

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

**ENDODONTİK ENFEKSİYONLARDA *TREPONEMA*
DENTİCOLA'NIN “POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU” (PCR)
YÖNTEMİ KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

Dt. M. Selçuk ÖZBEK

**Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. A. Şahin ERDOĞAN**

**Doktora Tezi
Erzurum-2009**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR		II
ÖZET		III
SUMMARY		V
GİRİŞ VE AMAÇ		1
GENEL BİLGİLER		3
GEREÇ ve YÖNTEM		41
BULGULAR		47
TARTIŞMA		52
SONUÇLAR		66
KAYNAKLAR		67
EKLER		93

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Aziz Şahin Erdoğan'a, Endodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mustafa Köseoğlu'na, tüm bölüm hocalarıma ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma;

Tecrübe, bilgi ve desteğini benden esirgemeyen babam Prof. Dr. Hikmet Özbek ve ağabeyim Yrd. Doç. Dr. Ahmet Özbek'e, gösterdiği sabır, anlayış ve destek için eşim ve oğlum Kerem Alp'e teşekkür ederim.

ÖZET

Endodontik Enfeksiyonlarda *Treponema denticola*'nın "Polimeraz Zincir Reaksiyonu"
(PCR) Yöntemi Kullanılarak Araştırılması

Bu çalışma; akut apikal periodontitis, akut apikal apse ve kronik apikal periodontitis tanısı konan hastalardan alınan mikrobiyal örneklerde *Treponema denticola*'nın varlığını, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile araştırmak amacıyla yapıldı.

Hastaların anamnez bilgileri, kaydedilerek sistemik rahatsızlığı bulunan ve son üç ay içerisinde antibiyotik kullanan hastalar çalışma dışında tutuldu. Çalışmada akut apikal periodontitisli 20 vakadan, kronik apikal periodontitisli 20 vakadan alınan kök kanal örnekleri ile akut apikal apseli 20 vakadan alınan pü örnekleri kullanıldı. Örneklerden DNA eldesi yapıldıktan sonra, real-time PCR yöntemi kullanılarak analizleri yapıldı.

Real-time PCR analizleri sonucunda *T. denticola*, akut apikal periodontitisli 20 vakanın 13'ünde (%65), kronik apikal periodontitisli 20 vakanın 11'inde (%55) ve akut apikal apseli 20 vakanın 16'sında (%80) tespit edildi. Genel olarak değerlendirildiğinde ise *T. denticola* 60 vakanın 40'ında (%67) tespit edildi. *Treponema denticola*'nın akut apikal apseli vakalardaki tespit edildiği %80 oranı istatistiksel olarak çok önemli bulundu ($p=0,007$). Ancak bu bakterinin akut apikal periodontitisli ve kronik apikal periodontitisli vakalardaki tespit edildiği oranlar istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Her üç vaka grubunda *T. denticola*'nın tespit edildiği oranlar arasındaki farklılığın da istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edildi.

Çalışma sonuçları, *Treponema denticola*'nın endodontik enfeksiyonlarda, özellikle akut apikal apseli vakalarda, önemli bir bakteriyel patojen olduğunu

göstermiştir ve endodontik kaynaklı periradiküler lezyonların patogeneğine katılabileceği fikrini de desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Endodontik Enfeksiyonlar, *Treponema denticola*, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Periradiküler Lezyonlar.

SUMMARY

Detection of *Treponema denticola* in Endodontic Infections by “Polymerase Chain Reaction” (PCR) Method

The aim of the present study was to investigate the presence of *Treponema denticola* in microbiological samples taken from cases with acute apical periodontitis, acute apical abscesses, and chronic apical periodontitis by polymerase chain reaction (PCR) method.

A medical history was obtained from each patient. Patients who had received antibiotic treatment during the last 3 months or had a general disease were excluded from the study. In the present study samples were obtained as follows; 20 root canal samples from cases with acute apical periodontitis, 20 root canal samples from cases with chronic apical periodontitis, and 20 pus samples from acute apical abscesses. DNA was extracted from the samples and analyzed with real-time PCR.

In the results of the real-time PCR analysis; *T. denticola* was detected in 13 of 20 cases diagnosed as acute apical periodontitis (65%), 11 of 20 cases diagnosed as chronic apical periodontitis (55%), and 16 of 20 cases diagnosed as acute apical abscesses (80%). In general *T. denticola* was found in 40 of 60 cases (67%). In cases of acute apical abscess, the prevalence value of *T. denticola* (80%) was found statistically very significant ($p=0.007$). However, no statistically significant associations were found between *T. denticola* and acute apical periodontitis or *T. denticola* and chronic apical periodontitis. On the other hand, no statistically significant association was found between differences in prevalence values of *T. denticola* in all three cases.

The findings of this study indicated that *T. denticola* is an important bacterial pathogen in endodontic infections, particularly in cases with acute apical abscesses.

Moreover, the findings of this study support the assertion that *T. denticola* may be involved in the pathogenesis of periradicular lesions of endodontic origin.

Key Words: Endodontic Infections, *Treponema denticola*, Polymerase Chain Reaction (PCR), Periradicular Lesions.

GİRİŞ ve AMAÇ

Endodontik enfeksiyonlar, pulpa ve periapikal dokuların enfeksiyonu olarak tanımlanırlar. Bu enfeksiyonlar; kronikleşme eğiliminde olan, anaerop bakterilerin baskın olduğu, polimikrobiyal enfeksiyonlardır.¹⁻⁵

Yapılan araştırmalar oral floranın yaklaşık olarak %50'sinin kültüre edilemediğini göstermektedir.⁶ Bundan dolayı kök kanal enfeksiyonlarındaki kültüre edilemeyen bakterilerin, hastalığın başlangıcında, ilerlemesinde veya her ikisinde de potansiyel bir rol oynama ihtimali vardır.⁷

Spiroketler, insan ve hayvanlardaki değişik hastalıkların etiyolojilerinde yer alan mikroorganizmalardır.^{8,9} Oral kavitede izole edilen bütün spiroketler *Treponema* cinsi içine dâhil edilirler.¹⁰ Bu bakteriler, besin ihtiyaçlarına karşı seçici davranan, bu nedenle kültüre edilebilmesi ve mikrobiyolojik ve biyokimyasal özellikleri nedeniyle çalışılması zor olarak bilinen mikroorganizmalardır.¹¹ Geleneksel tanı yöntemleri kullanılarak yapılan mikrobiyolojik çalışmalar, endodontik enfeksiyonlarda spiroketlerin varlığını göstermiş ancak tanımlanmalarını sağlayamamıştır.^{4,12}

Son yıllarda yapılan moleküler genetik çalışmalarda; bu mikroorganizmalar tanımlanabilmiş ve spiroketlerin bir kısmının endodontik patojenler grubuna dâhil olabileceği fikrini vermiştir. Yapılan çalışmalarda, enfekte kök kanalında en yaygın bulunan spiroketler: *Treponema denticola* ve *Treponema socranskii* türleridir.¹²⁻¹⁷

Endodontik enfeksiyonlara dâhil olan mikroorganizmaların doğru olarak tanımlanması sadece antimikrobiyal tedavi için değil, aynı zamanda hastalığın başlama ve ilerlemesini anlamada da önemli yer tutar.^{7,18}

Mikrobiyal tanıda en sık kullanılan moleküler genetik yöntemler, polimeraz

zincir reaksiyonu (PCR) ve onun varyasyonlarıdır.⁴ Moleküler genetik çalışmalar, kültüre edilemeyen bakterilerin tanımlanmalarına olanak sağlayarak bilinen endodontik mikrobiyal popülasyonun artmasına ve bu suretle kök kanal enfeksiyonlarının daha iyi anlaşılmasına imkân vermektedirler.^{4,19}

Bu çalışma:

- Akut apikal periodontitis,
- Akut apikal apse ve
- Kronik apikal periodontitis tanısı konan hastalardan alınan mikrobiyal örneklerde *T. denticola*'nın varlığını kültüre ihtiyaç duyulmaksızın, “real-time PCR” yöntemi kullanılarak araştırmak ve sonuçları değerlendirmek amacıyla yapıldı.

GENEL BİLGİLER

Enfeksiyon, vücut dokularının mikroorganizmalar ve varsa toksinleri ile istila edilmesi sonucu ortaya çıkan bir hastalık tablosudur.²⁰

Oral kavitedeki enfeksiyonların büyük çoğunluğu, diş pulpası veya periodonsiyum kaynaklı odontojenik enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonlar, basit bir pulpitisten geniş loj apselerine kadar değişen formlarda görülebilirler.²¹

Genel olarak oral kavite, nazofarinks ve gastrointestinal bölgelerdeki herhangi bir mikrororganizma kök kanalını enfekte edebilir. Enfekte kök kanalına girebilen ve hastalık yapabilen mikroorganizmaların büyük çoğunluğu bakterilerdir. Bu nedenle endodontik patojenlerin tanımlanmasında oral floranın bilinmesi önem taşımaktadır.^{2,21,22}

ORAL MİKROBİYOLOJİK FLORA

İnsan vücudundaki bakterilerin en yoğun olduğu yerlerden birisi olan oral kavitede, 500'ün üzerinde kültüre edilebilen ve çok sayıda kültüre edilemeyen bakteri türlerinden oluşan ortalama 10^{10} bakteri bulunduğu tahmin edilmektedir.^{6,18,23}

Oral kavitede mikroorganizmaların gelişmelerini etkileyen çeşitli faktörler vardır. Bu faktörler arasında; sıcaklık, pH, oksidasyon redüksiyon potansiyeli (Eh), iç ve dış kaynaklı besinler, antimikrobiyal ajanlar ve inhibitörler ile spesifik ve nonspesifik faktörlerden oluşan konak savunması yer almaktadır.^{22,24}

Oral flora pek çok virüs türleri, mikoplazmalar, bakteriler ve mantarlardan oluşur. Bu florada yer alan bakterilerin çoğu, hastalık yapabilme potansiyeline sahip “fırsatçı patojenler” dir.^{18,24}

Gram Pozitif Koklar

Streptokoklar

Streptokoklar, oral floranın büyük bir kısmını oluştururlar ve sıklıkla tükürükte, dilin dorsum kısmında, dental plakta ve gingival sulkusta bulunurlar.^{22,24}

Dental plaktan en sık izole edilen grup, *Streptococcus mutans* grubudur. Bu grup içerisinde yer alan *Streptococcus mutans*; çocuk ve erişkinlerde mine çürüğü etyolojisinde primer bir patojendir. Ayrıca bu patojen, yaşlılardaki kök yüzey çürüğünde ve çocuklardaki biberon çürüğünde de sıklıkla izole edilir.²⁴⁻²⁶

Diğer streptokoklar

Gram pozitif zorunlu anaeroplardan olan peptostreptokoklar, özellikle çürük dentinden, enfekte pulpa odalarından ve kök kanallarından, ilerlemiş periodontal hastalıklardan ve dental apselerden izole edilirler. *Peptostreptococcus micros*, *P. magnus*, *P. anaeropi* bu gruba dâhil olan bakterilerdir.^{22,24}

Enterokoklar

Bu grubun içinde *Enterococcus faecalis* en sık izole edilen türdür. Bu bakteri çoğunlukla enfekte kök kanallarından izole edilmektedir.^{24,27}

Stafilokoklar ve Mikrokoklar

Stafilokoklar ve mikrokoklar oral kaviteden yaygın biçimde izole edilen bakteriler değildir. Protez kullanan hastaların plak örneklerinde yapılan çalışmalarda, bu bakteriler daha sık olarak izole edilmişlerdir.²⁴

Gram Pozitif Çomaklar ve Flamentler

Gram pozitif çomaklar ve flamentler, dental plaktan yaygın olarak izole edilen bakteri gruplarındandır. Bu bakterilerin tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında, hücre duvarı yapısı ve asidik fermentasyon ürünleri gibi biyokimyasal metodlar ve serolojik yaklaşımlar önemli rol oynarlar.²⁴

Actinomyces türleri

Actinomyces grubu bakteriler, dallanmış filamonlar şeklinde üreme eğilimi gösteren bakterilerdir. *Actinomyces* türleri, dental plak mikroflorasının büyük bir kısmını oluştururlar. *Actinomyces israelii*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* ve *A. odontolyticus* oral kaviteden izole edilen türleridir. Bu bakteriler özellikle aproksimal bölgeler ve dişeti sıvısında yaygın olarak bulunurlar.^{22,24}

Eubacterium türleri

Bu bakteriler, kültüre edilebilmesi güç olan Gram-pozitif anaeropik çomaklardır. Asakkoritik *Eubacterium* türleri, periodontal cep içerisinde bulunan anaeropik mikrofloranın %50 sinden fazlasını oluştururlar. Asakkoritik grup içinde yer alan *Eubacterium brachy*, *E. timidum*, *E. notadum* ve *E. saphenum* periodontal hastalıkların ilerlemiş evrelerinden, *E. saburreum* ve *E. yuri* gibi sakkoritik olanlar ise subgingival plak içerisinde izole edilen türlerdir.^{24,28}

Laktobasiller

Laktobasiller, oral kavitedeki toplam kültüre edilebilir mikrofloranın %1'den daha az bir kısmını oluştururlar. Bu bakteriler Gram pozitif spor yapmayan çomaklardır. İlerlemiş mine ve kök yüzeyi çürüklerinde daha fazla görülmektedirler.^{24,25}

Gram Negatif Koklar

Neisseriae ve Veillonella

Neisseriae, dil, tükürük ve dental plaktan izole edilebilen, genelde çiftler halinde bulunan aerop koklardır.^{22,24}

Veillonella grubu bakteriler, dental plak oluşumu ve çürük etyolojisinde önemli rol oynayan, anaeropik koklardır. *Veillonella parvula*, *V. dispar*, *V. atypica* bu grubun üyeleridir.^{24,25}

Gram Negatif Basiller

Fakültatif Anaeropik Basiller

Oral florada bulunan fakültatif anaeropik Gram-negatif çomakların büyük çoğunluğu, *Haemophilus* cinsine ait bakterilerdir. Bu bakteriler, genellikle tükürük içerisinde, dental plakta ve epitelyal yüzeylerde bulunurlar.^{22,24}

Actinobacillus actinomycetemcomitans, gençlerde inatçı periodontal hastalıkların etyolojisinde rol oynayan Gram-negatif bir basildir. Fırsatçı bir bakteri olan *A. actinomycetemcomitans*, enfektif endokardit vakalarından, beyin ve deri altı apselerinden ve osteomyelit olgularından da izole edilmiştir.^{22,24}

Zorunlu Anaeropik Basiller

Bu grup içerisinde yer alan bakteriler, dental plak mikroflorasının büyük bir kısmını oluştururlar. Bu mikroorganizmaların sınıflandırılmasında yaşanan güçlükler, DNA- DNA homolojisi ve 16S rRNA analizleri gibi moleküler yöntemler kullanılarak giderilmeye çalışılmıştır.²⁴

Zorunlu anaeropik Gram-negatif çomakların büyük çoğunluğu başlangıçta *Bacteroides* grubuna dâhil edilmiştir. Daha sonraları ise bu grup *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Megamonas*, *Mitsoukella*, *Ruminobacter*, *Sebaldella*, *Tsieraella* gibi alt genoslara ayrılmış ve içerisinde aldıkları bakterilerin isimleri de değiştirilmiştir.^{2,24,29}

Porphyromonas ve *Prevotella* grubuna dâhil olan bazı organizmalar, kanlı agarda ürettiklerinde kahverengi veya siyah pigmentli koloniler oluştururlar. *Porphyromonas* grubunda *Bacteroides*'lerin sakkarolitik türleri bulunur. *Porphyromonas gingivalis* ağızda sıklıkla dişeti oluşunda, dil ve tonsillerde bulunur. *Prevotella* grubunda ise *Bacteroides*'lerin nonsakkarolitik türleri bulunur. *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *P. melaninogenica* ve *P. loescheii* bu grup içerisinde bulunan

pigmentli türlerdir. Pigmentsiz türler ise *Prevotella buccae*, *P. buccalis*, *P. oralis* ve *P. oris*'tir.^{2,22,24}

Zorunlu anaeropik Gram negatif bakterilerin bir kısmı ise *Fusobacterium* grubu içine dâhil edilmiştir. Bu grup içerisinde *F. nucleatum* en sık izole edilen türdür. Genel olarak fusobakterilerin dental plak oluşumunda önemli rol oynadıkları düşünülmektedir.^{2,22,24,30}

Spiroketler, subgingival plakta çok sayıda bulunan esnek, zemberek şeklinde çomaklardır. Bu bakteriler karanlık alan veya elektron mikroskobu kullanılarak tespit edilebilirler. Oral florada bulunan spiroketler, *Treponema* cinsi içerisine dâhil edilirler. *T. denticola*, *T. macrodentium*, *T. oralis*, *T. skoliodontium*, *T. socranskii*, *T. maltophilum*, *T. amylovorum* ve *T. vincentii* bu grubun üyeleridir. Laboratuvar ortamında kültüre edilemeyen bu bakterilerin tanımlanmalarında, kültürden bağımsız moleküler yöntemler (16S rRNA analizleri) kullanılmaktadır.^{2,24,25}

Mantarlar

Candida türleri, mantar mikroflorasının büyük bir kısmını oluşturur. *C. albicans*, en sık izole edilen türdür. *C. albicans*, bakteriyel flora bozulduğunda oral bölgedeki kandida lezyonlarına neden olur.^{22,24}

Virüsler

Oral kavitede en yaygın görülen virüs *Herpes simpleks* virüsüdür. *Herpes simpleks* virüs enfeksiyonuna, oral kavitede sıklıkla karşılaşılır. Bunun dışında *Cytomegalovirüs*, Hepatit virüsleri ve *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) özellikle tükürükten izole edilebilen virüslerdir.^{22,24}

Mikoplazmalar

Mikoplazmalar, murein tabakası bulunmaması nedeniyle, sert hücre duvarları

olmayan bakterilerdir. *Mycoplasma salivarium*, *M. pneumoniae*, *M. hominis* tükürükten, *M. buccale*, *M. orale* oral mukozadan, *M. pneumoniae* ise dental plaktan izole edilen mikoplazma türleridir.²⁴

Yukarıda bahsedilen mikroorganizmaları da içeren oral flora bakterileri Tablo 1’de özetlenmiştir.²⁴

Tablo 1: Oral kavitede yerleşik bulunan bakteriyal flora

Gram-pozitif Bakteriler	Gram-negatif Bakteriler
Koklar	
<i>Enterococcus</i> türleri	<i>Moraxella</i> türleri
<i>Peptostreptococcus</i> türleri	<i>Neisseria</i> türleri
<i>Staphylococcus</i> türleri	<i>Veillonella</i> türleri
<i>Stomatococcus</i> türleri	
<i>Streptococcus</i> türleri	
Basiller	
<i>Actinomyces</i> türleri	<i>Actionobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>Campylobacter</i> türleri
<i>Corynebacterium</i> türleri	<i>Capnocytophaga</i> türleri
<i>Eubacterium</i> türleri	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Fusobacterium</i> türleri
<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>Haemophilus</i> türleri
<i>Pseudoramibacter</i> türleri	<i>Leptotrichia</i> türleri
	<i>Porphyromonas</i> türleri
	<i>Prevotella</i> türleri
	<i>Selenomonas</i> türleri
	<i>Wolinella</i> türleri

ENDODONTİK MİKROBİYOLOJİ

Bakterilerin Pulpaya Giriş Yolları

Mikroorganizmalar, pulpaya çeşitli yollarla ulaşırlar.³¹ Çürük lezyonlarından veya periodontal ceplerden kaynaklanan oral flora bakterileri, mine ve dentin çatlaklarından, açık dentin tübüllerinden ve yan kanallardan pulpaya ulaşabilirler.⁵

Kuronal yol

Pulpa dokusuna mikroorganizmalar, en çok kuron yolu ile ulaşırlar. Pulpa iritanlara karşı, tersiyer dentin oluşumu ve dentin remineralizasyonu ile korunmaya çalışır. Pulpanın açılması ve bakteriyel bulaşma, iyatrojenik perforasyonlarda ve travma sonucu kırılan dişlerde de görülür.² Oral kavitede bulunan spiroketlerin, travma sonucu nekroze olmuş diş pulpalarına ulaşabildiği rapor edilmiştir.³² Derin çürüklü lezyonlarda, çok sayıda mikroorganizma pulpa açık olmasa bile pulpayı etkileyerek pulpitis geliştirebilir. Bu tip olgularda, kavite tabanında anaerop ve Gram pozitif mikroorganizmaların baskın olduğu karmaşık bir mikroflora bulunduğu bildirilmiştir.^{2,33,34}

Retrograd yol

Dişeti cep derinliğinin artması, periodontal membranı bakterilerin geçişine uygun duruma getirebilir.² Oral florada bulunan bazı bakteriler, buradan foramen apikaleye ulaşabilirler. Spiroketler, *Selenomonas*, *Sputigena* ve *Walinella recta* grubu gibi hareketli bakteriler, periodontal aralığı ilk geçen mikroorganizmalardır.²

Hematojen yol

Pulpanın bakteriler ile enfekte olabilmesinin diğer bir yolu da anakorezistir.^{1,4} Organizmanın herhangi bir yerinden kana veya lenfatik dolaşıma geçen bir bakteri pulpaya gelebilir ve enfeksiyonu başlatabilir. Böyle enfeksiyonlar, bakteriyemiye

takiben gelişen kök kanalı enfeksiyonları olarak düşünülebilir.^{2,5}

Polimikrobiyal Endodontik Enfeksiyonlar

Diş plaklarındaki mikroorganizmaların, ilk olarak Antony van Leeuwenhoek tarafından gözlemlendiği belirtilmektedir.³⁵ Miller³⁶ ise ilk defa mikroorganizmalar ile endodontik enfeksiyonlar arasındaki ilişkiyi belirtmiştir.

Kök kanal sistemi, belirli bakteri gruplarının üremesine imkân veren, seçici bir çevredir.⁵ Kök kanal mikroflorasının oluşmasında oksijen ve oksijen ürünleri, ekolojik belirleyici olarak rol oynarlar.^{4,37-39} Oksijen tüketimi, CO₂ ve hidrojen üretimi, düşük oksidasyon ve redüksiyon potansiyelinin oluşumuna neden olur.³⁹ Doku sıvısı ve nekrotik pulpanın yıkım ürünleri, polipeptidlerden ve amino asitlerden zengin olan besinler sağlar. Bu besinler, düşük oksijen basıncı ve bakteriyel ürünler, ortamda hangi bakteri gruplarının baskın olacağını belirler.⁵

Endodontik enfeksiyonlardaki bakterilerin büyük bir kısmı, periodontal enfeksiyonlardan da izole edilmişlerdir.^{4,40} *Peptostreptococcus* türleri, *Pseudoramibacter aloctolyticus*, *Prevotella intermedia* ve *Veillonella parvula*, kök kanallarından sık izole edilen ancak periodontal ceplerden izolasyonu az olan bakterilerdir. Periodontal ceplerden yaygın olarak izole edilebilmelerine rağmen, kök kanallarından izolasyonu az olan bakteriler ise *Prevotella melaninogenica*, *P. corrodens* ve *P. gingivalis*'dir.³⁹

Endodontik enfeksiyonlar, polimikrobiyal özellikte enfeksiyonlardır. Kültüre dayalı yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda, kanal içi enfeksiyonlarda kanal başına ortalama 3 ile 6 arasında bakteri türü olduğu gösterilmiştir.⁴¹⁻⁴⁵ Akut periradiküler apselli dişlerden alınan örneklerde ise, örnek başına ortalama 2 ile 8 arası bakteri türü varlığı gösterilmiştir.⁴⁶⁻⁵⁰ Enfekte bir kök kanalında 1 ml'deki bakteri

hücresi sayısı (Colony Forming Unit = CFU) genellikle 10^2 ve 10^8 arasındadır.^{5,51,52}

1970’li yıllardan önce, anaerobik kültür yöntemlerinin yetersizliğinden dolayı, endodontik enfeksiyonlardan izole edilebilen anaerobik bakteri sayısı oldukça azdı.^{4,5} Pulpal ve periapikal patolojilerde anaerobik bakterilerin önemi, anaerobik kültür tekniklerinin gelişmesi ve selektif ve non-selektif kültür ortamlarının kullanılması ile açığa çıkmıştır.⁵

Endodontik enfeksiyonlardaki bakterilerin büyük çoğunluğunu, zorunlu anaeroplara oluştururlar.^{4,5} Sundqvist ve arkadaşları,⁵³ yaptıkları çalışmada kök kanallarında zorunlu anaerobik bakterileri %91 oranında bulmuşlardır. Baumgartner ve Falkler,⁵⁴ ise çürüğe maruz kalmış periapikal lezyonlu dişlerde, zorunlu anaerobik bakteri oranını %68 olarak saptamışlardır. Anerobik bakteriler, sadece oksijensiz ortamda üreyebilen ve fonksiyon göstermek için düşük oksidasyon-redüksiyon potansiyeline ihtiyaç duyan bakterilerdir. Bu organizmaların oksijene duyarlılıklarında farklılıklar bulunur. Zorunlu anaeroplara, hem ilk izolasyon, hem de ilerleyen kültürlerinde anaerobik atmosfer koşullarına ihtiyaç duyarlar. Bu bakterilerin çoğu süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerine sahip değildir. Mikroaerofilik bakteriler ise oksijenli ortamda üreyebilen ancak enerji ihtiyaçlarını anaerobik enerji yolları ile sağlayan bakterilerdir. Fakültatif anaerobik bakteriler ise oksijen varlığında veya yokluğunda üreyebilen, süperoksit dismutaz ve katalaz üreten bakterilerdir.^{4,5}

Endodontik enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilen bakteriler, anaerobik Gram-negatif türler, Gram-pozitif anaeroplara, fakültatif ve mikroaerofilik streptokoklardır.⁴²⁻⁴⁵

Siyah pigmentli *Porphyromonas* ve *Prevotella* türleri özellikle proteolitik aktiviteleri ve apikal apselerin oluşumlarına katılımlarından dolayı enfekte kök kanallarından yoğun olarak izole edilen bakterilerdir.⁵⁵⁻⁵⁷ *Prevotella* ve *Porphyromonas*

grubunun bazı türleri, peptostreptokoklar, peptokoklar, *Fusobacterium spp.*, *Eubacterium spp.* ve *Actinomyces spp.* grubuna katılan bazı bakterilerin, belirli klinik belirti ve bulgular ile ilişkilerinin bulunduğunu gösteren çeşitli araştırmalar vardır.⁵⁶⁻⁶² Ancak herhangi bir tür ile endodontik enfeksiyonun şiddeti arasında kesin bir ilişki bulunamamıştır. Bunun nedeninin endodontik enfeksiyonların polimikrobiyal tabiatlı olmasından ve bakteriler arasındaki sinerjik ilişkinin toplam patojenik etkiyi artırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.⁴

Endodontik enfeksiyonlar, kök kanalından komşu periradiküler dokulara yayılabilen enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonun ciddiyeti, mikroorganizmaların sayısına, virülansına, konak direncine ve enfeksiyonlu bölgenin anatomik yapısına bağlıdır. Apekten yayılan enfeksiyon kemikte lokalize olabileceği gibi yumuşak dokulara geçerek apse veya sellülite de neden olabilir.^{4,5}

Periradiküler apseler, farklı bakteri gruplarını içine alan miks enfeksiyonlardır. Yapılan araştırmalarda, bu enfeksiyonlardan çok sayıda bakteri kültüre edilmiştir.^{46,48,56,61,63}

Endodontik kaynaklı periradiküler apselerden tanımlanan mikroorganizmalar, kök kanallarından izole edilen ve tanımlanan mikroorganizmalara benzerlik göstermektedir.^{53,58-61,64} Bu enfeksiyonlardan izole edilen bakteri türlerinin sadece bir kısmı saf kültürde apse oluşturmaktadır.⁶⁵⁻⁶⁸ Baumgartner ve arkadaşları;⁶⁷ *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerapius* ve *Veillonella parvula*'nın kobaylardaki saf kültürde apse oluşturabildiğini, oysa siyah pigmentli bakterilerin bunu başaramadığını ortaya koymuşlardır. Aynı çalışmada, *F. nucleatum*, *Prevotella intermedia* ve *Porphyromonas gingivalis*ten oluşan miks kültürün, *F. nucleatum*'un saf kültüründen daha fazla apse oluşturma gücünün olduğu da ortaya konmuştur. Bu durum,

endodontik enfeksiyonlarda bakteriler arasında sinerjik bir ilişki olduğu görüşünü desteklemektedir.⁵

Tablo 2’de endodontik enfeksiyonlardan sık olarak kültüre edilen mikroorganizmalar gösterilmektedir.³⁰ Oral flora ile karşılaştırıldığında bu organizmaların daha küçük ve sınırlı bir grubu oluşturdukları görülmektedir.⁴

Tablo 2: Apikal rarefaksiyonlu dişlerin kök kanallarından izole edilen bakteriler

Bakteriler	Kök Kanallarında Bulunma Oranları (%)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	48
<i>Streptococcus</i> sp.	40
<i>Bacteroides</i> sp.*	35
<i>Prevotella intermedia</i>	34
<i>Peptostreptococcus micros</i>	34
<i>Eubacterium alactolyticum</i>	34
<i>Peptostreptococcus anaerapius</i>	31
<i>Lactobacillus</i> sp.	32
<i>Eubacterium lentum</i>	31
<i>Fusobacterium</i> sp.	29
<i>Campylobacter</i> sp.	25
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	15
<i>Actinomyces</i> sp.	15
<i>Eubacterium timidum</i>	11
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	11
<i>Eubacterium brachy</i>	9
<i>Selenomonas sputigena</i>	9
<i>Veillonella parvula</i>	9
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	9
<i>Prevotella buccae</i>	9
<i>Prevotella oralis</i>	8
<i>Propionibacterium propionicum</i>	8
<i>Prevotella denticola</i>	6
<i>Prevotella loescheii</i>	6
<i>Eubacterium nodatum</i>	6

* *Bacteroides* grubunun pigmentsiz türleri.

Mikrororganizmalar arasındaki etkileşimler ve bakterilerin besin ihtiyaçlarına karşı seçici tutumları, endodontik enfeksiyonlardaki bütün bakterilerin kültüre edilebilmelerini ve tanımlanabilmelerini güçleştirmektedir. Bu nedenle gelişmiş kültür yöntemleri kullanılmasına karşın mikrororganizmaların çoğu kültüre edilememektedir.⁵

1990'lı yılların sonlarına doğru endodontik enfeksiyonlardaki florayı araştırmak amacıyla moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır.⁶⁹ Endodontik floradaki bir bakteriyi tespit etmek amacıyla moleküler yöntemleri kullanan ilk araştırmacılar Conrads ve arkadaşlarıdır.⁷⁰ Bu araştırmacılar, PCR yöntemini kullanarak ilk defa *Tannerella forsythia*'nın enfekte kök kanallarındaki varlığını göstermişlerdir. Bu bakterinin kültür yöntemleri ile enfekte kök kanallarındaki varlığı gösterilememiştir.⁶⁹ Moleküler yöntemler, endodontik enfeksiyonlardan kültür yöntemleri ile tespit edilemeyen veya kültüre edilebilmesi zor olan bakteri türlerinin tanımlanmasını sağlayarak, endodontik patojen olabileceği düşünülen türlerin sayısının artmasına olanak sağlamıştır. Bunun sonucunda bilinen endodontik mikrobiyal popülasyon büyük ölçüde artmıştır.⁴

Moleküler yöntemler kullanılarak endodontik patojenler listesine katılan yeni türler arasında: *Tannerella forsythia*, *Prevotella tannerae*, *T. denticola*, *Dialister pneumosintes*, *Filifactor alocis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Olsenella* spp., *Eubacterium infirmum* ve *Centipeda periodontii* yer alır.^{14, 70-77}

Moleküler tanı yöntemleri, enfekte kök kanallarından kültüre edilebilen bakterilerin kültür yöntemlerine göre daha yüksek oranda bulunmalarına da olanak sağlamıştır.⁴ Bu bakteriler arasında: *Porphyromonas endodontalis*, *P. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Propionibacterium propionicum*, *Actinomyces* spp., *Slackia exigua* ve *Mogibacterium timidum* yer

alır.^{14,75,78-83}

Wade ve arkadaşları,⁸⁴ kültüre edilebilen bazı bakteri türlerinin içinde kültüre edilemeyen suşların bulunabileceğini, bunun da bazı mikroorganizma türlerinin moleküler yöntemler kullanıldığında daha sık bulunma nedenlerinden biri olabileceğini belirtmişlerdir.

Spiroketler ve Endodontik Enfeksiyonlar

Mikroskopik olarak incelendiğinde, dental plaktaki mikroorganizmaların yaklaşık yarısını spiroketlerin oluşturduğu belirtilmiştir.⁸⁵ Spiroketler, endodontik enfeksiyonlardan alınan örneklerde mikroskop kullanılarak gözlemlenebilmiş olsalar da tanımlanmaları yapılamamıştır. Spiroketleri tanımlamak amacıyla kullanılan moleküler yöntemler, bu bakterilerin kültür yöntemlerindeki teknik engellerden dolayı gözden kaçtığını göstermektedir.⁴

Spiroketler, besin ihtiyaçlarına karşı son derece seçici davranan ve kültüre edilebilmesi çok zor veya olanaksız olan mikroorganizmalardır.^{24,85-87} *Treponema*, *Borellia* ve *Leptospira* insanda enfeksiyona neden olan spiroketlerdir.²⁵ Bu mikroorganizmalar, sifiliz, Lyme hastalığı ve leptospiroz gibi enfeksiyonlarda rol alan patojenlerdir.⁸⁸⁻⁹⁰ Spiroketlerin yüksek derecede komşu dokulara yayılabilme özelliğine sahip olmaları,^{91,92} vücudun pek çok bölgesindeki enfeksiyonlardan izole edilmelerini olanaklı kılmıştır.⁸⁵

Oral Treponemaların Taksonomisi ve Morfolojisi

Spirochaetales (kıvrımkılsılar) takımı mikroorganizmalar *Brachyspiraceae*, *Leptospiraceae* ve *Spirochaetaceae* olmak üzere 3 familyaya ayrılır. Birinci familyada *Brachyspira* (*Serpulina*) cinsi, ikinci familyada *Leptonema* ve *Leptospiracin* cinslerine ait bakteriler bulunmaktadır. *Spirochaetaceae* familyasında ise *Borrelia*, *Brevinema*,

Cristispira, *Spirochaeta*, *Spirochaeta* ve *Treponema* cinslerine mensup bakteriler yer almaktadır.⁹³

Oral kavitede bulunan spiroketlerin, *Treponema* cinsine ait olduğu kabul edilmektedir.^{85,86} Oral *Treponema* türleri, sakkarolitik ve asakkarolitik olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Sakkarolitik grubun üyeleri: *Treponema pectinovorum*, *T. socranskii*, *T. amylovorum*, *T. lecithinolyticum* ve *T. maltophilum*; asakkarolitik grubun üyeleri ise: *T. denticola*, *T. medium* ve *T. vincentii*'dir.⁸⁷

Spiroketlerin farklı morfolojileri ve hareket yetenekleri, medikal açıdan önemli bakteriler arasında yer almalarına neden olmuştur.⁸⁵ Bu bakterilerin çoğu spiral şekillidir.^{26,94} Ancak bazı türleri dolambaçlı şekiller de gösterebilir.⁹²

Bu bakterilerin yapısında peptidoglikan içeren hücre duvarı ile çevrili, karakteristik bakteriyel plazma membranının yanı sıra, hücre çeperine seçici özellik kazandıran dış membran kılıfı da bulunur.⁹⁴ Spiroketlerde hücre çeperi, sitoplazmik zar ile birleşerek protoplazmik silindir olarak adlandırılan kompleks bir yapı oluşturmaktadır.^{26,94}

Spirochaetales takımı mikroorganizmalarda, kirpik yerine eksen iplikleri adını alan telcikler mevcuttur. Bu telcikler, protoplazmik silindir ile dış membran kılıfı arasında yer alır.⁹¹ Her bakteride 2-100 adet arasında bulunabilen bu flagellumların bir kısmı, hücre dışına da kirpikler halinde uzanırlar. Bu özgül yapı nedeniyle spiroketler, yer değiştirici olarak ileri-geri yönlerde, kendi eksenleri boyunca burğu biçiminde ve yılanı olmak üzere üç çeşit hareket yaparlar.^{91,94}

Spiroketlerin kalınlıkları 0,15- 0,40 µm, uzunlukları ise 5- 20 µm arasında değişiklik gösterir.⁹⁵ Boya alıp almadıklarını ışık mikroskobu ile görmek zordur. Bu nedenle Gram metodu ile boyanamazlar.²

Oral Treponemaların Virulans Faktörleri

Mikroorganizmalarda patojenite ve virulans kavramlarına ait açıklamalar anlaşılır biçimde şu şekilde yapılmıştır.²⁶ Patojenite kavramının hastalık etkeni türe ait bir kavram olarak kullanılması, buna karşın patojen bir türün hastalandırıcılık özelliğinin ölçüsünün ise virulans olarak tanımlanması önerilmiştir.^{26,94}

Oral treponemaların insan vücudunun dış yüzeylerine bağlanabildiği, konakçı savunma mekanizmalarından kaçabildiği ve doku yıkıcı enzimleri üretebildiği belirtilmektedir.⁹⁶

Adezyon yeteneği

Oral treponema türleri için öncelikli kolonizasyon bölgesi gingival epitelyumdur. Bu bakterilerin hastalığa neden olabilmeleri için bir substrata bağlanabilmeleri gerekir. Eğer bakteri substrata bağlanamaz ise diş eti oluğu sıvısı ile ortamdan uzaklaştırılır.⁹⁷

Treponema denticola'nın hem aerobik hem de anaeropik koşullar altında gingival fibroblastlara bağlanabildiği gösterilmiştir.⁹⁷ Bu bakterinin gingival fibroblastlara bağlanmasında protein-protein ve protein-karbonhidrat etkileşiminin rol oynadığı düşünülmektedir.⁹¹

Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmaların neden olduğu önemli bakteriyel enfeksiyonlarda, fibronektin aracılığıyla bağlanmanın etkin bir rol oynadığı belirtilmektedir.⁹¹ Fibronektin, gingival fibroblastlar tarafından sentezlenen ve fibroblastların plazma membranlarında bulunan bir proteindir.⁹⁸ Bu glikoprotein hücre adezyonu, migrasyonu, tamiri ve kan pıhtılaşmasında görev yapar.⁹⁹ *Treponema denticola*'nın fibronektin gibi ekstrasellüler proteinlere bağlanabilme özelliği bulunmaktadır. Fibronektin antikorlarının varlığında *Treponema denticola*'nın

fibroblastlara bağlanması azalmakta ancak tamamen inhibe olmamaktadır.⁹⁸ *T. denticola*'nın spesifik bağlanma mekanizmalarını kullanarak laminin, tip IV ve tip I kollajen, jelatin ve fibrinojen gibi temel membran proteinlerine de bağlanabildiği belirtilmektedir.¹⁰⁰ *T. denticola*'nın major yüzey proteini (Msp) ve antijeni 53-kDa proteinidir. Major yüzey proteini hem hücre yüzeyindeki reseptörlere hem de sitoplazmik proteinlere bağlanır. Ayrıca epitelium hücrelerinin sitoplazmik membranlarında iyon kanalları oluşturur. Böylece diğer yüzey proteinleriyle benzer şekilde adezyonda rol alır.^{101,102} *Treponema denticola*'nın major yüzey proteininin lokalizasyonu ve oligomerizasyonunda, kimotripsin-benzeri proteinaz kompleksi görev yapar.^{10,103-105} Proteinlerden oluşan bu kompleks dentisilin olarak adlandırılmıştır. Dentisilinin, fibronektin ve konakçı hücre proteinaz inhibitörlerinin parçalanması reaksiyonlarına katıldığı belirtilmektedir.¹⁰³⁻¹⁰⁶ Ayrıca bu protein kompleksinin, spiroketlerin konakçı dokulara invazyonunda ve enfeksiyon hastalığının konakçı içerisinde yayılmasında rol oynadığı da ifade edilmektedir.¹⁰⁷ Ishihara ve arkadaşları,^{108,109} dentisilin aktivitesinin kaybı ve buna bağlı ortaya çıkan yapısal değişikliklerin *T. denticola*'nın patojenitesini etkilediğini belirtmektedirler. *Treponema denticola*'nın hiyaluronik asit veya hiyaluronat olarak da adlandırılan hiyaluronan'ı bağlayabildiği gösterilmiştir. Hiyaluronan, glukronik asit ve *N-asetil-D-glikozamin*'den oluşan yüksek molekül ağırlıklı bir polisakkarittir. Bu polisakkarit yumuşak dokularda ve epitelde bol miktarda bulunur. *Treponema denticola*'nın hiyaluronan'ı bağlama yeteneğinin, bakteriye ekolojik bir avantaj sağlayabileceği belirtilmektedir. Kimotripsin-benzeri proteinaz kompleksinin, *T. denticola*'nın hiyaluronan'ı bağlamada rol oynadığı düşünülmektedir.^{110,111}

Sitotoksik etkileri

Bakterilerin, kolonize olmaları ve sitotoksik etkiler göstermeleri virölans faktör olarak değerlendirilmektedir. Bundan dolayı, bakterilerin konakçı hücrelerde hasar oluşturmada tek başına kolonize olmaları virölans bir faktör değildir.¹¹¹

Treponema denticola'nın dış zarı diğer Gram-negatif bakterilere benzerken, dış membrandaki lipit kompozisyonu, lipoteikoik asit tabakasının bulunması nedeniyle, Gram-pozitif bakterilere benzemektedir.¹¹² Ellen ve arkadaşları,⁹⁸ *T. denticola*'nın insan diyeti fibroblastlarında oluşturduğu sitopatik reaksiyonları incelemişlerdir. Fibroblastlarda görülen değişikliklerin; plazma membranında kabarcık oluşması, daha sonra kabarcığın kıvrım oluşturarak plazma membranını sarması, hücrenin alt tabakadan ayrılması, hücre proliferasyonunun azalması ve sonuçta hücre ölümü olduğunu belirtmişlerdir. Grenier,¹¹³ *T. denticola*'nın kırmızı kan hücrelerine bağlanıp, bu hücreleri parçalayabildiğini vurgulamaktadır. Bakterinin; ilk aşamada D-glikozamin benzeri bileşenler ile eritrositlere bağlandığı, ikinci aşamada ise eritrositlerin membranlarında hasar meydana getirdiği belirtilmektedir.¹¹³ *Treponema denticola*'dan izole edilen ve eritrositlerde hemolize neden olan enzimler: *hly* geni tarafından kodlanan 46 kDa hemolizin ve *prt B* geninin kodladığı 30,4 kDa kimotripsin-benzeri proteinazdır.¹¹⁴ Kimotripsin-benzeri proteinaz kompleksinin, epitelyal hücreler üzerinde güçlü sitotoksik etkileri vardır. Bu proteinin; epitelyal hücrelerde ve fibroblastlarda bulunan endojen fibronektini parçalayabileceği, hücre migrasyonuna ve hücre adezyonuna engel oluşturarak epitelyal hücrelerin ölümüne neden olabileceği belirtilmektedir.¹¹⁵ Ayrıca pürüfiye edilmiş dentisin; invitro fibrinojen, transferrin, jelatin, serum albumin, laminin, tip IV kollojen, IgG ve IgA'yı hidrolize edebildiği gösterilmiştir.¹¹⁶ *Treponema denticola*'nın major yüzey proteininin de eritrositler ve

epitelyal hücreleri üzerinde sititoksik etkisinin bulunduğu rapor edilmiştir.^{11,104} Gopalsami ve arkadaşları,¹¹⁷ ratlarda yaptıkları çalışmada; *T. denticola*'nın dış membran lipidlerinin kemik rezorbsiyonunu indüklediğini bildirmektedirler.

Demiri ayırıştırma ve hareket yetenekleri

Periodontal cep içerisindeki kolonizasyonda en önemli basamaklardan birisi, bakterinin ihtiyacı olan demiri kazanabilmesidir.¹¹¹ *Treponema denticola*'nın sistalsin adı verilen antijenik proteininin demir alışverişinde önemli rol oynadığı ve hemoglobinin oksidasyon ve sülfürasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir.¹¹⁸

Patojenik spiroketlerin hareket yetenekleri de virülans faktörleri içerisinde yer almaktadır. Hareket yetenekleri bu bakterilerin mukozal yüzeylerdeki sıvılarda ve konakçı vücudunun intrasellüler boşluklarında bulunmalarına neden olmaktadır.¹¹⁹ Ayrıca bu bakterilerin hareket yetenekleri ile birlikte ince gövdeleri, kök kanalı içerisine ve periodonsiyuma diğer bakterilerden daha önce ve erken dönemde yerleşmelerine olanak vermektedir.²

Treponema denticola'nın sahip olduğu kamçı, bakterinin yüksek viskositeye sahip dişeti oluğu sıvısında hareket etmesine, dişeti epiteli ve bağdokusuna penetrasyonuna yardım etmektedir.¹²⁰ *Treponema denticola*'nın penetrasyon yeteneğinin, *T. socranskii* ve *T. vincenti*'ye oranla daha fazla olduğu vurgulanmaktadır.¹²¹

Endodontik Enfeksiyonlarda Treponemalar

Endodontik enfeksiyonlarda spiroketlerin varlığı ile ilgili ilk rapor 1894 yılında Miller tarafından yayınlanmıştır.³⁶ Miller,³⁶ bu bakterilerin pulpitis ve apikal periodontitisin patogenezeine dâhil olabileceğini belirtmektedir. Hampp,¹²² karanlık alan mikroskobu kullanarak yaptığı çalışmada kök kanal örneklerinin %55'inde spiroketleri

gözlemlemiştir. Trope ve arkadaşları,³² periodontal ve endodontik kaynaklı apselerden aldıkları pü örneklerini karanlık alan mikroskobu kullanarak incelemişler ve spiroketlerin varlığını periodontal apselerde %30-60, endodontik apselerde ise %0-10 arasında bulmuşlardır. Van Winkelhoff ve arkadaşları,⁵⁶ akut periradiküler apselerden aldıkları pü örneklerinde spiroketlerin varlığını rapor etmişlerdir. Thilo ve arkadaşları,¹²³ karanlık alan mikroskobunda değerlendirdikleri kök kanal mikrobiyasının %6'sını spiroketlerin oluşturduğunu belirlemişlerdir. Nair,¹²⁴ ışık ve transmisyon elektron mikroskobu kullanarak yaptığı çalışmada; spiroketlerin kök kanal mikroflorasının önemli bir parçası olabileceğini belirtmiştir. Dahle ve arkadaşları,⁹⁵ karanlık alan ve yüzey taramalı elektron mikroskobu (scanning elektron mikroskope, SEM) kullanarak yaptıkları bir çalışmada kök kanalında oral treponemalardan farklı olarak daha kalın (2 µm) ve daha uzun (140 µm) bir spiroket izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmalarında In situ SEM kullanan Molven ve arkadaşları¹²⁵ ile Siqueira ve arkadaşları¹²⁶ da enfekte kök kanallarında spiroketlerin varlığını göstermişlerdir.

Mikroskop kullanılarak yapılan çalışmalar, spiroketlerin endodontik enfeksiyonlardaki varlığını göstermiş olsa da bu grup mikroorganizmalar ancak son yıllarda tanımlanabilmişlerdir.¹²

Dahle ve arkadaşları,¹²⁷ endodontik enfeksiyonlarda izole ettikleri 4 spiroket suşunun, *T. pectinovorum* ile benzerliklerinin bulunduğunu belirlemişlerdir. Smallwood ve arkadaşları¹²⁸ ise PCR yöntemini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, enfekte kök kanallarından aldıkları mikrobiyal örneklerde spiroketlerin varlığını saptamışlar, ancak spiroketlerin türlerini karakterize edememişlerdir. Siqueira ve arkadaşları,⁷² PCR yöntemi kullanarak ilk defa enfekte kök kanallarında *T. denticola*'yı tespit etmişlerdir.

Yapılan farklı moleküler çalışmalar da bu bakterinin kök kanal mikroflorasının bir parçası olabileceğini göstermektedir.^{12,13,16,129,130} *Treponema socranskii*, *T. maltophilum*, *T. lecithinolyticum*, *T. vincentii*, *T. pectinovorum*, *T. amylovorum*, *T. medium*, *T. parvum* ve *T. putidum* gibi diğer treponemaların da endodontik enfeksiyonlardaki varlığı yapılan moleküler çalışmalarda gösterilmiştir.^{12,16,87,131,132}

PERİRADİKÜLER LEZYONLARIN KLİNİK SINIFLANDIRILMASI

Pulpal kaynaklı periradiküler lezyonlar, farklı şekilde adlandırılıp sınıflandırılabilirler. Periradiküler lezyonların sınıflandırılmasında histopatolojik terimler olan akut ve kronik yerine, klinik durumları tanımlayan semptomatik ve asemptomatik terimlerinin kullanılabileceği belirtilmektedir. Bu klinik tanımların kullanılmasıyla, periradiküler lezyonlar üç ana gruba ayrılabilirler; semptomatik (akut) apikal periodontitis, asemptomatik (kronik) apikal periodontitis ve apikal apseler.¹³³ Bazı kaynaklarda ise periradiküler lezyonlar beş ana grup altında toplanmışlardır. Akut apikal periodontitis, akut apikal apse, kronik apikal periodontitis (periapikal granülom, periapikal kist), kronik apikal apse ve condensing osteitis.^{2,133,134}

Akut Apikal Periodontitis

Akut apikal periodontitis apikal bölgedeki periodontal ligamentin lokalize iltihabıdır.¹³³ Irreversible iltihaplı pulpadan gelen iltihabi medyatörler veya nekrotik pulpadan gelen bakteriler, bakteri toksinleri, dezenfeksiyon amacıyla kullanılan ilaçlar, taşkın yapılan enstrümantasyonlar, kanal dolgu maddelerinin apeks dışına taşması ve yüksek yapılmış restorasyonlar akut apikal periodontitise neden olabilirler.^{2,133}

Apikal periodontitisin farklı tipleri, mikroorganizmalar veya onların ürünleri ile konak savunmasının etkileşimi sonucu oluşur.¹³⁵ Akut apikal periodontitis, sağlıklı

periodonsiyumda iritanlara karşı bir tepki şeklinde başlar ve oluşan enflamasyon kısa süreli olur ise bu durum primer apikal periodontitis olarak ifade edilebilmektedir. Önceden mevcut olan kronik bir lezyona karşı akut bir cevap olarak oluşursa bu durum da sekonder apikal periodontitis, periapikal flare-up veya phoneix apse olarak adlandırılabilir.^{31,135}

Akut apikal periodontitis, periapaksin iritanlara karşı oluşturduğu eksudatif bir tepkidir. İlk olarak periapikal hiperemi oluşur. İritasyon devam ederse apikal periodontal boşluğa devamlı vazodilatasyon ile iltihabi eksuda ve lökosit infiltrasyonu oluşur.² Endodontik eğerin periradiküler dokuları irrite etmesi gibi küçük çaptaki fiziksel hasarlar, kısa süreli enflamatuvar bir cevaba neden olabilirler. Ancak yaygın doku yıkımına ve hücre ölümüne neden olan büyük çaptaki hasarlar, periradiküler dokuların daha geniş enflamatur infiltrasyonu ile sonuçlanabilir.¹³⁴ Artan basınç sonucunda diş alveolü içerisinde yükselir ve periodontal ligament fibrillerinde gerilmeler oluşur. Diş üzerine hafif bir baskı bile şiddetli ağrıya neden olabilir.² Basıncıdaki devamlı artış osteoklast oluşumunu stimüle ederek, kemikte rezorbsiyon oluşumuna ve periodontal aralıkta genişlemeye yol açar. Bu durum, daha ileri evrede akut apikal apseye dönüşür. Vasküler konjesyon sonucunda bölgesel anoksi ve yıkım meydana gelir.²

Akut apikal periodontitisin en önemli klinik bulgusu perküsyona olan hassasiyettir. Ağrı, akut apikal periodontitisin varlığını gösteren bir bulgudur ve hafif hassasiyetten çok şiddetli seviyelere kadar farklılık gösterebilir.¹³³ Çoğunlukla lokalize dolgunluk hissi ağrıya eşlik eder. Tüm evrelerde ağrılı diş hasta tarafından kolayca lokalize edilir ve gittikçe artan düzeyde perküsyona duyarlı hale gelir.²

İlgili dişin apikal bölgesinin vestibül kısmına, parmak ile bastırıldığında ağrıda

artış olur. Bu bölgede diş etinde kırmızılık gözlenir. Ağıza alınan sıcak maddeler ağrı artışına neden olurken, ılık maddeler ağrıda geçici bir azalma yapar.^{1,2}

Apikal periodontitisin etiyolojisine bağlı olarak dişe uygulanan vitalite testleri farklılık gösterebilir.^{1,2,133} Pulpa nekrozunu takiben oluşan apikal periodontitisli dişlerde vitalite testleri negatiftir. Ancak pulpa kaynaklı akut periapikal patolojinin erken evresinde canlı kalabilen sinir liflerinden dolayı pozitif tepki kaydedilebilir.^{1,2}

Akut apikal periodontitisli diş radyografide periodontal membranın kalınlaşması ile sağlıklı görünüm arasında bir görüntü verir.¹³³ Nekroze pulpadan kaynaklı akut apikal periodontitiste sement- kortikal kemik arasındaki mesafe artmış, yani periodontal membran kalınlaşmıştır. Akut bir pulpitis izleyerek meydana gelen akut apikal periodontitiste ise röntgende sağlıklı bir görünüm izlenir.^{1,2}

Klinik ve röntgen bulguları, akut apikal periodontitiste teşhise varmak için yeterli olmakla birlikte, belirtilerin çoğu akut apikal apse ile ortak olduğundan ayırıcı tanıların varlığı gereklidir.¹ Akut apikal apsede, dişetiyle periost arasında, intraoral veya extraoral şişlik mevcuttur. Ayrıca akut apikal apsede, vestibülde apikal bölgeye rastlayan kırmızılaşmış dişeti üzerine oksijenli su ile ıslatılmış pamuk sürülürse, dişetinde beyazlaşma görülür.¹

Kronik Apikal Periodontitis

Kronik apikal periodontitis, düşük şiddette, uzun süreli mikro irritasyonlar sonucu oluşan ve yavaş ilerleyen kronik bir lezyondur.¹ Bu lezyon, belirli bir semptom ve belirti vermeden gelişip büyüebilir. Genellikle, nekrotik pulpa kaynaklı, düşük patojenik özellik gösteren ajanlar ve eksik yapılmış kanal tedavileri kronik apikal periodontitisin gelişmesine neden olur.¹³³

Kronik apikal periodontitis klinik olarak belirti vermez. Hastanın ağrı şikâyetleri

yoktur. İlgili diş perküsyona çok az seviyede hassasiyet gösterebilir veya hassasiyet göstermez. Kronik apikal periodontitisli diş, nekrotik bir pulpaya sahip olduğundan, termal veya elektriksel testlere cevap vermez.¹³³

Kronik apikal periodontitisin tanısında radyografik bulgular kullanılır. Röntgen filmlerinde ilgili dişte, yaklaşık bir toplu iğne başından nohut büyüklüğüne kadar değişen radyolüsent alanlar görülür.^{1,133}

Kronik apikal periodontitis histolojik olarak, periradiküler granülom veya periradiküler kist olarak sınıflandırılır.¹³³

Periradiküler Granülom

Histolojik olarak incelendiklerinde periradiküler granülomlarda, çoğunlukla küçük kapiller ve fibroblastlarla birlikte granülasyon dokusu, çok sayıda bağ dokusu lifleri ve bağ dokusu kapsülü gözlenir. Ayrıca granülomlarda plazma hücreleri, lenfositler, fagositler ve az sayıda nötrofiller de gözlenmiştir. Granülomların çoğu epitel dizileri veya odacıkları içerebilir.^{2,133,136}

Klinik belirti yokluğu nedeniyle, granülomların teşhisinde röntgen filmleri kullanılır. Tanı kriterleri, klinik olarak nekrotik pulpanın tespiti ve radyografide sınırları belirgin radyolüsent görüntünün izlenmesidir. Granülomlar, sıklıkla periapikal kistik lezyonlarla karıştırılır. Kesin tanı için biyopsi ile alınan parçanın histolojik olarak incelenmesi gerekmektedir.¹

Periradiküler Kist

Apikal periodontitisli lezyonların içinde radiküler kistlerin oranını inceleyen histopatolojik çalışmalar, radiküler kistlerin görülme oranının %6-55 arasında olduğunu rapor etmektedirler.¹³⁵ Periradiküler kistler histolojik olarak incelendiklerinde, santral bölümü eozinofilik sıvı veya semisolid bir materyalle dolu, stratiye skuamöz epitelle

çevrili bir kaviteden oluştukları görülmektedir.^{2,133}

İlgili dişte perküsyon, mobilite ve vitalite testlerinde negatif sonuçlar alınır. Bazen vitalite testinde pozitif sonuç alınmasının nedeninin, periapeksteki likefaksiyon nekrozunun neden olduğu elektrolitik geçişi veya iletim yapabilen sinir liflerinin bulunmasıyla ilişkili olacağı düşünülmektedir.²

Granülom ve kistler diğer periapikal patolojilere göre daha iyi bir sınır gösterirler. Ayrıca periapikal lezyonların ebatlarının büyük olmasının lezyonun kist olabilme ihtimalini artırabileceği de belirtilmektedir.^{1,2}

Akut Apikal Apse

Akut apikal apse; nekrotik pulpa kaynaklı, mikrobiyal ve mikrobiyal olmayan iritanların neden olduğu şiddetli iltihabi tepki ile periradiküler dokularda yıkıma neden olan, yaygın veya sınırlandırılmış bir likefaksiyon lezyondur.¹³⁴ Akut apikal apse, periodontal membranın apikal kısmının seröz iltihabı olan akut apikal periodontitisi takiben veya kronik apikal bir iltihabın akut hale gelmesi ile oluşabilmektedir.^{1,133}

Akut apikal apsenin histolojik görüntüsü çok sayıda parçalanmış polimorfonükleer lökositler, debrisler, hücre artıkları ve pürülan eksudanın birikimini gösteren likefaksiyon nekrozunun lokalize destrüktif lezyonu şeklindedir.^{2,134}

Klinik olarak, hastalarda yaygın veya lokalize şişlik bulunabilir. İntraoral şişlik, dişin apikal bölgesine palpasyonla veya çıplak gözle fark edilebilir. Ekstra oral şişliğin bulunduğu durumlarda ise gerginlik nedeniyle hastanın yüz derisinde parlama gözlenir.^{1,133} Bunlara ilave olarak, hastalarda bazen enfeksiyonun sistemik bulguları olan ateş ve lökositoz da görülebilmektedir.^{2,133,134} Akut apikal apseli diş nekrotik bir pulpaya sahip olduğundan termal ve elektriksel uyarılara cevap vermez. Diş alveolünden yükselmiştir ve her doğrultuda mobilitateye sahiptir. Çiğneme basınçlarında

ve dinamik oklüzyonda hastanın ağrısında artış olmaktadır.^{1,133,134}

Akut apikal apseli dişin radyografik görünümünde, periodontal ligament boşluğunun kalınlaşmasından, ileri rezorbtif lezyona kadar değişen görüntüler izlenir. Akut apikal apsenin, akut apikal periodontitisi takiben olduğu durumlarda radyografide genişlemiş apikal periodontal membrana eşlik eden intra veya ekstra oral şişliğin filme yansımış diffüz radolüsentliği görülmektedir.^{1,2}

ENDODONTİK ENFEKSİYONLARDA LABORATUVAR TANI TEKNİKLERİ

Mikrobiyal Örneğin Alınması

Klinikte mikrobiyal örneğin alınması esnasında dikkat edilecek hususlar arasında öncelikle kontaminasyonu engellemek ve örneği doğru bir şekilde alıp, laboratuvara göndermek önemli yer tutmaktadır.¹⁸ Laboratuvar personeli ile diş hekimi arasındaki iletişimin iyi olması da ortaya çıkabilecek sorunları önceden engellemek bakımından önemlidir. Eğer laboratuvar anaerobik bakteriyolojik tetkikler yapabilecek düzeneğe sahip değilse, böyle bir laboratuvara materyal yollamak anlam taşımamaktadır.^{2,5}

Endodontik enfeksiyonlardan, moleküler yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda örnek alma işleminde yapılması gerekenler, kültür yöntemlerindeki benzerlik göstermektedir. Enfekte kök kanalından aseptik bir örnek alınabilmesi için öncelikle dişin rubber dam ile izole edilmesi, diş ve etrafındaki rubber damın sodyum hipoklorit veya başka bir dezenfektan ile dezenfekte edilmesi gerekmektedir.⁵ Giriş kavitesi steril bir frez ile su spreyi kullanılmadan açılmakta, pulpa odasını da içine alan operasyon sahası %2,5'lik sodyum hipoklorit ile dezenfekte edilmektedir. Daha sonra bu solüsyon %5'lik sodyum tiosülfat ile inaktive edilmekte ve 15 numaralı K tipi eğe, apeksden yaklaşık 1 mm kısa olacak şekilde yerleştirilmekte ve kanal preparasyonu

yapılmaktadır. Ardışık iki eşit paper pointler kanal içerisine yerleştirilmekte ve 1 dakika beklenildikten sonra paper pointler ve kanal egesi kriyotüplere yerleştirilerek laboratuvara gönderilmektedir. Örnek alma işlemi tamamlanıncaya kadar antimikrobiyal solüsyonlar kullanılmamalıdır. Endodontik orjinli fasial şişliklerden örnek alımı ise mukozanın yüzey dezenfeksiyonu takiben, steril bir şırınga kullanılarak pü'nün aspirasyonu ile yapılmaktadır. Yüzey dezenfeksiyonu amacıyla %2'lik klorheksidin kullanılabilir ve aspirasyonu takiben şırınga içindeki havanın boşaltılması gerekmektedir. Örnekler, kriyotüplere aktararak laboratuvara gönderilmelidir.^{16,72,129,137}

Geleneksel Tanı Yöntemleri

Kültür

Kültür, besleyici bir ortamda üretilmiş olan mikroorganizmaların tümüne verilen isimdir. Saf kültür ise, tek bir mikroorganizmanın uygun üreme ortamında üremesi ile oluşan kültür olarak kabul edilmektedir.⁹⁴

Bir asırdan daha uzun bir süredir, yapay üreme besiyerleri kullanılarak yapılan kültür işlemleri enfeksiyon hastalıklarında standart tanı testi olarak kullanılmaktadır.¹³⁸ Ancak günümüz koşullarında bile mikrobiyal türlerin büyük bir kısmının kültüre edilmesinde sorunlar yaşandığı bir gerçektir.^{4,139}

Bakterilerin kültüre edilememesi nedenleri arasında; yapay kültür ortamının temel besinler ve üreme faktörlerinden yoksun olabilmesi, kültür ortamının bakterinin üremesine engel olacak şekilde toksik etki yapabilmesi, örnek içindeki diğer mikroorganizmaların hedef türü inhibe eden maddeler salgılayabilmeleri, bir türün üreyebilmek için başka bir türe ihtiyaç duyabilmesi ve bakteriler arasındaki etkileşimin kültür işlemleri esnasında bozulabilmesi yer almaktadır.¹⁴⁰⁻¹⁴²

Kültür yöntemlerinin en büyük avantajı, tek bir örnek içinde bulunan ve

çeşitlilik gösteren mikrobiyal türlerin tanımlanabilmesine imkân sağlamasıdır. Ayrıca kültür işlemleri izolasyonların antimikrobiyal duyarlılıklarını belirlemeye ve bu izolasyonların fizyolojilerini, biyokimyasal ve genetik özellikleri ile patolojilerini de çalışmaya olanak vermektedir.^{4,138} Bununla beraber masraflı olmaları, bazı seçici anaeropik bakterilerin tanımlanması için gereken sürenin günler, hatta haftalar alabilmesi, özellikle seçici anaeropik bakterilere karşı duyarlılıklarının çok düşük olması, özgüllüklerinin ise mikrobiyologların deneyimlerine bağlı olup düşük olması, kültür amaçlı alınan örneğin taşınma işlemlerinden etkilenebilmesi, çok sayıdaki bakteri türünün kültüre edilememesi ve kültüre edilebilen bakterilerin ise tanımlanmasında yaşanan güçlükler kültür temelli yöntemlerin başlıca dezavantajlarını oluşturmaktadır.^{138,139,143-145}

Mikroskopik muayene

Bakterilerin morfolojileri, çok küçük boyutta olmaları nedeniyle, ancak mikroskoplar (ışık mikroskobu, karanlık saha mikroskobu, faz kontrast mikroskobu, elektron mikroskop, vs.) altında gözlenerek saptanabilir. Bu amaçla, uygun sıvı veya katı ortamlarda saf olarak üretilen bakterilerden hazırlanan preparatlar özel boyalarla boyanarak incelenirler. Mikroskop altında, bakterilerin bireysel formları, büyüklükleri, kenarları, dizilişleri, spor durumları, boyanma özellikleri, flagella (kamçı) ve fimbria (pilus) muayeneleri gibi çeşitli özellikleri incelenmektedir.^{26,94,146}

Bakterilerin morfolojileri hakkında bilgi veren mikroskopik bulgular, yanlış bilgi verebilmektedir. Bunun nedeni çoğu bakteri türünün hücrelerinin farklılık gösterebilmesi, yani aynı türden hücrelerin biçimsel olarak farklı olabilmesidir. Mikroskopun diğer bir dezavantajı ise özgüllük ve duyarlılığının az olmasıdır.^{138,139}

İmmünolojik Yöntemler

Bu yöntemler, antijen-antikor reaksiyonunu özgüllüğü üzerine kurulmuş olan yöntemlerdir.¹³⁸ ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) ve immuno-fluoresan testleri, mikrobiyal tanıda sık şekilde kullanılan immünolojik yöntemlerdir.¹³⁸

İmmünolojik yöntemlerin avantajları arasında; mikrobiyal türlerin tanımlanması için gereken sürenin az olması, maliyetlerinin ucuz olması, standardize edilebilmelerinin kolay olması sayılabilir.¹⁴⁷ Önemli dezavantajları ise sadece hedef türleri tespit edebilmeleri, duyarlılıklarının düşük olması (yaklaşık 10^4 hücre), özgüllüklerinin kullanılan antikora bağlı olarak değişebilmesi ve ölü mikroorganizmaları ya da antijenik özellikteki hücre partiküllerini tespit edebilmeleridir.^{145,147}

Moleküler Tabanlı Yöntemler

Moleküler tabanlı yöntemler, daha önce bilinmeyen insan patojenlerinin tanımlanmalarını sağlayarak medikal mikrobiyolojiye önemli katkılar sağlamışlardır.¹⁴⁸ Bu yöntemlerin bir kısmı endodontik patojenlerin tanısında da kullanılmış ve endodontik enfeksiyonlarda bilinen etken mikrobiyal popülasyonun artmasına olanak sağlamıştır.⁴

Moleküler yöntemlerin çoğu ribozomal RNA genini (rDNA'yı) kullanarak, kültüre ihtiyaç duyulmadan, mikroorganizmaların tanımlanmasını yapabilmektedir. 16S rDNA geni, moleküler yaklaşımlarda, bakteriyel tanıda en sık kullanılan hedef bölgedir. Bu gen, korunmuş bölgeler (bakterilerin hepsinde aynı olan bölgeler) ve değişken bölgelerden (bir bakteriden diğerine değişiklik gösteren bölgeler) oluşur. 16S rDNA geninde bulunan değişken bölgeler, spesifik tanımlamada kullanılan bölgelerdir.^{4,7}

Moleküler yöntemlerin mikrobiyal tanıda diğer yöntemlere karşı önemli

avantajları vardır. Bu avantajların bazıları arasında:¹³⁸

- Hem kültüre edilebilen hem de kültüre edilemeyen bakteri türlerini tespit edebilmeleri,
- Özgüllüklerinin yüksek olması ve fenotipik olarak kesin olmayan davranış sergileyen mikrobiyal türlerin tanımlarını doğru bir şekilde yapabilmeleri,
- Mikrobiyal türleri, kültüre ihtiyaç duymadan direk olarak tespit edebilmeleri,
- Duyarlılıklarının diğer tanı yöntemlerine göre daha yüksek olması,
- Hızlı olmaları ve az zaman almaları,
- Örneklerin alınması ve taşınması esnasında anaeropik koşulların sağlanmasına ihtiyaç duyulmaması. Eğer zorunlu anaeropik bakteriler veya diğer dirençsiz bakteriler, taşınma esnasında canlılıklarını yitirirlerse moleküler yöntemler bu bakterilerin de tanımlanmalarına olanak sağlar.
- Antimikrobiyal tedavi süresince kullanılabilir olmaları,
- Epidemiyolojik çalışmalar için çok sayıda örneğin analizinin gerekli olduğu durumlarda, örneklerin düşük sıcaklıkta saklanıp hepsinin birden analizine imkân sağlamaları sayılabilir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Mikrobiyal tanıda en sık kullanılan moleküler yöntemler, PCR ve onun varyasyonlarıdır.⁴ PCR, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir.¹⁴⁹

PCR ile istenilen genlerin ya da DNA dizilerinin jenerasyonlara bağlı replikasyonu, hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilir. Doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi, PCR replikasyon sürecini taklit ederek yaklaşık 30 jenerasyon sonra,

seçilmiş bir DNA dizisinin yaklaşık olarak milyar katını kopyalar.¹⁴⁹

PCR Oluşum Mekanizması

PCR yöntemi bir gen veya DNA bölgesinin, bu bölgeye bağlanan oligonükleotid primerler aracılığıyla bir dizi replikasyon döngüsü geçirerek çoğaltılması esasına dayanır.¹⁴⁶

PCR yönteminde, sözü edilen her replikasyon döngüsü:

- DNA'nın denatürasyonu (DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrılması).
- Primerin bağlanması.
- Primerin uzaması, olmak üzere üç aşamada gerçekleşir.¹⁴⁶

Amplimer olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenirler.¹⁴⁹

Primerlerin, spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar. Bu artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır.¹⁴⁹

PCR'nin Temel bileşenleri ve İşleyişi

PCR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve $MgCl_2$ 'dür.¹⁴⁹ Polimeraz zincir reaksiyonu mikrotüplerde gerçekleştirilir. Amaca göre farklı PCR tüpleri ve değişik

sıcaklık dereceleri kullanılabilir. PCR sırasında en etkin denatürasyon sıcaklığının 94–96°C olduğu saptanmıştır. Denatürasyonu takiben, ardışık primerin bağlanması aşamasındaki T_m /bağlanma sıcaklığı oranının saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle başarılı bir PCR için T_m /bağlanma sıcaklığının doğru olarak saptanması gerekmektedir.¹⁴⁹

Primerlerin uzaması aşamasında genellikle Taq/Amplitaq DNA polimerazların, polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72°C kullanılır. Uzama aşaması için çoğu zaman iki dakika yeterli olmakla birlikte eğer uzun ampliconlar (PCR ile çoğaltılan DNA parçası) çoğaltılıyorsa süre artırılır. Toplam döngü sayısı 25–35 arasındadır. Döngü sayısının artırılması halinde istenmeyen ürünler fazlalaşırken, istenen ürünlerde bir artış olmamaktadır.¹⁴⁹

PCR Ürünlerinin Belirlenmesi ve Analizi

PCR ürünlerinin analizi ile genellikle üç çeşit bilgi edinilebilir.¹⁴⁹

- Hedef DNA dizisinin varlığının ve taşıdığı varyasyonların belirlenmesi.
- Çoğaltılmış PCR ürününün miktarının ölçülmesi.
- Dizi analizi.

Çoğaltılmış ürünlerin saptanması ve doğrulanması için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler arasında en basit ve geleneksel olanı elektroforezdir. Elektroforezi takiben etidyum bromür ile boyanmış DNA dizileri UV ışık altında görünür hale gelir.¹⁴⁹

PCR Çeşitleri

PCR ilk defa 1985 yılında Saiki ve arkadaşları¹⁵⁰ tarafından, orak hücreli anemi hastalığının teşhisi amacıyla geliştirilmiş ve kullanılmıştır.

Yaygın olarak kullanılan PCR çeşitleri; Klasik (single) PCR, yuvalanmış

(nested) PCR, geri (revers) transkripsiyon PCR, çoklu (multipleks) PCR ve real-time PCR'dır.^{4,149}

Klasik (Single) PCR

Hedef DNA dizisinin her iki ucuna özgü spesifik primerler kullanılarak, termostabil DNA polimeraz yardımıyla uygulanan PCR yöntemidir.¹⁵¹ En kolay uygulanan PCR yöntemi olup, çapraz kontaminasyon riski taşınması, amplifikasyon sonrası analiz gerektirmesi ve fazla zaman alması dezavantajlarıdır.^{19,151}

Yuvalanmış (Nested) PCR

Bu yöntem, klasik PCR yöntemine farklı primer takımlarıyla ikinci bir amplifikasyon uygulamaktan ibarettir. İlk amplifikasyonda elde edilen ürün, ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır. En önemli dezavantajı ilk reaksiyon amplifikasyon ürünlerinin ikinci reaksiyon tüplerine transferi esnasında kontaminasyon olasılığının oldukça yüksek olmasıdır.^{4,19,138,149}

Geri (Revers) Transkripsiyon PCR

RNA, PCR olarak da adlandırılan bu yöntem iki aşamalı olup RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi (geri transkripsiyon) ve tamamlayıcı DNA'nın da standart PCR yoluyla çoğaltılması aşamalarını kapsar. Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri, spesifik proteinleri kodlayan messenger RNA'yı (mRNA) tespit etmesi ve bu şekilde mikroorganizmaların fenotipleri hakkında önemli ipuçları verebilmesidir. Örneğin, penisilinazı kodlayan mRNA'nın varlığı, penisiline olan olası bir direnç hakkında önemli bilgi sağlamaktadır.^{4,149}

Çoklu (Multipleks) PCR

Bir PCR ile birden fazla hedef dizinin birlikte çoğaltılması çoklu PCR olarak adlandırılır. Bu yöntem, birden fazla bölgeye bağlanan çoklu primerler ile

gerçekleştirilir.¹⁴⁹ Çoklu PCR analizleri, PCR sürelerini ve maliyetlerini azaltmak amacıyla kullanılmaktadır.⁴

Real-Time PCR

Bu yöntem, floresan boyaların kullanılmasıyla, gerçek zamanlı olarak DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi yöntemidir.^{4,19} Real-time PCR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir yöntemdir.¹⁹

Real-time PCR yönteminin temelini, floresan reporter moleküllerinin ışınımlarının tespiti ve miktarının belirlenmesi oluşturur.^{4,19,152} Sinyal artışı, PCR ürün artışıyla doğru orantılıdır. Her bir PCR döngüsündeki floresan ışınımının kaydedilmesi ile başlangıçtan itibaren üstel fazda ürün artışına hangi noktada ulaşıldığı eş zamanlı (real-time) izlenebilir. Nükleik asit hedef molekülünün çok sayıdaki kopyasının oluşturulabildiği anda, artan miktarda floresan ışınım gözlenir. Ölçülebilir ışınım 3-15 döngüde oluşmaktadır.¹⁵¹

Farklı real-time PCR yaklaşımları bulunmaktadır. Bunlar arasında sıklıkla kullanılanlar, SYBR- Green, Molecular Beacon ve *TaqMan*'dir.^{153,154}

SYBR- Green yönteminde, yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar kullanılır. Bu yöntemde, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir. Molecular beacon yönteminde ise hedefe özgül probler kullanılarak testin özgüllüğü artırılmıştır.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷

TaqMan yöntemi, SYBR- Green'e oranla daha spesifik bir yöntemdir. Bu yöntemde, 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli probler kullanılmaktadır. Bu probler, primerlerden daha uzun oligonükleotidlerdir. Prob'un 5' ucunda floresan işaret molekülü (reporter boya), 3' ucunda ise baskılayıcı molekül (quencher boya)

kullanılmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece, 5' uçtaki işaret molekülünü sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı molekül tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması, prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde sentezin devam edebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi, 5'—3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece işaret molekülü serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen ampikon miktarına paralel olarak, sinyal şiddeti de artmaktadır.^{152,158,159}

Real-time teknolojisi ticari olarak, *Taq-Man* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corp.) ve *LightCycler* (Roche Diagnostic Corp.) sistemleri şeklinde bulunmaktadır.¹⁶⁰ Real-time PCR yöntemin avantajları arasında, diğer PCR yöntemlerine göre daha hızlı olması, miktar belirleyebilme (kantitatif) özelliğinin bulunması, elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon esnasında sonuç verebilmesi, kontaminasyon riskinin düşük olması ve hedef nükleik asitteki mutasyonları saptayabilmesi yer almaktadır.^{4,161}

PCR Yöntemlerinin Dezavantajları

PCR yöntemlerinin de diğer tanısal yöntemlerde olduğu gibi bazı dezavantajları vardır. Bunların arasından bazıları şunlardır:

- PCR yöntemlerinin, real-time PCR haricinde, hedef mikroorganizmanın tanısını niteliksel olarak yapabilmeleri ve örnek içindeki mikroorganizma miktarını belirleyememeleri.
- PCR yöntemlerinin çoğunun aynı anda sadece bir türü veya multipleks PCR' da olduğu gibi çok az sayıda farklı türleri tespit edebilmeleri.
- Maliyetlerinin yüksek ve çalışılmalarının zahmetli olması.

- Klinik örneklerde bulunabilen enzim inhibitörlerinin aynı zamanda PCR inhibitörü olarak da etki edip amplifikasyon reaksiyonunda başarısızlığa yol açabilmesi.
- Mantarlar gibi kalın hücre duvarına sahip mikroorganizmalardan DNA izolasyonu için ek işlemlere ihtiyaç duyulabilmesi.
- Kontamine olan DNA' nın amplifikasyonu sonucu yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkma olasılığının bulunmasıdır.^{4,138}

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti Kliniği'ne müracaat eden akut apikal periodontitis (20 vaka), akut apikal apse (20 vaka) ve kronik apikal periodontitis (20 vaka) tanısı konan 29'u bayan, 31'i erkek toplam 60 erişkin hastadan alınan örneklerde yapıldı. Hastalara çalışmanın amacı ve içeriği hakkında bilgi verildi. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü, Etik Kurul Bilimsel Araştırma ve Tez Başvuru Formun'da yer alan 23.06.2006 tarih ve 2006.3,1/8 numaralı "Bilgilendirilmiş Olur Formu" imzalatılarak yazılı onayları alındı (Ek 1).

Çalışmamıza nekrotik pulpalı, tek köklü ve dişeti cep derinliği 4 mm'den fazla olmayan dişler dâhil edildi. Hastalardan alınan anamnez bilgileri kaydedilerek sistemik rahatsızlığı bulunan (Diabetes mellitus gibi) ve son üç ay içerisinde antibiyotik kullanan hastalar çalışma dışında tutuldu (Ek 2).

Örnek Alımı

Akut ve kronik apikal periodontisli dişlerin kök kanallarından örnek alma işleminde, ilk olarak dişler pomza ile temizlendi ve rubber dam ile izole edildi. Bunu takiben, diş ve çevresindeki rubber dam önce %3'lük hidrojen peroksit ile temizlendi, daha sonra %2,5'lik sodyum hipoklorit solüsyonu ile dekontamine edildi. Giriş kavitesi su spreyi kullanılmadan, el ile yapılan irrigasyon yardımıyla, steril frezler kullanılarak açıldı. Pulpa odasını da içine alan operasyon sahasının dekontaminasyonu tekrar %2,5'lik sodyum hipoklorit solüsyonu ile sağlandı. Sodyum hipoklorit solüsyonun inaktivasyonu için %5'lik sodyum thiosülfat kullanıldı. 15 numaralı K tipi eğe (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland), radyografik olarak belirlenen diş apeksinden yaklaşık 1 mm kısa olacak şekilde yerleştirildi. Döndürme hareketi

yapılmaksızın kanaldan geri çekildi. Daha sonra ardışık iki eşit paper point, eğe ile aynı seviyede kanala yerleştirildi ve 1dk beklendi. Kanal içerisinden alınan paper pointler ve kanal eğesi kriyotüplere yerleştirilerek laboratuvara gönderildi. Örnekler, DNA ekstraksiyonu yapılncaya kadar -20°C dondurularak bekletildi.

Akut apikal apseli vakalardan örnek alımı ise %2'lik klorheksidin glukonat ile yüzey dezenfeksiyonunu takiben steril şırınga kullanılarak, pünün aspire edilmesi ile yapıldı. Örnekler kriyotüplere transfer edilerek laboratuvara gönderildi. DNA ekstraksiyonu yapılncaya kadar -20°C dondurularak bekletildi.

DNA Eldesi (Ekstraksiyonu)

Toplanan ve -20°C'de bekletilen örneklerden DNA eldesi için "QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit (Medek Medikal Ürünler ve Sağlık Hizmetleri A.Ş. İstanbul)" kullanıldı. Örnekler tek bir defada çalışılarak, çevresel şartlardan kaynaklanacak olumsuzluklardan kaçınıldığı gibi tüm örnekler için bir standartta sağlanmış oldu. DNA eldesinde, kitin üretici firması tarafından önerilen "doku örneklerinden DNA eldesi" protokolü, örneklerimize uyarlanacak şekilde ufak bazı değişikliklerle kullanıldı. Uygulanan prensipler ve yöntem basamaklar halinde şu şekildedir;

- Çalışmanın yapıldığı laboratuvar, çalışmadan önce laboratuvar için uygun giyim kurallarına göre, bokser tarzı önlük, bone, maske, gözlük ve eldiven giyildi.
- Kullanılacak ortamlar ve yüzeyler çalışmadan önce %10'luk sodyum hipoklorit solüsyonu ile silinip 10 dakikalık bekleme süresini takiben daha sonra distile su ile silindi.
- Kullanılacak ekipman (otomatik pipet, filtreli pipet uçları, 2 ml'lik

mikrosantrifüj tüpleri) moleküler seviyede steril olup, her türlü DNAase, RNAse enzimlerinden, projen etkenden arındırılmış olduğu üretici firma tarafından belgelenmişti.

- Çalışma biyogüvenlik seviyesi 2 olan laminar flow kabinlerinde yapıldı.
- Tüm örnekler derin dondurucudan çıkarılarak, oda sıcaklığına gelmeleri için laminar flow da bekletildi.
- DNA eldesinde kullanılacak kitin içeriği, çalışma masası üzerinde uygun şekilde düzenlendi. Kullanılacak mikrosantrifüj tüpleri ve DNA'nın elde edileceği tüpler örneklerle uygun şekilde eşleşme yapacak tarzda numaralandı.
- DNA eldesinde kullanılacak kite ait reagentlerin bir kısmı üretici firma tarafından satılırken, test için hazır kullanım şekliyle satılmamaktadır. Kullanıma hazır olabilmesi için moleküler grade saf etil alkol ile sulandırılması gerekmektedir. Hazırlanması gereken reagentler için moleküler grade etil alkol (Sigma®) kullanılarak kit içeriği kulanıma hazır hale getirildi. En son aşamada DNA'yı aktaracağımız sıvı olan ve kitin içeriğinde yer alan buffer AE, 70°C'lik ısı bloğuna konarak son aşamaya kadar bekletildi.

DNA eldesi için yapılan hazırlıklardan sonra DNA eldesi işlemlerine geçildi. Bu işlemler sırasıyla aşağıdaki gibi yapıldı.

- Oda sıcaklığına getirilmiş örnekler 90 saniye süreyle vortexte güçlü bir şekilde karıştırıldı. Ardından tüpün tepe ve kenarlarını sıçramış örneği tüpün altında toplamak amacıyla kısa santrifüj yapıldı (3 000 X g'de 15 saniye).
- Örnekten 200 µl'lik kısım alınarak 2 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı, üzerine 200 µl kit içeriğinden olan buffer ATL ilave edildi. Vortexte bu iki içerik iyice karıştırıldıktan sonra üzerine yine kitin içeriğinde mevcut olan

proteinase K'dan 20 µl katıldı. Karışım tekrar vortexlendikten sonra 56°C'da ki ısı bloğuna bırakılarak yaklaşık 60 dakika süreyle inkübe olması sağlandı.

- İnkübasyonu takiben ısı bloğundan alınan örnekler kısa santrifüj edildikten sonra üzerine 200 µl buffer AL konup, ısı bloğunda 70°C'da yaklaşık 30 dakika süreyle inkübe edildi.
- Isı bloğundan alınan örnekler kısa santrifüj yapıp üzerine 200 µl moleküler grade etil alkol ilave edildi. 20 saniye süreyle iyice vortexlendi ve oda sıcaklığında 1 dakika süreyle bekletildi.
- Karışım, kısa santrifüj işlemini takiben QIAamp spin column'lara aktarıldı ve 6 000 X g'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Column'un altındaki toplama tüpüne atık kısım geçerken, column'un silikon kısmına ortamdaki DNA'nın bağlanması sağlanmış oldu. Column yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 500 µl'lik hacimlerle AW 1 ve AW 2 ile iki defa yıkama işlemine tabi tutuldu. Yıkama işlemlerinin sonunda 6 000 X g'de 1 dakika süreyle santrifüj uygulandı. Bu işlemlerin her keresinde toplama tüpleri atılarak yeni toplama tüpleri kullanıldı.
- Yıkama işlemi bittikten sonra column'lar altlarında yeni toplama tüpleriyle birlikte oda sıcaklığında 3 dakika süreyle bırakıldı ve daha sonra 70°C'da ısı bloğunda 1 dakika daha bekletildi. Sonra üzerine 70°C'ta bekletilen buffer AE'den 200 µl kondu ve 1 dakika bekletilip 8 000 X'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası tüpün dibinde elde edilen buffer AE, tüm bu işlemlerin sonrasında açığa çıkarılan DNA'yı içermektedir.
- Elde edilen DNA solüsyonu, PCR işlemine kadar -20°C'da derin dondurucuda muhafaza edildi.

Oligonükleotid Diziler (Primerler-Amplimerler) ve PCR ile Hedef DNA Bölgesi'nin Çoğalması

Oligonükleotid diziler (primerler ve prob)

Treponema denticola'ya özgün primerler ve bu primerlerin çoğalttığı DNA bölgesinde, zincirlerden birine bağlanabilme özelliğindeki ikinci bir oligonükleotid dizisi yani prob daha evvelce Yoshida ve arkadaşları¹⁶² tarafından kullanılmıştır. Primer ve proba ait diziler İontek® Firmasına (İstanbul) yaptırılarak firmanın oligonükleotid diziler için uygun gördüğü şartlarda kullanılmıştır. Ayrıca firma tarafından PCR'ın çalışmasını kontrol etmek, aynı zamanda sistemin pozitif kontrolü olarak ve DNA eldesi sırasında PCR inhibitörlerinin etkinlik düzeylerini saptamak amacıyla da internal kontroller sağlanmış ve dizilerle birlikte gönderilmiştir. Ancak internal kontrol için kullanılan diziler firma tarafından belirlendiği ve paylaşım hakkı kendinde saklı olduğu için bu dizilerin nükleotid sıralamasına ait bilgi tarafımıza verilmemiştir.

Treponema denticola için özgül primerlerin ve probun nükleotid dizilimi şöyledir:

İleri (forward) primerler: 5'-AgAgcAAgcTcTcccTTAccgT-3'

Geri (reverse) primerler: 5'-TAAGggcggcTTgAAATAATgA-3'

Prob: 5'-FAM-cAgcgTTcggtCTgAgccAggATcA-TAMRA-3'

PCR ile DNA çoğalması

T. denticola'ya özgül primerlerle DNA'nın çoğaltılması ve saptanması real-time PCR ile yapılmıştır. Bu amaçla ICycler IQ Multicolor Real-Time RCR Detection System (BIO-RAD® Laboratories, Inc. Hercules, CA USA, Medek Medikal Ürünler ve Sağlık Hizmetleri A.Ş. İstanbul) kullanılmıştır. Her bir örnek için PCR ile DNA çoğaltma işlemi 25 µl'lik hacimde yapılmıştır. Bu hacmin 5 µl'si örneğe ait DNA olup

20 µl'si ise "1X QuantiTect Probe PCR buffer" dı ve řu içerikten oluşmaktaydı: Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgCl₂, pH 8.7, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP/dUTP) (QIAGEN®) her bir primerden 0.7 µM ve çift işaretli probtan 0.24 µM. rnek DNA'sı ve 1X QuantiTect Probe PCR buffer'dan oluşan 25 µl'lik toplam karışım firma tarafından sağlanan 96 örneklik reaksiyon plağına (96-well MicroAmp Optical Reaction Plate-BIO-RAD® Laboratories, Inc. Hercules, CA USA- Medek Medikal rnler ve Sağlık Hizmetleri A.ř. İstanbul) yerleştirildi ve üzeri yine firma tarafından sağlanan optik kalitedeki kaplama teybi ile (Optical-Quality Sealing Tape- BIO-RAD® Laboratories, Inc. Hercules, CA USA- Medek Medikal rnler ve Sağlık Hizmetleri A.ř. İstanbul) kapatılıp, real-time PCR cihazına yerleştirildi. (şekil 1) PCR ile DNA oėaltma programına ait protokol cihaza yüklenerek, örneklerde gerçek zamanlı olarak *T. denticola* DNA'sının varlığı araştırıldı. Uygulanan oėaltma protokolü, 50°C'de 2 dakika süreyle 1 dnė, 95°C'de 15 dakika süreyle 1 dnė, 95°C'de 30 saniye ve 58°C'de 90 saniye olacak şekilde 50 dnė, PCR sonucunda 11°C'de sonuçların alımına kadar bekleme şeklinde uygulandı.



şekil 1: Çalışmamızda kullandığımız real-time PCR cihazı

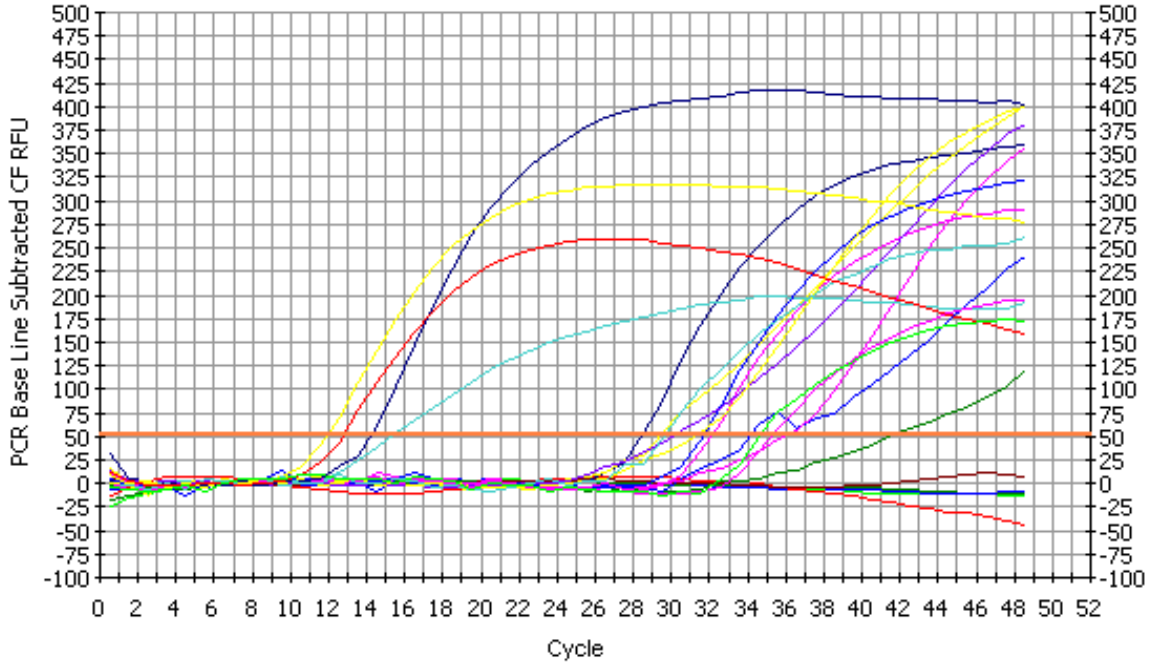
BULGULAR

Çalışma akut apikal periodontitis, kronik apikal periodontits ve akut apikal apse tanısı konan 60 hastadan aldığımız mikrobiyal örneklerde yapıldı. Hastaların yaş ortalaması 31 idi.

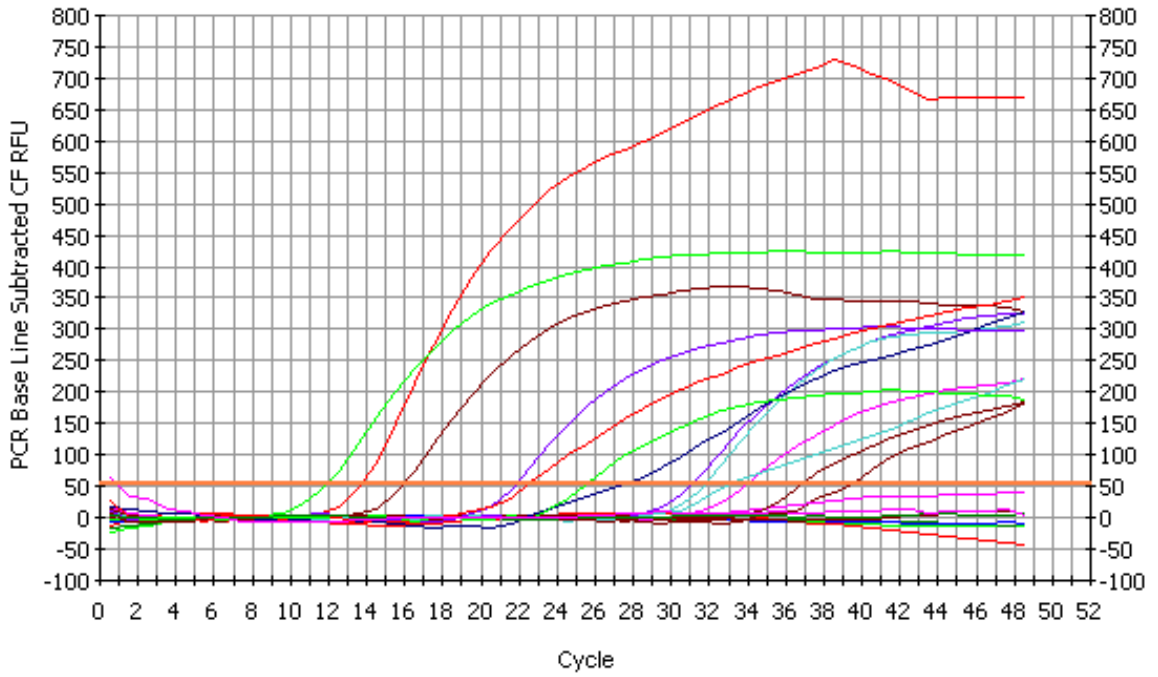
Çalışmada *T. denticola*, real-time PCR yöntemi kullanılarak akut apikal apseli 20 vakanın 16'sında (%80), akut apikal periodontisli 20 vakanın 13'ünde (%65) ve kronik apikal periodontitisli 20 vakanın 11'inde (%55) tespit edilmiştir (Şekil 2, 3, 4). Bununla beraber, *T. denticola*, semptomatik vakaların (akut apikal apseli ve akut apikal periodontitisli vakalar) %72,5'inde, asemptomatik vakaların %55'inde, toplamda ise 60 vakanın 40'ında (%67) tespit edilmiştir (Şekil 5, 6).

Treponema denticola'nın akut apikal apseli vakalardaki %80 tespit oranının istatistiksel olarak çok önemli olduğu ($\chi^2= 7,2$ $p= 0,007$), akut apikal periodontitis ve kronik apikal periodontitisli vakalardaki tespit edildiği oranların ise istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. Bu bakterinin semptomatik vakalardaki (akut apikal apseli ve akut apikal periodontitisli vakalardaki) %72,5 ve toplamdaki %67 tespit oranlarının da istatistiksel olarak çok önemli olduğu bulunmuştur (sırasıyla $\chi^2= 8,1$ $p= 0,004$; $\chi^2= 6,667$ $p= 0,009$).

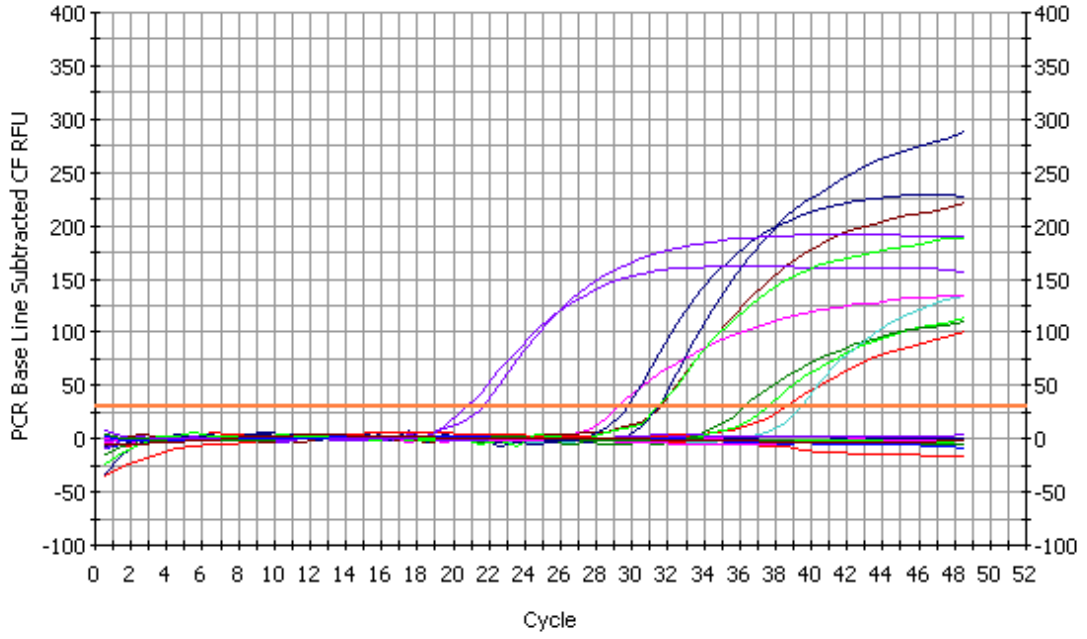
Akut apikal apseli, akut apikal periodontitisli ve kronik apikal periodontitisli vakalardan alınan örneklerde *T. denticola*'nın tespit edildiği oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Semptomatik ve asemptomatik vakalarda *T. denticola*'nın tespit oranları karşılaştırıldığında ise aradaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur (Tablo 5, 6).



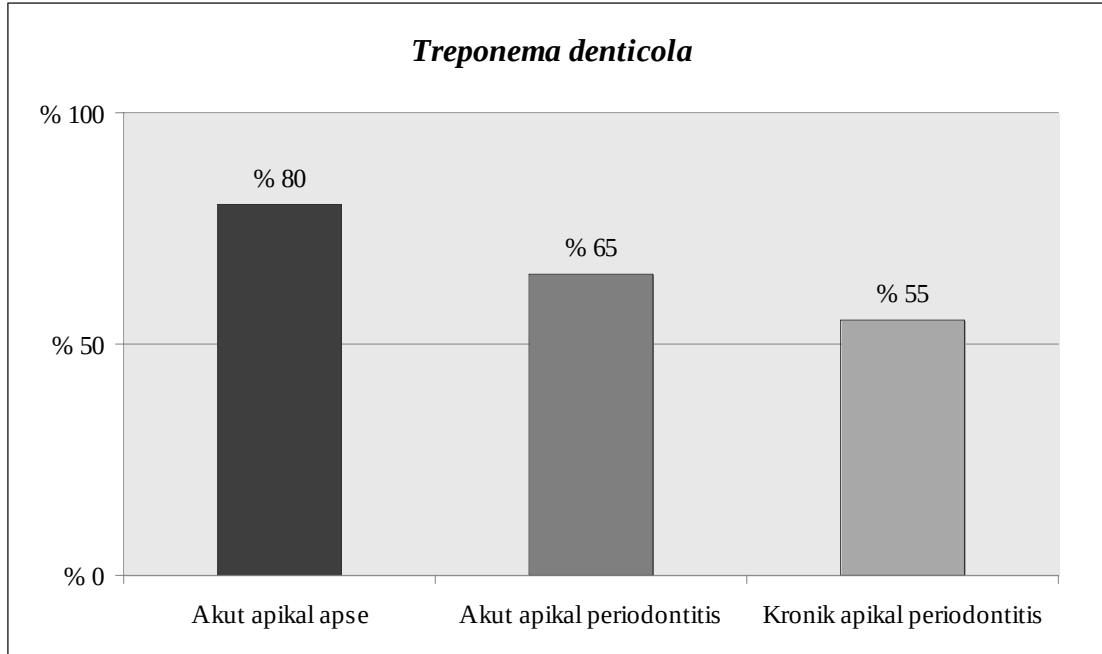
Şekil 2: Akut apikal apseli vakalardan alınan örneklerin real-time PCR sonuçları.



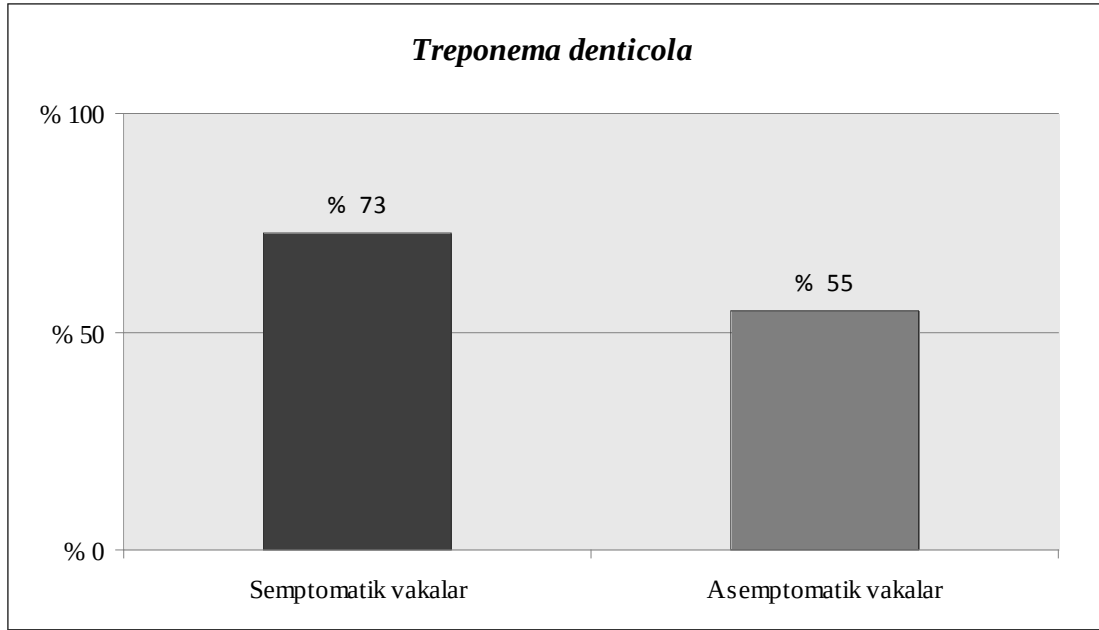
Şekil 3: Akut apikal periodontitisli vakalardan alınan örneklerin real-time PCR sonuçları.



Şekil 4: Kronik apikal periodontitisli vakalardan alınan örneklerin real-time PCR sonuçları.



Şekil 5: *Treponema denticola*'nın akut apikal apseli, akut apikal periodontitisli ve kronik apikal periodontitisli vakalardaki tespit oranlarının yüzde olarak gösterilmesi.



Şekil 6: *Treponema denticola*'nın semptomatik ve asemptomatik vakalardaki tespit oranlarının yüzde olarak gösterilmesi.

Tablo 3: *Treponema denticola*'nın akut apikal apseli, akut apikal periodontitisli ve kronik apikal periodontitisli vakalardaki tespit oranlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	<i>Treponema denticola</i>			Toplam Örnek Sayısı
	Pozitif	Negatif	Pozitif örnek oranı (%)	
Akut Apikal Apse	16	4	80	20
Akut Apikal Periodontitis	13	7	65	20
Kronik Apikal Periodontitis	11	9	55	20
TOPLAM	40	20	67	60
İstatistik test sonucu: $\chi^2 = 2.85$ p= 0.241				

Tablo 4: *Treponema denticola*'nın semptomatik ve asemptomatik vakalardaki tespit oranlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	<i>Treponema denticola</i>			
	Pozitif	Negatif	Pozitif örnek oranı (%)	Toplam Örnek Sayısı
Semptomatik vakalar	29	11	72.5	40
Asemptomatik vakalar	11	9	55	20
TOPLAM	40	20	67	60
İstatistik test sonucu: $\chi^2 = 1.838$ $p=0.175$				

TARTIŞMA

Oral kavitede bulunan, diş pulpası ve kök kanal sistemi gibi mikrofloraya maruz kalmayan bölgeler genellikle steril kabul edilmektedir.⁷

Periradiküler doku hastalıkları, kök kanal sistemindeki mikrobiyal enfeksiyon etkenlerinin neden olduğu semptomatik veya asemptomatik enflamatuvar lezyonlardır.^{129,163} Kök kanal enfeksiyonu ise pulpadaki kan dolaşımının tamamen durduğu, anaeropik bakterilerin yoğun olarak bulunduğu ve kronikleşme eğiliminde olan bir enfeksiyondur.^{42,62,129}

Son yıllarda, oral kavitedeki bakteriyel çeşitlilik üzerine yapılan çalışmalarda; oral kavitenin farklı bölgelerinde bulunan bakteri gruplarının %50-60'dan fazlasının,^{6,164-166} endodontik floradaki bakterilerin ise yaklaşık %40-55'inin kültüre edilemediği rapor edilmektedir.^{167,168}

Geleneksel olarak endodontik enfeksiyonlar, kültür yöntemleri kullanılarak araştırılmışlardır.¹⁶⁹ Kültür yöntemlerinin, kültüre edilmesi güç olan bakterileri tanımlamada ve belirlemede yetersiz kalabilmeleri, çalışmalarında bu yöntemleri kullanan araştırmacıları da zaman zaman zor durumda bırakabilmektedir.¹⁶⁸

Bazı bakterilerin, besin ihtiyaçlarına karşı göstermiş oldukları hassasiyet, bu bakterileri tanımlamak amacıyla kullanılan çeşitli biyokimyasal testlerin birbirinden farklı sonuçlar vermesine ve farklı yorumlamaya bağlı olarak yanlış bakteri tanımlamalarına neden olabilmektedir.¹⁷⁰⁻¹⁷² Bu nedenle, endodontik enfeksiyonlarda kültüre edilen bakteri suşlarının geleneksel tanı yöntemleri kullanılarak tanımlanmasında sorunlar ile karşılaşmıştır. Bunun sonucunda ise bazı bakteri türleri veya suşları mevcut değerlerinden az bulunurken, bazı bakteri türlerinin ise

tanımlanması yapılamamıştır.^{4,173-175}

Kök kanal tedavilerinin başarı oranının artması amacına yönelik etkili stratejilerin geliştirilebilmesi için, kök kanal sistemindeki patojenik etkenlerin iyi anlaşılması gereklidir.¹⁷⁶

Son yıllarda moleküler genetik yöntemler kullanılarak, kök kanal sistemini de içine alan, insan vücudunun çeşitli bölgelerinde kültüre edilemeyen veya kültüre edilebilmesi güç olan bakterilerin tespiti başarılı bir şekilde yapılmıştır.^{13,137}

Moleküler yöntemlerin hücre canlılığını temel almadan bakteriyel tanı yapabilmeleri, bu yöntemleri, özellikle zorunlu anaerobik enfeksiyonlarda yapılan çalışmalarda, avantajlı hale getirmektedir. Çünkü bu tür enfeksiyonlarda gerek örnek almada gerekse örneğin transferi esnasında hücre ölümü gerçekleşebilmektedir.^{177,178} Araştırmalar, endodontik enfeksiyonlarda kültür yöntemleri negatif sonuç verdiğiğinde moleküler yöntemlerin bakteri varlığını tespit edebildiğini göstermektedir.¹⁷⁶

Endodontik enfeksiyonları araştırmak amacıyla kullanılan moleküler yöntemler arasında PCR, moleküler klonlama, DNA problemleri, DNA dizi analizleri, nükleik asit melezleme (hibridizasyon) yöntemleri, denaturing gradient jel elektroforez analizleri (DGGE) yer almaktadır.^{71,179-185}

PCR, duyarlılığı son derece yüksek olan bir yöntemdir.⁴ Bu yöntem, örnek içinde bulunan yaklaşık 1-10 bakteri hücresinin tespitini yapabilirken, diğer tanı yöntemlerinin tespit duyarlılığı daha düşüktür.¹⁹ Seçici olmayan besiyerleri (non-selective media) kullanılarak yapılan kültür işlemleri örnek içinde 10^4 - 10^5 bakteri hücresi tespiti yapabilirken, seçici besiyerleri kullanıldığında kültür yöntemlerinin duyarlılığı 10^3 hücreye kadar çıkabilmektedir.¹⁴⁵ İmmünojenik yöntemlerin tesbit edebildiği sınırlar 10^3 ile 10^4 hücre arasındadır. Moleküler yöntemlerden olan DNA-

DNA hibridizasyon yöntemi ise örnek içinde 10^2 - 10^4 bakteri hücresi olduğunda bakteri varlığını gösterebilmektedir.^{129,145} Bundan dolayı, PCR yöntemi diğer tanı yöntemleri ile karşılaştırıldığında yaklaşık 10-100 kat daha duyarlı bir yöntemdir.¹⁹ Ayrıca bütün mikrobiyal türlerin DNA dizilerindeki farklılıktan dolayı PCR yönteminin özgüllüğü de son derece yüksektir.¹³⁹

Loesche ve arkadaşları,¹⁸⁶ periodontitisli hastalardan aldıkları subgingival plak örneklerinde *T. denticola*, *P.gingivalis*, *B. forsythus* ve *A. actinomycetemcomitans*' in varlığını mikroskop, anaeropik kültür, DNA prob yöntemi ve immünolojik yöntemler kullanarak araştırmışlar ve kültür yönteminin en zayıf tespit yöntemi olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer bir çalışmada Sakamoto ve arkadaşları,¹⁸⁷ periodontitisli hastalardan aldıkları tükürük ve plak örneklerinde *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *P. gingivalis*, *T. denticola* ve *T. socranskii*'nin varlığını klasik PCR, real-Time PCR ve kültür yöntemleri kullanarak araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, her iki PCR yönteminin kültüre göre daha hızlı, duyarlı ve doğru sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir.

Eick ve Pfister,¹⁸⁸ *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* ve *T. denticola*'nın varlığını periodontitisli hastalardan aldıkları subgingival plak örneklerinde PCR ve kültür yöntemleri kullanarak karşılaştırmalı olarak araştırmışlar ve PCR yönteminin kültür yöntemlerine göre daha duyarlı ve özgüllüğünün daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır.

Asai ve arkadaşları,¹⁸⁹ yaptıkları bir çalışmada *TaqMan* real-Time PCR yönteminin, subgingival plak örneklerinde *T. denticola*, *T. vincentii* ve *T. medium* gibi oral treponemaların araştırılmasında oldukça duyarlı ve özellikli bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Boutaga ve arkadaşları¹⁹⁰ periodontitisli hastalardan aldıkları subgingival plak örneklerinde *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythensis*,

P. intermedia ve *M. micros*' un varlığını real-Time PCR ve anaeropik kültür yöntemleri kullanarak araştırmışlar ve real-Time PCR'ın anaeropik kültür yöntemine göre hem hızlı hem de duyarlı olması bakımından önemli avantajları olduğunu bildirmişlerdir.

Rolph ve arkadaşları,¹⁷⁶ kök kanallarındaki bakterilerin araştırılmasında PCR yönteminin kültür yöntemine göre daha duyarlı olduğunu ve infekte kök kanal florasının, sadece kültür yöntemleri kullanılarak alınan sonuçlardan daha fazla çeşitlilik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Gomes ve arkadaşları,¹⁹¹ primer ve sekonder endodontik enfeksiyonlarda *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *Prevotella intermedia* ve *P. nigrescens*'in varlığını anaeropik kültür ve PCR yöntemleri kullanarak araştırmışlardır. Araştırmacılar, bu bakterileri kültür yöntemleri kullanarak %13 oranında bulurken, PCR yöntemi ile %50 oranında bulmuşlar ve siyah pigmentli anaeroplara tespit edilmesinde PCR yönteminin kültüre göre daha yüksek bir duyarlılığa sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Williams ve arkadaşları,¹⁹² endodontik enfeksiyonlu dişlerden aldıkları mikrobiyal örneklerde *Enterococcus faecalis*'in varlığını real-time PCR, revers transkripsiyon PCR ve kültür yöntemleri kullanarak araştırmışlar ve her iki PCR yönteminin duyarlılığının kültüre göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır.

Treponema denticola, kültüre edilebilmesi zor olan bir oral spirokettir.^{17,72} Spiroketlerin karmaşık ve kendilerine özgül olan besin ihtiyaçları ile üremeleri için ihtiyaç duydukları anaeropik ortama karşı gösterdikleri titizlik, bu bakterilerin kültüre edilmelerinde sorunlar yaşanmasına neden olmaktadır.^{4,13,72,93} Son yıllarda ilerleyen kültür yöntemlerine rağmen, spiroketlerin büyük çoğunluğu uzun süreli in vitro kültür işlemlerine karşı, direnç sergilemektedir.¹³

Oral treponemaları birbirlerinden ayırmak için kullanılan fenotipik testler, bu

bakterilerin izolasyon ve kültür işlemlerinde yaşanan güçlükler nedeniyle yetersiz kalabilmektedir.¹⁹³ Bu nedenle, bu bakteriler arasındaki farklılığı belirlemede moleküler yöntemler tercih edilmektedir.^{131,193-196}

Yoshida ve arkadaşları¹⁶² da yaptıkları bir çalışmada real-time PCR yönteminin, farklı spiroket türlerinin birbirlerinde ayrılmasında başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Endodontik enfeksiyonları araştırmak amacıyla yapılan kültür temelli çalışmalarda *T. denticola*, *B. forsythus* (*Tannerella forsythia*) ve *A. actinomycetemcomitans* gibi patojenlerin varlığı az veya hiç rapor edilmemiştir.^{4,129,130,137,163}

Araştırmalarında kültür yöntemlerini kullanan birçok araştırmacı dentoalveoler ve endodontik enfeksiyonlarda *T. denticola*'nın varlığını gösterememişlerdir.^{42,45,48,53,54,58,59,167,197-202}

Son yıllarda, klinik örneklerden oral treponemaların tanımlanabilmesi moleküler yöntemler kullanılarak başarılabilmektedir. Bu yöntemler arasında genel olarak kullanılanlar; klasik PCR,⁷² nested PCR,¹³² PCR amplifikasyonunu takiben dot-blot hibridizasyon uygulaması,¹³¹ PCR ile amplifiye edilen spirochaetal 16S rRNA' nın klonlanması ve sekans edilmesi,¹⁰ DNA-DNA hibridizasyonu^{75,129} ve *Taqman* real-time PCR'dır.¹⁸⁹

Vianna ve arkadaşları,²⁰³ asemptomatik periapikal lezyonlu 20 dişten aldıkları mikrobiyal örneklerde endodontik patojenlerin varlığını kültür ve moleküler yöntemler (DNA chip'leri) kullanarak araştırmışlar, *T. denticola* ve *T. forsythia*'yı kültür yöntemleri ile tanımlayamamışlardır. Araştırmacılar moleküler yöntemler kullanıldığında; *Micromonas micros* (%50), *Fusobacterium nucleatum ssp.* (%40), *T.*

forsythia (%40) ve *T. denticola*'nın (%30), kültür yöntemleri kullanıldığında ise *F. nucleatum* (%25), *Gemella morbillorum*'un (%25) en sık bulunan bakteriler olduğunu belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar, ayrıca zorunlu anaeropik bakterilerin tespitinde; moleküler yöntemlerin daha faydalı olduğunu da ifade etmişlerdir.

Endodontik enfeksiyonların polimikrobiyal tabiatlı olmasından dolayı, bu enfeksiyonlarda yer alan bakteriler arasında etkileşimlerin olabileceği ve bu etkileşimlerin hem bakterilerin canlılıklarını devam ettirmelerinde hem de virulanslarında önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.¹⁶³ Böyle bir bakteriyel ortamda, gerek *T. denticola*'nın kendi virulansının gerekse de diğer bakterilerin virulanslarının artabileceği belirtilmektedir.²⁰⁴

Kesavalu ve arkadaşları,²⁰⁵ fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada *T. denticola*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum* ve *T. vincentii*'nin virülans özelliklerini araştırmışlar ve bu dört bakterinin de farelerin subkutan dokularında apse oluşturabileceğini göstermişlerdir. Ayrıca *T. denticola*'nın önemli seviyede tripsin benzeri proteaz aktivitesine sahip olduğunu, fakat *T. socranskii* ve *T. vincentii*'nin bu aktiviteden yoksun olduğunu da ortaya koymuşlardır.

Foschi ve arkadaşları²⁰⁶ ise hayvanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, endodontik enfeksiyonların etiolojisinde *T. denticola*'nın rolünü araştırmışlar ve bu bakterinin önemli bir endodontik patojen olduğunu saptamışlardır. Ayrıca bu araştırmacılar, *T. denticola*'nın tek başına oluşturduğu enfeksiyonun, *P. gingivalis* ve *T. forsythia* ile birlikte oluşturduğu enfeksiyondan daha patojenik olduğunu vurgulamışlardır.

Oral treponemalardan özellikle *T. denticola*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum* ve *T. vincentii*'nin gingivitis, erişkin periodontitis, akut nekrotizan ülseratif gingivitis, juvenil

periodontitis ve inatçı periodontitis ile olan ilişkileri çeşitli araştırmalarda ortaya konmuştur.^{9,10,111,207}

Treponema denticola'nın, periradiküler hastalıkların patogenezeine, sahip olduğu virülans faktörlerinden ve diğer oral hastalıklarda önemli bir patojen olduğundan dolayı katılabileceği belirtilmektedir.^{12,15-17,72,174,208}

Çalışmamızda *T. denticola*, real-time PCR yöntemi kullanılarak akut apikal apseli vakalarda %80, akut apikal periodontisli vakalarda %65 ve kronik apikal periodontisli vakalarda %55 oranında tespit edilmiştir. *Treponema denticola*'nın akut apikal apseli vakalarda tespit edildiği %80 oranı ile kronik apikal periodontisli vakalardaki %55 tespit oranı arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmamasının, örnek sayısının azlığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. *T. denticola*'nın çalışmamızdaki üç vaka grubunda farklı oranlarda bulunmasında, oksijen basıncı, redüksiyon potansiyeli, pH, besin kaynakları ve bakteriler arasındaki etkileşimler gibi çevresel faktörlerdeki farklılıkların rol almış olabileceği düşünülmektedir.^{163,168}

Siqueira ve arkadaşları,⁷² periradiküler lezyonlu 21 dişin kök kanalından aldıkları mikrobiyal örneklerde; *T. denticola*'nın varlığını klasik PCR yöntemini kullanarak araştırmışlar, bu bakteriyi toplamda %52,4 oranında (21 vakanın 11'inde) bulduklarını rapor etmişlerdir.

Siqueira ve arkadaşlarının,¹⁷ klasik PCR yöntemi ile yaptıkları başka bir çalışmada, 54 tek köklü ve nekrotik pulpalı dişte *T. denticola*'nın varlığı araştırılmış, asemptomatik vakaların %34,5'inde, semptomatik vakaların %53,3'ünde, akut periradiküler apseli dişlerden alınan örneklerin %50'sinde, toplamda ise %42,6 oranında bu bakterinin varlığı rapor edilmiştir.

Siqueira ve arkadaşlarının¹⁷⁴ endodontik kaynaklı, akut apseli 10 vakadan

aldıkları pü örneklerinde ise klasik PCR yöntemi kullanılarak *Porphyromonas gingivalis*, *P. endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *T. denticola* ve *A. actinomycetemcomitans*'ın varlığı araştırılmış, *T. denticola* %50 oranında bulunmuştur. Bu bulgular,^{17,72,174} bizim değerlerimizden daha azdır.

Bulgularımız, araştırmalarında klasik PCR yöntemini kullanan Rôças ve arkadaşları^{15,130} ile Foschi ve arkadaşlarının²⁰⁹ bulgularından da daha yüksek oranlarda endodontik enfeksiyonlarda *T. denticola*'nın varlığını göstermektedir.

Rôças ve arkadaşları,¹⁵ akut ve kronik apikal periodontitisli toplam 20 dişten aldıkları kök kanalı örneklerinde 11 oral patojenin varlığını klasik PCR yöntemi kullanarak araştırmışlar ve akut apikal periodontitiste *T. denticola*'nın %54 (7/13), kronik apikal periodontitiste ise %43 (3/7) oranında bulunduğunu belirlemişlerdir.

Rôças ve arkadaşlarının¹³⁰ aynı yöntemi kullanarak yaptıkları başka bir çalışmada ise periradiküler lezyonlu ve nekrotik pulpalı 50 dişten alınan mikrobiyal örneklerde *B. forsythus*, *P. gingivalis* ve *T. denticola*'nın varlığı araştırılmış, *T. denticola*'nın akut apseli vakalarda %50, apikal periodontitisli vakalarda %47, kronik lezyonlarda ise %40 oranında bulunduğu rapor edilmiştir.

Foschi ve arkadaşları²⁰⁹ ise 44'ü primer ve 18'i sekonder endodontik enfeksiyonlu olmak üzere toplam 62 dişten aldıkları mikrobiyal örneklerde *E. faecalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* ve *T. denticola*'nın varlığını klasik PCR yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, periapiikal radyolüsentliği bulunan semptomatik vakalarda *T. denticola*'yı %56 oranında bulurken, akut apikal periodontitisli vakalardan alınan örneklerde bu bakterinin varlığını rapor etmemişlerdir. Bununla beraber araştırmacılar, *T. denticola*'nın sekonder enfeksiyonlara oranla semptomatik primer endodontik enfeksiyonlarda daha yüksek oranda bulunduğunu da

belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamız ile karşılaştırıldığında ortaya çıkan bu farklı sonuçların nedeninin, kullandığımız real-time PCR yönteminin duyarlılığının, klasik PCR yönteminden daha yüksek olmasından^{154,159,177} kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Siqueira ve arkadaşları,¹²⁹ DNA problemleri ve DNA-DNA hibridizasyon yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada, 11 semptomatik, 17 asemptomatik dişten aldıkları mikrobiyal örneklerde 42 bakteri türünün varlığını araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, *B. forsythus*'u %39 oranında bularak en yaygın tür olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada *T. denticola*'nın %18 oranında bulunduğu rapor edilmektedir.

Siqueira ve arkadaşlarının⁷⁵ aynı yöntemi kullanarak yaptıkları başka bir çalışmada ise endodontik kaynaklı akut apseli 27 vakadan alınan pü örneklerinde 49 bakteri türünün varlığı araştırılmıştır. Bu araştırmacılar en yaygın bulunan bakterilerin, *B. forsythus* (%30), *P. gingivalis* (%30), *Streptococcus constellatus* (%26), *P. intermedia* (%22), *P. nigrescens* (%22), *F. periodonticum* (%19) ve *Eikenella corrodens* (%18) olduğunu rapor etmişlerdir. *Treponema denticola*'nın ise 24 vakanın sadece 1 tanesinde (%4) bulunduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar bizim apseli vakalarda bulduğumuz 16/20 (%80) oranından büyük farklılık göstermektedir.

Jung ve arkadaşlarının,²¹⁰ PCR amplifikasyonunu takiben dot-blot hibridizasyon yöntemini kullanarak, 18 semptomatik, 20 asemptomatik dişten aldıkları kök kanalı örneklerinde yaptıkları bir çalışmada, *T. denticola*, *T. pectinovorum*, *T. maltophilum*, *T. lecithinolyticum*, *T. vincentii*, *T. socranskii* subsp. *socranskii*'yi içeren oral treponemaları semptomatik vakaların %28'inde, asemptomatik vakaların ise %5'inde bulduklarını rapor etmişlerdir.

Jung ve arkadaşları,¹³¹ aynı tanı yöntemi kullanarak yaptıkları başka bir

çalışmada, periradiküler lezyonlu bulunan 79 dişin kök kanalından aldıkları örneklerde oral treponemaların varlığını araştırmışlar ve *T. maltophilum*'u %26, *T. socranskii*'yi ise %2,7 oranında bulurken, *T. denticola*, *T. pectinovorum* ve *T. vincentii*'yi tespit edememişlerdir.

Siqueira ve arkadaşları,²¹¹ 25'i kronik apikal lezyonlu, 25'i akut apikal apseli toplam 50 vakadan aldıkları mikrobiyal örneklerde, *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *P. micros*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* ve *T. denticola*'nın varlığını klasik PCR ve DNA-DNA hibridizasyon yöntemlerini kullanarak araştırmışlar ve sonuçta *T. denticola*'yı PCR yöntemi ile 23 örnekte bulurken (%46), hibridizasyon yöntemi ile ancak 5 örnekte (%10) bulabilmişlerdir. *Porphyromonas endodontalis*'in ise PCR yöntemi ile 11 örnekte (%22), hibridizasyonla ise 4 örnekte (%8) bulunduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada *T. denticola* örneklerinin %38'inde, *P. endodontalis* örneklerinin ise %28'inde PCR yönteminin pozitif, hibridizasyon yönteminin ise negatif sonuç verdiğini vurgulamışlardır. Bu sonuçlar, *T. denticola*'nın endodontik enfeksiyonlarda araştırılmasında, PCR yönteminin hibridizasyon yöntemlerine göre daha güvenilir bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Hibridizasyon yöntemleri kullanılarak yapılan bu çalışmaların sonuçları,^{75,129,131,210,211} bizim çalışmamızdan farklılık göstermektedir. Biz bu farklılığın çeşitli nedenleri olabileceğini düşünmekteyiz. Öncelikle hibridizasyon reaksiyonlarında, problemler ile hedef olmayan nükleik asit dizileri arasında olabilecek homolojilerden dolayı istenmeyen sonuçlar ortaya çıkabilmektedir.²¹² Ayrıca birbirleri ile yakın ilişkili mikrobiyal türler arasındaki olası çapraz hibridizasyon da yanlış sonuçlar doğurabilmektedir.¹²⁹ DNA hibridizasyon yöntemlerinin tespit limitlerinin, çalışmamızda kullandığımız real-time PCR yönteminden daha düşük olmasının¹⁹ da bu

farklılıkta rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

Siqueira ve Rôças,¹⁶ nested PCR yöntemini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, akut periradiküler apseli 19 vakadan aldıkları mikrobiyal örneklerde, *T. amylovorum*, *T. denticola*, *T. lecithinolyticum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii* ve *T. vincentii*'nin varlığını araştırmışlardır. Araştırmacılar *T. denticola*'yı diğer treponema türlerine göre daha yüksek bir oranda (%79) bulmuşlardır. Bu sonuç bizim apse örneklerinde elde ettiğimiz oran ile büyük benzerlik göstermektedir.

Sakamoto ve arkadaşları¹⁶⁸ ile Siqueira ve arkadaşları²¹³ moleküler yöntemler kullanarak yaptıkları çalışmalarında, semptomatik ve aseptomatik endodontik enfeksiyonlardaki bakteriyel kompozisyonun birbirlerinden önemli derecede farklı olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde çalışmamızda da *T. denticola*'nın semptomatik ve asemptomatik vakalarda farklı oranlarda tespit edilmesi, bu araştırmacıların çalışmalarını destekler niteliktedir.

Birbirlerinden farklı coğrafik bölgelerdeki çeşitli konakçı ve çevresel faktörlerin, oral kavitedeki bakteriyel kolonizasyonu etkileyebileceği belirtilmektedir.²¹⁴⁻²¹⁷ Endodontik enfeksiyonların da oral flora kaynaklı enfeksiyonlar olmaları nedeniyle, oral floradaki bu farklılığın endodontik flora üzerinde etkisinin olabileceği belirtilmektedir.²¹⁸ Bu faktörler arasında hem sert hem de yumuşak oral dokularda bulunan ve bakteriyel adezyonda rol oynayan genetik farklılıkların, psikolojik stres, sigara içme alışkanlığı, sosyoekonomik durum, su kaynaklarının kalitesi ve enfeksiyon hastalıkları gibi çevresel faktörlerin yer aldığı rapor edilmektedir.^{214-216,219}

Siqueira ve arkadaşları,²¹⁸ Brezilyalı ve Güney Koreli hastalardan (asemptomatik periradiküler lezyonlu veya akut periradiküler apseli) aldıkları mikrobiyal örneklerde, *D. pneumosintes*, *Filifactor alocis*, *F. nucleatum*, *P.*

endodontalis, *T. forsythia*, *T. denticola* ve *T. maltophilum*'un varlığını nested PCR yöntemini kullanarak araştırmışlar ve Brezilyalı hastalardan alınan mikrobiyal örneklerde en sık bulunan bakterilerin *P. endodontalis* (%79), *T. denticola* (%79), *D. pneumonsintes* (%76) olduğunu, Güney Kore'li hastalardan alınan örneklerde ise *F. nucleatum* (%38), *T. forsythia* (%26) ve *T. maltophilum*'un (%24) diğer bakterilere oranla daha yüksek oranda bulunduğunu belirlemişlerdir. *T. denticola*'nın ise Güney Kore'li hastalardan alınan örneklerde %12 oranında bulunduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar, endodontik enfeksiyonlarda yer alan bazı bakteri türlerinin yaygınlığının, coğrafik bölgeler arasında önemli derecede farklılık gösterebileceğini vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızın sonuçları Brezilyalı hastalardan alınan sonuçlara benzerlik göstermektedir. Her ne kadar araştırmacılar Brezilyalı hastalardan alınan mikrobiyal örneklerde, asemptomatik periradiküler lezyonlarda *T. denticola*'yı bizden daha yüksek bir oranda (%80) bulmuş olsalar da apseli vakalarda buldukları %78 oranı, bizim apseli olgularda bulduğumuz sonuca paralellik göstermektedir.

Rôças ve arkadaşları,²¹⁹ Brezilya (Rio de Janeiro) ve ABD'de (Portland, OR) akut apikal apseli hastalardan aldıkları mikrobiyal örneklerde, 10 endodontik patojenin varlığını nested PCR yöntemini kullanarak araştırmışlar ve Brezilya'dan alınan örneklerde en sık bulunan bakterilerin *T. denticola* (%73), *P. endodontalis* (%70) ve *T. forsythia* (%57), Birleşik Devletler'den alınan örneklerde ise en sık bulunan bakterilerin *Dialister invisus* (%70), *P. endodontalis* (%63) ve *Dialister pneumonsintes* (%55) olduğunu rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar, her iki coğrafik bölgeden alınan sonuçları karşılaştırdıklarında, özellikle *T. denticola* ve *T. forsythia*'nın diğer bakterilere oranla daha yüksek oranda farklılık gösterdiklerine dikkat çekmektedirler.

Oliveira ve arkadaşları¹⁸⁵ ise yaptıkları moleküler bir çalışmada Brezilya ve

ABD’de akut apikal apse tanısı konan hastalardan aldıkları mikrobiyal örneklerdeki bakteriyel çeşitliliği PCR ve gradient jel elektroforez analizlerini kullanarak araştırmışlar ve örneklerdeki bakteriyel profillerin önemli derecede farklılık gösterdiğini izlemişlerdir.

Siqueira ve arkadaşlarının²⁰⁸ çekilmiş insan dişleri üzerinde yaptıkları çalışmada, nested PCR yöntemi ile 23 diş kökünün apikal 1/3’lük kısmında *T. denticola*’yı da içine alan 11 endodontik patojenin varlığı araştırılmış ve *T. denticola* %26 oranında bulunarak, bu bakterinin periradiküler lezyonların patogeneze dâhil olabileceği vurgulanmıştır.

Baumgartner ve arkadaşları,¹³ nested PCR yöntemini kullanarak *T. denticola*, *T. maltophilum*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii* ve *T. vincentii*’nin varlığını semptomatik ve asemptomatik endodontik enfeksiyonlardan aldıkları mikrobiyal örneklerde araştırmışlardır. Bu çalışmada toplamda en sık bulunan bakterinin %45 oranı ile *T. socranskii* olduğu, *T. denticola*’nın ise semptomatik vakalarda %34,5, asemptomatik vakalarda %20, toplamda ise %29 oranında olduğu tespit edilmiştir.

Rôças ve arkadaşları,¹² ise 22’si kronik periradiküler lezyonlu ve 10’nu akut apikal periodontitisli olmak üzere toplam 32 vakadan aldıkları mikrobiyal örneklerde, nested PCR yöntemini kullanarak, *T. denticola*, *T. socranskii*, *T. vincentii* ve *T. pectinovorum*’un varlığını araştırmışlardır. Sonuçta *T. denticola*’nın akut apikal periodontitisli vakaların 8’inde (%80), asemptomatik vakaların 17’sinde (%77), toplamda ise %78 oranında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar, *T. denticola*’nın diğer 4 treponema türü ile karşılaştırıldığında, daha yüksek oranlarda bulunduğunu da vurgulamışlardır.

Gomes ve arkadaşları,²²⁰ nested PCR yöntemini kullanarak yaptıkları bir

çalışmada, primer ve sekonder endodontik enfeksiyonlu dişlerden aldıkları mikrobiyal örneklerde *F. alocis*, *T. denticola* ve *T. forsythia*'nın varlığını araştırmışlar ve *T. denticola*'nın primer endodontik enfeksiyonlarda %38 (19/50), sekonder endodontik enfeksiyonlarda ise %24 (12/50) oranında bulunduğunu rapor etmişlerdir. Bununla beraber *T. denticola*'nın, primer enfeksiyonlu apseli vakalarda %24 oranında tespit edildiğini, ancak primer enfeksiyonlu asemptomatik vakalarda ise bu bakterinin tespit edilemediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, bu üç bakterinin endodontik semptomlarla ilişkilerinin olabileceğini de raporlarına eklemişlerdir.

Gomes ve arkadaşlarının²²¹ aynı moleküler yöntem ile yaptıkları başka bir çalışmada ise primer endodontik enfeksiyonlu (nekrotik pulpalı veya periradiküler apseli) 50 dişten aldıkları mikrobiyal örneklerde *P. gingivalis*, *T. denticola* ve *T. forsythia*'nın varlığını araştırmışlar ve *T. denticola*'nın 50 örneğin 19'unda (%38) bulunduğunu vurgulamışlardır.

Nested PCR yöntemi kullanılarak yapılan bu çalışmaların sonuçlarını değerlendirdiğimizde; Baumgartner ve arkadaşları¹³ ile Gomes ve arkadaşlarının^{220,221} *T. denticola*'yı bizden daha düşük oranlarda, Rôças ve arkadaşlarının¹² ise daha yüksek oranda tespit ettiğini görmekteyiz. Biz bu farklılığın, kullandığımız tanı yönteminden (real-time PCR) ve coğrafik faktörlerden kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Çalışmamızın sonuçlarına göre:

- Moleküler genetik yöntemler, endodontik enfeksiyonlarda etken bakterilerin tanımlanmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır.
- Moleküler genetik yöntemler içerisinde real-time PCR'ın, diğer tanı yöntemlerine göre daha duyarlı bir yöntem olduğu bulgularımızca da desteklenmiştir.
- Araştırma sonuçlarımız *T. denticola*'nın endodontik enfeksiyonlarda etken olarak yer alabilecek önemli bir bakteriyel patojen olduğunu göstermiştir.
- Yine sonuçlarımıza dayanarak *T. denticola*, endodontik kaynaklı periradiküler lezyonların patogeneze dâhil edilmelidir görüşündeyiz ve bu yöndeki görüşleri de desteklemekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Çalışkan MK. Endodontide tanı ve tedaviler. İstanbul: Nobel tıp kitabevleri, 2006: 111-155, 155-178.
2. Alaçam T, Uzel İ, Alaçam A, Aydın M. Endodonti. Ankara: Barış yayınları, 2000: 45-72, 313-383.
3. Baumgartner JC. Endodontic microbiology. In Walton RE, Torabinejad M, eds. Principles and practice of endodontics. Third edition. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2002: 282-294.
4. Baumgartner JC, Hutter JW, Siqueira JF, Jr. Endodontic microbiology and treatment of infections. In Cohen S, Hargreaves KM, Keiser K, eds. Pathways of the pulp. Ninth Edition. St. Louis, Missouri: Mosby, 2006: 580-607.
5. Baumgartner JC, Bakland LK, Sugita EI. Microbiology of endodontics and asepsis in endodontic practice. In Ingle JJ, Bakland LK, eds. Endodontics. Fifth Edition. Hamilton, London: BC Decker Inc, 2002: 63-93.
6. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol 2001; 183: 3770-3783.
7. Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. Endod Top 2004; 9: 5-14.
8. Edwards AM, Dymock D, Jenkinson HF. From tooth to hoof: treponemes in tissue-destructive diseases. J Appl Microbiol 2003; 94: 767-780.
9. Loesche WJ. The role of spirochetes in periodontal disease. Adv Dent Res 1988; 2: 275-283.
10. Dewhirst FE, Tamer MA, Ericson RE, et al. The diversity of periodontal

- spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 196-202.
11. Fenno JC, McBride BC. Virulence factors of oral treponemes. *Anaerobe* 1998; 4: 1-17.
 12. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AFB, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *Int Endod J* 2003; 36: 20-26.
 13. Baumgartner JC, Khemaleelakul S, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod* 2003; 29: 794-797.
 14. Fouad AF, Barry J, Caimano M, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3223-3231.
 15. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AFB, Uzeda M. Identification of selected putative oral pathogens in primary root canal infection associated with symptoms. *Anaerobe* 2002; 8: 200-208.
 16. Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Treponema* species associated with abscesses of endodontic origin. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 336-339.
 17. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Oliveira JCM, Santos KRN. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. *Int Endod J* 2001; 34: 280-284.
 18. Baumgartner JC. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. *Endod Top* 2004; 7: 35-51.
 19. Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent* 2003; 31: 333-339.
 20. Türker M, Yüçetaş Ş. Ağız, diş, çene hastalıkları ve cerrahisi. Ankara: Atlas kitapçılık, 1997: 245-277.
 21. Chow AW. Infections of the oral cavity, neck, and head. In Mandell GL, Benet

- EJ, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone, 2000: 689-702.
22. Topazian RG, Goldberg MH. Oral and maxillofacial infections. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders, 1994: 1-250.
23. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontology 2000 1994; 5: 66-77.
24. Marsh P, Martin MV. Oral microbiology fourth edition. Bodmin, Cornwall: MPG Books Ltd, 1999: 1-33.
25. Levinson W, Jawetz E. Medical microbiology & Immunology. Tercüme: Dündar İH, Erken E, Kılıç B, Memişoğlu HR, Özcan K, Özgönen T, Yarkın F. Tıbbi mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Ankara: Güneş kitabevi, 2004: 1-193.
26. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. Medizinische Mikrobiologie. Tercüme: Küçüker MA, Tümbay E, Anğ Ö, Erturan Z. Tıbbi mikrobiyoloji. İstanbul: Nobel tıp kitabevleri, 2002: 1-42, 138-220.
27. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. Endod Top 2003; 6: 135-159.
28. Spratt DA, Weightman AJ, Wade WG. Diversity of oral asaccharolytic *Eubacterium* species in periodontitis – identification of novel phylotypes representing uncultivated taxa. Oral Microbiol Immunol 1999; 14: 56-59.
29. Paster BJ, Dewhirst FE, Olsen I, Fraser GJ. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. J Bacteriol 1994; 176: 725-732.
30. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenecity of the root canal flora. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78: 522-530.

31. Nair PNR. Pathobiology of primary apical periodontitis. In Cohen S, Hargreaves KM, Keiser K, eds. *Pathways of the pulp*. Ninth Edition. St. Louis, Missouri: Mosby, 2006: 541-579.
32. Trope M, Tronstad L, Rosenberg ES, Listgarten M. Darkfield microscopy as a diagnostic aid in differentiating exudates from endodontic and periodontal abscesses. *J Endod* 1988; 14: 35-38.
33. Hoshino E, Ando N, Sato M, Kota K. Bacterial invasion in non-exposed dental pulp. *Int Endod J* 1992; 25: 2-5.
34. Hoshino E. Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *J Dent Res* 1985; 64: 1195-1198.
35. Cruse WP, Bellizzi R. A historic review of endodontics, 1689-1963, part 1. *J Endod* 1980; 6: 495-499.
36. Miller WD. An introduction in the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dental Cosmos* 1894; 36: 505-533.
37. Loesche WJ, Gusberti F, Mettraux G, Higgins T, Syed S. Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. *Infect Immun* 1983; 42: 659-667.
38. Carlsson J, Frölander F, Sundqvist G. Oxygen tolerance of anaerobic bacteria isolated from necrotic dental pulps. *Acta Odontol Scand* 1977; 35: 139-145.
39. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Top* 2003; 6: 3-28.
40. Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non vital teeth associated with advanced periodontitis. *Int Endod J* 1990; 23: 100-106.

41. Wittgow WC Jr, Sabiston CB Jr. Microorganisms from pulp chambers of intact teeth with necrotic pulps. *J Endod* 1975; 1: 168-71.
42. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 257-262.
43. Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 318-322.
44. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 100-105.
45. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J* 2002; 35: 698-702.
46. Williams BL, McCann GF, Schoenknecht FD. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 770-774.
47. Lewis MAO, MacFarlane TW, McGowan DA. Quantitative bacteriology of acute dentoalveolar abscesses. *J Med Microbiol* 1986; 21: 101-104.
48. Brook I, Frazier EH, Gher ME. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 123-125.
49. Goumas PD, Naxakis SS, Papavasiliou DA, Moschovakis ED, Tsintzos SJ, Skoutelis A. Periapical abscesses: causal bacteria and antibiotic sensitivity. *J Chemother* 1997; 9: 415-419.
50. Sakamoto H, Kato H, Sato T, Sasaki J. Semiquantitative bacteriology of closed odontogenic abscesses. *Bull Tokyo Dent Coll* 1998; 39: 103-107.
51. Byström A, Happonen RP, Sjögren U, Sundqvist G. Healing of periapical

- lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Dent Traumatol* 1987; 3: 58-63.
52. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. [Dissertation]. Umea, Sweden: University of Umea, 1976. (Alınmıştır) Baumgartner JC, Hutter JW, Siqueira JF, Jr. Endodontic microbiology and treatment of infections. In Cohen S, Hargreaves KM, Keiser K, eds. *Pathways of the pulp*. Ninth Edition. St. Louis, Missouri: Mosby, 2006: 580-607.
 53. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endod* 1989; 15: 13-19.
 54. Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17: 380-383.
 55. Sundqvist G, Carlsson J, Herrmann B, Tärnvik A. Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *J Med Microbiol* 1985; 19: 85-94.
 56. van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect Immun* 1985; 49: 494-497.
 57. Haapasalo M, Ranta H, Ranta K, Shah H. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Infect Immun* 1986; 53: 149-153.
 58. Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T, Hirosuke S. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endod* 1987; 13: 24-28.
 59. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J*

Endod 1992; 18: 558-561.

60. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios* 1994; 80: 231-243.
61. Brook I, Frazier EH, Gher ME. Microbiology of periapical abscesses and associated maxillary sinusitis. *J Periodontol* 1996; 67: 608-610.
62. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent* 1996; 24: 47-55.
63. Heimdahl A. Culturing the exudate of an odontogenic infection- A useful procedure. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2000; 90: 1-8.
64. Brook I, Frazier EH. Clinical features and aerobic and anaerobic microbiological characteristics of cellulitis. *Arch Surg* 1995; 130: 786-792.
65. Brook I, Walker RI. Infectivity of organisms recovered from polymicrobial abscesses. *Infect Immun* 1983; 42: 986-989.
66. Price SB, McCallum RE. Studies on bacterial synergism in mice infected with *Bacteroides intermedius* and *Fusobacterium necrophorum*. *J Basic Microbiol* 1987; 27: 377-386.
67. Baumgartner JC, Falkler WA Jr, Beckerman T. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 253-256.
68. Odell LJ, Baumgartner JC, Xia T, Davids LL. Survey of collagenase gene prtC in *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis* isolated from endodontic infections. *J Endod* 1999; 25: 555-558.
69. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2- Redefining the endodontic microbiota. *J Endod* 2005; 31:

488-498.

70. Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16S rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod* 1997; 23: 433-438.
71. Xia T, Baumgartner JC, David LL. Isolation and identification of *Prevotella tanneriae* from endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 273-275.
72. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Santos KRN. Detection of *Treponema denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 335-337.
73. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Identification of *Dialister pneumosintes* in acute periradicular abscesses of humans by nested PCR. *Anaerope* 2002; 8: 75-78.
74. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Detection of *Filifactor alocis* in endodontic infections associated with different forms of periradicular diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 263-265.
75. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92: 451-457.
76. Fouad AF, Kum K-Y, Clawson ML, et al. Molecular characterization of the presence of *Eubacterium* spp. and *Streptococcus* spp. in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 249-255.
77. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Nested PCR detection of *Centipeda periodontii* in primary endodontic infections. *J Endod* 2004; 30: 135-137.
78. Machado de Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Alves GB, Hirata JR, Andrade AFB.

- Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16s rRNA gene-directed polymerase chain reaction. J Endod 2000; 26: 729-732.
79. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Molecular detection of black- pigmented bacteria in infections of endodontic origin. J Endod 2001; 27: 563-566.
 80. Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Pseudoramibacter alactolyticus* in primary endodontic infections. J Endod 2003; 29: 735-738.
 81. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003; 96: 215-222.
 82. Xia T, Baumgartner JC. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. J Endod 2003; 29: 549-552.
 83. Hashimura T, Sato M, Hoshino E. Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* and *Eubacterium saphenum* from pulpal and periradicular samples using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Int Endod J 2001; 34: 463-470.
 84. Wade WG, Spratt DA, Dymock D, Weightman AJ. Molecular detection of novel anaerobic species in dentoalveolar abscesses. Clin Infect Dis 1997; 25 (Suppl 2): S235-236.
 85. Dahle UR, Sunde PT, Tronstad L. Treponemes and endodontic infections. Endod Top 2003; 6: 160-170.
 86. Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. J Endod 2003; 29: 244-247.

87. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Occurrence of two newly named oral treponemes - *Treponema parvum* and *Treponema putidum* - in primary endodontic infections. Oral Microbiol Immunol 2005; 20: 372-375.
88. Calvet HM. Sexually transmitted diseases other than human immunodeficiency virus infection in older adults. Clin Infect Dis 2003; 36: 609-614.
89. Hengge UR, Tannapfel A, Tying SK, Erbel R, Arendt G, Ruzicka T. Lyme borreliosis. Lancet Infect Dis 2003; 3: 489-500.
90. Vinetz JM. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis 2001; 14: 527-538.
91. Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The spirochetes. Annu Rev Genet 2002; 36: 47-73.
92. Goldstein SF, Buttle KF, Charon NW. Structural analysis of *Leptospiraceae* and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy. J Bacteriol 1996; 178: 6539-6545.
93. Paster BJ, Dewhirst FE. Phylogenetic foundation of spirochetes. J Mol Microbiol Biotechnol 2000; 2: 341-344.
94. Bilgehan H. Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi. İzmir: Barış yayınları, 2002: 3-69, 71-102, 253-281.
95. Dahle UR, Tronstad L, Olsen I. Observation of an unusually large spirochete in endodontic infection Oral Microbiol Immunol 1993; 8: 251-253.
96. Dahle UR, Tronstad L, Olsen I. Spirochaetes in oral infections. Dent Traumatol 1993; 9: 87-94.
97. Weinberg A, Holt SC. Interaction of *Treponema denticola* TD-4, GM-1, and MS25 with human gingival fibroblasts. Infect Immun 1990; 58: 1720-1729.
98. Ellen RP, Song M, McCulloch CAG. Degradation of endogenous plasma

membrane fibronectin concomitant with *Treponema denticola* 35405 adhesion to gingival fibroblasts. Infect Immun 1994; 62: 3033-3037.

99. Ellen RP, Dawson JR, Yang PF. *Treponema denticola* as a model of polar adhesion and cytopathogenicity of spirochetes. Trends Microbiol 1994; 2: 114-119.
100. Haapasalo M, Singh U, McBride BC, Uitto VJ. Sulhydryl-dependent attachment of *Treponema denticola* to laminin and other proteins. Infect Immun 1991; 59: 4230-4237.
101. Haapasalo M, Müller KH, Uitto VJ, Leung WK, McBride BC. Characterization, cloning, and binding properties of the major 53-kilodalton *Treponema denticola* surface antigen. Infect Immun 1992; 60: 2058-2065.
102. Mathers DA, Leung WK, Fenno JC, Hong Y, McBride BC. The major surface protein complex of *Treponema denticola* depolarizes and induces ion channels in HeLa cell membranes. Infect Immun 1996; 64: 2904-2910.
103. Fenno JC, Wong GWK, Hannam PM, Müller KH, Leung WK, McBride BC. Conservation of msp, the gene encoding the major outer membrane protein of oral *Treponema* spp. J Bacteriol 1997; 179: 1082-1089.
104. Fenno JC, Hannam PM, Leung WK, Tamura M, Uitto VJ, McBride BC. Cytopathic effects of the major surface protein and the chymotrypsin like protease of *Treponema denticola*. Infect Immun 1998; 66: 1869-1877.
105. Fenno JC, Tamura M, Hannam PM, Wong GWK, Chan RA, McBride BC. Identification of a *Treponema denticola* OppA homologue that binds host proteins present in the subgingival environment. Infect Immun 2000; 68: 1884-1892.

106. Lee SY, Bian XL, Wong GWK, Hannam PM, McBride BC, Fenno JC. Cleavage of *Treponema denticola* PrcA polypeptide to yield protease complex-associated proteins Prca1 and Prca2 is dependent on PrtP. J Bacteriol 2002; 184: 3864-3870.
107. Ellen RP, Ko KS, Lo CM, Grove DA, Ishihara K. Insertional inactivation of the prtP gene of *Treponema denticola* confirms dentisilin's disruption of epithelial junctions. J Mol Microbiol Biotechnol 2000; 2: 581-586.
108. Ishihara K, Kuramitsu HK, Miura T, Okuda K. Dentisilin activity affects the organization of the outer sheath of *Treponema denticola*. J Bacteriol 1998; 180: 3837-3844.
109. Ishihara K, Miura T, Kuramitsu HK, Okuda K. Characterization of the *Treponema denticola* prtP gene encoding a prolyl-phenylalanine-specific protease (dentisilin). Infect Immun 1996; 64: 5178-5186.
110. Haapasalo M, Hannam PM, McBride BC, Uitto VJ. Hyaluronan, a possible ligand mediating *Treponema denticola* binding to periodontal tissue. Oral Microbiol Immunol 1996; 11: 156-160.
111. Chan ECS, McLaughlin R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. Oral Microbiol Immunol 2000; 15: 1-9.
112. Özdemir H, Marakoğlu İ. Periodontopatojenler. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2004; 7: 52-59.
113. Grenier D. Characteristics of hemolytic and hemagglutinating activities of *Treponema denticola*. Oral Microbiol Immunol 1991; 6: 246-249.
114. Chu L, Burgum A, Kolodrubetz D, Holt SC. The 46-kilodalton-hemolysin gene from *Treponema denticola* encodes a novel hemolysin homologous to

- aminotransferases. *Infect Immun* 1995; 63: 4448-4455.
- 115.** Uitto V-J, Pan Y-M, Leung WK, et al. Cytopathic effects of *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase on migrating and stratified epithelial cells. *Infect Immun* 1995; 65: 3401-3410.
- 116.** Mäkinen P-L, Mäkinen KK, Syed SA. Role of the chymotrypsin-like membrane-associated proteinase from *Treponema denticola* ATCC 35405 in inactivation of bioactive peptides. *Infect Immun* 1995; 63: 3567-3575.
- 117.** Gopalsami C, Yotis W, Corrigan K, Schade S, Keene J, Simonson L. Effect of outer membrane of *Treponema denticola* on bone resorption. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 121-124.
- 118.** Kurzban GP, Chu L, Ebersole JL, Holt SC. Sulfhemoglobin formation in human erythrocytes by cystalysin, an L-cysteine desulfhydrase from *Treponema denticola*. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 153-164.
- 119.** Saglie R, Newman MG, Carranza FA Jr, Pattison GL. Bacterial invasion of gingiva and advanced periodontitis in humans. *J Periodontol* 1982; 53: 217-222.
- 120.** Klitorinos A, Noble P, Siboo R, Chan ECS. Viscosity-dependent locomotion of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 242-244.
- 121.** Stamm LV, Bergen HL. Molecular characterization of a flagellar (fla) operon in the oral spirochete *Treponema denticola* ATCC 35405. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 179: 31-36.
- 122.** Hampp EG. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1957; 10: 1100-1101.
- 123.** Thilo BE, Baehni P, Holz J. Dark-field observation of bacterial distribution in

- root canals following pulp necrosis. J Endod 1986; 12: 202-205.
124. Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. J Endod 1987; 13: 29-39.
 125. Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. Endod Dent Traumatol 1991; 7: 226–229.
 126. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 93: 174-178.
 127. Dahle UR, Tronstad L, Olsen I. Characterization of new periodontal and endodontic isolates of spirochaetes. Eur J Oral Sci 1996; 104: 41-47.
 128. Smallwood E, Gharbia SE, Williams JC, Gulabivala K, Shah HN. Isolation and direct nucleic acid detection of oral spirochaetes in root canal infections. Int Endod J 1998; 31: 189-220.
 129. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000; 89: 744-748.
 130. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN, Coelho AMA. “Red complex” (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 91: 468-471.
 131. Jung IY, Choi BK, Kum K-Y, et al. Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 92: 329-334.

132. Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR-based identification of *Treponema moltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium*, and *T. lecithinolyticum* in primary root canal infections. Arch Oral Biol 2003; 48: 495-502.
133. Torabinejad M, Walton RE. Periradicular lesions. In Ingle JI, Bakland LK, eds. Endodontics. Fifth Edition. Hamilton, London: BC Decker Inc, 2002: 175-201.
134. Torabinejad M. Pulp and periradicular pathosis. In Walton RE, Torabinejad M, eds. Principles and practice of endodontics. Third edition. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2002: 27-48.
135. Nair PNR. Pathology of apical periodontitis. In Ørstavik D, Pitt Ford TR, eds. Essential endodontology: prevention and treatment of apical periodontitis. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1998: 68-105.
136. Weiner S, McKinney RV, Walton RE. Characterization of the periradicular surgical specimen. A morphological and histochemical study of the inflammatory patterns. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1982; 53: 293-302.
137. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Moraes SR, Santos KRN. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. Int Endod J 2002; 35: 345-351.
138. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1- Current molecular technologies for microbiological diagnosis. J Endod 2005; 31: 411-423.
139. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. Clin Infect Dis 1999; 29: 475-486.
140. Wade W. Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections. J R Soc Med 2002; 95: 81-3.

141. Wade WG. Non-culturable bacteria in complex commensal populations. *Adv Appl Microbiol* 2004; 54: 93-106.
142. Kell DB, Young M. Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 238-43.
143. Relman DA. Emerging infections and newly-recognised pathogens. *Neth J Med* 1997; 50: 216-220.
144. Tang Y-W, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem* 1997; 43: 2021-2038.
145. Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontology* 2000 1995; 7: 69-82.
146. Güneş HV. Moleküler hücre biyolojisi. Eskişehir: Kaan kitabevi, 2006: 1-14.
147. Sixou M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis* 2003; 9: 54-62.
148. Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science* 1999; 284: 1308-1310.
149. Arı Ş. DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması. In Temizkan G, Arda N, eds. *Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler*. İstanbul: Nobel tıp kitap evleri, 2004: 101-120.
150. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic application of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
151. Real-Time PCR, (Çevrimiçi)
http://www.genetiklab.com/altsayfa.php?giris_ID=2&tablo=tbl_yontemler, 30 Ocak 2008.

152. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4: 357-362.
153. Cashion AK, Driscoll CJ, Sabek O. Emerging genetic technologies in clinical and research settings. *Biol Res for Nurs* 2004; 5: 159-167.
154. Mackay IM. Real time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 190-212.
155. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-193.
156. Diss T. The polymerase chain reaction. In Crocker J, Murray PG, eds. *Molecular biology in cellular pathology*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2003: 193-212.
157. Mhlanga MM, Malmberg L. Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. *Methods* 2001; 25: 463-471.
158. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→ 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7276-7280.
159. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-94.
160. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 151-159.

161. Morris T, Robertson B, Gallagher M. Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2933-2936.
162. Yoshida A, Kawada M, Suzuki N. et al. TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for the correlation of *Treponema denticola* numbers with the severity of periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 196-200
163. Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 281-293.
164. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM et al. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 558-563.
165. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3944-3955.
166. Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, et al. Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 61-68.
167. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* 2002; 81: 761-766.
168. Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 112-122.
169. Siqueira JF Jr. Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic

- infections. J Endod 2003; 29: 619-623.
- 170.** Downes J, King A, Hardie J, Philips I. Evaluation of the Rapid ID 32A system for identification of anaerobic Gram-negative bacilli, excluding the *Bacteroides fragilis* group. Clin Microbiol Infect 1999; 5: 319-326.
- 171.** Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J Clin Microbiol 2000; 38: 3623-3630.
- 172.** Santala AM, Sarkonen N, Hall V, Carlson P, Jousimies-Somer H, Könönen E. Evaluation of four commercial test systems for identification of *Actinomyces* and some closely related species. J Clin Microbiol 2004; 42: 418-420.
- 173.** Lewis MA, MacFarlane TW, McGowan DA. A microbiological and clinical review of acute dentoalveolar abscess. Br J Oral Maxillofac Surg 1990; 28: 359-366.
- 174.** Siqueira JF Jr, Rôças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction. J Endod 2001; 27: 164-167.
- 175.** Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 94: 746-755.
- 176.** Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. J Clin Microbiol 2001; 39: 3282-3289.
- 177.** Pitt TL, Saunders NA. Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium. J Clin Pathol 2000; 53: 71-75.

178. Whelen AC, Persing DH. The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50: 349-373.
179. Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN, et al. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol* 1994; 65: 56-61.
180. Baumgartner JC, Bae KS, Xia T, Whitt J, David LL. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and polymerase chain reaction for differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *J Endod* 1999; 25: 324-328.
181. Nissan R, Makkar SR, Sela MN, Stevens R. Whole genomic DNA probe for detection *Porphyromonas endodontalis*. *J Endod* 2000; 26: 217-220.
182. Dymock D, Weightman AJ, Scully C, Wade WG. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 537-542.
183. Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO, Olsen I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: 191-196.
184. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Rosado AS. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of endodontic infections. *J Endod* 2005; 31: 775-782.
185. Oliveira JCM, Siqueira JF Jr, Rôças IN, et al. Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 14-18.

186. Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, van Poperin N, Hujoel PP. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? J Clin Microbiol 1992; 30: 418-426.
187. Sakamoto M, Tokeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. Microbiol Immunol 2001; 45: 39-44.
188. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. J Clin Periodontol 2002; 29: 638-644.
189. Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 3334-3340.
190. Boutaga K, Savelkoul PHM, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. J Periodontol 2007; 78: 79-86.
191. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiol Immunol 2005; 20: 211-215.
192. Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. Faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. J Endod 2006; 32: 715-721.
193. Sato T, Kuramitsu HK. Restriction fragment length polymorphism analysis of

- 16S ribosomal RNA genes amplified by polymerase chain reaction for rapid identification of cultivable oral treponemes. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 117-121.
- 194.** DiRienzo JM, Cornell S, Boehringer H. Use of randomly cloned DNA fragments for the identification of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 88-96.
- 195.** Tanner A, Maiden MFJ, Paster BJ, Dewhirst FE. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Periodontology* 2000 1994; 5: 26-51.
- 196.** Umemoto T, Nakazawa F, Hoshino E, Okada K, Fukunaga M, Namikawa I. *Treponema medium* sp. nov., isolated from human subgingival dental plaque. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 67-72.
- 197.** Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic sign and symptoms. *Int Endod J* 1994; 27: 291-298.
- 198.** Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996; 29: 69-75.
- 199.** Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 71-76.
- 200.** Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90: 600-608.
- 201.** Jacinto RC, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza Filho FJ.

- Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 285-292.
- 202.** Sousa ELR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Pinheiro ET, Teixeira FB, Souza Filho FJ. Bacteriological study of root canals associated with periapical abscess. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 332-339.
- 203.** Vianna ME, Horz H-P, Gomes BPFA, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 253-258.
- 204.** Kesavalu L, Holt SC, Ebersole JL. Virulence of a polymicrobial complex, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*, in a murine model. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 373-377.
- 205.** Kesavalu L, Walker SG, Holt SC, Crawley RR, Ebersole JL. Virulence characteristics of oral treponemes in a murine model. *Infect Immun* 1997; 65: 5096-5102.
- 206.** Foschi F, Izard J, Sasaki H, et al. *Treponema denticola* in disseminating endodontic infections. *J Dent Res* 2006; 85: 761-765.
- 207.** Willis SG, Smith KS, Dunn VL, Gapter LA, Riviere KH, Riviere GR. Identification of seven *Treponema* species in health and disease associated dental plaque by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 867-869.
- 208.** Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FRF, Santos KRN. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. *J Endod* 2004; 30: 638-643.

209. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri 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: 289-295.
210. Jung IY, Choi BK, Kum K-Y, et al. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infections. *J Endod* 2000; 26: 599-604.
211. Siqueira JF, Rôças IN, Uzeda M, Colombo AP, Santos KRN. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridisation for detection of selected endodontic pathogens. *J Med Microbiol* 2002; 51: 1090-1096.
212. Yilmazer S, Öztürk M, Arı Ş, Topal Sarıkaya A. Nükleik asit melezlemesine dayalı yöntemler. In Temizkan G, Arda N, eds. *Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler*. İstanbul: Nobel tıp kitap evleri, 2004: 121-159.
213. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 363-370.
214. Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol* 1998; 69: 1111-1118.
215. Sirinian G, Shimizu T, Sugar C, Slots J, Chen C. Periodontopathic bacteria in young healthy subjects of different ethnic backgrounds in Los Angeles. *J Periodontol* 2002; 73: 283-288.
216. Baumgartner JC, Siqueira JF Jr, Xia T, Rôças IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J*

- Endod 2004; 30: 141-144.
- 217.** Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000 2005; 38: 135-187.
- 218.** Siqueira JF Jr, Jung IY, Rôças IN, Lee CY. Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; 99: 641-647.
- 219.** Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Siqueira JF Jr. Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylotypes in endodontic abscesses from two geographic locations. J Endod 2006; 32: 1135-1138.
- 220.** Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, et al. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. J Endod 2006; 32: 937-940.
- 221.** Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. J Endod 2007; 33: 1049-1052.

EKLER**EK 1****ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ****SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ****ETİK KURUL BİLİMSEL ARAŞTIRMA VE TEZ BAŞVURU FORMU**

(GÖNÜLLÜLERİN BİLGİLENDİRİLMESİ VE RIZASININ ALINMASI
PROTOKOLÜ)

Tarih:.....

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

“Endodontik enfeksiyonlarda *Treponema Denticola*’nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi Kullanılarak Araştırılması” isimli klinik araştırma hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı / Soyadı ve İmzası:

Adresi: (varsa telefon no, faks no)

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı / Soyadı ve İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı / Soyadı ve İmzası:

EK 2

ANAMNEZ FORMU

Adı / Soyadı:

Yaşı:

Tarih:

Cinsiyeti:

Diş no:

Sistemik hastalığı: E ☐ H ☐Hamilelik durumu: E ☐ H ☐Antibiyotik kullanımı: E ☐ Ne kadar süredir? H ☐Kalıtsal hastalığı: E ☐ H ☐**Sübjektif Bulgular**Ağrının şekli: Yok ☐ Yaygın ☐ Lokalize ☐ Spontan ☐ Yansıyan ☐Ağrının şiddeti: Yok ☐ Orta derecede ☐ Şiddetli ☐Çiğnemede ağrı: Yok ☐ Orta derecede ☐ Şiddetli ☐Sıcakta ağrı: ☐Soğukta ağrı: ☐Ağrının süresi: Kısa ☐ Uzun süreli ☐

Diğer:

Objektif BulgularAğız dışı şişlik: E ☐ H ☐Ağız içi şişlik: E ☐ H ☐Lenf bezlerinde şişlik: E ☐ H ☐Elektrikli pulpa testi: Vital ☐ Nonvital ☐Termal uyarılara tepki: Yok ☐ Kısa süreli ☐ Uzun süreli ☐Palpasyona hassasiyet: E ☐ H ☐Perküsyona hassasiyet: Yok ☐ Orta derecede ☐ Şiddetli ☐Fistül varlığı: E ☐ H ☐Dişin periodontal durumu: Normal ☐ Mobil ☐ Diğer ☐

Dişeti cep derinliği:

Radyografik bulgular

- Normal ☐
- Periodontal aralıkta genişleme ☐
- Periapikal radyolüsensi ☐
- Periapikal radyopasite ☐
- Furkal radyolüsensi ☐
- Çürük ☐
- Önceden yapılmış kanal dolgusu ☐
- Diğer ☐

Teshis

- Normal pulpa ☐
- Reversible pulpitis ☐
- Irreversible pulpitis ☐
- Nekrotik pulpa ☐
- Normal periodonsiyum ☐
- Akut apikal periodontitis ☐
- Kronik apikal periodontitis ☐
- Akut apikal apse ☐
- Kronik apikal apse ☐
- Condensing osteitis ☐
- Diğer ☐