenskog kanala kod pulpne i periradikularne afekcije zuba. Zagreb: Stomatološki fakultet 1985. Disertacija.
30. SJÖGREN U, FIGOR D, PERSSON S, SUNDQVIST G. Influence of infection at the time of filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int Endodont J 1997; 30: 297-306.
31. BAUMGARTNER JC, FALKER WA Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infested root canal. J Endodont 1991; 17: 380-3.