

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŞ HASTALIKLARI VE TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

**PERİAPİKAL LEZYONLU DİŞLERDE
ENTEROCOCCUS FAECALİS VE
CANDIDA ALBİCANS'IN BULUNMA SIKLIĞI VE
ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARININ TEST EDİLMESİ**

Dt. Aysin DUMANI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. H. Oğuz YOLDAŞ

Bu tez Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından DHF2006D1 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....

ADANA - 2008

KABUL VE ONAY FORMU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan **‘Periapikal Lezyonlu Dişlerde *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans*’ın Bulunma Sıklığı ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Test Edilmesi’** adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Doç.Dr.H.Oğuz YOLDAŞ

Çukurova Üniversitesi

İmza

Doç.Dr.M.Cem DOĞAN

Çukurova Üniversitesi

İmza

Doç.Dr.Haluk ÖZTUNÇ

Çukurova Üniversitesi

İmza

Prof.Dr.Tayfun ALAÇAM

Gazi Üniversitesi

İmza

Prof.Dr.Fatih KÖKSAL

Çukurova Üniversitesi

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince hem klinik hem de akademik düzeyde bilgilerini bizimle paylaşan, tezimin her aşamasında tavsiyeleri ve hoşgörüsüyle yol gösterici olan danışmanım Doç. Dr. H. Oğuz Yoldaş'a,

Tez izleme komitemdeki değerli hocalarım Doç. Dr. Haluk Öztunç ve Doç. Dr. Cem Doğan'a,

Doktora yeterlilik sınavımın ve tez jürimin değerli üyesi Prof. Dr. Tayfun Alaçam'a,

Tez çalışmalarım süresince bilgileriyle bize yol gösteren, laboratuvarlarında çalışma ortamı sağlayan ve yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen Ç.Ü. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a

Tez örneklerimin çalışılması sırasında her türlü yardımı gösteren Ç.Ü. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi M. Begüm KAYAR, Arş. Gör. Dr. Beril AKÇİMEN, Dt. Arzu ŞAHAN KİPALEV'e ve tezimin yazımı sırasında teorik ve pratik konularda desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Beril AKÇİMEN'e,

Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı kliniğinde hastaların kök kanallarından örnekler alırken her türlü yardımı gösteren Hemşiremiz Ayfer TOPAL'a,

Çalışmamın istatistik bölümünde yardımcı olan Ç.Ü. Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Gülşah SEYDAOĞLU'na,

Çalışmalarım sırasında bana her konuda destek olan A.Şehnaz İŞÇİ ve bölüm arkadaşlarıma,

Diş Hekimliği ve doktora eğitimim sırasında her zaman yanımda olan, anlayışını ve yardımlarını esirgemeyen eşim Emir Yakup DUMANI'ye,

Yaşamımın her anında olduğu gibi doktora eğitimim sırasında da desteklerini hiç eksik etmeyen sevgili annem Reyhan TOPUZ, babam Mehmet TOPUZ, ablam Arzum TOPUZ ve sevgili kardeşim Murat TOPUZ'a

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Polimikrobiyal Endodontik Enfeksiyonlar	4
2.1.1. Kök Kanal Mikroorganizmalarının Patojenitesi	6
2.1.2. Mikroorganizmalar arası etkileşim	7
2.1.3. Lipopolisakkarit ve Diğer Mikrobiyal Modulinler	8
2.1.4. Ekzotoksinler	8
2.1.5. Enzimler	9
2.2. Patojenite ve Histopatoloji	9
2.2.1. Başlangıç (Akut) Apikal Periodontitis	12
2.2.2. Kronik Apikal Periodontitis	14
2.2.3. Kistik Apikal Periodontitis	15
2.3. Extraradiküler Enfeksiyonlar	18
2.4. Başarısız Endodontik Tedaviler	20
2.5. Koronal Sızdırmazlık	22
2.6. Başarısız Endodontik Tedaviden Sonra Oluşan Enfeksiyonda Bulunan İnatçı Mikroorganizmalar	22
2.7. Enterokoklar	25
2.7.1. <i>E.faecalis</i>	27
2.7.1.1. <i>E.faecalis</i> 'in Birincil Enfeksiyonlarda Bulunma Sıklığı	27
2.7.1.2. <i>E.faecalis</i> 'in İkincil Enfeksiyonlarda Bulunma Sıklığı	29
2.7.1.3. Oral Enterokok Enfeksiyonları	31
2.7.2. <i>E.faecalis</i> 'in Yaşam ve Virülans Faktörleri	32

2.8. Candida	32
2.8.1. Genel Özellikler ve Sınıflandırma	32
2.8.2. Mantarların Morfolojik Özellikleri	33
2.8.3. Fungal Patojenitenin Mekanizması	34
2.8.3.1. Çeşitli Çevresel Koşullara Uyum Sağlayabilme	34
2.8.3.2.Çeşitli Yüzeyle Adezyon	34
2.8.3.3. Hidrolitik Enzimlerin Salınımı	35
2.8.3.4. Morfolojik Değişim	35
2.8.3.5. Biofilm Oluşumu	35
2.8.3.6. Konak Defansının İmmünomodülasyonu ve Defanstan Kurtulması	36
2.8.4. Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar	36
2.8.4.1. Birincil Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar	37
2.8.4.2. İkincil Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar	38
2.8.4.3. Oral Mantar Enfeksiyonları	39
2.8.5. Mantarların Dentinde Kolonizasyonu	39
2.8.6. Mantarların İzolasyonu	42
2.8.7. Mantarların Tanımlanması	42
2.8.8. Periradiküler Mantar Enfeksiyonları	43
2.9. Antibiyotiklerin <i>E.faecalis</i> 'e Etkisi	44
2.10. Antimikrobiyal Medikamentlerin <i>E.faecalis</i> 'e Etkisi	45
2.11. Antifungallerin <i>C.albicans</i> 'a Etkisi	47
2.12. Antimikrobiyal Medikamentlerin <i>C.albicans</i> 'a Etkisi	48
3. GEREÇ ve YÖNTEM	50
3.1. Tükürükten Örnek Alınması	51
3.2. Kök Kanalından Örnek Alınması	51
3.3. Örneklerin Kültür Yöntemi İle Değerlendirilmesi	52
3.4. Kök Kanallarından Elde Edilen <i>E.faecalis</i> ve <i>C.albicans</i> İzolatlarının Antibiyotik, Antimikotik ve Antimikrobiyallere Karşı Duyarlılıklarının Ölçülmesi	53
3.4.1. <i>E.faecalis</i> İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılığının Tespiti	54
3.4.2. <i>C.albicans</i> İzolasyonu ve Antimikotik Duyarlılığının Tespiti	55
3.5. Çalışmada Kullanılan Duyarlılık Testleri	55
3.5.1. Agar Dilüsyon Yöntemi	55
3.5.2. Strip Difüzyon Yöntemi	58

3.5.3. Agar Difüzyon Yöntemi	59
3.6. Örneklerin PCR Yöntemi İle Değerlendirilmesi	60
3.6.1. DNA Ekstraksiyonu	60
3.6.2. Amplifikasyon	62
3.6.2.1. <i>Enterokok</i> Genusu Amplifikasyonu	62
3.6.2.2. <i>E.faecalis</i> Amplifikasyonu	63
3.6.2.3. <i>C.albicans</i> amplifikasyonu	64
3.6.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme	64
3.6.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme İçin Kullanılan Tamponlar	64
3.6.3.1.1. 10xTBE Stok Tamponunun Hazırlanması	64
3.6.3.1.2. Yükleme Tamponu	65
3.6.3.2. Uygulama	65
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	66
4.BULGULAR	67
4.1. Konvansiyonel Kültür Yöntemiyle Elde Edilen Bulgular	67
4.2. PCR Yöntemiyle Elde Edilen Bulgular	68
4.3. Hem Kültür Hem PCR Yöntemiyle Aynı Anda Pozitif Çıkan Örneklerden Elde Edilen Bulgular	71
4.4. Kültür Yöntemi İle Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>E.faecalis</i> İzolatlarının Duyarlılık Testleri	72
4.4.1. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>E.faecalis</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı	72
4.4.2. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>E.faecalis</i> İzolatlarının İrrigasyon Solüsyonlarına Duyarlılığı	73
4.4.3. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>E.faecalis</i> İzolatlarının Pansuman Materyallerine Duyarlılığı	76
4.5. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>E.faecalis</i> İzolatlarının Duyarlılık Testleri	78
4.5.1. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>E.faecalis</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı	78
4.5.2. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>E.faecalis</i> İzolatlarının İrrigasyon Solüsyonlarına Duyarlılığı	79
4.5.3. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>E.faecalis</i> İzolatlarının Pansuman Materyallerine Duyarlılığı	80

4.6. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>C.albicans</i> İzolatlarının Duyarlılık Testleri	82
4.6.1. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>C.albicans</i> İzolatlarının Antimikotiklere Duyarlılığı	82
4.6.2. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>C.albicans</i> İzolatlarının İrrigasyon Solüsyonlarına Duyarlılığı	83
4.6.3. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>C.albicans</i> İzolatlarının Pansuman Materyallerine Duyarlılığı	85
4.7. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>C.albicans</i> İzolatlarının Duyarlılık Testleri	87
4.7.1. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>C.albicans</i> İzolatlarının Antimikotiklere Duyarlılığı	87
4.7.2. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>C.albicans</i> İzolatlarının İrrigasyon Solüsyonlarına Duyarlılığı	88
4.7.3. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen <i>C.albicans</i> İzolatlarının Pansuman Materyallerine Duyarlılığı	89
4.8. Birincil ve İkincil Enfeksiyonlu Hastalarda Tedaviden Sonra Oluşan Alevlenme Oranı	90
5.TARTIŞMA	91
5.1. Örnek Toplama	91
5.2. Kültür ve PCR Yöntemleri Arasındaki Farklılıklar	92
5.3. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerde <i>E.faecalis</i> Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi	95
5.4. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerde <i>E.faecalis</i> Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi	97
5.5. Oral Kavitede <i>E.faecalis</i> Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi	100
5.6. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerde <i>C.albicans</i> Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi	103
5.7. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerde <i>C.albicans</i> Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi	104
5.8. Oral Kavitede <i>C.albicans</i> Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi	106
5.9. Antibiyotiklerin <i>E.faecalis</i> İzolatlarına Etkisi	108
5.10. Antimikrobiyal Medikamentlerin <i>E.faecalis</i> İzolatlarına Etkisi	110
5.11. Antifungallerin <i>C.albicans</i> İzolatlarına Etkisi	113
5.12. Antimikrobiyal Medikamentlerin <i>C.albicans</i> İzolatlarına Etkisi	114
5.13. Antimikrobiyal Ajanın Aktivitesini Değerlendirmede Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması	117
5.14. Alevlenme Olguları	118

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	119
6.1. SONUÇLAR	119
6.2.ÖNERİLER	120
KAYNAKLAR	121
ÖZGEÇMİŞ	142

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Tedavi edilmeyen veya ortadan kaldırılmayan bir uyarın sonucu sağlıklı dokuda hastalık ilerlemesinin genel aşamaları	10
Şekil 2.2.	Birincil akut apikal periodontitis'in şematik görüntüsü	13
Şekil 2.3.	İkincil akut apikal periodontitis'in şematik görüntüsü	14
Şekil 2.4.	Periapikal gerçek kistin şeması	16
Şekil 2.5.	Periapikal cep kistin şeması	16
Şekil 2.6.	Dentin tubüllerindeki <i>E.faecalis</i> hücreleri	28
Şekil 2.7.	<i>E.faecalis</i> 'in Kültür ve PCR teknikleri kullanılarak bulunması	29
Şekil 2.8.	Mikroorganizmaların birincil ve ikincil endodontik enfeksiyonlarda bulunma sıklıkları	30
Şekil 2.9.	<i>C.albicans</i> hücrelerinin dentin üzerinde üremelerinin SEM görüntüsü	41
Şekil 3.1.	0,5 Mc Farland bulanıklık standardına eşdeğer yoğunlukta hazırlanan bakteri süspansiyonları	56
Şekil 3.2	<i>E.faecalis</i> üremesinin pozitif kontrolü için her örnekten antibiyotiksiz MHA besiyerine yapılan ekimlerin 37 °C de 24 saat inkübasyon süresinden sonra görülen üremeler	56
Şekil 3.3.	<i>C.albicans</i> üremesinin pozitif kontrolü için her örnekten antimikotiksiz SDA besiyerine yapılan ekimlerin 37 °C de 24 saat inkübasyon süresinden sonra görülen üremeler	57
Şekil 3.4.	Strip Difüzyon Testi	58
Şekil 3.5.	Agar Difüzyon Testi	59
Şekil 3.6.	Kuru ısı bloğu	60
Şekil 3.7.	Herolab Micro Cen 13 D santrifüj cihazı	61
Şekil 3.8.	Che bios optimum-one, uv-vis Spektrofotometre	62
Şekil 3.9.	Applied Biosystem 2720 Termal Döngü Cihazı	62
Şekil 3.10.	OWL Separation Systems Model elektroforez tankı	65
Şekil 4.1.	<i>E.faecalis</i> 97008 nolu suşun genus spesifik primerlerle yapılan amplifikasyonun elektroforez görüntüsü	68
Şekil 4.2.	<i>E.faecalis</i> 97008 nolu suşun tür spesifik primerlerle yapılan amplifikasyonun elektroforez görüntüsü	69

Şekil 4.3.	<i>C.albicans</i> 90028 nolu suşun tür spesifik primerlerle yapılan amplifikasyonun elektroforez görüntüsü	69
Şekil 4.4.	Hasta örneklerinde bulunan <i>Enterokok</i> PCR görüntüleri	70
Şekil 4.5.	Hasta örneklerinde bulunan <i>E.faecalis</i> 'in PCR görüntüleri	71
Şekil 4.6.	Hasta örneklerinde bulunan <i>C.albicans</i> 'ın PCR görüntüleri	71
Şekil 4.7.	Penisilin 4 µg/ml duyarlılık testi	73
Şekil 4.8.	5 nolu izolatın irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı	74
Şekil 4.9.	11 nolu izolatın irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı	74
Şekil 4.10.	7 nolu izolatın pansuman materyallerine duyarlılığı	77
Şekil 4.11.	Amfoterisin B 0,25 µg/ml duyarlılık testi	82
Şekil 4.12.	3 nolu izolatın irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı	84
Şekil 4.13.	6 nolu izolatın pansuman materyallerine duyarlılığı	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Cerrahi olmayan endodontik tedavi tekrarlarının başarı oranları	21
Çizelge 2.2.	Periradikuler hastalıkların değişik formlarıyla ilişkili patojenler	24
Çizelge 2.3.	Periapikal lezyonlu kanal tedavili dişlerdeki bakteriyolojik bulgular	25
Çizelge 2.4.	En önemli enterokok türleri ve yaşam ortamları	27
Çizelge 2.5.	Apikal periodontitise sahip kanal tedavili dişlerde <i>E.faecalis</i> sıklığını araştıran çalışmalar	31
Çizelge 2.6.	Birincil endodontik enfeksiyonlarda mantar bulunma sıklığını gösteren çalışmalar	38
Çizelge 2.7.	İkincil endodontik enfeksiyonlarda mantar bulunma sıklığını gösteren çalışmalar	39
Çizelge 3.1.	Tanısal faktörler	51
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan besiyerleri ve içerikleri	54
Çizelge 3.3.	Çalışmada kullanılan antibiyotik konsantrasyonları ve antibiyotikler için kullanılan solvent ve dilüentler	54
Çizelge 3.4.	Çalışmada kullanılan antimikotiklerin konsantrasyonları ve antimikotikler için kullanılan solvent ve dilüentler	55
Çizelge 3.5.	PCR şartlarında kullanılan oligonükleotid primer çiftleri	63
Çizelge 4.1.	Birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlerin tedavileri sırasında kök kanalından ve tükürükten alınan örneklerin Kültür sonuçları	68
Çizelge 4.2.	Birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlerin tedavileri sırasında kök kanalından ve tükürükten alınan örneklerin PCR sonuçları	70
Çizelge 4.3.	Hem kültür hem PCR yöntemiyle aynı anda pozitif çıkan örneklerden elde edilen bulgular	72
Çizelge 4.4.	Kullanılan antibiyotik konsantrasyonları	72
Çizelge 4.5.	Birincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen <i>E.faecalis</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi.	73
Çizelge 4.6.	Birincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen <i>E.faecalis</i> izolatlarının irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı	74
Çizelge 4.7.	İrrigasyon solüsyonları uygulamasından sonra izolatlarda oluşan üremeler	75
Çizelge 4.8.	Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler	76

Çizelge 4.9.	Birincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen <i>E.faecalis</i> izolatlarının pansuman materyallerine duyarlılığı	76
Çizelge 4.10.	Deney patlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler	78
Çizelge 4.11.	İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen <i>E.faecalis</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi	79
Çizelge 4.12.	İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen <i>E.faecalis</i> izolatlarının irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı	79
Çizelge 4.13.	Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler	80
Çizelge 4.14.	İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen <i>E.faecalis</i> izolatlarının pansuman materyallerine duyarlılığı	80
Çizelge 4.15.	Deney patlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler	81
Çizelge 4.16.	Kullanılan antimikotik konsantrasyonları	82
Çizelge 4.17.	Birincil enfeksiyonlardan elde edilen <i>C.albicans</i> izolatlarının antimikotik duyarlılık testi.	83
Çizelge 4.18.	Birincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen <i>C.albicans</i> izolatlarının irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı	83
Çizelge 4.19.	Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler	84
Çizelge 4.20.	Birincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen <i>C.albicans</i> izolatlarının pansuman materyallerine duyarlılığı	85
Çizelge 4.21.	Deney patlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler	86
Çizelge 4.22.	İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen <i>C.albicans</i> izolatlarının antimikotik duyarlılık testi	87
Çizelge 4.23.	İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen <i>C.albicans</i> izolatlarının irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı	88
Çizelge 4.24.	Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler	88
Çizelge 4.25.	İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen <i>C.albicans</i> izolatlarının pansuman materyallerine duyarlılığı	89

Çizelge 4.26. Deneş patlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler	89
Çizelge 5.1. Periradiküler lezyonlu kanal tedavili dişlerde <i>C.albicans</i> 'ın bulunma sıklığının karşılaştırılması	106

KISALTMALAR DİZİNİ

DNA:	Deoksiribonükleik asit
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Gr:	Gram
<i>E.faecalis</i> :	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>C.albicans</i> :	<i>Candida albicans</i>
CHX:	Klorheksidin
NaOCl:	Sodyum hipoklorit
EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
Ca(OH) ₂ :	Kalsiyum hidroksit
SF:	Serum Fizyolojik
G:	Gliserin
spp.:	Türleri
LPS:	Lipopolisakkarit
IL:	Interlökin
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör-alfa
Ig G:	Immun globulin G
Ig M:	Immun globulin M
C3:	Kompleman 3
SEM:	Tarayıcı Elektron Mikroskopi
TEM:	Transmission Elektron Mikroskopi
Ntr:	Nitrojen
Cya:	Adenilat siklaz
Crp:	Katabolit repressor protein
G+C:	Guanin+Sitozin
ATCC:	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
RNA:	Ribonükleik asit
rRNA:	Ribozomal RNA
RGD:	Arjinin-glisin-aspartik asit
Mg:	Magnezyum
Ca:	Kalsiyum
cfu:	Koloni oluşturma birimi

SDA:	Sabora dekstroz agar
MIC:	Minimum inhibitör konsantrasyon
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
MTAD:	Tetrasiklin asit ve deterjan karışımı
EGTA:	Etilenglikoltetraasetik asit
NaF:	Sodyum florid
PCR-RFLP:	PCR-Restriction Fragment length polymorphism
AP-PCR:	Arbitrarily Primed-PCR
ERIC:	Enterobacterial Repetitive İntergenic Consensus
PFGE:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
TMA:	Transkripsiyon aracılı amplifikasyon
NASBA:	Nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon
KAAA:	Kanamycin esculin azide agar
TSBV:	Triptiksoy serum bacitracin vancomycin

ÖZET

PERİAPİKAL LEZYONLU DIŞLERDE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* VE *CANDIDA ALBICANS*'IN BULUNMA SIKLIĞI VE ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARININ TEST EDİLMESİ

Bu çalışmanın amacı endodontik enfeksiyonlarda kök kanallarında ve tükürükte, *E.faecalis* ve *C.albicans*'ın varlığının kültür ve PCR yöntemleri ile araştırılmasıdır.

Mikrobiyolojik örnekler enfekte kök kanallı 100 hastanın (birincil enfeksiyon) 117 dişinden ve inatçı periapikal lezyona sahip kanal tedavili (ikincil enfeksiyon) 70 hastanın 114 dişinden elde edildi. Tükürük örnekleri her hastanın dil altı bölgesinden alındı.

E.faecalis, 117 nekrotik kanala sahip dişlerin 16 (%14) adedinde ve 114 başarısız kök kanal tedavili dişlerin 10 (%9) adedinde kültür yöntemi ile bulundu. Bu hedeflenen tür PCR yöntemi ile birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlerde sırasıyla 19 (%16) ve 11 (%10) adet bulundu.

C.albicans, 117 nekrotik kanala sahip dişlerin 20 (%17) adedinde ve 114 başarısız kanal tedavili dişlerin 10 (%9) adedinde kültür yöntemi ile bulundu. Bu hedeflenen tür PCR yöntemi ile birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlerde sırasıyla 23 (%20) ve 13 (%11) adet bulundu.

Tükürük örneklerinde ise *E.faecalis* birincil enfeksiyonlu dişlere sahip 100 hastanın 7 (%7)'sinde ve ikincil enfeksiyonlu dişlere sahip 70 hastanın 6 (%9)'sında kültür yöntemi ile bulundu. PCR yöntemi ile bu hedeflenen tür sırasıyla 6 (%6) ve 7 (%10) adet bulundu. *C.albicans* birincil enfeksiyonlu dişlere sahip 100 hastanın 15 (%15)'inde ve ikincil enfeksiyonlu dişlere sahip 70 hastanın 11 (%16)'inde kültür yöntemi ile bulundu. PCR yöntemi ile bu hedeflenen tür sırasıyla 17 (%17) ve 15 (%21) adet bulundu.

On sekiz *E.faecalis* ve 18 *C.albicans* izolatlarının antimikrobiyal ve antifungal ajanlara (*E.faecalis* izolatları için penisilin, vankomisin, spiramisin, kolistin ve *C.albicans* izolatları için amfoterisin B, nistatin, flukanazol ve ketokanazol) karşı duyarlılığı agar dilüsyon yöntemi ile değerlendirildi. Bu izolatların %5 NaOCl, %2,5 NaOCl, %17 EDTA ve %2 Klorheksidin solüsyonlarına antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için strip difüzyon yöntemi kullanıldı. İzolatların pansuman materyalleri olan Ca(OH)₂+Serum fizyolojik, Ca(OH)₂+Gliserin ve Ca(OH)₂+Klorheksidin'e olan duyarlılığı ise agar difüzyon yöntemi ile değerlendirildi. SF bütün testlerde pozitif kontrol olarak kullanıldı.

E.faecalis izolatlarının hepsi penisilin, vankomisin, spiramisin, kolistin'e direnç gösterdi. Irrigasyon solüsyonlarından %2 Klorheksidin *E.faecalis*'i öldürmede en etkili olan solüsyonu olduğu, bununla birlikte %5 NaOCl diğer solüsyonlara göre en geniş inhibisyon zonunu oluşturduğu saptandı. Pansuman materyali olarak Ca(OH)₂+Klorheksidin patı *E.faecalis* izolatlarını öldürmede Ca(OH)₂+Serum Fizyolojik ve Ca(OH)₂+Gliserin patlarına göre daha etkili bulundu.

C.albicans izolatların hepsi ketokanazole direnç gösterdi. Solüsyonlardan %5 NaOCl *C.albicans*'ı öldürmede daha etkili olduğu ve diğer solüsyonlara göre daha büyük çapta inhibisyon zonu oluşturduğu belirlendi. Ca(OH)₂+Gliserin patı

diğer patlara göre hem *C.albicans*'ı ödürmede hem de inhibisyon zonu oluşturmada daha üstün bulundu.

Tedavi sonrası hastalarda görülen alevlenme reaksiyonları araştırıldı. Nekrotik kanallı 100 hastanın 4 (%4)'ü ve inatçı periapikal lezyona sahip başarısız kanal tedavili dişlere sahip 70 hastanın 6 (%9)'sında 2 gün içinde şiddetli ağrı olduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: Birincil kök kanal enfeksiyonu, İkincil kök kanal enfeksiyonu, *E.faecalis*, *C.albicans*, Antimikrobiyal maddeler, İrrigasyon solüsyonları

ABSTRACT

THE PREVALENCE OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS* AND *CANDIDA ALBICANS* IN TEETH WITH PERIAPICAL LESIONS AND THE ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF THESE ISOLATES

The aim of this study was to investigate the presence of *E.faecalis* and *C.albicans* in endodontic infections and in saliva by culture and PCR methods.

Microbial samples were obtained from 117 teeth in 100 patients with infected root canals (primary infection) and 114 teeth with 70 patients with root-filled teeth with persisting periapical lesions (secondary infection). Saliva samples were obtained under tongue.

E.faecalis was cultured from 16 (%14) of 117 necrotic canals and 10 (%9) of 114 re-treated root canals. PCR detection identified the target specie in 19 (%16) and 11 (%10) of primary and secondary infections respectively.

C.albicans was cultured from 20 (%17) of 117 necrotic canals and 10 (%9) of 114 re-treated canals. PCR detection identified the target specie in 23 (%20) and 13 (%11) of primary and secondary infections respectively.

From the saliva samples, *E.faecalis* was cultured from 7 (%7) of 100 patients with primary infections and 6 (%9) of 70 patients with secondary infections. PCR detection identified the target specie respectively 6 (%6) and 7 (%10). *C.albicans* was cultured from 15 (%15) of 100 patients with primary infections and 11 (%16) of 70 patients with secondary infections. PCR detection identified the target specie respectively 17 (%17) and 15 (%21).

The susceptibility of 18 *E.faecalis* and 18 *C.albicans* isolates to antimicrobial and antifungal agents (penicillin, vancomycin, spiramisin, colistin for *E.faecalis* and amphotericin B, nistatin, fluconazole, ketoconazole for *C.albicans*) was determined by agar dilution method. In vitro antimicrobial activity of %5 NaOCl, %2,5 NaOCl, %17 EDTA and %2 CHX against *E.faecalis* and *C.albicans* isolates were tested by strip diffusion method. In vitro susceptibility of *E.faecalis* and *C.albicans* isolates to three intracanal medicaments: Ca(OH)₂+Steril saline solution, Ca(OH)₂+Glycerin and Ca(OH)₂+Chlorhexidine were evaluated by agar diffusion method. Saline was used as the positive control for all study groups.

All tested *E.faecalis* isolates showed resistance to penicillin, vancomycin, spiramisin, colistin. Through irrigation solutions, %2 Chlorhexidine is more effective in killing *E.faecalis* but %5 NaOCl produced larger inhibition zone than %2,5 NaOCl, %17 EDTA and %2 Chlorhexidine. For intracanal medication, CHX+Ca(OH)₂ worked efficiently in killing *E.faecalis* isolates than Ca(OH)₂+Steril saline solution, Ca(OH)₂+Glycerin.

For *C.albicans*, all tested isolates were susceptible to amphotericin B, nistatin, fluconazole. And 18 of the root canal isolates showed resistance to ketoconazole. %5 NaOCl is more effective in killing and produced larger inhibition zone than %2,5 NaOCl, %17 EDTA and %2 Chlorhexidine. Ca(OH)₂+Glycerin intracanal medication was better in killing *C.albicans* isolates and produced larger inhibition zone than other Ca(OH)₂ medicaments.

The flare up rates was also investigated. Four (%4) of the 100 patients with necrotic canals and 6 (%9) of the 70 patients with root-filled teeth with persisting periapical lesions had severe pain in 2 days.

Key Words: Primary root canal infection, Secondary root canal infection, *E.faecalis*, *C.albicans*, Antimicrobial medicaments, Irrigation solutions.

1. GİRİŞ

W.D.Miller 1860 yılında pulpa hastalığında bakterilerin varlığını araştıran ilk araştırmacıdır¹. Kakehashi et al.² pulpa ve periradiküler hastalıklara bakterilerin neden olduğunu kanıtlayan çalışmayı 1965 yılında yayınlamıştır. Bu araştırmacılar farelerde ağız florasına açık olan pulpada, pulpa nekrozu ve periradiküler lezyon oluştuğunu ancak germ-free farelerde pulpa ağız ortamına açık olduğu halde herhangi bir patolojik değişiklik oluşmadığını kanıtlamışlardır. Sonuç olarak sadece oral floraya sahip konvansiyonel farelerin diş köklerinde lezyon oluşmuştur. Möller et al.³ maymun dişleri üzerinde yaptıkları bir araştırmada, enfekte olmuş devital pulpaların periapikal lezyonlara sebep olduğunu bulmuşlardır.

Ağız kavitesinden 300'den fazla çeşitte bakteri izole edilirken, endodontik enfeksiyonlardan sınırlı sayıda bakteri izole edilmektedir⁴. Bu mikroorganizmalardan en çok görülenler *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteriodes* ve *Lactobacillus* cinsleridir^{4,5}. Kültür çalışmalarındaki bazı yetersizliklerinden dolayı, ağız mikroflorasının %50'si üretilmemektedir⁶. Bu yüzden kültive edilemeyen organizmalar da endodontik enfeksiyonda bulunabilmekte ve lezyonların patogeneğinde rol oynayabilmektedir. Kültür metotlarının gelişimiyle birlikte, endodontik enfeksiyonlarda saptanan mikroorganizma türünün 3 ile 12 arasında değiştiği görülmüştür.

Endodontik enfeksiyonlarda bulunan mikroorganizmaların kültür dışında tespit edilmesine yarayan tekniklerden birisi de polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur. Nükleik asit amplifikasyon yöntemi olan PCR, klinik materyallerde bulunan veya izole edilen etkenlere ait DNA'ların veya bazı spesifik sekansların in vitro olarak amplifikasyonlarını amaçlar. PCR esaslı arama metodu, kültürde üretilen veya üretilmeyen mikroorganizmaların yüksek duyarlılık ve özgüllükte hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır. PCR tekniyle sadece hedeflenen bakteri bulunmaktadır ama örneklerde bulunan toplam bakteri sayısı bilinmemektedir.

Kök kanal enfeksiyonları zorunlu ve fakültatif anaerobik bakterilerin baskın olduğu karışık ve semispesifik enfeksiyonlardır⁷. Gram negatif [Gr negatif], fakültatif ve zorunlu anaerob mikroorganizmalarla ilişkili kök kanal enfeksiyonları farklı klinik semptomlar göstermektedir. Birincil kök kanal enfeksiyonu, nekrotik pulpalı dokuda

mikroorganizmaların kolonize olmasıyla oluşmaktadır. Nekrotik pulpa, baskın olarak anaerobik, birbirine neredeyse eşit oranlarda Gr negatif ve Gram pozitif [Gr pozitif], her kanalda 4-7 tür mikroorganizma kombinasyonu ile karakterize polimikrobiyal flora içermektedir⁸. Buna karşı periapikal lezyona sahip kanal tedavili dişlerde saptanan flora, predominant olarak Gr pozitif ve hemen hemen eşit oranlarda fakültatif ve zorunlu anaerop mikroorganizmalarla karakterize bir monoenfeksiyon olabilmektedir⁹.

Enterococcus faecalis (*E.faecalis*) ve *Candida albicans* (*C.albicans*) ağız kavitesindeki en dirençli mikroorganizmalardır^{10,11} ve bunlar kök kanal sisteminde zor şartlarda bile yaşamlarını sürdürebilmektedir¹². *C.albicans*, incelenen deney modellerinde en sık görülen ve en virulent *Candida* türüdür. Virulans faktörlerin değişkenliği sayesinde *C.albicans* dentine tutunabilmekte ve hatta penetre olabilmektedir. Enfekte kök kanallarında mantarların bulunma oranı %1 ile %17 arasında değişiklik göstermektedir^{13,14}. Bu mikroorganizmaların kök kanal sisteminden uzaklaştırılmasında bazı güçlükler yaşanabilmektedir.

E.faecalis, fakültatif anaerop Gr pozitif koktur ve tedaviye dirençli apikal periodontitisin en çok görülen etkeni olarak kabul edilmektedir^{9,11}. *E.faecalis* birincil endodontik enfeksiyonlarda %4-40 oranında¹⁵, inatçı periapikal lezyonlarda ise daha yüksek sıklıkta bulunmaktadır. Bu mikroorganizmanın inatçı periapikal lezyonlarda bulunma ihtimali birincil enfeksiyonlarda bulunma ihtimaline göre 9 kat fazladır¹⁵. Periradiküler lezyonlu kanal dolgulu dişlerde *E.faecalis*'in görülme olasılığı, çalışmalarda %11.5'dan %77'ye kadar değişen oranlarda bulunmuştur^{9,11,15,16,17,18,19}. *E.faecalis* farklı toplumlarda farklı oranlarda bulunmaktadır. Prevalanstaki bu değişkenlik coğrafi bölgelerden, beslenme alışkanlığından, önceki veya yeni yapılan tedavi sırasında asepsis derecesinden, restorasyonun kuronal sızıntısından, kullanılan primerlerin hassasiyet farklılığından kaynaklanabilmektedir. Ülkemizde bu tür mikroorganizmaların kök kanallarında ve ağızda bulunma oranları ile ilgili yapılan çalışmalar son derece sınırlıdır.

Sadece birkaç çalışma enterokokların ağız kavitesinde bulunmasına odaklanmıştır. *E.faecalis* enterokok çeşitlerinden en sık izole edilen türdür²⁰. Jett et al.²¹ göre enterokoklar gastrointestinal sistem, vajina ve ağız kavitesinde normal flora elemanı olarak bulunan mikroorganizmalardır. Williams et al.²² yaptıkları bir çalışmada 206 vakanın %21.8'inin tükürüğünde enterokok bulmuşlardır.

Endodontik irrigasyon solüsyonlarının etkinliğiyle ilgili çeşitli çalışmalarda sıklıkla *E.faecalis* denenmiştir^{23,24} ve birçok mikroorganizmaya toksik olan kimyasal ajanlara direnç geliştirmiştir. Benzer çalışmalar *Candida* türleri için de yapılmaktadır ve standart kök kanal ilaçlarına dirençli olduğu bilinmektedir²⁵.

Klorheksidin (CHX) ve Sodyum Hipoklorit (NaOCl) irrigasyon ve kanal içi pansuman materyali olarak diş hekimliğinde kullanılmaktadır. CHX geniş spektrumda mantarlar, Gr negatif ve Gr pozitif bakteriler üzerine etkilidir²⁶. NaOCl'ün doku çözücü özelliği bulunmaktadır ve kök kanallarındaki mikroorganizmaları yok etmekte etkilidir^{23,27}.

Etilen diamin tetraasetik asitin (EDTA) antimikrobial etkinliği tarif edilmiştir ama günümüzde direkt temas testinde, diğer endodontik irrigasyon solüsyonları ile karşılaştırıldığında mantarları öldürme yeteneği tam olarak bilinmemektedir²⁸. EDTA'nın antibakteriyel etkisi azdır. Ancak, smear tabakasının inorganik kısmını uzaklaştırarak diğer irrigasyon solüsyonlarının dentin tübüllerine girişine yardım etmektedir²⁹.

Kalsiyum hidroksitin (Ca(OH)₂) etkili sıvı dezenfektanlarla birleşimi gelişmiş bir pansuman sağlamaktadır. Bu artan antimikrobial spektrum *C.albicans* gibi inatçı mikroorganizmalara etki etmektedir³⁰. Ca(OH)₂'in NaOCl veya CHX solüsyonlarıyla karışımı sıvı Ca(OH)₂ süspansiyonlarının alkalın kapasitesini sürdürmektedir ve dentin tübüllerini dezenfekte etme etkinliğini artırmaktadır²⁵.

Çalışmamızın amacı Adana ve çevre illerden kanal tedavisi ve kanal tedavisi tekrarı için gelen hastaların dişlerinin kök kanallarından ve dil altından alınan örneklerden *Enterococcus*, *E.faecalis* ve *C.albicans*'ın bulunma sıklığını Kültür ve PCR yöntemi ile araştırmak ve kök kanallarından elde edilen *E.faecalis* ve *C.albicans* izolatlarının antibakteriyel (Penisilin, Vankomisin, Spiramisin, Kolistin) ve antimikotik (Amfoterisin B, Nistatin, Flukonazol, Ketokanozol) ajanlar ve %5 NaOCl, %2,5 NaOCl, %17 EDTA ve %2 CHX solüsyonlarına ve Kalsiyum hidroksit-Serum Fizyolojik (Ca(OH)₂-SF), Kalsiyum hidroksit-Gliserin (Ca(OH)₂-G) ve Kalsiyum hidroksit-CHX (Ca(OH)₂-CHX) patlarına karşı duyarlılıklarının tespiti amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polimikrobiyal Endodontik Enfeksiyonlar

Nekrotik kök kanalında mikroorganizmaların kolonizasyonu birçok faktörden etkilenmektedir. Bunlar kök kanalındaki oksijen miktarı, besinlerin girişinin elde edilebilirliği (redox potansiyeli), bakteriyel sinerjizm, mikroorganizmalar arasında rekabet ve konak savunma sistemidir^{8,31}.

Sundqvist et al.³² nekrotik pulpal çürüksüz dişlerin kök kanallarını araştırdıkları çalışmada, bakterilerin %90'ından fazlasını zorunlu anaeroplara oluşturduğunu bildirmektedir. Baumgartner ve Falkler³³ yaptıkları çalışmada, çürükle ekspoz olan dişlerin apikal 5 mm'sinden kültive edilen zorunlu anaeroplara, bakterilerin %67'sini oluşturduğunu bildirmişlerdir. Mikroorganizmalar enfeksiyonun zamanına ve periradikuler hastalıkların tipine bağlı olarak farklılaşmaktadır. Mikroorganizma çeşitlerinin büyük kısmı kronik periradikuler lezyonla ilişkiliyken sınırlı bir kısmı ise akut apikal periodontitis ve akut periradikuler abse gibi semptomatik periradikuler hastalıklarla ilişkilidir^{33,34}.

Kök kanal enfeksiyonlarında bulunan mikroorganizma popülasyonu statik değildir ve zamanla değişim göstermektedir. Fabricus et al.^{35,36} maymunların kök kanallarında bulunan mikroorganizmaları araştırmışlardır. Bu çalışmada hayvanların kök kanalları endojen oral bakterilerle enfekte edilmiştir ve sonra kapatılıp 1080 gün beklenmiştir. Sonuçlar zamanla anaerobik bakterilerin baskın hale geldiğini göstermiştir. 1080 gün sonra, kanallardan kültive edilen mikroorganizmaların %98'inin zorunlu anaeroplara olduğu bulunmuştur^{35,36}. Doku sıvısı, nekrotik pulpa dokusu, düşük oksijen gerilimi ve bakterilerin yan ürünleri, hangi bakterinin baskın olduğunu belirlemektedir. Bazı bakteriyel metabolitler diğer bakteriye antagonist olabilmektedir. Buna ek olarak bazı bakteri çeşitleri bakteriosin üretmektedirler ve bir çeşit tarafından üretilen proteinler diğer çeşit bakterinin ortamda olmasını önleyebilmektedir.

Genel olarak birincil kök kanal enfeksiyonlarında kompleks ve anaerobik bakteriler baskındır. Baskın çeşitler *Bacteriodes*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* ve *Campylobacter*'dir. Fakültatif ve mikroaerofilik streptokoklar da birincil enfeksiyonlarda sıklıkla bulunmaktadır⁷.

Birincil enfeksiyonda bulunmayan mikroorganizmalar tedavi sırasında, randevular arasında, tedavi sonrasında kök kanal sistemine girebilmekte ve intradikuler enfeksiyona neden olabilmektedir. Tedavi sırasında kök kanal sistemine yeni mikroorganizmaların girmesi genellikle plak kalıntıları, diş taşı ve çürükle, rubber damden kaynaklanan sızıntıyla, kanal aletlerinin veya kanal içinde kullanılan irrigasyon solüsyonlarının kontaminasyonu ile gerçekleşen aseptik zincirin ihlali yüzünden olmaktadır³⁷.

Pinherio et al¹⁷. yaptıkları bir çalışmada inatçı periapikal lezyonlu 60 kanal dolgululu dişin 51 tanesinden mikroorganizmalar elde etmiştir. Çoğu vakada kanal başına bir veya iki tür bulunmuştur. İzole edilen tüm bakteri türlerinin %57.4' ü fakültatif anaeroblar, %83.3' ü Gr pozitif türlerdir. Bu bulgular %58 ve %69 fakültatif anaerob ve %87 ve %74.3 Gr pozitif mikroorganizma bulan Sundqvist⁹ ve Molander¹¹'in çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir.

Çevresel etkenler tedavi sırasında ve sonrasında kök kanal sisteminde işlev göstermekte ve bazı mikroorganizmaların yaşaması için ortam oluşturmaktadır. Bu yüzden bazı mikroorganizma çeşitlerinin kök kanal sistemindeki başarısızlıkla ilişkisi bulunmaktadır. İnatçı ikincil enfeksiyonlarda mikroorganizmalar tek çeşittir veya birincil enfeksiyonlarla karşılaştırıldığında daha az çeşitlilik göstermektedir. Gr pozitif bakteri inatçı enfeksiyonlarda dominanttır¹¹. Mantarlar da birincil enfeksiyonlara göre ikincil enfeksiyonlarda daha yüksek oranda bulunmaktadır⁹.

Siyah pigmentli bakteriler odontolojik orijinli akut abselerden izole edilmekte ve akut semptomların patogenezinde aktif rol oynamaktadır³⁸. Gr negatif bakterilerden, özellikle *porphyromonas* ve *prevotella*, siyah pigmentli bakterilerdir. Bazı siyah pigmentli bakterilerden *peptostreptokoklar*, *peptokoklar*, *fusobacterium spp.*, *eubacterium spp.* ve *actinomyces spp.* klinik bulgu ve semptomlar göstermektedir³⁹. Ama herhangi bir bakteri çeşidi ve oluşturduğu endodontik enfeksiyon şiddeti arasında bir korelasyon bulunmamaktadır. Bu, endodontik enfeksiyonun polimikrobiyal doğası ve bakteri veya patojenik etkiyi artıran virülans faktörleri arasındaki sinerjik ilişki kaynaklanmaktadır.

2.1.1. Kök Kanal Mikroorganizmalarının Patojenitesi

Kök kanalını enfekte eden bir mikroorganizmanın, periapikal inflamasyonu başlatma potansiyeli bulunmaktadır. Bununla birlikte bireysel çeşitlerin virülansı ve patojenitesi değişkendir ve diğer mikroorganizmaların ortamda bulunmasından etkilenmektedir.

Endodontik patojenlerin hastalık yapabilmesi için gerekli olan şartlar şunlardır:

1. Mikroorganizmalar periradikuler hastalığı başlatıp sürdürebilmesi için yeterli sayıda bulunmalıdır.
2. Mikroorganizmalar kök kanal enfeksiyonu oluşturabilmesi için virülans faktörlere sahip olmalıdır.
3. Kök kanal sistemine uzamsal yerleşmiş mikroorganizmalar virülans faktörleriyle periapikal dokulara geçip patojen hale gelebilmelidir.
4. Kök kanal ortamı, mikroorganizmaların yaşamasına ve çoğalmasına izin vermeli ve sinyal salgılayarak virülans genleri uyarabilmelidir.
5. Konak periradikuler dokularda enfeksiyonun hızını azaltarak savunma stratejisini başlatabilmeli ve bu durum doku hasarına yol açabilmelidir⁷.

Etkili adaptasyon mekanizmalarına sahip bakteri yeni çevresel ve biyolojik ortamlara uyum sağlayabilmektedir. Mikroorganizmaların oluşturduğu biofilm, mikroorganizma topluluğunun katı yüzeye absorbe edildiği ve genel matrikse iyice yerleştiği bir yapıdır⁴⁰. Bakteri biyofilm olarak ürerse, bakterinin değişen genetik ve metabolik gelişimi kompleks matriksle birlikte olmaktadır. Ayrıca antimikrobiyal ajanların girişini ve aktivasyonunu önlemekte⁴¹ ve antibiyotik direnci planktonik hücrelere göre 1500 kat daha fazla olmaktadır⁴². Organizmaların kolonizasyonu olumsuz çevre ve besin durumlarına karşı koruma oluşturmaktadır.

Kemomekanik tedaviden sonra kök kanalının çevresel ortamı; azalan oksijen gerilimi, sınırlı besin bulunabilirliği ve antimikrobiyallerin bulunması kök kanal sisteminde mikroorganizmaların sayı ve tür olarak azalmasına yol açmaktadır⁹. Kalan bakteri için besin kaynakları ağız kavitesinden, dejenere olan bağ dokusundan, dentinal tubül içeriklerinden, periapikal dokulardan gelen serum benzeri sıvıdan oluşabilmektedir⁴³.

2.1.2. Mikroorganizmalar Arası Etkileşim

Mikroorganizmalar arasındaki etkileşim ekolojik düzende önemli bir rol oynamaktadır ve endodontik ortama uyumlu polimikrobiyal floranın oluşumunu sağlamaktadır⁸. Fabricus⁴⁴ çalışmasında, deney maymunlarının periapikal lezyonlu dişlerinin kök kanallarından izole edilen bakterileri (*Prevotella oralis* ve 11 diğer çeşit) farklı kombinasyonlarda veya tek çeşit olarak diğer maymunların kök kanallarına inoküle etmiştir. Tek bakteriyel çeşit inoküle edildiğinde, sadece hafif apikal periodontitis gelişmiştir. Kombinasyon halinde verildiğinde, aynı bakteri çeşidi daha şiddetli periapikal reaksiyonlar oluşturmaktadır.

F.nucleatum endodontik alevlenmelerdeki anahtar mikroorganizma olarak kabul edilmektedir. Villanueva⁴⁵ yaptığı çalışmada, *F.nucleatum* şiddetli ağrı grubundaki hastalarda bulunmuştur. Bu şiddetli ağrı grubundaki dişlerden aynı zamanda *prevotella* ve *porphyromonos* türleri de izole edilmiştir. Akut endodontik lezyonla ilişkili diğer mikroorganizmalar, *F.nucleatum*'un bulunduğu az semptomlu dişlerden elde edilmiştir⁴⁶. *F.nucleatum*'un, *prevotella* ve *porphyromonas* türleri ile birleşimi halinde bulunması endodontik alevlenmedeki risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Ve bunların sinerjik etkisi periapikalinde lezyon olan dişleri daha kötü hale getirmektedir. *Porphyromonas* türlerinin *F.nucleatum*la birlikte yaptığı aktivasyon desteğinde, Feuille et al.⁴⁷, farede lezyon model yardımıyla *F.nucleatum*un *P.gingivalis*le birlikte yumuşak doku yıkımında sinerjik etki gösterdiğini ve bunun sonucunda dişin nekroz olduğunu rapor etmişlerdir.

Dahlen et al.⁴⁸'nin, yaptıkları çalışmada enfekte maymun dişlerinin çürük kuronlarında sekiz bakteri çeşidi izole edildiği bildirilmiştir. Bunlar mikroorganizmaların farklı çeşitlerinin birleşmesine bağlı olarak farklı iltihabi cevapları meydana getirmektedir. *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacteriodes oralis*, *Fusobacterium necrophorum*'un karışımı bakteriler arasında en etkili olan karışımdır ve şiddetli lezyonlara neden olmaktadır. Halbuki diğer kombinasyonlarda veya tek başlarına bu mikroorganizmalar yaşayamamaktadır ve daha az enflamasyon oluşturmaktadır. Bu faktörler endodontik enfeksiyondaki sinerjinin etkisine açıklık getirmektedir⁴.

Endodontik flora ekolojisini etkileyen mikroorganizmalar arasındaki etkileşimler pozitif veya negatif ilişkili olabilirler. Bunun sonucunda bazı mikroorganizmalar kök

kanal florasında girişteki besin ve metabolik çevreden etkilenebilirler. Pulpa enfeksiyonunun erken evreleri sırasında fakültatif anaeroplara mikroflorada baskındır³⁵ ve bulunan oksijeni kullanıp, endodontik oksijen kısmi basıncını düşürerek⁴⁹ zorunlu anaeroplara üremesini sağlamaktadır. Besin olarak, mikroorganizmaların bazı çeşitlerinin metabolik yıkım ürünleri, diğer çeşitler için besin zincirinin bir kısmını oluşturabilmektedir⁵⁰.

2.1.3. Lipopolisakkarit ve Diğer Mikrobiyal Modulinler

Robert Koch'un öğrencisi olan Richard Pfeiffer⁵¹, endotoksini yüksek olarak piyojenik, termotabile makromolekül olarak tanımlamıştır. Bu, lipopolisakkarit (LPS) olarak adlandırılmıştır. Bununla birlikte endotoksin yanlış bir adlandırmadır çünkü LPS Gr negatif organizmanın hücre duvarının en dış tabakasının integral kısmı oluşturmaktadır. LPS bakterinin ölümünden sonra salgılanmaktadır, çoğalma ve üreme aşamasında az miktarlarda yayılmaktadır. LPS'in patolojik etkisi endotelial hücreler ve makrofajlar arasındaki ilişki sonucu olmaktadır. Çoğu Gr negatif bakterinin LPS'i, Toll-4 yüzey reseptörlerine tutunmaktadır ve endotelial hücrelere, adezyon moleküllerinin ve interlökinlerin (IL) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) gibi birkaç moleküler mediatörün salgılanması için sinyal göndermektedir⁵². TNF- α LPS'in zarar veren etkilerini oluşturmakta birincil mediatördür. TNF- α deney hayvanlarına verildiğinde LPS'nin neden olduğu ölümcül şoka neden olmaktadır.

LPS periapikal lezyonlu dişlerin dentin duvarlarından ve kök kanallarından elde edilen örneklerde bulunmuştur. Gr negatif organizma endodontik floraya baskın olduğu için, apikal kök kanalında çoğaldıktan ve öldükten sonra LPS salarlar ve LPS apikal foramenden periapikale ulaşarak apikal periodontitisi başlatmakta ve sürdürmektedir⁵³.

LPS, memeli hücrelerinde sitokin üretimine neden olan tek bakteriyel degradasyon ürünü değildir. Bakteriden kaynaklanan çoğu proteinler, bazı karbonhidratlar ve yağlar, modulinlerin yeni sınıfı olarak belirlenmektedir ve sitokin işlevinin ve konak doku patolojisinin oluşmasına neden olmaktadır⁵⁴.

2.1.4. Ekzotoksinler

Endotoksinler gibi olmayan ekzotoksinler yaşayan mikroorganizmalar tarafından salgılanan antijenik, nonpiyojenik, termolabil polipeptidlerdir ve bunlar toksoidlere

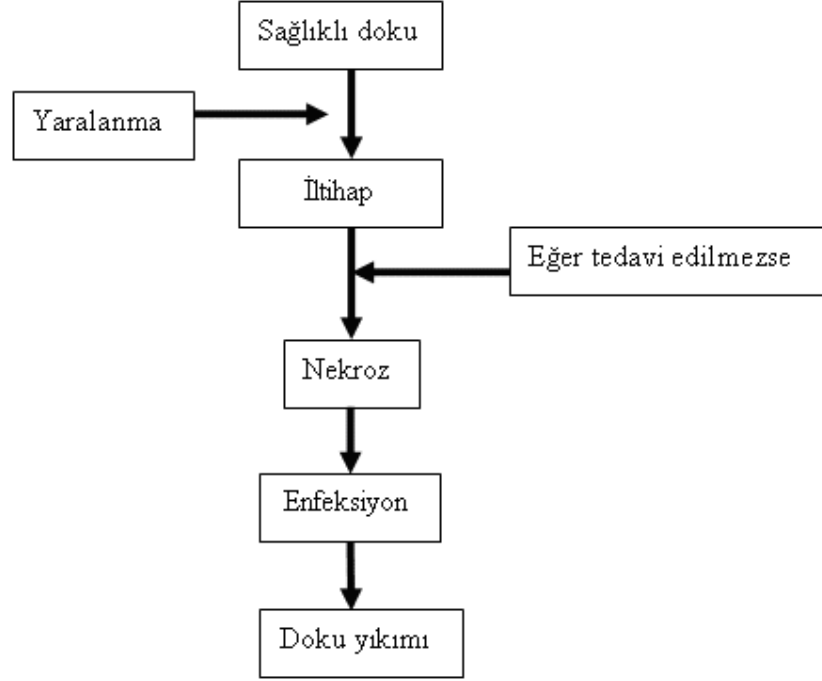
dönüşebilirler. Lökotoksin, marjinal periodontitisin kesin tiplerinin patogeneziyle ilişkili iyi bilinen bir ekzotoksindir. Lökosit hücre membranlarında küçük delikler oluşturup hücrenin lizisine neden olmaktadır⁵⁵. Lökotoksin *Fusobacterium necrophorum*⁵⁶ ve *Actinobacillus actinomycetemcomitans*⁵⁷ çeşitleri tarafından üretilir. Bununla birlikte *fusobacterium* türlerinden, *F.nucleatum* en sık rastlanan endodontik patojendir ve bu mikroorganizma herhangi bir ekzotoksin üretmez. *A.actinomycetemcomitans* yüksek miktarda kapnofilik veya karbondioksit seven bir organizmadır ama kök kanal ortamında yaşayamamaktadır. Bu yüzden, ekzotoksinler endodontik floranın patojenitesinde önemli bir role sahip değildir.

2.1.5. Enzimler

Endodontik mikroorganizmalar kollejenaz, hyaluronidaz, fibrinolizinler ve proteazlar gibi çeşitli enzimleri üretirler. Bu enzimler direkt olarak toksik değildir ama konak dokusundaki organizmaların yayılmasına yardım etmektedir. Mikroorganizmalar kan pıhtısı ve diğer konak savunmasıyla ilişkili çeşitli plazma proteinlerini yıkan enzimler üretmektedirler. Bazı *porphyromonas* ve *prevotella* türleri, özellikle Ig G ve Ig M plazma proteinlerini yıkmaktadırlar⁵⁸. C3 kompleman faktörü, hem humoral hem de fagositik konak savunması için gerekli opsoninler olduğu için önemlidir.

2.2. Patojenite ve Histopatoloji

Bir dokuda bir uyarının veya iritanın uzaklaştırılmaması veya tedavi edilmemesi sonucunda ilk oluşan doku reaksiyonu inflamasyondur. Bunu nekroz ve sonrasında oluşan enfeksiyon takip etmektedir ve en sonunda doku kaybı oluşmaktadır. Hastalığın ilerlemesine, aşırı soğuk nedeniyle ayak parmağının soğuk ısırmasının tedavi edilmemesiyle ayağa giden kan akışını azalması örnek olarak verilebilir. Sonunda tedavi edilmeyen ayak parmağında gangren oluşur ayak parmağının kaybedilmesine yol açar. Tedavi edilmeyen veya ortadan kaldırılmayan bir uyarın sonucu dokudaki hastalık ilerlemesinin genel aşamaları Şekil 2.1’de şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.1: Tedavi edilmeyen veya ortadan kaldırılmayan bir uyarın sonucu sağlıklı dokuda hastalık ilerlemesinin genel aşamaları

Pulpa hastalığının aynı aşamalarla ilerlemesini düşünürsek, uyarının genellikle bakteri olduğu bilinmektedir. Bakterinin kök kanal sisteminin içinde bulunması, genellikle apikal periodontitis olarak bilinen periapikal iltihabi cevaba neden olmaktadır. Bu cevap, bakterinin kendi kendine olduğu kadar, ekzotoksin ve lipopolisakkarit gibi kendi ürünlerinin oluşturduğu irritasyona verilen konak savunma sisteminin de cevabıdır⁵⁹.

Korzen et al.⁶⁰ periapikal doku hastalıklarının, kök kanalındaki bakteri invazyonuyla direkt ilişkili olduğunu ve kök kanalları enfekte olmadığında periapikal dokularda iltihap oluşmadığını göstermişlerdir. Mikroorganizmalar bütün kök kanalında mevcutsa, periapikal inflamasyon reaksiyonu şiddetlidir. Bununla birlikte, eğer inokulum sınırlı ise, periapikal doku reaksiyonu da sınırlıdır. Sunqvist⁸, kanal içinde bulunan mikroorganizmaların ve periapikal radyolüsentliğin etkilenen dişten izole edilen türlerin sayısıyla direkt olarak ilişkili olduğunu doğrulayan periapikal lezyonların, 18 ve 19 vakada bulunduğunu göstermiştir. Möller et al.³ primatlarda yaptığı çalışmada, kök kanalının içinde bakteri yoksa periapikal iltihabi cevap

oluşmadığını doğrulamıştır ve Fabricus et al.³⁶ devitalize ama enfekte olmayan dişte herhangi bir iltihabi cevap oluşmadığını, sadece 2 vakada kök kanallarından pulpa uzaklaştırılırken apikal foramenden çıkma sonucu reaksiyon geliştiğini rapor etmişlerdir. Bu iki vakada, periapikal enflamasyonun devitalizasyon işlemi sırasında eğerle oluşturulan mekanik zarar sonucunda olduğu düşünülmektedir³⁶.

Periapikal iltihap, tedavi edilmeyen enfekte kök kanal sistemi ve konak savunması veya immun sistem arasındaki etkileşimin direkt sonucudur. Akut iltihabi cevap olarak başlar ama dinamik durumundan dolayı hastalık süresince kendiliğinden değişmektedir. Pulpasız dişin kök kanal sisteminin içinde kan desteği yoksa, konak savunma hücreleri irritasyon kaynağına ulaşamamaktadır ve bu yüzden konak enfeksiyonu yok edememektedir. Bundan dolayı, kronik iltihabi cevap apikal bölgede gelişmekte ve kanal içinde bulunan bakteriler doku sıvısı ve apikal foramenden kök kanal sistemine sızan iltihabi eksudadan besinlerini elde etmektedirler⁶¹. Tükürük ve besin maddeleri çürükler, çatlaklar veya açılan restorasyon marjinleri gibi yollardan kök kanal sistemine girebilirler.

Kök kanal sistemi içinde enfeksiyon oluştuğunda, normal hücre üreme mekanizmasıyla bakteri sayıları yavaş yavaş artmaktadır. Özetle, periapikal inflamasyon genellikle kök kanal sistemindeki bakteri enfeksiyonunun direkt etkisiyle oluşur. Bu yüzden dişi değerlendirirken, hem pulpanın hem periapikal dokuların durumunun tanısı ve incelenmesi zorunludur. Buna ek olarak, klinisyenler hastalığın nedenlerine karar vermelidir. Hastalığı tedavi etmede ilk prensip etkeni uzaklaştırmak ve tekrarlanmasını önlemektir.

Pulpa enfeksiyonu oluşmadan periapikal enflamasyon oluşabilmektedir. Böyle bir durumda apikal periodontitis kök kanal sistemi enfekte olmadan da gelişebilmektedir. Travmatik okluzyon buna bir örnektir ve bu durumdaki enflamasyonun nedeni etkenin devamlı, değişmez olmasından kaynaklanmaktadır ve fonksiyon sırasında periodontal ligament irritasyonu; alt çenenin prematüre okluzal kapanış veya lateral ve protruziv hareketlerde okluzal engellenmesi sırasında oluşmaktadır⁶². Travma uzun dönemli irritasyondur, bu da iyileşmeyen kemik rezorpsiyon prosesinin oluşmasına neden olmaktadır.

Bakterilerin kök kanalının içinde bulunması veya periapikal bölgedeki bakteriyel invazyona karşı oluşturulan başlangıç periapikal cevap, birincil akut apikal periodontitis

olarak bilinmektedir⁶². Böyle bir reaksiyon, travma veya endodontik enstrumantasyon işlemleri ve iritan materyaller nedeniyle oluşmaktadır. Birincil akut apikal periodontitis öncelikle sağlıklı periapikal bölgede görülmektedir ve genellikle kısa sürelidir. Eğer herhangi bir tedavi uygulanmaz ise iyileşme, abse oluşumu (birincil apikal abse), fistül gelişimi, enfeksiyonun kemikten veya yumuşak dokulardan yayılması (sellülit), kist oluşumu veya kronik hale gelmesi (kronik apikal periodontitis) gibi durumlar gözlenebilmektedir⁵⁹. İyileşme sadece reaksiyonun devam etmesini sağlayan irritasyon olmadığında ve kanal içinde herhangi bir mikroorganizma bulunmadığında (travmatik kazalardan veya endodontik tedavi tamamlandıktan sonraki durumlarda) görülmektedir.

2.2.1. Başlangıç (Akut) Apikal Periodontitis

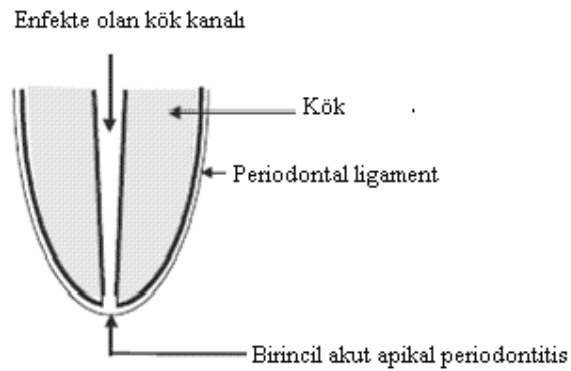
Akut apikal periodontitis genellikle, mikroorganizma ve ürünlerinin apikal kök kanalından periapikal dokuya ulaşması sonucu oluşmaktadır. Bununla birlikte travma, enstrumantasyondan kaynaklanan hasar, kimyasallar veya endodontik materyaller sonucu kaynaklanan irritasyondan dolayı da oluşabilmektedir. Bu mekanizmaların hepsi; ağrı, bazı vakalarda dişin yükselmesi ve perküsyonda duyarlılık gibi klinik semptomlara eşlik eden kısa süreli şiddetli konak cevabını arttırmaktadır. Bu başlangıç semptomatik lezyonlar, akut apikal periodontitis (akut periradiküler periodontitis) olarak kabul edilmektedir⁶³.

Lezyonun histopatolojik görüntüsü apikal periodontitisin klinik durumuyla ilişkilidir⁶⁴. Akut apikal periodontitis lezyonlarında vazodilatasyon, vasküler tıkanıklık, ödem, makrofajların ve nötrofil lökositlerin dışarıya çıkması periodontal ligamenti ilgilendirmektedir. Lamina duranın bozulması ve komşu spongios kemikte sınırlı kemik rezorpsiyonuna dikkat edilmelidir. Konak savunmasının oluşturduğu ilk tepki enfekte kök kanalından çıkan mikroorganizmaların sınırlı olmasını sağlamaktır. Bazen virüent kök kanal mikroorganizmaları, apikal foramenden çıkış yolu bulmakta, eksternal kök yüzeyinde film oluşturmakta veya önceden sağlıklı periapikal doku içinde yuva oluşturmaktadır. Buna cevap olarak, çok sayıdaki nötrofil lökositleri toplanmakta ve yeni başlamış akut lezyon birincil periapikal abseye dönüşmektedir⁶⁵. Önceden var olan kronik lezyonun alevlenmesi de benzer bir yolla gerçekleşmekte ve oluşan abse 'ikincil abse' olarak adlandırılmaktadır. Hem birincil abse oluşumu hem de alevlenme sonucu

gelişen ikincil abse sonucu, önemli kemik kaybı ve bir miktar apikal kök rezorpsiyonu oluşmaktadır. Bu da kronik lezyonun gelişmesi için alan yaratmaktadır⁶⁶.

Enfeksiyon bu duruma dahil olduğunda, nötrofiller mikroorganizmalara sadece saldırmak ve öldürmekle kalmayıp lökotrien ve prostaglandin salınımı yaparlar. LTB₄ daha fazla nötrofili ve makrofaji alana çeker ve makrofajlar osteoklastlar üzerine etkilidirler. Birkaç gün içinde periapaksin çevresi rezorbe olabilmekte ve periapikalde radyolusent alan oluşabilmektedir⁶⁷. Bu başlangıçtaki hızlı kemik yıkımı indomethacin yönetimiyle engellenebilmektedir⁶⁸. İndomethacin siklooksijenaz enziminin etkinliğini önlemekte ve böylece prostaglandin sentezini baskılamaktadır. Nötrofillerin çoğu inflamasyon alanında ölmekte ve enzimlerini salıp ekstrasellüler matriksin ve hücrelerin yıkımına neden olmaktadır. Savaş alanı içinde dokuların kendilerinin neden oldukları yıkım, enfeksiyonun vücudun diğer kısımlarına yayılmasını önlemekte ve desteğin yayılması için alan sağlamakta ve iyi gelişmiş savunma hücrelerini uzaklaştırarak, mücadeleyi devam eden savaş haline getirmektedir. Akut cevap ilerki aşamalarda, antijen-antikor kompleksi oluşturarak yoğunlaşmaktadır⁶⁸. Akut erken lezyon, kendiliğinden iyileşme görülebilmesi, enfeksiyon yoğunlaşması ve kemik içine yayılması (alveoler abse), lezyon dışarıya açılabilmesi (fistül veya fistül yolu oluşabilir) veya kronikleşebilmesi gibi çeşitli olasılıklar doğurmaktadır.

Birincil akut apikal periodontitis, dişe basınç uygulandığında perküsyonda hassasiyet ve ağrı oluşturarak ayırt edilir. Radyografik olarak; periodontal ligament boşluğu ve lamina dura normal olarak gözükmemektedir veya periodontal ligament boşluğu hafif kalınlaşmıştır. Ayrıca dişin apeksinin etrafında lamina dura kaybı görülmektedir (Şekil 2.2).



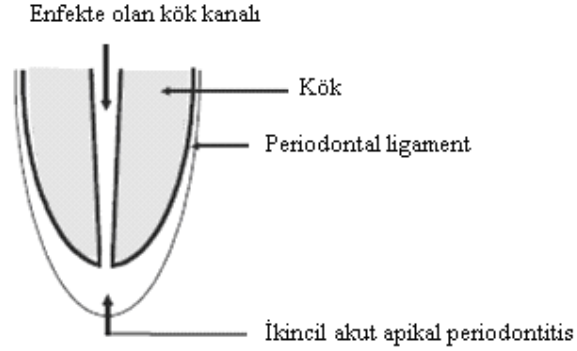
Şekil 2.2: Birincil akut apikal periodontitis'in şematik görüntüsü

Dişte mobilite artmıştır ve ağrının ilk atağı ani ve beklenmediktir. Hasta keskin ağrının farkındadır. Ayrıca ağrı ısırma ve dokunma ile artar. Bunların yanı sıra, periapikal bölgede basınçta hissedilmektedir.

2.2.2. Kronik Apikal Periodontitis

Kronik periapikal enflamasyonda, kök kanalı içerisindeki bakteri ve konak cevabı arasında denge bulunmaktadır. Eğer bu denge bozulursa, akut iltihabi reaksiyon şiddetli semptomlarla gelişir⁵⁹. Bu iltihabi reaksiyonlar farklı faktörlerin lokal olarak üretimi sonucu veya immün reaksiyonun bir sonucu olarak kendi kendine oluşmaktadır.

Kronik apikal periodontitis dental veya periapikal granuloma olarak adlandırılabilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: İkincil akut apikal periodontitis'in şematik görüntüsü

Histopatolojik olarak hücreleri ve fibroblastları olan granülatöz bir dokudur ve iyi gelişmiş bir fibröz kapsüle sahiptir. Seri kesitlemede, kronik apikal lezyonların %45'inin epitelize olduğunu görülmüştür⁶⁹. Epitelize hücreler, çoğalmaya başladığında rasgele aynı doğrultuda yerleşip irregular epitelyal kitle oluşturmaktadır. Böylece vasküler ve içeri sızan bağ doku sarılmış olmaktadır. Bazı lezyonlarda epitel, kök kanalının girişine kadar gelişebilmekte ve apikal foramende tıkaç benzeri örtü oluşturmaktadır⁷⁰. Epitelyal hücreler kök yüzeyinde ve kanal duvarında 'epitelyal ataşman' oluşturmaktadır. Ekstraepitelyal dokular, baskın olarak küçük kan damarları, lenfositler, plazma hücreleri ve makrofajlar içermektedir. Lezyonun belli bir döneminde

T lenfositler B lenfositlere göre daha fazladır⁷¹ ve CD4+ hücreler CD8+ hücrelere göre sayıca üstündür. Doku kapsülü yoğun kollejenaz fiberlerinden oluşmuştur ve kök yüzeyine sıkıca tutunmaktadır. Bu yüzden lezyon dişin çekilmesi sırasında dişle beraber çıkabilmektedir.

Kronik apikal periodontitis klinik görünümde akut apikal periodontitisten farklıdır, bu genel durum periapikal hastalık oluşumunu, farklı histolojik şartlar altında göstermektedir. Hastaların bu lezyonlarla ilişkili herhangi bir semptomları yoktur, genellikle rutin radyografik inceleme sırasında tesadüfi olarak bulunmaktadır. Pulpa, nekrotik veya enfekte hale gelebilmekte veya önceden kanalları doldurulmuş ve sonrasında enfekte olabilmektedir. Pulpa duyarlılık testlerine cevap yoktur ve röntgende periapikal radyolusent alan görülmektedir. Diş perküsyona, basınca veya palpasyona hassas değildir ama bu testlerde farklılık hissedebilmekte ve diş biraz mobil hale gelebilmektedir.

Kronik periapikal patolojinin en sık rastlanılan sonucu periapikal granulomadır. Periapikal granulomanın klinik tanısı, genellikle periapikal radyolusentliğin radyografik görüntüsüne veya periodontal ligament boşluğunun kalınlaşmasına dayanılarak yapılmaktadır. Kesin tanı cerrahi biopsi ve histolojik incelemeyle doğru olarak yapılabilmektedir. Bu yüzden, çoğu klinisyen bu oluşumu kronik apikal periodontitis olarak tanımlamaktadır. Radyografik olarak, ilişkili dişin apeksinin çevresinde radyolusensi ve lamina dura kaybı vardır.

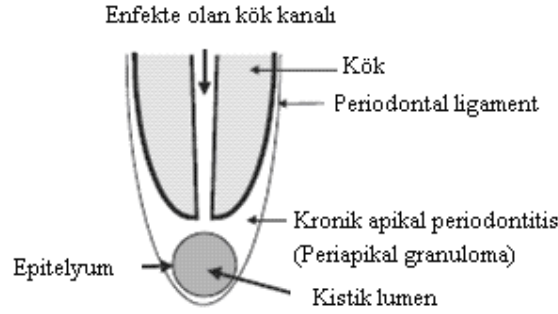
2.2.3. Kistik Apikal Periodontitis

Periapikal ve radiküler kistler genel olarak kronik apikal periodontitis'in devamı veya sonucudur. Ama her kronik lezyon kiste dönüşmez. Apikal periodontitis lezyonundan kist oluşum oranı %6 ve %55 arasında değişmektedir. Nair et al.⁶⁹ epitelin granuloma, abse ve kist gibi bütün apikal periodontitis lezyonlarının %50'sinden fazlasında bulunduğunu belirtmiştir. Bu yüzden epitelin bulunmasının kistin tanısında yetersiz kalacağı ve seri kesitleme ve tam histopatolojik kriterler gerektiğini bildirmiştir. Eğer lezyonun kök kanal sistemiyle herhangi bir ilişkisi varsa ve lezyonun çevresinde epitelin tamamıyla kapsül oluşturduğuna karar vermek isteniyorsa bütün biopsi (yumuşak doku ve diş apeksi) tam olarak incelenmelidir. Dikkatli seri kesitler ve

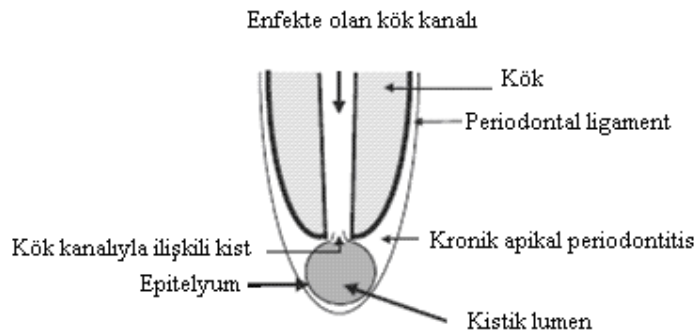
histopatolojik kriterler gerçek kist oranının %20'den daha az olduğunu göstermektedir⁶⁹.

Periapikal cep kistler ve periapikal gerçek kistler olmak üzere iki tip periapikal kist tanımlanmıştır⁷⁰. Periapikal cep kistler kese benzeri epitelle sınırlı bir kavitedir ve kök kanalına açıktır. Periapikal gerçek kistler epitel hatla çevresi sarılı olan ve kök kanalıyla herhangi bir ilişkisi olmayan kistlerdir. Nair et al⁷⁰. tarafından tam histolojik kriterler kullanılarak yapılan bir çalışmada, incelenen lezyonların sadece %15'inin kist olarak sınıflandırıldığı ve bunların %9'unun periapikal gerçek kist ve %6'sının periapikal cep kist olduğu bildirilmiştir.

Hem periapikal gerçek kistler (Şekil 2.4) hem periapikal cep kistler (Şekil 2.5) kronik apikal periodontitisin çeşitleri olarak düşünülmektedir.



Şekil 2.4: Periapikal gerçek kistin şeması



Şekil 2.5: Periapikal cep kistin şeması

Kistlerde diğerkronik periapikal durumlara benzer olarak, genellikle semptom yoktur ve klinik tanı radyografik bulgulara dayanmaktadır. Bununla birlikte, kistin en son tanısı sadece, kök ucunu da içeren biopsinin çok yönlü seri kesitlerinin histolojik incelemesi ile yapılmaktadır.

Gerçek kist oluşumu 3 aşamada görülmektedir⁷². Birinci faz, etkin olmayan Malassez epitel artıklarının, lezyondaki çeşitli hücrelerden salınan büyüme faktörleri eşliğinde çoğalmasdır⁷³. İkinci faz, epitelle çevrili kavite oluşmasıdır. Kistik kavitenin oluşumu ile ilgili iki uzun-dönemli hipotez bulunmaktadır. Besin eksikliği teorisi, epitelyal hattın merkez hücrelerinin besin kaynaklarından uzaklaştırılmaları ve nekroza ve likefaktif dejenerasyon oluşmasına dayalı bir varsayımdır. Toplanan ürünler, nötrofil granülositleri nekrotik alana yönlendirmektedir. Parçalanmış epitelyal hücreleri içeren bu tür mikrokaviteler, lökositleri infiltre edip ve doku eksudalarını birleştirerek, çok katlı yassı epitel hatlı kistik bir kavite oluşturmaktadır. Abse teorisine göre doku nekrozu ve lizisi ile oluşan absenin çevresindeki epitelin çoğalması ile kist oluşumunun gerçekleştiği iddia edilmektedir. Bu teorinin temellerini epitelyal hücrelerin ekpoze olan bağ doku yüzeyini örtme kabiliyeti oluşturmaktadır.

Gerçek kist oluşumunun 3. fazı sırasında, kist henüz tam aydınlanmayan bazı mekanizmalar sayesinde oluşmaktadır. Osmotik basınca⁷⁴ dayalı teoriler son yıllarda geri çekilmiştir ve araştırmalar sitogenez için moleküler bir temel bulma arayışına yönelmiştir⁷⁵.

Nekrotik kök kanalına açık lumeni olan apikal cep kist, osmotik basıncı yok ederek oluşur ve radiküler kistin oluşmasının ana faktörüdür. Net deliller henüz elde edilememiştir ama radiküler kistlerin doku dinamikleri ve hücresel komponentleri kistin büyümesi için mümkün olan moleküler yollardır.

Histopatolojik olarak, apikal gerçek kistler 4 ana komponent içermektedir; kist kavitesi, epitelyal hücre duvarı, extraepitelyal doku ve kollejenaz kapsülüdür. Kavite tam olarak epitelyal hatla çevrelenmiştir ve genel olarak nekrotik doku ve bazen kolesterol kristalleri ve eritrositler içermektedir. Çok katlı yassı epitelin kalınlığı, az hücre tabakasından çok hücre tabakasına kadar değişiklik göstermektedir. Kist duvarının en iç yüzeyinin Tarayıcı Elektron Mikroskopu (SEM) görüntüsü epitelyal ve globuler hücrelerin varlığını ortaya koymuştur. Örneklerin SEM ve Transmission Elektron Mikroskopu (TEM) görüntüleri karşılaştırılarak yapılan çalışmalar, çeşitli

intraepitelyal nötrofillerin epitelden kist lumenine göç ettiğini göstermiştir. Epitelyal hatla fibröz kapsül arasındaki doku, genellikle çok fazla kan damarı ve baskın olarak T lenfositler⁷⁶ olmak üzere B lenfositler ve plazma hücreleri gibi hücreleri içermektedir. Epitelyal hatta çok bulunan nötrofiller, extraepitelyal alanda nadiren bulunmaktadır.

Periapikal cep kistler etkilenen dişin kök kanalına açık epitel hatlı patolojik kaviteden oluşmaktadır. Apikal kök kanalında bulunan bakteriler nedeniyle apikal foramenin çevresinde nötrofillerin toplanmasıyla apikal cep kist oluşabilmektedir. Biyolojik olarak cep kist enfekte kök kanal boşluğunun periapiks içine genişlemesinden dolayı oluşmaktadır.

Konvansiyonel kanal tedavisi sırasında kök kanalının içindeki irritantların uzaklaştırılmasından sonra iyileşme gözlenmektedir⁵⁹. Buna karşın, lezyon periapikal gerçek kist haline gelmişse, iyileşme kanal içindeki irritantların varlığına ve yokluğuna bağlı değildir. Bu yüzden gerçek kistler cerrahi tedavi gerektiren 'self sustaining' lezyonlardır^{59,70}. Buna ek olarak, periapikal gerçek kistler'in %29-43'ü kolesterol kristalleri içerir⁷⁰ ve bunlar parçalanmış hücrelerden, kan damarlarından ve plazma lipitlerinin sirkülasyonu ile serbest bırakılmaktadır. Bu kristaller, gerçek kistlerin kendiliğinden iyileşmesini engellemektedir⁷⁷. Çok katlı yassı epitel hat ve cep kistin duvarının geri kalanının histolojik görüntüsü ve gelişme süreci gerçek kiste benzerdir^{59,70}. Bundan dolayı, cep kistin kök apeksinden ayrıldıktan sonra epitel hattın tamamıyla kapanmasıyla gerçek kist oluşturduğu henüz ispatlanmamış olsa da olası bir durumdur.

2.3. Extraradiküler Enfeksiyonlar

Extraradiküler enfeksiyon birincil, ikincil veya inatçı kök kanal enfeksiyonu olabilir. Extraradiküler enfeksiyonun en genel formu akut periradiküler absesdir. Ana kaynağı genellikle intraradiküler enfeksiyondur ve nadir görülmektedir.

Konak, periradiküler lezyonun gelişmesine neden olan mikroorganizma hızını önlemek için bir bariyer yapmaktadır. Kemik dokusu, hücrelerin (fagositler) ve moleküllerin (antikor ve savunma molekülleri) bulunduğu granülamatöz doku yüzünden rezorbsiyon veya değişime uğramaktadır⁷⁸. Genellikle apikal foramende bulunan epitelyal tıkaç veya polimorfonükleer lökositlerden oluşan savunma duvarı, mikroorganizmaların periradiküler dokulara geçişini engellemektedir⁷⁹. Endodontik

patojenlerden çok azı bu bariyerden geçebilmektedir. Ancak mikroorganizmaların oluşturduğu ürünler bilinmeyen bir şekilde bu güvenlik bariyerinden geçip periradiküler lezyona neden olmakta veya lezyonun devamlılığını sürdürmektedirler.

Son zamanlarda extraradiküler olarak bulunan inatçı mikroorganizmaların, kök kanal tedavisindeki başarısızlığı üzerinde oldukça durulmaktadır. Kültür yöntemi ve mikroskopla yapılan çalışmalarda, tedavi edilmiş ve edilmemiş kök kanalındaki extraradiküler enfeksiyonun oluşumu incelenmiştir^{80,81}. Periapikal dokulara yerleşen mikroorganizmalara, endodontik dezenfeksiyon yöntemlerinin ulaşamaması yüzünden, extraradiküler enfeksiyon kanal tedavisinin başarısızlığının bir faktörü olarak gösterilmektedir.

Patojenler barınamayacakları ortamlarda yaşamlarını sürdürecekt mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu yüzden bunlar savunma hücrelerinin ve moleküllerinin aktivasyonundan kaçarak, kendilerini kompleman sistemin aktivasyonuna karşı antijenik tabakalarını değiştirerek ve konak moleküllerinde proteoliz oluşturarak korumaktadırlar⁷⁸. Yine de bazı oral mikroorganizmalar konak savunma mekanizmasının üstesinden gelerek extraradiküler enfeksiyona neden olmaktadır. *Actinomyces spp.* ve *Propionibacterium propionicum* gibi bazı oral mikroorganizmaların extraradiküler enfeksiyonla ilişkili olduğu kabul edilmektedir⁸².

Konak savunma sisteminden kurtulmaya yarayan en önemli mekanizmanın muhtemelen biyofilm içindeki mikroorganizmalar arasındaki etkileşim olduğu düşünülmektedir. Bunlar mikroorganizmaların oluşturduğu ürünlerle çevrelenmiştir ve intermikrobiyal matriksi oluşturmaktadır⁸¹. Tronstad et al.⁸³ kök kanal tedavisine cevap vermeyen dişlerde yaptıkları inceleme sonucunda apikal foramene komşu bakteriyel biyofilmlerin ve periradiküler granülomaların içinde bakteriyel kolonilerin lokalize olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular, biyofilmler içindeki bakteriyel organizasyonun, konak savunmasından etkilenmeyerek periapikal lezyonun inatçılığına yardımcı bulunduğunu göstermektedir. Periradiküler biyofilmlerin tedavisinde, klinisyen hiçbir klinik vakada biyofilmleri ortaya çıkaramamaktadır. Teorik olarak tedaviye dirençli klinik vakalardan alınan örneklerden izole edilen mikroorganizmalar, klinisyene kök kanalında bulunan bakteriler hakkında bilgi vermektedir.

Apikal foramenin dışında yerleşmiş olan bakterilere kanal içi dezenfeksiyon yöntemlerinin veya antibiotiklerin uygulanmasının kolaylıkla etki etmediği

bilinmektedir. Periapikal dokulara endodontik medikamentlerin yerleştirilmesi, mikroorganizmaları yok etmek ve periradiküler biyofilmleri ayrıştırmak için yeterli bir yöntem olarak görülmemektedir. Extraradiküler enfeksiyonların klinik tespiti çok zor veya imkansızdır. Aynı zamanda çoğu endodontik medikamentin kullanımı sitotoksik etkisinden dolayı veya apikalden taşma durumlarında antimikrobiyal etkinin nötralize olması sonucu etkisiz kalmaktadır. Cerrahi olmayan tedavi stratejilerinin uygulanmasının biyofilmlerle baş edebilmesi düşündürücü gözükmektedir. Bu yüzden inatçı extraradiküler enfeksiyonlar mevcutsa, periradiküler cerrahiyle tedavi edilmelidir⁸⁴.

2.4. Başarısız Endodontik Tedaviler

Apikal periodontitisli bir dişin endodontik tedavisindeki amaç; kök kanal sisteminden mikroorganizmaları yok etmek ve yeniden oluşabilecek bir enfeksiyonu önlemektir. Bakteri ve ürünleri, pulpa nekrozunda ve apikal lezyonda birincil etyolojik faktör olarak düşünülmektedir⁸. Kök kanal tedavisi, genellikle tedavi kabul edilebilir standartlarda yapılmadığında başarısızlığa uğramaktadır^{85,86}. Çoğu dişin kök kanal tedavisine cevap vermemesinin nedeni kanal içi enfeksiyonun önlenememesi, kontrol edilememesidir⁶⁹. Hiç şüphesiz ki endodontik başarısızlıkla bağdaştırılan en önemli faktör kök kanal sistemindeki ve periapikal dokulardaki enfeksiyonun inatçı olmasıdır. Bilimsel deliller, iyi tedavi edilmiş olguların kötü sonuç vermesini bazı faktörlere bağlamıştır. Bunlar mikrobiyal faktörler, dışsal veya içsel nonmikrobiyal faktörlerdir^{79,88}.

Kök kanal tedavilerini takip çalışmalarında %85-96 başarı oranları rapor edilirken, literatür bilgileri apikal periodontitisli dişlerin retreatment başarısının düşük olduğunu göstermektedir^{85,89} (Çizelge 2.1). Yenilenen tedavi olgularının prognozunun zayıf olması kök kanal tedavisi başarısız olan olgulardaki mikrofloranın eliminasyonundaki zorluklarla ilişkili olabilmektedir⁸⁹.

Çizelge 2.1: Cerrahi olmayan endodontik tedavi tekrarlarının başarı oranları

Çalışma (yıl)	Takip süresi (yıl)	Başarı oranı (%)
Strinberg (1956) ⁸⁹	4	66*
	7	84*
Grahnen and Hansson (1961) ⁹⁰	5	65*
Engström et al. (1964) ⁹¹	4	74*
Molven (1976) ⁹²	3.5	64**
Molven and Halse (1988) ⁹³	10-17	71**
Bergenholtz et al. (1979) ⁹⁴	2	48**
Allen et al. (1989) ⁹⁵	0.5-1.0	73***
Sjögren et al. (1990) ⁹⁶	8-10	62**
van Nieuwenhuysen et al. (1994) ⁹⁷	0.5-2	72
Sundqvist et al. (1998) ⁹	5	74**

*Periapikal lezyonu olan ve olmayan devital dişler, **Periapikal lezyonlu kanal tedavili dişler, ***Cerrahi tedaviyi kabul etmeyen vakalar

Kanalların doldurulması aşamasında enfeksiyonun varlığı dişlerin yeniden tedavi ihtiyacını önemli miktarda artırmaktadır. Sundqvist et al.⁹ yaptıkları çalışmada, kanalın doldurulma aşamasında dişlerden alınan bakteriyolojik örnekler pozitif ise başarı oranı %33 ancak negatif örneğe sahipse başarı oranı %80'dir. Bu çalışma, kanal dolumu sırasında enfekte olan dişlerin başarı oranının %26 daha az olduğunu gösteren Sjögren et al.⁹⁸ çalışmasıyla benzerlik göstermektedir. Bu bulgular tedavinin yenilenme amacının kök kanal sistemindeki mikroorganizmaların tamamıyla yok edilmesi olduğunu vurgulamaktadır.

Endodontik tedavi en yüksek standartta yapılsa bile, bazı vakaların uzun dönem takiplerinde periapikal radyolusent alanların bulunduğu veya geliştiği görülmektedir. Kök kanal tedavisinden sonra periapikal radyolusensinin devamına etken olan faktörler şunlardır:

1. Kök kanalının apikal kısmında bulunan intraradikular enfeksiyonlar⁷⁹.
2. Genellikle periapikal aktinomikoz formunda olan extraradiküler enfeksiyonlar³⁴.
3. Kanal dolum materyalinin veya diğer maddelerin apikalden çıkarak yabancı cisim reaksiyonu oluşturması⁹⁹.
4. Fazla miktarda kolesterol kristallerinin birikmesiyle oluşan gerçek kistler¹⁰⁰.

2.5. Koronal Sızdırmazlık

Kök kanalının dezenfeksiyonuyla birlikte iyi bir kök kanal dolgusunu takiben hemen yapılan sızdırmaz bir koronal dolgu kök kanal sisteminin yeniden enfekte olmasını önlemektedir. Koronal sızdırmazlığın kök kanal tedavisine olan etkisi 90 yıldır bilinmektedir. Endodontik çalışmalarda başarı için önceden koronal restorasyona önem verilmeyip, kök kanal preparasyonuna ve dolum kalitesine önem verilmekteydi. 1980'nin ortalarından itibaren restoratif başarısızlıklardan dolayı kök kanal tedavili dişlerin yeniden kontamine olması gündeme gelmiştir. In vitro ve in vivo araştırmalar göstermiştir ki; endodontik tedavi sonrasında oluşan koronal sızıntı bakteriyel penetrasyona izin vermekte ve kanalın yeniden kontamine olup başarısızlığa uğramasına neden olmaktadır.

Ray ve Trope¹⁰¹ koronal restorasyonun kalitesi ve koronal sızdırmazlığı arasındaki ilişkiyi, endodontik olarak tedavi edilmiş dişin radyografisindeki periapikal durumu inceleyerek değerlendirmişlerdir. Bu çalışmaya göre iyi koronal restorasyon ve iyi endodontik tedavi sonucu çok az periapikal iltihabi lezyon oluştuğu ve kötü koronal restorasyon ve kötü endodontik tedavi sonrasında %18.1 başarı görüldüğü bildirilmiştir. Kötü endodontik tedaviyi izleyen radyografik olarak iyi yapılmış daimi restorasyonların başarı oranı %67.6 olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak apikal sağlığın, endodontik tedavinin kalitesi ile birlikte koronal restorasyonun kalitesine bağlı olduğu ortaya çıkmıştır.

2.6. Başarısız Endodontik Tedaviden Sonra Oluşan Enfeksiyonda Bulunan İnatçı Mikroorganizmalar

İyi tedavi edilmiş kök kanal sisteminin apikal kısmında bulunan mikroorganizmalar endodontik başarısızlığa yol açabilmektedir. Gerekli teknikleri ve enstrümanları kullanmadan yapılan kemomekanik preparasyonlarda kök kanal yüzeyinde dokunulmamış alanlar bulunduğu kanıtlanmıştır. Kök kanal dolgusu radyografik olarak tam olsa bile dokunulmamış alanlar bakteri ve nekrotik doku içermektedir¹⁰².

Radyografik olarak iyi tedavi edilmiş kök kanalı, kök kanal sisteminin temizliği ve dolgusu açısından tamamıyla gerekli olan güveni vermemektedir¹⁰³. Besin artıklarının bulunduğu ramifikasyon ve deltalarda lokalize olan bakteriler muhtemelen

kök kanal tedavisi sırasında aynı yerde kalırlar. Yine de dentinal tubuller ve istmuslar gibi bölgelerde bulunan bakteriler subsratı etkili bir şekilde kullanabilirler. Kök kanal sisteminde düşük miktarda besin varlığında bile yaşama kabiliyeti olan mikroorganizmalar kalabilir. Endodontik tedavinin başarısızlığı, kanal tedavisinden sonra ortamda bulunan patojeniteye sahip mikroorganizmaların yüksek sayıya ulaşması ve periapikal dokuya giriş yolu sağlayarak periapikal lezyona sebep olması veya lezyonun devamlılığını korumasına bağlıdır. Bakterilerin çoğunun ölmesine rağmen, bazı bakteriler ölü hücreler ve dokulardan çıkan besin artıklarını alıp canlılıklarını sürdürmektedirler. Kök kanal dolgusu tam ve eksiksiz tıkama sağlamazsa, doku sıvıları bakterilerin üremesi için uygun ortam oluşturmaktadır. Mikroorganizma hücrelerinin bulunduğu tedavi edilmiş periapikal lezyonlu dişte, mikroorganizmalar kök kanal yüzeyine sızan doku sıvısından besinlerini alırlar¹¹.

Açlık periyotlarına genellikle dayanıklı olmadıklarından, çoğu bakteri için canlı kalabilme yeteneği önemlidir. Çeşitli regülatör sistemler bakterilerin besin tüketimine karşı koyabilmelerinde etkili rol oynamaktadır. Bu sistem, açlık durumlarında transkripsiyonu aktive olmuş kararlı genlerin kontrolü altındadır. Örneğin; nitrojen eksikliğinde küçük parçalar halinde amonyak olsa bile, bakteriler bu amonyağı Ntr gen sisteminde nitrojen kaynağı olarak kullanabilmektedir. Amonyak yüksek konsantrasyon altında Ntr gen sistemi tarafından hapsolmektedir. Bazı fakültatif bakteriler moleküler oksijenin düşük konsantrasyon altında olduğu zaman, Arc A ve Arc B genlerinden oluşan Arc sistemini aktive edebilmektedirler. Sonuç olarak, metabolik yolların aktive olması, solunum metabolizması için kullanılan alternatif terminal elektron alıcılarına izin vermekte, dolayısıyla aerobikten anaerobik metabolizmaya döngü oluşmaktadır.

Glukozun düşük konsantrasyonlu olduğu durumlarda, çeşitli organik karbon kaynaklarının kullanımı için enzim sentezini sağlayan adenilat siklaz (cya) ve katabolit repressor protein (crp) genlerinin kontrolü altında bazı bakteriler yıkımı baskılayan sistemi aktive edebilirler. İnorganik fosfatın düşük konsantrasyonuyla başlayan fosfat eksikliğinde, hücreler organik fosfat bileşiklerinin ve inorganik fosfatın küçük parçacıklarının kullanımı için gensele değişime uğramaktadırlar¹⁰⁴.

Başarısız kanal tedavili dişler ve hiç tedavi edilmemiş dişler arasında flora açısından farklılık görülmektedir. Başarısız kök kanal dolgulu dişlerde Gr pozitif anaeroplara baskın olduğu enfeksiyonlar bulunduğu halde, ilk kez kök kanal tedavisi

yapılacak olan dişlerde genel olarak Gr pozitif ve Gr negatif bakterilerin birleşiminden oluşan flora ile karşılaşılır⁹. Periradikuler hastalıkların değişik formlarıyla ilişkili patojenler Çizelge 2.2’ de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2: Periradikuler hastalıkların değişik formlarıyla ilişkili patojenler.

Kronik Lezyon ^{8,33,105,61.}	Periradikuler	Akut Lezyon ^{32,38,106}	Periradikuler	İnatçı Lezyon ^{9,11,18,107,108}	Periradikuler	Extraradikuler Enfeksiyon ^{34,109}
<i>Bacteriodes</i>		<i>Porphyromonas</i>		<i>Enterococcus</i>		<i>Actinomyces</i>
<i>Treponema</i>		<i>Fusobacterim</i>		<i>Actinomyces</i>		<i>Prorionibacterium</i>
<i>Prevotella</i>		<i>Treponema</i>		<i>Streptococcus</i>		
<i>Porphyromonas</i>		<i>Bacteriodes</i>		<i>Candida</i>		
<i>Fusobacterium</i>		<i>Prevotella</i>		<i>Propronibacterium</i>		
<i>Streptococcus</i>		<i>Peptostreptococcus</i>		<i>Pseudomonas</i>		
<i>Eubacterium</i>						
<i>Actinomyces</i>						
<i>Campylobacter</i>						

Streptokoklar enfekte kök kanallarından en sık izole edilen mikroorganizmalardan biridir. *S.anginosus* grubu ve *S.mitis* en çok rastlanan streptokok çeşitleridir¹¹⁰. Son 10 yılda, mantarların enfekte kanallardan izole edildiği gösterilmiştir. Enfekte kök kanallarında mantarların bulunma oranı %1 ve %17 arasında değişmektedir. Mantar benzeri mikroorganizmalar, başarısız kök kanal tedavili dişlerde bulunmaktadır⁷⁹. İyi tedavi edilmeyen dişteki mikrobiyal flora, hiç tedavi edilmeyen dişte bulunan anaeroplara baskın olduğu mikrobiyal çeşitleri içinde bulundurmaktadır⁹. Bu büyük olasılıkla, başlangıç enfeksiyonuna etken olan mikroorganizmaların kök kanal sisteminin yetersiz temizliğinden dolayı kanal içinde canlılığını sürdürmesinden kaynaklanmaktadır.

Hancock et al.¹⁹ yaptıkları çalışmada, Kuzey Amerika popülasyonunda başarısız kök kanal tedavilerinde bulunan flora birleşimi tespit edilmiş, sonuçları önceki İskandinavya çalışmasıyla karşılaştırılmış ve kültive edilen bakteri oranları arasında farklılık bulunmamıştır. Her iki çalışmada da *E.faecalis* baskın bakteri olarak bulunmuştur. Bu sonuç *E.faecalis*’in toplumlar arasında farklılık olmaksızın başarısız endodontik tedavilerden sorumlu tutulmasına yol açmaktadır.

Möller¹¹¹, başarısız vakaları incelediğinde, kanal başına 1.6 bakteriyel çeşit olduğunu göstermiş ve %29 vakada *E.faecalis* bulmuştur. Sundqvist et al.⁹, kanal başına 1.3 bakteriyel çeşit bulmuş ve bunun %42’sinin anaerop bakteri tarafından oluştuğunu

belirtmiştir. *E.faecalis* %38 enfekte kök kanalında ortaya çıkmıştır. Fakültatif bakteri birincil kök kanal enfeksiyonlarında birkaç vakada az sayıda bulunurken, ikincil veya inatçı kök kanal enfeksiyonlarında tek çeşit mikroorganizma olarak sıklıkla bulunmaktadır. Bu oranlar Çizelge 2.3' de gösterilmektedir.

Çizelge 2.3: Periapikal lezyonlu kanal tedavili dişlerdeki bakteriyolojik bulgular

Bulgular	Möller et al. ¹¹¹	Sundqvist et al. ⁹	Hancock et al. ¹⁹
Kök kanalı başına düşen bakteriyel çeşitler	1.6	1.3	1.7
Anerobik bakteri*	%51	%42	%42
Gr pozitif bakteri *	%80	%87	%80
<i>E.faecalis</i> **	%29	%38	%32

* İzole edilen bakteri oranı , ** Bakterili kanal oranı

2.7. Enterokoklar

Enterokoklar Thiercelin tarafından 1899 yılında Fransa'da tanımlanmış¹¹² ve 1930 yılında Lancefield tarafından serolojik olarak grup D streptokok olarak sınıflandırılmıştır. 1937 yılında Sherman'ın sınıflandırma tasarısına göre enterokok terimi; 10 veya 45 °C'de, pH 9.6 ve %6.5 NaCl'de üreyebilen ve 60 °C'de 30 dakika yaşayabilen ve safrada üreme özelliğine sahip streptokok için kullanılmaktadır^{112,113}.

Enterokoklar tekli, ikili, ya da kısa zincirler halinde görülebilen Gr pozitif koklardır. Fakültatif anaeroplardır, oksijen varlığında ve yokluğunda yaşama yeteneğindedirler^{15,114}.

Enterokoklar yüksek alkalın ve tuz konsantrasyonları dahil olmak üzere zorlu çevre şartlarında yaşayabilmektedirler. Tuz ruhuna, deterjanlara, ağır metallere, etanole, aside ve kurumaya karşı dirençlidir¹¹⁴. Karbonhidrat, gliserol, laktat, malat, sitrat, arjin, agmatin ve alfa keto asidi içeren birçok enerji kaynağını katabolize edebilmektedir¹¹⁴. Enterokokların çoğu türleri nonhemolitik ve nonmotildir. Kanlı agardaki yüzey kolonileri dairesel, düz veya her ikisi birliktedir. DNA'sının Guanin+Sitozin (G+C) içeriği %37'den 40 Mol'a ulaşmaktadır¹¹⁵.

Yirmi üç enterokok çeşidi mevcuttur ve manitol, sorbose, argininin ilişkisine bağlı olarak 5 gruba ayrılmaktadır. *E.faecalis*, *E.faecium*, *E.casseliflavus*, *E.mundtii* ve *E.gallinarumlar* aynı gruba aittir. Bu 5 çeşit manitol agarında asit oluşturup arginini

hidrolize etmekte, ama sorbose agarında asit oluşturmada başarısız olmaktadır¹¹⁴. *E.faecalis* arabinoz negatiftir ve bazı tipik değişiklikler dışında piruvat kullanan ve tellurite tolerans gösteren grubun tek üyesidir¹¹⁶. Moleküler teknikler hızlı ve doğru olarak enterokok çeşitlerini tanımlamada kullanılmaktadır. Günümüzde Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC) ticari olarak bulunabilen *E.faecalis*'in 69 türünü listelemektedir¹¹⁷.

Enterokoklar insan gastrointestinal ve genital bölgesinde bulunmaktadır¹¹⁸. Ama ağız kavitesi gibi diğer bölgelerde de kolonize olabilmektedir¹¹⁹. Bu mikroorganizmalar immünkompromize hastaların oral mukozal lezyonlarında¹²⁰, periodontitiste¹²¹ ve kanal enfeksiyonlarında⁹ bulunmaktadır.

1970'lerden itibaren enterokoklara daha çok önem verilmiştir. Enterokoklar bakterimiye, endokardite, bakteriyel meninjitte, idrar yollarında ve çeşitli diğer enfeksiyonlara neden olan ve Amerika'da en sık görülen ikinci nasokomial patojendir^{21,122}. Bu enfeksiyonlardaki bakterilerin kaynağı sağlık personelinin ellerinden, klinik enstrümanlardan veya hastadan hastaya geçişle olmaktadır¹²³. Çalışmalar nasokomial enfeksiyonların hastaların hastaneye yatmadan kendi floralarından kaynaklanmadığını ortaya çıkarmıştır¹²⁴. Enterokokal enfeksiyonlarda Amerika'daki nasokomial enfeksiyonların %12'sinin *E.faecalis* tarafından oluşturulduğu (%80'den fazlasının) ve *E.faecium*'un kalan enfeksiyonların büyük bir kısmından sorumlu olduğu bulunmuştur¹²⁵. Diğer enterokok çeşitlerinin insan enfeksiyonlarında nadiren bulunduğu gösterilmiştir¹¹⁰.

E.faecalis'in germ-free farelerde kök kanal sisteminden submandibuler lenf nodüllerine geçiş sağlayabileceğini, hastalarda olası enfeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir¹²⁶. Son zamanlarda enterokok enfeksiyonlarında artış vardır. Bunun nedenleri:

1. Enterokok türlerinin çoğunun ilaca dirençli olması,
2. İmmunosupresif hasta sayısındaki artış,
3. Kateter ilişkili enfeksiyonlardır¹²².

1984 yılında, DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyon çalışmalarından sonra, enterokoklara genel cins adı verilmiştir. Streptokoklardan daha uzak ilişkili 2 yeni cins olan *Lactococcus* ve *Enterococcus* tanıtılmıştır. En önemli enterokok türleri Çizelge 2.4' de listelenmiştir¹²⁷.

Çizelge 2.4: En önemli enterokok türleri ve yaşam ortamları

Enterokok türleri	Yaşam ortamları
<i>E.faecalis</i>	Oral kavite, gastro-intestinal kanal, hayvanlar, su, besinler
<i>E.faecium</i>	Oral kavite, gastro-intestinal kanal, hayvanlar, su, besinler
<i>E.gallinarum</i>	Besinler, insanlar
<i>E.casseliflarus</i>	Toprak, bitki, besinler, insan
<i>E.avium</i>	Hayvanlar
<i>E.hirae</i>	Hayvanlar
<i>E.durans</i>	İnsanlar, hayvanlar, besinler

Enterokoklar konak hücrelerine ve ekstrasellüler matrikse tutunmaya izin veren çeşitli virülans faktörlere sahiptir, böylece doku invazyonu kolaylaşmakta, immunmodülasyona etki etmekte ve toksin kaynaklı zarar meydana getirmektedir. Bu virülans faktörler¹⁵;

1. Agregasyon maddesi
2. Enterokok yüzey proteinleri
3. Jelatinaz
4. Sitolizin toksini
5. Ekstrasellüler süperoksit üretimi
6. Kapsüller polisakkaritler
7. Antibiyotik direnç paterni

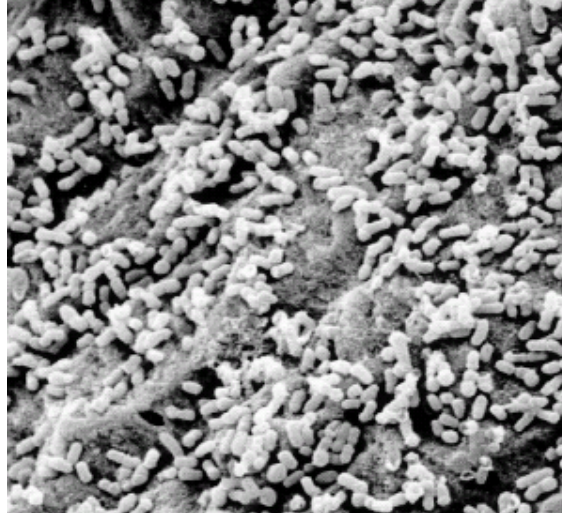
Agregasyon maddesi, yüzey karbonhidratları veya fibronektin tutunma maddesi organizmanın, dentinde bulunan konak kollajen tip 1 ve ekstrasellüler matriks proteinlerine tutunmasını kolaylaştırmaktadır¹²⁸.

2.7.1. *E.faecalis*

2.7.1.1. *E.faecalis*'in Birincil Endodontik Enfeksiyonlarda Bulunma Sıklığı

Nekrotik pulpal dişlerde, periradiküler dokulardan apekse doku sıvılarının girişi olabilmektedir. Albumin doku sıvılarının en önemli protein bileşenidir. *E.faecalis*'in protein ve/veya karbonhidrat içeriklerinin yüzey reseptörü olarak ilişkili albumine tutunabileceği önceden bilinmektedir¹²⁹.

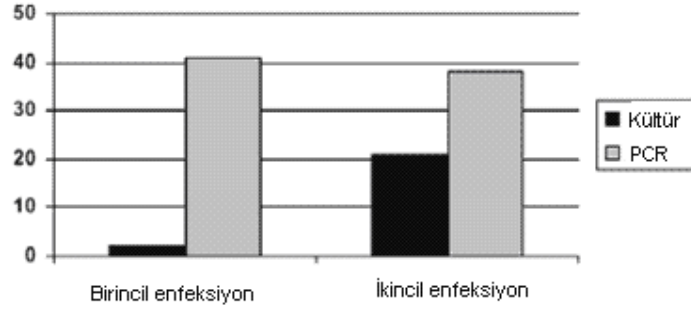
SEM analizleri çeşitli deney şartlarında farklı biyofilm oluşumunu göstermiştir. Eğer *E.faecalis* aerobik olarak besinden zengin ortamda ürerse, biyofilm oluşumu ve bakterinin dentin tubüllerine derin penetrasyonu görülmektedir. Şekil 2.6'da dentin tubüllerindeki *E.faecalis* hücreleri görülmektedir¹³⁰.



Şekil 2.6: Dentin tubüllerindeki *E.faecalis* hücreleri. Bu alan kök kanal lumeninden 0.5 mm uzaklıktadır. SEM görüntüsü (x7360)¹³⁰.

E.faecalis aerobik olarak besinden zengin bir ortamda yetişirse, makro yapısının boyutu 500'den 1000 mikrometreye kadar değişen düzensiz şekilli, sınırları belli olmayan bir biyofilm oluşturmaktadır¹³¹.

Gomes et al.¹³² 50 birincil ve 50 ikincil enfeksiyonlu dişleri içeren 100 örnekli çalışmasında *E.faecalis*'i kültür ve PCR metotlarıyla araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonuçları Şekil 2.7' de gösterilmektedir.



Şekil 2.7: *E.faecalis*' in Kültür ve PCR teknikleri kullanılarak bulunması

Sassone et al.¹³³ yaptıkları çalışmada 111 tek köklü birincil enfeksiyonlu dişten elde edilen mikroorganizmalar DNA-DNA hibridizasyon tekniği ile incelenmiştir.

Roças et al.¹⁵ ve Fouad et al.¹³⁴ birincil enfeksiyonlarda 16S rDNA primeri ile *E.faecalis* bulunma sıklığını araştırmışlardır.

Enterokokların akut endodontik enfeksiyonlarda ve flare-up'lardaki rolü henüz çok çalışılmamıştır. Pinherio et al.¹⁷ çalışması, enterokokun birincil anaerobik bakteri olduğunu ve *E.faecalis* ve diğer enterokokların hiçbirinin kanal tedavili dişin akut semptomlarıyla ilişkili olmadığını göstermiştir.

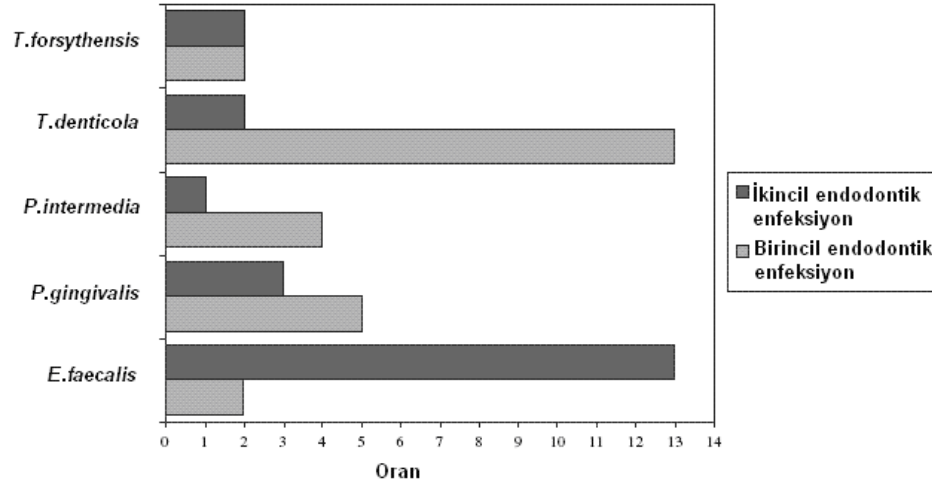
Siqueira et al.¹⁶ moleküler genetik metotlar kullanarak birincil kök kanal enfeksiyonlarında *E.faecalis*, Streptokok ve Actinomyces bulunma sıklığını araştırmışlardır. Bu araştırmacılar *E.faecalis*'i semptomsuz dişlerde akut semptomlulara göre daha sık bulmuşlardır. *E.faecalis* çoğu tedavi işlemlerine dirençli apikal periodontitisli kanal tedavili dişlerden en sık elde edilen türdür ve şiddetli akut enfeksiyonlardan sorumlu olduğuna dair herhangi bir delil bulunamamıştır.

2.7.1.2. *E.faecalis*'in İkincil Endodontik Enfeksiyonlarda Bulunma Sıklığı

İnatçı mikroorganizma olan *E.faecalis* nekrotik dişlerin florasının az bir kısmını oluştururken, kök kanal tedavisinden sonra inatçı periradiküler lezyonların etyolojisinde önemli role sahiptir. Bu mikroorganizma kök kanal başarısızlığında genellikle yüksek oranda bulunmakta ve kök kanalında tek mikroorganizma olarak veya floranın major komponenti olarak yaşayabilmektedir¹³⁵.

Foschi et al.¹³⁶ çalışmasında kanal tedavisi yapılacak olan birincil ve ikincil endodontik enfeksiyonları kapsayan 54 İtalyan hastanın 62 dişinden örnekler alınmıştır.

Bu çalışmada bulunan *E.faecalis* ve diğer mikroorganizmaların birincil ve ikincil endodontik enfeksiyonlarda bulunma sıklıkları Şekil 2.8’de gösterilmektedir.



Şekil 2.8: Mikroorganizmaların birincil ve ikincil endodontik enfeksiyonlarda bulunma sıklıkları¹³⁶.

PCR ile inatçı enfeksiyonlu endodontik olarak tedavi edilmiş kök kanallarında yapılan çalışmalar; *E.faecalis* bulunma sıklığını %12-90 arasında değişen değerlerde göstermiştir^{134,137,138,139}. *E.faecalis* sıklığında gözlenen bu geniş aralık; kullanılan farklı tanımlama tekniklerine, coğrafik farklılıklara ve örnek sayısına bağlıdır^{13,139,140}. Peciuline et al.¹⁸ kök kanal dolgulu kronik apikal periodontitisli dişlerde kültür metodu ile %70 oranında enterokok bulmuşlardır. Engström¹⁴¹ çalışmasında enterokoku, 223 dişte kültür metodu ile araştırmıştır. Pozitif üreme 134 (%60) örnekte görülmüştür ve enterokok 20 (%14.9) vakada bulunmuştur. Enterokoklar %20.9 oranında önceden kanal tedavisi yapılan dişlerden izole edilmiştir. Apikal periodontitise sahip kanal tedavili dişlerde *E.faecalis*' in sıklığını kültür ve PCR yöntemi ile araştıran çalışmalar Çizelge 2.5’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.5: Apikal periodontitise sahip kanal tedavili dişlerde *E.faecalis* sıklığını araştıran çalışmalar

Yazar/Yıl	Kanal tedavili diş sayısı	Bakteriyel üreme gösteren diş sayısı	<i>E.faecalis</i> sıklığı	Kullanılan method
Engström 1964 ⁹¹	54	21	5/21=%24	Kültür
Möller 1966 ¹¹¹	264	120	34/120=%28	Kültür
Molander et al. 1998 ¹¹	100	68	32/68=%47	Kültür
Sundqvist et al. 1998 ⁹	54	24	9/24=%38	Kültür
Peciuliene et al. 2000 ¹⁸	25	20	14/20=%70	Kültür
Peciuliene et al. 2001 ¹⁴²	40	33	21/33=%64	Kültür
Hancock et al. 2001 ¹⁹	54	33	10/33=%33	Kültür
Pinheiro et al. 2001 ¹⁷	60	51	27/51=%53	Kültür
Siqueira & Roças 2004 ¹³⁸	22	22	17/22=%77	PCR
Roças et al. 2004 ¹⁵	30	30	20/30=%67	PCR

Roças et al.¹⁴³ *E.faecalis*'i Kuzey Kore toplumunda, tekrarlayan vakalarda PCR yöntemi ile %64 oranında bulmuştur. Siqueira et al. *E.faecalis*'i Brezilya toplumunda PCR yöntemi ile kanal tedavili dişlerde %77 oranında bulmuştur¹³⁸. Zoletti et al.¹⁴⁴ tür-spesifik 16S ribozomal RNA (rRNA) gen-bazlı PCR kullanarak yaptıkları çalışmada *E.faecalis*'i 27 dişin 22 (%81.5)'sinde bulmuşlardır.

Kötü doldurulmuş kök kanallarında diğer enterokoklar arasından *E.faecalis*'in üstünlüğü, ekolojik rekabetteki gücünden veya ağız kavitesinde en sık elde edilen enterokok türü olmasından kaynaklanmaktadır¹⁴².

2.7.1.3.Oral Enterokok Enfeksiyonları

Sadece birkaç çalışma enterokokların ağız kavitesinde bulunmasına odaklanmıştır. Enterokoklar birkaç insanın ağız kavitesinden az sayıda izole edilmektedir. *E.faecalis* enterokok çeşitlerinden en sık izole edilen türdür²⁰. Jett et al.²¹ göre enterokoklar gastrointestinal, vajina ve ağız kavitesinin flora mikroorganizmalarıdır.

Williams et al.²² 206 vakanın tükürüğünde enterokok varlığını araştırmışlardır. Smyth et al.¹⁴⁵ hemodiyaliz hastalarının ve farklı kontrol gruplarının diş taşında enterokok taşıma oranını araştırmışlardır. Sedgley et al.¹⁴⁶ oral enterokokların sıklığı, fenotipi ve genotipini araştırmışlardır. Sedgley et al.¹⁴⁷ başka bir çalışmada tür-spesifik *E.faecalis* 16S rRNA gen primerleri kullanılarak yaptıkları PCR analizlerinde 41 hastanın tükürük, dil, diyeti oluğu ve endodontik örneklerinden *E.faecalis* bulunma

sıklığını araştırmışlardır. Yine Sedgley et al.¹³⁷ başka bir çalışmada *E.faecalis* bulunma sıklığını 30 tükürük örneğinde araştırmıştır.

2.7.2. *E.faecalis*'in Yaşam ve Virülans Faktörleri

E.faecalis litik enzimler, sitolizin, tutunma maddesi, pheromones ve lipoteikoik asit gibi virülans faktörlere sahiptir¹⁵. Konak hücrelerine tutunur, proteinleri salgılar, bu sayede diğer bakteri hücreleriyle savaşır ve konak cevabını değiştirir^{43,15}. *E.faecalis* lenfositlerin aktivitesini baskılama yeteneğine sahiptir ve böylece endodontik başarısızlığın oluşmasına neden olmaktadır¹⁴⁸.

E.faecalis değişken virülans faktörlere sahiptir. Bu virülans özelliklerini, türler arasında paylaşma yeteneğine sahiptirler. Bu da mikroorganizmanın yaşamasını ve hastalık oluşturmasını sağlamaktadır²¹. Bu faktörler hastalık oluşturma konusunda *E.faecalis*'in var olan özelliklerine katkıda bulunabilir veya bulunmayabilir. *E.faecalis* virülans faktörlere az bağımlı olduğu için, yaşama yeteneğine sahiptir ve dişin kök kanalında inatçı patojen olarak kalabilmektedir²¹. *E.faecalis* kök kanal sisteminin içinde çeşitli yollarla mücadele etmektedir. Değişken genetik polimorfizm göstermektedir¹⁴⁶. Serine proteaz, jelatinaz ve kollajene tutunma proteinine sahiptir, bu da dentine tutunmaya yardım etmektedir¹⁴⁹. Kolaylıkla dentin tubülüne girebilmekte ve orada yaşayabilmektedir. Yeterli besin kaynağına sahip olana kadar uzun süre açlığa dayanmaktadır. Mevcut olduğunda, açlıktan ölmüş hücrelerin serumunu besin kaynağı olarak kullanarak yenilenmektedir¹⁵⁰. Alveoler kemikten ve periodontal ligamentten çıkan serum *E.faecalis*'in Tip I kollajene tutunmasına yardım etmektedir.

2.8. Candida

2.8.1. Genel Özellikler ve Sınıflandırma

Candida cinsi mantarlar, *Cryptococcaceae* familyasından olup 30'dan fazla türü tarif edilmiştir. *C.albicans* dışında, *C.tropicalis*, *C.stellatoidea*, *C.pseudotropicalis*, *C.viswanathii*, *C.parapsilosis*, *C.guilliermondi* ve *C.krusei* diğer önemli *Candidalardan* bazılarıdır. Doğal kaynağı insandır. Toprak ve bitkilerden de üretilebilir. *Candida* cinsi mantarlar bifaziktir. Maya fazındayken tek hücrelidir, konağı girdiklerinde basit

tomurcuklanma ile oluşan blastosporlar ile ürerler. Yaptığı hastalıklara genel olarak kandidiyaz (kandidiyoz) veya monilyaz ismi verilir¹⁵¹.

İnsanda hastalık yapan *Candida*'ların başında *C.albicans* gelir. *C.albicans*'lar içerisinde GDH18, GDH3339, CA1957, ATCC 28366 ve ATCC 10321 suşları daha virülandır. Diğer *Candidalar* insanda nadiren hastalık yapar veya avirülandır¹²⁶. *C.albicans*, eşeyli çoğalan, diploit, maya tipi bir mantar türü ve insanlarda oral ve vajinal fırsatçı enfeksiyonların etmenidir. *Candida* cinsine ait 200 tür olmasına karşın *Candida* enfeksiyonlarının %75' inin sorumlusu *C.albicans*'tır. *C.albicans* insan ağızı ve sindirim sistemi içinde yaşayan pek çok organizmadan biridir. Sağlıklı yetişkinlerin %40' ının ağızında, sağlıklı kadınların %20-25' inin vajinasında varlığı bulunmaktadır¹⁵².

2.8.2. Mantarların Morfolojik Özellikleri

Mantarlar 2 temel formda bulunabilen kemoorganotofik ökaryotik mikroorganizmalardır. Bu iki form; mayalar ve küflerdir. Küfler, silindirik tubül dalları içeren çok hücreli filamentöz mantardır. Bir filamente “*hifa*” denir. Hifalar ya septattır (bölümlere ayrılmış) ya da konositikdir (çapraz duvarları olmayan çok çekirdekli). Bunlar genellikle yüzeyel büyür ve sonra dallanarak tufları oluşturur ve buna “*mycelium*” denir. Hifayla birlikte büyük sitoplazmik bir yapı bulunur. Bu genellikle hifa tipine doğrudur ve hifanın eski kısmı vakuolize olur ve sitoplazmada kaybolur.

Mayalar tek hücreli mantarlardır ve hücreler sferik veya oval şekillidirler. Hücre bölünmesi genellikle bir ana hücreden küçük büyümeler şeklinde olan tomurcuklanmayla oluşmaktadır. Septum formasyonu büyük miktarda kitin içeren filament bir halka görünümüyle meydana gelmektedir. Tomurcuk yavaşça büyümekte ve sonra ana hücreden ayrılmaktadır. Bu oluşan tomurcuklara “*blastoconida*” denir. Maya hücresinden büyüyen filamentöz hücre zincirlerine “*pseudohifa*” denir.

C.albicans tomurcuklanma yaparak üreyen ve en çok çalışılan mantar türüdür. Maya hücrelerinin oluşumuyla sonuçlanır ve bunlara “*blastopors*” veya “*blastoconidia*” denir. Germ tüplerinin gelişimiyle hifaya doğru bir değişim oluşmaktadır. Maya hücreleri tomurcuklanmayla büyürken eğer komşu hücreden ayrılma olmazsa “*pseudohifalar*” oluşmaktadır. *C.albicans*lar, yuvarlak ince hücre duvarlı klamidyosporlar oluşturmaktadırlar. Bu morfolojik değişim mantarların farklı koşullara ve farklı alanlara adapte olabilmelerini açıklamaktadır. Mantarlar, nükleer bir membranla

kapatılmış, bir nukleusa sahiptirler. Bunların hücre membranları lipitlerden (steroller) ve glikoproteinlerden oluşmaktadır. Bunlar aynı zamanda mitokondri, golgi, ribozom, endoplazmik retikulum ve hücre duvarına sahiptirler. N-glukozamin polimeri olan kitin mantar hücre duvarının en önemli maddesidir. Çoğu mantar, hücre duvarında selüloz bulundurmaktadır. Hücre duvarı genellikle %80-90 polisakkarittir. Protein, lipit, polifosfatlar ve inorganik iyonlar da hücre duvarının yapıştırıcı matriks kısmını oluşturur. *C.albicans*'ın hücre duvarının yaklaşık %80-90'ını karbohidratlar oluşturmaktadır. Bunlar temel olarak 3 ana polisakkarit'ten oluşmaktadır. B-glukans, kitin ve mannopteinler. Aynı zamanda *C.albicans*'ların hücre duvarlarında proteinler (%6-25) ve lipitler (%1-7) bulunmaktadır¹⁰.

2.8.3. Fungal Patojenitenin Mekanizması

Mantarların patogeneğinde rol oynayan virülans faktörleri; çeşitli çevresel koşullara adapte olabilme, çeşitli yüzeylere adezyon, hidrolitik enzimleri üretebilmesi, morfolojik değişim, biyofilm oluşumu, konak defansının immünomodülasyonu ve defanstan kurtulabilmesidir.

2.8.3.1. Çeşitli Çevresel Koşullara Uyum Sağlayabilme

Candida türleri ve özellikle *C.albicans* çok yönlü patojenlerdir. Çok yönlü olmasının esas nedeni, bunların anatomik olarak farklı alanlarda kommensal olarak yaşayabilme yetenekleridir. Örnek olarak *C.albicans* pH gibi fizyolojik uç durumlara iyi bir uyum kapasitesine sahiptir. Bu özellikler bu türlerin kan gibi nötral pH'da veya vajinal kanalın asidik pH'ında üreyebilmesine izin vermektedir.

2.8.3.2.Çeşitli Yüzeylere Adezyon

Candida türleri konak dokuya tutunabilen yüzey moleküllerine sahiptir. Bu moleküllerin insan CR3 integrinine homolog reseptörleri vardır. Bu CR3 integrin iC3b, fibrinojen, fibronektin, laminin ve vibronektindeki RGD (arjinin-glisin-aspartik asit) gruplarına bağlanmaktadır. Lektin epitelyal hücrelerdeki şekerlere bağlanır. Mannoz içeren proteinler ise konak hücre ve dokularındaki lektin benzeri moleküllere bağlanır. *Candida* türleri aynı zamanda Tip 1 ve Tip 4 kollajene bağlanabilmektedir¹⁵³. Bazı araştırmacılar *C.albicans*'ın çoğu streptokok türüyle koagregasyon yaptığını ama

S.mutans ve *E.faecalis* ile koagregasyon yapmadığını göstermişlerdir^{154,155}. Koagregasyon reaksiyonları oral mukoza ve sert dokuların kolonizasyonunda önemli rol oynayabilmektedir. *C.albicans*'ın varlığı, in vitrodaki total plak formasyonunda anlamlı bir artışa neden olabilmektedir.

2.8.3.3. Hidrolitik Enzimlerin Salınımı

C.albicans'ın ürettiği hidrolitik enzimler periradiküler dokularda yıkıma neden olabilmektedir. Aspartil proteinaz, kollajenaz, aminopeptidaz, glukaminidaz, asit ve alkalın fosfataz, hyaluronidaz ve kondroitin sülfataz içeren enzimler ekstrasellüler matriks proteinlerinin degradasyonunda bazı etkilere sahiptir. Bu fungal türden salınan kollajenolitik enzimin insan dentin kollajenini degrade edebileceği gösterilmiştir. Konak hücrelerinin membranlarının hasarlanmasıyla ilişkili olabilen fosfolipazlar, membranın destabilizasyonu ve hücrenin lizisine neden olan fosfolipitlerin ayrılmasından sonra ortaya çıkabilmektedir. Çoğu fosfolipaz aktivitesi doku invazyonu sırasında hifal tiplerde saptanmıştır¹⁰.

2.8.3.4. Morfolojik Değişim

C.albicans sıklıkla blastospor ve hifal formları içeren dimorfik mantarlar olarak tanımlanmaktadır. Ama bunlar polimorfik mantarlardır, çünkü blastosporlar, germ tüpleri, doğru hifa, psödohifa ve klamidosporlar gibi çevre koşullarına bağlı olarak birçok morfolojik formda üreyebildikleri rapor edilmiştir. Klamidosporlar hariç her form karışık olarak bulunabilmektedir. Hifalı yapının özelliği konak dokuya invaze olma ve makrofajlarca fagositozdan korunma olabilmektedir¹⁰.

2.8.3.5. Biyofilm Oluşumu

C.albicans, farklı yüzeylerde biyofilmler oluşturma kapasitesine sahiptir ve bu özellik biyofilm oluşturmayan *C.glabrata*, *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* gibi mantarlardan daha patojenik olmasının bir sebebi olabilir¹⁵⁶. Donlan ve Colsterton¹⁵⁷, a göre biyofilm; eksopolimerik matriks içeren farklı fenotipik özellikler gösteren, yüzeye geri dönüşümsüz olarak yapışan bir mikroorganizma topluluğudur. Biyofilmin potansiyel risklere karşı koruyucu özelliği de vardır. Durağan konumdaki hücreler, hareketli konumdakilere göre antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençlidir.

2.8.3.6 Konak Defansının İmmünomodülasyonu ve Defanstan Kurtulması

C.albicans farklı mekanizmaların bir sonucu olarak konak defansını uyarabilmektedir. *C.albicans*'a karşı defansta en önemli inflamatuvar hücre, polimorfonükleer nötrofillerdir. Bu türlerin oksijen radikalleri üretimiyle ve degranülasyonu polimorfonükleer nötrofil fonksiyonlarını engelledikleri ve monositleri öldürdükleri gösterilmiştir.

Candida türleri kompleman faktörlerini ve Ig G1, Ig A1 ve Ig A2 degradasyonunu sağlayan proteinaz üretimine doğru konak defans moleküllerini uyarmaktadırlar. Hücre duvarındaki glukan, sitin ve monoproteinler periradikuler lezyonların patogenezinde indirekt mekanizmayla immunomodulatör etkiye (aktivasyon veya depresyon) neden olurlar. *C.albicans* preinflamatuvar sitokin, makrofajlar, endotelial hücreler ve fibroblastların salınımını stimüle eder.

Mantarlar kompleman sistemini aktive edebilirler. Kompleman aktivasyonu vasküler permeabilitede değişikliklere neden olur, lökositlerin kemotaksisine veya opsoninlerin etkilerine neden olur, fagositozu başlatır.

C.albicans enfeksiyonuyla kompleman sistem 2 mekanizmayla aktive olmaktadır. *C.albicans*'taki mannan Ig G'yi aktive etmekte ve klasik yol işlemeye başlamakta ya da *C.albicans* yüzeyindeki mannan direkt olarak aktive etmektedir¹⁰.

2.8.4. Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar

Patojenik mantarlar şu gruplara girerler:

1.*Ascomycetes*

2.*Basidiomycetes*

3.*Zygomycetes*

4.*Deuteromycetes*

a.*Candida*

b.*Aspergillus*

Candida ve *Aspergillus* en sık rastlanılan fırsatçı fungal patojenlerdir. *Candida*'lar insanda normal florada bulunur ve yüzeysel hastalıklara ve hayatı tehdit eden hastalıklara neden olabilmektedir. *Candida* türleri insanda oral kavitede,

gastrointestinal yollarda, anüste, kasıkta, vajinal kanalda ve vulvada bulunmaktadır. Oral hastalığı olmayan bireylerin hemen hemen 1/3'ü mantar taşımaktadır¹⁰.

Endojen mantarların çoğu fırsatçı patojenlerdir ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin, immunsupresyonla ve koruyucu engellerin hasarlanmasıyla normal mikrobiyotada meydana gelen dengesizlik ile enfeksiyonlara neden olurlar. Fungal enfeksiyonlar genellikle hastalığın hastalığıdır¹⁰.

Dil dorsumu *C.albicans*'ın primer oral habitatıdır. Mukoza, supragingiva, dentin, kök yüzeyi, subgingiva ve periodontal cepler sekonder olarak kolonize oldukları diğer yerlerdir¹²⁸.

Ağız mantarlarının en önemlisi *Candida* ailesindedir. *C.albicans* en baskın mantar türüdür. Bunu *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.tropicalis*, *C.guillermundii*, *C.keyfr*, *C.parapsioli*s takip eder. *C.dublinski* *C.albicans*'la yakından ilişkili yeni bir çeşittir. *Saccharomyces spp.* ve *Geotrichum spp.* gibi diğer mantar türleri oral kaviteden izole edilmiştir. Bunlar *Candida* türü ile karşılaştırıldığında patojenik önemi sınırlıdır²⁵.

2.8.4.1. Birincil Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar

Mantarlar birincil endodontik enfeksiyonların mikrobiyasında bulunmamaktadır⁴. Buna rağmen bazı araştırmacılar mantarları kültür ve moleküler genetik metotlarla tespit etmişlerdir. Son 10 yılda, mantarların enfekte kanallardan izole edildiği bilinmektedir. Enfekte kök kanallarında mantarların bulunma oranı %1 ve %17 arasında değişmektedir^{13,14}. Maya hücrelerinin varlığı periapikal kök yüzeyindeki rezorbsiyon alanlarında ve periradiküler granülomalarda gösterilmiştir¹⁵⁸.

Möller¹¹¹, sağlam kuronlu dişlerin nekrotik pulpa örneklerinden *Candida* türlerini, Siqueira¹⁵⁹ PCR ile 50 enfekte kök kanalını incelemişlerdir. Şen et al¹⁵⁸ periradiküler lezyonlu çekilmiş 10 dişte *C.albicans* bulunma sıklığını ve Siqueira¹⁶⁰ SEM ile primer kök kanal enfeksiyonlarında mantar bulunma olasılığını araştırmışlardır.

Nekrotik kök kanallarındaki ekolojik şartlar mantar ve streptokok üremesini ve varlığını artırmaktadır. Buna ek olarak *C.albicans*, *S.gordoni*, *S.mutans*, *S.sanguis* gibi streptokoklarla koagrage olup biyofilm oluşumunu kolaylaştırmaktadır¹⁶¹. Biyofilmler yine kolonizasyonu arttırarak bulunan türlerin yaşamasına olanak sağlamaktadır. Bu da nekrotik kanallarda streptokok ve mantarların ilişkili bulunmasını açıklamaktadır¹⁶².

Moleküler teknikler kullanılarak yapılan tanısal işlemler konvansiyonel kültür tekniklerine göre daha yüksek hassasiyete sahiptir. Fazla sayıdaki mikrobiyal çeşitler, PCR esaslı moleküler tanımlama teknikleri kullanılarak kök kanallarından elde edilmiştir¹⁶³. Periapikal radyolüsentli vakaların bulunduğu Baumgartner et al.¹⁴ çalışmasında, birincil apikal periodontitisli dişlerde PCR ile *C.albicans* bulunma sıklıkları araştırılmıştır. Çeşitli çalışmalara ait kök kanallarında mantar bulunma sıklıkları Çizelge 2.6'da gözlenmektedir.

Çizelge 2.6: Birincil endodontik enfeksiyonlarda mantar bulunma sıklığını gösteren çalışmalar

Çalışma	Method	Oran
Möller 1966 (111)	Kültür	%3
Debelian et al. 1997 (164)	Kültür	%4
Lana et al. 2001 (165)	Kültür	%7
Şen ve ark. 1995 (158)	SEM	%40
Baumgartner et al. 2000 (14)	PCR	%21
Siqueira et al. 2002 (159)	PCR	%2
Siqueira et al. 2002 (160)	SEM	%7

SEM: Scaning Elektron Mikroskop, PCR: Polimerize Zincir Reaksiyonu

2.8.4.2. İkincil Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar

Mantarlar birincil kök kanal enfeksiyonlarında bulunsa da, başarısız kanal tedavili dişlerde daha sık görülmektedir¹⁰. Nair et al.⁸⁴ endodontik tedavili dişlerin periradiküler lezyonlarından alınan biyopsilerden maya varlığını incelemiştir. Sundqvist et al.⁷⁹ ve Molander et al.¹⁹ çalışmalarında başarısız endodontik tedavili dişlerden *C.albicans* bulunma sıklığını araştırmışlardır. Hancock et al.¹⁹ periapikal radyolüsentli olan kanal dolgulu dişlerin mikroflorasını araştırmışlardır. Pinherio et al.¹⁷ seçici ortam kullanmadığı çalışmasında kültür yöntemi ile periapikal lezyonlu kanal dolgulu dişlerde *Candida* cinsini araştırmışlardır. Peciuline et al.¹⁴² çalışmasında kronik apikal periodontitisli kanal dolgulu dişlerde seçici ortam kullanarak *C.albicans* bulunma sıklığını araştırmışlardır. Çizelge 2.7'de bu araştırmalarda tespit edilen mantar bulunma sıklığı gösterilmektedir.

Çizelge 2.7: İkincil endodontik enfeksiyonlarda mantar bulunma sıklığını gösteren çalışmalar

Çalışma	Method	Oran
Möller 1966 (111)	Kültür	%3
Nair et al. 1990 (79)	LM ve TEM	%22
Walimo et al. 1997 (108)	Kültür	%7
Sundqvist et al. 1998 (9)	Kültür	%8
Molander et al. 1998 (11)	Kültür	%4
Peciuliene et al. 2001 (142)	Kültür	%18
Hancock et al. 2001 (19)	Kültür	%3
Cheung & Ho 2001 (166)	Kültür	%17
Pinherio et al. 2003 (17)	Kültür	%4
Siqueira & Roças 2004 (138)	PCR	%9

LM: Işık Mikroskopu, TEM: Transmission Elektron Mikroskop, PCR: Polimerize Zincir Reaksiyonu

2.8.4.3. Oral Mantar Enfeksiyonları

C. albicans diğer candidalar içerisinde ağız mukozası ve plastik yüzeylere en iyi tutunan mantardır. Statherin ve PRPler (PRP1 hariç), *C. albicans*'ın diş sert dokularına ve yanak mukozasına tutunmasına aracılık eder. Statherin bloke edildiğinde diş sert dokularına tutunma %93, yanak mukozasına tutunma %43 oranında azalır. Candidaların konak dokuya tutunması blastospor fazında daha fazladır. Ortamda şeker (galaktoz) bulunduğunda veya 2 değerlikli iyonlar (Mg^{++} , Ca^{++}) bulunduğunda tutunması artar. Mono ve disakkaritler tutunmayı artırır, aminoşekerler ise inhibe eder¹⁵¹.

Egan et al.¹⁶⁷ apikal periodontitisli 60 kök kanal örnekli diş seçici ortam kullanarak incelemiştir (25 kanal dolgulu, 35 tedavi edilmemiş diş) ve hastanın tükürüğünde mantar varsa kök kanalında mantar bulunması arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir.

Akdeniz et al.¹⁶⁸ yaptıkları çalışmada 20 çürüksüz ve 13 çürüklü dişlere sahip olan sağlıklı çocukların tükürük örneklerinde candida bulunma sıklığını araştırmışlardır.

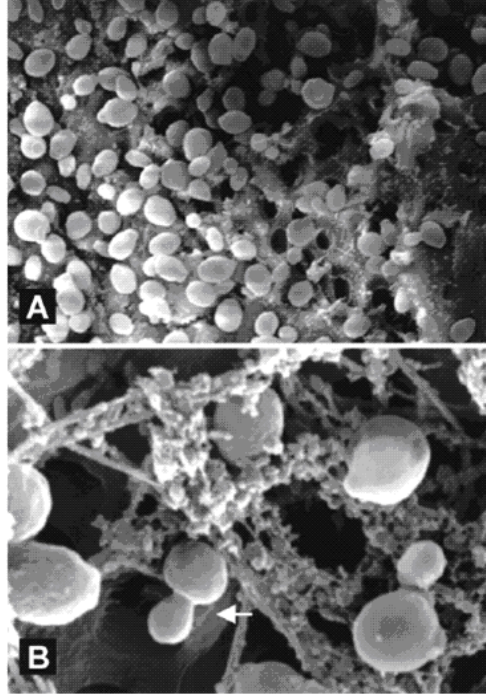
Rozkiewicz et al.¹⁶⁹ yaptıkları çalışmada çocuklar ve ergenlerden farenks, supragingival plak ve çürük lezyonlarında *C. albicans* varlığı araştırılmıştır.

2.8.5. Mantarların Dentinde Kolonizasyonu

Dentin kolonizasyonu kök kanal sisteminin enfeksiyonu sırasında önemli bir aşamadır ve endodontik mikroorganizmaların yer ve besin savaşında daha avantajlı hale gelmesini sağlamaktadır. Ayrıca dentinal tübüllere invazyon mikroorganizmaları kanal

tedavisi sırasında yapılan işlemlerden koruyarak kalıcı enfeksiyonların oluşmasında önemli bir aşama haline getirebilmektedir. Mayalar ortalama 1-6 µm çapında, hifalar ise 1,9-2,6 µm çapındadır. Bu boyutlara göre mantarlar dentin tübüllerine penetre olabilmektedir¹⁰. Periapikal lezyonla ilişkili dentin tübülleri ve enfekte kök kanallarında bakteri ve fungi varlığı Şen et al.¹⁵⁸ tarafından SEM kullanılarak bulunmuştur. Bu araştırmacılar, kök kanallarının ovoid ve hifal formlarda mantarlarla şiddetli bir şekilde enfekte olduğunu bulmuşlardır. Farklı bir çalışmada Şen et al.¹⁷⁰ *C.albicans*'ın büyüme paternlerini doğal ve kimyasal olarak modifiye edilen diş sert dokularında araştırmışlardır. Mantar hücreleri EDTA ve NaOCl ile tedavi edilmiş veya edilmemiş mine, sement ve dentine tutunma ve üreme yeteneğindedir. Siqueira et al.¹⁷¹ radiküler dentin kolonizasyonunu araştırdığında 5 çeşit mantar bulmuştur. *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.guillermondii*, *C.parapsilosis* ve *S.cerevisize*'dir. *C.albicans* dentin enfeksiyonunda farklı paternlere sahiptirler. Bazı örneklerde dentinal yüzeyin kolonizasyonu azdır ve dentin tübüllerine penetrasyon yoktur. Başka örneklerde ise kök kanal duvarlarının bazı bölgeleri büyük kolonili mantar hücreleriyle kaplıdır.

Son zamanlarda *C.albicans* ve *E.faecalis*'in insan dentinine penetrasyonu in vitro olarak çalışılmıştır¹⁷². Dentin disklerine penetrasyonun hem makroskopik incelemesi hem de dentin tübüllerindeki mikroorganizmaların mikroskopik incelemesi yapılmıştır. Dentin tübüllerinde *C.albicans*'ın gelişimi *E.faecalis*'le karşılaştırıldığında daha azdır. Ama her iki organizmanın 2 mm kalınlıktaki insan dentin diskine penetrasyon yeteneği vardır. *C.albicans* hücrelerinin dentin üzerinde üremelerinin SEM görüntüsü Şekil 2.9' da gösterilmektedir.



Şekil 2.9: *C.albicans* hücrelerinin dentin üzerinde üremelerinin SEM görüntüsü, A, Blastosporlar, B, Blastosporların ve hücrenin germ tüp oluşumunu göstermesi (ok)¹⁰.

Nektotik pulpa yüzeyi ve komşu dentin, zorlu ekolojik şartlara rağmen, *Candida* enfeksiyonunun gelişmesi için gerekli olan ortamı sağlamaktadır. Diğer bir taraftan tutunma, hifa oluşumu, penetrasyon için yakın temas, proteaz sekresyonu ve fenotipik switching gibi virülans faktörleri patojen olabilmesi için gereklidir. *C.albicans*'ın dentine ve biofilme tutunması antimikrobiale ajanlara direncini artırır ve penetrasyon kapasitesi thigmotropizm gibi pleomorfik büyüme tiplerine bağlıdır.

Eğer dentinde smear tabaka mevcutsa, farklı *Candida* formlarının kalın bir biofilm tabakasında buldukları gösterilmiştir¹⁰. Buna karşın, smear tabakası yoksa biofilm yoktur ama aynı koloniler vardır. Başka bir çalışmada Şen et al.¹⁷³ smear tabakasının varlığının *C.albicans*'ın dentine adezyonunu artırdığını saptamıştır. Artmış adezyonun, dentinin organik yapısının disintegrasyonunun elde edilmesine ve gelişim ve adezyon kaynağı olarak Ca iyonlarının varlığına bağlı olduğu hipotezi ortaya atılmıştır. In vitroda penetrasyonun az olmasının nedeni smear tabakasının uzaklaştırılması olabilmektedir.

2.8.6. Mantarların İzolasyonu

Mantarlar ağız enfeksiyonlarındaki en genel maya türleridir ve kültür ve izolasyonu kolaydır. Mayaların endodontik enfeksiyonlardaki mikrobiyolojik örneklerde gözden kaçmasının nedenleri bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi, bakterilerle karşılaştırıldığında koloni oluşturan ünite sayısının düşük olmasıdır²⁵. Peculene et al.¹⁴² mantarların çoğu örnekte toplam kültive edilen floranın %1'inden az olduğu rapor etmiştir.

Klinik laboratuvarlarda saf kültürden hazırlanan koloniler seri dilüsyonlardan sonra genellikle 5-50 koloni oluşturma birimi (cfu) petrilere genellikle seçilmektedir. Orijinal örnekte bulunmasına rağmen, mantar kolonileri kültür için kullanılan petrilere uzun süre bulunmamaktadır. Buna ek olarak, seçici olmayan ortamda mantarların koloni morfolojileri hava ve diğer kaynakların kontaminantlarına benzeyen koloni morfolojilerinden dolayı göz ardı edilmektedir.

Mantarlar birincil izolasyon için seçici ortam kullanılarak endodontik örneklerden izole edilebilmektedir. Mantarlar bakterilere göre yüksek pH'a dayanıklıdır ve bu yüzden mantarların izolasyonunda çeşitli seçici ortamlar bulunmaktadır. Sabora agarı ağız mantarlarının izolasyonunda sıklıkla kullanılan bir ortamdır. Ortamın pH'ı hafif asidiktir (pH=5.6), böylece mantarların ve asidurik organizmaların büyümesine izin verir ama çoğu bakteriyi engeller. pH hidroklorik asit eklemesiyle 3-4'e düşürülür, böylece asidurik bakterilerin büyümesi engellenir. Sabora agarının değişik formları ticari olarak bulunmaktadır. Sabora dekstroz agar (SDA) ağız mantarlarının izolasyonunda en sık kullanılan agardır²⁵.

Bakteriyel büyüme kloramfenikol, streptomycin, novobiocin, penisilin ve diğer antibiyotiklerin eklenmesiyle önlenir ama endodontik enfeksiyonlardan mantarların etkili izolasyonu için gerekli değildir. Bununla birlikte dilüe edilmemiş örnekte olabildiğince petriye koymak önemlidir böylece cfu'nun toplamı düşük olsa bile mantarların bulunması garanti olmaktadır²⁵.

2.8.7. Mantarların Tanımlanması

Mantar kolonileri genellikle beyaz ve sarıdır, tipik olarak bakteri kolonilerinden 2-3 kat daha büyüktür. Stafilokok görüntüsündedirler, ama koloni yüzeyi genellikle stafilokoklardan daha kurudur. İzole edilen koloniler; pozitif katalaz testi veya faz

kontrast mikroskopisinde tipik hücresel morfolojisiyle ağız mantarları olarak tanımlanmaktadır²⁵.

Gram boyama sonucunda Gr pozitif ve hücre ölçümü 2,5-5 mikrometre olması ağız mantarlarının tanımlanmasını sağlar. Mantarlar bakterilere (0,3-0,7) göre çok büyüktür bu da birincil tanımlamayı doğrular. *C.albicans*, ağız enfeksiyonlarında ve endodontik enfeksiyonlarda en sık görülen mantardır ve birincil tanımlamadan sonra germ tüp deneyiyle tanımlanmaktadır²⁵.

Rutin laboratuvar çalışmalarında, ağız mantarları ticari olarak bulunabilen identifikasyon kitleri kullanılarak tanımlanabilmektedir. Bu kitlerdeki bireysel testler; çeşitli karbonhidratları ve glukozidaz ve aminopeptidaz enzimlerinin üretiminin fermentasyonunu ve/veya assimilasyonunu ölçebilmektedir. *Candida* türü ve diğer ağız mantarlarının sınıflandırılması bu test sistemleriyle tanımlanabilmektedir.

Birçok olguda fenotipik karakter ağız mantarlarının tanımlamasında etkili ve değerli bir metottur. Buna ek olarak, bazen DNA analizlerine dayalı olan metotların kullanımı gerekmektedir. Bu sayede mantar çeşitleri ve türleri arasında farklılık ortaya çıkmaktadır. Arbitrarily primed PCR, tür-spesifik DNA probes ve Real-time Lightcycler PCR kullanımı gibi metotlar buna dahildir.

2.8.8. Periradiküler Mantar Enfeksiyonları

Periapikal aktinomikozis, bakterilerin kök kanal sisteminden periapikal alana çıktığı endodontik enfeksiyondur. Çok farklı actinomyces türleri bu lezyonların bakteriyel makrokolonilerinden izole edilmiştir⁸². Bazı bakteriler periapikal aktinomikozla ilişkilidir ama bilinmemektedir, çünkü endodontik tedavi sırasında veya gerçek aktinomikoza benzer enfeksiyonlarda dışarı çıkan bakteri kolonileridir²⁵.

Apikal periodontitisli dişlerin periapikal dokularında mantar bulunmasıyla ilgili sınırlı bilgi bulunmaktadır. Nair et al.⁷⁹ 9 tedaviye dirençli ve asemptomatik insan periapikal lezyonunu ışık ve elektron mikroskopisi kullanarak analiz etmiştir. Bu çalışmada etkilenen dişlerin cerrahi tedavisi sırasında çıkarılan blok biopsiler kullanılmıştır. Cerrahi gereken vakalar 4-10 yıl önce endodontik tedavi yaptıran bütün vakaların %10'unu oluşturmaktadır. Dokuz biopsinin 6'sında apikal kök kanalında mikroorganizma varlığına rastlanmıştır. Dört tanesi 1 veya daha fazla çeşitte bakteri

içermektedir ve 2 tanesinde mantar bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu mikroorganizma kolonilerine periapikal alanda rastlanmamıştır.

Diğer 2 çalışmada apikal periodontitisli kök kanalında bulunan mikroorganizma morfotiplerini karakterize etmede SEM kullanılmıştır^{160,174}. Kök kanalında çok sayıda bakteri bulunmasına rağmen sadece 1 örnekte apikal foramene yakın bir mesafede dışarıya bakteri çıkmıştır. Mantar benzeri hücreler kök kanalının dışında görülmemiştir ama 1 örnekte mantar benzeri hücreler kök kanalının orta üçlüsünde bulunmuştur.

Periapikal alanda yaşayan dokulardan yanlış-pozitif sonuçlar; karşı reaksiyonlardan, spesifik primerlerden, çekim veya Siqueira ve Lopes¹⁷⁴'in sunduğu periapikal cerrahi işlemleri sırasında kontaminasyona uğramasından dolayı olabilmektedir. Periapikal alandan alınan örneğin kontaminasyonuna yol açan etkenler; dişeti oluşu (intrasulcular insizyon), yapışık dişeti, mukoza (submarjinal flep), fistül ve kanal içeriklerinin periapikal alanın içine operasyon sırasında ters basınçtan dolayı itilmesi olabilmektedir.

2.9. Antibiyotiklerin *E.faecalis*'e Etkisi

Yıllardır tıp ve diş hekimliğinde sistemik ve topikal antibiyotikler kullanılmaktadır. Kök kanalında kan dolaşımının bulunmaması, endodontik enfeksiyonların tedavisinde sistemik antibiyotik kullanımını etkisiz kılmaktadır. Bununla birlikte kök kanallarında bulunan mikroorganizma türlerinin dirençleri önemlidir çünkü bu türler vücudun diğer bölgelerinde rezervuar oluşturmaktadır⁹. Ayrıca enterokoklar bakteriyel endokarditin önemli bir etkeni olduğu için endodontik enterokokların antibiyotik duyarlılığı ilgi uyandırmıştır¹²⁷.

Abott et al.¹⁷⁵'a göre kronik alveoler enfeksiyonlar kan desteğine sahip olmayan pulpasız dişler ve lezyonlarla ilişkilidir. Bu yüzden antibiyotiğin sistemik etkisi ve kök kanalına ulaşan az konsantrasyonu faydasızdır. Lokal antibiyotiğin sistemik kullanıma göre iyi yanı sistemik sonuçların ve komplikasyonların önlenmesi ve yüksek konsantrasyonların kullanılabilmesidir¹⁷⁶. Kök kanal tedavisi sırasında uygulanan çoğu antimikrobial ajan, kimyasal antiseptikler veya antibiyotiklerdir. Aynı araştırmacılar kimyasal antiseptiklerin etkili antimikrobial ajan olduğunu ama aynı zamanda memeli hücrelerini de aynı konsantrasyonda öldürebileceğini rapor etmiştir. Bununla birlikte, antibiyotiklerin memeli hücrelerine etkili konsantrasyonlarda bile az toksik olduğunu ve

bunların irrigasyon solüsyonu gibi kısa süreli kullanımlar için uygun olmadığını çünkü etkinliklerini hücre yenileme siklusu sırasında gösterdikleri bilinmektedir¹⁷⁷.

Çoğu enterokok, beta laktamlar (sefalosporinler ve semisentetik penisilinaz dirençli penisilinler), klindamisin, aminoglikozidler ve fluoroginolenların düşük konsantrasyonları dahil çeşitli antimikrobilyallere intrinsik veya doğal olarak dirençlidirler¹²⁷.

Doğal olarak ampisilin ve vankomisine duyarlıdır ama etkisine maruz kalınca bu antibiyotiklere direnç geliştirebilmektedir. Tetrasiklinlere, makrolidlere, glikopeptidlere (vankomisin ve teicoplanin), kloramfenikol ve aminoglikozidler gibi B-laktamların yüksek konsantrasyonlarına direnç geliştirme yeteneğindedir¹²⁷. *E.faecalis*'in antibiyotiklere duyarlılığı çoğu çalışmada çalışılmıştır ve sonuçlar çelişkilidir ve farklı minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleriyle sonuçlanmaktadır¹⁷⁸.

Pinheiro et al.¹⁷⁹ yaptıkları çalışmada *E.faecalis* %45.8 oranında ikincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilmiştir ve bu izolatların benzilpenisilin, amoksisilin ve amoksisilin-klavulonik aside duyarlılıkları araştırılmıştır.

Reynaud et al.¹⁸⁰ yaptıkları çalışmada 23 Litvanyalı ve 36 Finlandiyalı hastanın apikal periodontitisli kök kanal dolgulu dişlerinden elde edilen izolatların penisilin, ampisilin ve vankomisine duyarlılıkları araştırılmıştır.

Hoelscher et al.¹⁷⁸ yaptıkları çalışmada amoksisilin, penisilin, klindamisin, metronidazol, doksisisiklini toz halinde hazırlamış ve Kerr EWT patına belirli oranda eklemiştir ve *E.faecalis*'e etkisini değerlendirmişlerdir.

2.10. Antimikrobiyal Medikamentlerin *E.faecalis*'e Etkisi

Hidrojen peroksit (H_2O_2) dezenfeksiyon ve sterilizasyon için sıklıkla kullanılan bir biosiddir¹⁸¹. Siqueira et al.¹⁸² NaOCl ve H_2O_2 solüsyonlarının birleşiminin ex vivo olarak *E.faecalis*'le kontamine edilen kök kanallarında yalnız başına NaOCl'e göre daha etkili olduğunu bulmuşlardır.

CHX glukonat antimikrobiyal özelliklerinden, düşük toksisitesinden dolayı uzun süredir diş hekimliğinde kullanılmaktadır. CHX'in avantajlarına rağmen, aktivitesi pH'a bağlıdır ve organik madde bulunduğu zaman etkinliği azalmaktadır¹⁸³. Geniş bir antimikrobiyal spektruma sahiptir ve Gr pozitif ve Gr negatif bakterilere ve mantarlara karşı etkilidir¹⁸⁴.

Heling&Chandler¹⁸⁵ irrigant kombinasyonlarının (%3 H₂O₂, CHX ve NaOCl) in vitro olarak dentin tubüllerinin içinde bulunan *E.faecalis*'e karşı antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmişlerdir. CHX'nin antibakteriyel etkisinin daha çok olduğu gösterilmiştir.

Porteiner et al.¹⁸⁶ sığır serum albumininin CHX'in toplam aktivitesini kaybetmesine neden olduğunu saptamışlardır. Bu albumin gibi proteinden zengin iltihabi eksudanın apikal foramenden kök kanalına doğru girişi CHX'nin antibakteriyel aktivitesini zayıflatabileceğini göstermektedir.

Gomes et al.¹⁸⁷ CHX ve NaOCl solüsyonlarının enterokoklar üzerine etkilerinin farklılıklarını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmanın sonuçları Oncag¹⁸⁹ et al. ve Vianna et al.¹⁷⁴ çalışmalarının sonuçlarına benzemektedir.

MTAD doksisisiklin, sitrik asit ve Tween-80 deterjanı içermektedir. Shabahang&Torabinejad¹⁸⁸ çekilmiş insan dişlerinde *E.faecalis* veya tükürükle kontamine edilen kök kanallarında MTAD'nin iyi bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada %1.3 NaOCl irrigasyonu ve MTAD ile final tedavi kombinasyonunun insan dişinin sement ve dentin örneklerinden *E.faecalis*'i elimine ettiği bulunmuştur.

Dentin geçirgenliğinin artması ve kök dentini ile kök kanal dolgusu arasındaki sızıntıdaki azalma, smear tabakasının EDTA'nın yardımıyla uzaklaştırılmasıyla sağlanmaktadır ve buna ek olarak fazla sayıda lateral kanal tıkamak da mümkün olmaktadır. EDTA, kök dentinin geçirgenliğinde artışı ve endodontik aletlerin aktivitesinin artmasını sağlamaktadır. EDTA az bir antibakteriyel etkiye sahiptir, ama smear tabakasının inorganik kısmını uzaklaştırarak diğer irrigantların dentin tubüllerine girişine yardım etmektedir¹⁸⁹. %10'luk sitrik asit solüsyonu EDTA gibi smear tabakasını kaldırır ve *E.faecalis*'e az bir etkisi vardır.

E.faecalis'i elimine etmede etkili olan diğer irrigantlar ozonlanmış su ve stanöz floriddir¹⁹⁰. Ozonlanmış su %2.5'luk NaOCl'le aynı antimikrobial etkiyi göstermiştir. Stanöz florid *E.faecalis*'e göre daha yüksek bir antimikrobial etkiye sahiptir¹³⁵.

Ca(OH)₂ bugünlerde kullanılan en popüler pansuman materyalidir ve *E.faecalis*'e karşı etkinliği tartışma konusudur^{191,192,193}. CHX antibakteriyel potansiyeli ve kolay uygulama özelliğinden dolayı pansuman materyali olarak kullanılmaktadır.

Siren et al.¹⁸⁸ *E.faecalis*' le enfekte edilen dentin bloklarında, Ca(OH)₂ patının %0.5 CHX veya %2/4 İodine potasyum iodid solüsyonlarıyla karışımının dezenfeksiyon etkisini araştırmışlardır¹³⁰.

Sukawat et al.¹⁹⁴ çalışmalarında Ca(OH)₂ ile kamfore edilmiş paramonoklorofenolün karışımının dentin tubülleri içerisinde bulunan *E.faecalis*'i tamamıyla yok ettiğini saptamışlardır. %38 iodoform içeren silikon-yağ esaslı Ca(OH)₂ olan Metapex, *E.faecalis*'le enfekte dentin tubüllerini Ca(OH)₂'e göre daha etkili dezenfekte etmektedir¹⁹⁵. Ca(OH)₂ patına kalaylı florid eklenmesi yalnız başına Ca(OH)₂ patına göre daha etkilidir.

Solüsyonlarda ve pat karışımlarında tespit edilen mikroorganizmanın antibiyotik duyarlılığındaki oluşan farklılıklar, değişik *E.faecalis* türlerine, tedavi protokollerine ve endodontik enfeksiyonun doğasına dayanmaktadır.

Bu çalışmada kök kanallarında *E.faecalis* bulunma sıklığı PCR ve Kültür yöntemi ile araştırılması ve elde edilecek olan izolatların antibiyotiklere ve antimikrobiallere duyarlılıklarının araştırılması hedeflenmiştir.

2.11. Antifungallerin *C.albicans*'a Etkisi

Kök kanal enfeksiyonunda lokal antibiyotik ajanların kullanımına yıllar boyunca ilgi duyulmuştur. Bununla birlikte, antibiyotik karışımlarının tamamen dentini dezenfekte ettiği veya daha yüksek başarı oranı gösterdiğine dair bilgi yoktur ve lokal antimikotik maddelerin geleneksel lokal dezenfeksiyon ajanlarından daha iyi sonuç verdiğinin delili yoktur²⁵. 1950'lerden 1970'lere kadar enfekte kök kanallarının tedavisinde antibiyotikli preparatlar kullanılmıştır. Çoğu antibiyotikli pat nistatin veya sodyum kaprilat gibi antifungal ajanları içermektedir¹⁰.

Waltimo et al. inatçı apikal periodontitisli ve marjinal periodontitisli dişlerden *C.albicans* türünün 5 farklı antifungal ajana (amfoterisin-B, fluorocytosine, flukanazol, mikonazol ve klotrimazol) karşı direncini karşılaştırmışlardır³⁰.

Ateş et al.¹⁹⁶ yaptıkları çalışmada *C.albicans*'ın 2 klinik ağız içi izolatu ve bir standart türü çalışmaya dahil edilmiştir. Test solüsyonları olarak EDTA, etilenglikoltetraasetik asit (EGTA), sodyum florid (NaF), titanyum tetraflorid, nistatin ve ketokanozol kullanılmıştır. Solüsyonların MIC ve minimum fungisidal konsantrasyonları saptanmıştır.

Şen et al.¹⁹⁷ yaptıkları çalışmada yukardaki çalışmadaki gibi *C.albicans*'ın 2 klinik ağız içi izolatu ve bir standart türü çalışmaya dahil edilmiştir. Test solüsyonları olarak NaOCl, EDTA, CHX, hexetidine, benzalkonium chloride, povidone- iodine, nistatin ve ketokanozol kullanılmıştır. Bu solüsyonların antifungal etkilerine karar vermek için agar difüzyon metodu kullanılmıştır.

2.12. Antimikrobiyal Medikamentlerin *C.albicans*'a Etkisi

Antimikrobiyal medikamentlerden biri olan NaOCl, %0.5'den %5.25 kadar değişen konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Güçlü bir antimikrobiyal ajandır ve pulpa artıklarını ve dentinin organik içeriklerini etkili bir şekilde çözmektedir. %0.5-%5.25 konsantrasyonlarda tamponlanmamış solüsyon olarak kullanıldığında pH 11, bikarbonat ile tamponlandığında pH 9'dur.¹⁸¹ İyot preparasyonları NaOCl ile birlikte kullanıldığında mantarlara karşı ek bir etki göstermez çünkü aynı aktiviteye sahiptir. Buna ek olarak, iodine dişleri boyar ve potansiyel olarak allerjiktir.

Waltimo et al.³⁰ ve Viana et al.¹⁹⁸ %0.5 ve %5 NaOCl solusyonunun mantarlar üzerine olan antimikrobiyal etkisini değerlendirmişlerdir.

Şen et al.¹⁹⁹ %0.12 CHX, %1 NaOCl ve %5 NaOCl'ün antifungal özelliklerini araştırmışlar. Aynı araştırmacılar, EDTA'nın *C.albicans* üzerine antifungal etkisini diğer dezenfektanlarla kıyaslamıştır. Smith ve Wayman, sitrik asit ve NaOCl'ün antimikrobiyal etkinliğini araştırmışlardır²⁰⁰. Ferguson et al.¹⁹⁰ NaOCl, hidrojen peroksit ve CHX diglukonatın *C.albicans*'a etkisini değerlendirmişlerdir.

EDTA kanal tedavisinde en sık kullanılan şelatördür ve dentinin inorganik içeriğini eriterek smear tabakasını ortadan kaldırır²⁰¹. EDTA'nın antimikrobial etkinliği tarif edilmiştir ama günümüzde direkt temas testinde, diğer endodontik irrigantlarla karşılaştırıldığında mantarları öldürme yeteneği tam olarak bilinmemektedir²⁸.

EDTA'nın 2 yolla antifungal aktivite gösterdiği bulunmuştur¹⁰. Antikolonizasyon özelliğiyle *C.albicans*'ın adeziv özelliğini azaltmaktadır, büyüme engelleyici özelliğiyle *C.albicans*'ın Ca ihtiyacını hem hücre duvarından hem de ortamdan uzaklaştırarak, metabolik aktivitesini ve patojenitesini azaltarak etki etmektedir.

CHX 1962'den beri diş hekimliğinde antibakteriyel ajan olarak kullanılmaktadır. CHX genellikle antiseptik ürünlerde en sık kullanılan biosiddir. CHX hücre duvarına

veya en dış membrandan bakterinin sitoplazmasına veya daha alt membranına veya mantarın plazma membranından içeri girme yeteneğine sahiptir. CHX'nin yüksek konsantrasyonları hücreler arası içeriklerin koagülasyonuna neden olmaktadır¹⁹⁸.

Ca(OH)₂'in etkili sıvı dezenfektanlarla birleşimi gelişmiş bir pansuman sağlamaktadır. Bu artan antimikrobiale spektrum *C.albicans* gibi inatçı mikroorganizmalara etki etmektedir¹⁸¹. Ca(OH)₂'in NaOCl veya CHX solüsyonlarıyla birleşimi sıvı Ca(OH)₂ suspansiyonlarının alkaline kapasitesini sürdürmektedir ve dentin tübüllerini dezenfekte etme etkinliğini artırmaktadır²⁵.

Siquiera et al.¹⁷⁷ in vitro olarak *C.albicans* ile enfekte edilen sıgır dentininde 4 kanal içi medikamentin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bunlar Ca(OH)₂/CPMC/G patı, CHX/Çinko oksit patı, Ca(OH)₂/G patı ve Ca(OH)₂/CHX patıdır.

Waltimo et al.²⁰² 7 *C.albicans* türünün iodyen potasyum iodyen, CHX asetat, NaOCl ve Ca(OH)₂' e karşı duyarlılığını değerlendirmişlerdir.

Bu çalışmada kök kanallarında *C.albicans* bulunma sıklığı PCR ve Kültür yöntemi ile araştırılması ve elde edilecek olan izolatların antimikotiklere ve antimikrobiyalere duyarlılıklarının araştırılması hedeflenmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışmaya katılan tüm hastalar tedavinin ilk seansında Hasta Onam formunu okudu ve imzaladı.

Hastalar Çukurova Üniversitesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Ana Bilim Dalı kliniğine kök kanal tedavisi yaptırmak için başvuran kişiler arasından seçildi. Bu çalışmada 117 birincil enfeksiyonlu (nekrotik pulpalı) diş sahip 100 hasta ve 114 ikincil enfeksiyonlu (apikal periodontitisli ve eski kanal tedavili) diş sahip 70 hastanın kök kanallarından ve tükürüğünden tek araştırmacı tarafından mikrobiyolojik inceleme için örnekler alındı. Komplike sistemik hastalıkları olan, hemen tedavi öncesi antibiyotik kullanmış olan, ağız ortamına açık pulpa odasına sahip olan, rubber-dam takılması mümkün olmayan ve ikincil enfeksiyonlu dişlerde eski kök kanal tedavisi sökülemeyen ve tedavi sürecine uyum göstermeyen hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Bütün hastalardan çalışma öncesi radyograflar alındı ve PAI²⁰³ indeksine göre sınıflandırıldı. PAI indeksinin kullanımı için araştırmacının kendi kararları içinde kalibrasyonu yapıldı. PAI indeksi toplam 5 skor içermektedir. Bu skorlar:

1. Periapikal dokular normal
2. Kemik yapısında çok az miktarda değişiklik var
3. Kemik yapısında mineral kaybı ile görülen değişiklikler var
4. İyi tanımlanabilen radyolusent alanlar gözlenebilen apikal periodontitis var
5. Çok geniş radyolusent alanlar gösteren yaygın apikal periodontitis var.

Ayrıca hastaların yaşı, cinsiyeti, dişin lokalizasyonu, semptom ve fistül varlığı kaydedildi. Çalışmaya dahil edilen hastalara ait tanısal faktörler çizelge 3.1 de gösterildi.

Çizelge 3.1: Tanısal faktörler

Tanısal faktörler		Birincil Enfeksiyon (n:100 hasta, 117 diş)		İkincil Enfeksiyon (n:70 hasta, 114 diş)	
		n	%	n	%
Yaş	≤45	62	62	55	79
	>45	38	38	15	22
Cinsiyet	Erkek	39	39	24	34
	Kadın	61	61	46	66
Dişin yeri	Maxilla	80	68	65	57
	Mandibula	37	32	49	43
	Anterior	94	80	59	52
	Posterior	23	20	55	48
Semptom	Var	55	47	48	42
	Yok	62	53	66	58
PAI	≤2	22	18	33	29
	>3	95	82	81	71
Fistül	Var	29	23	20	18
	Yok	88	77	94	82

3.1. Tükürükten Örnek Alınması

Çalışmaya katılan tüm hastaların tedavileri başlamadan önce steril kurutma kağıtları dil altında 2 dakika bekletilerek tükürük örnekleri alındı. Örnekler kültür yöntemi için thioglukolatlı buyyona ve PCR yöntemi için TE buffera aktarıldı. DNA ekstraksiyonu yapılana kadar -20 °C’de saklandı.

3.2. Kök Kanalından Örnek Alınması

Tedavi edilecek diş pomza ve lastikle temizlendikten sonra rubber dam yerleştirildi. Rubber dam’ın sızıntısını önlemek için klemp ve diş çevresine dişeti bariyeri sürüldü ve UV ışıkla sertleştirildi. Diş ve rubberdam Möller tarafından tanımlanan metod²⁰⁴ ile %30 hidrojen peroksit, %5 NaOCl ile silindi. Steril frezler ile pulpa odası açıldıktan sonra giriş kavitesi ve rubber dam %5 NaOCl ile yeniden silindi ve artık NaOCl, %5 sodyum tiosülfatla inaktive edildi. Dekontaminasyon aşamalarının etkinliğini kontrol etmek için, kök kanalına girmeden önce giriş kavitesinden steril pamukla alınan örnek thioglukolat besiyeri içerisine aktarıldı.

Mikrobiyolojik inceleme için örnekler, röntgen ve apeks bulucu ile belirlenen kanal boyunda ucu kesilmiş 15’lik K tipi steril kanal eğesi yerleştirildi, 2 dakika eğeleme işlemi yapıldıktan sonra kanal eğesi thioglukolat besiyeri içerisine aktarıldı. Kök kanalları steril serum fizyolojik (SF) ile nemlendirildi ve her diştten her biri en az 1

3 dakika bekletilen 3 tane steril paper point ile örnekler alındı ve TE buffera aktarıldı. PCR ile *Enterokok*, *E.faecalis* ve *C.albicans* hedef dizilerinin tespiti için TE bufferlar DNA ekstraksiyonu yapılanaya kadar -20°C’de saklandı.

İkincil enfeksiyonlu hasta grubunda eski kanal dolgusu gates-glidden frezlerle, döner Ni-Ti veya K-file eğelerle herhangi bir kimyasal çözücü kullanılmadan uzaklaştırıldı.

Çok köklü dişlerde örnek eksudasyon bulunan kanaldan veya periapikal radyolusensi gösteren kökten, diğer kanalların ağzı steril pamuk peletlerle kapatıldıktan sonra alındı.

Örnek alma işlemleri tamamlandıktan sonra hastaların çoğunda kök kanal tedavileri bir hafta arayla 2 seansta yapıldı. Sadece birincil enfeksiyonlu dişlerde apikal rezeksiyon operasyonu geçirecek hastaların tedavileri tek seansda yapıldı. İki seanslı tedavilerde birinci seansta eğeleme ve pansuman işlemleri yapıldıktan sonra dişler en az 3 mm geçici dolgu maddesi (Cavit, Espe Dental, Seefeld, Almanya) ile restore edildi. Hastalara herhangi bir sistemik reçete yazılmadı ancak ağrıları olursa ağrı kesici alabilecekleri söylendi.

İlk randevudan bir hafta sonra hastalar kanal dolgusu için çağrıldı ve oluşan postoperatif ağrının derecesi aşağıdaki parametrelere göre değerlendirildi.

1. Ağrı yok
 2. Hafif ağrı: fark edilebilir fakat rahatsız edici olmayan, ağrı kesici almaya ihtiyaç olmayan ağrı.
 3. Orta derecede ağrı: rahatsız edici fakat dayanılabilir bir ağrı (eğer ağrı kesici kullanıldıysa etkili).
 4. Şiddetli ağrı: dayanılması çok güç ve ağrı kesiciler ağrıyı geçirmede etkisiz
- Dördüncü derecedeki ağrı tipi flare-up (alevlenme) olarak kaydedildi.
- Tüm hastaların kök kanal dolguları guta perka ve AH plus patı ile lateral kondenzasyon yöntemi ile dolduruldu ve daimi restorasyonları yapıldı.

3.3. Örneklerin Kültür Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Mikroorganizmaların izolasyonu amacı ile thioglukolatlı buyyona alınan dil, pamuk ve ege örnekleri +4°C ve en geç iki saat içerisinde Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilimdalı laboratuvarına ulaştırıldı. Örnekler 37 °C’de 24

saat inkübasyona bırakıldı. Sterilizasyon işleminin kontrolü için alınan pamuk örneklerinde üreme oluştuğunda sterilizasyon işleminin başarısızlığından dolayı o örnekler çalışmadan çıkartıldı. Kök kanalından kanal egesi ve dil altından kurutma kâğıtları ile alınan örneklerde 24 saat sonunda üreme görülen sıvı besiyerlerinden, Enterokok türlerinin izolasyonu için %7 koyun kanlı agar besiyerine, *C.albicans* izolasyonu için de SDA besiyerine pasajlar yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri %5 CO₂'li atmosferde 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda besiyerlerinde üreyen koloniler makroskopik ve mikroskopik morfolojik özellikleri, % 6.5 NaCl tolerans testi, karbonhidrat fermentasyon özellikleri ve germ tüp oluşturma özelliklerine göre tanımlandı. Makroskopik ve mikroskopik morfolojik özellikleri, katalaz aktivitesi ve tuz tölerans testi sonuçları enterokok ile uyumlu olan izolatlar tip tayini için, 16S rRNA genindeki 310 bplik tip spesifik bölgeyi hedef alan primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi ile amplifikasyon yapıldı.

3.4. Kök Kanallarından Elde Edilen *E.faecalis* ve *C.albicans* İzolatlarının Antibiyotik, Antimikotik ve Antimikrobiyallere Karşı Duyarlılıklarının Ölçülmesi

Hastaların kök kanallarından izole edilen 26 *E.faecalis* izolatının 18'i (11 birincil enfeksiyonlu, 7 ikincil enfeksiyonlu dişlerden) ve 30 *C.albicans* izolatının 18'i (12 birincil enfeksiyonlu, 6 ikincil enfeksiyonlu dişlerden) çalışmaya dahil edildi. Bu izolatların antibakteriyel (Vankomisin, Penisilin, Spiramisin, Kolitsin) ve antimikotik (Amfoterisin B, Flukonazol, Ketokanozol, Nistatin) ajanlar ve kanal içi irrigasyon solüsyonları ve pansuman kombinasyonlarına karşı duyarlılıklarının tespiti amacıyla değerlendirmeye alındı. Bu izolatlar haftalık pasajlar yapılarak +4 °C'de buzdolabında saklandı.

E.faecalis olarak tanımlanan suşların Penisilin, Vankomisin, Kolistin ve Spiramisine karşı duyarlılıkları; Mueller-Hinton agar (MHA)'da agar dilüsyon yöntemi ile, *C.albicans* olarak tanımlanan suşların ise Amfoterisin B, Nistatin, Ketokanozol ve Flukonazole duyarlılıkları ise SDA da agar dilüsyon yöntemiyle değerlendirildi. *E.faecalis* ve *C.albicans* izolatlarının, irrigasyon solüsyonu olarak kullanılan %5 NaOCl, %2.5 NaOCl, %17 EDTA ve %2 CHX'e duyarlılıklarını tespiti için strip difüzyon yöntemi; kanal içi pansumanı olarak kullanılan G-Ca(OH)₂, SF-Ca(OH)₂ ve

CHX-Ca(OH)₂ kombinasyonlarına duyarlılıkların tespiti için de agar difüzyon yöntemi uygulandı. Bu çalışmada kullanılan besiyerleri ve içerikleri çizelge 3.2 gösterilmektedir.

Çizelge 3.2: Çalışmada kullanılan besiyerleri ve içerikleri

Thioglukolat buyyon	Kanlı agar besi yeri	SDA	MHA
Yeast ekstrakt 5 gr	Blood agar base 40gr (Kat. No: CM 0055)	Sabouraud agar (Merck- Kat No 1.05438.0500) 260 gr	MHA 136 gr (Merck Kat. No 1.05437.0500)
Casitone 15 gr	Distile su 1000 ml	Distile su 4000ml	Distile su 4000 ml
Dekstroz 5 gr			
NaCl 2,5 gr			
L-sistin 0,5 gr			
Sodiumthioglycolate 0,5gr			
Agar 0,75 gr			
Rezasurine (%1'lik solüsyon) 1ml			
Distile su 1000 ml pH 7,2			

3.4.1. *E.faecalis* İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılığının Tespiti

MHA antibiyotik duyarlılık testi için kullanıldı. Besiyeri açık otoklavda homojen hale getirildi. Daha sonra steril mezür yardımı ile 250 ml'lik balonlara ayrıldı ve otoklavda 121 °C de 15 dakika steril edildi

Agar dilüsyon testi için 45 °C ye kadar soğuması beklenen besi yerlerine, distile su içerisinde dilue edilerek hazırlanan antibiyotikler Çizelge 3.3'de gösterilen konsantrasyonlarda ilave edilerek çeşitli konsantrasyonlarda test besiyerleri hazırlandı. Çalışmada üremenin pozitif kontrolü amacı ile bir balondaki besiyerine antibiyotik ilave edilmedi.

Çizelge 3.3: Çalışmada kullanılan antibiyotik konsantrasyonları ve antibiyotikler için kullanılan solvent ve dilüentler.

Antibiyotik	Vankomisin (SİGMA V-2002)	Penisilin (Kristasil, BİLİM)	Spiramisin (Rovamycin tablet, Eczacıbaşı)	Kolistin (SİGMAC-4461)
Solvent	Distile su	Distile su	Distile su	Distile su
Dilüent	Distile su	Distile su	Distile su	Distile su
Konsantrasyonları	0,1-0,5-1-2-4-16- 32 µg/ml	0,5-1-2-4-8-16 µg/ml	0,5-1-5-10-20 µg/ml	0,1-0,5-1-2-4 µg/ml

3.4.2. *C.albicans* İzolasyonu ve Antimikotik Duyarlılığının Tespiti

C.albicans izolasyonu ve antimikotik duyarlılığının tespiti için ticari olarak sağlanan SDA besiyeri kullanıldı. Besiyeri açık otoklavda homojen hale getirildi. Daha sonra steril mezür yardımı ile 250 ml'lik balonlara ayrıldı ve otoklavda 121 °C de 15 dakika steril edildi.

Agar dilüsyon testi için 45 °C ye kadar soğuması beklenen besi yerlerine, antibiyotikler (penisilin 1000000 ü/lt ve gentamisin 80 gr/lt) ilave edildi. Antimikotik maddelerin stok solüsyonları Çizelge 3.4'de gösterilen solvent ve dilüentleri içerisinde dilue edilerek hazırlandı ve antimikotikler bu çizelgede gösterilen konsantrasyonlarda ilave edilerek test besiyerleri hazırlandı. Çalışmada üremenin kontrolü amacı ile bir balondaki besiyerine antimikotik ilave edilmedi.

Çizelge 3.4: Çalışmada kullanılan antimikotiklerin konsantrasyonları ve antimikotikler için kullanılan solvent ve dilüentler.

Antimikotik	AmfoterisinB (SİGMA, A4888)	Flukonazol (Triflucan,PFİZER)	Ketokanozol (Ketoral,BİLİM)	Nistatin (SİGMA, N9767-5MU)
Solvent	DMSO	Solüsyon	DMSO	DMSO
Dilüent	% 0,85 NaCl	% 0,85 NaCl	% 0,85 NaCl	% 0,85 NaCl
Konsatrasyonları	0,25-0,5-1-2-4 µg/ml	8-16-32-64-128 µg/ml	0.5-8-16-32 µg/ml	0,25-0,5-1-2-4 µg/ml

DMSO: Dimetil sulfoksit

3.5. Çalışmada Kullanılan Duyarlılık Testleri

3.5.1. Agar Dilüsyon Yöntemi

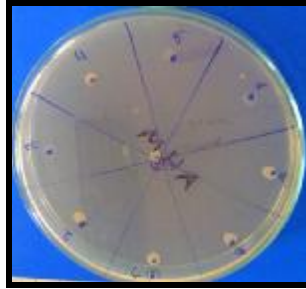
E.faecalis için antibiyotik duyarlılık testleri; The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M7-A7. 2006) önerilerine göre, agar dilüsyon yöntemi ile yapıldı. Çalışmada MHA besiyeri kullanıldı. Antibiyotik duyarlılığı test edilecek olan, klinik örneklerden izole ve identifiye edilmiş *E.faecalis* suşlarından, çalışmadan 24 saat önce tek koloni alınarak, kanlı agar besiyerine pasaj yapıldı. Besiyeri 37 °C de bir gece inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon periyodu sonunda üreyen taze koloniler çalışmada kullanıldı. Besiyerinin yüzeyinde üreyen koloniler SF ile toplandı ve 0,5 Mc Farland

bulanıklık standardına eşdeğer yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edilecek şekilde sulandırıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: 0,5 Mc Farland bulanıklık standardına eşdeğer yoğunlukta hazırlanan bakteri süspansiyonları

Daha önceden hazırlanan ve farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren MHA besiyerlerine, plak üzerinde her izolat için daha önceden işaretlenmiş alanlara, hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 5 µl miktarında damlatılarak ekimler yapıldı. Plaklar bakterilerin absorpsiyonuna imkan sağlamak üzere oda ısısında 15 dakika bekletildi. Ayrıca üremenin pozitif kontrolü amacı ile her örnekten yine 5 µl alınarak antibiyotiksiz MHA besiyerine damlatılmak sureti ile inokülasyonlar yapıldı. Besiyerleri 37°C de 24 saat inkübe edildi.



Şekil 3.2: *E.faecalis* üremesinin pozitif kontrolü için her örnekten antibiyotiksiz MHA besiyerine yapılan ekimlerin 37 °C de 24 saat inkübasyon süresinden sonra görülen üremeler

İnkübasyon süresinin sonunda farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren besiyerlerinde üremeler, antibiyotiksiz MHA besiyerindeki üreme (Şekil 3.2) ile kıyaslanarak semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Üremenin tamamen engellendiği konsantrasyonun bir tüp öncesi MIC90 değeri olarak kabul edildi.

C.albicans için de antimikotik duyarlılık testlerinde de farklı konsantrasyonlarda bu yöntem kullanıldı (CLSI, M27-A). Test için örneklerden izole edilen ve stoklanan *C.albicans* suşlarının, SDA da üretilen gecelik subkültürleri kullanıldı. İnkübasyon sonunda SDA yüzeyinde üreyen *C.albicans* kolonileri steril SF ile toplandı ve 0.5 Mc Farland bulanıklık standardına eşdeğer yoğunlukta süspansiyon elde edilecek şekilde sulandırıldı. Daha önceden hazırlanan ve farklı konsantrasyonlarda antimikotik içeren SDA besiyerlerinde, plak üzerinde her izolat için daha önceden işaretlenmiş alanlara hazırlanan mikroorganizma süspansiyonlarından 5 µl miktarında damlatılarak ekimler yapıldı. Plaklar mikroorganizmaların absorpsiyonuna imkân sağlamak üzere oda ısısında 15 dakika bekletildi. Ayrıca üremenin pozitif kontrolü amacı ile her örnekten yine 5 µl alınarak antimikotiksiz SDA besiyerine damlatılmak sureti ile inokülasyonlar yapıldı. Besiyerleri 37°C de 24 saat inkübe edildi.



Şekil 3.3: *C.albicans* üremesinin pozitif kontrolü için her örnekten antimikotiksiz SDA besiyerine yapılan ekimlerin 37 °C de 24 saat inkübasyon süresinden sonra görülen üremeler.

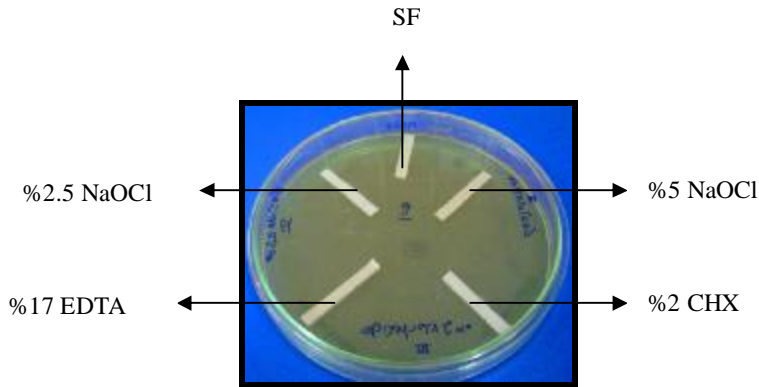
İnkübasyon süresinin sonunda farklı konsantrasyonlarda antimikotik içeren besiyerlerinde üremeler, antimikotiksiz SDA besiyerindeki üreme (Şekil 3.3) ile kıyaslanarak semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Üremenin tamamen engellendiği konsantrasyonun bir tüp öncesi MIC90 değeri olarak kabul edildi.

3.5.2. Strip Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon testi, The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M2-A9. 2006) standartlarında stripe modifiye edilerek yapıldı.

İrrigasyon solüsyonlarının antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirilmesinde strip difüzyon testi kullanıldı. Duyarlılık testi için %5 NaOCl, %2,5 NaOCl, %17 EDTA ve %2 CHX irrigasyon solüsyonları kullanıldı. Whatman-3 filtre kağıtları 0,5x4 cm ebadında kesilip steril edildikten sonra irrigasyon solüsyonları içerisine daldırıldı. Stripler maksimum emiş potansiyelleri dikkate alınarak 5 dakika dezenfektan solüsyonu içerisinde bekletildi. Daha sonra steril petri kutuları içerisinde 1-2 dakika bekletilerek üzerilerindeki absorbe olmamış fazla solüsyonun uzaklaştırılması sağlandı.

Klinik örneklerden üretilen test suşlarının Mc Farland 0.5 bulanıklık standardına eşdeğer yoğunlukta elde edilen süspansiyonlardan, daha önce agar diffüzyon testinde belirtildiği gibi, hazırlanan eküvyonlar *E.faecalis* suşları için antibiyotiksiz MHA besiyerine, *C.albicans* içinde SDA besiyerine yüzeye sürülerek ekilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri oda ısısında 15 dakika bekletilerek mikroorganizmaların yüzeye adezyonları sağlandı ve daha sonra dezenfektan solüsyonu ile hazırlanan test stripleri besiyerlerine radyal olarak yerleştirildi (Şekil 3.4). Üremenin pozitif kontrolü için SF içerisinde bekletilen stripler negatif kontrol olarak kullanıldı. Etüvde 37°C de 24 saat inkübe edilen besiyerlerinde oluşan inhibisyon zonları ölçüldü.

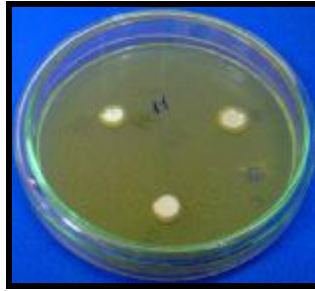


Şekil 3.4: Strip Difüzyon Testi

3.5.3. Agar Difüzyon Yöntemi

Kanal içi pansumanda kullanılan G-Ca(OH)₂, SF-Ca(OH)₂ ve CHX-Ca(OH)₂'in klinik izolatlar üzerine antimikrobiyal ve antimikotik etkisini tespit için agar difüzyon yöntemi uygulandı.

Antibiyotiksiz olarak hazırlanan MHA ve SDA plaklarında steril bir pipet ile 5 cm aralıklarla 6 mm çapında 5mm derinlikte 4 adet kuyucuk açıldı. Daha önce anlatıldığı gibi test edilecek mikroorganizmaların SF içerisinde McFarland 0.5 bulanıklık standardına eşdeğer yoğunlukta süspansiyon elde edilecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarını içeren tüplerin içerisine steril pamuklu eküvyon daldırılıp iki dakika bekletildi. Daha sonra eküvyonlardan fazla süspansiyonu uzaklaştırmak için tüp civarında rotasyonel hareketlerle bastırılarak çıkartıldı. Bu eküvyonlar MHA besiyeri yüzeyine sürülerek test mikroorganizmalarının ekim işlemi tamamlandı. *C.albicans* içeren tüplerden çıkartılan eküvyonlarda SDA besiyeri yüzeyine sürülerek mikroorganizmaların besiyerine ekim işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra besiyerlerinde önceden açılan her bir kuyucuğa sırası ile 140 µl (kuyucuklardan taşmayacak şekilde) G-Ca(OH)₂, SF-Ca(OH)₂ ve CHX-Ca(OH)₂ patları konuldu. Son kuyucuğa ise üremenin pozitif kontrolü için 140 µl SF konuldu (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Agar Difüzyon Testi

Ekim yapılan plaklar etüvde 37°C de inkübe edildi. Besiyeri üzerinde kuyucukların etrafında oluşan inhibisyon zonları 1., 4. ve 7. günlerde ölçüldü.

3.6. Örneklerin PCR Yöntemi İle Değerlendirilmesi

Kök kanallarından ve tükürükten TE buffera alınan ve -20 C’de saklanan klinik örneklerdeki *Enterokok*, *E.faecalis* ve *C.albicans* suşlarının hızlı tanısı için in house-PCR yöntemi uygulandı.

Klinik örneklerdeki hedef dizilerin spesifik primerler yardımı ile termal döngü cihazında (Applied Biosystem 2720 Termal Döngü Cihazı, SİNGAPUR) in-vitro şartlarda amplifikasyonu ve ampliconların spesifik DNA markerları ile birlikte agaroz-jel’de elektroforez sonucu oluşan band büyüklüklerine göre tespiti esasına dayalı tanı metodu 3 aşamada gerçekleştirildi. Bunlar: örneklerden DNA’nın ekstraksiyonu, ekstrakte DNA’nın amplifikasyonu ve ampliconların agaroz-jelde görüntülenmesidir.

3.6.1. DNA Ekstraksiyonu

Bu çalışmada *E.faecalis* 97008 nolu suş ve *C.albicans* 90028 nolu suş Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonundan temin edildi ve pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Bu çalışmada kök kanal örneklerinden ve tükürükten *Enterokok*, *E.faecalis* ve *C.albicans* DNA’larının ekstraksiyonu için; QIAGEN QIA amp DNA Mini Kit (Lot No: 11872534, Kat No: 51304 Qiagen Sciences, Maryland, 20874, USA) doku ekstraksiyon kiti kullanıldı. Uygulamada üretici firmanın önerilerine sadık kalındı. Ekstraksiyon 8 basamakta tamamlandı. Bu aşamalar;

1-Yaklaşık 100 µl pellet örnekleri 1.5 ml’lik eppendorf tüplerine alındı. Bunların üzerlerine 180 µl ATL buffer ve 20 µl proteinaz K eklenip vortekslendi ve 56 °C’de kuru ısı bloğunda (VMR Digital Heatblock, Kat No: 13259-062, USA) bir gece bekletilerek lizis olması sağlandı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Kuru ısı bloğu

2-İnkübasyondan sonra kapakta sıvı kalmaması için örnek tüpleri kısa süreli santrifüj (Herolab Micro Cen 13 D, ALMANYA) edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Herolab Micro Cen 13 D santrifüj cihazı

Daha sonra tüplere 200 µl AL buffer eklenip 15 saniye pulse vortex yapıldı, vortex sonrası tüpler 70 °C de 10 dakika bekletildi, süre sonunda tüpler tekrar kısa süreli santrifüj edildi.

3-Daha sonra tüplere 200 µl % 96 etanol eklenip 15 saniye pulse vortex yapıldı, sonra kısa süreli santrifüj edildi.

4-Örnek tüplerindeki son karışım 2 ml'lik toplama tüpü içindeki QIA amp spin kolonlara kenarlarını ıslatmadan boşaltıldı ve 6000 x G'de 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, içi sıvı dolu olan alttaki toplama tüpü atıldı.

5-Filtrenin üzerine kenarlarını ıslatmadan 500 µl AW1 yıkama solüsyonu eklendi ve daha sonra bu tüpler 6000 x G'de 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, içi sıvı dolu olan tüp atıldı.

6-Tüp içerisindeki filtrenin üzerine kenarlarını ıslatmadan 500 µl AW2 yıkama solüsyonu eklendi 20000 x G'de 3 dakika santrifüj edildi. Spin kolon 1,5 ml'lik yeni bir eppendorf tüpüne aktarıldı.

7-Üzerine 200 µl AE buffer eklendi ve oda ısısında 1 dakika bekletildi, 6000 x G'de 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolon atılmış ve tüpteki sıvı kalıp DNA olarak kullanıldı.

8-Ekstrakte edilmiş DNA içeren tüpler, spektrofotometrede (Che Bios Optimum-One, UV-Vis Spektrofotometre, İTALYA) 260 nm dalga boyunda DNA yoğunluğu yönünden incelendi (Şekil 3.8) ve $>3\mu\text{g/ml}$ yoğunluktaki örnekler amplifikasyon için $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.



Şekil 3.8: Che Bios Optimum-One, UV-VİS Spektrofotometre

3.6.2. Amplifikasyon

3.6.2.1. *Enterokok* Genusu Amplifikasyonu

Enterokok genusunun genomunda yer alan konservatif ve spesifik tuf genine ait, 112 bp uzunluğundaki gen bölgesinin amplifikasyonu hedeflendi. Amplifikasyon için F:5 'TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G 3' ve R:5 'AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC 3' primer (SİGMA, ALMANYA) kullanıldı.

Amplifikasyon 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, her bir dNTP'den 200 μM , her bir primerden 25 pmol, 2.5 U Taq polymerase ve 5 μl kalıp DNA içeren toplam 50 μl PCR karışımında gerçekleştirildi. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Applied Biosystem 2720 Termal Döngü Cihazı

Amplifikasyon aşamaları 95°C’de 15 dakika ön denaturasyon işleminden sonra 35 siklus çizelge 3.5’deki gibi ısı ve zaman ayarlarında denaturasyon, bağlanma ve uzama aşamalarını içeren siklus tekrarlandı, son siklustan sonra 72°C’de 5 dakika - son uzama ile amplifikasyon işlemi tamamlandı.

Çizelge 3.5: PCR şartlarında kullanılan oligonükleotid primer çiftleri

Parametreler	<i>Enterokok</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>C.albicans</i>
Sequence (5' - 3')^a	TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G	GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG	GCC GGT GAC GAC GCT CCA AGA GCTG
	AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC	CCG TCA GGG GAC GTT CAG	CCG TGT TCA ATT GGG TAT CTC AAG GTC
Uzunluk (bp)	112 bp	310 bp	158 bp
Referans	122	138	205
Denaturasyon	94°C’de 15 saniye	94°C’de 30 saniye	95°C’de 1 dakika
Bağlanma	55°C’de 15 saniye	60°C’de 1 dakika	55°C’de 30 saniye
Uzama	72°C’de 45 saniye	72°C’de 1 dakika	72°C’de 1 dakika
Final uzama	72°C’de 5 dakika	72°C’de 2 dakika	72°C’de 10 dakika

^a Üstteki primer Forward primer ve alttaki primer Reverse primerdir.

3.6.2.2. *E.faecalis* Amplifikasyonu

E.faecalis varlığını göstermek için bu mikroorganizmanın 16S rRNA gen bölgesinde yer alan, tür spesifik ve konservatif olan, 310 bp uzunluğundaki fragmentin amplifikasyonu hedeflendi. Amplifikasyon için F: 5 ‘GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG3’ ve R: 5 ‘CCG TCA GGG GAC GTT CAG 3’ primerler kullanıldı.

Amplifikasyon 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, her bir dNTP’den 200 µM, her bir primerden 25 pmol, 2.5 U Taq polymerase ve 5 µl kalıp DNA içeren toplam 50 µl PCR karışımında gerçekleştirildi. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon aşamaları 95°C’de 15 dakika ön denaturasyon işleminden sonra 35 siklus çizelge 3.5’deki gibi ısı ve zaman ayarlarında denaturasyon, bağlanma ve uzama aşamalarını içeren siklus tekrarlandı, son siklustan sonra 72°C’de 2 dakika - Son uzama ile amplifikasyon işlemi tamamlandı.

3.6.2.3. *C.albicans* amplifikasyonu

C.albicans genomunda yer alan, 158 bp uzunluğundaki iyi korunmuş ve tür spesifik olan fragmentin amplifikasyonu hedeflendi. Amplifikasyon için F: 5 ‘GCC GGT GAC GAC GCT CCA AGA GCT G 3’ ve R: 5 ‘CCG TGT TCA ATT GGG TAT CTC AAG GTC 3’ primer dizileri kullanıldı.

Amplifikasyon 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, herbir dNTP’den 200 µM, herbir primerden 25 pmol, 2.5 U Taq polymerase ve 5 µl litre kalıp DNA içeren toplam 50 µl PCR karışımında gerçekleştirildi. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon aşamaları 94°C’de 4 dakika ön denaturasyon işleminden sonra 35 siklus çizelge 3.5’ deki gibi ısı ve zaman ayarlarında denaturasyon, bağlanma ve uzama aşamalarını içeren siklus tekrarlandı, son siklustan sonra 72°C’de 10 dakika - Son uzama ile amplifikasyon işlemi tamamlandı.

3.6.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

PCR ile amplifikasyon işlemi sonucu elde edilen ampikonların tespiti için ampikonlar 100 bp lik Step ladder ile birlikte, % 0.5 Etidyum bromid içeren %2’lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Ethidyum bromide ile boyanan DNA parçaları UV altında incelenmiştir. Oluşan bantın büyüklüğü, “DNA step ladder” ile kıyaslanarak belirlenmiştir.

3.6.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme İçin Kullanılan Tamponlar

3.6.3.1.1. 10xTBE Stok Tamponunun Hazırlanması

Hem agarozun hazırlanmasında hem de tank tamponu olarak kullanıldı.

Tris-Base	108.0 gr
Borik asit	55.0 gr
EDTA	8.3 gr
Distile su	1000 ml

Tris, EDTA ve borik asit balon içerisindeki distile su ile eritilerek homojen hale getirildikten sonra 0.1N NaOH ve 0.1N HCl kullanılarak pH 8.3’e ayarlandı.

3.6.3.1.2. Yükleme Tamponu

PCR ile amplifiye edilmiş DNA fragmentlerinin elektroforez jelindeki hareketlerinin takibi amacı ile kullanıldı.

Sükroz	2.000 gr
Bromfenol mavisi	0.025 gr
1X TBE	10 ml

Stok 10xTBE' den distile su ile 1xTBE hazırlandı. Sükroz ve Bromfenol mavisi bu tampon içerisinde çözüldü.

3.6.3.2. Uygulama

1-Elektroforez için %2'lik jel oluşturmak üzere 2 gr agaroz (Certified PCR agarose, Bio-Rad) tartılıp bir balon içerisine konuldu.

2-Üzerine 100ml 1xTBE tamponu ilave edilerek mikrodalga fırında eritildi.

3-Agaroz soğumaya bırakılmış, 60 °C civarında içerisine 10 mg/ml'lik stok ethidium bromide solüsyonundan 5 µl eklenmiş, önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş jel kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.

4-Oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilen jelin soğuyarak katılaşması sağlandı.

5-Jel kalıbı elektroforez tankına (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System, USA) yerleştirildikten sonra, taraklar jele zarar vermeden yavaşça çıkarıldı.



Şekil 3.10: OWL Separation Systems Model elektroforez tankı

6-Yukarıda belirtilen sikluslarda amplifiye edilmiş örneklerden 5'er µl alınarak, kağıt parafilm üzerinde 3 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak elektroforeze hazır hale getirildi.

7-Jel üzerinde tarağın çıkarılması ile oluşan yükleme kuyularına sırası ile ilk iki kuyuya, DNA marker ve distile su ile hazırlanmış pozitif kontrol, takip eden kuyulara da yükleme tamponu içerisinde hazırlanan her bir örnekten 8 µl alınarak sırası ile yüklendi. Ve en son kuyuya distile su içinde hazırlanan negatif kontrol yüklendi.

8-Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300, TALWAN) çalıştırılarak 80 mA – 120 V akım verildi.

9-Brom fenol mavisinin migrasyonu takip edilerek jelin 2/3'lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.

10-Jel tanktan çıkarılmış ve jel görüntüleme cihazı (DNR Bio-Imaging Systems Visible & Ultraviolet Transilluminator, MiniBIS Bio-Imaging System, USA) ile görüntülenerek incelendi.

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin normal dağılıma uygunluğu test edilmiş, normal dağılım gösteren sürekli değişkenlerin analizinde bağımsız gruplarda t testi ve tek yönlü varyans analizi, normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin analizinde ise Mann Whitney U veya Kruskall Wallis testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin analizinde ise ki-kare, Mc Nemar testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama±standart sapma, medyan, n ve yüzde olarak ifade edilmiştir. p değerinin <0,05 olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır ve p<0.017 anlamlı olarak kabul edilmiştir (p<0,10/n; n= karşılaştırma sayısı).

4.BULGULAR

Kök kanal enfeksiyonları ile *Enterokok*, *E.faecalis* ve *C.albicans* arasındaki muhtemel etiyolojik ilişkiyi konvansiyonel Kültür ve NAAT (Nükleer Asit Amplifikasyon Tekniği) yardımıyla tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada toplam 401 klinik örnek etken mikroorganizmaların izolasyonu ve örneklerdeki hedef mikroorganizmalara ait spesifik DNA dizilerinin varlığını tespit amacıyla PCR ve Kültür yöntemiyle değerlendirildi. Ayrıca klinik örneklerden izole edilen suşların antimikrobiallere duyarlılıkları test edildi.

4.1. Konvansiyonel Kültür Yöntemiyle Elde Edilen Bulgular

Birincil enfeksiyonlu ve ikincil enfeksiyonlu dişlerin tedavisi sırasında alınan kanal içi ve tükürük örneklerinde, etken mikroorganizmaları tespit amacıyla yapılan kültür çalışmasında, 117 birincil enfeksiyonlu dişlerin 16 tanesinin (%14) kanal içi örneğinden *E.faecalis*, 20 tanesinin (%17) kanal içi örneğinden *C.albicans* izole edildi. Bu hasta grubundan alınan tükürük örneklerinde ise 7 (%7) hastada *E.faecalis*, 15 (%15) hastada ise *C.albicans* izole edildi. Bu hasta grubunda 6 (%5) hastanın hem kanal hem tükürük örneğinin ikisinde de *E.faecalis*, 8 (%7) hastanın da her iki örneğinde de *C.albicans* izole edildi. İkincil enfeksiyonu olan 114 dişin kanal tedavilerinin yenilenmesi sırasında alınan örneklerde ise, 10 (%9) hastanın kanal içi örneğinden *E.faecalis*, 10 (%9) hastanın kanal içi örneğinden *C.albicans* izole edildi. Bu hasta grubundan alınan tükürük örneklerinde ise 6 (%9) hastanın tükürük örneğinde *E.faecalis*, 11 (%16) hastadan ise *C.albicans* izole edilmiştir. Bu hasta grubunda 5 (%4) hastanın hem kanal hem tükürük örneğinin ikisinde de *E.faecalis*, 5 (%4) hastanın da her iki örneğinde de *C.albicans* izole edildi. Kültür yöntemiyle elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1 de gösterilmektedir ve istatistiksel olarak *E.faecalis* ve *C.albicans*' in birincil ve ikincil enfeksiyonlarda bulunması arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$, Ki Kare testi).

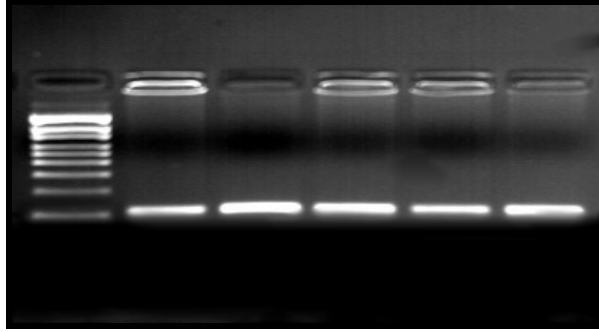
Çizelge 4.1: Birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlerin tedavileri sırasında kök kanalından ve tükürükten alınan örneklerin Kültür sonuçları.

KÜLTÜR SONUÇLARI	Birincil Enfeksiyonlu Dişler (n: 117 diş, 100 hasta)			İkincil Enfeksiyonlu Dişler (n: 114 diş, 70 hasta)		
	K	T	K-T	K	T	K-T
İzolat						
<i>E.faecalis</i>	16 (%14)	7 (%7)	6 (%5)	10 (%9)	6 (%9)	5 (%4)
<i>C.albicans</i>	20 (%17)	15 (%15)	8 (%7)	10 (%9)	11 (%16)	6 (%5)
Toplam	36 (%31)	22 (%22)	14 (%12)	20 (%18)	17 (%25)	11(%9)

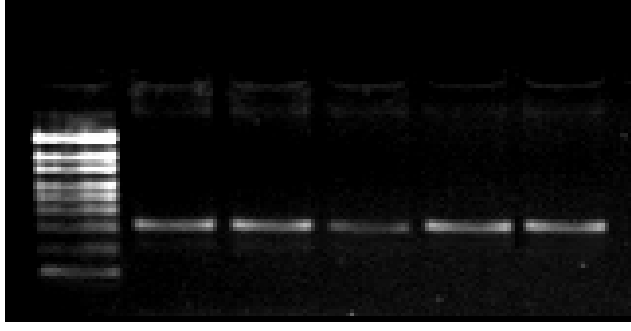
K: Kanal, T: Tükürük, K-T:Aynı anda hem kanal hem tükürükte bulunması.

4.2. PCR Yöntemiyle Elde Edilen Bulgular

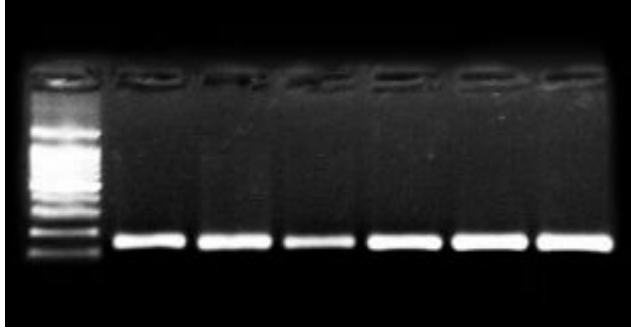
Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonundan temin edilen *E.faecalis* 97008 nolu suşun genus spesifik primerlerle yapılan amplifikasyonun elektroforez görüntüsü (Şekil 4.1), aynı suşun tür spesifik primerlerle yapılan amplifikasyonun elektroforez görüntüsü (Şekil 4.2) ve *C.albicans* 90028 nolu suşun tür spesifik primerlerle yapılan amplifikasyonun elektroforez görüntüsü (Şekil 4.3) aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.1: *E.faecalis* 97008 nolu suşun genus spesifik primerlerle yapılan amplifikasyonun elektroforez görüntüsü



Şekil 4.2: *E.faecalis* 97008 nolu suşun tür spesifik primerlerle yapılan amplifikasyonun elektroforez görüntüsü



Şekil 4.3: *C.albicans* 90028 nolu suşun tür spesifik primerlerle yapılan amplifikasyonun elektroforez görüntüsü

PCR yöntemi ile *Enterokok* cins spesifik primerlerle pozitif bulunan bütün örnekler aynı zamanda *E.faecalis* tür spesifik primerlerle de pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda kök kanallarında ve tükürükte bulunan bütün enterokokların *E.faecalis* olduğu tespit edildi.

Kanal içi ve tükürük örneklerinde, etken mikroorganizmaları tespit amacıyla yapılan PCR çalışmasında, 117 birincil enfeksiyonlu dişlerin 19 tanesinin (%16) kanal içi örneğinden *E.faecalis*, 23 (%20) hastanın kanal içi örneğinden *C.albicans* izole edildi. Bu hasta grubundan alınan tükürük örneklerinde ise 6 (%6) hastanın tükürük örneğinde *E.faecalis*, 17 (%17) hastanın tükürüğünde *C.albicans* izole edilmiştir. Bu hasta grubunda 4 (%3) hastanın hem kanal hem tükürük örneğinin her ikisinde de *E.faecalis*, 8 (%7) hastanın da her iki örneğinde de *C.albicans* izole edildi. Eski kanal tedavisi olan hastaların yeniden kanal tedavileri yapılması sırasında alınan örneklerde

ise, 11 (%10) hastanın kanal içi örneğinden *E.faecalis*, 13 (%11) hastanın kanal içi örneğinden *C.albicans* izole edildi. Bu hasta grubundan alınan tükürük örneklerinde ise 7 (%10) hastanın tükürük örneğinde *E.faecalis*, 15 (%21) hastanın tükürük örneğinde ise *C.albicans* izole edilmiştir. Bu grupta 5 (%4) hastanın hem kanal hem tükürük örneğinin her ikisinde de *E.faecalis*, 7 (%6) hastanın da her iki örneğinde de *C.albicans* izole edildi. PCR yöntemiyle elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4, 4.5, 4.6 da gösterilmektedir ve istatistiksel olarak *E.faecalis* ve *C.albicans*'m birincil ve ikincil enfeksiyonlarda bulunması arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$, Ki Kare testi).

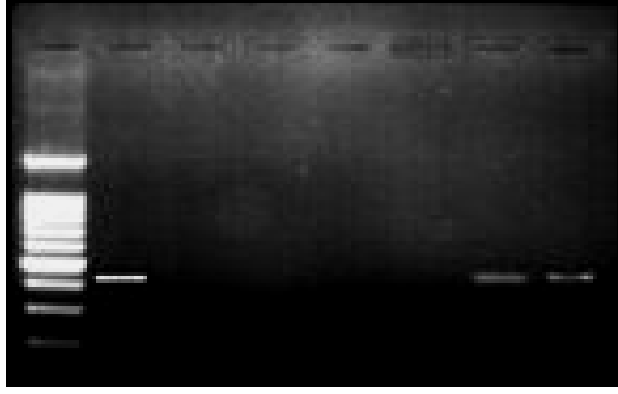
Çizelge 4.2:Birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlerin tedavileri sırasında kök kanalından ve tükürükten alınan örneklerin PCR sonuçları

PCR SONUÇLARI	Birincil Enfeksiyonlu Dişler (n: 117 diş, 100 hasta)			İkincil Enfeksiyonlu Dişler (n: 114 diş, 70 hasta)		
	K	T	K-T	K	T	K-T
<i>E.faecalis</i>	19 (%16)	6 (%6)	4 (%3)	11 (%10)	7 (%10)	5 (%4)
<i>C.albicans</i>	23 (%20)	17 (%17)	8 (%7)	13 (%11)	15 (%21)	7 (%6)
Toplam	42 (%36)	23 (%23)	12 (%10)	24 (%21)	22 (%31)	12 (%10)

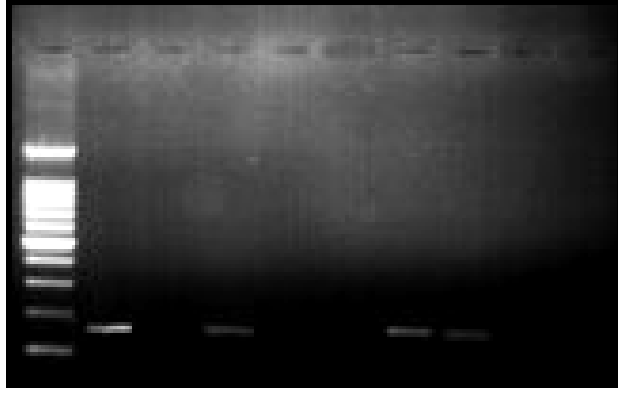
Kanal:K, Tükürük :T, K-T:Aynı anda hem kanal hem tükürük



Şekil 4.4: Hasta örneklerinde bulunan *Enterokok* PCR görüntüleri (1 pozitif kontrol 2 negatif kontrol, 3-5 hasta örnekleri)



Şekil 4.5: Hasta örneklerinde bulunan *E.faecalis*'in PCR görüntüleri (1 pozitif kontrol, 2 negatif kontrol, 3-7 hasta örnekleri)



Şekil 4.6: Hasta örneklerinde bulunan *C.albicans*'ın PCR görüntüleri (1 pozitif kontrol, 2 negatif kontrol, 3-9 hasta örnekleri)

4.3. Hem Kültür Hem PCR Yöntemiyle Aynı Anda Pozitif Çıkan Örneklerden Elde Edilen Bulgular

Birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlerde Kültür ve PCR tekniği farklı sonuçlar vermiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında birincil enfeksiyonlu dişlerde hem PCR hem de Kültür tekniği ile aynı anda *E.faecalis* görülme oranı %13, *C.albicans* görülme oranı %15' dir. Bu dişlerin bulunduğu hastaların tükürüğünde ise bu oran *E.faecalis* için %5 ve *C.albicans* için %13' dür.

İkincil enfeksiyonlu dişlerde aynı karşılaştırma yapıldığında *E.faecalis* görülme oranı %8, *C.albicans* görülme oranı %8' dir. Bu dişlerin bulunduğu hastaların tükürüğünde ise bu oran *E.faecalis* için %9 ve *C.albicans* için %14' dür. Sonuçlar çizelge 4.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.3: Hem kültür hem PCR yöntemiyle aynı anda pozitif çıkan örneklerden elde edilen bulgular.

	Kanal		Tükürük	
	<i>E.faecalis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>C.albicans</i>
Birincil enfeksiyonlu diş	15 (%13)	18 (%15)	5 (%5)	13 (%13)
İkincil enfeksiyonlu diş	9 (%8)	9 (%8)	6 (%9)	10 (%14)

4.4.Kültür Yöntemi İle Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *E.faecalis* İzolatlarının Duyarlılık Testleri

4.4.1. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *E.faecalis* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı

Birincil enfeksiyonlu dişlere sahip olan hastalardan elde edilen *E.faecalis* izolatlarının agar dilüsyon yöntemiyle yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde Spiramisin, Kolistin, Penisilin ve Vankomisine duyarlılıkları Çizelge 4.4’de gösterilen konsantrasyonlarda araştırıldı.

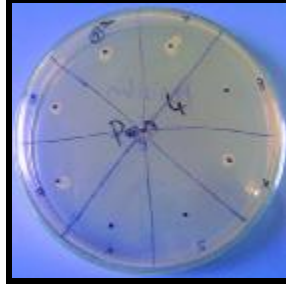
Çizelge 4.4: Kullanılan antibiyotik konsantrasyonları

Antibiyotik	Spiramisin (Rovamycin tablet, Eczacıbaşı)	Kolistin (SIGMAC-4461)	Penisilin (Kristasil, BİLİM)	Vankomisin (SIGMA V-2002)
Konsantrasyonları	0,5-1-5-10-20 µg/ml	0,1-0,5-1-2-4 µg/ml	0,5-1-2-4-8-16 µg/ml	0,1-0,5-1-2-4-16-32 µg/ml

İzole edilen izolatların tamamında, Spiramisin’in MIC₉₀>20 µg/ml üzerinde bulundu ve dirençli olarak değerlendirildi.

Aynı izolatların yine tamamında Kolistin MIC₉₀>4 µg/ml’nin üzerinde bulundu ve izolatların tamamı bu antibiyotiğe karşı dirençli olarak değerlendirildi.

Penisilin duyarlılığında ise, bir izolatta MIC₉₀=1 µg/ml, diğer izolatta ise MIC₉₀= 0,25 µg/ml olarak bulundu. Bu sebeple bu 2 izolat Penisiline duyarlı olarak kabul edilirken kalan 9 izolatın tamamı için de MIC₉₀>16µg/ml olarak bulundu ve bu suşlar Penisiline dirençli olarak kabul edildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Penisilin 4 µg/ml duyarlılık testi.

Vankomisin duyarlılığında ise, izolatlardan sadece birinde MIC₉₀=1 µg/ml bulundu ve bu suş duyarlı olarak değerlendirildi. Diğer izolatların ise MIC₉₀ değerleri 32 µg/ml'nin üzerinde bulundu ve bu suşlar Vankomisin dirençli olarak kabul edildi (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5: Birincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *E.faecalis* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi.

Antibiyotik	İZOLAT		MIC	
	Duyarlı suş sayısı	Dirençli suş sayısı	Duyarlı	Dirençli
Spiramisin	-	11	<1 µg/ ml	>2 µg/ ml
Kolistin	-	11	<2 µg/ ml	>4 µg/ ml
Penisilin	2	9	<8 µg/ ml	>16 µg/ ml
Vankomisin	1	10	<4 µg/ ml	>32 µg/ ml

Değerler MIC₉₀ ve microgram/ mililitredir.

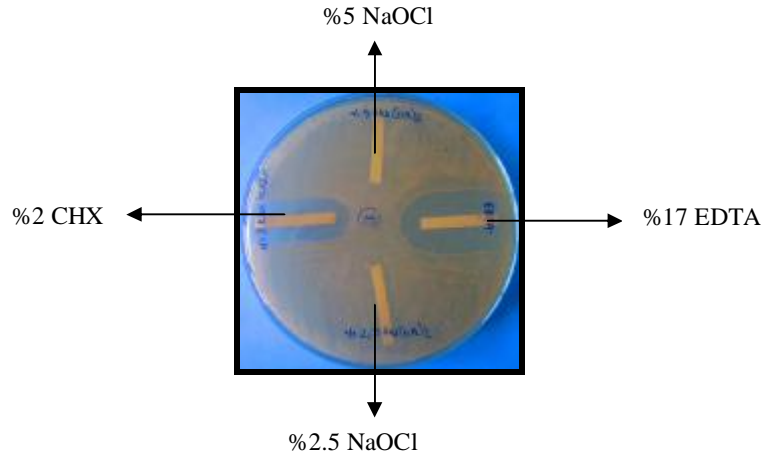
4.4.2. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *E.faecalis* İzolatlarının İrrigasyon Solüsyonlarına Duyarlılığı

İzolatların %2 CHX, %17 EDTA, %2.5 NaOCl ve %5 NaOCl gibi kanal içi irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığının araştırılmasında strip difüzyon testi kullanıldı. Üremeyi ne kadar engellediklerine bakıldıktan sonra oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek, bütün izolatların duyarlılıkları değerlendirildi (Çizelge 4.6, Şekil 4.8, 4.9).

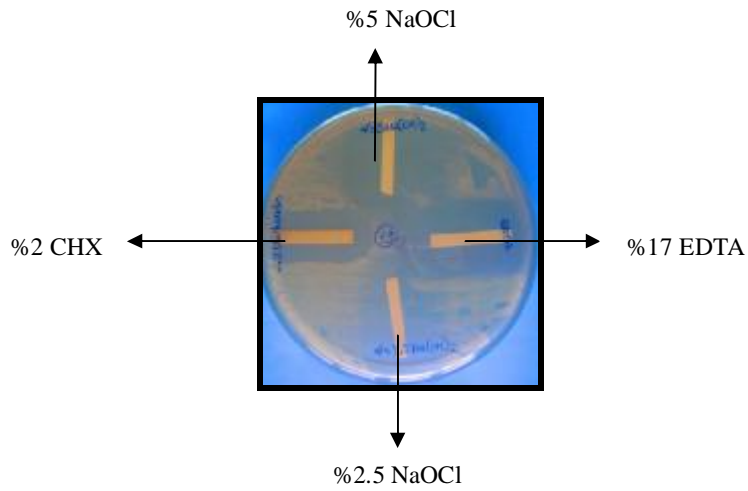
Çizelge 4.6: Birincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *E.faecalis* izolatlarının irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı

İSİM	%2 CHX	%17 EDTA	%2.5 NaOCl	%5 NaOCl	Kontrol
İzolat 1	26	0	0	0	0
İzolat 2	24	36	30	30	0
İzolat 3	26	40	36	45	0
İzolat 4	24	0	0	0	0
İzolat 5	22	34	0	0	0
İzolat 6	17	38	0	0	0
İzolat 7	24	38	36	50	0
İzolat 8	22	40	30	46	0
İzolat 9	26	36	0	0	0
İzolat 10	28	0	0	0	0
İzolat 11	28	36	30	50	0

Değerler milimetredir ve 0 olması *E.faecalis*' in o solüsyonda hiç çap oluşturamadığını göstermektedir.



Şekil 4.8: 5 nolu izolatın irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı.



Şekil 4.9: 11 nolu izolatın irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı

%2 CHX solüsyonunda hiçbir izolatta direnç tespit edilemezken, %17 EDTA solüsyonunda ise 3 izolatta direnç saptandı. %2.5 NaOCl solüsyonunda 6 izolatta direnç tespit edilirken, bu izolatların % 5 NaOCl solüsyonuna da dirençli olduğu bulundu. CHX ve EDTA'nın üremeyi engelleme kapasitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0.2). EDTA solüsyonu ile %2.5 NaOCl ve %5 NaOCl solüsyonları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0.3). CHX solüsyonu ve %2.5 NaOCl ve % 5 NaOCl solüsyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (p<0.004). *E.faecalis* üremesini en iyi engelleyen CHX solüsyonudur (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7: İrrigasyon solüsyonları uygulamasından sonra izolatlarda oluşan üremeler.

		GRUP				Total
		%2CHX	%17EDTA	%2.5NaOCl	%5 NaOCl	
CAPGR	Üreyen(n)	0	3	6	6	14
	(%)	0,0%	27,3%	54,5%	54,5%	31,8%
	Üremeyen	11	8	5	5	30
	(%)	100,0%	72,7%	45,5%	45,5%	68,2%

İnhibisyon çapı karşılaştırılması yapıldığında CHX'inin çap ortalaması EDTA, %2,5 NaOCl ve %5 NaOCl'den düşüktür ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (p<0.01). EDTA ve %2,5 NaOCl arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır (p=0.09). %2,5 NaOCl ve %5 NaOCl arasında ise fark bulunmaktadır (p<0.05). İnhibisyon çapı karşılaştırılmasında en etkili %5 NaOCl'dir. Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler Çizelge 4.8.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.8: Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler

Grup	Ort±SS	Med (min-max)
%2 CHX	24,2±3,1	24(17-28)
%17 EDTA	37,2±2,1	37(34-40)
%2.5 NaOCl	32,4±3,2	30(30-36)
%5 NaOCl	44,2±8,2	46(30-50)

Değerler milimetredir.

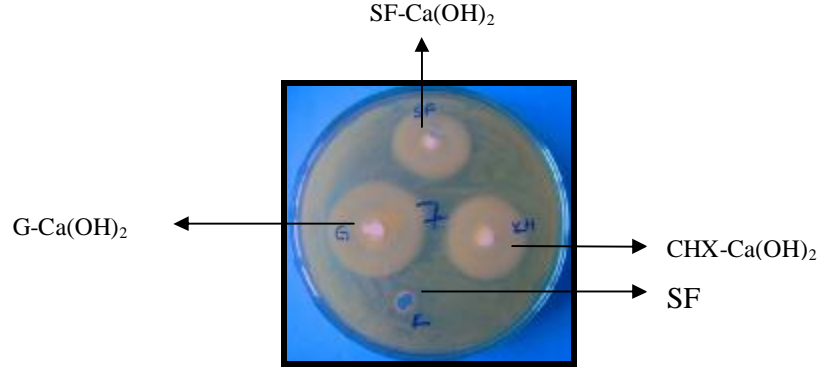
4.4.3. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *E.faecalis* İzolatlarının Pansuman Materyallerine Duyarlılığı

Kanal içi pansumanda kullanılan G-Ca(OH)₂, SF-Ca(OH)₂ ve CHX-Ca(OH)₂ pat kombinasyonlarının *E.faecalis* üzerine antimikrobiyal etkisini tespit için agar difüzyon yöntemi kullanılarak; 1., 4. ve 7. günde oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü ve göreceli olarak değerlendirildi (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.10).

Çizelge 4.9: Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *E.faecalis* İzolatlarının Pansuman Materyallerine Duyarlılığı

İSİM	G-Ca (OH) ₂			SF-Ca (OH) ₂			CHX-Ca (OH) ₂			Kontrol
	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	
İZOLAT 1	11	13	13	15	15	15	15	15	15	0
İZOLAT 2	12	15	15	12	8	8	15	18	18	0
İZOLAT 3	13	17	17	0	15	15	15	16	16	0
İZOLAT 4	16	19	19	15	13	13	20	14	14	0
İZOLAT 5	0	12	12	0	15	15	15	15	15	0
İZOLAT 6	15	13	13	12	12	12	18	14	14	0
İZOLAT 7	15	16	16	12	12	12	16	13	13	0
İZOLAT 8	15	17	17	12	12	12	18	12	12	0
İZOLAT 9	0	17	17	0	16	16	0	17	17	0
İZOLAT 10	12	16	16	12	12	12	20	16	16	0
İZOLAT 11	14	14	14	12	12	12	20	14	14	0

Değerler milimetredir ve 0 olması *E.faecalis*' in o patta hiç çap oluşturamadığını göstermektedir.



Şekil 4.10: 7 nolu izolatin pansuman materyallerine duyarlılığı

Pansuman materyallerinden CHX-Ca(OH)₂ 1. günde sadece 1 izolatta üremeyi engelleme açısından etkisiz kalmıştır. Bu pat hem en iyi üremeyi engelleyen ajandır hem de en geniş inhibisyon çapı oluşturan ajandır. Bu patın inhibisyon çapı 4. ve 7. günlerde azalmaktadır ama istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,1$). G-Ca(OH)₂ 2 izolatta üremeyi engelleme açısından etkisiz kalmıştır. Ve bu pat hem üremeyi engellemede hem de inhibisyon çapı oluşturmada 2. etkili patdır. Bu patın inhibisyon çapı 4. ve 7. günlerde artmaktadır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,01$). SF-Ca(OH)₂ 3 izolatta üremeyi engelleme açısından etkisiz kalmıştır, bu yüzden üremeyi engellemede ve inhibisyon çapı oluşturmada diğerlerine göre en az etkili olandır. Bu patın inhibisyon çapı 4. ve 7. günlerde artmaktadır ama istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,1$). Deney patlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler Çizelge 4.10' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.10: Deneysel patların inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler

	Takip günü			P değeri Zaman içindeki karşılaştırma
	Ort±SS	Medyan (min-max)		
	1gün	4 gün	7 gün	
G-Ca (OH)₂	13,6±1,73 14 (11-16)	15,3±2,15 16 (12-19)	15,3±2,15 16 (12-19)	0,01
SF- Ca (OH)₂	12,7±1.38 12(12-15)	12,9±2.25 12(8-16)	12,9±2.25 12(8-16)	0,1
CHX- Ca (OH)₂	17,2±2.25 17(15-20)	14,9±1.75 15(12-18)	14,9±1.75 15(12-18)	0,1
P değeri (gruplar arasında karşılaştırma)	,001	,031	,031	

4.5. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *E.faecalis* İzolatlarının Duyarlılık Testleri

4.5.1. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *E.faecalis* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı

İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *E.faecalis* izolatlarının agar dilüsyon yöntemiyle yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde Spiramisin, Kolistin, Penisilin ve Vankomisine duyarlılıkları araştırıldı.

İzolatların tamamında, spiramisin için MIC₉₀>20 µg/ml üzerinde bulundu ve izolatlar spiramisine karşı dirençli olarak değerlendirildi. Aynı izolatların yine tamamında kolistin için MIC₉₀>4 µg/ml' nin üzerinde bulundu ve izolatların tamamı bu antibiyotiğe karşı da dirençli olarak değerlendirildi.

Penisilin duyarlılığında ise, bir izolatta MIC₉₀=4 µg/ml, bir izolattada MIC₉₀=1 µg/ml, bir izolat için ise MIC₉₀=0.5 µg/ml olarak bulundu. Bu sebeple bu izolatlar penisiline duyarlı olarak kabul edilirken kalan 4 izolatın tamamı için de MIC₉₀>16µg/ml olarak bulundu ve bu suşlar penisiline dirençli olarak kabul edildi.

Vankomisin duyarlılığında ise, izolatların tamamında MIC₉₀ değerleri 32 µg/ml'nin üzerinde bulundu ve bu suşlar Vankomisin dirençli olarak kabul edildi (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11: İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *E.faecalis* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi.

Antibiyotik	İZOLAT		MİC	
	Duyarlı suş sayısı	Dirençli suş sayısı	Duyarlı	Dirençli
Spiramisin	-	7	<1 µg/ ml	>2 µg/ ml
Kolistin	-	7	<2 µg/ ml	>4 µg/ ml
Penisilin	3	4	<8 µg/ ml	>16 µg/ ml
Vankomisin		7	<4 µg/ ml	>32 µg/ ml

4.5.2. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *E.faecalis* İzolatlarının İrrigasyon Solüsyonlarına Duyarlılığı

İzolatların %2 CHX, %17 EDTA, %2.5 NaOCl ve %5 NaOCl gibi kanal içi irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığının araştırılmasında strip difüzyon testi kullanıldı. Üremeyi ne kadar engellediklerine bakıldıktan sonra oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek, bütün izolatların duyarlılıkları değerlendirildi (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12: İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *E.faecalis* izolatlarının irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı

İSİM	%2 CHX	%17 EDTA	%2.5 NaOCl	%5 NaOCl	Kontrol
İzolat 1	26	40	36	46	0
İzolat 2	26	0	0	0	0
İzolat 3	24	36	26	50	0
İzolat 4	24	36	0	0	0
İzolat 5	32	0	0	0	0
İzolat 6	30	38	50	70	0
İzolat 7	24	36	30	44	0

Değerler milimetredir ve 0 olması *E.faecalis*' in o solüsyonda hiç çap oluşturamadığını göstermektedir.

Toplam 7 izolatdan alınan izolatlardan, %2 CHX solüsyonunda hiçbir izolatta direnç tespit edilemezken, %17 EDTA solüsyonunda ise 2 izolatta direnç saptandı. %2.5 NaOCl solüsyonunda 3 izolatta direnç tespit edilirken, bu izolatların % 5 NaOCl solüsyonuna da dirençli olduğu bulundu. *E.faecalis* üremesini en iyi engelleyen CHX solüsyonudur.

İnhibisyon çapı karşılaştırılması yapıldığında CHX'in çap ortalaması EDTA, %2,5 NaOCl ve %5 NaOCl'den düşüktür. EDTA ve %5 NaOCl arasında fark bulunmaktadır. %2,5 NaOCl ve %5 NaOCl arasında fark bulunmaktadır. İnhibisyon

çapı karşılaştırılmasında en etkili %5 NaOCl'dir. Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler Çizelge 4.13'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.13: Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler

Grup	Ort±SS	Med (min-max)
%2 CHX	26,57±3,20	26 (24-32)
%17 EDTA	37,20±1,78	36 (36-40))
%2.5 NaOCl	35,50±10,50	33 (26-50)
%5 NaOCl	52,50±11,93	48 (44-70)

Değerler milimetredir.

4.5.3. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *E.faecalis* İzolatlarının Pansuman Materyallerine Duyarlılığı

Kanal içi pansumanda kullanılan G-Ca(OH)₂, SF-Ca(OH)₂ ve CHX-Ca(OH)₂'in *E.faecalis* üzerine antimikrobiyal etkisini tespit için agar difüzyon yöntemi kullanılarak; 1., 4. ve 7.günde oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü ve göreceli olarak değerlendirildi (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14: İkincil enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *E.faecalis* İzolatlarının Pansuman Materyallerine Duyarlılığı

İSİM	G-Ca (OH) ₂			SF- Ca (OH) ₂			CHX- Ca (OH) ₂			Kontrol
	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	
İzolat 12	12	12	12	12	12	12	15	12	12	0
İzolat 13	12	15	15	0	12	12	20	15	15	0
İzolat 14	18	18	18	12	12	12	18	12	12	0
İzolat 15	12	15	15	0	9	9	16	10	10	0
İzolat 16	20	22	22	18	15	15	20	12	12	0
İzolat 17	14	18	18	0	12	12	18	12	12	0
İzolat 18	0	11	11	0	12	12	0	15	15	0

Değerler milimetredir ve 0 olması *E.faecalis*' in o solüsyonda hiç çap oluşturamadığını göstermektedir.

Pansuman materyallerinden CHX-Ca(OH)₂ 1. günde sadece 1 izolatta üremeyi engelleme açısından etkisiz kalmıştır. Bu pat hem en iyi üremeyi engelleyen ajandır hem de en geniş inhibisyon çapı oluşturan ajandır. Bu patın inhibisyon çapı 4. ve 7. günlerde azalmaktadır. G-Ca(OH)₂ yine 1. günde 1 izolatta üremeyi engelleme açısından etkisiz kalmıştır. Bu patın inhibisyon çapı 4. ve 7. günlerde artmaktadır. SF-Ca(OH) 1. Günde 4 izolatta üremeyi engelleme açısından etkisiz kalmıştır, bu yüzden üremeyi engellemede en az etkili olandır ve inhibisyon çapı oluşturmada G-Ca(OH)₂ patına benzemektedir. Bu patın inhibisyon çapı 4. ve 7. günlerde azalmaktadır. Deney patlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler Çizelge 4.15' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.15: Deney patlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler

	1 gün	Takip günü Ort±SS Medyan (min-max)	
		4 gün	7 gün
G-Ca (OH)₂	14,6±3,5 13(12-20)	15,8±3,8 15(11-22)	15,8±3,8 15(11-22)
SF- Ca (OH)₂	14,0±3,4 12(12-18)	12,0±1,73 12(9-15)	12,0±1,73 12(9-15)
CHX- Ca (OH)₂	17,8±2,04 18(15-20)	12,5±1,81 12(10-15)	12,5±1,81 12(10-15)

Değerler milimetredir.

4.6. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *C.albicans* İzolatlarının Duyarlılık Testleri

4.6.1. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *C.albicans* İzolatlarının Antimikotiklere Duyarlılığı

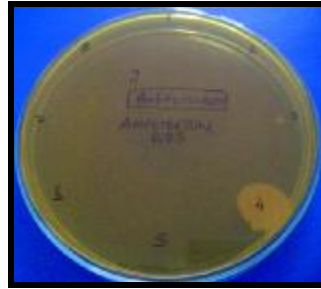
C.albicans izolatlarının agar dilüsyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testlerinde Amfoterisin B, Nistatin, Flukonazol ve Ketokanozol'e Çizelge 4.16' da gösterilen konsantrasyonlarda duyarlılıkları araştırıldı.

Çizelge 4.16: Kullanılan antimikotik konsantrasyonları

Antimikotik	Nistatin (SİGMA, N9767- 5MU)	Amfoterisin-B (SİGMA, A4888)	Flukonazol (Triflucan,PFİZER)	Ketokanozol (Ketoral,BİLİM)
Konsantrasyonları	0,25-0,5-1-2-4 µg/ml	0,25-0,5-1-2-4 µg/ml	8-16-32-64-128 µg/ml	0.5-8-16-32 µg/ml

İzolatların tamamında, Nistatin MIC₉₀=0.5 µg/ml olarak saptandı ve Nistatine duyarlı olarak değerlendirildi.

İzolatların tamamı, Amfoterisin B'ye duyarlı olarak bulundu. Yedi izolat için MIC₉₀=0.5 µg/ml, 5 izolat için ise MIC₉₀=0.125 µg/ml olarak saptandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Amfoterisin B 0,25 µg/ml duyarlılık testi

Flukonazol için, izolatların yine tamamı duyarlı olarak saptandı. İzolatların 8'inde MIC₉₀=8 µg/ml olarak bulunurken, 4 ünde MIC₉₀=16 µg/ml olarak bulundu ve bunlarda orta duyarlı olarak değerlendirildi.

Ketokanozol duyarlılığında ise, 8 izolat için MIC₉₀=8 µg/ml, 4 izolat için ise MIC₉₀=16 µg/ml olarak saptandı ve izolatların tamamı dirençli olarak kabul edildi (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17: Birincil enfeksiyonlardan elde edilen *C. albicans* izolatlarının antimikotik duyarlılık testi.

Antimikotik	İZOLAT			MIC ₉₀		
	Duyarlı suş sayısı	Orta duyarlı suş sayısı	Dirençli suş sayısı	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Nistatin	12	-	-	<4µg/ ml	5-7 µg/ ml	>8 µg/ ml
Amfoterisin B	12	-	-	<1 µg/ ml	2-3 µg/ ml	>4 µg/ ml
Flukonazol	8	4	-	<8 µg/ ml	16-32 µg/ ml	>64 µg/ ml
Ketokanozol	-	-	12	<2 µg/ ml	3 µg/ ml	>4 µg/ ml

Değerler MIC₉₀'dır ve Microgram/Mililitredir.

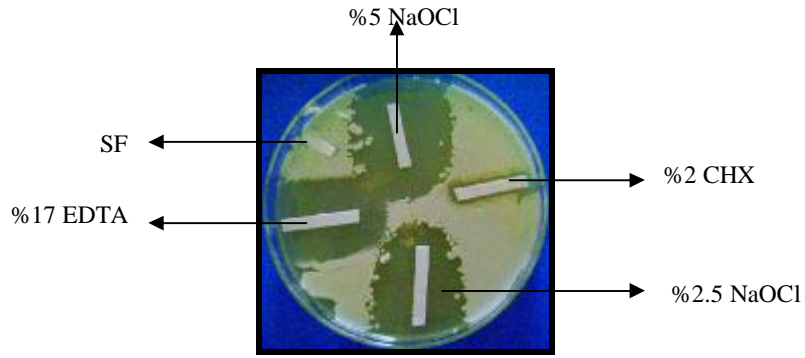
4.6.2. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *C.albicans* İzolatlarının İrrigasyon Solüsyonlarına Duyarlılığı

C.albicans izolatlarının %2 CHX, %17 EDTA, %2.5 NaOCl ve % 5 NaOCl irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığının araştırılmasında strip difüzyon testi kullanıldı. Oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek, bütün izolatların duyarlılıkları birbirleriyle mukayese edilerek göreceli olarak değerlendirildi (Çizelge 4.18, Şekil 4.12).

Çizelge 4.18: Birincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *C.albicans* izolatlarının irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı

İSİM	%2 CHX	%17 EDTA	%2.5 NaOCl	%5 NaOCl	Kontrol
İzolat 1	15	45	45	75	R
İzolat 2	15	50	30	70	R
İzolat 3	20	50	60	60	R
İzolat 4	15	40	45	70	R
İzolat 5	12	44	50	65	R
İzolat 6	13	40	50	65	R
İzolat 7	20	44	60	82	R
İzolat 8	20	70	50	70	R
İzolat 9	22	45	50	65	R
İzolat 10	25	40	50	65	R
İzolat 11	20	45	44	55	R
İzolat 12	25	44	50	74	R

Değerler milimetredir.



Şekil 4.12: 3 nolu izolatın irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı.

İnhibisyon çapı karşılaştırılması yapıldığında %2 CHX' inin çap ortalaması %17 EDTA, %2,5 NaOCl ve %5 NaOCl' den düşüktür ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0.001$). EDTA ve %2.5 NaOCl arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ($p=0.08$). %5 NaOCl solüsyonunun inhibisyon çapı, %2,5 NaOCl ve %17 EDTA solüsyonlarının inhibisyon çapından istatistiksel olarak fazladır ($p<0.0001$). *C.albicans* üremesini en iyi engelleyen %5 NaOCl solüsyonudur. Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler Çizelge 4.19' da gösterilmektedir.

Çizelge 4.19: Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler

Grup	Ort±SS	Medyan (min-max)
%2 CHX	18,5±4,4	20(12-25)
%17 EDTA	46,4±8,14	44(40-70)
%2.5 NaOCl	48,6±7,77	50(30-60)
%5 NaOCl	68,0±7,14	67,5(55-82)

Değerler milimetredir.

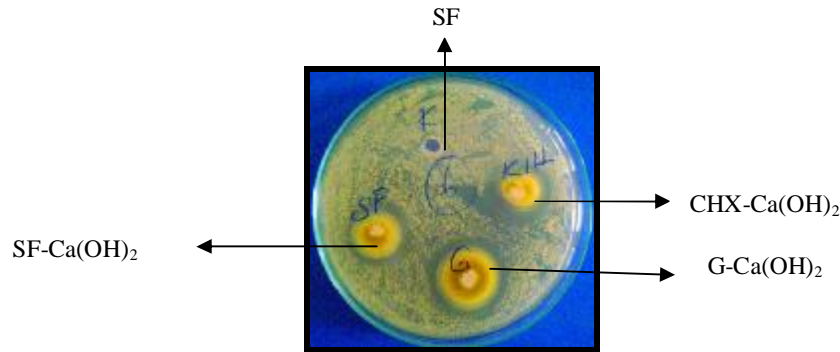
4.6.3. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *C.albicans* İzolatlarının Pansuman Materyallerine Duyarlılığı

Kanal içi pansumanda kullanılan G-Ca(OH)₂, SF-Ca(OH)₂ ve CHX-Ca(OH)₂'in *C.albicans* üzerine antimikrobiyal etkisini tespit etmek için agar difüzyon yöntemi kullanılarak; 1., 4. ve 7.günde oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü ve göreceli olarak değerlendirildi (Çizelge 4.20, Şekil 4.13).

Çizelge 4.20: Birincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *C.albicans* İzolatlarının Pansuman Materyallerine Duyarlılığı

İSİM	G-Ca (OH) ₂			SF-Ca (OH) ₂			CHX-Ca (OH) ₂			Kontrol
	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	
İzolat 1	26	18	18	23	14	11	22	19	19	0
İzolat 2	23	19	19	23	14	0	20	17	17	0
İzolat 3	30	20	18	26	15	12	24	10	8	0
İzolat 4	24	13	13	17	10	0	22	20	20	0
İzolat 5	27	19	19	22	16	16	20	17	17	0
İzolat 6	30	19	16	23	13	10	15	20	17	0
İzolat 7	31	17	17	27	16	16	30	16	14	0
İzolat 8	30	20	23	42	0	0	24	16	16	0
İzolat 9	25	18	18	22	14	14	26	18	18	0
İzolat 10	27	18	20	24	15	15	30	15	17	0
İzolat 11	30	20	20	24	16	16	27	17	17	0
İzolat 12	30	20	20	25	15	15	25	19	17	0

Değerler milimetredir.



Şekil 4.13: 6 nolu izolatin pansuman materyallerine duyarlılığı.

Pansuman materyallerinden G-Ca(OH)₂ 1. günde en geniş inhibisyon çapı göstermiştir. Bu fark SF-Ca(OH)₂ ve CHX-Ca(OH)₂ patlarına göre istatistiksel olarak daha yüksektir (p=0.015). Dördüncü günde bütün pat kombinasyonlarında inhibisyon

çapında azalma görülmüştür ancak G-Ca(OH)₂ ve CHX-Ca(OH)₂ inhibisyon çapları SF-Ca(OH)₂ den anlamlı olarak daha yüksektir. Her üç pat kombinasyonunda da 4. ve 7. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur, ancak SF-Ca(OH)₂ patının bu günlerde inhibisyon çapı istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur (p=0,001). SF-Ca(OH)₂ patı 4. günde 1 ve 7. günde 2 izolatta etkisiz kalmıştır ve bunlarda üreme görülmektedir. Bu patın günler arasındaki etkinliği azalmaktadır ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (p=0,001). CHX-Ca(OH)₂ patı SF-Ca(OH)₂ patı ile benzer değerlerde inhibisyon çapı oluşturmuştur. Bu değer 4. ve 7. günlerde azalmaktadır ve hiçbir izolatta bu günlerde etkisiz değildir. Deney patlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler Çizelge 4.21’ de gösterilmektedir.

Çizelge 4.21: Deney patlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler

	Takip günü Ort±SS Medyan (min-max)			P değeri (Zaman içindeki karşılaştırma)
	1gün	4 gün	7 gün	
G-Ca (OH)₂	27,75±2,76 28,5(23-31)	18,41±1,97 19(13-23)	18,41±2,46 18,5(13-23)	0,001
SF- Ca (OH)₂	24,83±5,95 23,5(17-42)	14,36±1,74 15(10-16)	13,88±2,31 15(10-16)	0,001
CHX- Ca (OH)₂	23,75±4,33 24(15-30)	17,0±2,73 17(10-20)	16,41±3,02 17(8-20)	0,01
P değeri (gruplar arasında karşılaştırma)	,015	,000	,001	

Değerler milimetredir.

4.7. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *C.albicans* İzolatlarının Duyarlılık Testleri

4.7.1. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *C.albicans* İzolatlarının Antimikotiklere Duyarlılığı

İkincil enfeksiyonlarda, *C.albicans* izolatlarının agar dilüsyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testlerinde; Nistatin, Amfoterisin B, Flukonazol ve Ketokanozol'e Çizelge 4.4' de gösterilen konsantrasyonlarda duyarlılıkları araştırıldı.

İzolatların tamamında, Nistatin için MIC90=0.5 µg/ml olarak saptandı ve bu izolatlar Nistatine duyarlı olarak değerlendirildi.

Amfoterisin B duyarlılığında ise, izolatların tamamı için, MIC90=0.5 µg/ml olarak saptandı ve duyarlı olarak kabul edildi.

Flukonazol için, izolatların 4 ünde MIC90=8 µg/ml olarak bulundu ve duyarlı olarak kabul edildi. İzolatların 1 inde MIC90=16 µg/ml ve 1 inde 32 µg/ml olarak bulundu ve bunlarda orta duyarlı olarak değerlendirildi.

Ketokanozol duyarlılığında ise, 4 izolat için MIC90=8 µg/ml, 1 izolat için ise MIC90=32 µg/ml, 1 izolat için ise 4 µg/ml olarak saptandı ve izolatların tamamı dirençli olarak kabul edildi (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22: İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *C.albicans* izolatlarının antimikotik duyarlılık testi.

Antimikotik	İZOLAT			MIC90		
	Duyarlı suş sayısı	Orta duyarlı suş sayısı	Dirençli suş sayısı	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Nistatin	6	-	-	≤4 µg/ ml	5-7 µg/ ml	≥8 µg/ ml
Amfoterisin B	6	-	-	≤1 µg/ ml	2-3 µg/ ml	≥4 µg/ ml
Flukonazol	4	2	-	≤8 µg/ ml	16-32 µg/ ml	≥64 µg/ ml
Ketokanozol	-	-	6	<2 µg/ ml	3 µg/ ml	>4 µg/ ml

Değerler MIC90'dır ve Microgram/Mililitredir

4.7.2. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *C.albicans* İzolatlarının İrrigasyon Solüsyonlarına Duyarlılığı

C.albicans izolatlarının %2 CHX, %17 EDTA, %2.5 NaOCl ve % 5 NaOCl irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığının araştırılmasında strip difüzyon testi kullanıldı. Oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek, bütün izolatların duyarlılıkları birbirleriyle mukayese edilerek göreceli olarak değerlendirildi (Çizelge 4.23).

ÇİZELGE 4.23: İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *C.albicans* izolatlarının irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığı

İsim	%2 CHX	%17 EDTA	%2.5 NaOCl	%5 NaOCl	Kontrol
İzolat 1	13	40	60	66	0
İzolat 2	14	42	80	60	0
İzolat 3	22	40	60	80	0
İzolat 4	20	40	60	82	0
İzolat 5	16	40	45	70	0
İzolat 6	25	40	45	80	0

Değerler milimetredir.

İnhibisyon çapı karşılaştırılması yapıldığında %2 CHX' inin çap ortalaması %17 EDTA, %2,5 NaOCl ve %5 NaOCl'den düşüktür. EDTA solüsyonunun inhibisyon çapı %2.5 NaOCl ve %5 NaOCl solüsyonlarının inhibisyon çaplarından küçüktür. %2,5 NaOCl solüsyonunun inhibisyon çapı %5 NaOCl solüsyonunun inhibisyon çapından küçüktür. *C.albicans* üremesini en iyi engelleyen %5 NaOCl solüsyonudur. Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler Çizelge 4.24' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.24: Deney solüsyonlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler

Grup	Ort±SS	Med (min-max)
%2 CHX	18,3±4,7	18(13-25)
%17 EDTA	40,3±0,8	40(40-42)
%2.5 NaOCl	58,3±12,9	60(45-80)
%5 NaOCl	73,0±9,0	75(60-82)

Değerler milimetredir.

4.7.3. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerden Elde Edilen *C.albicans* İzolatlarının Pansuman Materyallerine Duyarlılığı

Kanal içi pansumanda kullanılan G-Ca(OH)₂, SF-Ca(OH)₂ ve CHX-Ca(OH)₂'in *C.albicans* üzerine antimikrobiyal etkisini tespit etmek için agar difüzyon yöntemi kullanılarak; 1., 4. ve 7.günde oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü ve göreceli olarak değerlendirildi (Çizelge 4.25).

Çizelge 4.25: İkincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *c.albicans* izolatlarının pansuman materyallerine duyarlılığı

İSİM	G-Ca (OH) ₂			SF-Ca (OH) ₂			CHX-Ca (OH) ₂			Kontrol
	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	
İzolat 13	23	19	17	20	16	15	20	16	15	0
İzolat 14	23	16	20	22	11	16	22	16	16	0
İzolat 15	27	19	19	24	18	12	30	16	15	0
İzolat 16	30	20	20	25	17	14	27	19	18	0
İzolat 17	28	18	18	30	15	14	27	17	16	0
İzolat 18	25	18	18	17	10	10	22	17	16	0

Değerler milimetredir.

Pansuman materyallerinden G-Ca(OH)₂ patı birincil enfeksiyonlara benzer şekilde en geniş inhibisyon çapı oluşturmuştur. SF- Ca(OH)₂ ve CHX- Ca (OH)₂ patları birbirine benzer çaplar göstermektedir. Her 3 patında 4. ve 7. günlerde inhibisyon çapları azalmaktadır. Deney patlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler Çizelge 4.26' da gösterilmektedir.

Çizelge 4.26: Deney patlarının inhibisyon çaplarına ait ortalama değer, standart sapma ve medyan değerler

	Takip günü		
	Ort±SS		
	Medyan (min-max)		
	1gün	4 gün	7 gün
G-Ca (OH)₂	26,0±2,82 26(23-30)	18,33±1,36 18,5(16-20)	18,67±1,21 18,5(17-20)
SF- Ca (OH)₂	23,0±4,47 23(17-30)	14,5±3,27 15,5(10-18)	13,5±2,16 14(10-16)
CHX- Ca (OH)₂	24,67±3,88 24,5(20-30)	16,8±1,16 16,5(16-19)	16,0±1,09 16(15-18)

Değerler milimetredir.

4.8. Birincil ve İkincil Enfeksiyonlu Hastalarda Tedaviden Sonra Oluşan Alevlenme Oranı

Birincil enfeksiyonlu dişlere sahip 100 hastanın 4 (%4)'ünde ve ikincil enfeksiyonlu dişlere sahip 70 hastanın 6 (%9)'sında iki seanslı kök kanal tedavilerinde, tedavilerinin ilk seanslarından sonra alevlenme görüldü. Alevlenme reaksiyonu oluşan 4 birincil enfeksiyonlu ve 6 ikincil enfeksiyonlu dişlerin kök kanallarında *E.faecalis* bulunmadı ama birincil enfeksiyonlu dişlerden 1 tanesinde ve ikincil enfeksiyonlu dişlerden 2 tanesinde *C.albicans* hem PCR hem kültür yöntemi ile bulundu.

5.TARTIŞMA

5.1. Örnek Toplama

Çalışmamızda Adana ve çevre illerden kanal tedavisi ve kanal tedavisi tekrarı için gelen periapikal lezyonlu dişlere sahip hastaların kök kanallarından ve dil altından alınan örneklerinde *Enterococcus*, *E.faecalis* ve *C.albicans* bulunma sıklığını kültür ve PCR yöntemi ile araştırarak, elde edilen *E.faecalis* ve *C.albicans* izolatlarının antibakteriyel (Penisilin, Vankomisin, Spiramisin, Kolistin) ve antimikotik (Amfoterisin B, Nistatin, Flukonazol, Ketokanozol) ajanlara ve antimikrobiyal solüsyonlara (%5 NaOCl, %2,5 NaOCl, %17 EDTA, %2 CHX) ve pat kombinasyonlarına (Ca(OH)₂-SF, Ca(OH)₂-G ve Ca(OH)₂-CHX) karşı duyarlılıklarının tespiti amaçlanmıştır.

Kök kanallarından kültür yöntemi için örnek alma işlemi kanal eğeleri ile yapıldı. Kanal eğeleri tedavi öncesi alınan röntgende belirlenen kök kanal boyunda yerleştirildikten sonra 2 dakikalık eğeleme işlemi gerçekleştirildi ve kanal eğesi tioglukolat besiyerine aktarıldı. Sonra kök kanalları steril SF ile nemlendirildi ve paper pointler ile PCR yöntemi için TE buffera örnekler alındı. Örnek alma işlemi sırasında kök kanal girişlerine çoğu çalışmada belirtilen nitrojen gazı verilmedi^{179,206}. Bunun nedeni elde etmek istediğimiz mikroorganizmaların, oksijen varlığından etkilenmeyen fakültatif anaerob mikroorganizma ve maya olmasıdır.

Örnek alma işlemi sırasında Sassone et al.¹³³ TE buffera eğeyi ve paper pointleri aktarmakta, bazıları^{179,206,207} ise bu çalışmada olduğu gibi sadece paper pointleri aktarmaktadır. Her iki yöntemde literatürde sıklıkla rastlanmaktadır. Bu yöntem farklılıklarının sonuçlara etkisi ayrı bir araştırma konusu olabilir.

Paper pointle alınan kök kanal örnekleri, kök kanalında bulunan floranın tipi, sayısı ve farklılığını yansıtmaktadır. Paper pointin bütün mikroorganizmalara ulaşamaması durumunda, örnek kök kanal florasını doğru tanımlayamamaktadır. Örneğin değeri ve doğruluğu; dişin ne kadar dikkatli hazırlandığına, örneğin ne kadar titizlikle alındığına ve kontaminasyonu önleyici basamaklara bağlıdır¹². Bu çalışmada bu basamaklar her aşamada kontrol edilmiş, şüpheli örnekler çalışma dışı bırakılmıştır.

5.2. Kültür ve PCR Yöntemleri Arasındaki Farklılıklar

Kültürasyon mikroorganizmaların in vitro şartlarda üretilmesidir. Klinik materyallerdeki enfeksiyon hastalığına sebep olan mikroorganizmaların üretilmesi, identifikasyonu ve antimikrobiyallere duyarlılıklarının tespitinde kullanılan bu yöntem, klamidyalar, neisseryalar ve bazı enterokok türleri gibi geç ve güç üreyen bakterilerle, klasik besiyerlerinde üretilmeyen treponemalar ve virüsler için kullanışlı değildir. Yine fermentatif tip metabolizmaya sahip, multiplikasyon süreleri uzun olan anaerob bakterilerin tanısında da geç sonuç vermesi ve identifikasyondaki yetersizlikleri sebebi ile kültür teknikleri önerilmemektedir. Özetle;

1. Besiyerlerin yapısındaki metabolitlerin yetersizliği
2. Karışık floraya sahip örneklerdeki flora bakterilerinin metabolik ürünlerinin, örnekte üretilmesi amaçlanan patojen bakteri/bakteriler üzerine inhibitör etkileri
3. Mikroorganizmalar arasındaki satellit ilişkiler
4. Kültür ortamında, doğal ortamdaki Quorum sensing şartlarının sağlanamaması sebebi ile mikroorganizma toplulukları arasındaki işbirliğinin gösterilememesi gibi sebepler enfeksiyon hastalığı ile muhtemel etyolojik ajan/ajanlar arasındaki ilişkinin ispatında bazen yetersiz kalabilmektedir.

Ayrıca örnek alınması ve ortamın oksijen yoğunluğu, pH değişimi, ısı farklılıkları, beslenmede yetersizlik ve bekletilme süresi gibi uygun olmayan şartlarda örnek transportu, örnekteki canlı mikroorganizma sayısını ve buna bağlı olarak yöntemin duyarlılığının azalmasına yol açabilmektedir.

Moleküler tanı yöntemleri Adli Tıp, Onkoloji ve Genetik bilim dalları başta olmak üzere birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Bu yöntemler son yıllarda, üretilmesinde güçlük çekilen veya kültür ortamlarında hiç üretilmeyen mikroorganizmaların sorumlu olduğu, enfeksiyon hastalıkları tanısında da başarı ile kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler tanı yöntemleri yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Ayrıca, tekrarlanabilir sonuçlar üreten ve genomdaki tek nükleotid farkını bile ortaya koyabilmektedir. Günümüzde PCR, PCR-Restriction Fragment length polymorphism (PCR-RFLP), Arbitrarily Primed-PCR (AP-PCR), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) ve Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) gibi moleküler epidemiyolojik yöntemler, biyokimyasal ve fizyolojik özellikler,

morfolojik yapı, antibiyotik duyarlılık kalıpları gibi düşük duyarlılığa sahip, tekrarlanabilirliği laboratuvar şartlarına bağlı olarak değişen, fenotipik özelliklere dayalı epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin yerini almaya başlamıştır.

Bu çalışmada hedef mikroorganizmaların modifiye besiyerlerinde kolay üretilibilmeleri sebebi ile temel olarak kültür bazlı izolasyon ve identifikasyon yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca kültüre paralel olarak, örneklerdeki hedef mikroorganizmaların tanısında daha kısa sürede ve daha duyarlı sonuç üreten Nükleik Asit Amplifikasyon yöntemi olan PCR kullanılmıştır. Böylece PCR'ın duyarlılığı ve uygulanabilirliği de araştırılmıştır.

Mikroorganizmalar için moleküler tanısal metotların kültüvasyona göre çeşitli avantajları vardır. Bunlar;

1. Kültür ortamında üretilmeyen mikroorganizmaların gen amplifikasyonu ile gösterilebilmesi,
2. Spesifik primerler yardımı ile hedef bakteri türü genomundaki korunmuş, multikopi ve spesifik gen bölgelerinin çoğaltılmasının mümkün olması,
3. Direkt klinik materyalden amplifikasyonun mümkün olması,
4. DNA'nın geç degrade olması sebebi ile canlı mikroorganizma veya ölü mikroorganizmaya ait ampikonların yaratacağı belirsizliklerin kantitasyon veya mRNA RT-PCR uygulamaları ile ortadan kaldırılmasının mümkün olması
5. Genellikle 2-4 saat gibi kısa sürede sonuç vermesi,
6. Örneklerin alınması, taşınması ve saklanması konusundaki uygulamaların, klasik kültür yöntemlerinde kullanılan taşıma yöntemlerine göre daha toleranslı oluşu,
7. Kantitatif yöntemlerle tedavinin takibinin mümkün olmasıdır.²⁰⁸

Moleküler tanı ve tiplendirme amacı ile çok sayıda farklı enzim ve termal döngü siklusunun kullanıldığı amplifikasyon bazlı yöntemler geliştirilmiştir. In house PCR, Transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA), Strand displacement amplifikasyon, Nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon (NASBA), ERIC-PCR, Nested-PCR ve AP-PCR bu yöntemlerden en çok kullanılanlarıdır. Bizim çalışmamızda kullandığımız in-house PCR yöntemi, bir hedef dizinin amplifikasyonu için kullanılabilceği gibi, tek tüpte birden fazla hedef DNA fragmentinin amplifikasyonunu amaçlayan ve hedef dizi sayısı

ile uyumlu primer dizilerinin reaksiyona sokulduğu, “Multiplex-PCR” düzeni ile de uygulanabilmektedir.

Amplifiye edilecek en uygun nükleik asit fragmenti ile primer dizilerini seçme şansını yaratması sebebi ile in-house PCR yöntemi sıklıkla araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

In-house-PCR yöntemi ile teorik olarak, örnekteki 1-10 mikroorganizmanın tespiti mümkün olabilmektedir. Ancak pratik uygulamalarda farklı mikroorganizma türleri için güvenilir sonuçların 10-100 mikroorganizma ile sağlanabildiği gösterilmiştir. Diğer PCR uygulamaları gibi in-house PCR’ında en önemli dezavantajı canlı ve ölü mikroorganizma ayırımı yapamamasıdır. Bu ayırımı şart olması halinde ya mRNA-RT-PCR modifikasyonu uygulanmalı veya kantitatif-PCR ile miktar tayini yapılarak aralıklı örneklerde DNA yükü izlenmelidir²⁰⁹.

Bu çalışmada, 170 hastaya ait kanal içi ve tükürük örnekleri, kanal enfeksiyonlarına sebep olan mikroorganizmaların tanısı için konvansiyonel kültür teknikleri ve in-house PCR yöntemi ile eş zamanlı olarak değerlendirilmiştir. In-house PCR’in yöntemi konvansiyonel kültür yöntemlerine göre hızlı, yüksek duyarlı ve özgüllüktedir. Ayrıca, metabolik özellikleri yüzünden konvansiyonel kültür yöntemleri ile üretilmesinde güçlük çekilen, ancak kanal enfeksiyonlarında sık karşılaşılan ve ilaç direnci yüzünden tedavi problemleri yaratan enterokok ve candida türlerinin tanı ve tiplendirilmelerinde kullanılmaktadır.

Enterokoklar %5 oranında kan içeren herhangi bir besiyerinde izole edilebilir. Safra-eskulin azid, feniletal alkol agar, Columbia kolistin-nalidiksik asid agar ve azid içeren diğer besiyerleri kullanılarak gram negatiflerden ayrılabilir. Enterokoklar için standart besiyerleri, uygun antibiyotik suplementi eklenmiş Beyin-kalp infüzyon veya Todd-Hewitt broth veya agardır. Enterokoklar 35-37°C de anaerop şartlarda üretilebilir²⁰⁹. Ayrıca klinik örneklerden enterokokların farklı tür ve suşlarını ayırmada; kanamycin esculin azide agar (KAAA) da kullanılmaktadır²¹⁰. Çalışmamızın kültür kısmında enterokok izolasyonu için kanlı agar kullanıldı.

Mantarlar, seçici ortam kullanılarak endodontik örneklerden izole edilebilmektedir. Mantarlar bakterilere göre yüksek pH’a dayanıklıdır bu yüzden mantarların izolasyonunda çeşitli seçici ortamlar kullanılmaktadır. Sabora agarı ağız mantarlarının izolasyonunda sıklıkla kullanılan bir agardır. Ortamın pH’ı asidiktir

(pH=5.6), böylece mantarların ve asidurik organizmaların üremesine izin verir, ama çoğu bakterinin üremesini de engeller. pH hidroklorik asit eklemesiyle 3-4'e düşürülür, böylece asidurik bakterilerin üremesi engellenir.²⁵

Triptiksoy serum bacitracin vankomisin (TSBV) ortamı, *A.actinomyetemcomitans* ve yakından ilişkili *Haemophilus* türünün izolasyonunda birincil olarak kullanılan seçici ortamdır. Diğer bakterilere karşı yüksek ayırt edici gücüne karşı, TSBV petrileri bu ortamda iyi büyüyen ağız mantarlarının birincil izolasyonu için de sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, eğer iki grup birden mevcutsa TSBV petrilerinde büyüyen çok sayıda Gr negatif enterik çomakların, az sayıda bulunan mantar kolonilerinin üremesini önlemektedir. Bu yüzden SDA veya her iki agarın birden kullanımı tavsiye edilmektedir. TSBV ortamı serum eklemesinden dolayı biraz daha pahalıdır. Buna rağmen, ağız mantarlarının izolasyonunda 2 ortamın etkinliğini karşılaştıran, çok sayıda klinik örneğe sahip bir çalışma bulunmamaktadır²⁵.

Mantarlar aynı zamanda Rogosa agar (laktobasil izolasyonu için) ve Mitis Salivarius agar (*S.mutans* ve ilişkili streptokokların izolasyonu için) gibi asidurik bakterileri hedef alan bazı seçici ortamlarda üreyebilmektedir. Ancak, bu ortamlar ağız mantarlarının izolasyonunda özel olarak kullanılmamaktadır.²⁵

Bununla birlikte, Slack et al.²¹¹ Robertson's agar, Goldman ve Pearson²¹² triptikaz soy agar ve kanlı besiyeri, Leavitt et al.²¹³ dekstroz agar kullanarak yalnızca mantar varlığını ortaya koyarken, Jackson ve Halder²¹⁴ SDA, Matusow et al.²¹⁵ Schaedler agarı, Tronstad et al.²¹⁶ Brucella kanlı besiyerini kullanarak *C.albicans* varlığını göstermişlerdir.

Araştırmacıların deneyimlerine göre, mantarlar hedef mikroorganizma olursa SDA'nın birincil seçim olması uygundur²⁵. Bu yüzden çalışmamızın kültür kısmında mantarlar için SDA besiyeri kullanıldı.

5.3. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerde *E.faecalis* Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi

Çalışmada kültür yöntemi ile birincil enfeksiyonlu dişlerde *E.faecalis* %14 oranında bulunurken, PCR yöntemi ile *E.faecalis* %16 oranında bulundu. Birincil enfeksiyonlu dişlerden alınan örneklerin analizinde yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$, Ki Kare).

E.faecalis birincil kök kanal enfeksiyonlarında her ne kadar az sayıda olsa da özellikle kural sızıntılı dişlerde bulunabilmektedir¹³². Enterokoklar tek veya karışık kültürler halinde kök kanal sistemlerinde yaşayabilmektedir³⁵. Ancak, kök kanalında yok edilmesi oldukça güçtür¹⁴¹. *E.faecalis*'e ek olarak *E.faecium* ve *E.casseliflavus* gibi enterokok türleri de insanların nekrotik kök kanal sistemlerinde bulunabilmektedir²¹⁷.

Sassone et al.¹³³ yaptıkları çalışmada 111 tek köklü birincil enfeksiyonlu dişten elde edilen mikroorganizmaların birleşimi DNA-DNA hibridizasyon tekniği ile incelemiştir. Bu çalışmada pozitif üreme gösteren örneklerin %89.3'ünde *E.faecalis* bulunmuştur. Bu bulgu bazı çalışmalarla uyumsuzdur çünkü bu tür genellikle ikincil enfeksiyonlu dişlerle ilişkilidir^{15,108,217} ve mikrobiyolojik kültür¹⁰⁹ ve moleküler metotlarla değerlendirilen birincil endodontik enfeksiyonlarda nadiren bulunmaktadır^{218,219}.

Sedgley et al.²²⁰ bu mikroorganizmayı real-time PCR kullanarak birincil endodontik enfeksiyonlu 40 dişin %67.5'inde bulmuşlardır.

Gomes et al.¹³² 50 birincil ve 50 ikincil enfeksiyonlu diş içeren 100 örneklilik çalışmada kültür metoduyla 23 örnekte, moleküler metotla 79 örnekte *E.faecalis* izole etmişlerdir. *E.faecalis* kültür yöntemi ile 50 birincil enfeksiyonlu dişin 2'sinde (%4) ve 50 ikincil enfeksiyonlu dişin 21'inde (%42), PCR yöntemi ile 50 birincil enfeksiyonlu dişin 41'inde (%82) ve 50 ikincil enfeksiyonlu dişin 38'inde (%76) bulunmuştur. Bu çalışmada *E.faecalis*'in nekrotik kök kanallarında yüksek oranda bulunmasının nedeninin kural sızıntı olduğu bildirilmiştir. Nekrotik pulpal dişlerin çoğunda (49/50) bozulmuş kural restorasyon, çürük veya kural olarak restore edilmemiş dişler bulunmaktadır. Kural sızıntı enterokokların pulpa boşluğuna girişindeki yerlerden birisidir. Çalışmamızda bulduğumuz düşük sonuçlar, ağız ortamına açık olan kanalların çalışmaya dahil edilmemiş olmasıyla açıklanabilir.

Roças et al.¹⁵ ve Fouad et al.¹³⁴ birincil enfeksiyonlarda 16S rDNA primeri ile *E.faecalis*'i sırasıyla %18 ve %8 bulmuşlardır. Engström 40 yıl önce, nekrotik kök kanallarının tedavisinde pozitif kültürü dişlerin %12.1'inde enterokok bulunduğunu rapor etmiştir¹⁴¹. Bizim çalışmamız da bu çalışmalarla uyum göstermektedir.

Siqueira et al.¹⁶ moleküler genetik yöntem kullanarak birincil kök kanal enfeksiyonlarında *E.faecalis*, Streptokok ve Actinomyces bulunma sıklığını araştırmışlardır. Örnekler 27'si akut periradiküler absese sahip 53 enfekte dişten alınmış

ve 13 bakteri türünün varlığı genomic DNA probeları ve Checkerboard DNA-DNA hibridizasyon kullanımıyla ortaya konmuştur. Kök kanal örneklerinde bulunan bakteriler PCR ile tanımlanmıştır. Bu çalışmada örneklerin %22.6'sında Streptokok, %9.4'ünde Actinomyces, %7.5'inde *E.faecalis* saptanmıştır. Asemptomatik lezyonlarda ise en sık bulunan türün *S.intermedius* (%11.5), *E.faecalis* (%11.5) ve *S.angiosus* (%77) olduğu bildirilmiştir.

5.4. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerde *E.faecalis* Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda *E.faecalis*, kültür yöntemi ile ikincil enfeksiyonlu dişlerde %9 oranında ve PCR yöntemi ile %10 oranında bulundu. İkincil enfeksiyonlu dişlerden alınan örneklerin analizinde yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$, Ki Kare).

E.faecalis az besin varlığında ve diğer mikroorganizma türlerinin az görüldüğü ikincil enfeksiyonlu dişlerin kök kanallarında yaşamını sürdürebilmektedir. Bu başarısız kanal tedavili dişlerde mikroorganizmanın virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu durumun *E.faecalis* hücrelerinin dentin tubüllerinin içine girebilme ve insan serumunun varlığında kollajene tutunabilme yeteneğiyle ilişkili olabileceğinden kaynaklanmaktadır⁴³. Özellikle DNA'sının dentin tarafından absorbe edilmesi ve dentinden çıkarılmasının zorluğu birçok probleme neden olmaktadır²²¹.

Molander et al.¹¹ yaptıkları çalışmada fakültatif anaeroplara özellikle Gr pozitiflerin düşük metabolik aktivitede uzun süre hareketsiz olarak yaşayabildiğini ve kök kanal tedavisi sırasında veya sonrasında kronal sızıntı gibi faktörlerin besin durumunu değiştirebildiği ve bakteri üremesini sürdürebildiğini bildirmektedir. Foschi et al.¹³⁶ yaptıkları çalışmada örnekler, kanal tedavisi yapılacak 54 hastanın 62 dişinden elde edilmiştir. Dişler akut apikal periodontitis, kronik apikal periodontitis ve şiddetli apikal periodontitis olarak kategorize edilmiştir. Vakaların %71'inde birincil, %29'unda ikincil endodontik enfeksiyon bulunduğu bildirilmiş ve seçilen bakterilerin analizlerinde PCR yöntemi kullanılmıştır. *T.denticola* ve *E.faecalis* 62 örneğin 15'inde, *P.gingivalis* 8 örnekte, *P.intermedia* 5 örnekte ve *T. forsythensis* 4 örnekte bulunmuştur. *E.faecalis* kronik apikal periodontitisli dişlerin %60'ında ve ikincil enfeksiyonlu dişlerin %72'sinden elde edilmiştir. *E.faecalis*'in kronik apikal periodontitis ve ikincil

endodontik enfeksiyonda bulunma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Molander et al.¹¹ 100 apikal periodontitisli kanal tedavili dişin yeniden tedavisinde kültür yöntemi ile %68 oranında bakteri bulmuşlardır. *E.faecalis* en sık izole edilen tür olduğu ve pozitif üreme gösteren dişlerin %47'sinde bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, *E.faecalis* 19 başarısız kanal tedavili dişin 6'sından tek tür olarak kültür yöntemi ile izole edilmiştir.

Sundqvist et al.⁹ periapikal radyolusensi olan kanal tedavili 54 diş yeniden tedavi ederken, kök kanallarından mikrobiyolojik inceleme için örnek almışlardır. Bu örneklerin 24 (%45)'ünde çeşitli cinsde bakteri üremesi görülürken, geri kalan 30 dişte herhangi bir üreme görülmemiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre *E.faecalis*'in en sık izole edilen bakteri olduğu ileri sürülmüştür.

Hancock et al.¹⁹ tedavi sonrası inatçı enfeksiyonu olan 54 kanal dolgulu dişin yeniden tedavisinde, 33 (%61) kök kanalında çeşitli mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. *E.faecalis*, pozitif kültüre sahip dişlerin 10 (%30)'unda ve 6 dişte de tek tür olarak bulunmuştur.

Peciuline et al.¹⁸ yaptıkları çalışmada 25 apikal periodontitisli eski kanal tedavili dişin yeniden tedavisinde tedaviden önce, eğlemeden sonra ve NaOCl ve EDTA ile irrigasyondan sonra kültür almışlardır. Mikroorganizmalar 25 dişin 20'sinden izole edilmiştir. *E.faecalis* 20 kültür pozitif dişin 14'ünden saf kültür veya floranın major komponenti olarak elde edilmiştir. Eğleme ve irrigasyondan sonra alınan ikinci örneklerde 20 örneğin sadece 7'sinde üreme görülmektedir. Bunlardan 5'inde saf kültür olarak *E.faecalis* bulunmuştur.

Peciuline et al.¹⁴² yaptıkları başka bir çalışmada ise apikal periodontitisli 40 kanal tedavili diş yeniden tedavi edilmiştir. Mikroorganizma üremesi 33 (%83) dişte görülmüştür ve *E.faecalis* kültür pozitif dişlerin 21 (%64)'inden izole edilmiştir. On bir dişte *E.faecalis* tek tür olarak bulunmuştur ve 10 dişte diğer bakteriler ve mantarlarla birlikte izole edilmiştir. *E.faecalis*'in karışık enfeksiyon olarak bulunduğu 10 dişin 8'inde, *E.faecalis* baskın tür olarak bulunmuştur.

Pinherio et al.¹⁷ yaptıkları bir çalışmada, başarısız kanal tedavili 60 dişin 51 (%85)'inde üreme görülmüştür. *E.faecalis* en sık izole edilen türdür ve bütün dişlerin

%45'inde ve pozitif kültürlü olanların %53'ünde bulunmuştur. Yirmi yedi *E.faecalis* türünün 18'i saf kültür olarak analiz edilmiştir.

Siqueira ve Roças¹³⁸ kanal tedavisi başarısızlığıyla ilişkili mikroorganizmaları PCR kullanarak analiz etmişlerdir. Periapikal lezyona sahip kanal tedavili 22 dişten kök kanal örnekleri alınmış ve yeniden kanal tedavisi yapılmıştır. Örneklerden DNA ekstrakte edilmiş ve PCR kullanılarak 19 farklı tür varlığı analiz edilmiştir. Çalışılan 19 türden en azından biri olmak üzere bütün örnekler pozitif bulunmuştur. *E.faecalis*'in en sık izole edilen tür olduğu ve dişlerin %77'sinde bulunduğu bildirilmiştir. Diğer bulunan çeşitler *Pseudoramibacter alactolyticus* (%52), *Propionibacterium proproncum* (%52), *Dialister pneumosintes* (%48), *Filifactor alocis* (%48) ve *C.albicans* (%9)'tır.

Zoletti et al.¹⁴⁴ tür-spesifik 16S rRNA gen esaslı PCR kullanılarak yaptıkları çalışmada 50 dişin 40 (%80)'nda *E.faecalis* bulmuştur. Kültür metodu ile *E.faecalis* 50 dişin 8 (%16)'inde bulunmuştur. PCR'ın bu bakteri türlerini analiz etmede kültür metoduna göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bu 50 dişin 27'si periradiküler lezyonu olmayan kanal tedavili diştir ve PCR yöntemi ile 22 (%81.5)'sinde, kültür metoduyla 5'inde (%18.5) *E.faecalis* bulunmuştur.

Çalışmamızda *E.faecalis* kültür metodu ile %9, PCR metodu ile %10 oranında bulundu. Birçok çalışmaya göre düşük olarak tespit edilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda örnek sayısı diğer çalışmalardan çok daha fazladır.

Farklı ülkelerin laboratuvar bulguları endodontik enfeksiyonla ilişkili türlerin sıklığının çok farklı olduğunu göstermiştir. Bu farklılığın, tanımlama metodundaki değişikliklere ve kök kanal mikrobiyatındaki birleşimin coğrafik etkiye bağlı olmasından şüphelenilmektedir. Başka bir deyişle toplumun ağız içi mikrobiyotası dünyanın farklı bölgelerinde değişik gösterebilmektedir²⁰⁸. Diğer etkenler beslenme alışkanlığı, tedavi sırasında asepsi derecesi, restorasyonun kural sızıntısı, kullanılan primerlerin hassasiyet farklılığıdır²²².

Siren et al.¹⁰⁸ enterokok cinsi ve diğer enterik bakterilerin kök kanalına, tedavi sırasında çalışma alanının yetersiz izolasyonu, geçici dolgunun sızıntısıyla veya kök kanalının drenajı için ağız ortamına açık bırakılmasıyla girebileceğini bildirmişlerdir.

Kök kanal tedavisi yapılan hastaların iyi doldurulmayan kök kanallarında enterokoklar yaşayabilmekte ve üreyebilmektedir¹⁰⁸. Bununla birlikte periodontitisli

hastalar sağlıklı periodonsiyumlu hastalara göre *E.faecalis* hücrelerine daha iyi bir ortam sağlamaktadır. Bunun nedeni periodontal hastalığı olan bireylerin daha kötü oral hijyene sahip olması ve plak retansiyonu için daha fazla alan bulunmasıdır¹⁴⁷.

Etkili bir moleküler teknik; prevalansın doğru değerlendirilmesini, endodontik *E.faecalis* enfeksiyonunun lokal ve sistemik hastalıklardaki doğru etkisini değerlendirmede kritikdir. Endodontik prevalans çalışmalarında primerlerin hassas olması özellikle retreatment vakalarında önemlidir. Bu vakalarda kök kanalında ulaşılabilen mikroorganizma sayısı düşük olabilir ve kanal dolgusu çıkartılırken mikroorganizmalar kayba uğrayabilir¹³⁸.

Bizim çalışmamızda kullanılan Grup 1 primer seti; 14 Enterococcus cinsi, 2 Abiotrophia cinsi ve 4 Listeria cinsi tuf genleri için¹²² ve grup 2 primer seti ise *E.faecalis* 16S rRNA geni için spesifiktir¹³⁸. Çalışmada kontrol amacıyla her örnek PCR yöntemiyle 2 kez incelenmiştir.

5.5. Oral Kavitede *E.faecalis* Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda *E.faecalis* birincil enfeksiyonlu dişlere sahip olan hastaların dil altından alınan tükürük örneklerinin kültür yöntemi ile analizinde %7, PCR yöntemi ile analizinde %6, ikincil enfeksiyonlu dişlere sahip olan hastaların tükürük örneklerinin kültür yöntemi ile analizinde %9, PCR yöntemi ile analizinde %10 olarak bulundu. Birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlere sahip hastaların ağız kavitesinde *E.faecalis* bulunma sıklıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$, Ki Kare).

Ağız mikroflora bileşenleri farklı toplumlarda değişebildiği gibi aynı bireyin ağız kavitesinde farklı yerlerde ve ağızın aynı bölümü içerisinde farklı durumlarda da değişiklik gösterebildiği için yeterince mikroflora çalışması yapılamamıştır²²³.

Williams et al.²² 206 vakanın %21.8'inin tükürüğünde enterokok bulmuşlardır. Smyth et al.¹⁴⁵ ın yaptıkları çalışmada hemodiyaliz hastalarının ve farklı kontrol gruplarının diş taşında enterokok bulunma oranını araştırmışlardır. Üniversite grubu, ağırlı dişli hasta grubu, hemodiyaliz hasta grubu ve hemodiyaliz ünitesinde çalışan personeldeki enterokok taşıma oranı birbirinden önemli derecede farklı bulunmamış ve bu oranın %5-20 arasında değiştiği bildirilmiştir. Sonuçlara göre yaş, cinsiyet, yakın zamandaki antibiyotik kullanımı hikayesi ve son diş hekimi muayenesinin üzerinden ne

kadar zaman geçtiğinin enterokok bulunma oranlarıyla ilişkisi yoktur. Bu durumlarda en sık elde edilen enterokok türü *E.faecalis*'dir ve bunu *E.liquefaciens* takip etmektedir.

Sedgley et al.¹⁴⁶ oral enterokokların sıklığı, fenotipi ve genotipini araştırmışlardır. Enterokoklar, endodontik tedavi için gelen 100 hastanın ağız gargarası örneklerinden %11'inde, herhangi bir endodontik tedavi hikayesi olmayan 100 diş hekimliği öğrencisinin %1'inden elde edilmiştir. Endodontik tedavi için gelen hastaların ağız ortamında *E.faecalis* varlığının yaş, cinsiyet, sigara, son 2 ayda antibiyotik kullanma, ağız kuruluğu, semptomların bulunmasıyla ve endodontik tedavisi yapılacak dişin periapikal lezyonunun radyografik durumuyla ilişkili olmadığını ortaya koymuşlardır.

Sedgley et al.¹⁴⁷ yaptıkları başka bir çalışmada tür-spesifik *E.faecalis* 16S rRNA gen primerleri kullanılarak yaptıkları PCR analizlerinde 41 hastanın 29 (%70)'unun tükürük, dil, diş eti cebi, endodontik tedavi sırasında alınan örneklerin en azından bir tanesinde *E.faecalis* bulunmuştur. *E.faecalis* 12 tükürük (%29), 22 dil (%55), 7 diş eti cebi (%22) ve 2 endodontik tedavi sırasında alınan örneklerde bulunmuştur. Bu çalışmada *E.faecalis*; diş eti cebi, tükürük ve kök kanalı örneklerine göre dilde daha fazla bulunmuştur. *E.faecalis* sağlıklı dişetinde (%73) sağlıklıya (%20) göre daha çok bulunmaktadır. Dil örneklerinde *E.faecalis* görülmesinde kültür ve PCR metotları arasında büyük bir fark bulunmaktadır. Bu dil plağının derin tabakalarının daha fazla ölü veya yaşayabilen ama kültive edilemeyen hücreleri barındırabileceğinden dolayı olabildiği bildirilmiştir.

Sedgley et al.¹³⁷ yaptıkları bir diğer çalışmada ise *E.faecalis*'i 30 tükürük örneğinin 5'inde 114–490 hücre/ml'ye ulaşan konsantrasyonlarda bulmuşlardır. Bu çalışmada, paralel mikrobiyolojik kültür değerlendirmelerinde *E.faecalis*, qPCR ile bulunan 5 örneğin sadece 2'sinde 30–240 cfu/ml konsantrasyonlarda bulunmuştur. Geri kalan 25 örnek qPCR ile bakıldığında *E.faecalis*'in negatif olduğu bulunmuş ve bu negatif kültür tarafından doğrulanmıştır.

Tükürük örnekleri, dil dorsumu ve diş eti cebi örneklerine göre daha fazla kültive edilen enterokok bulmaya yardımcı olmaktadır. Farklı enterokok türleri ve *E.faecalis* suşları farklı virülans faktörlere sahiptir ve bunların ağız kavitesine tutunmaları farklılık göstermektedir¹⁴⁷.

Aas et al.²²⁴,nın yaptıkları çalışmada, beş sağlıklı bireyden elde edilen DNA örneklerinde 16S rRNA genlerini içeren 2500'den fazla klonun analizinde enterokok cinsi DNA dizisine rastlanmamıştır. Bu yüzden *E.faecalis* ve diğer enterokok türleri ağız florasının bakterileri olarak kabul edilmezler²²⁴.

Enterokoklar peynir, et, sebze ve yağlar gibi fermente edilmiş pişmemiş besinlerde sıklıkla bulunmaktadır. *E.faecium* etlerde bulunurken, *E.faecalis* peynirde baskındır¹²⁵. Enterokok'un yetiştiği ortam memelilerde özellikle insanlarda, gastrointestinal kanaldır. Bununla birlikte, enterokoklar çeşitli yerlerde, olağanüstü kapasitesiyle toprak ve yüzey suları gibi farklı ortamlarda üreyerek kolonize olabilmektedir. Şimdiye kadar yiyeceklerden kaynaklanan patojenik etkiye sahip enterokoklar az sayıda bulunmuştur. Yiyecek ürünlerindeki enterokok varlığına dayanarak, ağız kolonizasyonunun kısa süreli kaynağı olarak rol oynayabileceği hakkında tahminler bulunmaktadır²²⁵.

Razavi et al.²²⁶ 50 diş hekimliği öğrencisinin tükürük örneklerini toplamış ve enterokok varlığı açısından negatif olan bireyleri çalışmaya dahil etmiştir. Farklı çeşitteki 20 peynir yerel süpermarketlerden elde edilmiştir. Enterokoklar standart metotlar kullanılarak kültive edilmiştir. Enterokok varlığı 5 İsviçre peynirinin 1'inde, 5 Fransız yumuşak peynirinin 3'ünde ve 5 Mozeralla peynirinin 1'inde ve 5 Feta peynirinin 1'inde bulunmuştur. Diş hekimliği öğrencilerinden 8 gönüllü kişi 10 g en yüksek değerde *E.faecalis* içeren peynirden yemişlerdir. Tükürük örnekleri peynir yenmeden önce ve yendikten 1, 10 ve 100 dakika sonra toplanmıştır. Bir dakika sonra ortalama 5480 *E.faecalis* koloni oluşum ünitesi tükürük örneklerinden elde edilirken, bakteri sayısı 10 dakika sonra düşmüş ve 100 dakika sonra 1 ve 10 dakikalık skorlara göre önemli miktarda düşmüştür. Bir hafta sonraki bulunma düzeyi daha düşük bulunmuştur.

Antibiyotik dirençli enterokoklar sıklıkla et ürünlerinde, süt ve süt ürünlerinde, hazır yiyeceklerde ve hatta probiyotik bakteri olarak kullanılmaktadır. Avrupa peynirleriyle yapılan önceki çalışmalarda, enterokoklardan özellikle *E.faecalis* ve *E.faecium*'un farklı oranlarda penisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, gentamisin, linkomisin, rifamisin, fusidik asit ve vankomisine karşı dirençli olduğu bulunmuştur²²⁷. Antibiyotik dirençli enterokoklar sıklıkla pastörize edilmiş ve daha

fazla miktarda işlenmemiş süt peynirlerinde bulunmalarına rağmen, oluşan son ürünler besin zinciri içerisinde artan antibiyotik direnciyle daha ciddi risklere neden olabilirler.

5.6. Birincil Enfeksiyonlu Dişlerde *C.albicans* Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi

Mantarların tedavi edilmemiş kök çürüklerinde²¹⁴, dentin tubüllerinde²²⁸, inatçı apikal periodontitise sahip tedavi edilmiş kök kanallarında⁷⁹, asemptomatik apikal periodontitisli dişlerin apikal kök yüzeylerinde²²⁹ ve periapikal dokulardaki varlığı²¹⁶ kültür yöntemi ve mikroskopik inceleme ile kanıtlanmıştır. Mantarlar kök kanallarına başlangıç tedavisi sırasında, restorasyonların sızıntısıyla veya dentin tubüllerine kolonizasyonla girebilmektedir¹⁶⁷.

Çeşitli araştırmalarda birincil enfeksiyonlarda kök kanallarında mantarların bulunması %0.6'dan %10'a kadar değişen oranlarda bulunmuştur^{211,212,213} ve bu oran tedaviye dirençli vakalarda %3.7-10 arasında değişmektedir^{9,11,216}.

Çalışmamızda kültür yöntemi ile birincil enfeksiyonlu dişlerde *C.albicans* %17 oranında bulunurken PCR yöntemi ile %20 oranında bulundu. Birincil enfeksiyonlu dişlerden alınan örneklerin analizinde yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05, Ki Kare).

Möller¹¹¹, *Candida* türlerini 29 pozitif üreme gösteren sağlam kuronlu dişlerin nekrotik pulpa örneklerinin 1'inde izole etmiştir. Siqueira¹⁵⁹ PCR ile 50 enfekte kök kanalından yalnızca 1'inde saptamıştır. Şen et al¹⁵⁸, periradiküler lezyonlu çekilmiş 10 dişin 4'ünde mantar bulmuştur. Siqueira¹⁶⁰, SEM ile primer kök kanal enfeksiyonlarında mikrobiyal kolonizasyon varlığını göstermiş ve 15 dişin 1'inde maya benzeri hücreler görmüştür ve bu maya benzeri hücreler tomurcuklanmayla büyük koloniler oluşturmuşlardır.

Baumgartner et al.¹⁴ periapikal radyolusensili vakaların değerlendirildiği çalışmada, birincil apikal periodontitisli enfekte kök kanallı 24 dişin 5 (%21)'inde *C.albicans*'ı PCR ile bulmuştur. Aynı çalışmada, iğne aspirasyon tekniği kullanılarak 19 abseli vakadan örnekler toplanmış ve bu örneklerin hiçbirinde *C.albicans* DNA'sına rastlanmamıştır. Siqueira et al.¹⁵⁹ çalışmasında ise grup-spesifik primerler ve PCR kullanılarak birincil apikal periodontitisli 91 kanal örneğinin 1'inde mantar bulunmuştur.

Egan et al.¹⁶⁷ yaptıkları çalışmada birincil enfeksiyonlu dişlerde mantar bulunma sıklığını %5.7, ikincil enfeksiyonlu dişlerde %16 olarak bildirmiştir. Bu çalışmayla aynı seçici ortam olan SDA'ı kullanan Wilson et al.²³⁰ %1.9 ve Jackson et al.²¹⁴ %26 oranında mantar varlığını göstermişlerdir.

Bu iki çalışmada, kanal içi pansuman materyalinin yerleştirilmesinden sonra alınan kültürlerde mantar bulunma sıklığı sırasıyla %6.8 ve %33.6'ya yükselmektedir^{230,214}. Bu yetersiz tedavinin, mantarların üremesi için ortam sağladığı hipotezini doğrulamaktadır^{9,108}. Bu farklılıklar dişin kronal durumundan kaynaklanabilir ancak detaylar verilmemiştir.

Najzar-Fleger et al.²³¹ birincil enfeksiyonlu dişlerden alınan örneklerde, besiyeri olarak sabora agar kullanarak candida türlerini %55 oranında bulmuşlardır.

5.7. İkincil Enfeksiyonlu Dişlerde *C.albicans* Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda ikincil enfeksiyonlu dişlerde *C.albicans* kültür yöntemi ile %9 ve PCR yöntemi ile %11 oranında bulundu. İkincil enfeksiyonlu dişlerden alınan örneklerin analizinde yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$, Ki Kare).

İyi yapılmamış kök kanal tedavili dişlerdeki flora, tedavi edilmeyen dişlerin kök kanallarında bulunan floraya benzemektedir ve yetersiz kanal tedavili dişler yüksek sayıda tür içermektedir. Endodontik tedavi başarısızlıkları kök kanalının içinde kalan mikroorganizmalara bağlıdır. Eğer bu mikroorganizmalar patojen özellikte olur, yeterli sayıya ulaşır ve periradiküler dokulara giriş yolu elde ederse, periradiküler hastalıklara neden olabilir veya önceden var olan hastalığı sürdürebilirler⁹.

Mantarların birincil kök kanal enfeksiyonlarında bulunma sıklığı araştırılmış^{158,160} ama genellikle başarısız kanal tedavili dişlerde bulunmuştur^{7,11,19,79,102,166}. *C.albicans*'ın ikincil kök kanal enfeksiyonlarında bulunması, bu mikroorganizmanın kanal içi medikamentlerine direnç göstermesi, dentinde kolonize olabilmesi ve dentin tubüllerine penetre olabilme yeteneği ile açıklanmaktadır^{171,232}. Araştırmacılar kültür yöntemlerini kullanarak kanal tedavili dişlerde *C.albicans*'ı %3'den %18'e ulaşan değerlerde izole etmişlerdir^{9,11,17,111,142,166}.

Siqueira ve Roças¹³⁸ başarısız endodontik tedavili dişlerden alınan örneklerin PCR ile analizinde %9 oranında *C.albicans* bulmuşlar ve bu oranın mantar türlerinin başarısız endodontik tedaviyle ilişkili mikroorganizma topluluğun bir kısmını oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir.

Sundqvist et al.⁹ başarısız endodontik tedavili 24 dişin 2'sinde *C.albicans* izole etmişlerdir. Molander et al.¹¹ yaptığı apikal periodontitisli ve kanal dolgulu 100 diş içeren bir çalışmada *C.albicans* 3 kanalda izole edilmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada seçici ortam olan SDA kullanılmamıştır.

Hancock et al.¹⁹ periapikal radyolusensi olan kanal dolgulu 54 dişin mikroflorasını araştırmışlardır. Bu dişlerin 34'ünde üreme görülmüştür ve *C.albicans* sadece 1 diştten izole edilmiştir. Bu çalışmada mantarlar için seçici ortam kullanılmamıştır.

Pinherio et al.¹⁷ yaptıkları çalışmada periapikal lezyonlu kanal dolgulu 60 diş incelemiş ve 51 dişte üreme görüldüğü bildirilmiştir. Bunlardan sadece 2'sinin *C.albicans* olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada SDA kullanılmamıştır.

Peciuline et al.'ının¹⁴² yaptıkları çalışmada kronik apikal periodontitisli kanal dolgulu dişlerde mantarlara, enterik Gr negatif çomaklara, enterokok cinslerine rastlanmıştır. Kırk diş çalışmaya dahil edilmiş ve 33 dişte üreme görülmüştür. Bu çalışmada mantarlar için seçici ortam olan konvansiyonel kültür metotları kullanılmıştır. Mantarlar 6 diştten elde edilmiştir (%18 kültür (+) diştten). Bütün türler *C.albicans* türüne aittir.

Waltimo et al.¹⁰⁷ yaptıkları çalışmada *C.albicans*'ı 967 dişin kanal tedavisi tekrarında alınan örneklerin %4.9'undan elde ederken, Egan et al.¹⁶⁷ çalışmasında bu oranı %16 olarak bulmuştur. Çizelge 5.1'de ikincil enfeksiyonlu dişlerden alınan örneklerden *C.albicans*'ın bulunma oranları gösterilmektedir.

Çizelge 5.1: Periradiküler lezyonlu kanal tedavili dişlerde *C.albicans*'ın bulunma sıklığının karşılaştırılması

Çalışma	Tanımlama metodu	Mikroorganizma bulunan pozitif örnekler	<i>C.albicans</i>
Möller ¹¹¹	Kültür	%57	%3
Sundqvist et al. ⁹	Kültür	%44	%8
Molander et al. ¹¹	Kültür	%68	%4
Peciuliene et al. ¹⁴²	Kültür	%83	%18
Hancock et al. ¹⁹	Kültür	%63	%3
Cheung ve Ho ¹⁶⁶	Kültür	%67	%17
Pinherio et al. ¹⁷	Kültür	%85	%4
Siqueira ve Roças ¹³⁸	PCR	%100	%9

Endodontik enfeksiyonlarda mantar çalışmaları çok olduğu halde, çoğu çalışmada hasta sayısı azdır ve bu çalışmalarda mantarlar için seçici ortam kullanılmadığında mantar izolasyon sıklığı %5'den az olarak bulunmaktadır. Seçici kültür ortamı kullanıldığında ise bu oran %7-18'e çıkmaktadır. Bununla beraber, kanal tedavili veya tedavisiz apikal periodontitisli dişler arasındaki farklılık halen anlam kazanmamıştır. Çünkü özellikle mantarların izolasyonuna odaklanan karşılaştırmalı çalışmalar halen düşük sayıdadır.

Çalışmamızda seçici mantar kültür ortamı (SDA) kullanıldı ve *C.albicans* ikincil enfeksiyonlu dişlerde kültür yöntemi ile %9 ve PCR yöntemi ile %11 oranında bulundu.

5.8. Oral Kavitede *C.albicans* Bulunma Sıklığının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda birincil enfeksiyonlu dişlere sahip olan hastaların dil altından alınan tükürük örneklerinin kültür yöntemi ile analizinde %15 oranında *C.albicans*'a rastlanılırken PCR yöntemi ile analizinde %17, ikincil enfeksiyonlu dişlere sahip olan hastaların tükürük örneklerinin kültür yöntemi ile analizinde %16 ve PCR yöntemi ile analizinde bu oran %21 olarak bulunmuştur. Birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlere sahip hastaların tükürüklerinden alınan örneklerden elde edilen bulgularda yöntemler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadı ($p>0.05$, Ki Kare).

Egan et al.¹⁶⁷ 55 hastanın apikal periodontitisli 60 kök kanal tedavili dişini ve uyarılmamış tükürük örneklerini incelemiştir (25 kanal dolgulu, 35 tedavi edilmemiş diş). Bu çalışmada seçici ortam olarak (SDA) kullanılmıştır ve mantarlar tükürükte (%32) kök kanalına (%10) göre daha çok bulunmuştur. Yirmi üç izolat tükürükten ve 8 izolat kök kanal örneklerinden elde edilmiştir. Bu izolatların %74'ü candida cinsine

aittir. Tükürükten elde edilen mantar türlerinden *C.albicans* en sık bulunandır (17/23 veya %73.9), bunu *R.mucilaginosa* (2/23), *C.dublınıensis* (1/23), *C.tropicalis* (1/23) ve *Cryptococcus humicolus* (1/23) izlemektedir. Kök kanallarından elde edilen 8 izolat ise *R.mucilaginosa* (4/8), *C.albicans* (3/8), *C.saka* (1/8)'dir. Araştırmacılar hastanın tükürüğünde mantar varsa kök kanalında da mantar bulunma olasılığının 13.8 kat fazla olduğunu, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu vurgulamışlardır¹⁶⁸.

Egan et al.¹⁶⁷ çalışmasında tükürük örneklerinden izole edilen candida türleri (17/23) yüksek oranda bulunmuştur ve bu oran diğerlerinin bulgularıyla desteklenmektedir²³³. Ama genellikle immun sistemi baskılanmış hastalarla ilişkili olan *R.mucilaginosa*, *C.dublınıensis*, *Cryptococcus humicolus* ve *Trichosporan mucoides*²³⁴ bu çalışmada sağlıklı bireylerden elde edilmektedir. *C.dublınıensis*, Sullivan et al.²³⁵'in yaptıkları çalışmayla tanımlanmıştır ve HIV enfeksiyonuyla ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Son zamanlarda HIV-negatif bireylerden de elde edilmiştir.

Örnek toplama (imprint kültür, mukozal sürüntü, gargara, tükürük)²³⁶ ve kültür teknikleri²³¹ mantarların izole edilmesini etkileyen faktörlerdir. İmprint kültürle alınan örnekler mantarların ağız içi dağılımını göstermekte yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte, Oliver ve Shillitoe²³⁷ yaptıkları çalışmada tükürükden kültür alma tekniklerinin sağlıklı bireylerde candida taşıyıcılığının tespitinde en hassas metot olduğunu ortaya koymuşlardır.

Akdeniz et al.¹⁶⁸ ağızlarında çürük olmayan 20 sağlıklı çocuk ve çürüklü dişlere sahip 13 sağlıklı çocuğu dahil ettikleri çalışmada, çürüklü dişlere sahip çocukların %69'unun, çürüğü olmayan çocukların %5'inin tükürüğünde candida bulmuştur. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Ayrıca, %61.5 çocuğun kök kanallarında candida bulunmaktadır.

Rozkiewicz et al.¹⁶⁹ yaptıkları çalışmada çocuklar ve ergenlerden farenks, supragingival plak ve çürük lezyonlarından toplam olarak 206 mikrobiyolojik örnek almıştır. API sistemiyle mantarlar tanımlanmış ve 123 örnekte *C.albicans* izole edilmiştir. Bunun %49.6'sı supragingival plaktan, %39 çürük lezyonlarından ve %11.4'ü farengeal sürüntüden elde edilmiştir. *C.albicans* çocukların ağız kavitesinde yüksek oranda bulunmuştur.

5.9. Antibiyotiklerin *E.faecalis* İzolatlarına Etkisi

Çalışmamızda birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *E.faecalis* izolatlarının agar dilüsyon yöntemiyle belirli konsantrasyonlarda Spiramisin, Kolistin, Penisilin ve Vankomisine duyarlılıkları araştırıldı. Hem birincil hem ikincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen 18 izolatın Spiramisin ve Kolistine dirençli, 13 izolatın Penisiline, 17 izolatın Vankomisine dirençli olduğu bulundu. Geriye kalan 5 izolatın penisiline ve 1 izolatın vankomisine duyarlı olduğu görüldü.

Çoğu ilaca dirençli türler olan *Staphylococcus aureus*, *E.faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumonia*, *Myobacterium tuberculosis* ve diğer türlerin hayatı tehdit edici enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak, özellikle ağız enfeksiyonlarında, anaerobik bakterilerde çeşitli türler artmaktadır. Hastanelerde ve büyük medikal merkezlerde klindamisin, sefalosporinlere, penisinlere direnç gelişmektedir²³⁸.

Yeni çalışmalar özellikle vankomisine dirençli *E.faecium* ve *E.faecalis* gibi enterokokların ortaya çıktığını belirtmektedir. Bu vankomisin dirençli enterokoklar major nasokomial patojenler olarak hastanelerde karşımıza çıkmaktadır ve aynı anda pek çok antibiyotiğe direnç göstermektedir. Bu enfeksiyonların tedavisinde ise çok az tedavi seçeneği kalmaktadır²³⁹.

Vankomisin birincil olarak Gr pozitif bakterilere etkili bir ilaçtır ve ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılmalıdır²⁴⁰. Streptokoklar kadar enterokokların da neden olduğu endokarditin tedavisinde penisiline alerjisi olan hastalarda vankomisin tedavisi etkili bir alternatiftir.

Çalışmamızda *E.faecalis* izolatlarının penisilin ve vankomisine direnç gösterdiği bulunmuştur. Pinherio et al.²⁴¹ yaptıkları çalışmada kök kanallarından elde edilen bütün *E.faecalis* izolatlarını vankomisine duyarlı bulmuşlardır.

Litvanyalı 23 hastanın ve Finlandiyalı 36 hastanın apikal periodontitisli kök kanal dolgulu dişlerinden elde edilen *E.faecalis* izolatlarının hepsi penisilin ve ampisiline duyarlıdır ve izolatların hiçbiri vankomisine direnç göstermemiştir. Finlandiya ve Litvanyada farklı antibiyotik kullanımına rağmen, *E.faecalis* ağız kavitesinde commensal olarak bulunmaktadır ve izolatlar benzer antibiyotiğe direnç profili göstermiştir¹⁸⁰.

Pinheiro et al.¹⁷⁹ yaptıkları çalışmada, *E.faecalis* ikincil enfeksiyonlu dişlerden %45.8 oranında izole edilmiş ve bu izolatların benzilpenisilin, amoksisilin ve amoksisilin-klavulonik aside duyarlı olduğunu gösterilmiştir. Amoksisilin ve amoksisilin-klavulonik asidin MIC değeri benzilpenisilin'den düşüktür. Bu bulgular oral enterokokların ampisiline benzilpenisilinden daha hassas olduğunu bulan Roms et al. ve Nord ve Wadstöm' un bulgularıyla uyum içindedir.

Hoelscher et al. yaptıkları çalışmada amoksisilin, penisilin, klindamisin, metronidazol, doksisisiklin toz halinde temin edilmiş ve Kerr EWT patına, bu patın toplam hacminin %10 ağırlığında eklenmiştir ve pat üreticilerin tavsiyesine göre karıştırılmıştır. Bu karışımın *E.faecalis*'e etkisi agar difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kerr EWT patı ve amoksisilin, penisilin, klindamisin, doksisisiklin içeren antibiyotik bileşimlerinin yalnız başına Kerr EWT patıyla karşılaştırıldığında inhibisyon zonunda önemli farklılıklar olduğu ortaya çıkmıştır. Metronidazol-pat kombinasyonlarıyla, Kerr EWT patı arasında farklılık bulunmazken amoksisilin, penisilin, klindamisin, doksisisiklin gibi pat-antibiyotik kombinasyonları, tek başına patla karşılaştırıldığında geniş inhibisyon zonu göstermiştir¹⁷⁸.

Bazı çalışmalarda *E.faecalis*'in amoksisilin, amoksisilin-klavulonik asit, benzilpenisilin, vankomisin ve doksisisikline duyarlılığı bulunduğunu ama eritromisin ve azitromisine daha düşük oranda duyarlılık gösterdiği görülmüştür^{179,241}. Buna karşın, Dahlen et al.²⁰⁶ *E.faecalis*'in benzilpenisilin, ampisilin, klindamisin, metronidazol ve tetrasikline dirençli olduğunu ama eritromisin ve metronidazole duyarlı olduğunu ileri sürmüştür.

Fass²⁴² çalışmasında azitromisin ve eritromisin arasında çapraz direnç olduğunu ve azitromisinin enterokoklara karşı eritromisinden daha az etkili olduğunu göstermiştir. *E.faecalis* klindamisine direnç göstermektedir ve bu ilaç enterokoklara klinik olarak etkili değildir. Bu yüzden dental işlemlerde, enterokok enfeksiyonları için penisiline alerjisi olan hastalara önerilen alternatif profilaktik rejim sınırlıdır. Penisiline alerjisi olan hastalara uygun bir alternatif ilaç olan moxifloxacinin, kök kanallarındaki *E.faecalis* izolatlarına invitro olarak etkili olduğu gösterilmiştir. Yeni çalışmalar moxifloxacinin, periodontal patojenlere ve dentoalveolar abselerden izole edilen bakterilere iyi bir antibakteriyel etki gösterdiğini bulmuşlardır²⁴¹.

Sedgley et al.¹⁴⁶ yaptıkları çalışmada tükürük örneklerinden elde edilen bütün enterokok türlerinin ampisilin, benzilpenisilin, gentamisin ve vankomisine duyarlı olduğunu bulmuşlardır.

In vitro test sistemi *E.faecalis*'in diğer streptokoklarla kıyaslandığında, ampisilin ve penisiline 10-100 kez fazla MIC_s değeri gösterdiği bulunmuştur²⁰⁶.

Değişik coğrafik alanlarda ve enfeksiyonun ileri evrelerinde, bakterilerin direnç paternlerinin değiştiği görülmektedir¹⁴¹. Enterokokların kök kanallarından izole edildiği önceki çalışmalar izolatların tamamının eritromisine duyarlı olduğunu göstermişlerdir^{243,244}. Heintz et al.²⁴³ %90'dan fazla izolatın duyarlı olduğunu bulurken, Stern et al.²⁴⁴ %61.9 izolatın bu ilaca duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Bu bulgular enterokokların zaman geçtikçe eritromisine duyarlılığının gittikçe azaldığını vurgulamaktadır. Bu yüzden enterokokların eritromisine olduğu gibi diğer antibiyotiklere karşı da direnç gösterebileceği kabul edilebilir.

Endodontik orijinli birçok enfeksiyon antibiyotiğe gerek duyulmadan iyileşebilmektedir. Çünkü kan sirkülasyonu olmayan nekrotik ve enfekte pulpada antibiyotikler kök kanal sisteminde bulunan mikroorganizmalara ulaşamamakta ve yok edememektedir. Bu yüzden enfeksiyon kaynağına sistemik antibiyotik tedavisi etkisizdir. Bununla birlikte antibiyotikler immun yetmezliği olan hastalarda enfeksiyonun yayılmasını ve ikincil enfeksiyonların gelişmesini engellemektedir. Bu yüzden, antibiyotikler bazı endodontik enfeksiyonlarda ilave olarak kullanılmaktadır.

5.10. Antimikrobiyal Medikamentlerin *E.faecalis* İzolatlarına Etkisi

Çalışmamızda *E.faecalis* izolatlarının %2 CHX, %17 EDTA, %2.5 NaOCl ve %5 NaOCl gibi kanal içi irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığının araştırılmasında Disk difüzyon testi, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, M2-A9. 2006) standartlarında stripe modifiye edilerek yapıldı. *E.faecalis* üremesini en iyi engelleyen solüsyonun CHX olduğu ancak inhibisyon zonu oluşturmakta ise en etkili %5 NaOCl solüsyonun olduğu bulundu.

CHX'in %2'lik jel veya sulu solüsyonu, kök kanal boşluğundaki ve dentin tubüllerindeki *E.faecalis*'i azaltmakta veya tamamen elimine etmede etkilidir²⁶. %2'lik CHX solüsyonuyla 2 dakika irrigasyon yapmak, dentin tubüllerindeki *E.faecalis*'i 100 µm derinliğe kadar uzaklaştırmaktadır²⁶. Hem %0.12'lik CHX solüsyonu hem de

%10'luk Ca(OH)₂ patı, 46 °C'ye ısıtıldıktan sonra *E.faecalis*'e normal vücut ısısına göre daha yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği kanıtlanmıştır¹⁸⁹.

Gomes et al.¹⁸⁷ %5.25'lik NaOCl'ün *E.faecalis*'i 30 sn'de hızlıca yok edebildiğini, ama daha düşük konsantrasyonlarda (4-0.5%) tamamıyla yok edebilmesi için 5-30 dakikaya ihtiyaç olduğunu ortaya koymuşlardır. %0.2'lik CHX solüsyonu *E.faecalis*'i 30 sn'de yok edebilirken, aynı konsantrasyondaki CHX jel aynı etkiye 2 saatte ulaşmaktadır. Bu çalışma Oncag et al.²⁴⁵ ve Vianna et al.¹⁹⁹ çalışmalarıyla benzer sonuçlara sahiptir. Bu çalışmalarda in vitro olarak CHX, NaOCl'e göre *E.faecalis* ve *S.aureus*'u yok edebilmekte daha etkilidir. Sonuçlarımız bu sonuçlarla uyum içerisindedir.

Heling&Chandler¹⁸⁵ irrigan kombinasyonlarının in vitro olarak dentin tubüllerinde bulunan *E.faecalis*'e karşı antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmişlerdir. %3'lük hidrojen peroksit ve CHX solüsyonlarının spesifik kombinasyonunun, tek başına CHX ve NaOCl solüsyonları gibi diğer bileşiklerle karşılaştırıldığında dentindeki antimikrobiyal aktivitesinin daha fazla olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, birincil veya ikincil endodontik enfeksiyonlarda CHX ve hidrojen peroksit birleşiminin kök kanal dezenfeksiyonunda kullanımını gösteren herhangi bir klinik çalışma bulunmamaktadır.

E.faecalis biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir ve bu yeteneğiyle de fagositoza, antikora ve antimikrobiallere direnci, biyofilm oluşturmayan organizmalara göre 1000 kat fazladır²⁴⁶. *E.faecalis* kök kanal sistemine tedavi sırasında, pansuman seansları arasında, tedaviden sonra girebilmektedir¹⁵. Bu yüzden, bu işlemlerin her biri sırasında *E.faecalis* enfeksiyonunun önlenmesi ve eliminasyonu amaçlanarak tedavi işlemlerinin uygulanması dikkate alınmalıdır.

E.faecalis'in kök kanal boşluğuna girişini önlemek için ek aşamalar gerekmektedir. Bunun için tedaviden önce hasta ağızını CHX solüsyonu ile yıkamalı, diş ve rubberdam yüzeyleri CHX ve NaOCl solüsyonlarıyla dezenfekte edilmeli ve kanal dolgusu yapılmadan önce guta perkaların NaOCl solüsyonu ile dezenfekte edilmesi önerilmektedir²⁷.

Çalışmamızda kanal içi pansumanda kullanılan G-Ca(OH)₂, SF-Ca(OH)₂ ve CHX- Ca (OH)₂ karışımlarının klinik izolatlar üzerine antimikrobiyal etkisini tespit için agar difüzyon yöntemi uygulandı. CHX-Ca(OH)₂ patı hem birincil hem ikincil

enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *E.faecalis* izolatlarında üremeyi engelleme ve inhibisyon çapı oluşturma açısından en etkili pat olarak bulunurken, bunu G-Ca(OH)₂ patı takip etti. SF-Ca(OH)₂ patı üremeyi engelleme açısından ve inhibisyon çapı oluşturma açısından en etkisiz pat olduğu görüldü. Bu patlardan sadece G-Ca(OH)₂ patının etkinliği 4. ve 7. günlerde artmakta, diğer 2 patın ise bu günlerde etkinliği azalmaktadır.

E.faecalis'in alkalın toleransının mekanizması tam olarak bilinmemektedir ama son zamanlarda gösterilen hücre duvarıyla ilişkili proton pompası, hücreye proton salarak sitoplazmayı asidik hale getirmesi, *E.faecalis*'in yüksek alkalın ortamında yaşayabilmesi açısından önemlidir. *E.faecalis*'in Ca(OH)₂ patı ile pansumandan sonra yaşayabilme mekanizması:

1. *E.faecalis* pasif olarak pH hemostazını sürdürmektedir. Bu sitoplazmanın tamponlama kapasitesinde olduğu gibi iyonların hücre membranına penetrasyonu sonucu meydana gelmektedir.
2. *E.faecalis* proton pompasına sahiptir, bu da pH hemostazını sürdürmesini sağlamaktadır. Bunu, proton pompaları hücrede iç pH'ı düşürerek başarmaktadır.
3. pH 11.5 veya daha yüksekse, *E.faecalis*'in yaşaması olanaksızdır. Bununla beraber dentinin tamponlama kapasitesi sonucu, 11.5'lik pH'ın dentin tubüllerinde günümüzde kullanılan Ca(OH)₂ teknikleriyle devam etmesi olası değildir¹³⁵.

Almyroudi et al.¹³⁰ yaptıkları çalışmada Ca(OH)₂ patının *E.faecalis*'i 3. ve 8. günlerde öldürebildiğini ama 14. günde çok etkili olmadığını göstermişlerdir. Bu çalışmada Ca(OH)₂ patı, CHX jel, CHX jel-Ca(OH)₂ ve yavaş salımlı çip olarak 4 formda kullanılmıştır. Bütün CHX preparatları *E.faecalis*'e 3, 8, 14. günlerde etkili olduğu bulunmuştur. Ca(OH)₂ bu mikroorganizmayı 3. ve 8. günlerde yok etmiştir ama 14. günde çok etkili olamamıştır.

CHX emdirilmiş guta perka ve iodoform içerikli guta perka *E.faecalis*'e karşı az inhibisyon aktivasyonu göstermiştir^{248,249}. Başka bir çalışmada, %5'lik CHX yavaş salım düzeneği dentin tubüllerindeki *E.faecalis*'i 500 micrometre derinliğe kadar tamamıyla yok etmiştir²⁵⁰.

CHX'in *E.faecalis*'e antimikrobiyal etkisinin, CHX-Ca(OH)₂ karışımına göre daha iyi olduğu bilinmektedir²⁴⁷. %2'lik CHX jelin Ca(OH)₂ ile karıştırılması sonucu pH 12.8'e ulaşmaktadır ve dentin tubüllerindeki *E.faecalis*'i tamamıyla yok etmektedir²⁴⁷. CHX-Ca(OH)₂ birleşimi, Su-Ca(OH)₂ birleşimine göre *E.faecalis*'i yok etmekte daha başarılıdır²⁵¹. Çalışmamızda da CHX-Ca(OH)₂ patı hem birincil hem ikincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *E.faecalis* izolatlarında üremeyi engelleme ve inhibisyon çapı oluşturma açısından en etkili pat olarak bulundu.

Siren et al.²⁵² *E.faecalis* ile enfekte edilen dentin bloklarında, Ca(OH)₂'in %0.5 CHX veya %2/4 iodine potasyum iodid solüsyonlarıyla karışımının dezenfeksiyon işleminde iyi bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Saf Ca(OH)₂'in dentinde *E.faecalis*'i tamamen etkisiz hale getiremediği, ama CHX ve iodine potasyum iodid solüsyonlarıyla karışım preparasyonlarının dentinin derinliklerinde *E.faecalis*'i 1 ve 7 günlük test periodlarında yok ettiği saptanmıştır.

Çalışmalarda dentin tubüllerindeki *E.faecalis*'in 10 gün boyunca Ca(OH)₂ pansumanına dirençli olduğu gösterilmektedir¹⁹³. Estrela et al.²⁵⁴ SF içeren Ca(OH)₂ patının indirekt etkisini değerlendirirken, bu patın *E.faecalis*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *B.subtilis*'e ve bu bakteri karışımlarına etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Bazı klinisyenler tarafından Ca(OH)₂ patı; kullanımının detaylı, zaman kaybettiren ve özellikle kök kanallarından çıkarılması zor olan bir materyal olduğu için tercih edilmemektedir¹³⁰.

5.11. Antifungallerin *C.albicans* İzolatlarına Etkisi

Çalışmamızda birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *C.albicans* izolatlarının agar dilüsyon yöntemiyle belirli konsantrasyonlarda amfoterisin B, nistatin, flukonazol ve ketokanazol'e duyarlılıkları araştırılmıştır. Hem birincil hem ikincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen izolatların nistatin, amfoterisin B ve flukonazole duyarlı olduğu bulundu. Bununla birlikte bütün izolatların ketokanazol'e dirençli olduğu görüldü.

İnatçı apikal periodontitisle birlikte marjinal periodontitisli dişlerden *C.albicans* türünün amfoterisin-B, fluorositozin, flukanazol, mikonazol ve klotrimazol gibi 5 farklı antifungal ajana karşı direncini karşılaştıran bir çalışmada; bütün test edilen türlerin amfoterisin B ve 5-fluorocetazine karşı duyarlı olduğu ve 1,0 µg/ml'den düşük MIC

değerine sahip olduğu bulunmuştur. Endodontik ve periodontal izolatlar arasında herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Endodontik izolatlar arasında en etkili flukanazol bulunmuştur. Bir endodontik türün flukanazole karşı dirençli olması, mikonazol ve klotrimazol karşı ilişkili olarak yüksek MIC değerine sahip olduğunu kanıtlar. Bu çalışmada kök kanalından veya dişeti çevresinden izole edilen 70 oral *C.albicans* suşunun, belirlenen antifungal ajanlara karşı hassasiyeti değerlendirilmiştir. Bu çalışma kök kanal enfeksiyonundan izole edilen *C.albicans* suşunun antifungal hassaslığıyla ilgili literatürdeki ilk ve en önemli karşılaştırmalı çalışmadır³⁰.

Ateş et al.¹⁹⁶ yaptıkları çalışmada ketokanazolün bütün türlere karşı en düşük MIC ve Minimum Fungisidal Konsantrasyon (MFC) gösterdiğini bulmuşlardır. EDTA en yüksek antifungal ve fungisidal aktiviteyi göstermiştir. Diğer tetraasetik asit ajan olan EGTA'nın *C.albicans*'a etkisiz olduğu rapor edilmiştir.

Şen et el.¹⁹⁷ yaptıkları çalışmada EDTA'nın en iyi antifungal aktiviteye sahip ajan olduğu bulunmuştur. Rutin antifungal ajanlardan, nistatin ve ketokanazol ve CHX'nin konsantre solüsyonu (Savrolin) EDTA'dan sonra en etkili aktiviteye sahiptir. %5 NaOCl ve %2.5 NaOCl etkileri sırasıyla bu grupları takip etmektedir.

5.12. Antimikrobiyal Medikamentlerin *C.albicans* İzolatlarına Etkisi

Çalışmamızda *C.albicans* izolatlarının %2 CHX, %17 EDTA, %2.5 NaOCl ve %5 NaOCl gibi kanal içi irrigasyon solüsyonlarına duyarlılığının araştırılmasında strip difüzyon testi kullanıldı. *C.albicans* üremesini en iyi engelleyen solüsyonun %5 NaOCl olduğu bulundu. %17 EDTA ve %2.5 NaOCl inhibisyon çapı oluşturma açısından birbirine benzer değerler gösterdi ve %2 CHX en az inhibisyon çapı oluşturdu.

Waltimo et al.³⁰, hem %0.5 hem %5 NaOCl'ün 30 saniyede mantarları in vitro olarak öldürdüğünü, %0.05 ve %0.005 NaOCl'ün mantarları öldürmede 24 saatlik inkübasyondan sonra çok zayıf kaldığını bildirmişlerdir. Ancak bu bulgular, Viana et al.¹⁹⁸ nın yaptıkları çalışmanın sonuçları ile kısmi olarak çelişmektedir. Çünkü Viana et al.¹⁹⁸ çalışmasında %0.5'lik NaOCl *C.albicans*'ı 30 dakikada, %5.25'lik solüsyonun bütün mantarları 15 saniyede öldürdüğü sonucuna varılmıştır.

EDTA güçlü bir antibakteriyel ajan olarak kabul edilmese de, etkili bir antifungal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir^{197,255}. Kalsiyum iyonları *C.albicans*'ın oluşumunda, tutunmasında ve üremesinde önemli bir role sahiptir²⁵⁶.

EDTA antifungal özelliğini hem kültür ortamındaki hem de hücre duvarındaki kalsiyumla şelasyon yaparak göstermektedir¹⁹⁷.

EDTA'nın kök kanallarındaki smear tabakasını uzaklaştırma özelliğinin yanı sıra, smear tabakasındaki mikroorganizmaları da yok ettiği vurgulanmıştır^{257,258,259}. Buna ek olarak, EDTA'nın antifungal etkisinden, özellikle kandidozis oranının yüksek olduğu ikincil kök kanal enfeksiyonlarında, irrigasyon solüsyonu olarak kullanımıyla yararlanılmaktadır^{10,260}. EDTA ve NaOCl'nin sırasıyla kullanımının, *C.albicans*'ın dentine tutunmasını ve üremesini engellediği gösterilmiştir¹⁷³.

İkincil kök kanal enfeksiyonlu dişlerde ve yüksek oranda oral kandidozise sahip hastalarda EDTA ve titanyum tetraflorid alternatif irrigasyon solüsyonları olarak kullanılmaları tavsiye edilmektedir¹⁹⁶.

Şen et al.¹⁹⁹ %0.12 CHX, %1 NaOCl ve %5 NaOCl'ün antifungal özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında, *C.albicans*'ın smear tabakası varken daha dirençli olduğunu bulmuşlardır. Smear tabakası yokken, NaOCl'in antifungal etkiye 30 dakika sonra ulaştığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, EDTA'nın *C.albicans* üzerine antifungal etkisi diğer dezenfektanlarla da kıyaslanmıştır. Buna göre en etkili antifungal ajanın EDTA olduğu ve nistatin, ketakonazol ve %1,5 CHX glukonat solüsyonlarının EDTA'dan daha az etkili antimikrobiyal ajanlar oldukları sonucuna varılmıştır. %5 NaOCl solüsyonu geniş bir inhibisyon zonu oluşturmasına rağmen konsantrasyonunun azalması (%2,5) ile birlikte antifungal etkinliğinin bir kısmını yitirdiği bildirilmiştir. Bu bulgu bizim bulgularımız ile uyumaktadır.

Smith ve Wayman¹²⁰⁰, sitrik asit ve NaOCl'ün antimikrobiyal etkinliğini araştırmışlardır ve *C.albicans*'ın *E.faecalis* veya Basillus türlerinden daha dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, sitrik asitin NaOCl kadar etkili olmadığı bildirilmiştir.

Ferguson et al.¹⁹⁰ çalışmasına göre; NaOCl, hidrojen peroksit ve CHX diglukonat dilue edildiğinde *C.albicans*'a etkili olduğu ama sıvı Ca(OH)₂'in etkili olmadığı bulunmuştur. NaOCl, hidrojen peroksit, CHX diglukonat ve sıvı Ca(OH)₂'in *C.albicans*'ı öldürmesi için gereken MIC değeri saptanmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız G-Ca(OH)₂ patını hem birincil hem ikincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *C.albicans* izolatlarında inhibisyon çapı oluşturma açısından en etkili pat olarak bulduk. Çalışmamızda kullandığımız diğer patlar

CHX-Ca(OH)₂ ve SF-Ca(OH)₂ inhibisyon çapı oluşturma açısından birbirine benzer değerler göstermektedir. Her 3 pat kombinasyonunda da 4. ve 7. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık.

Candida türleri endodonti'de sık kullanılan Ca(OH)₂ gibi materyallere karşı dirençlidir. Waltimo et al.²⁰², nın 7 farklı *C.albicans* türünün iodin potasyum iodid, CHX asetat, NaOCl ve Ca(OH)₂ gibi 4 farklı dezenfektana karşı duyarlılıklarının değerlendirdikleri çalışmada, *C.albicans* Ca(OH)₂'e direnç gösterdiği sonucuna varmışlardır. %5 ve %0.5 NaOCl ve %2'lik iodine potasyum iodid 30 sn'de, %0.5 CHX asetat 5 dakika sonra bütün mantar hücrelerini öldürmüştür. Bununla birlikte Ca(OH)₂'in NaOCl veya CHX ile karışımı, uzun süreli etkiye sahip geniş spektrumlu bir antimikrobiyal birleşim sağlamaktadır. Aynı araştırmacıların sulandırılmış Ca(OH)₂ solüsyonunun etkisini araştırdıkları bir diğer çalışmada *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.guilliermondii*, *C.krusei* ve *C.tropicalis* gibi mantar türlerini incelemişlerdir. Ayrıca *E.faecalis*'in duyarlılığı da karşılaştırma amacı ile değerlendirilmiştir. Bütün *Candida* türleri *E.faecalis* ile kıyaslandığında Ca(OH)₂'e eşit oranda ya da daha fazla direnç göstermişlerdir. Bu çalışmada mantar türlerinin çoğu 1-6 saat inkübasyonda yaşayabilirken, *E.faecalis* 10 ve 20 dakika içinde ölmektedir. *C.albicans* SF'ın içeren Ca(OH)₂ patına 48 saat direkt temas testinde duyarlı olduğu gözlenmiştir.

C.albicans'lar geniş pH aralıklarında yaşayabildikleri için Ca(OH)₂ solüsyonunun alkalitesi etkili olmayabilmektedir. Üstelik Ca(OH)₂'in Ca iyonları, *Candida*'ların morfogenezinde ve üremesinde etkili olmaktadır. Ca(OH)₂'in antimikrobiyal aktivitesi yüksek pH'ından ve yüksek alkalın tamponlama kapasitesinden kaynaklanmaktadır. Bu mekanizmalar, Ca(OH)₂'in *C.albicans* gibi alkalın dirençli mikroorganizmalara karşı etkili olmadığını açıklamaktadır^{28,256}.

Siquiera et al.¹⁷⁷ in vitro olarak *C.albicans* ile enfekte edilen sığır dentininde 4 kanal içi medikamentin etkinliğini değerlendiren çalışmalarında, örnekler medikamentlerle kontakta 1 saat, 2 gün ve 7 gün bekletmişlerdir. Ca(OH)₂-CPMC-G patı ve CHX-Çinko oksit patı 1 saatlik temasta tamamıyla dezenfekte etmektedir. Ca(OH)₂-G patı 7 gün sonra *C.albicans*'ı elimine etmiştir. Ca(OH)₂-CHX 7 gün sonra bile etkisiz kalmıştır. Sıvı Ca(OH)₂ herhangi bir aktiviteye sahip olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte *C.albicans* hücrelerinin standardize inokulumu, Ca(OH)₂ patı veya

kamfore edilmiş para-monoklorofenolle direkt ilişkide olursa mantar hücrelerini etkili bir şekilde ikiside öldürmektedir.

5.13. Antimikrobiyal Ajanın Aktivitesini Değerlendirmede Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

Herhangi bir antimikrobiyal ajanın aktivitesinin etkinliğini kanıtlamak, enfeksiyon kontrol yönteminin gelişmesinde faydalıdır. Genellikle 3 invitro teknik bu amaç için kullanılmaktadır. Dilüsyon metodu, gerekli olan antimikrobiyal ajanın miktarını nicel olarak vermeye yardım etmektedir. Agar dilüsyon metodu ise antimikrobiyal ajanı içeren disklerin etrafında oluşan inhibisyon çaplarını vermektedir ve bu da etkinliğiyle ilişkilidir. Direkt temas metodu ise antimikrobiyal madde hakkında nitel bilgi elde etmemizi sağlamaktadır.

Bütün teknikler avantajlara ve dezavantajlara sahiptir. Örnek olarak; dilüsyon metodu zaman kaybettiren ve sadece kültür ortamında çözülebilen medikamentler için kullanılmaktadır. Bununla ilişkili olarak agar difüzyon metodunda tespit edilen inhibisyon zonun büyüklüğü, test medikamentinin çözünebilirliği ve yayılabilirliğine dayanmaktadır, bu yüzden etkili potansiyelini belirtememektedir. Direkt temas metodu, medikamentin etkinliği ve mikroorganizmaya direkt temasıyla ilişkilidir. Bu diğer değişkenlerden bağımsızdır ve pratik bir laboratuvar testidir²⁶¹.

Agar difüzyon yöntemi, endodontik dezenfektanların ve irrigasyon solüsyonlarının antimikrobiyal aktivitesini test etmede genel olarak kabul edilen bir metottur. Bu metot kolay, standart, üretilebilir ve oldukça ucuzdur. Bununla birlikte, bazı faktörler (materyalin pH'ı, inkübasyon süresi, toksisitesi, duyarlılığı, ilacın difüzyon kapasitesi) petrielerde test materyallerinin antimikrobiyal aktivitesinde önemli role sahiptir. Bu yüzden, kesin tahminler bu çalışmalara göre yapılmamalıdır. Çünkü in vitro çalışmalarda izole edilen tek mikroorganizma çalışılmaktadır, bu da polimikrobiyal endodontik enfeksiyonlu dişlerin klinik durumunu yansıtmamaktadır. Candida vakalarında, diğer mikroorganizmalarla koagregasyon¹⁵⁵, ilaçlara ve konak savunma mekanizmalarında mikrobiyal direncin artışına neden olan kompleks biyofilmlerin oluşumunda önemli bir role sahiptir^{262,263}.

Invitro araştırmalar invivo araştırmaları direkt olarak yansıtmamaktadır. Çünkü kök kanalı nekrotik ve/veya yaşayan doku ve doku sıvıları içermektedir. Bu durum

medikamentlerin etkinliğini azaltmaktadır. Çalışmamızda elde edilen izolatlar birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişleri olan farklı hastalardan elde edilmiştir. On sekiz *E.faecalis* ve 18 *C.albicans* izolatlarından bazıları antimikrobiyallere duyarlı çıkarken bazıları dirençli çıkmıştır. Çok az çalışmada kök kanallarından elde edilen izolatlar üzerinde bu tür çalışmalar yapılmaktadır. Çoğu çalışmada aynı koloni ve suş özellikleri gösteren mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Oysaki kök kanallarında farklı *E.faecalis* ve *C.albicans* türleri bulunmaktadır.

5.14. Alevlenme Olguları

Endodontik tedavi sonrası oluşan ağrı ve rahatsızlık durumu hastalar ve hekimler için can sıkıcıdır. Kök kanal tedavisiyle ilişkili postoperatif ağrı uzun dönem başarının zayıf bir göstergesi olsa da klinik açıdan oldukça önemlidir.²⁶⁴ Tedavi öncesi ağrı²⁶⁵, randevu sayısı²⁶⁶⁻²⁶⁸, pansuman materyallerinin kullanımı^{269,270} ve diş lokalizasyonu²⁷¹ gibi faktörler tedaviden sonra oluşabilecek ağrı ve alevlenmelerin nedeni olabilir.

Yapılan çalışmalarda endodontik tedavi sonrası oluşan ağrının değerlendirilmesinde farklı skalalar ve metotlar kullanılmıştır^{265,272,273,274}. Bunların arasından görsel analog skala (VAS) ağrının ölçülmesinde doğru ve güvenilir bir oran skala olarak tanımlanmıştır²⁷⁵. Bununla birlikte ağrı algısı birçok faktöre göre farklılık gösteren subjektif ve değişken bir durumdur. Bu yüzden bu çalışmada rahatsızlık seviyesi ve ağrı oranını basitleştirmek için sadece 4 kategoride seviyelendirilmiştir ve 4. derecedeki ağrı tipi alevlenme olarak kaydedilmiştir.

Başarısız olmuş endodontik tedavinin cerrahi olmayan tekrarının başarı şansının yüksek olduğu kabul edilmektedir. Bazı çalışmalarda tedavi tekrarlarında oluşabilecek alevlenme oranının ilk defa kanal tedavisi yapılacak olanlara göre belirgin bir biçimde fazla olduğu gösterilmiştir²⁷⁶⁻²⁷⁸. Ancak Mattschek et al.²⁷² ve Siqueira et al.²⁶⁵ yaptıkları çalışmalarda tedavi tekrarı ve ilk kez kanal tedavisi yapılan hastalar arasında ağrı seviyeleri arasında belirgin bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da alevlenme reaksiyonu birincil enfeksiyonlu dişlere sahip 100 hastanın 4 (%4)'ünde ve ikincil enfeksiyonlu dişlere sahip 70 hastanın 6 (%9)'sında tedavilerinin ilk seanslarından sonra görülmüştür. Tedavi tekrarından sonra alevlenme reaksiyonu daha fazla görülse bile sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0.05).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. SONUÇLAR

1) Çukurova bölgesinde birincil ve ikincil kök kanal enfeksiyonlarına sahip 170 hastadan alınan örneklerde *E.faecalis* ve *C.albicans* bulunma sıklıkları benzerdir ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

2) Çalışmamızda kök kanal enfeksiyonlarında *E.faecalis* bulunma oranları %9-16, *C.albicans* bulunma oranları %9-20 arasında farklılık gösterirken, tükürükte bu oranlar sırasıyla %6-10 ve %15-21 arasında değişmektedir. Bu oranlar hem kültür hem PCR yöntemlerinin sonuçlarını yansıtmaktadır. Birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlerin kök kanallarından alınan örneklerin analizinde yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$, Ki Kare).

Birincil ve ikincil enfeksiyonlu dişlere sahip hastaların tükürüklerinden alınan örneklerden elde edilen bulgularda yöntemler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadı ($p>0.05$, Ki Kare). *E.faecalis* oranları hem kök kanal enfeksiyonlarında hem tükürükte diğer çalışmalardan düşük olmasına rağmen, *C.albicans* oranları pek çok çalışma ile benzerlik göstermektedir.

3) Hem birincil hem ikincil enfeksiyonlu dişlerden elde edilen *E.faecalis* izolatların tamamının spiramisin ve kolistin'e dirençli olduğu, çoğunun penisilin ve vankomisine dirençli, az sayıda izolatınsa duyarlı olduğu bulundu. *E.faecalis* üremesini en iyi engelleyen solüsyonun CHX olduğu ancak inhibisyon zonu oluşturmakta ise en etkili %5 NaOCl solüsyonun olduğu bulundu. Bu yüzden hem birincil hem ikincil enfeksiyonların kök kanal tedavileri sırasında bu solüsyonlarla kök kanallarını irrije edilmesi gerekliliği sonucuna varıldı. CHX-Ca(OH)₂ patı *E.faecalis* izolatlarında üremeyi engelleme ve inhibisyon çapı oluşturma açısından en etkili pat olarak bulundu.

4) *C.albicans* izolatların ise nistatin, amfoterisin B ve flukonazol'e duyarlı olduğu bulundu. Bununla birlikte bütün izolatların ketokanazol'e dirençli olduğu bulundu. *C.albicans* üremesini en iyi engelleyen solüsyonun %5 NaOCl olduğu bulundu. *C.albicans*'ın üremesini sınırladığı için EDTA ve NaOCl'nin sırasıyla kullanımı tavsiye edilmektedir. G-Ca(OH)₂ patı *C.albicans* izolatlarında inhibisyon çapı oluşturma açısından en etkili patdır.

5) Alevlenme reaksiyonu birincil enfeksiyonlu dişlere sahip 100 hastanın 4 (%4)'ünde ve ikincil enfeksiyonlu dişlere sahip 70 hastanın 6 (%9)'sında tedavilerinin ilk seanslarından sonra görülmüştür. Tedavi tekrarından sonra alevlenme reaksiyonu daha fazla görülse de sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$, Ki Kare) .

6.2. ÖNERİLER

1) Ülkemizde bu mikroorganizmalarla yapılan çalışmalar az sayıdadır, hasta sayısı yüksek olan daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışma farklı bölgelerde tekrarlanabilir.

2) Tükürükte *E.faecalis*'in az bulunması, kök kanallarında bulunma oranını azaltan önemli bir etkidir, çünkü enterokoklar sıklıkla peynir, et, sebze ve yağlar gibi fermente edilmiş pişmemiş besinlerde bulunmaktadır. Ve *E.faecalis* peynirde baskın olarak bulunan bir mikroorganizma türüdür. Bu besinlerde bulunan enterokoklar, çürükler, çatlaklar veya açılan restorasyon marjinleri gibi yollardan kök kanal sistemine girebilirler. Çukurova bölgesinde tüketilen peynirlerde *E.faecalis* bulunma oranlarının araştırılması, besinsel değişikliklerin açıklanması açısından faydalı olabilir.

KAYNAKLAR

1. **Miller W.** An introduction in the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dent Cosmos* **1984**;36:505.
2. **Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ.** The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg* **1965**;20:340.
3. **Möller AJR, Fabricius L, Dahlen G, Öhman AE, Heyden G.** Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research* **1981**;89:475-84.
4. **Sundqvist G.** Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1994**;78:522-530.
5. **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.
6. **Socransky SS, Gibbons RJ, Dale AC, Bortnick L, Rosenthal E, MacDonald JB.** The microbiota of the gingival crevice in man. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch Oral Biol* **1963**;8:275-280.
7. **Siqueira JF Jr.** Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2002**;94:281-293.
8. **Sundqvist G.** Bacteriological studies of necrotic dental pulps [dissertation]. *Umea (Sweden): University of Umea*;1976.
9. **Sundqvist G, Fidor D, Persson S, Sjögren U.** Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg* **1998**;85:86-93.
10. **Siqueira JF Jr, Sen BH.** Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Rad and Endod* **2004**;97:632-41.
11. **Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T.** Microbial status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* **1998**;31:1-7.
12. **Sundqvist G, Figdor D.** Life as an endodontic pathogen. *Endod Topics* **2003**;6:3-8.
13. **Slack G.** The resistance to antibiotics of microorganisms isolated from root canals. *Br Dent J* **1957**;18:493-494.

14. **Baumgartner JC, Watts CM, Xia T.** Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod* **2000**; 26: 695-8.
15. **Roças IN, Siqueira JF, Santos KRN.** Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* **2004**; 30: 315-20.
16. **Siqueira JF Jr, Rjeas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP.** Actinomyces species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J Endod* **2002**;28:168-172.
17. **Pinheiro ET, Gomes BPFA, Feraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ.** Microorganisms from canals of root- filled teeth with periapical lesions. *Int Endod Journal* **2003**;36:1-11.
18. **Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Happasalo M.** Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root- filled canals in Lithuanian population. *J Endod* **2000**;26:593-5.
19. **Hancock HHI, Sigurdsson AD, Trope MB, Moiseiwitsch JB.** Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Path* **2001**;91:579-586
20. **Gold OG, Jordan HV, van Houte J.** The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. *Arch Oral Biol* **1975**;20:473-77.
21. **Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS.** Virulence of Enterococci. *Clin. Microbiol Rev* **1994**;7:462-78.
22. **Williams NB, Forbes M, Blau E, Eickenberg C.** A study of the simultaneous occurrence of Enterococci, Lactobacilli, and yeasts in saliva from human beings. *J Dent Res* **1950**;29:563-570.
23. **Ayhan H, Sultan N, Çirak M, Ruhi MZ, Bodur H.** Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J* **1999**;32:99-102.
24. **Shih M, Marshall J, Rosen S.** The antibacterial efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Rad Oral Endod* **1970**;29:613-9.
25. **Waltimo T, Haapasalo M, Zender M, Meyer J.** Clinical aspects related to endodontic yeast infections. *Endodontic Topics* **2004**;9:66-78.
26. **Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF.** Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol* **1993**;9:243– 8.

27. **Senia ES, Macarro RV, Mitchell JL, Lewis AG, Thomas L.** Rapid sterilization of gutta percha cones with 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* **1975**;1:136-140.
28. **Şen BH, Akdeniz BG, Denizci AA.** The effect of EDTA on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2000**;90:651-655.
29. **Trisha AK, Frederick RL, Chin-Lo H.** The antimicrobial effect of MTAD, Sodium hypochlorite, Doxycycline, and Citric acid on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* **2007**;33:28-30
30. **Waltimo TMT, Ørstavik D, Meurman JH, Samaranayake LP, Haapasalo MP.** In vitro susceptibility of *Candida albicans* isolates from apical and marginal periodontitis to common antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol* **2000**;15:245–248.
31. **Bergenholtz G.** Microorganisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontol Revy* **1974**;25:347-358.
32. **Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U.** Prevalence of black-pigmented Bacteriodes species in root canal infections. *J Endodon* **1989**;15:13
33. **Baumgartner JC, Falkler WA Jr.** Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* **1991**;17:380-3.
34. **Sjögren U, Happonen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G.** Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. *Int Endod J* **1988**;21:277-82.
35. **Fabricus L, Dahlen G, Holm SC, Möller AJR.** Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* **1982**;90:200.
36. **Fabricus L, Dahlen G, Öhman AE, Möller AJR.** Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res* **1982**;90:134-144.
37. **Siqueira JF Jr, Lima KC.** Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus xylosus in a secondary root canal infection with persistent symptoms: a case report. *Australian Endodontic Journal* **2002**;28:61-3.
38. **Siqueira JF Jr, Rocas IN, Oliveira JC, Santos KR.** Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* **2001**;9:563-566.
39. **Brook I, Frazier EH, Gher ME.** Microbiology of periapical abscesses and associated maxillary sinusitis. *J Periodontol* **1996**;67:608.
40. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **1999**;284:1318-22.

41. **Stewart PS.** Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Anti-microb Agents Chemother* **1996**;40:2517-22.
42. **Socransky SS, Haffajee AD.** Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* **2002**;28:12-55.
43. **Love RM.** *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* **2001**;34:399-405.
44. **Fabricius L.** Oral bacteria and apical periodontitis: an experimental study in monkeys. Dr. Odont. Thesis. Göteborg University, Sweden, 1982,
45. **Villanueva P.** Fusobacterium nucleatum in endodontic flare-ups. *Oral Surg Oral Med Oral Path* **2002**;93:179-183.
46. **Haapasalo M, Ranta H, Ranta K, Shah H.** Black-pigmented Bacteroides spp in human apical periodontitis. *Infect Immun* **1986**;53:149-53.
47. **Feuille F, Ebersole J, Kesavalu L, Steffen M, Holt S.** Mixed infection with Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence. *Infect Immun* **1996**;64:2095-100.
48. **Dahlen G, Fabricius L, Holm S, Möller ÅJR.** Interactions within a collection of 8 strains isolated from a monkey dental root canal. *Oral Microbiol Immunol* **1987**;2:164-70.
49. **Listgarten MA, Lewis DW.** The distribution of spirochetes in the lesion of acute necrotizing ulcerative gingivitis: an electron microscopical and statistical study. *J Periodontol* **1967**;38:379.
50. **Lerner UH.** Regulation of bone metabolism by the kallikrein – kinin system, the coagulation cascade, and acute phase reactions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1994**;78:481.
51. **Rietschel ET, Brude H.** Bacterial endotoxins. *Sci Am* **1992**;267:54.
52. **Arden LA.** Revised nomenclature for antigen non-specific T cell proliferation and helper factors. *J Immunol* **1979**;123:2928.
53. **Dahlen G, Fabricius L, Holm SE, Möller AJR.** Circulating antibodies after experimental chronic infection in the root canal of teeth in monkeys. *Scand J Dent Res* **1982**;90:338.
54. **Heersche JN.** Systemic factors regulating osteoclast function. In Rifkin BR, Gay CV, editors. *Biology and physiology of Osteoclast*, Boca Raton, **1992**.

55. **Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ.** Biochemical and morphological characterization of killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **1980**;28:259.
56. **Langelan MA, Block RM, Grossman LI.** A histologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens. *J Endodon* **1977**;3:8.
57. **Szajkis S, Tagger M.** Periapical healing in spite of incomplete root canal debridement and filling. *J Endodon* **1983**;9:203.
58. **Kantz WE, Henry CA.** Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of nonvital teeth in man. *Arc Oral Biol* **1974**;19:91.
59. **Nair PNR.** Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontology 2000* **1997**;13:121-148.
60. **Korzen BH, Krakow AA, Gren DB.** Pulpal and periapical tissue responses in conventional and monoinfected gnotobiotic rats. *Oral Surg* **1974**;37:783-802.
61. **Sundqvist G.** Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* **1992**;7:257-262.
62. **Kvinsland S, Kristiansen AB, Kvinsland I, Heyeraas KJ.** Effect of experimental traumatic occlusion on periodontal and pulpal blood flow. *Acta Odontol Scand* **1992**;50:211-219.
63. **American Association of Endodontists:** Glossary of Endodontic Terms, 203, *The Association*, Chicago.
64. **Beer R, Baumann MA, Kim S.** Endodontology. In: Rateitschak KH, Wolf HF, eds. *Color Atlas of Dental Medicine*. Stuttgart: Thieme, **2000**;26-34.
65. **Happonen RP, Bergenholtz G.** Apical periodontitis. In: Bergenholtz G, Horsted-Bindslev P, Reit C, eds. *Textbook of Endodontology*. Oxford: Blackwell, **2003**;130-144.
66. **Marton IJ, Kiss C.** Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **2000**;15:139-150.
67. **Stashenko P, Wang CY, Riley E, Wu Y, Ostroff G, Niederman R.** Reduction of infection-stimulated periapical bone resorption by the biological response modifier PGG glucan. *J Dent Res* **1995**;74:323-30.
68. **Torabinejad M.** The role of immunological reactions in apical cyst formation and the fate of the epithelial cells after root canal therapy: a theory. *Int J Oral Surg* **1983**;12:14-22.

69. **Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J.** Microbiological status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after 'one visit' endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon*, **2005**.
70. **Nair PNR, Pajarola G, Schoeder HE.** Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1996**;81:93.
71. **Ng Y-L, Spratt D, Sriskantharaja S, Gulabivala K.** Evaluation protocols for field decontamination before bacterial sampling of root canals for contemporary microbiology techniques. *J Endodon* **2003**;29:317.
72. **Shah HN, Collins MD.** Prevotella, a new genus to include *Bacteriodes melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteriodes*. *Int J System Bacteriol* **1990**;40:205.
73. **Main DMG.** The enlargement of epithelial jaw cysts. *Odontol Revy* **1970**;21:29-49.
74. **Hungate RE.** The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev* **1950**;14:1.
75. **Ten Cate AR.** Epithelial cells rests of Malassez and the genesis of dental cyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1972**;34:956.
76. **Torabinejad M, Kettering J.** Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endodon* **1985**;18:205.
77. **Nair PNR, Sjögren U, Sundqvist G.** Cholesterol crystals as an etiological factor in non-resolving chronic inflammation: an experimental study in guinea pigs. *Eur J Oral Sci* **1998**;106:644-50.
78. **Siqueira JF Jr.** Tratamento das infecções endodónticas. Rio de Janeiro: *MEDSI*; **1997**.
79. **Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg K-E, Sundqvist G.** Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *Journal of Endodontics* **1990**; 16: 580-8.
80. **Ten Cate AR.** Epithelial cells rests of Malassez and the genesis of dental cyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1972**; 34: 956.
81. **Torabinejad M, Kettering J.** Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endodon* **1985**; 18: 205.
82. **Nair PNR, Schroeder HE.** Periapical actinomycosis. *J Endod* **1984**; 10: 567-70.

83. **Tronstad L, Barnett F, Cervone F.** Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endodontics and Dental Traumatology* **1990**;6:73-7.
84. **Siqueira JF Jr.** Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* **2001**;34:1-10.
85. **Seltzer S, Bender IB, Turkenkopf S.** Factors affecting successful repair after root canal therapy. *Journal of the American Dental Association* **1963**;67:651-62.
86. **Sjögren U.** Success and failure in endodontics. *Odontological Dissertations*. Umea, Sweden: Umea University. **1996**.
87. **Lopes HP & Siqueira Jf Jr.** *Endodontia: Biologia E Técnica*. Rio de Janeiro: Medsi. **1999**.
88. **Lin LM, Skribner JE, Gaengler P.** Factors associated with endodontic treatment failures. *Journal of Endodontics* **1992**;18:625-7.
89. **Strindberg LZ.** The dependence of the results of pulp therapy on certain factors: an analytical study based on radiographic and clinical follow-up examinations. *Acta Odont Scand* **1956**;14:1-175.
90. **Grahn H, Hansson L.** The prognosis of pulp and root canal therapy: a clinical and radiographic follow-up examination. *Odontol Revy* **1961**;12:146-65.
91. **Engström B, Hard af Segerstad L, Ramström G, Frostell G.** Correlation of positive cultures with the prognosis for root canal treatment. *Odontol Revy* **1964**;15:257-70.
92. **Mølven O.** The frequency, technical standard and results of endodontic therapy. *Norske Tannlaegeforenings Tidende* **1976**;86:142-7.
93. **Mølven O, Halse A.** Success rates for gutta-percha and Kloroperka N-0 root fillings made by undergraduate students: radiographic findings after 10-17 years. *Int Endod J* **1988**;21:243-50.
94. **Bergenholtz G, Lekholm U, Milthorpe R, Heden G, Ödesjö B, Engström B.** Re-treatment of endodontic fillings. *Scand J Dent Res* **1979**;87:17-24.
95. **Allen RK, Newton CW, Brown ce.** A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic re-treatment cases. *J Endod* **1989**;15:261-6.
96. **Sjögren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K.** Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* **1990**;16:498-504.

97. **van Nieuwenhuysen J-P, Aouar M, D' Hoore W.** Re-treatment or radiographic monitoring in endodontics. *Int Endod J* 1994;27:75-81.
98. **Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G.** Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30:297-306.
99. **Simon JH, Chimenti RA, Mintz GA.** Clinical significance of the pulse granuloma. *J Endod* 1982;8:116-9.
100. **Nair PNR.** New perspectives on radicular cysts: do they heal? *Int Endod J* 1998;31:155-60.
101. **Ray HA, Trope M.** Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J* 1995;28;8-12.
102. **Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gaengler P, Langeland K.** Clinical, radiographic, and histopathological study of endodontic treatment failures. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 1991;71:603-11.
103. **Kersten HW, Wesselink PR, Thoden Van Velzen SK.** The diagnostic reliability of the buccal radiograph after root canal filling. *International Endodontic Journal* 1987;20:20-4.
104. **Atlas RM.** *Principles of Microbiology*, 2nd edn. Dubuque, IA, USA: WCB Publishers 1997.
105. **Machado de Oliveria JC, Siqueira JF Jr, Alves GB, Hirata R Jr, Andrade AFB.** Detection of Porphyomonas endodontalis in infected root canals by 16s rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *J Endod* 2000;26:729-32.
106. **van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J.** Bacteriodes endodontalis and other black-pigmented Bacteriodes species in odontogenic abscesses. *Infect Immun* 1985; 49: 494-8.
107. **Waltimo TMT, Siren EK, Torkko HLK, Olsen I, Haapasalo MPP.** Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30:96-101.
108. **Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ.** Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997;30:91-5.
109. **Happonen R-P.** Periapical actinomycosis: a follow-up study of 16 surgically treated cases. *Endod Dent Travmato* 1986;2:205-9.

110. **Siqueira Jf Jr, Rôças IN, Lopes HP, Uzeda M.** Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *Journal of Endodontics* **1999**;25:14-6.
111. **Möller AJR.** Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontologisk Tidskrift* **1966**;74:380.
112. **Barbara E Murray.** The life and times of Enterococcus. *Clin Microbiol Rev.* **1990**;3:46-65.
113. **Yeşim Çetinkaya, Pamela Falk, Glen Mayhall C.** Vancomycin resistant Enterococci. *Clin Microbiol Rev.* **2000**;13:686-707.
114. **Gilmore MS.** The enterococci pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington: *ASM Pres*, **2002**.
115. **Isabela N R, Jose FS, Katia RNS.** Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endodon* **2004**;30:315-320.
116. **Facklam RR, Carvalho MGS, Teixeira LM.** History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of Enterococci. In: Gilmore MS, ed. The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington: *ASM Pres*, **2002**:1-54.
117. <http://www.atcc.org/common/catalog/bacteria/bacteriaIndex.cfm>. Accessed May 25, **2005**.
118. **Murray BE.** The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev* **1990**;3:46-65.
119. **Smyth CJ, Matthews H, Halpenny MK, Brandis H, Colman G.** Biotyping, serotyping and phage typing of Streptococcus faecalis isolated from dental plaque in the human mouth. *J Med Microbiol* **1987**;23:45-54.
120. **Wahlin YB, Holm AK.** Changes in the oral microflora in patients with acute leukemia and related disorders during the period of induction therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1988**;65:411-7.
121. **Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J.** Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **1992**;7:249-52.
122. **Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, et al.** Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol* **1999**;37:3497-503.
123. **Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J.** Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* **2004**;22:822-30.

124. **Nallapereddy SR, Duh RW, Singh KV, Murray BE.** Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulse-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **2002**;40:868-76.
125. **Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzappel WH.** Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *In J Food Microbiol* **2003**;88:105-22.
126. **Ribeiro Sobrinho AP, Barros MHM, Nicoli JR.** Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *J Endod* **1998**;24:405-8.
127. **Portenier I, Waltimo T, Haapasalo M.** *Enterococcus faecalis*-the root canal survivor and star in post treatment disease. *Endodontic Topics* **2003**;6:135-159.
128. **Suchitra U, Kundabala M.** *Enterococcus faecalis*: An endodontic pathogen. *Endodontology* 11-3.
129. **Shorrock PJ, Lambert PA.** Binding of fibronectin and albumin to *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis*. *Microbial Pathogenesis* **1989**;6:61-7.
130. **Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh Mackenzie, Saunders WP, Edin RCS, Glas RCPS.** The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *J Endod* **2002**;28:163-67.
131. **George S, Kishen A, Song KP.** The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* **2005**;31:867-872.
132. **Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA.** *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **2006**;102:247-53.
133. **Sassone L, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M.** Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral microbiol immunol* **2007**;22:390-7.
134. **Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spanberg LS.** Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2005**;99:112-8.
135. **Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ.** *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J End* **2006**;32:93-8.
136. **Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C.** Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and associatio with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol* **2005**;20:289-295.

137. **Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB.** Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arc Oral Biology* **2005**;50:575-583.
138. **Siqueira JF Jr, Roças IN.** Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2004**;97:85-94.
139. **Kaufman B, SpangbergL, Barry J, Fouad AF.** Enterococcus spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod* **2005**;31:851-6.
140. **Baumgartner JC, Siqueira JF Jr, Xia T, Roças IN.** Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod* **2004**;30:141-4.
141. **Engström B.** The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontol Revy* **1964**;15:87-104.
142. **Peciuline V, Reynaud A, Balciunene I, Haapasalo M.** Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* **2001**;34:429-34.
143. **Roças IN, Jung IL-Y, Lee CY, Siqueira JF Jr.** Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod* **2004**;30:504-508.
144. **Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR.** Identification of *E.faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches. *J Endod* **2006**;32:722-6.
145. **Smyth CJ, Halpenny MK, Ballagh SJ.** Carriage rates of enterococci in dental plaque of haemodialysis patients in Dublin. *Br J Oral Maxillofac Surg* **1987**;25:21-33
146. **Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB.** Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* **2004**;19:95-101.
147. **Sedgley CM, Buck G, Appelbe O.** Prevalence of *E.faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod* **2006**;32:104-9.
148. **Lee W, Lim S, Son H, Bae K.** Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* **2004**;30:209–12.
149. **Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ.** Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* **2003**;18:121–6.

150. **Figdor D, Davies JK, Sundqvist G.** Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* **2003**;18:234-9.
151. **Aydın M.** Kandida cinsi mantarlar (*C.albicans*). Ed. Cengiz, Mısırlıgil, Aydın. *Tıp ve Diş Hekimliğinde Mikrobiyoloji Sa*: 1109, Güneş Yayınevi. Ankara **2004**.
152. **Brodgen KA, Guthmiller JM.** Polymicrobial diseases. Interactions between candida species and bacteria in mixed infections.
153. **Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martnez JP.** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **1998**;62:130-80.
154. **Holmes AR, Gopal PK, Jenkinson HF.** Adherence of *Candida albicans* to a cell surface polysaccharide receptor on *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun* **1995**;63:1827-34.
155. **Jenkinson HF, Lala HC, Shepherd MG.** Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. *Infect Immun* **1990**;58:1429-36.
156. **Haynes K.** Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* **2001**;9:591-6.
157. **Donlan RM, Costerton JW.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **2002**;15:167-93.
158. **Şen BH, Piskin B, Demirci T.** Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* **1995**;11:6-9.
159. **Siqueira JF, Roças IN, Moraes SR, Santos KR.** Amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. *Int Endod J* **2002**;35:345-51.
160. **Siqueira JF Jr, Roças IN, Lopes HP.** Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2002**;93:174-8.
161. **Holmes AR, Cannon RD, Jenkinson HF.** Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. *J Ind Microbiol* **1995**;15:208-13.
162. **Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G.** Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* **1994**;176:2137-42.
163. **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**;81:761-66.

164. **Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L.** Observation of *Saccharomyces cerevisiae* in blood of patient undergoing root canal treatment. *Int Endod J* **1997**;30:313-7.
165. **Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, et al.** Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* **2001**;16:100-5.
166. **Cheung GS, Ho MW.** Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* **2001**;16:332-7.
167. **Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K.** Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J* **2002**;35:321-29.
168. **Akdeniz BG, Koparal E, Sen BH, Ates M, Denizci AA.** Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. *ASDC J Dent Child* **2002**;69:289-92.
169. **Rozkiewicz D, Daniluk T, Zaremba ML, Cylwik-Rokicka D, Stokowska W, Pawinska M, Dabrowska E, Marczuk-Kolada G, Waszkiel D.** Oral *C.albicans* carriage in healthy preschool and school children. *Adv Med Sci* 2006;51:187-90.
170. **Şen B, Safavi KE, Spangberg LS.** Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arc Oral Biol* **1997**;42:513-70.
171. **Siqueira JF Jr, Roças IN, Lopes HP, Elias CN, de Uzeda M.** Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod* **2002**;28:770-3.
172. **Waltimo TMT, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MPP.** In vitro yeast infection of human dentin. *J Endod* **2000**;26:207-209.
173. **Şen BH, Chungal NM, Liu H, Fleischmann J.** A new method for studying the adhesion of *Candida albicans* to dentin in the presence or absence of smear layer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2003**;96:201-6.
174. **Siqueira JF Jr, Lopes HP.** Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J* **2001**;34:216-220.
175. **Abbott PV, Hume WR, Pearman JW.** Antibiotics and endodontics. *Australian Dental J* **1990**;35:50-60.
176. **Goodson J.** Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. *J Dent Res* **1989**;68:1625-32.

177. **Siqueira JF Jr, Roças IN, Lopes HP, Magalhaes FA, de Uzeda M.** Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. *J Endod* **2003**;29:501-4.
178. **Hoelscher A.A, Bahcall J.K, Maki JS.** In vitro evaluation of the antimicrobial effects of a root canal sealer antibiotic combination against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* **2006**;32:145-147.
179. **Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ.** Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* **2003**;18:100-3.
180. **Reynaud af Geijersstam AH, Ellington MJ, Warner M, Woodford N, Haapasalo M.** Antimicrobial susceptibility and molecular analysis of *E.faecalis* originating from endodontic infections in Finland and Lithuania. *Oral Microbiol Immunol* **2006**;21:164-168.
181. **Mcdonnell G, Russell D.** Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* **1999**;12:147-179.
182. **Siqueira Jr JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M.** Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from root canal, in vitro. *Int Endod J* **1997**;30:279-282.
183. **Russell AD, Day MJ.** Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect* **1993**;25:29-38.
184. **Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM.** Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigating solutions. *End Topics* **2005**;10:77-102.
185. **Heling I, Chalender NP.** Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* **1998**;31:8-14.
186. **Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M.** Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J* **2001**;34:184-88.
187. **Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ.** In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* **2001**;34:424-428.
188. **Shabahang S, Torabinejad M.** Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis*-contaminated root canals of extracted human teeth. *J Endod* **2003**;29:576-9.
189. **Evanov C, Liewehr F, Buxton TB, Joyce AP.** Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate irrigants at 37 degrees C and 46 degrees C. *J Endod* **2004**;30:653-7.

190. **Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ.** Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod* **2002**;28:68-71.
191. **Heling I, Sommer M, Steinberg D, Friedman D, Sela MN.** Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in a sustained-release device for dentin sterilization. *Int Endod J* **1992**;25:15-9
192. **Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich, Seal MN, Friedman M.** Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)₂ in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J* **1992**;25:20-4.
193. **Haapasalo M, Ørstavik D.** In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* **1987**;66:1375-9.
194. **Sukawat C, Srisuwan T.** A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod* **2002**;28:102-4.
195. **Cwikla SJ, Belanger M, Giguere S, Progulske-Fox A, Vertucci FJ.** Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *J Endod* **2005**;31:50 -2.
196. **Ates M, Akdeniz BG, Sen BH.** The effect of calcium chelating or binding agents on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2005**;100:626-30.
197. **Sen BH, Akdeniz BG, Denizci A.A.** The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2000**;90:651-5.
198. **Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ.** In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2004**;97:79-84.
199. **Şen BH, Safavi KE, Spangberg LS.** Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod* **1999**;25:235-8.
200. **Smith JJ, Wayman BE.** An evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid as root canal irrigant. *J Endod* **1986**;12:54-8.
201. **Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A.** Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J* **2003**;36:810-830.
202. **Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP.** In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J.* **1999**;32:421-9.
203. **Orstavik D, Kerekes K, Eriksen HM.** The periapical index: a scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* **1986**;2:20-34.

204. **Möller A.J.** Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Thesis Odontol Tidskr* **1966**; spec 74.
205. **Kan VL.** Polymerase chain reaction for diagnosis of candidemia. *J Infect Dis* **1993**;168:779-83.
206. **Dahlen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C.** Identification and antimicrobia susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* **2000**;15:309-312.
207. **Gomes BPF, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ.** Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* **2004**;19:71-76.
208. **Stephen Coben, Kenneth M.Hargreaves.** Endodontic microbiology and treatment of infections. Pathways of the Pulp. 9th edition, Canada; Mosby Elsevier 2006;580-607.
209. **Durmaz R.** Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji. Ankara, **2004**.
210. **Qamer S, Sandoe JAT, Kerr1 K.G.** Use of Colony Morphology To Distinguish Different Enterococcal Strains and Species in Mixed Culture from Clinical Specimens. *J of Clmcal Microb.* **2003**;2644-46.
211. **Slack G.** The bacteriology of infected root canals and in vitro penicillin sensitivity. *British Dental Journal* **1953**;3:211-4.
212. **Goldman M, Pearson AH.** Post debridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **1969**;28:897-905.
213. **Leavitt JM, Irving JN, Srugaevsky P.** The bacterial flora of root canals as disclosed by a culture medium for endodontics. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **1958**;11:302-8.
214. **Jackson FL, Halder AR.** Incidence of yeast in root canals during therapy. *British Dental Journal* **1963**;115:459-60.
215. **Matusow R.** Acute pulpal-alveolar cellulites syndrome. III: Endodontic therapeutic factors and the resolution of a *Candida albicans* infection. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **1981**;52:30-4.
216. **Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J.** Extraradicular endodontic infections. *Endodontics and Dental Traumatology* **1987**;3,86-90.

217. **Ferrari PH, Cai S, Bombana AC.** Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J.* **2005**;38:372-380.
218. **Siqueira JF Jr, Roças 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**;89:164-167.
219. **Siqueira JF Jr, Roças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP.** Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* **1997**;30:91-95.
220. **Sedgley C, Nagel A, Dahlen G, Reit C, Molander A.** Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *E.faecalis* in root canals. *J of Endod* **2006**;32:173-177.
221. **Okazaki M, Yoshida Y, Yamaguchi S, Kaneno M, Elliott JC.** Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals. *Biomaterials* **2001**; 22: 2459–2464.
222. **Nandakumar R, Mirchandani R, Fouad A.** Primer sensitivity: can it influence the results in *Enterococcus faecalis* prevalence studies? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2007**;103:429-32.
223. **Socransky SS, Manganiello SD.** The oral microbiota of man from birth to senility. *J Periodontol* **1971**;42:485-96.
224. **Aas J, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst F.** Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* **2005**;43:5721-32.
225. **Hugas M, Garriga M, Aymerich M.** Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol* **2003**;88:223-33.
226. **Razavi A, Gmür R, Imfels T, Zehnder M.** Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol* **2007**;22:248-51.
227. **Teuber M, Meile L, Schwarz F.** Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* **1999**; 76:115-137.
228. **Feretti GA.** Dentinal candidiasis in cancer patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1988**;65:56-60.
229. **Lomçsali G, Şen BH, Camkaya H.** Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endodontics and Dental Travmatology* **1996**;12:70-6.

230. **Wilson MI, Hall J.** Incidence of yeasts in root canals. *Journal of British Endodontic Society* **1968**;2:56–9.
231. **Najzar-Fleger D, Flipovic D, Prpic G, Kobler D.** Candida in root canals in accordance with oral ecology. *International Endodontic Journal* **1992**;25:40 (Abstract 1528).
232. **Waltimo TM, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MP.** Susceptibility of oral candida species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* **1999**;32:94-8.
233. **Odds FC.** Ecology and epidemiology of Candida. In: *Candida and Candidosis*. 1st. Ed.. UK: Baliere Tindall,50-74.
234. **Campbell CK, Johnson EM, Philpot CM, Warnock DW.** Identification of pathogenic fungi. *Public Health Laboratory Service*. Frome, Somerset, UK: Butler and Taner, 242-84.
235. **Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC.** *Candida dubliniensis* sp.: phenotypic and molecular characterisation of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **1995**;14:1507–21.
236. **Arendorf TM, Walker DM.** The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Archives of Oral Biology* **1980**;25:1–10.
237. **Oliver DE, Shillitoe EJ.** Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. *Journal of Oral Pathology* **1984**;3:265–70.
238. **Hecht DW, Vudentam G, Osmolski JR.** Antibiotic resistance among anaerobes: what does it mean? *Anaerobe* **1999**;5:421-9.
239. **Morrison D, Woodford N, Cookson B.** Enterococci as emerging pathogens of humans. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* **1997**;26,89S–99S.
240. **Chambers HF.** Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th. Ed.. New York, USA: McGraw-Hill, 1239-72.
241. **Pinheiro ET, Gomes BPFA, Drucker DB, Zaia AA, Feraz CCR, Souza-Filho FJ.** Antimicrobial susceptibility of *E.faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* **2004**;37:756-63.
242. **Fass RJ.** Erythromycin, clarithromycin, and azithromycin: use of frequency distribution curves, scattergrams, and regression analyses to compare in vitro activities and describe cross-resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1993**;37:2080–6.

243. **Heintz CE, Deblinger R, Oliet S.** Antibiotic sensitivities of enterococci isolated from treated root canals. *J of Endod* **1975**;1:373-6.
244. **Stern MH, Dreizen S, Ott TW, Levy BM.** Analysis of positive cultures from endodontically treated teeth: a retrospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.***1990**;69:366-71.
245. **Oncag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D.** Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* **2003**; 36: 423-432.
246. **Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ.** Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; 28: 689-93.
247. **Gomes B, Souza S, Ferraz G, et al.** Effectiveness of %2 chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* **2003**; 36: 267-75.
248. **Shur A, Sedgley C, Fenno J.** The antimicrobial efficacy of 'MGP' gutta-percha in vitro. *Int Endod J* **2003**;36:616-21.
249. **Lui J, Sae-Lim V, Song K, Chen N.** In vitro antimicrobial effect of chlorhexidine-impregnated gutta percha points on *E.faecalis*. *Int Endod J* **2004**;437:105-13.
250. **Lin S, Zuckerman O, Weiss EI, Mazor Y, Fuss Z.** Antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow release device to disinfect dentinal tubules. *J Endod* **2003**;29:416-8.
251. **Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T.** Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod* **2003**; 29: 338 –9.
252. **Siren EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Orstavik D.** *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci.* **2004**;112:326-31.
253. **Orstavik D, Haapasalo M.** Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Travmatol* **1990**;6:142-9.
254. **Estrela C, Pimenta FC, Ito II, Bammann LL.** In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J of Endod* **1998**;24:15-7.
255. **Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M.** Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J* **2003**;36:411-7.

256. **Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG.** Effect of calcium uptake on *Candida* morphology. *FEMS Microbiol Lett* **1991**;77:187-94.
257. **Sen BH, Wesselink PR, Türkün M.** The smear layer: a phenomenon in root canal therapy. *Int Endod J* **1995**;28:141-8.
258. **Byström A, Sundqvist G.** The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* **1985**;18:35-40.
259. **Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I.** Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. *J Endod* **1995**;21:592-3.
260. **Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Orstavik D, Haapasalo MP.** Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med* **2003**;14:128-37.
261. **Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Decora JD.** Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J* **2001**;34:341-345.
262. **Brown MR, Gilbert P.** Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol* **1993**;74:87S-97S.
263. **Hawser SP, Douglas LJ.** Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* **1994**;62:915-21.
264. **Taintor JF, Langeland K, Valle GF, Krasny RM.** Pain: a poor parameter of evaluation in dentistry. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1981**;52:299-303.
265. **Siqueira JF, Roças IN, Favieri A, Machado AG, Gahyva SM, Oliveria CM, Abad EC.** Incidence of post operative pain after intracanal Procedures based on an antimicrobial strategy. *J Endodon* **2002**;28:457-60.
266. **Albashaireh ZS, Alnegrish AS.** Postobturation pain after single and multiple visit endodontic therapy. *J Dent* **1998**;26:227-32.
267. **Roane JB, Dryden JA, Grimes EW.** Incidence of post operative pain after single and multiple visit endodontic procedures. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol* **1983**;55:68-72
268. **Eleazer PD, Eleazer KR.** Flare-up rate in pulpally necrotic molars in one-visit versus two- visit endodontic procedures. *J Endod* **1998**;24:614-616.
269. **Trope M.** Relationship of intra-canal medicaments to endodontic flare-ups *Endod Dent Traumatol* **1990**;6:226-9.

270. **Abbott PV.** Medicaments: aids to success in endodontics. Part 1. A review of literature. *Aust Dent J* **1990**;35:438-48.
271. **Alaçam T, Tinaz AC.** Interappointment emergencies in teeth with necrotic pulps. *J Endodon* **2002**;28:375-7
272. **Mattscheck DJ, Law AS, Noblett WC.** Retreatment versus initial root canal treatment: Factors affecting posttreatment pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2001**;92:321-4.
273. **DiRenzo A, Gresla T, Johnson BR, Rogers M, Tucker D, BeGole EA.** Postoperative pain after 1-and 2-visit root canal therapy. . *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **2003**;93:605-10.
274. **Walton RE, Holton IF, Michelich R.** Calcium Hydroxide as an intracanal medication: Effect on posttreatment pain. *J Endod* **2003**;29:627-9
275. **Price DD, McGrath PA, Rafii A, Buckingham B.** The validation of visual analogue scale measures for chronic and experimental pain. *Pain* **1983**;17:45-56.
276. **Torabinejad M, Kettering JD, McGraw JC, Cummings RR, Dwyer TG, Tobias TS.** Factors associated with endodontic interappointment emergencies of teeth with necrotic pulps. *J Endodon* **1988**;14:261-6
277. **Imura N, Zuolo ML.** Factors associated with endodontic flare-ups: a prospective study. *Int Endod J* **1995**;28:261-5
278. **Trope M.** Flare-up rate of single visit endodontics *Int Endodon J* **1991**;24:24-6

ÖZGEÇMİŞ

Ayşin Dumani 1978 yılında Adana’da doğdu. İlköğrenimini Celalettin Sayhan ilköğretim okulunda, hazırlık sınıfını Akdeniz Kolejinde, ortaokul ve lise öğrenimini Bilfen Kolejinde tamamladı. 1996–1997 öğretim yılında İstanbul Çapa Diş Hekimliği Fakültesi’nde diş hekimliği öğrenimine başladı ve 2001 yılında bu fakülteden mezun oldu. 2003 yılı bahar yarıyılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı’nda doktora öğrenimine başladı. 2005 yılında ‘Periapikal Lezyonlu Dişlerde *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans*’ın Bulunma Sıklığı ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Test Edilmesi’ konulu doktora tez çalışmasına başladı.