Revista de Odontologia da UNESP. 2007; 36(2): 163-68 © 2007 - ISSN 1807-2577

Enterococcus faecalis: considerações clínicas e microbiológicas

***Thaís Cachuté PARADELLA*[a], *Cristiane Yumi KOGA-ITO*[a],**

***Antonio Olavo Cardoso JORGE*[a]**

[a]*Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil*

Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *Enterococcus faecalis*: clinical and microbiological considerations. Rev Odontol UNESP. 2007; 36(2): 163-68.

Resumo: O gênero *Enterococcus* abrange diversas espécies, incluindo E. *faecalis*, que participam de diversas doenças na cavidade bucal, tais como cárie, infecções endodônticas recorrentes e periodontites apicais. O objetivo deste artigo foi descrever as principais características microbiológicas do gênero *Enterococcus*, relacionando-as com patologias clínicas endodônticas e periapicais. Após descrição das espécies mais patogênicas do gênero *Enterococcus*, concluiu-se que os fatores de virulência determinam sua elevada patogenicidade, o que se traduz em condições clínicas pouco favoráveis e persistência das infecções endodônticas, mesmo quando o retratamento é instituído.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis; endodontia; periodontia.*

Abstract: *Enterococcus* genus gathers species, including *E. faecalis*, which has participation in oral pathologies, such as caries, recurrent endodontic infections and apical periodontites. The purpose of this article was to describe the main microbiologic characteristics of the *Enterococcus* genus, relating them to clinical endodontic and periapical pathologies. After description of the most pathogenic species of the *Enterococcus* gender, it was concluded that its virulence factors determine the great pathogenesis of this gender, which relates to the poor prognosis clinical conditions and persistency of endodontic infections, even when re-treatment is established.

Keywords: *Enterococcus faecalis; endodontics; periodontics.*

Introdução

O gênero *Enterococcus* inclui diversas espécies residentes do trato gastrintestinal, da vagina e da cavidade bucal como comensais. Por outro lado, algumas espécies, como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, podem originar doenças, incluindo infecções urinárias e endocardite[1]. Mais de 90% das infecções humanas enterocócicas são causadas por *E. faecalis*, sendo as demais por *E. faecium.* Doenças relacionadas a outras espécies desse gênero são raras[1,2].

Enterococcus compõe um grupo de bactérias Gram-positivas que são associadas a infecções endodônticas em odontologia. No entanto, essas espécies correspondem a uma porcentagem muito pequena da microbiota bacteriana inicial de dentes com polpas necróticas sem tratamento[3]. *E. faecalis* é freqüentemente encontrado em canais obturado, exibindo sinais de periodontite crônica apical[4]. Estudos in vitro[5,6] demonstraram a capacidade do *E. faecalis* de penetrar nos túbulos dentinários, habilidade esta não demonstrada por todas as espécies bacterianas. Do ponto de vista microbiológico, os enterococos apresentam poucas exigências para o seu crescimento, sendo capazes de crescer em temperatura de 10 a 45 °C, pH 9,6 em 6,5% de solução salina, e de sobreviver a 60 °C por 30 minutos. São microrganismos facultativos, catalase-negativos, e a grande parte das espécies desse gênero hidrolisam esculina na presença de bile. Para a identificação de enterococos por procedimentos convencionais, testes de fermentação de carboidratos e utilização de piruvato são determinados em meio de infusão cérebro-coração (BHI), contendo bromocresol violeta e 1% de carboidratos esterilizados por filtração ou piruvato a 1%. *E. faecalis* cresce em piruvato a 1%, não fermentando manitol e sacarose[4,7].

E. faecalis apresenta resistência aos efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio, provavelmente devido ao efetivo sistema de bombeamento de prótons que mantém níveis de pH citoplasmático ótimos dificultando o tratamento endodôntico[1,8]. *E. faecalis* é ainda o microrganismo mais comumente isolado de dentes com infecções pós-tratamento

endodôntico[9]. O isolamento do *E. faecalis* de canais radiculares não tem relação com a utilização de determinados materiais obturadores em particular, mas sim com a baixa sensibilidade a agentes microbianos e com a habilidade em inativá-los[10]. Grande parte dos casos clínicos mostra canais radiculares infectados com *E. faecalis* que permaneceram assintomáticos por anos, pois não responderam à terapia endodôntica convencional e foram descobertos por radiografias periapicais que revelaram lesões periapicais, muitas vezes em estado avançado. Alguns pacientes revelam dor branda e pode ocorrer a agudização do processo durante o tratamento endodôntico[11]. *E. faecalis* é isolado de dentes com tratamento endodôntico sem lesão apical em torno de 81,5% dos casos e em infecções pulpares e periapicais recorrentes. Essa espécie bacteriana impede a liberação de enzimas hidrolíticas por células polimorfonucleadas, o que pode explicar o seu domínio em infecções pulpares[5,11].

Objetivo

O objetivo deste estudo foi descrever os principais fatores de virulência do *Enterococcus faecalis*, relacionando-os com patologias clínicas endodônticas e periapicais.

Revisão da literatura

A habilidade de formação de biofilme pelo gênero *Enterococcus* permite a colonização de superfícies inertes e biológicas, protege contra agentes antimicrobianos e ação de fagócitos, mediando adesão e invasão de células do hospedeiro[12] .

Além da formação de biofilme, os fatores de virulência mais citados na literatura são a produção de substância de agregação, adesinas de superfície, ácido lipopoliteicóico, produção extracelular de superóxido, enzima lítica gelatinase e hialuronidase[1]. Cada um desses fatores pode estar associado a vários estágios de infecções endodônticas, bem como à inflamação periapical. As bacteriocinas de *Enterococcus*, por exemplo AS-48, têm importância na dominância de *E. faecalis* em infecções endodônticas persistentes[1].

Esses microrganismos são resistentes a diversos antibióticos (tetraciclina e gentamincina)[9]. *Enterococcus* ssp. são susceptíveis a ampicilina, benzilpenicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, rifampicina, estreptomicina e vancomicina[1,9].

Por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR), foram analisadas as substâncias de codificação de agregação (asa e asa373), o ativador de citolisina (cylA), a produção de gelatinase (gelE), o fenótipo gelatinase-negativa (ef1841/fsrC), os fatores de aderência (esp e ace) e o antígeno de endocardite (efaA). Os resultados demonstraram que os produtos de PCR incluindo efaA, ace e asa foram identificados em todas as espécies testadas, mas asa 373 não foi detectada. O gene de gelatinase (gelE) foi detectado em *E. faecalis*, mas não em *E. faecium*[1,9].

A substância de agregação (AS) é uma adesina bacteriana, codificada por plasmídio, que responde a ferormônios e que realiza eficiente contato entre hospedeiro e receptor bacteriano, facilitando a troca de plasmídios[13]. Esse contato depende de uma substância ligante, que também é codificada por plasmídios. Espécies que não são codificadas por essa substância ligante não conseguem eficiente ação do AS[1]. A substância agregadora é de natureza protéica e sua expressão na superfície da célula pode ser induzida por soro[13]. O ASA373 pertence à família do AS, diferindo porém em sua estrutura protéica. O AS tem sido responsável por promover adesão direta, independente de opsonina, de *E. faecalis,* a neutrófilos humanos pelo mecanismo mediado por receptores do sistema complemento, tornando essas cepas de *E. faecalis* resistentes à fagocitose por neutrófilos[1,14]. Espécies que possuem AS realizam produção extracelular de superóxidos, os quais contribuem para o dano tecidual em infecções dominadas por *E. faecalis*.

Os superantígenos são moléculas produzidas por bactérias, fungos ou parasitas que podem induzir inflamação atuando na estimulação de linfócitos T, seguida de grande liberação de citocinas inflamatórias, resultando em dano tecidual[1,15]. A associação de AS com a substância ligante apresenta atividade de superantígeno[16], levando à proliferação de linfócitos T, com subseqüente liberação de TNF beta e interferon gama, os quais estimulam a liberação de TNF alfa pelos macrófagos, atuando na reabsorção óssea. Interferon gama ativa a produção de agente citotóxico ácido nítrico, o que leva à destruição celular[1].

Outro fator de virulência importante é a proteína ESP, codificada pelo gene esp, detectado em casos de bacteriemia, mas não em indivíduos saudáveis[1,17]. Essa proteína participa da formação de biofilme por *E. faecalis,* e, possivelmente, essa forma de organização auxilia a bactéria a resistir ao efeito bactericida da medicação de hidróxido de cálcio em canais radiculares infectados[1,18].

E. faecalis apresenta em sua parede celular o ácido lipopoliteicóico (LTA), que auxilia na ligação das bactérias às células eucarióticas, incluindo linfócitos[19,20]. O LTA estimula reabsorção óssea, além de estimular diversas células polimorfonucleadas a liberarem mediadores inflamatórios, contribuindo para o dano tecidual[1].

A gelatinase é uma metalo-proteinase, composta por zinco, purificada e descrita em 1964[21]. Ela pode hidrolisar gelatina, colágeno, fibrinogênio, caseína, hemoglobina e insulina. A gelatinase é produzida por um grande número de células eucarióticas, pois, no hospedeiro, faz parte de processos fisiológicos normais, como regulação na formação e na remodelação tecidual. No entanto, no caso de indivíduos com periodontites com grande quantidade de *E. faecalis*, os níveis de gelatinase no fluido gengival e na saliva são eleva-

dos. Assim, a hidrólise de colágeno pela gelatinase produzida por *E. faecalis* pode ter papel importante na patogênese e na propagação de inflamações periapicais[22,23].

E. faecalis também produz a enzima hialuronidase, que atua no ácido hialurônico encontrado no tecido conjuntivo humano, facilitando a disseminação bacteriana. Essa enzima já foi isolada de dentina cariada, apresentando participação na destruição dentinária durante o processo de cárie[24]. A presença da hialuronidase constitui-se um fator auxiliar na disseminação de uma infecção pulpar para a região periapical; no entanto, esse fator ainda não foi comprovado.

Para a bactéria ser patogênica, ela deve essencialmente aderir-se aos tecidos, invadí-los, multiplicar-se e sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro e a outras bactérias, em competição, e então produzir dano tecidual. *E. faecalis* tem os requisitos para estabelecer uma infecção endodôntica e manter a resposta inflamatória potencialmente danosa ao hospedeiro[1]. Ocorrendo contaminação do canal radicular por *E. faecalis*, este pode aderir-se à parte mineral da dentina por meio do LTA e ao colágeno por AS. A Figura 1, obtida por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), mostra *E. faecalis* aderido aos túbulos dentinários de um dente humano.

Outras adesinas de superfície também são importantes, especialmente a ACE. No interior do canal, as bactérias encontram uma série de condições não-favoráveis, como deficiência nutricional, toxinas de outras bactérias e medicação endodôntica. Essas condições modulam a expressão de adesinas bacterianas. Além disso, a infiltração de soro para dentro do canal induz a expressão de AS, aumentando a aderência bacteriana. *E. faecalis* consegue resistir à medicação intracanal, como hidróxido de cálcio, uma vez que esse microrganismo consegue penetrar profundamente nos túbulos dentinários em direção à polpa, não sendo atingido pelo hidróxido de cálcio. A presença de suas toxinas e bacteriocinas, como a citolisina, explica o porquê da não existência de muitas outras espécies em associação com *E. faecalis* em infecções endodônticas[1,25].

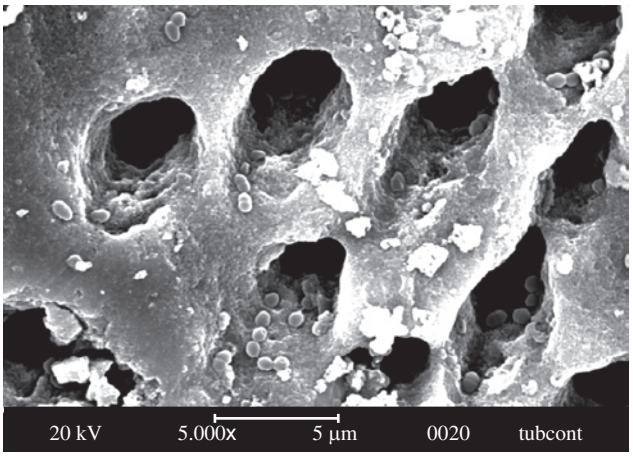

Figura 1. *E. faecalis* penetrando nos túbulos dentinários de um dente humano. Gentilmente cedida por Márcia Maciel Menezes e Márcia Carneiro Valera – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP.

A elevação do pH em 8,5, conseqüência de tratamentos insuficientes com medicação alcalina, como o hidróxido de cálcio, aumenta a habilidade de adesão ao colágeno de *E. faecalis in vitro*, podendo este ser o mecanismo crítico pelo qual *E. faecalis* predomina em infecções endodônticas persistentes[25].

Apesar de o canal radicular obturado ser pobre em nutrientes, *E. faecalis* obtém sua nutrição do ácido hialurônico presente na dentina por meio da degradação por hialuronidase, e, nos casos de selamentos inadequados do conduto, a entrada de fluidos potencializa a ação de *E. faecalis*. Produção extracelular de superóxidos, gelatinase e outras enzimas levam a dano direto dos tecidos periapicais, além de estimular o dano tecidual causado pela resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro, induzida por *E. faecalis*. Não se pode excluir o fato de que a bactéria, ultrapassando o forame apical, atinge a região perirradicular e, então, causa danos nessa região. No entanto, o foco de infecção está no canal radicular e nos túbulos dentinários, regiões de difícil acesso ao sistema de defesa do hospedeiro. Portanto, a remoção mecânica de *E. faecalis*, bem como o uso de anti-sépticos na endodontia, é essencial, uma vez que resíduos do LTA podem sustentar a inflamação[1,25].

Medida preventiva é a utilização de agentes como a tripsina, que bloqueia a ação dos fatores de virulência, bem como previne a invasão dos túbulos dentinários, evitando sua aderência[1,26].

Apesar de infecções endodônticas e periapicais serem polimicrobianas, as infecções persistentes apresentam a dominância de *E. faecalis*[1,27], ressaltando a importância da discussão dos seus fatores de virulência, assim como a evolução da pesquisa nessa área.

Utilizando-se da reação em cadeia de polimerase (PCR), identificaram-se determinadas espécies bacterianas, incluinde *E. faecalis*, em periodontites apicais agudas, periodontite apical crônica, periodontite apical exacerbada, sendo 71% dos casos associados a infecções endodônticas primárias e 29% a infecções endodônticas recorrentes (secundárias). *E. faecalis* estava presente em 70% dos casos de periodontite apical crônica e em 72% dos dentes com infecções endodônticas secundárias, estando, portanto, associado a falhas nos tratamentos endodôntico e periapical[28].

Quarenta pacientes com lesões perirradiculares recidivantes, incluindo pacientes diabéticos, que estavam sob retratamento endodôntico tiveram material colhido dos canais radiculares dos dentes afetados, sendo o material submetido à PCR. Os resultados demonstraram que *E. faecalis* foi a única espécie enterocócica detectada, com prevalência de

22%, 19% destes em pacientes não-diabéticos e 33% em pacientes diabéticos [29]. Em contraste, outro estudo[30] apontou *E. faecalis* como a espécie mais prevalente na microbiota subgengival de pacientes com periodontite crônica e baixos níveis de linfócito T CD4. Nesse estudo, os autores concluíram que a severa imunossupressão tem um papel fundamental a favor da colonização dessa espécie.

E. faecalis se mantém viável em canais radiculares in vitro, por um período de 12 meses sem nutrientes adicionais[9]. Apresenta capacidade de se manter viável sob várias condições experimentais não-favoráveis, como quando exposto a sais biliares, ácido, calor, falta de glucose, hipoclorito de sódio e quando armazenado em água de torneira[4,31,32]. A habilidade do *E. faecalis* de sobreviver a períodos extensos em ambientes nutricionais limitados representa uma importante característica da patogênese desta espécie em processos patológicos de falhas no tratamento endodôntico[4].

E. faecalis sobrevive por mais de quatro meses em soro humano a 50%, de acordo com estudo recente[4], no qual o microrganismo cresceu e estabilizou seu crescimento em 10^6 UFC.mL^{-1} durante esse período, independente da densidade celular inicial. Quando a concentração de soro foi de 1 ou 5%, os valores de crescimento observados foram semelhantes àqueles com concentrações mais altas de soro, o que significa que apenas 1% de soro humano é necessário para o crescimento e a sobrevivência do *E. faecalis*. Esses resultados demonstram que *E. faecalis* é capaz de persistir como patógeno no canal radicular, onde algumas células podem sobreviver às medidas antimicrobianas adotadas durante o tratamento endodôntico, serem capazes de se multiplicar utilizando nutrientes derivados do soro humano e, dessa forma, apresentando potencial para manter a infecção periapical[4].

O papel das bactérias e de seus subprodutos no estabelecimento e na perpetuação das infecções pulpares e periapicais é bem conhecido[33]. A grande maioria das bactérias infectantes é removida durante os procedimentos endodônticos de instrumentação e irrigação do canal radicular. Quando múltiplas sessões de tratamento endodôntico são necessárias, utiliza-se uma medicação intracanal com atividade antibacteriana. Porém, a total eliminação de espécies bacterianas patogênicas nem sempre é atingida na prática clínica. As complexidades anatômicas de alguns canais radiculares e as subseqüentes dificuldades de acesso de instrumentos, irrigantes e medicação intracanal são fatores bem conhecidos. Além disso, a dificuldade de eliminação da população bacteriana encontrada em canais radiculares encontra argumento na variedade de espécies bacterianas[34-36].

Em termos de instrumentação de canais radiculares, um estudo recente[37] comparou diferentes instrumentos manuais e rotatórios (limas Hedstroëm, Giromatic e Hero 642). Apesar de todos os instrumentos e técnicas testadas terem reduzido o número de *E. faecalis* no canal radicular, não houve diferença significante entre as técnicas em reduzir o número de bactérias intracanal. Outros autores[38,39] afirmaram que *E. faecalis* e *E. faecium* são resistentes ao preparo do canal radicular, bem como diversas medicações intracanal, o que significantemente contribui para falhas no tratamento endodôntico.

O hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) é utilizado como medicação intracanal, por apresentar capacidade de eliminação bacteriana, quando utilizado durante um período de 7 dias. No entanto, já foi demonstrado[4] que a espécie patogênica mais comumente isolada de tratamentos endodônticos sem sucesso (*E. faecalis*) é capaz de sobreviver nos túbulos dentinários após longos períodos de terapia à base de hidróxido de cálcio, sendo essa afirmação corroborada por estudos[40,41] nos quais o hidróxido de cálcio não foi eficaz na sua eliminação nos cones de guta-percha.

Foram feitas tentativas de aumentar o poder bactericida do hidróxido de cálcio, incluindo a adição de medicamentos como monoclorafenol canforado (CMC) e iodeto de potássio 2% (KI)[35]. O hidróxido de cálcio eliminou 94% das bactérias testadas, porém não apresentou efeito bactericida sobre o *E. faecalis*. No entanto, apesar do KI ter resultado em 9 de 10 amostras livres de espécies bacterianas nas primeiras 24 horas, o número médio de bactérias remanescentes após esse período de tempo foi 99,99% menor com KI do que com o hidróxido de cálcio. Portanto, os autores concluíram que o KI tem grande potencial de eliminação de *E. faecalis* quando o seu tempo de contato com a superfície dentária é de quinze minutos, em média, o que o torna um material interessante para irrigação e não para medicação intracanal.

A clorexidina apresentou boa eficácia contra *E. faecalis;* no entanto, essa eficácia é diretamente dependente da concentração, e a associação de clorexidina a 0,5% e hidróxido de cálcio demonstra ser mais eficiente do que apenas a utilização de hidróxido de cálcio[42]. A combinação de gel de clorexidina a 0,2% e hidróxido de cálcio se mostrou eficaz na eliminação de *E. faecalis*[42]. No entanto, a combinação de clorexidina e hidróxido de cálcio pode ser clinicamente difícil do ponto de vista de obturação de canal. Em compensação, em outro estudo[43] a clorexidina a 2% foi mais efetiva do que o hidróxido de cálcio a 2,5% na eliminação de *E. faecalis*. Porém, de acordo com um recente estudo[44], não houve diferenças significantes em termos de redução de unidades formadoras de colônia de *E. faecalis* comparando-se clorexidina em gel a 2%, clorexidina líquida a 2% e hipoclorito de sódio a 5,25%.

Uma outra metodologia que vem sendo considerada para eliminar espécies bacterianas é a utilização de ozônio. No entanto, o ozônio apresentou pouca atividade sobre *Enterococcus* ssp. quando há formação de biofilme[45].

A identificação de microrganismos capazes de resistir à terapia de tratamento endodôntico e sobreviver no ambiente do canal radicular auxilia no desenvolvimento de eficazes

terapias antimicrobianas. Técnicas microbiológicas moleculares aumentam a sensibilidade de detecção microbiana e, assim, permitem a identificação de *Enterococcus* com maior precisão[29].

A complexa interação entre diferentes espécies bacterianas existentes em infecções pulpares primárias ou secundárias resulta em quadros clínicos característicos, os quais não podem ser alcançados por espécies bacterianas individuais. Assim, a pesquisa relacionando interações entre *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella, Porphyromonas* e *Tanerella,* com características clínicas, utilizando técnicas microbiológicas moleculares, principalmente com espécies bacterianas difíceis de serem cultivadas in vitro (como *Tanerella forsythensis* e *Treponema denticola*), auxilia na obtenção de uma descrição mais compreensiva dos microrganismos endopatogênicos[46].

Com a descrição dos microrganismos que participam das infecções endodônticas e periapicais, bem como de suas características microbiológicas, espera-se que novas medicações intracanal e irrigantes auxiliem no tratamento e na resolução dessas patologias persistentes.

Considerações gerais

Enterococcus abrangem espécies patogênicas, sobretudo *E. faecalis*, presentes em infecções endodônticas e periapicais persistentes. Características microbiológicas, bem como seus fatores de virulência, determinam a patogenicidade de *E. faecalis*, o que se traduz em condições clínicas pouco favoráveis e persistência das infecções, mesmo quando o retratamento é instituído.

Referências

1. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15:308-20.
2. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. Clin Microbiol Rev. 1994;7:462-78.
3. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol Immunol. 1992;7:257-62.
4. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth, and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. Oral Microbiol Immunol. 2003;18:234-9.
5. Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. J Endod. 2006;32:722-6.
6. Rocas IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod. 2004;30:315-20.
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Chicago: Lippincott Williams & Wilkins; 1997.
8. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J. 2002;35:221-8.
9. Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander Al. Quantative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. Arch Oral Biol. 2005;50:575-83.
10. Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. J Endod. 2002;28:634-7.
11. Reynaud AF, Geijersstam A, Sorsa T, Stackelberg S, Tervahatiala T, Haaspalo M. Effect of *E. faecalis* on the release of serine proteases elastase and cathepsin G, and collagenase-2 (MMP-8) by human polymorphonuclear leukocytes (PMNs). Int Endod J. 2005;38:667-77.
12. Baldassarri L, Creti R, Montanaro L, Orefici G, Arciola CR. Pathogenesis of implant infections by enterococci. Int J Artif Organs. 2005;28:1101-9.
13. Kreft B, Marre S, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. Infect Immun. 1992;60:25-30.
14. Vanek NN, Simon SI, Jacques-Palaz K, Mariscalco MM, Dunny GM, Rakita RM. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin independent binding to human neutrophils via complement receptor type 3-mediated mechanism. Immunol Med Microbiol. 1999;26(1):49-60.
15. Jappe U. Superantigens and their association with dermatological inflammatory diseases: facts and hypothesis. Acta Dermatol. 2000;80:321-8.
16. Schilievert PM, Gahr PJ, Assimacopoulos AP, Dinges MM, Stoehr JA, Harmala JW, et al. Aggregation and binding substance enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. Infect Immun. 1998;66:218-33.
17. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. Infect Immun. 1999;67:193-200.
18. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medication root canals. J Endod. 2002;28:689-93.
19. Beachey EH, Chiang TM, Ofek I, Kang AH. Interaction of lipoteichoic acid of grupo A Streptococci with human platelets. Infect Immun. 1977;16:649-54.
20. Beachey EH, Dale JB, Grebe S, Ahmed A, Simpson WA, Ofek I. Lymphocyte binding and T-cell mitogenic properties of group A streptococcal lipoteichoic acid. J Immunol. 1979;122:189-95.

21. Bleiweis AS, Zimmerman LN. Properties of proteinase from *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. J Bacteriol. 1964;88:653-88.
22. Mäkelä M. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. J Dent Res. 1994;73:1397-406.
23. Soell M, Elkaim R, Tenembaum H. Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingivas crevicular fluid from periodontitis-affected patients. J Dent Res. 2002;81:174-8.
24. Hashioka K, Suzuki K, Yoshida T, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. Relationship between clinical symptoms and enzyme-producing bacteria isolated from infected root canals. J Endod. 1994;20:75-7.
25. Kayaoglu G, Erten H, Orstavik D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. Int Endod J. 2005;38:389-96.
26. Xiao J, Hook M, Weinstock GM, Murray BE. Conditional adherence of *Enterococcus faecalis* to extracellular matrix proteins. Immunol Med Microbiol. 1998; 21:287-95.
27. Stuart CH, Schwartz, SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006;32:93-8.
28. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sanbri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20:289-95.
29. Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99:112-8.
30. Gonçalves LS, Ferreira SM, Silva A Jr, Villoria GE, Costinha LH, Souto R, et al. Association of T CD4 lymphocyte levels and subgingival microbiota of chronic periodontitis HIV-infected Brazilians under HAART. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97:196-203.
31. Laplace JM, Thuault M, Hartke A, Boutibonnes P, Auffray Y. Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: influence of antecedent growth conditions and induced proteins. Curr Microbiol. 1997;34:284-9.
32. Capiaux H, Giard JC, Lemarinier S, Auffray Y. Characterization and analysis of a new gene involved in glucose starvation response in *Enterococcus faecalis*. Int J Food Microbiol. 2000;10(55):99-102.
33. Gomes BP, Ferraz CC, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. J Endod. 2002;28:758-61.
34. Gomes BP, Lilly JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. Int Endod J. 1996;29:69-75.
35. Baker NE, Liewehr FR, Buxton TB, Joyce AP. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide, iodine potassium iodide, betadine, and betadine scrub with and without surfactant against *E. faecalis in vitro*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;98:359-64.
36. Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Sousa-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single or multiple visit root canal treatments carried out in infected teeth *ex vivo*. Int Endod J. 2005;38:697-704.
37. Colak M, Evcil S, Bayindir YZ, Yigit N. The effectiveness of three instrumentation techniques on the elimination of *Enterococcus faecalis* from a root canal: an *in vitro* study. J Contemp Dent Pract. 2005;6:94-106.
38. Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. Int Endod J. 2005;38:372-80.
39. Dahlen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. Oral Microbiol Immunol. 2000;15:309-12.
40. Lui JN, Sae-Lim V, Song KP, Chen NN. *In vitro* antimicrobial effect of chlorexidine-impregnated gutta percha points on *Enterococcus faecalis*. Int Dent J. 2004;37:105-13.
41. Segdley CM, Lennal SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. Int Endod J. 2005;38:735-42.
42. Basrani B, Tjardehane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorexidine and calcium hydroxide containing medicaments against *Enterococcus faecalis in vitro*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003;96:618-24.
43. Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intra-canal medicaments on microrganisms within root canals. Int Endod J. 2004;37:311-9.
44. Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of immediate and prolonged antimicrobial action of chlorexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99:768-2.
45. Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An *in vitro* evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2005;38:22-9.
46. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Souza EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004;19:71-6.