T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİP II DİYABETİN FARKLI TANILARA SAHİP DİŞLERDE ENDODONTİK MİKROFLORAYA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dt. A.GÜRHAN TAÇ

ENDODONTİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç.Dr. A. Diljin KEÇECİ

2008-ISPARTA

T.C

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİP II DİYABETİN FARKLI TANILARA SAHİP DİŞLERDE ENDODONTİK MİKROFLORAYA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dt. A.GÜRHAN TAÇ

ENDODONTİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DAtaNIŞMAN
Doç.Dr. A. Diljin KEÇECİ

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından D05.1189 Proje numarası ile desteklenmiştir.
Tez. No:

2008-ISPARTA

KABUL VE ONAY

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Endodonti Anabilim Dalı, ***Endodonti Programı***
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 07/ 03 /2008

Tez Danışmanı : Doç Dr. A. Diljin KEÇECİ
Süleyman Demirel Üniversitesi ……

Üye : Prof. Dr. Bilge Hakan ŞEN
Ege Üniversitesi ……

Üye : Yrd. Doç Dr. Murat MADEN
Süleyman Demirel Üniversitesi ……

Üye : Doç Dr. Selçuk KAYA
Süleyman Demirel Üniversitesi ……

Üye : Yrd. Doç Dr. Gülgün TINAZ
Süleyman Demirel Üniversitesi ……

ONAY : Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof.Dr Halis KÖYLÜ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktora eğitimimde benden bilgi ve desteğini esirgemeyen, preoperatif hazırlıkların oldukça zor olduğu bir tez konusu önermiş olsa da, multidisipliner bir çalışmanın başlatılmasını sağlayan ve tez projemde yürütücülük yaparak bana destek olan ve cesaret veren danışmanım **Doç. Dr. Ayşe Diljin KEÇECİ** 'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca daha önceki çalışmaları, literatürdeki değerli bilgileri ve kilit noktalardaki çözüm önerileriyle tecrübesinden bizzat yararlandığım ikinci tez danışmanım **Prof. Dr. Bilge Hakan ŞEN**'e teşekkürü bir borç bilirim. Konvansiyonel kültür yöntemindeki tüm aşamalarda teorik ve pratik destekleri için SDÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden başta **Doç. Dr. Selçuk KAYA**, **Yrd.Doç.Dr.Emel SESLİ ÇETİN** ve **Dr. Tülay TETİK**'e; kendimi onlardan biriymiş gibi hissetmemi sağlayarak sonsuz misafirperverlik gösteren tüm asistan ve teknisyen arkadaşlara, PCR yöntemindeki yardımları için Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden **Yrd.Doç.Dr. Gülgün TINAZ**'a, tez izleme komitesindeki yönlendirmeleriyle beraber asistanlık eğitimim boyunca bilgisini ve desteğini esirgemeyen **Yrd.Doç.Dr.Murat MADEN**'e, doktora eğitimime katkılarından dolayı **Yrd.Doç.Gül Çelik ÜNAL** ve **Yrd.Doç.Dr.Nejdet ADANIR**'a teşekkür ederim. SDÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarında her açıdan desteğini ve yardımlarını gördüğüm **Yrd.Doç.Dr.Samim YAŞAR** ve **Araş.Gör.Meryem ATEŞ**'in nezrinde görevli tüm personele, diyabet hastalarının bana yönlendirilmesinde ve ölçümlerde emeği olan SDÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nın tüm asistanlarına, istatistik danışmanlığı için Orman Fakültesi öğretim üyelerinden **Dr.Yılmaz ÇATAL**'a, tezim için gerekli olan hastaları bulmama yardım eden otomasyon görevlimiz **Turan ÇEVİK**'e teşekkürü bir borç bilirim. Bugünlere gelmemdeki en büyük emeğin sahiplerine, anneme, babama ve ablalarıma koşulsuz desteklerini hiçbir zaman esirgemedikleri için; tüm kararlarımda beni daima destekleyen, sevgi ve özverisiyle hep yanımda olan hayat arkadaşım **Nalan Şengül TAÇ**' a bu tez süresince gösterdiği anlayışından, sabrından dolayı ve hayatımıza kattığı en değerli varlığımız, oğlum **Artun Tuna** için sonsuz **TEŞEKKÜR EDERİM.**

A. Gürhan TAÇ
Isparta 2008

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY……..…….i
ÖNSÖZ……ii
İÇİNDEKİLER iii
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ŞEKİL VE GRAFİKLER..... vii
TABLOLAR viii
RESİMLER ix
1.GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİ 3
2-1 Genel Mikrobiyoloji 3
2-1.1 Bakterilerin İsimlendirilmeleri ve Kültür Koleksiyonları 3
2-1.2 Bakterilerin Tiplendirilmeleri 4
2-1.2.1 Şekillerine Göre Tiplendirilmeleri 4
2-1.2.2 Gram Boyanma Özelliklerine Göre Tiplendirilmeleri 4
2-1.2.3 Oksijen Gereksinimlerine Göre Tiplendirilmeleri 5
2-2 Mikroorganizmaların Kök Kanalından Kültür ve İzolasyonu 6
2-2.1 Kültür İçin Örnek Alınmadan Önce Göz Önüne Alınması Gereken Faktörler 7
2-2.2 Kök Kanalından Kültür Örneği Alınması 7
2-2.3 Endodontik Mikrobiyolojide Besiyerleri 9
2-2.3.1 BHI Kanlı Agar (Beyin-kalp-infüzyon-kanlı agar) 10
2-2.3.2 Zenginleştirilmiş Tiyoglikolat Besiyeri 10
2-2.3.3 Pepton Maya Glukoz (PYG) Besiyeri 10
2-2.3.4. Tiyoglikolat Besiyeri 10
2-2.3.5 TSA Agar (Trypticase Soy Agar) 11
2-2.3.6. Schaedler Agar 11
2-2.4 Kök Kanal Mikroorganizmalarının Belirlenmesinde Kullanılan Diğer Yöntemler 11
2-3 PCR Yöntemi 12
2-3.2 PCR'nin Oluşum Mekanizması 14
2-3.3 PCR Yönteminin Avantajları 16
2-3.4 PCR Yönteminin Dezavantajları 16
2-3.5 PCR Ürünlerinin Belirlenmesi ve Analizi 17
2-3.6 PCR Yönteminin Endodontik Çalışmalara Katkısı 17
2-4 Oral Flora 18
2-5 Kök Kanal Florası 20
2-5.1 Kök Kanal Florasının Taksonomisi 20
2-5.3 Mikrobiyal İlişkiler 21
2-5.4 Enfekte Kök Kanallarının Mikroflorası 22
2-5.4.1 Primer Enfekte Kök Kanalı 22
2-5.4.2 Sekonder Enfekte Kök Kanalı 27
2-5.5 *Enterococcus faecalis* 28
2-5.5.1 *Enterococcus faecalis*'in Endodontik Açıdan Önemi 28
2-5.5.2 *E. faecalis*'in Dirençli Olmasını Sağlayan Yapısal Elemanları ve Fonksiyonları 30
2-5.5.3 *E. faecalis*'in Yaygınlığı 33
2-5.6. Mantarlar 34
2-5.6.1 Mantarların Yapısı 36
2-5.6.2 Oral Mantarların Sınıflaması 36

2-5.6.3 Oral Mantar Türleri ... 37
2-5.6.3.1 Kandidalar ... 37
2-5.6.4 İzolasyon ve Tanımlama ... 38
2-5.6.5 Fungal Patojenite ve Mekanizması ... 39
2-5.6.6 Konak Savunmasının İmmüno-Modülasyonu ve Evazyonu ... 42
2-5.6.7 Patogenez ... 42
2-5.6.8 Endodontik Enfeksiyonlarda Mantar Oranları ... 43
2-5.6.9 Dentin ve Mantarlar ... 44
2-5.6.11 Kandidaların Eliminasyonu ... 46
2-5.6.12 Kandida ve Sistemik Koşullar ... 48
2-5.6.12.1 Kandida ve Diyabet ... 48
2-6 Diabetes Mellitus ve Ağız Diş Sağlığı ... 49
2-6.1 Diabetes Mellitus ve Periodontal Hastalık ... 50
2-6.2 Diabetes Mellitus ve Diş Çürüğü ... 51
2-6.3 Diabetes Mellitus ve Kök Kanal Florası ... 51
2-6.4 Diabetes Mellitus ve Periapikal İyileşme ... 52

3. GEREÇ VE YÖNTEM ... 54

3-1 Deney Kurgusu ve Örnek Toplama Prosedürleri ... 57
3-2 Konvansiyonel Kültür Ekimi, İzolasyon ve Tanımlama ... 58
3-3 Mikrobiyal Tanımlama ... 61
3-4 PCR İncelemesi İçin DNA Ekstraksiyonu ... 62
3-4.1 PCR Uygulaması ... 62
3-5 İstatistiksel Değerlendirme ... 65

4. BULGULAR ... 66

5. TARTIŞMA VE SONUÇ ... 81

ÖZET ... 103

SUMMARY ... 104

KAYNAKLAR ... 105

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	acquired immuno deficiency syndrome= Aids
AP	apical periodontitis= Apikal periodontitis
ark.	arkadaşları
AS	agregasyon substans
AS-48	plazmid kodlu peptid antibiyotik
ATCC	American type culture collection= Amerikan tip kültür koleksiyonu
BHI Kanlı Agar	brain heart infusion blood agar= Beyin-kalp-infüzyon-kanlı agar
Bkz	bakınız
bp	base pair= Baz çifti
BS	binding substance= Bağlayıcı substans
CI	calculus index= Kalkulus indeksi
CFU	colony forming unit= Koloni oluşturan ünite
CMCP	camphorated paramonochlorophenol= Kamfurlu paramonoklorofenol
CO_2	karbondioksit
CyIL	gene encoding cystathionine= Gen kodlu sitationin
DI	debris index= Debris indeksi
DM	diabetes mellitus= Tip II diyabet
DMFT	decayed, missing and filled teeth
DNA	deoksiribonükleik asit
dNTP	deoksiribonükleosit trifosfatlar
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid= Etilen diamin tetraasetik asit
EMB Agar	eosin methylen blue agar= Eosin metilen mavisi agar
ESM	ekstraselüler matris
ESP	enterococcal surface protein= Enterokokal yüzey proteini
EtBr	etidyum bromür
G	santrifuge speed=santrifüj hızı
GIS	gastrointestinal sistem
GLC	gas liquid chromatography= Gaz likit kromatografi
HbA_{1C}	glycosylated hemoglobin A1c= Glukozlu hemoglobin
H_2	hidrojen
IPI	iodine potassium iodide= İyodin potasyum iyodid
Ig	immünglobulin
LDTM	liquit dental transport medium
LTA	lipoteikoik asit
MMP	matris metalloproteinaz
$MgCl_2$	magnezyum klorür
mM	milimolar

mL	mililitre
mg/dl	desilitrede miligram
NaCl	sodyum klorür
NAP	apikal periodontisi bulunmayan nekroz
Nm	nanometre
NaOCI	sodium hypochlorite =Sodyum hipoklorit
N_2	azot
OHI-S	simplified oral hygiene index = Basitleştirilmiş oral hijyen indeksi
O_2	oksijen
PCR	polymerase chain reaction= Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	asitlik derecesi
PMNL	polymorphonuclear leukocyte= Polimorfonücleer lökosit
PYG	peptone-yeast-extract-glucose= Pepton yeast glukozlu besiyeri
RET	sekonder kök kanal enfeksiyonu, Retreatment
rRNA	ribozomal ribonükleikasit
SEM	scanning electron microscope= Taramalı elektron mikroskobu
TSA Agar	trypticase soy agar= Triptikaz soy agar
UV	ultraviyole
Vit	vitamin
VMGAI	viability medium Göteborg anaerobic
ZnO	çinko oksit
µm	mikrometre
µg/mL	mililitrede mikrogram
µL	mikrolitre

ŞEKİL VE GRAFİKLER

Şekil 1. PCR'nin oluşum aşamaları.

Şekil 2. Maya hücrelerinin şematik formları.

Şekil 3. Hastalardan alınan anamnez.

Şekil 4. Konvansiyonel kültür işleminde örneklerin ekimi için takip edilen yol.

Şekil 5. Apikal periodontitisli kök kanallarında (Grup 1a,2a) en sık izole edilen mikro-organizmalar.

Şekil 6. Apikal periodontitis bulunmayan nekrotik kök kanallarında (Grup 1b,2b) en sık izole edilen mikroorganizmalar.

Şekil 7. Sekonder kök kanal enfeksiyonu bulunan dişlerde (Grup 1c,2c) en sık izole edilen mikroorganizmalar.

Grafik 1. Mikroorganizmaların Gram boyanma özelliklerine göre gruplara dağılımı (%).

TABLOLAR

Tablo 1. Dişeti oluğundan izole edilmiş mikroorganizmalar (24).

Tablo 2. Bacteroides türlerinin tanımlamasındaki değişiklik

Tablo 3. Asemptomatik enfekte kök kanallarında yaygın olarak bulunan bakteri türleri (6).

Tablo 4. Apikal periodontitisli dişlerde sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar (29,77,78).

Tablo 5. Kronik apikal periodontitisten yaygın olarak izole edilen mikroorganizmalar (8,78,95).

Tablo 6. Sekonder enfeksiyonda (dirençli kök kanal enfeksiyonu) sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar (8,9,29,32).

Tablo 7. *E. faecalis*'in virülans faktörleri ve fonksiyonları.

Tablo 8. PCR ve kültür ile yapılan çalışmalarda periradiküler lezyonlu kanal dolgulu dişlerde bulunan *E. faecalis* oranları.

Tablo 9. Kök kanallarından izole edilen mantar oranları.

Tablo 10 Diyabetli ve sağlıklı bireylerde endodontik açıdan ağzın durumu (10).

Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen bireylerin cinsiyet ve yaş dağılımı.

Tablo 12. Çalışmaya dahil edilen bireylerin diyabet kontrol düzeyine ve gruplara göre dağılımı.

Tablo 13. Gruplardan izole edilen kök kanalı başına düşen ortalama mikroorganizma sayıları.

Tablo 14. Çalışmaya dahil edilen bireylerin OHI-S ve DMFT indeksleri değerleri

Tablo 15. Gruplara göre kök kanallarından elde edilen bakteriyel türlerinin prevalansı (%)

Tablo 16. Mikroorganizmaların Gram boyanma özelliklerine göre dağılımları (Gram boyanma özelliğine göre diş başına düşen oran).

Tablo 17. HbA_{1C} düzeylerine ve Gram boyanma özelliklerine göre mikroorganizma sayısı (%).

Tablo 18. Gram boyanma ve oksijen gereksinimlerine göre mikroorganizmaların dağılımı.

Tablo 19. Konvansiyonel kültür yöntemiyle saptanan kandida ve enterokok türlerinin gruplara göre dağılımı.

Tablo 20. Son yıllarda endodontik mikroflorayı inceleyen çalışmalar ve çalışmamızla karşılaştırılması.

RESİMLER

Resim 1. Tiyoglikolat besi yeri.

Resim 2. AnaeroGen (solda) ve anaerobik taşıma ortamı (sağda).

Resim 3. Kullanılan besi yerleri.

Resim 4. Koloni özelliklerinden köken alan tanımlama için hazırlık.

Resim 5. Mikrobiyolojik tanımlamada kullandığımız API sistemleri.

Resim 6. Çalışmamızda kullandığımız TECHNE marka PCR cihazı.

Resim 7. Çalışmamızda kullandığımız agaroz jel elektroforez cihazı.

Resim 8. Çalışmamızda kullandığımız ultraviyole görüntüleme cihazı.

Resim 9. PCR ile oluşan amplikonların elektroforez görüntüsü.

1. GİRİŞ

Oral kaviteden izole edilen mikroorganizmaların kök kanalından da izole edilebileceği kabul edilir. Çünkü kök kanalına ulaşan mikroorganizmaların ana kaynağı oral floradır (1-3). Pulpaya ulaşan mikroorganizmalara karşı gelebilmek için pulpanın durumu önemli rol oynar. Vital ve sağlıklı pulpa, mikroorganizmalara karşı oldukça dirençlidir; oral mikroorganizmaların penetrasyonunu yavaşlatır veya tamamen bloke eder. Örneğin pulpa bir kırık sonucu oral kaviteye açılmışsa, oluşan enflamasyon, nekroz ve bakteriyel penetrasyon 2 hafta sonrasında bile 2 mm'den daha derine ulaşamaz. Bunun aksine nekrotik pulpa, çok hızlı bir şekilde bakteriler tarafından enfekte edilir (4).

Pulpanın savunma gücünü aşan mikroorganizmalar periapikal bölgeye ulaştıkları anda vücudun doğal savunma mekanizmalarıyla karşı karşıya kalırlar. Bu aşamada kök kanalında ve kanalın apikal deltasında bulunan bakteriler vücudun normal savunma sisteminden korunmaktadırlar (5). Konak savunma mekanizmasının üzerindeki şiddette mikroorganizma varlığı periapikal bölgede ciddi enflamatuvar reaksiyonlara neden olmaktadır (6,7).

Apikal foramenden çıkan mikroorganizmalar, vücudun polimorfonükleer lökositler (PMNL), lenfositler gibi çeşitli enflamatuvar hücreleri, sitokinler gibi interselüler aracılar ve proteolitik enzimler gibi kimyasal silahlardan oluşan bir savunma mekanizmasıyla karşılaşırlar. Vücudun bu savunma mekanizması bazen kök kanalındaki mikroorganizmaları elimine edememekte ve enflamatuvar proçes iyileşme ile değil, periapikal dokuların yıkımı ve apikal periodontitisin oluşumu ile sonuçlanabilmektedir (8).

Çalışmalar, apikal periodontitisin tedavi başarısındaki değişkenliğin mikrobiyal floranın kompozisyonundaki farklılıklarla ilişkili olabileceğini göstermektedir (9).

Bu konuda üzerinde yoğunlaşmamız gereken iki nokta vardır. Biri konak dokunun durumu, diğeri ise istilacı mikroorganizmalar ile bunlar arasındaki mikrobiyal ilişkilerdir.

Vücudun savunma mekanizması sistemik hastalıklardan etkilenir. Hatta AIDS gibi immünosupresif hastalıklar, vücudun savunma mekanizmasının tamamen çökmesine neden olur. Kanser hastalarında da vücut, enfeksiyon ajanlarına oldukça duyarlı hale gelir. Tip II diyabet (diabetes mellitus, DM) hastalığı da immün sistemin birçok fonksiyonlarını etkiler. Bu etki, gecikmiş iyileşme ve baskılanmış immün yanıt şeklinde ortaya çıkar (10). Diyabet hastalarındaki oral bulguların idrar ile aşırı sıvı kaybıyla, enfeksiyona gecikmiş yanıt ile, mikrovasküler değişikliklerle ve tükürükteki artmış glukoz konsantrasyonuyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (11-13). Tükürükteki glukoz oranının diyabetiklerde daha yüksek olduğu bildirilmesine rağmen (14) tükürüğün içeriğindeki protein, amilaz, lizozim, IgA, elektrolitler, tamponlama kapasitesi ve pH üzerine yapılan araştırmaların sonuçları hala tartışmalıdır (15-17). Çalışmalarda, diyabetik hastalarda tükürük sekresyonunda azalmanın olduğu bildirilmesine rağmen (18,15), böyle bir ilişkinin olmadığına işaret eden araştırıcılar da vardır (16). Sağlıklı bireylerin ağızlarında tükürük elektrolitleri, glikoproteinler, antimikrobiyal enzimlerle beraber oral mukozayı korur. Sağlıklı bireylerdeki tükürük içeriği, ağzın temizlenmesine yardımcı olur, potansiyel toksik yapıları parçalar, asiditeyi düzenler, bakteriyel toksinleri ve enzimleri nötralize edip mikroorganizmaları yok eder. Tükürüğün içeriğindeki ve miktarındaki değişim, denge içinde olan bu ortamı değiştirir.

Bu çalışmanın amacı, Tip II diyabetli ve sağlıklı bireylerde apikal periodontitis (AP), AP bulunmayan nekroz ve sekonder kök kanal enfeksiyonu tanısı konmuş dişlerde kök kanal mikroflorasının konvansiyonel kültür yöntemiyle belirlenmesidir. Ayrıca, endodontik floranın dirençli bir üyesi olan *E. faecalis*'in görülme sıklığının kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle saptanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

2-1 Genel Mikrobiyoloji

Mikroorganizmalar, hücre büyüklüklerine, hücresel yapılarına ve yaşama özelliklerine göre 3 ana sınıfa ayrılırlar: Virüsler (15-250 nm), bakteriler (1-5 µm) ve mantarlar (3 µm'den büyük). Bir başka temel sınıflandırma kriteri de, hücre çekirdek yapısına göre ökaryotikler (protozoonlar, mayalar, mantarlar, algler, bitkiler, hayvanlar) ve prokaryotikler (bakteriler) olarak yapılmıştır. Virüsler, bu sınıflandırmanın dışında tutulmuştur (19,20).

2-1.1 Bakterilerin İsimlendirilmeleri ve Kültür Koleksiyonları

Tanımlı bir bakterinin genellikle iki ismi vardır. Her ikisi de yanyana ve italik harfler ile yazılır. İlk yazılan isim o bakterinin genus (cins) ismidir ve büyük harfle yazılır. İkinci yazılan isim ise o bakteri türüne ait özel isimdir ve spesifik epitet olarak adlandırılır. Örneğin; *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacteroides distasonis*, *Porphyromonas gingivalis* gibi (19,20).

Geniş ve kalabalık bir bakteri popülasyonunun standardizasyonu için bakterilerin kültür koleksiyonları oluşturulmuştur. Bazı ülkelerin mikrobiyoloji enstitüleri her bakteriden birer örnek toplayarak geniş bir koleksiyon oluşturmuş ve her suşa birer numara vermiştir. Çoğunlukla literatürde Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu kullanılmakta ve örneğin ATCC 29212 bir *Enterococcus faecalis* iken ATCC 10231 suşu bir *Candida albicans* suşudur (19-21).

2-1.2 Bakterilerin Tiplendirilmeleri

2-1.2.1 Şekillerine Göre Tiplendirilmeleri

Bakteri hücreleri, 0.2-0.5 µm' den 40-60 µm' ye kadar değişen büyüklükte olabilirler. Bakteriler yuvarlak, çomak ve sarmal biçimli olmak üzere üç şekilde görülürler (19,20,22).

Bakteri hücreleri bir küre şeklinde ise ışık mikroskopundaki görüntüsü daire şeklinde olacaktır. Böyle hücrelere *kok* adı verilir. Genellikle 0.8-1.5 µm boyundadırlar. Eğer mikroskopta, koklar ucuca dizilmiş görünüyorlarsa, *Streptococcus* adını alırlar (19-21). Streptokokların sadece C (oral) ve D grubu (enterokok) olanları kök kanalı enfeksiyonunda rol alır. Anaerop ortamda üreyebilen streptokoklara *Peptostreptococcus* adı verilir (20,21,23). Koklar, ardışık olarak birbirlerine dik üç düzlemde düzensiz bölündüklerinde üzüm salkımı biçimini andıran kitleleri (*Staphylococcus*) oluştururlar (21-23).

Kokların uzamış şekillerine basil veya çomak adı verilir. Ortalama boyları 1-8 µm'dir. Kokların tersine basil zincirlerinin biçimi, onları tanımlayan karakteristik özelliklerini oluşturmaz. Bazı basiller çok kısa olup kokobasil adını alır (19-21).

Bazı bakteriler, iplik gibi uzundur. Vücutları bir vida gibi spiral şeklindedir, serttir ve vücutlarını matkap gibi kullanabilirler. Bu bakterilerin genel isimleri spirokettir (19-21).

2-1.2.2 Gram Boyanma Özelliklerine Göre Tiplendirilmeleri

Bakteri hücrelerinin hücre duvarı ve sitoplazmik membranları bazı boyalara geçirgendir. Bu özellikleri nedeniyle bir bakteri hücresinin duvar yapısı hakkında karar vermek mümkündür. Bu boyalardan en çok kullanılanı Gram boyasıdır (19-21). Mikroskopta bakteri hücreleri siyaha yakın koyu mavi görünüyorsa bu hücre Gram pozitiftir. Bir dış duvarı yoktur. Tam aksine, eğer kan kırmızısından daha açık bir

kırmızı renk ile boyanmışsa bu hücrede bir dış duvar vardır ve bu Gram negatiftir (19-21).

2-1.2.3 Oksijen Gereksinimlerine Göre Tiplendirilmeleri

Yaşadığımız atmosferin yaklaşık %80'i azot ve %20'si oksijendir. Bazı bakteriler, inkübasyon ortamındaki oksijen seviyesinin bu kadar yüksek olmasından rahatsız olmazlar, hatta bunu gereksinirlerken, bazı bakteriler %0.5 oksijen varlığında bile yaşayamazlar. Bu durumda bakteri-oksijen ilişkisi, onları sınıflamak için yeterli bir dayanaktır (24).

Zorunlu aerop bakteriler, inkübe edildikleri (üretildikleri) ortamda bol oksijen bulunmasını isterler. *Bacillius*, *Bordetella*, *Brucella*, *Franciella*, *Micrococcus*, *Nocardia* ve *Pseudomonas* genusunun üyeleri bu gruba örnek teşkil ederler. Enfekte kök kanalında genellikle zorunlu aerop bakteri bulunmaz (22-25).

Fakültatif anaerop bakteriler, hem oksijenli hem de oksijensiz koşullarda üreyebilirler. Bu nedenle pek çok fakültatif mikroorganizmada hem fermentatif, hem de nonfermentatif metabolizma birlikte bulunur. Bakterilerin önemli bir çoğunluğu bu gruptandır. Fakat enfekte kök kanalı florasında bir azınlıktır. Bu grup bakterilere örnek olarak: bir kaç tanesi hariç *Staphylococcus* ve *Streptococcus* genusunun bütün üyeleri, Gram negatif barsak bakterileri, *Actinobacillius*, *Corynebacterium*, *Haemophylus*, *Legionella* genuslarının üyeleri bulunur (22-25).

Mikroaerofilik bakteriler, ancak %4-6 O_2'i tolere edebilirler. Bu seviyenin üzerindeki oksijen bu bakteriler için anabolik baskı oluşturur. Enfekte kök kanalında bulunan *Camphylobacter* ve *Lactobacillus* genusunun pek çok üyesi mikroaerofilik bakterilere birer örnek teşkil eder. Bunlar ilerleyen pasajlarında aerotoleran olabilirler (22-25).

Aerotoleran anerop; bu grup mikroorganizmalar %2-8 O_2 toleransı gösterebilir. Aslında bu isim, fakültatifler ile zorunlu anaeroplar arasında kalan spektrumu tümüyle içerisine alabilir. Çünkü mikroaerofilik bakteriler ve hatta

fakültatif anaerop bakteriler bile aslında birer aerotoleran mikroorganizmadır, fakat tolere edebildikleri oksijen seviyelerindeki farklar nedeniyle farklı sınıflandırılırlar. Aerotoleran ve mikroaerofilik bakterilerin arasındaki sınır keskin değildir (22-25).

Zorunlu anaerop; bu grup bakteriler hem ilk izolasyon hem de ilerleyen kültürlerinde anaerobik atmosfer koşulları gereksinirler. Böyle bakterilere anaerop bakteriler veya kısaca anaeroplar adı verilir. Endodontik patojenlerin en bilinenleri bu gruba girer (*Acidaminococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Mitsoukella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, spiroketler, *Veillonella*, *Wolinella* gibi) (22-25).

2-2 Mikroorganizmaların Kök Kanalından Kültür ve İzolasyonu

Bakteri kültürü, hastalık örneklerinden bakteri kökenlerinin izolasyonu ve bu kökenlerin çeşitli özelliklerinin (örn., üreme, biyokimyasal profil, özgül antiserumlarla reaktivite) incelenmesine dayanılarak tanımlanmalarıdır. Kültürlerin herhangi bir sonuç elde edilmeden önce en az 18 saat enkübe edilmeleri gerekir (19-21,23,24). Kök kanalından örnek alma ile sonuçların elde edilmesine kadar olan işlemler dizisine **kültür almak** denir. Eğer ekilmiş bir besiyerinde koloni gözlenmiyor yani bakteri üremesi yok ise kısaca **negatif kültür** olarak ifade edilir. Üreme varsa yani sıvı besiyerinde bulanıklık veya katı besiyerinde koloni oluşumu gözleniyorsa, **pozitif kültür** olarak ifade edilir. Pozitif kültürlerden bakteri numunesi alınarak çoğaltılır ve **saf kültür** elde edilerek bir dizi standart fizyolojik ve biyokimyasal testlere tabi tutulur. Bu testlerin sonucuna göre bakterinin hangi genusa ait olduğu ve adının ne olduğu tespit edilir. Bu işlemlere ise **identifikasyon** (tanımlama) denir (23).

2-2.1 Kültür İçin Örnek Alınmadan Önce Göz Önüne Alınması Gereken Faktörler

Kültür tekniği ile ilgili olarak kanalda bakteri bulunan bir bölgeye ulaşılamaması veya yeterli sayıda bakteri hücresinin kültür ortamına taşınmaması bir sorun olarak görülmektedir. Pansuman için kök kanalına uygulanan ilacın besiyerine taşınması, vasatta özel türden mikroorganizmalar için yeterli besin maddesinin bulunmaması, kök kanalındaki serumun besiyerine taşınması gibi göz önüne alınması gereken önemli sorunlar vardır. Bunların hepsi kök kanalının mikrobiyolojik muayenesini olumsuz etkiler. Ayrıca, kültür alınırken oluşabilen kontaminasyonlar kanalın durumu hakkında yanlış hükümlere neden olabilmektedir. Bir başka önemli sorun negatif kültür elde edilmesine rağmen kültür alma seansı ve dolgu seansı arasında kanalda kontaminasyon oluşma riskidir. Bütün bunlar gözönüne alındığında mikrobiyolojik disipline tam olarak uyulması zorunluluğu açıkça görülmektedir (23).

2-2.2 Kök Kanalından Kültür Örneği Alınması

Ağızdan alınan materyalde üremesi beklenen patojen bakterinin daima bir anaerop olduğu varsayılır. Eğer patojen mikroorganizma fakültatif aerop ise, bu bakteriler anaerop kültür içerisinde rahatça üreyebilecek ve kaybolmayacaktır. Bu yüzden her aşamada anaerop ortamın bulunmasına dikkat edilmelidir.

Materyal alınacağı gün, iki adet anaerop sıvı besiyeri (tercihan PYG veya tiyoglukolat besiyeri) hazır bulundurulur. Fistülü olan bir apseden, periodontal cepten veya kök kanalından örnek alınacaksa, farklı kalınlıkta birkaç tane kuru sıcak sterilizatörde veya otoklavda sterilize edilmiş kağıt koni hazır bulundurulur. Hastalar son 3 aydır hiçbir antibiyotik kullanmıyor olmalı, ağzına hiçbir lokal antiseptik uygulamıyor olmalıdır. Antibiyotik veya antiseptik molekülü ile karşılaşan bir bakteri hücresi ölmeden önce defektif formlarına döner. Uzayabilir, hareketli ise hareketsizleşebilir, farklı boyanabilir ve mikrobiyoloji laboratuvarını yanıltarak

yanlış identifikasyona sebep olabilir (26). Bu hazırlıklar yapıldıktan sonra ağzın muhtelif bölgelerinden mikrobiyolojik materyal alınabilir (23).

Enfekte kök kanalından kültür yapılması dişhekiminin kök kanalı içerisinde hangi mikroorganizma ile karşı karşıya bulunduğunu bilmesini, doğru tedavi politikasını belirlemesini ve iyileşmeyi monitörize etmesini mümkün kılar. Möller yöntemi (27) halen kullanılan yöntemdir. Enfekte kök kanalının steril koşullar altında açılması ve içerisine steril bir kağıt koni sokularak kök kanalı içerisindeki mikroorganizmaların bu kağıt koniye bulaşması sağlanır. Daha sonra bu kağıt koni anaerop transport besiyerine veya doğrudan anaerop besiyerine inoküle edilir. İnkübasyonu takiben üreyen bakteriler identifiye edilir.

Kök kanalları bir süredir (yaklaşık 2 gün) ağız ortamına açık vaziyette bulunuyor ise kültür yapılmamalıdır. Uzun süre açık kalmış kök kanalından izole edilebilecek bakteriler ağız florasının saprofit üyeleri olabilir ve gerçek kök kanal patojeni olan bakteriler, yoğun *Candida*, *Staphylococcus* ve *Neisseria* kolonileri arasında maskelenerek gözden kaçabilir.

Yakın bir zamanda hekim müdahalesi görmüş kanallardan kültür yapmak da hatalı sonuçlara sebep olur. Önceki müdahale sırasında kanal içerisine uygulanmış antiseptikler, bakteri hücrelerinin morfolojileri ve metabolizmaları üzerinde atipik değişimlere sebep olur (23).

Uygun koşullar oluşturulduktan sonra aşağıdaki işlemler sıra ile yapılır:

1. Dişin üzerindeki eklentiler pomza ile uzaklaştırılır,
2. Hasta ağzını 2 dakika boyunca su ile çalkalar,
3. Daha önceden dezenfekte edilmiş (%30'luk hidrojen peroksit veya %10 poviodon-iodine (Batticon, Betadine, Iodeks, Isosol, Batiodin, Polyod) ve % 2,5'luk sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu ile lastik örtü ve klemp dişe uygulanır, tükürük emici yerleştirilir.
4. Diş yüzeyi, dişi çevreleyen lastik örtü ve klempler aynı solüsyonlarla tekrar dezenfekte edilir.
5. Örnek alınması esnasında kontaminasyonun önüne geçmek için bu solüsyonların etkinliği %5'lik sodyum tiyosülfat ile inaktive edilir.

6. Steril bir frez ile kavite açılır, açıksa genişletilir. Pulpa odasını perfore edecek kadar yaklaşıldıktan sonra frez değiştirilir ve yeni bir steril frez ile pulpa tavanı kaldırılır, kanal ağızları bulunur.
7. Steril bir 15-25 numara kanal eğesi ile apekse kadar ilerlenir ve kök kanal boyu tesbit edilir.
8. Önceden sterilize edilmiş ve kanal içerisinde rahat hareket edebileceği düşünülen çaptaki kağıt koni, kanal içerisine itilir. Mümkün olan en derin şekilde ilerletilir, hasta ağrı duyduğunu işaret veya telkin ediyorsa 1 mm kadar geri çekilir. Hafifçe oynatılarak kanal duvarlarına sürtünmesi sağlanır. Bu vaziyette 60 s beklenir, sonra dışarı çekilir.
9. Kanal içerisine şırınga yardımıyla steril fizyolojik serum solüsyonu (26,28-31), VMGAI veya LDTM enjekte edilir (9,32-34), çalışma boyunda dişe göre belirlenen ebatta 25-35 no'lu Hedström eğe ile kanal duvarlarından çevir-çek (reaming motion) yöntemiyle açığa çıkarılan dentin talaşları steril kağıt konilere emdirilir.
10. Kök kanalının yenileneceği olgularda, koroner güta-perka steril Gates-Glidden frezler yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra apikal kısımdaki güta-perka uygun H tipi eğe yardımıyla uzaklaştırılır. Kağıt koniler ve kanal eğeleriyle yapılan işlemler bu vakalara da uygulanır.
11. Kök kanalı içerisindeki steril fizyolojik serum veya sıvı besiyeri emdirilmiş kağıt koniler (en az 3 tane) ve dentin talaşı bulaşmış kanal eğesi (sap kısmından steril pens ile kesilir) önceden hazır bulundurulan sıvı besiyerine daldırılır ve laboratuvara iletilir (23,26,28,30-32,35-39).

2-2.3 Endodontik Mikrobiyolojide Besiyerleri

Endodontik amaçlar ile anaerop ekim yapılabilecek başlıca besi yerleri ve içerikleri şöyledir:

2-2.3.1 BHI Kanlı Agar (Beyin-kalp-infüzyon-kanlı agar)

Maddeler su içerisinde karıştırılarak pH=7.4'e ayarlanır. Aseptik şartlarda %5 defibrine koyun kanı ilave edilir. Pek çok anaerop bakterinin üretilebilmesi için bu besiyerinde 5-7 günlük inkübasyonları yeterli olmaktadır (22,23,25).

2-2.3.2 Zenginleştirilmiş Tiyoglikolat Besiyeri

İçerisinde; Vit K1 solüsyonu (0.1 mg/ml), Sodyum bikarbonat (1 mg/ml), Hemin (5 mg/ml), tavşan veya at kanı (%10) bulunur. Genel amaçlı olarak, disgenik* Aktinomiçesler için kullanılabilir (22,23,25).

2-2.3.3 Pepton Maya Glukoz (PYG) Besiyeri

Bu besiyeri anaeropların antibiyotik duyarlılık testlerinde tüp dilüsyon yöntemi için kullanılır. Glukoz, bu besiyerinin terkibinden çıkarılırsa bu besiyeri **PYG besiyeri** adını alır. Bu durumda glukoz yerine başka şekerler ilave edilebilir ve anaerop bakterilerin şeker fermentasyonlarının incelenmesi amacı ile bazal besiyeri olarak kullanılır (22,23,25).

2-2.3.4. Tiyoglikolat Besiyeri

Genel amaçlı olarak kullanılabilir. Ayrıca Aktinomiçeslerin primer izolasyonunda kullanılabilir. pH'sı 7.2'dir.

* Disgenik: Gen yapısı değişmiş, mutant.

Bir renk indikatörü olarak resazurin ilave edilebilir. Kolay hazırlanması nedeniyle birçok anaerobik çalışmada tiyoglikolat besiyeri kullanıla gelmektedir (22,23,25).

2-2.3.5 TSA Agar (Trypticase Soy Agar)

Triptikaz, pepton, NaCl, agar ve distile su karıştırılarak pH =7.3 ± 0.2 olarak ayarlanır, %5 defibrine koyun veya tavşan kanı ilave edilip karıştırılır. Bütün aneroplar için genel kullanıma uygundur (22,23,25).

2-2.3.6. Schaedler Agar

Schaedler Agar, anaerobik mikroorganizmalar için çeşitli formulasyonlarda kullanılabilir. Vitamin K1 ve %5 koyun kanı ilave edilmiş hali hassas aeroplar ve anaeroplar için kullanılır. Özellikle *Bacteroides*, *Prevotella* ve *Porphyromonas* gibi hassas anaerobik bakteriler için uygundur. Yüzde 5 koyun kanı içeren, kanamisin ve vankomisin ilave edilmiş Schaedler K-V Agar *Bacteroides* and *Prevotella* türleri için seçici besiyeri olarak kullanılabilir (40).

2-2.4 Kök Kanal Mikroorganizmalarının Belirlenmesinde Kullanılan Diğer Yöntemler

Rutin uygulamada tür tanımlaması, elde edilen örneğin yeterli tanıtımını yapmayan yüksek dilüsyonlu agarlı petri kutuları kullanılarak yapılmaktadır. Dilüsyonun elde edilmesinin yanında fenotipik özellikler kullanılarak (kültür) enfeksiyöz ajanın tanımlanması, çoğu mikroorganizmanın üremesi için gerekli

çevresel koşulları taklit etmekten uzak olduğu için ciddi hatalar ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca fenotipik karakterleri belirlemek de zordur. Bunlar çeşitlilik gösterebilir. Bazı türler, fenotipik olarak oldukça farklı veya benzer davranışlar gösterebilirler (5,41-43).

Bugün gezegenimizde yaşayan bakterilerin büyük çoğunluğu üretilemez. Denizlerde ve karada bulunan mikroorganizmaların %99'undan fazlası laboratuvar koşulları altında ekilememektedir (44). Oral kavitedekiler de dahil olmak üzere insan vücudunda bulunan mikroorganizma türlerinin çoğunun üretilemez olduğu da bildirilmiştir (45-47). Bu yüzden, kültür almanın bakterilerin tanımlanması için bir 'altın standart' olarak gösterilmesi ve kullanılması sorgulanmıştır. Bu şekilde ekilemeyen mikroorganizmalar, sadece genotipik özelliklerinin temeli üstünde tanımlanmalıdır. Çünkü genotipik özellikler, enfeksiyöz ajanın karakterizasyonu ve tanımlaması için daha değerli bilgiler sunmakta, mikroorganizmanın üretilmesine ve izolasyonuna gereksinim duymaksızın klinik örnekler üzerinde direkt olarak mikroorganizmanın tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (41,48-52). Kary Mullis, 1987'de bulduğu, 16S rRNA genini (53) kullanarak mikroorganizmaların DNA'larının çoğaltılmasına dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, Polymerase Chain Reaction) ile (54) 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır. PCR, diagnostik mikrobiyoloji alanında çoğu hastalığın hızlı ve etkili teşhisini mümkün kılmaktadır (55-57).

2-3 PCR Yöntemi

In vitro koşullarda çoğaltılan DNA'ların başlıca kullanım amaçları, özgün bir DNA parçasının bol miktarda elde edilmesi, moleküler analizinin yapılması ve genetik mühendisliğinde rekombinant organizmalar elde etmek üzere gen aktarımı için kullanılmasıdır (35,49).

Hücrelerde DNA doğal olarak, replikasyon ile çoğalır. DNA çift sarmalında birbirinden ayrılan ipliklerin tamamlayıcıları sentezlenerek bir DNA molekülünden onunla aynı olan iki yavru molekül meydana gelir. Buna göre de hücre bölünmesiyle

yeni oluşan hücrelere tüm genler aynen geçerler. Her yeni hücre jenerasyonunda genlerin kopya sayılarının iki katına çıkması nedeniyle jenerasyonlar boyunca DNA miktarı başlangıca göre üssel olarak artar. Örneğin 30 jenerasyon sonra hücre ve gen sayısında milyarlarca kez artış olur (56,57).

2-3.1 PCR'nin Temel Bileşenleri

PCR'de kullanılan ana ajanlar; çoğaltılacak olan **kalıp DNA**, hedef DNA'nın bilinen zincirini tamamlayıcı tek bir bant şeklinde **oligonükleotidler (primerler),** ortamda fazla miktarlarda bulunan dört **deoksiribonükleosit trifosfatlar (dNTP'ler),** ısıya dayanıklı DNA polimeraz (57), tampon ve $MgCl_2$'dür (58). PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. **DNA polimeraz enzimleri**, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleosit trifosfattan uzun polinükleotit zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar (56). Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. PCR'de en yaygın olarak kullanılanı *Thermus aquaticus*'dan elde edilen *Taq*DNA polimerazdır (57,58). Gen çoğaltılması dahil PCR'nin birçok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan **primerlere** gereksinim vardır. Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlayan primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır (57,58). Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır (56-58). Deoksiribonükleozid trifosfatlar **(dATP, dGTP, dTTP, dCTP)** yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. PCR için en uygun dNTP konsantrasyonu deneysel olarak belirlenmeli ve Taq/Amplitaq enzimlerine özgü bir tampon **(PCR Buffer**) kullanılmalıdır (57,58). **$MgCl_2$**'ün Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile

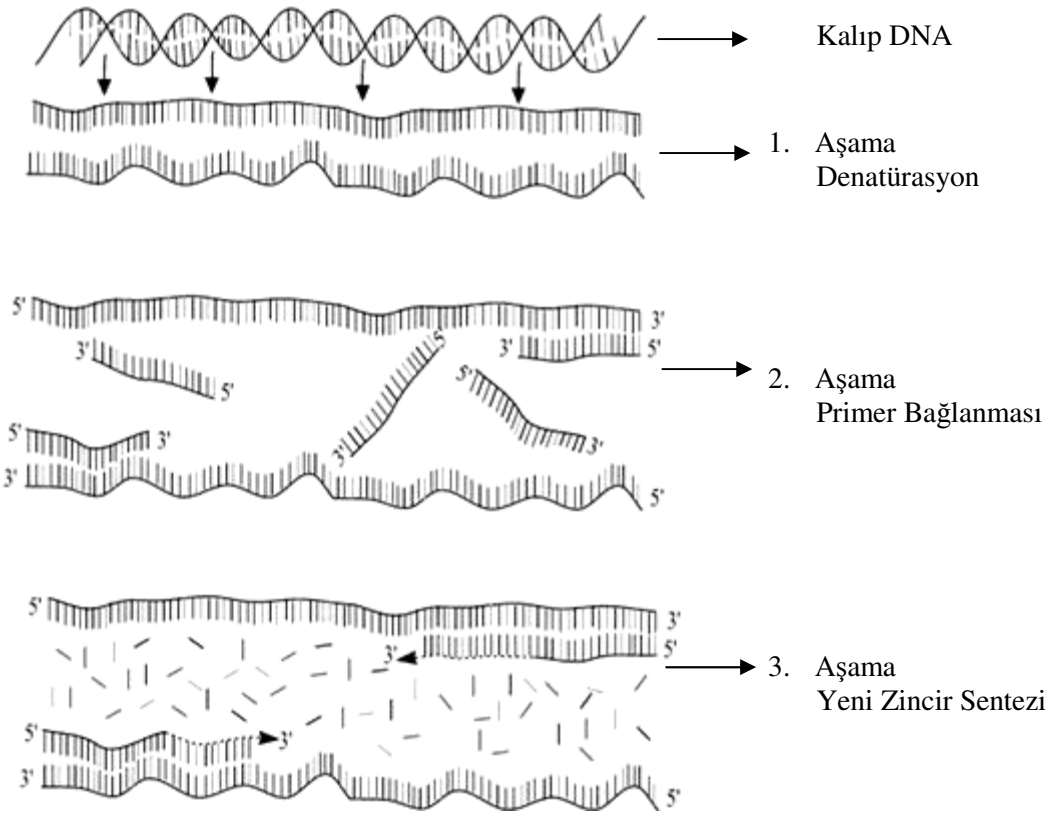
çözünebilir kompleksler oluştururlar ve polimeraz aktivitesini stimüle ederler, primer/kalıp etkileşimini sağlarlar. Bu nedenle $MgCl_2$'ün PCR'nin özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. $MgCl_2$ içeren tamponlar kullanılıyorsa, ayrıca $MgCl_2$ kullanımına gerek yoktur (58).

2-3.2 PCR'nin Oluşum Mekanizması

PCR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır (35,49,56,57). Bir PCR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması ve uzama olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur (35,49-52,57). Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar (35,53,55,57,58). Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır (Şekil 1) (57,58).

Amplimer olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle birleşirler. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur (35,53,57).

Verimli bir polimeraz zincir reaksiyonu için; denatürasyon, primerlerin bağlanması, primerlerin uzaması, döngü sayısı, PCR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkış süreleri önemlidir. Bu reaksiyon, amaca göre farklı mikro tüplerde gerçekleştirilir değişik sıcaklık dereceleri kullanılabilir (57,58).



Şekil 1. PCR'nin oluşum aşamaları.

Kalıp olarak kullanılan hedef DNA, bantları birlikte tutan hidrojen bağlarının kırılmasıyla sonuçlanacak şekilde yüksek derecelerde ısıtılır. Böylece DNA iki ayrı bant haline gelir (57). Genellikle en etkin denatürasyon sıcaklığının 92-95°C olduğu saptanmıştır (48,49,57,58).

İki kısa DNA primeri, hedef DNA'nın her bandında kendisi için uygun olan bölgelere tutunur. Yeni DNA zinciri, ortamda bol miktarda bulunan *Taq*DNA polimerazların primerlere tutunması ve bu suretle ilerlemesi neticesinde elde edilir (57). *Taq*DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık 72°C'dir. Uzama aşaması için çoğu zaman iki dakika yeterlidir. PCR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını garanti altına almak için son döngünün uzama süresi çoğunlukla uzun (10-15 dakika) tutulur (58). Tipik bir PCR reaksiyonu ise 25- 40 siklustan oluşur (57,58).

2-3.3 PCR Yönteminin Avantajları

PCR, tek bir örnekte 1-10 kadar bakteriyel tür belirleyebilirken, diğer yöntemler daha az belirleme oranları göstermektedir. Selektif ortam kullanıldığı zaman kültür yönteminin duyarlılığı 10^3 hücreye artmaktadır (59). Bu durumda PCR yönteminin, diğer tanımlama yöntemlerinden 10-100 kat daha duyarlı olduğu görülmektedir (59,60).

PCR'nin bu yüksek sensitivitesi sonucu elde edilen diğer bir avantaj da, kök kanallarından örnek alınmasında karşılaşılan bazı zorluklar nedeniyle toplanan bakteriyel hücrelerin sayısının çok düşük olduğunda ortaya çıkmaktadır (57). Ancak sistem, ortam diğer DNA'larla ve maddelerle oldukça karışmış durumda olsa bile zorlanmadan işlemektedir (57).

Gerek biyokimyasal gerekse başka tekniklerle olsun kültür ortamında mikroorganizmanın tanımlanabilmesi için en az 8 saatlik bir inkübasyon süresi gerekmektedir. Geleneksel kültür yöntemlerinde anaerobik bakterilerin tanımlanması için 7-14 günlük, PCR için ise sadece birkaç saatlik süreye ihtiyaç duyulmaktadır (57).

2-3.4 PCR Yönteminin Dezavantajları

PCR yönteminin en önemli dezavantajlarından biri, hazırlık ve uygulama aşamasında oldukça hassasiyet gerektirmesidir. Ayrıca konvansiyonel kültür yöntemiyle kıyaslandığında maliyeti oldukça yüksektir.

PCR'nin en önemli dezavantajı, ortamda bulunan canlı mikroorganizmalarla beraber ölü mikroorganizmaların DNA'sını da çoğaltmasıdır. Kültür yönteminde sadece canlı hücreler pozitif görülürken PCR'de ölü ve canlı hücreler birlikte saptanmaktadır (57,58).

2-3.5 PCR Ürünlerinin Belirlenmesi ve Analizi

Çoğaltılmış ürünlerin saptanması ve doğrulanması için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler arasında en basit ve genel olanı **elektroforezdir**. DNA'nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerindeki göçüne dayanır. Agaroz ya da poliakrilamid jellerde, bir floresan boya olan ve DNA ipliklerinin arasına giren, etidyum bromür (EtBr) boyaması ile ürünler görülür. DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorplaması sonucu floresan etki göstermesi ile olur. Bu etki DNA konsantrasyonuna bağlı olarak kuvvetli veya zayıf olabilir Boyamadan sonra DNA, jelde bir UV transilüminatörden yararlanılarak görülebilir hale gelir. Jelin kalıcı görünümü fotoğraflamak yolu ile elde edilir. Boyutu bilinen işaret DNA'lar ve kontrol PCR ürünleri de aynı elektroforez jeline uygulanır, böylece çoğaltılmış ürünün boyutu hakkında fikir edinilir (57,58).

2-3.6 PCR Yönteminin Endodontik Çalışmalara Katkısı

Periodontal bir patojen olan *Treponema denticola*'nın, ilk kez PCR ile enfekte kök kanallarında yüksek prevalans gösterdiği görülmüştür (61-63). Bir spiroket olan *Treponema socranskii* ve *Treponema vincentii*'de PCR ile endodontik olguların büyük çoğunluğunda tespit edilmiştir (64). Gram negatif anaeroplardan biri olan periodontal patojen *Tannerella forsythensis* ve *Prevotella tannarae*'de kültür yöntemleriyle önceden kök kanallarında görülmemesine rağmen endodontik olguların çoğunda PCR ile tespit edilmiştir (65-68).

Siyah pigmente Gram negatif anaerobik bir bakteri olan *Porphyromonas endodontalis* ve *Porphyromonas gingivalis*'in PCR ile prevalansının bilinenden daha fazla olduğu görülmüştür (28,67,69-71).

Hashimura ve arkadaşları (72), PCR yöntemiyle yaptıkları araştırmalarında *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* ve *Eubacterium saphenum*'u kök kanallarından elde etmiş ve prevalanslarının oldukça yüksek olabileceğini

bildirmişlerdir. Fouad ve arkadaşları da (73) *F. nucleatum*'un endodontik enfeksiyonlarda %82 gibi büyük bir oranda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Enfekte kök kanallarından ve akut periradiküler abselerden aspire edilen pü örneklerinde, PCR kullanılarak bir zorunlu anaerobik Gram negatif çomak olan *Dialister pneumosintes* bulunmuştur (74,75). Bu mikroorganizma, periradiküler enfeksiyonlu kanal örneklerinin %66'sında tesbit edilmiştir.

Başarısız endodontik tedavili dişler açısından bakıldığında ise çalışmalarda elde edilen bazı sonuçlar şu şekildedir:

Kanal yenileme gereken 22 persiste periradiküler lezyonlu diş üzerinde yapılan moleküler çalışmada, örneklerin tümünün hedef mikrobiyal türlerin en az birini içerdiği görülmüştür. Olguların %77'sinde pozitif olmak üzere en yaygın bulunan mikrobiyal tür *E. faecalis* olmuştur. Diğer en yaygın mikrobiyal türlerin *Pseudoramibacter alactolyticus* (52%), *Propionibacterium propionicum* (52%), *Dialister pneumosintes* (48%), ve *Filifactor alocis* (48%) olduğu görülmüştür. *Candida albicans*, örneklerin %9'undan elde edilmiştir (36).

2-4 Oral Flora

Teorik olarak oral kavitede bulunan bütün bu bakteri türleri pulpa nekrozu sonrası kök kanalı enfeksiyonuna katılma ve periapikal dokulara yayılabilme kapasitesine sahiptir. Fakat oral kavitenin toplam florası ile kıyaslandığında sınırlı sayıda bakteriyel grup ve türün enfekte kök kanallarında bulunduğu bildirilmektedir (76,77).

Ağız içinde en fazla karşılaşılan (%30-60) mikroorganizma *Streptococcus viridans*'tır. Dişsiz ağızda *Streptococcus mutans* ve *S. sanguis*'e rastlanmazken, çocuk, genç ve erişkin ağızlarında sayıca da en fazla olan bakteriler *Streptococcus* grubuna aittir (Tablo 1)(24).

Tablo 1. Dişeti oluğundan izole edilmiş mikroorganizmalar (24).

Grup	***Cins ve/veya tür***	***%***
Gram pozitif fakültatif kok	Stafilokoklar, Enterokoklar, *Streptococcus mutans, S.sanguis, S. mitis, S.salivarius*	28.8
Gram pozitif anaerop kok	*Peptostreptococcus spp*	7.4
Gram pozitif fakültatif çomak	Korinebakteriler, Laktobasiller, Nokardialar,	15.3
Gram pozitif anaerop çomak	*Actinomyces bifidus, A. israeli, A.naeslundii, A.odontolyticus, P.acnes, Lactobacillus buccalis,* Korinebakteriler	20.2
Gram negatif fakültatif kok	*Neisseria spp*	0.4
Gram negatif anaerop kok	*Veilonella parvula, V. Alcalescens*	8.7
Gram negatif anaerop çomak	*Bacteroides (Porphyromonas) melaninogenicus, B. Oralis, V. sputorum, E. nucleatum, S. sputigenum*	17.3
Spiroketler	*Treponema denticola, T. oralis, T. macrodentium, B. vincentii*	1.9

Dil florasında da en çok fakültatif streptokokların (%38.3) bulunduğu bildirilmiştir. Veillonella'lar % 14.3, fakültatif difteroidler %13 oranında bulunur (24).

Çürük de, pulpa ve periapikal bölgenin enfeksiyonunda rol oynayan bakteriler için ana kaynaktır. Yumuşak nekrotik dentinden örnek alındığında, laktobasillerin ve polisakkarit üreten streptokokların hakim olduğu, biraz daha derinlere inildiğinde Gram pozitif pleomorfik çomakları içeren çeşitli bakterilerin bulunduğu çürüklü dentinle karşılaşılır. Dişin %93'ü Gram pozitif çomakları, %32'si Gram pozitif kokları, %11.6'sı Gram negatif kokları, %5'i Gram negatif çomakları içerir. Laktobasiller, %50 den daha fazla oranlarda en yaygın tür olarak bulunurlar.

Gram pozitif pleomorfik çomaklar ve filamentler %25 oran ile ikinci sıklıkta mevcut olan mikroorganizmalardır. Bu grup *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* ile beraber *Rothia* ve *Eubacterium*'ları içermektedir. Gram pozitif anaerobik koklar (*Streptococcus intermedius* ve *Streptococcus constellatus*) %7

oranında, fakültatif streptokoklar (*S. mutans*, *S. mitis*, *S. milleri* ve *S. sanguis*) %6 oranında bulunmaktadır. *Veillonella* en yaygın Gram negatif türdür ve *Prevotella* (*Bacteroides*) ve diğer Gram negatif çomaklar sporadik (nadir) bulunurlar (24).

Bugün ise hassas anaerobik teknikler kullanarak laboratuvarda çalışırken çalışmanın farklı fazlarında oksijene maruz kalmanın önüne geçildiği zaman enfekte kök kanallarında zorunlu anaerobik bakterilerin hakim olduğu, hatta floranın %90'ı kadarının bu bakterilerden oluştuğu görülmüştür (77).

2-5 Kök Kanal Florası

2-5.1 Kök Kanal Florasının Taksonomisi

Birçok yeni organizma türü devamlı tanımlanmakta ve önceden bilinen türler yeniden sınıflandırılmaktadır. Örneğin siyah-pigmente Gram negatif anaerobik çomaklar bunun bir örneğidir. Başlangıçta kanlı agarda üreyen ve siyah pigmente koloniler oluşturan tüm anaerobik çomaklar tek bir tür "*Bacteroides melaninogenicus"* olarak sınıflandırılmaktaydı. Bu tür şimdi siyah-pigmente anaerobik çomakların sekiz farklı türüne ayrılmıştır. Siyah-pigmente sakkarolitik türler *Prevotella*, asakkarolitik türler ise *Porphyromonas* genusu olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 2) (77).

Tablo 2. Bacteroides türlerinin tanımlamasındaki değişiklik.

Önceki Tanımlama	*Şimdiki Tanımlama*
Bacteroides asaccharolyticus	*Porphyromonas asaccharolytica*
B. endodontalis	*P. endodontalis*
B. gingivalis	*P. gingivalis*
B. intermedius	*Prevotella intermedia*
B. nigrescens	*P. nigrescens*
B. melaninogenicus	*P. melaninogenica*
B. denticola	*P. denticola*
B. loesche	*P. loescheii*

Campylobacter rectus ve *C. curvus* yeniden sınıflandırmaya örnek diğer bakterilerdir. Bu bakteriler de önceden *Wolinella recta* ve *W. curva* olarak isimlendirilmekteydi (77).

2-5.3 Mikrobiyal İlişkiler

Kök kanalındaki mikroorganizmaların biyolojisi, çeşitli faktörler tarafından düzenlenir. Kök kanalına giriş serbest ve açık bir şekilde meydana geliyorsa tükürük, plak florası ve çürük lezyonu bu mikroorganizmaları etkiler ve bakteriler çoğunlukla streptokoklar, Gram pozitif fakültatif ve anaerobik çomakların hakim olduğu bir flora meydana getirirler. Dentin tübülleri, fraktürler, lateral kanallar veya kan yoluyla giriş de enfekte eden bakteriyal türlerin çeşitliliğini farklı yollarla etkilemektedir (78).

Mikroorganizmalar kök kanalına girdiği zaman aralarında bir yarış başlar. Besin ve yer için yarışmadan ayrı olarak bakteriler, hidrojen peroksitler, sülfür bileşikleri ve asitler gibi toksik metabolitlerin üretimini içeren antagonistik güçler yardımıyla diğer bakterilere üstün gelme yarışına girerler (8,78).

Bunun aksine, diğerlerinin ortamda bulunmasından fayda gören bakteriyel türler de vardır. Böyle pozitif bakteriyel ilişki sıklıkla bilateraldir (simbiyoz) ve bu durumda bakterilerin her ikisi de bundan avantaj görmektedir. Örneğin fakültatif bakteriler tarafından oksijenin tüketilmesi anaerobik bakterileri destekler ve bu durumdan her iki bakteri türü de faydalanır (8,78). Fakültatif bakterilerin oran olarak azalması ve anaerobik bakterilerin artması, oksijenin tüketilmesi ve düşük oksidasyon-redüksiyon potansiyeli nedeniyle meydana gelebilir. Bu durumda zamanla anaerobik bakterilerin üremesi desteklenir (77-79). Bakteriler, diğer bakteri ürünlerini de besin olarak kullanabilirler (80).

Prevotella ve *Porphyromonas* türleri özel beslenme gereksinimlerine sahip bir bakteri grubudur. Bu bakteriler için vitamin K ve hemin gereklidir. Vitamin K, diğer bakteriler tarafından oluşturulabilir (77). *Campylobacter rectus* ise, hemin ile ilişkili bir büyüme faktörü oluşturması neticesinde bu türlerin üremesini stimüle edebilmektedir (77,80). *F. nucleatum*, kanallarda *P. micros*, *P. endodontalis*, *C.*

rectus ve *Selenomonas sputigena*'nın bulunması ile pozitif ilişkisi vardır. *Eubacteria* da *Peptostreptococcus* türleri ile pozitif bir ilişkiye sahiptir. *P. endodontalis*, *F. nucleatum*, *Eubacterium alactolyticum* ve *C. rectus* ile pozitif olarak ilişki içindedir fakat *P. intermedia* ile aralarında negatif bir ilişki bulunmaktadır. Genelde fakültatif streptokoklar diğer bakterilerle ya ilişki halinde değildir, ya da negatif bir ilişkiye sahiplerdir (77).

2-5.4 Enfekte Kök Kanallarının Mikroflorası

Genel olarak bakıldığında endodontik mikrobiyota hakkında bilgilenmenin, nekrotik pulpalı dişler ile başarısız endodontik tedavili dişlerin kök kanal sistemlerinde bulunan mikroorganizmaların tanımlanmasıyla mümkün olabileceği sonucuna varılabilir (53). Oral kavitenin normal florasında bugün için 500'den fazla farklı türde bakterinin bulunduğu bildirilmektedir (76,77,81). Biyo-ürünlerinin pulpal ve periapikal hastalıkların başlıca nedeni olduğu kabul edilen bakterilerle beraber, kandida (1-4,9,29,30,32,37,82-86), sitomegalo virüs ve Ebstein-Barr virüs (87) gibi enfeksiyon ajanlarının bile kök kanallarında bulunabileceği bildirilmiştir.

Bildirilen bu kadar fazla ve farklı türdeki mikroorganizmalara rağmen kök kanallarından yaklaşık 150 kadar bakteri izole edilebilmiş ve ekilebilmiştir. Araştırmalar, kök kanalı başına 4-7 farklı türün bulunabileceğini göstermektedir (26,29,37,81,87).

2-5.4.1 Primer Enfekte Kök Kanalı

Kök kanalında primer enfeksiyon, mikroorganizmaların pulpaya giriş yaptığı, pulpa dokusunda kolonize olduğu ve pulpa fonksiyonunun bozulduğu, kanalların henüz tedavi edilmemiş olduğu durumu tarif eder. Bu olgularda mikroorganizmalar pulpaya sıklıkla, çürük kavitesinin direkt açılımı ile dentin tübüllerinin ağızlarının fazlaca açığa çıkmasıyla sonuçlanan kavite preparasyonu

sonucu ulaşırlar. Aksesuar kanal ağızlarının açığa çıkması, periodontal hastalıkta apikal foramen, erozyon, mine çatlağı, restoratif prosedürler, anakorezis ve pulpanın direkt açılımı da diğer ulaşım yollarındandır (26).

Primer endodontik enfeksiyonlardan izole edilen mikroorganizmalar, besin, düşük oksidasyon-redüksiyon potansiyeli, pH, ısı ve bakteriyel ilişkiler gibi ekolojik koşullar üremelerine uygun bir ortamı yeterince sağladığından dolayı yoğun olarak zorunlu anaeroplardan oluşmaktadır (7,26). Bu tür olgular, Sundqvist'in bir çalışmasında bildirdiğine göre fazla sayıda siyah pigmente Gram negatif anaeroplar içermektedir (77). Periradiküler lezyonlu kanal dolgulu dişler ise daha çok Gram pozitif bakteriler, ancak anlamlı düzeyde daha az siyah pigmente çomaklar içermektedirler (88). Diğer yandan fakültatif anaerobik bakteriler bu olgularda genellikle azınlıktadır ve tedaviye dirençli olgularda hakimdir (9).

Oral kavitede çok fazla sayıda bakteri bulunmasına karşın; nekrotik pulpalı kanallarda bulunan bakteri türleri, bakteriyel ilişkiler, beslenme koşulları ve düşük oksijen potansiyeli gibi sebeplerle oldukça sınırlıdır. Bu koşullar, periapikal kemik rezorpsiyonunu stimüle eden dirençli enfeksiyonlara yol açan, uzun süre hayatta kalabilen ve çoğalan fakültatif ve zorunlu anaerobik mikroorganizmaların floraya hakim olmalarına yol açar (89).

Detaylı çalışmalar; primer enfekte kök kanallarında (örn. Nekrotik pulpalı kök kanallarında) zorunlu anaeropların, sekonder endodontik enfeksiyonlu dişlerde (örn. başarısız kanal tedavili dişlerde) fakültatiflerin başka tür mikroorganizmalardan daha fazla ürediği ve hayatta kaldığını ortaya koymaktadır (9,29,37,90,91).

Nekrotik pulpalı dişlerin kanallarından izole edilen bakteriler genellikle *Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, Actinomyces*, fakültatif streptokoklar, *Peptostreptococcus, Lactobacillius* ve *Eubakterium* genusuna aittir (81,92-94) (Tablo 3).

Tablo 3. Asemptomatik enfekte kök kanallarında yaygın olarak bulunan bakteri türleri (6).

Grup	***Koklar***	***Çomaklar***
Gram pozitif mikroorganizmalar	*S. sanguinis* *S. mitis* *S. mutans* *Streptococcus anginosus* *Enterococcus faecalis* *Peptostreptococcus micros* *P. anaerobius*	*Actinomyces israeli* *A. naeslundii* *Eubacterium alactolyticum* *E. lentum* *E. nodatum* *E. timidum* *Propionibacterium propionicum* *P.granulosum* *Lactobacillius spp.*
Gram negatif mikroorganizmalar	*Capnocytophaga ochracea* *C. sputigena* *Veillonella parvula* *Campylobacter rectus* *C. curvus*	*Fusobacterium nucleatum* *Prevotella intermedia* *P. melaninogenica* *P. denticola* *P. buccae* *P.buccalis* *Porphyromonas gingivalis* *P.endodontalis* *Bacteroides gracilis*

Konak doku, polimorfonükleer lökositler (PMNL), lenfositler gibi çeşitli enflamatuar hücre tipleri, sitokinler gibi interselüler aracılar, proteolitik enzimler gibi kimyasal silahlardan oluşan bir savunma mekanizmasına sahip olmasına rağmen, vücut, nekrotik kök kanalındaki mikroorganizmaları elimine edememekte, enflamatuvar proçes iyileşme ile sonuçlanamayabilmektedir. Kök kanal enfeksiyonu ile konak savunma mekanizması arasındaki bu savaş, sonunda periapikal dokuların yıkımıyla ve apikal periodontitisin oluşumu ile sonuçlanır (8).

Çalışmalar, apikal periodontitisin tedavi başarısındaki değişkenliğin mikrobiyal floranın kompozisyonundaki farklılıklarla ilişkili olabileceğini göstermektedir (9).

Primer apikal periodontitisli bir dişin kök kanalı, geniş bir bakteriyel flora içerir. Genelde 3-6 farklı tür bakteri tek bir dişte bulunur. Geniş lezyonlu dişler, küçük lezyonlu dişlerden daha çok bakteriyel tür bulundurmaktadır. Zorunlu anaerobik bakteriler, *Streptokok* gibi bazı fakültatif anaeroplarla beraber primer apikal periodontitiste tipiktir (37) (Tablo 4).

Tablo 4. Apikal periodontitisli dişlerde sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar (29,77,78).

Grup		Mikroorganizmalar
Gram negatif Anaerobik çomak	*Prevotella spp.*	*P.intermedia, P. nigrescens, P.bucca, P. oris P. oralis, P. denticola*
	Fusobacterium spp.	*Fusobacterium nucleatum,*
	Selenomonas	*Selenomonas spp.*
Gram pozitif Anaerobik kok	*Peptostreptococcus spp.*	*Peptostreptococcus micros, P. anaerobius*
Gram pozitif Anaerobik ve Fakültatif çomak	*Eubacterium*	*Eubacterium spp.*
	Propionibacterium	*P. acnes*
	Actinomyces	*A.viscosus, A. israelii, A. naeslundii*
	Lactobacillus	*Lactobacillus spp.*
Gram pozitif Fakültatif kok	*Streptococcus spp.*	*S.anginosus, S. intermedius, S. constellatus, S. mitis*

Endodontik tedavi başlamadan önce asemptomatik apikal periodontitisin florası, anaerobik bakterilerin hakim olduğu bir flora olarak ortaya çıkar. Böyle bir ortamda 2-8 farklı tür izole edilebilmektedir. Pigmente olmayan ve siyah pigmente *Prevotella* türleri, Gram pozitif anaerobik ve fakültatif çomaklarla beraber sıklıkla izole edilir. *Streptococcus* türleri de yaygın şekilde bulunur (78) (Tablo 5).

Tablo 5. Kronik apikal periodontitisten yaygın olarak izole edilen mikroorganizmalar (8,78,95).

Grup	***Mikroorganizmalar***	
Gram negatif anaerobik çomak	*Prevotella spp.*	*P.intermedia, P. nigrescens*
		P.oris, P. oralis, P. denticola
	Porphyromonas spp.	*P. gingivalis*
	Fusobacterium spp.	*F. nucleatum*
	Campylobacter spp.	*C. rectus*
	Selenomonas spp.	*Selenomonas spp.*
	Treponema spp.	*T. denticola*
	Bacteroides spp.	*B. forsythus*
Gram pozitif anaerobik ve fakültatif çomak	*Actinobacillus spp.*	*A. Actinomycetemcomitans*
	Eubacterium spp.	*Eubacterium spp.*
	Propionibacterium spp.	*P. acnes*
	Actinomyces spp.	*A.viscosus, A. israelii*
		A .naeslundii, A. odontolyticus
	Lactobacillus spp.	*Lactobacillus spp.*
Gram negatif anaerobik kok	*Veillonella spp.*	*Veillonella spp.*
Gram pozitif anaerobik kok	*Peptostreptococcus spp.*	*P.micros.*
Gram negatif fakültatif Çomak	*Eikenella spp.*	*E. corrodens*
	Capnocytophaga spp.	*Capnocytophaga spp.*
Gram pozitif fakültatif kok	*Streptococcus spp.*	*S.anginosus, S. intermedius*
		S.constellatus, S. mitis
		S.sanguis, S. oralis
Mantar	*Candida spp*	*Candida albicans*

Fabricius ve arkadaşları (96,97) maymunlarda yaptıkları çalışmalarında ayrı ayrı ve kombine halde bakterileri inokule ettiklerinde oluşan periapikal reaksiyonları incelemişlerdir. Bakteriler, yaşamlarını devam ettirebilmeleri ve periapikal lezyon oluşturabilmeleri açısından incelendiğinde bir bakteri türü küçük veya orta düzeyde periapikal lezyona neden olurken, bakteri kombinasyonlarının ciddi seviyede lezyona neden oldukları görülmüştür.

2-5.4.2 Sekonder Enfekte Kök Kanalı

Kök kanalındaki sekonder enfeksiyon, kanal tedavisi yapılmış bir dişteki mikrobiyal enfeksiyonu, dolayısıyla bir başarısızlığı tanımlamaktadır (26). Olgulardaki başarısızlığın çoğunun nedeni tedavi sırasındaki teknik problemler (29), kanal içi enfeksiyon varlığı (84) veya kanal boyunca koronal yolla mikroorganizmaların sızıntısıdır (23,32,78,90,98-101). Bu sızıntı neticesinde mikroorganizmalar, gözden kaçan kanallar ile enstrümante edilmemiş kanal bölgelerinde lokalize olabilmekte ve kemomekanik prosedürlere rağmen hayatta kalabilmektedirler (9,29,91,102).

Yukarıda bahsedilen noktaların yanında, apikal radyolusensi gösteren kanal dolgulu her dişte sadece kanal içi enfeksiyonun bulunduğu düşünülmemelidir. Periapikal kist (103), ekstraradiküler enfeksiyon (104), yabancı cisim reaksiyonu (105) veya skar dokusu formasyonu da benzer görüntüye neden olabilmektedir (32,106).

Sekonder enfeksiyonlarda, primer enfeksiyonla kıyaslandığında sıklıkla izole edilen bazı mikroorganizma türleri ön plana çıkmaktadır. Bunlar; *E. faecalis/faecium* grubu, enterik Gram negatif fakültatif çomaklar, koliformlar, *Pseudumonas* türleri (32,100,107), *Streptococcus* gibi fakültatif mikroorganizmalar (9,29,90,91) ve *Peptostreptococcus micros* (26) gibi zorunlu anaerobik bakterilerdir. Koagülaz negatif stafilokoklardan olan *Staphylococcus saprophyticus* ve *Staphylococcus haemolyticus* da klinik olarak en sıklıkla karşılaşılan türlerdir (86). Bununla beraber *E. faecalis*, en sıklıkla izole edilen ve kanalda hakim olduğu görülen mikroorganizmadır (9,29,32,37,88,91,99-101,106). Primer apikal periodontitiste bulunmayan veya nadir bulunan mantarlar ve Gram negatif enterik çomaklar gibi bazı mikroorganizmaların da bu tür olgularda sayısının artmış olduğu bilinmektedir (9,29,32,36,37,84-86,90,108-113).

Başarısız endodontik tedavi sonrası kök kanallarının florası, tedavisi henüz yapılmamış kök kanallarının mikrobiyal florasına oranla oldukça farklıdır (9,29,37,114). Nekrotik kanallar tipik olarak kanal başına 4-7 tür olacak şekilde Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmaların ortalama eşit oranda bulunduğu ve anaerobiklerin hakim olduğu polimikrobiyal bir floraya sahip iken (32,69,94),

kanal yenileme olguları fakültatif ve zorunlu anaeropların dengede olduğu ya da *E. faecalis*'in öne çıktığı fakültatif anaerobik Gram pozitif türlerin hakim olduğu, tür açısından oldukça sınırlı bir floraya sahip bir mono enfeksiyon olarak ortaya çıkar (9,26,29,37,90,91) (Tablo 6).

Tablo 6. Sekonder enfeksiyonda (dirençli kök kanal enfeksiyonu) sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar (8,9,29,32).

Grup	***Mikroorganizmalar***	
Gram pozitif fakültatif kok	*Enterococcus spp.*	*E. faecalis*
	Streptococcus spp.	*S.anginosus,S. intermedius*
		S.constellatus, S. mitis
		S.sanguis, S. oralis
Gram pozitif anaerobik kok	*Peptostreptococcus spp.*	*P.micros*
Gram pozitif anaerobik ve fakültatif çomak	*Actinomyces spp.*	*A.viscosus A. israelii A. naeslundii*
Gram negatif anaerobik ve fakültatif çomak	*Bacteroides spp.*	*B. forsythus*
Mantar	*Candida spp.*	*Candida albicans*

2-5.5 *Enterococcus faecalis*

Enterokoklar, insanda GIS yollarında, oral kavitede ve vajinada normal flora dahilinde bulunur. *E. faecalis*, normal oral floranın bir parçasıdır fakat enstrümante edilmemiş enfekte kök kanallarında çok az sayıda bulunur (9,29,32,36,37,90,114-116).

2-5.5.1 *Enterococcus faecalis*'in Endodontik Açıdan Önemi

Enterokoklar, en zor koşulların bulunduğu ortamlarda bile yaşamlarını devam ettirebilmektedirler. Kök kanallarındaki çoğu bakteri, birbirleriyle simbiyotik

ilişki içerisinde bulunmalarına rağmen *E. faecalis* buna ihtiyaç duymaz (115,117). Yüzde 6.5'luk NaCl içerisinde, pH'ı 9.6 olan 10-45 C° ısı aralığındaki bir ortamda üreyebilir (115) ve ısısı 60 C° olan ortamda 30 dakika yaşamını devam ettirebilir, ultraviyole ışımalara karşı direnç geliştirebilir (115,118,119).

E. faecalis, ani değişen ortamlara da kolaylıkla uyum sağlayabilir. Subletal stres* şartlarına önceden maruz bırakılmaları durumunda, safra tuzu, hiperozmolarite, ısı, etanol, hidrojen peroksit, asidite ve alkalinitenin normalde öldürücü dozlarına daha az duyarlı hale gelmektedir. Dahası bu ani değişen şartlara karşı çapraz koruma geliştirdiği görülmüştür (120-122). Çevresel streslere maruz kaldığı zaman bakterinin yaşam mekanizmaları bu streslere adapte olabilir, şartlar eski haline dönünce de tekrar yaşamına devam edebilir (123).

E. faecalis'in bu değişen şartlara uyum sağlama ve tolere etme kapasitesi, diğer tür mikroorganizmalara karşı üstünlüğünü ortaya çıkarmakla beraber, kanal içi medikamentlere rağmen hayatta kalabilmesini yeterince açıklamaktadır.

E. faecalis kök kanallarına girer, antibakteriyellere rağmen yaşar, çoğalır ve dirençli hale gelir. Henüz kanal tedavisi yapılmamış dişlerde çok az miktarda bulunabildiğinden elimine edilebilir (29). Fakat, seanslar arasında etkili örtüleme yapılamadıysa veya fazla sayıda tedavi seansı yapılması neticesinde kanal içerisinde yüksek oranda *E. faecalis*'e rastlanabildiği bildirilmektedir (100). Yani, bu bakteri kök kanallarına tedavi esnasında girmektedir (100,124).

In vitro çalışmalar, *E.faecalis*'in dentinal tübüllere ilerleyebildiğini göstermektedir (107,125). Halbuki çoğu bakteri bu yeteneğe sahip değildir. Hayvan çalışmalarında, farklı bakterilerin saf kültürleri kök kanallarına inoküle edildiği zaman diğerlerinin aksine kök kanalında kolonize olduğu ve başka bakterilere ihtiyaç duymaksızın hayatta kalabildiği görülmüştür (96). Bu nedenlerle, özellikle kanal yenilenmesi olgularında diğer mikroorganizmalara nazaran ön plana çıkmaktadır.

Bugün kullandığımız çoğu antibakteriyel materyalle bu bakterinin eliminasyonu oldukça zordur. Bazı çalışmalar, *E.faecalis*'in kalsiyum hidroksite kısmen dirençli olduğunu bildirmektedir (9,100,125-127). Bu belki de optimal sitoplazmik pH düzeyinin gelişmesini sağlayan proton pompası mekanizması yüzün-

*Subletal stres: Organizma üzerinde öldürücü olmayan yüksek derecede stres

dendir (126,127). Bu yüzden kalsiyum hidroksitin sekonder apikal periodontitisli kanal yenileme olgularında dezenfektan olarak kullanımı tartışmalıdır (9,100,125).

Berber ve arkadaşları (128), kök kanalları ve dentin tübülleri içerisindeki *E. faecalis*'e karşı farklı konsantrasyonlardaki (%5.25-2.5-0.5) sodyum hipokloritin etkinliğini inceledikleri çalışmalarında, dentin tübülleri analiz edildiğinde test edilen en etkili irigan solüsyonun %5.25'lik NaOCl olduğunu göstermişlerdir. Sukawat ve Srisuwan ise (129), 3 farklı kalsiyum hidroksit formülünün *E. faecalis*'le enfekte dentin üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini inceledikleri çalışmalarında distile su, %0.2'lik klorheksidin ve CMCP karışımlı formülasyonların 7 gün uygulanması sonrası CMCP ve kalsiyum hidroksit karışımının dentinal tübül dezenfeksiyonunda tamamen etkili olduğu görülmüştür. Kalsiyum hidroksitin diğer karışımları etkili bulunmamıştır. Bu çalışmayı destekleyen bir diğer çalışmada da (130) *E. faecalis*'e karşı kalsiyum hidroksit ve klorheksidin karışımının etkinliği incelenmiş, *E.faecalis*'e karşı kalsiyum hidroksitin klorheksidinin etkinliğini değiştirmediği fakat yaygın endodontik patojenlere karşı ilave etkinlik sağladığı sonucu elde edilmiştir.

2-5.5.2 *E. faecalis*'in Dirençli Olmasını Sağlayan Yapısal Elemanları ve Fonksiyonları

Agregasyon substans (AS), plazmid* değişiminin olması için verici ile alıcı bakteriler arasındaki etkili yüzey temasını sağlayan plazmid kodlu bakteriyel adezindir. AS, verici hücre tarafından salınırken, bakteriyel konjugasyonun* oluşabilmesi için alıcı hücre yüzeyinden de BS'nin (bağlayıcı substans) salımı gereklidir. AS ile BS'nin kombinasyonu süperantijen aktivasyonuna neden olur (131). Süperantijenler; bakteriler, virüsler, parazitler ve mayalar tarafından salgılanan ve doku hasarıyla sonuçlanan, enflamatuvar sitokinlerin salımını takiben T-lenfositlerin stimülasyonuna neden olan moleküllerdir (115). AS, karşılıklı bakteriyel çekim işlemi süresince, bakterinin diğer ökaryotik hücrelere ve kollagen Tip I içeren

*Plazmid: Kendi kendini eşleyebilen, kromozomdan ayrı bir DNA parçası.

*Konjugasyon: Hücre teması yoluyla bakteriler arasında genetik malzeme aktarımı.

ekstraselüler matrise (ESM) yapışması için aracılık etmektedir (115).

Bununla beraber, *E. faecalis*'in Tip I ve Tip IV kollagen içeren ESM proteinleriyle bütünleşmesinde (115) katkısı olduğu gösterilen bir proteinimsi yapı (**Ace**) tanımlanmıştır (132,133). Ace genindeki parçalanmanın, *E. faecalis*'in kollagen matrisine bağlanmasında hasar oluşturduğu bildirilmektedir (134) (Tablo 7).

Tablo 7. *E. faecalis*'in virülans faktörleri ve fonksiyonları.

Faktör	***Fonksiyon***
AS**,** Yüzey adezinleri, LTA	Adezyon ve kolonizasyon
AS, EfaA geni, LTA	Konak savunmasına direnç
Sitolizin**,** AS-48, Diğer bakteriosinler	Diğer bakteriler üzerinde inhibisyon
LTA**,** Ekstraselüler süperoksit anyonu Jelatinaz**,** Hyalüronidaz, Sitolizin	Doku hasarı
Seks feromonları, LTA	Enflamasyonun indüksiyonu

Enterokokal gen ESP *(enterokokal yüzey proteini)*, yüksek molekül ağırlıklı yüzey proteinidir (135,136). Esp, *E. faecalis*'in abiotik (canlı olmayan) yüzeylerde biofilm formasyonu ile primer tutunmasını teşvik etmektedir (137). Bununla beraber, *E. faecalis* tarafından oluşturulan biofilm medikament uygulanmış dentin duvarlarında da görülmektedir. Bunun, enfekte kök kanallarında $Ca(OH)_2$'in bakterisidal etkisinden korunmayı sağladığı bildirilmiştir (127).

E. faecalis tarafından **EfaA** geninin üretimi yaygın olarak görülmektedir (138). Hayvan çalışmalarında, EfaA genine sahip olma açısından *E. faecalis* incelenmiş ve bu gene sahip olan *E. faecalis*'in sahip olmayandan daha uzun hayatta kaldığı rapor edilmiştir (139).

Lipoteikoik asitler (LTA), Gram pozitif bakterilerin hücre yüzeylerinde ve streptokok ile laktobasillerin sıvı kültürlerinde bulunur. LTA'nın hücrelere bağlanmanın yanında hidroksiapatite olan yüksek afinitesi de gözlemlenmiştir. Bu şekilde diş yüzeylerinde Gram pozitif kolonizasyonu da sağlanmaktadır (115).

LTA'in ratlara intragingival enjeksiyonunu takiben periodontal dokularda ciddi enflamatuvar lezyonlar ve kemik rezorpsiyonu görülmüştür (115). *E. faecalis* veya diğer Gram pozitif bakteri türlerinden izole edilen LTA, enflamatuvar yanıtın çeşitli fazlarında rol oynadıkları bilinen medyatörlerin salımı için lökositleri stimüle

etmektedir (115). Bununla beraber, trombosit aktivasyon faktörü ve histamin gibi ikincil medyatörlerin salımı vasıtasıyla vasküler geçirgenliği arttırmaktadır (140,141). Daha da önemlisi, hücrenin duvarlarının otolizisini engellemektedir. Bu durumda hücre duvarına etki eden antibiyotiklerin etkinliği yeterince güçlü olmamaktadır (115).

E. faecalis'in bazı **seks feromonları** ile inhibe edici peptidlerinin süperoksit üretimini, lizozomal enzim sekresyonunu arttırdığı, nötrofiller için ise kemotaktik etki gösterdiği bulunmuştur (142).

Süperoksit anyonu, enflamatuvar hastalıkların dahil olduğu çeşitli doku hasarlarına neden olan oldukça reaktif oksijen radikalidir. İzole edilen 91 tip *E.faecalis*'in 87'sinin ekstraselüler süperoksit radikali ürettiği bulunmuştur (143). Süperoksitle beraber diğer oksijen radikallerinin lipid, protein ve nükleik asit gibi biyolojik yapıtaşları üzerinde yıkıcı etkileri vardır. Nötrofil ve diğer fagositik hücreler, mikroorganizmaları öldürmek için süperoksit üretirken, bu esnada enflamasyon bölgesinde doku hasarına da neden olurlar. Periapikal lezyonlardaki fagositik hücreler tarafından süperoksit üretimi ile bunun eliminasyonu arasındaki denge değiştiği zaman periapikal bölgede yıkılma ile kronik apikal periodontitisteki kemik kaybına neden olunmuş olur (115).

Jelatinaz, matris metalloproteinaz ailesinin (MMP) bir üyesidir ve enflamatuvar, epiteliyal, fibroblast, osteoklast gibi memeli hücrelerinin çoğu tarafından yapılabilir. Bakteriyel jelatinazınkine benzer şekilde konak jelatinazı da ekstraselüler matris çökeltici fonksiyonları arasından dokuların tamir ve formasyonunun düzenlenmesi gibi normal fizyolojik proçeslerde rol oynar (115). Jelatinazın inhibisyonu, doku kültür incelemelerinde (144) ve deneysel periodontal hastalık modellerinde (145) kemik rezorpsiyon oranını azaltmıştır.

Hyalüronidaz, hyalüronat ve hyalüronan şeklinde hyalüronik asittir ve doku hasarıyla yakından ilişkili indirgeyici bir enzimdir (115). Bağ dokusunun mukopolisakkarit kısmını depolimerize eder ve bu durumda bakteriyel invazyon artar (115,146-148). Yani; hyalüronidaz kök kanallarından periapikal lezyon içine bakterilerin göçünü kolaylaştırabilmektedir.

Sitolizin oluşturan bakteriler, bilinmeyen bir mekanizmayla cyIL geni sayesinde lizisten korunur (147,148). Eritrositler, PMNL'ler ile makrofajlar ve Gram

pozitif organizmaların büyük kısmı (Gram negatifler değil) sitolizin'in hedef hücreleri arasındadır. Bir hipotez olmakla beraber, *E. faecalis*'in sitolizisinin bakteriosin etkisi, Gram negatiflerin kolonizasyonunu destekler (115). Bir çalışmada; $CyIL_L$ ve $CyIL_S$ genleri, sitolizinin strüktüral subünitleri olarak kabul edilen, oksijen seviyesindeki değişikliklere yanıt olarak regüle edilir ve daha fazla sitolizin, anaerobik koşullar altında oluşur (149). Endodontik açıdan baktığımızda bu durum oldukça önemlidir. Aeroblar tarafından oksijenin tüketilmesini takiben kök kanalında *E. faecalis* anaerobik koşullarda bulunabilir. Anaerobik koşullar, kök kanalındaki bakteriyel biyofilm tabakalarında da egemendir ve *E. faecalis* biyofilm oluşturma kapasitesine de sahiptir (127).

AS-48, *E. faecalis* S-48'den orijinal olarak izole edilen plazmid kodlu peptid antibiyotiktir. AS-48, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin büyük çoğunluğu üzerinde litik aktivite gösterir. AS-48'in hedef hücreler üzerindeki etkisi, sitoplazmik membran potansiyelinin azalmasıyla başarılan iyon geçişlerinin indüksiyonu şeklindedir (115).

2-5.5.3 *E. faecalis*'in Yaygınlığı

E. faecalis bir çalışmada, 19 başarısız endodontik tedavili kanalın 6'sından tek başına izole edilebilmiştir (26). Bazı eski çalışmalar, 8 endodontik hastanın 6'sında oral örneklerde *Enterococcus* genusuna ait bakterilerin bulunduğunu bildirmektedir (124). Bunun aksine oral gargara örneklerinde *E. faecalis*'in prevalansını inceleyen bazı çalışmalarda ise toplam 130 endodontik hastanın %17'sinden daha azında bu bakterinin bulunduğu bildirilmektedir (150,151).

Sedgley ve arkadaşları (124), dilden, gargaradan, gingival sulkustan ve kök kanallarından örnek aldıkları 41 endodontik hastada (136 diş) kültür ve PCR ile yaptıkları incelemede *E. faecalis*'i en çok dilden aldıkları örneklerde gözlemlemişlerdir. Hastaların %68'inde *E. faecalis*'i bu bölgelerden (dil (%43), gargara (%10), gingival sulkus (%14)) izole ederlerken kök kanallarının %5'inde ilgili bakteriye rastlamışlardır. Araştırıcılar kök kanallarındaki bu düşük oranı retreatment olgularının toplam olgulardaki düşük oranına bağlamışlardır.

E. faecalis, nekrotik pulpalı tedavi edilmemiş dişlerin ana florasının küçük bir bölümünü oluşturmakta (94,96), kronik apikal periodontitisli kök kanal dolgulu dişlerde %23-70 gibi yüksek oranlarda izole edilmektedir (9,27). Üstelik bu dişlerde, diğer bakteriler olmaksızın tek başına (monokültür) bulunabildiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (29,96,152).

Periradiküler lezyonlu kanal dolgulu dişlerde *E. faecalis*'in oranını araştıran çalışmalar farklı izolasyon teknikleri ve saptama yöntemleri nedeniyle %0-77 gibi geniş bir aralıkta sonuçlar rapor etmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. PCR ve kültür ile yapılan çalışmalarda periradiküler lezyonlu kanal dolgulu dişlerde bulunan *E. faecalis* oranları.

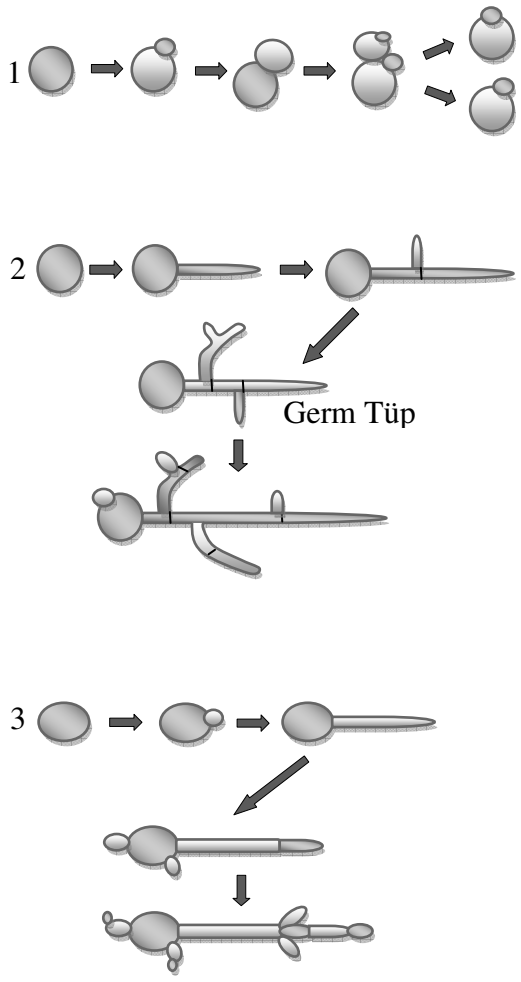
Çalışma	*Yıl*	*Yöntem*	*E. faecalis*
Möller (27)	1966	Kültür	% 29
Sundqvist ve ark. (29)	1998	Kültür	% 38
Molander ve ark. (9)	1998	Kültür	% 47
Peciuliene ve ark. (114)	2000	Kültür	% 70
Peciuliene ve ark. (37)	2001	Kültür	% 64
Hancock ve ark. (32)	2001	Kültür	% 30
Cheung ve Ho (86)	2001	Kültür	% 0
Rolph ve ark. (153)	2001	PCR	% 0
Pinheiro ve ark. (90)	2003	Kültür	% 53
Siqueira ve ark. (36)	2004	PCR	% 77
Kaufman ve ark. (88)	2005	PCR	% 5.5
Fouad ve ark. (116)	2005	PCR	% 22
Sedgley ve ark. (124)	2006	PCR	%10

2-5.6. Mantarlar

Mantarlar, fotosentetik olmayan ökaryotik mikroorganizmalardır. Görünüm bakımından iki tür yapı gösterirler. Bir kısmı çok hücreli ipcikler oluşturarak gelişen *küfler*dir (20,21) ve, dallanmış silindirik tübüler şekilli multiselüler filamentöz yapı gösterirler. Tek bir filamente *hif* denir. Hifler, ya bölümlü ya da koenositik (ara duvarlar olmaksızın çok hücreli) şekildedir (113). Yaklaşık 2-10 μm eninde,

bakterilerden daha geniş ve dallanan ipcik biçiminde oluşumlardır. Uygun bir ortamda çoğalan bu mantarların oluşturdukları, gözle görülen sınırlı kitlelerine miçelyum adı verilir. Miçelyumlar hiflerin uçlarından uzamaları, dallanmaları ve birleşmelerinden oluşmuş bir örgüdür (20,21,113).

Mantarların bir kısmı ise tek hücreler şeklinde üremek suretiyle oval ya da yuvarlak, yaklaşık 3-5 μm çapında oluşumlardan yapılı biçimde bir bakıma bakterilere benzeyen mayalardır (20). Hücre, ana hücrenin dışına doğru tomurcuklanma şeklinde yeni bir hücre formasyonu gösterebilir (113) (Şekil 2).



Şekil 2. Maya hücrelerinin şematik formları.

Bazı mantarlar için küf ya da maya ayırımı yapmak çok güçtür. Bunlar bulundukları ortam koşullarının etkisi ile zaman zaman bir görünümden diğerine geçmektedirler. *C. albicans*'ın 4 değişik şekil oluşturarak geliştiği görülür (pleomorfizm) 1) Psödohif, 2) Maya hücresi, 3) Klamidosporlar (Klamidokonidiler), 4) Gerçek hif (çok seyrek olarak) (154).

2-5.6.1 Mantarların Yapısı

Mantarlar, nükleer membranla çevrili bir çekirdeğe sahiptir. Hücre membranı steroller içeren lipitler ve glikoproteinlerden oluşur. Mantar hücre duvarları mimari olarak bitkisel hücre duvarını andırır. %80-90 oranında protein, lipit ve polifosfatlardan oluşan polisakkaritler ile inorganik iyonlardan oluşur (155). Bir N-asetilglukozamin polimeri olan kitin mantar hücre duvarlarının yaygın bir bileşenidir. Bu şekilde rijit bir yapıya sahip olur. Bununla beraber hücre duvarları selüloz da içermektedir. Glukan, mannan, galaktosan ve kitosan gibi polisakkaritler ise bazı mantar hücre duvarlarında kitin veya selülozun yerini almıştır (113,154). Beslenme, bu hücre duvarı yoluyla alınan nitrojen ve karbon bileşiklerine bağlıdır (8).

2-5.6.2 Oral Mantarların Sınıflaması

Oral mayalar, *Saccharomycetaceae*, *Endomycetaceae*, *Dipodascaceae* ve *Lipomycetaceae* olarak 4 aileye ayrılan *Endomycetes* sınıfı ve *Ascomycota* divizyonuna aittir. Klinik olarak en önemli oral mayalar *Saccharomycetaceae* ailesinden ve *Candida* genusundan olanlardır (8).

2-5.6.3 Oral Mantar Türleri

Mantarlar, oral kavitede sık rastlanılan fırsatçı patojenlerdendir. Herhangi bir oral rahatsızlığı olmayan bireylerin ortalama üçte birinin ağzında mantarlara rastlanmıştır (111).

Ortalama 50.000 civarında mantar türü olduğu, bunların 200 kadarının hayvan ve insanlarda hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Kandida ve Aspergillus ailesinin üyeleri ise en sık rastlanılan fırsatçı patojenlerdendir (113).

Dilin dorsumu *C. albicans* için birincil, diğer bölgeler ise sekonder oral habitattır (113). Supragingival alan ve mukoza, dentin, kök, subgingival alan ve periodontal cepler bu tür sekonder kolonizasyon alanlarındandır (113,156). *C. albicans*'ın yanında büyük çoğunlukta *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* ve *Saccharomyces* türleri'ni içeren mantarlar da oral kaviteden izole edilmişlerdir (23,78). Oral kavitede *C. albicans* insidansı sağlıklı erişkinlerde %30-45 arasındadır (157).

2-5.6.3.1 Kandidalar

En önemli oral mantar genusu kandida, bunlar içinde en hakim olan kandida türü ise *Candida albicans'*tır. Bunu, *C. glabrata, C. krusei, C. tropicalis, C. guilliermondii, C. kefyr* ve *C. parapsilosis* takip eder. Son çalışmalar, *C. dubliniensis*'in de bulunduğunu göstermiştir (8). *Candida dubliniensis*, *C. albicans*'la ilişkili olarak belirlenmiş yeni bir türdür ve sağlıklı bireylerin oral florasında nadiren görülür (111).

Kandidalar *Deuteromycota*'da *Blastomycetes* sınıfının *Cryptococcales* takımında *Cryptococcaceae* ailesinde sınıflandırılan, blastosporlarla çoğalan, yalancı hif yapan, gerçek hif yapmaları nadir olan ve eşeyli şekilleri *Hemiascomycetes* sınıfında bulunan bir grup anamorf (eşeysiz üreyen) mayadır. Bugün için kabul edilmiş 220 kadar türü bulunmaktadır. *C. albicans* ve diğer bazı Kandida türleri

birçok sağlam insanın ağız-boğaz, vajina, deri, barsak ve dışkılarında bulunmakta, direncin kırıldığı durumlarda hastalık yapabilmektedirler. Kandidalar basık küre şeklinde, silindirik olabilen, 2-8x3-15 mm boyutlarında ökaryonlu mikroorganizmalardır ve tomurcuklanarak çoğalırlar. Tomurcuklanarak meydana gelen yavru hücre ana hücrenin aynıdır, ana hücreden ayrılabilir veya ayrılmaz. Ayrılmayı başaramayan hücre tomurcukları, yalancı hif şeklinde zincirler, seyrek olarak bazen de gerçek hife benzeyen bir ağ oluştururlar (154).

Klamidosporlara sahip olma *C. albicans*'ın en belirgin özelliğidir ve herhangi başka bir Kandida türü tarafından nadiren meydana getirilir. Bu bakımdan *C. albicans* ile diğer Kandidaların ayırdedilmesini sağlarlar. Kandidalar, Klamidosporlar sayesinde yedek besin depolarlar ve yuvarlak/kalın duvarlı bu oluşumlar sayesinde açlığa ve diğer çevresel şartlara karşı canlılığı koruyabilecek uyum geliştirirler. Klamidospor üreten ve 1995'de ayrı bir Kandida türü olarak kabul edilen *C. dubliniensis*'in klamidosporlarının diğerlerinden farklı olması önemli bir fenotip özelliğidir (154).

2-5.6.4 İzolasyon ve Tanımlama

İçerisinde antifungal bulunmayan neredeyse her besiyerinde üreyebilirler. Sabouraud agarda, mısır unlu agarda, patatesli nişastalı dekstroz agarda en kolay ürerler (111,158). Fakat bakterilerle kıyaslandığında düşük koloni sayısı (CFU) gösterirler (111).

Mantarlar, primer izolasyon için seçici besiyeri kullanıldığı zaman endodontik örneklerden en iyi izole edilen organizmalardandır. Bakterilere nazaran daha geniş bir pH aralığını tolere edebilir ve izolasyon için çeşitli selektif ortamlar gerektirirler. Sabouraud dekstroz agar, oral mantarların izolasyonu için yaygın olarak kullanılan besiyeridir. Bu ortamın pH'ı oldukça asidiktir (ortalama 5.6) ve asidürik organizmalarla mantarların büyümesine izin verirken çoğu bakteriyi inhibe ederler. Asidürik bakterilerin büyümesini engellemek için hidroklorik asit ilavesiyle pH 3-4 seviyesine kadar düşürülebilir. En iyi 37 ^{o}C'de nemli ortamda üremekte, anaerobik koşullar altında üremektedirler (111).

İlk izolasyonun %10 CO_2'li atmosferde yapılması önerilir. Bu ısıdaki bir ortamda 1-4 gün inkübasyonu takiben tipik koloniler ortaya çıkar (158).

C. albicans ve *C. dubliniensis'*i diğer Kandida'lardan ayıran en önemli özellik jerm tüp testine pozitif cevap vermeleridir (154,158).

Jerm Tüp Testi: Saf kültürden bir öze dolusu koloni materyali, serum içerisinde süspanse edilir ve etüvde 2 saat bekletilir. Mikroskop ile 40x büyütmede incelenir. Sadece *C. albicans ve C. dubliniensis* tomurcuklanma (çimlenme borusu) gösterir. Bunların dışındaki diğer Kandida'lar jerm tüp negatiftir (154,158).

Koloniler düzgün, grimsi beyaz, sarımsı, yumuşak ve peynir kokuludur. Birkaç hafta beklemekle dev Kandida kolonileri ortaya çıkar**.** Tipik olarak bakteri kolonilerinden 2-3 kat büyüktür. Yüzeyi kuru bir görünüme sahiptir. Koloniler eskidikçe buruşuk bir görünüm alır. Kültürlerinden alınan koloni materyali Gram pozitif boyanır (111). Aynı zamanda, pozitif katalaz testi ile (%3'lük H_2O_2 uygulandığı zaman şiddetli köpürme) ve faz kontrast mikroskobu ile tipik selüler morfoloji göstermeleriyle oral mantar olarak kolayca tanımlanabilir (111,154).

2-5.6.5 Fungal Patojenite ve Mekanizması

Mantarla konak arasındaki karşılıklı etkileşim sonucuna bağlı olarak ya subklinik düzeydeki enfeksiyonlar (latent veya gizli enfeksiyonlar) ve/ veya klinik bulgular (görülebilir belirtiler)in ortaya çıkması şeklinde hastalık meydana gelir veya meydana gelmesi önlenir. Etkenin hastalık yapıcı birçok özelliği ile konağın duyarlılığı tarafından belirlenen bu olay özellikle insanlarda sıradan bir kommensal olarak bulunan fakat konağın savunması zedelendiğinde dokulara yayılarak ona zarar verebilen kandidaların yaptıkları enfeksiyonların altındaki gerçeği oluşturur (159).

Değişen Çevre Koşullarına Adaptasyon: *C. albicans*, pH gibi sert fizyolojik koşullara kolay adapte olabilir. Bu durum, mikroorganizmanın kan dolaşımı veya çoğu dokulardaki nötral pH ortamından vajinal kanalın asidik pH ortamına kadar geniş bir alanda bulunabilmasine ve üreyebilmesine olanak sağlar (160).

Farklı Yüzeylere Adezyon: *C. albicans*'ı kandidalar içerisinde en sık karşılaşılan tür olarak öne çıkaran özelliklerin başında mukoza yüzeylerine yapışma yeteneği gelir. *C. albicans* ile epitel hücrelerinin yüzey lipidlerinin ve glikolipidlerinin yapışma olayında rollerinin olabileceği, bunların giderildiği deneylerde bağlanmanın %48-54 azaldığı öne sürülmüştür (159). *C. albicans*, plastik yüzeylere de en iyi tutunan mantardır (158,159). Protez tiplerinde kullanılan polimetilmetakrilata yapışma göstermektedir (161). Monroy ve arkadaşları (161), 2004 yılında yaptıkları çalışmalarında protez kullanan 105 hastanın %66.7 sinde *C. albicans* bulunduğunu bildirmişlerdir.

Kandida türleri, konak dokulara tutunmasını düzenleyen yüzey molekülleri bulunduru. Lektin, epitelial hücrelerdeki şekerlere, mannoz içeren proteinler ise konak hücre ve dokulardaki lektin benzeri moleküllere tutunur (162). Bununla beraber, Tip I ve Tip IV kollajene ve bakterilere tutunmaya da meyillidir (113). Bazı kandida türleri oral bakterilerle kolonizasyon yapabilir (113). Örneğin; *C. dubliniensis, Fusobacterium nucleatum* ile, *C. Tropicalis, Streptococcus gordonii* ile kolonizasyon yapar (113).

Hidrolitik Enzimlerin Üretimi: *C. albicans*, periradiküler dokularda hasara neden olan hidrolitik enzimler de oluşturmaktadır. Bu enzimler, aspartil proteinaz, kollagenaz, aminopeptidaz, glukozaminidaz, asit, alkalen fosfataz, hyaluronidaz ve kondroitin sülfatazdır ve bunlar ekstraselüler matris proteinlerinin çözünmesine yol açmaktadır. Bu türlerden oluşturulan kollagenolitik enzim, insan dentin kollagenini de çözebilmektedir (8,113).

Morfolojik Değişim: Diğer Kandidalar gibi konağa girmeden önce maya fazındadır, buna Y fazı (Yeast phase, saprofit faz) denir. Konak dokuya temas ettikten bir süre sonra yalancı hif geliştirerek hastalık yapan fazına, yani M fazına (Mycelial phase, hyphal phase) geçerler (158).

Kandidalar, sıklıkla maya ve hif formları halinde bulunurlar (108,109). Hif formuna geçiş, konak dokuya tutunmanın yanısıra makrofajların fagositozundan kaçış da sağlamaktadır (113). *C. albicans*'ın ortam koşullarına adapte olabilmek için geliştirdiği bir kaçış mekanizması olarak tanımlanan fenotipik dönüşüm, koloni morfolojisinde ortaya çıkan degişiklikler olarak da tarif edilmektedir (163).

Sadece standart suşların değil, vücudun farklı bölgelerinden izole edilen kommensal veya patojenik suşların da fenotipik dönüşüm gösterdiği ve bu

dönüşümün patojenik suşlarda daha hızlı (yüksek frekanslı) ortaya çıktığı bildirilmiştir (163). Gelişecek fenotipi sıcaklık, pH ve besiyeri gibi ortam koşulları belirlemektedir (159).

Biyofilm Formasyonu: *C. albicans* bileşiminde karbonhidrat (%41), protein (%5), fosfor ve heksozamin ihtiva eden bir ektraselüler matris sentezleyerek hücre dışında biriktirir. Bu matris hidrofobiktir ve konak doku proteinlerine tutunabilir. Bu tutunmayı takiben üzerine sırasıyla serum proteinleri (bilhassa fibrin), deskuame epitel hücreleri, ölü lökositler, ve psödophifalar yerleşir. Antifungallere daha dirençli olan ve birbirlerinin yaşam faaliyetlerini destekleyen kandial elementlerden oluşan, çamursu yapıdaki bu tabakaya kandidal biyofilm adı verilir (113,158).

Bir biyofilm içerisinde üreyen *C. albicans*'lar, antifungal flukonazol'e planktonik hücrelerden 100 kattan fazla, amfoterisin B'ye ise 20-30 kez daha fazla dirençli olabilmektedir (113).

Bir kandidal biyofilmde, en alt tabakadaki *C. albicans* hücreleri blastospor geliştirerek altındaki konak dokuya penetre olurlar. Böylece hem dışardan gelebilecek antifungal müdahaleden korunurlar, hem de konak dokuda enfeksiyonu sistematize edecek bir mimari geliştirirler (158).

Kandidal biyofilmlerin yüzeyine stafilokok kolonizasyonu sık görülür. Ortamda >250 mM glukoz bulunduğunda *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sanguis*, kandidal biyofilme iştirak eder. *S. salivarius* ve *Actinomyces*'lerin kandidiyal biyofilme katılabilmesi için ortamda en az 500 mM galaktoz bulunması gerekmektedir. Bu şekilde miks biyofilm oluştuktan 6 saat sonra kandidalar flukonazol direnci kazanırlar (MIC, >128 µg/ml). Çünkü stafilokokların ekstraselüler polisakkaritleri biyofilme dışarıdan uygulanabilecek flukonazolü inhibe ederler. Ayrıca kandidalar önceden duyarlı bile olsalar flukonazol, nistatin, klorheksidin, terbinafin, amfoterisin B, vorikonazol ve ravukonazol'e karşı direnç kazandıkları rapor edilmiştir (158).

Biyofilm oluşturan bu kandidalara karşı en etkili ilaç ekinokandin (kaspofungin ve mikafungin), ve amfoterisin B'nin lipit formülasyonlarıdır (158). Kök kanalı içerisindeki kandidal biyofilm için biyomekanik preparasyon, sodyum hipoklorit, IPI ve klorheksidinin etkili olduğu, kalsiyum hidroksitin pat olarak direkt temas halinde olmadıkça etkisiz olduğu bildirilmektedir (3,43,111,164-170).

2-5.6.6 Konak Savunmasının İmmüno-Modülasyonu ve Evazyonu*

Polimorfonükleer nötrofiller, *C. albicans*'a karşı savunmada rol oynayan en önemli enflamatuvar hücrelerdendir (171). Bu türler, oksijen radikalleri üretimi ve degranülasyon ile monositleri öldürmelerinin yanısıra polimorfonükleer nötrofil fonksiyonlarını da bloke etmektedirler (172). Kandida türleri, proteinaz üretimi vasıtasıyla konak savunma moleküllerinin etkisinden korunabilir ve kompleman faktörleri ile IgG1, IgA1 ve IgA2 gibi immünoglobülinleri de degrade eder (155).

Mantarlar, kompleman sistemini de aktive edebilmektedirler. Kompleman ürünlerinin aktivasyonu, vasküler permeabilitede değişikliklere ve lökositlerin kemotaksisine neden olabilir (113).

2-5.6.7 Patogenez

Kandidalar fırsatçı patojendir ve kandida hastalarında ortak bulgu immün sistemdeki bir defektin önceden mevcut olmasıdır. İmmün sistemi tamamen veya kısmen fonksiyon dışı bırakan sebepler sistemik ve lokal olabilir.

Örneğin kalp, göz, diş protezi veya kateter gibi uzun süre suni materyal temas eden dokularda lokal bir immün yetmezlik durumu görülebilir. Veya sigara, alkol gibi tahriş edici kimyasallar ile temas eden mukoza ve deride lokal olarak immün savunma hasar görebilir. Dolayısıyla immün savunmanın azaldığı bir dokuda kandida enfeksiyonu sürpriz olmaz (8,158).

Maya enfeksiyonlarının gelişmesi için gerekli olan lokal veya genel predispozan faktörler dört kategoride sınıflandırılabilir (8).

a) Konak faktörleri: konağın fizyolojik durumundaki normal veya patolojik değişikliklerdir.
b) Diyet faktörleri: karbonhidratça zengin diyet veya vitamin eksikliği.
c) Mekanik faktörler: protez kullanımı.
d) İyatrojenik faktörler: Geniş spektrumlu antibiyotikler ve kortikosteroidlerin kullanımı, kök kanal dolgusunun maksiller sinüse taşırılması.

*Evazyon: Varyasyon, değişme.

2-5.6.8 Endodontik Enfeksiyonlarda Mantar Oranları

Mantarların endodontik olgularda kök kanalı enfeksiyonlarından tek başına sorumlu olduğuna dair bulgular vardır (85). 1981 yılında yayınlanan bir olgu raporunda *C. albicans*'ın saf kültürünün akut pulpal-alveoler selülitis'e neden olduğu bildirilmiştir (8).

Mantarlar, özellikle *C. albicans*, enfekte kök kanallarından (1), çürükten (111,156) ve periodontal ceplerden (95) izole edilebilmiştir. Tedaviye dirençli olguların kök kanallarında da sıklıkla gösterilmiştir (9,29,37,84,110). Periapikal lezyonlarla ilişkili apikal kök yüzeylerinde bulunan rezorpsiyon alanlarında da mantar hücrelerine rastlanmıştır (173). Endodontik tedavi sırasında taşırılan bazı patların maksiller sinüs aspergillusuna yol açtığı da rapor edilmiştir (174) (Tablo 9).

Tablo 9. Kök kanallarından izole edilen mantar oranları.

Primer Enfeksiyonlar	***Yıl***	***Yöntem***	***Mantar oranı***
Şen ve ark. (1)	1995	SEM	%40
Debelian ve ark. (4)	1997	Kültür	%4
Baumgartner ve ark. (82)	2000	PCR	%21
Lana ve ark. (30)	2001	Kültür	%7
Siqueira ve ark. (83)	2002	PCR	%1
Siqueira ve ark. (2)	2002	SEM	%7
Ferrari ve ark. (3)	2005	Kültür	%4
Dirençli Enfeksiyonlar			
Nair ve ark. (84)	1990	LM ve TEM	%22
Waltimo ve ark. (85)	1997	Kültür	%7
Sundqvist ve ark. (29)	1998	Kültür	%3.7
Molander ve ark. (9)	1998	Kültür	%4.2
Peciuliene ve ark. (37)	2001	Kültür	%18
Hancock ve ark. (32)	2001	Kültür	%3
Cheung ve Ho (86)	2001	Kültür	%17
Pinheiro ve ark. (90)	2003	Kültür	%4
Siqueira ve Roças (36)	2004	PCR	%9

Waltimo ve arkadaşları (85), çalışmalarında dirençli kök kanal enfeksiyonlarının %7'sinde mantar mevcudiyetini bildirmişlerdir. Konvansiyonel tedaviye yanıt vermeyen 967 apikal periodontitisli olgudan alınan örneklerde 692 (%72) olguda mikroorganizma bulunmuş, 275 olguda (%28) üreme görülmemiştir. Kültür pozitif örneklerin %7'sinden (47 örnek) 48 mantar türü izole edilmiştir. İzole edilen mantarlar 6 olguda (%13) saf kültür olarak, 41 olguda (%87) bakterilerle birlikte izole edilmiştir. Tüm izolasyonların *Candida* genusuna ait olduğu bulunmuş ve *C. albicans'*ın da en yaygın tür olduğu görülmüştür. *C. glabrata, C. guilliermondii, C. inconspicua* ve *Geotrichum candidum* da olgulardan izole edilmiştir.

Tablo 9'da elde edilen sonuçlar, mantarın tedaviye dirençli olduğunu da ortaya koyabilmektedir. Bununla beraber dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta da; kültür ekimlerinde mantarlar için seçici ortam kullanılmasıdır. Çoğu besiyerinde üreyebilmesine rağmen kullanılan besiyerinin özelliği sonucu etkileyecektir.

2-5.6.9 Dentin ve Mantarlar

Apikal periodontitisli çekilmiş dişlerde mantarların dentine tutunma ve ilerlemeleri, mikroskobik incelemeler ve *in vitro* araştırmalarla gözlenmiştir.

Bazı araştırıcılar (108,109,175), *C. albicans*'ın kolonizasyonu fazla miktarda olsa bile dentinal penetrasyonlarının zayıf olabildiğini bildirmesine rağmen bazı çalışmalarda bunun aksi belirtilip, *C. albicans*'ın dentinofilik bir mikroorganizma olarak tanımlanabileceği ileri sürülmektedir.

Şen ve arkadaşları (1) periapikal lezyonlu dişlerin kök kanallarında ve dentinal tübüllerde SEM kullanarak bakteriler ve mantarları araştırmışlardır. Araştırıcılar kök kanallarının ovoid ve hif şekilli mantarlarla enfekte olduklarını gözlemlemişlerdir. Dentini uzun süre besin kaynağı olarak kullanabilme ve farklı büyüme formlarıyla dentine invaze olabilme yeteneğinden dolayı *C. albicans*'ın dentinofilik bir mikroorganizma olarak düşünülebileceğini söylemişlerdir.

Smear tabakası varlığının, *C. albicans*'ın dentine adezyonu üzerindeki pozitif etkisi de çalışmalarda gösterilmiştir (108,176).

Başka bir çalışmalarında Şen ve arkadaşları (108), doğal olan ve kimyasal olarak modifiye edilmiş diş sert dokularında *C. albicans* üremesini incelemişlerdir. Bu çalışmalarında önceden EDTA ve sodyum hipoklorit uygulanmış ve uygulanmamış mine, sement ve dentin üzerinde mantar hücrelerinin tutunma ve üremelerine izin vermişler, mine ile sement arasında *C. albicans*'ın üremesi açısından bir farklılık bulamamışlardır. EDTA/NaOCI'nin sonuçlar üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı görülmüştür. Smear tabakalı dentin örneklerinde kolonilerin, biyofilm formunda yoğun bir hif ve mantar hücreleri içerdiği görülmüş, smear tabakası mevcudiyetinin, *C. albicans*'ın kök dentinine tutunmasını ve çoğalmasını kolaylaştırdığı öne sürülmüştür (109). Aynı çalışmada, dentin tübüllerinde hif ve blastospor formlarında Kandida hücrelerinin bulunduğu da belirtilmiştir (109).

Siqueira ve arkadaşları (177) *in vitro* bir çalışmada, farklı Kandida türlerinin dentine kolonizasyonunu incelemişler, hücrelerin çoğunlukla filament veya hif sahibi olmayan tek hücreler halinde bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bununla beraber mantarların dentin tübüllerine invazyonu hakkındaki bilgiler yetersizdir. Bu amaçla planlanmış bir çalışmada dentin tübüllerine penetrasyon mikroskobik, dentin diskleri boyunca penetrasyon ise makroskobik olarak incelenmiştir. *C. albicans*'ın dentin tübülleri içine doğru ilerleyişinin, *E. faecalis* ile kıyaslandığında düşük olduğu ancak her iki organizma da dentin disklerinde 2 mm derinliğe kadar penetre olabildiği görülmüştür (175).

2-5.6.10 Apikal Dokular ve Mantarlar

Nair ve arkadaşları (84), ışık ve elektron mikroskobu yardımıyla tedaviye dirençli ve asemptomatik periapikal lezyonu bulunan 9 dişten (4-10 yıl öncesinde endodontik tedavi yapılmış olguların %10'unu oluşturan cerrahi işlem endikasyonu bulunan dişler) cerrahi tedavi esnasında aldıkları blok biyopsileri incelemişler, 6 dişin apikal kök kanalında mikroorganizma tespit etmişlerdir. Dört dişin bir veya daha fazla tür bakteri içerdiğini, 2 dişin maya hücreleri içermediğini, bununla beraber periapikal bölgede mikroorganizma kolonilerine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Apikal periodontitisli dişlerin kök kanallarında bulunan mikroorganizmaların

morfotiplerini tanımlamak için SEM de kullanılmış (2,178), primer kök kanal enfeksiyonlu 15 dişin 1'inde maya benzeri hücre kolonileri bulunmuştur (2). Bakteriler kök kanalında fazla sayıda bulunurken, sadece bir örnekte apikal foramenin çok az dışarısında, bir örnekte ise kök kanalının orta üçlüsünde mikroorganizma gözlenmiştir (2,178).

Bir çalışmada da konservatif endodontik tedaviye direnç göstermiş olan apikal periodontitisli dişlerden cerrahi olarak uzaklaştırılan 103 periapikal granülom incelenmiştir. Histolojik kesilerle yüzey tabakalarının uzaklaştırılması sonrası, PCR tekniği ile örnekler incelenmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar, çalışılan dişlerin hiçbirinde periapikal dokularında oral mayaları gösterememişlerdir (179).

2-5.6.11 Kandidaların Eliminasyonu

Kök kanal enfeksiyonlarında bulunan *E. faecalis* ve *C. albicans* gibi inatçı mikroorganizmalar, sıklıkla konvansiyonel endodontik tedaviye dirençlidir.

Sodyum hipoklorit'in mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisi %0.5-5.25 arasındaki konsantrasyonlarda sağlanır. Geniş bir antimikrobiyal spektrumu vardır ve *C. albicans*'a karşı da etkilidir. Ferguson ve arkadaşları (164), *C.albicans*'ın irrigasyon solüsyonlarına ve lokal olarak kullanılan dezenfekte edici medikamentlere olan duyarlılığını inceledikleri çalışmalarında sodyum hipoklorit, H_2O_2, klorheksidin diglukonat'ın minimum inhibe edici konsantrasyonlarını (MIC) araştırmışlar, sodyum hipoklorit için MIC<10 μg/mL, H_2O_2 için MIC<234 μg/mL ve klorheksidin diglukonat için MIC<0.63 μg/mL değerleriyle materyallerin etkili antikandidal ajanlar olduğu sonucunu elde etmişlerdir. Sıvı kalsiyum hidroksitin ise bir etkisi gözlenmemiş, $Ca(OH)_2$ patı veya CMCP ile direkt temas ettirildiğinde bu ajanların ikisi de maya hücrelerini öldürmüştür.

Siqueira ve arkadaşları (167) *in vitro C. albicans* ile enfekte ettikleri sığır dişi dentin silindirleri üzerinde 4 farklı medikamentin (kalsiyum hidroksit/gliserin, kalsiyum hidroksit/ %0.12' lik klorheksidin diglukonat, kalsiyum hidroksit/ CPMC/ gliserin ve %0.12'lik klorheksidin diglukonat/çinko oksit) etkinliğini incelemişlerdir. *Candida albicans*'ı elimine etmek için incelenen bu preparatlardan en etkililerinin;

kalsiyum hidroksit+ CMCP+ gliserin ile klorheksidin+ZnO karışımları olduğunu bildirmişlerdir. En etkisiz preparat, kalsiyum hidroksit+klorheksidin preparatı olmuştur. Kalsiyum hidroksit+CPMC+gliserin kombinasyonunun C. *albicans*'ın yanında *E. faecalis* üzerinde de etkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır (43).

Peciuliene ve arkadaşları (37) da, enstrümantasyon sonrası 10 ml %2.5 NaOCl ve 5ml %17 EDTA ile irrigasyon yapılmış *C. albicans* bulunan kanalların hiçbirinde mayaya rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada; başlangıçta *E. faecalis*'in pozitif olduğu 20 kanalın 6'sında halen bu bakterinin bulunduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, *C.albicans*'ın *in vivo* eliminasyonu, yukarıdaki rutin uygulama ile başarılabilir gözükmektedir.

Tek seansta etkili antisepsinin sağlanması için sodyum hipokloritle irrigasyonu takiben klorheksidin veya IPI solüsyonu ile kanalların yıkanması önerilmektedir (33,37,165). Klorheksidin solüsyonu, düşük konsantrasyonda geniş spektrumlu bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve özellikle *C.albicans* üzerinde etkinliği bulunmaktadır (164). Bir çalışma (165); kanalların %2'lik klorheksidin solüsyonu ile son yıkanmasının, sodyum hipokloritle irrige edilen kontrollerden anlamlı düzeyde daha etkili sonuç verdiğini göstermiştir. Şen ve arkadaşları (180) ise EDTA'nın en yüksek, povidon iyodinin en düşük antifungal aktivite gösterdiğini, %0,2'lik klorheksidin konsantrasyonunun, EDTA ve NaOCl solüsyonları ile kıyaslandığında daha düşük antifungal etkinlik sergilediğini bildirmişlerdir.

Kalsiyum hidroksit, pat olarak direkt kontakt halinde olmadıkça *C. albicans* gibi alkali rezistant mikroorganizmalara karşı etkili değildir (111,166,168). Bir çalışmada (166), *C. albicans*'ın kalsiyum hidroksite karşı hem klinik hem de *in vitro* direnç gösteren *E.faecalis*'ten daha da dirençli olduğu bildirilmiştir. Kalsiyum hidroksit'in sodyum hipoklorit ile veya klorheksidin solüsyonu ile kombinasyonu, kalsiyum hidroksitin alkalin kapasitesini korumuş (181), dentinal tübüllerdeki dezenfekte edici etkinliğini arttırmıştır (182).

2-5.6.12 Kandida ve Sistemik Koşullar

İleri yaşlar, sigara kullanımı, Diabetes mellitus (DM), Cushing's sendromu, immün sistemin baskılanması (AIDS gibi), kanser (lösemi gibi), beslenme bozuklukları (Vit B eksikliği gibi) ve antibiyotikler gibi faktörler orofarengeal kandidozis için risk faktörlerindendir (183). Yaşam koşullarının zorlukları (stres) da immün yanıtın azalmasına neden olabilmekte ve bu yolla enfeksiyon için uygun zemin hazırlanmış olmaktadır (184). Geniş spektrumlu antibiyotikler gibi ilaçlar, lokal oral florayı değiştirerek kandidaların proliferasyonu için gerekli şartları sağlamış olurlar (185-187).

2-5.6.12.1 Kandida ve Diyabet

Kandida türleri, DM'li hastaların oral kavitelerinden sıklıkla izole edilmiştir. Bir çalışmada, insüline bağımlı (Tip I) diyabetik hastaların %77'sinin oral kavitelerinde kandida türlerinin bulunduğu bildirilmiştir (188).

Diyabetik hastalarda mayaların bulunuşuyla ilgili olarak birkaç faktör ön plana çıkmaktadır. Hastalığın tipi, süresi ve glisemik kontrolün derecesi bunlardandır. Protez kullanımı gibi bazı oral faktörler de diyabetik hastalarda maya kolonizasyonuna katkıda bulunabilmektedir (112,189).

PCR tekniği kullanılarak yapılmış bir çalışmada (189) 56 Tip I, 81 Tip II olmak üzere toplam 137 diyabetli ve 137 sağlıklı bireyin oral kavitesinden alınan gargara örneklerinde, diyabetli bireylerin 83'ünden (%60), sağlıklı bireylerin 78'inden (%57) kandida türleri izole edilmiştir. Hastalığın tipi ile kandidanın bulunuşu arasında istatistiksel olarak anlamlılık görülememiştir. Bununla beraber; kandidanın izole edildiği hasta sayısı ile hastaların yaşı, cinsiyeti, hastalığın tipi, HbA_{1c} seviyesi ve diyabetik komplikasyonlar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, protezli (tam veya parsiyel) diyabetik hastaların ağızlarında, dişli diyabetik hastaların ağızlarından daha fazla oranda *C. albicans* dışında kandida türleri bulunmuştur. Diyabetik hastalar ile

kontrol grubu arasında ise, oral mayaların bulunuşu, yaş, cinsiyet farklılıklarının istatistiksel bir anlamlılığı bulunmamıştır.

Bazı çalışmalar, oral kandida'nın bulunuşu ile diyabet hastalığının süresi ve glisemik kontrolün derecesi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildirirken (190,191), bazı çalışmalarda (189,192,193), kandidanın bulunuşu; glisemik kontrol düzeyi, hastalığın komplikasyonları, süresi, yaş ve cinsiyet ile ilişkili bulunmamıştır.

Kontrol altında olmayan diyabetin oral kandidozis ile ilişkili olduğunu (192), immün baskılanmış periodontitiste ise mayaların yüksek oranda bulunduğunu bildiren çalışmalar (194) mevcut olmakla beraber diyabet hastalarının periodonsiyumunda bu mikroorganizmanın bulunuşu ile periodontal yıkım arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma bulunamamıştır.

2-6 Diabetes Mellitus ve Ağız Diş Sağlığı

Diabetes mellitus (DM); karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasında anormalliklerle karakterize bir sendromdur. Bu durum ya tam ya da kısmi insülin eksikliğinden kaynaklanır (Tip I), veya dokunun kendi hücresel metabolik etkilerine direnci neticesinde oluşur (Tip II) (195). DM, immün sistemin birçok fonksiyonlarını da etkiler. Bu etki, gecikmiş iyileşme ve baskılanmış immün yanıt şeklinde ortaya çıkar (10). Kontrol altında olmayan DM un oral komplikasyonları kserostomi, enfeksiyon, zayıf iyileşme, ciddi çürükler, kandidozis, gingivitis, periodontal hastalık ve yanan ağız sendromudur (10). Periodontal hastalığın agresif formları artmış serum glukoz düzeyleriyle ilişkili olmakta ve özellikle kontrol altında olmayan diyabet hastalarında görülmektedir (196). Diyabetikler arasında periodontal ataşman kaybı da görülmektedir (197).

2-6.1 Diabetes Mellitus ve Periodontal Hastalık

Periodontal yıkımın diyabetli hastalarda (özellikle kontrol altında olmayan diyabetlilerde) 3 kat daha fazla olduğu (198,199) ve bu hastalarda diş kayıplarının arttığını bildiren çalışmalar vardır (195,198,200-202).

Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, anormal polimorfonükleer lökosit fonksiyonu varlığı ve bunun konak savunma mekanizmasıyla uyum içinde fonksiyon görmesi, anjiopati, değişmiş mikrobiyal flora ve normal olmayan kollajen metabolizması olabileceği düşünülmektedir (203). DM'un polimorfonükleer granülositlerin özellikle hareketlilik, tutunma, kemotaksis, fagositoz ve yok etme özelliklerinde değişiklik oluşmasında etkili olduğu bilinmektedir (204).

Genel olarak bakıldığında periodontal hastalık, özellikle kontrol altında olmayan insülin bağımsız DM'nin sık karşılaşılan bir komplikasyonu olarak düşünülebilir. Tip I diyabetli hastalarda, özellikle yaşlı diyabetiklerde, dişeti ceplerinin, marjinal alveoler kemik kaybı ile periodontal ataşman kaybının sıklıkla görüldüğü ve marjinal gingivitis prevalansının oldukça yüksek olduğu bildirilmektedir (205).

Diyabetikler, non-diyabetiklere oranla oral sağlıklarının zayıflığından (yüksek çürük insidansından ve azalmış tükürük akış hızından) daha fazla şikayet etmektedirler (199,205). Bazı çalışmalar (15,18) diyabetik hastalarda tükürük sekresyonunda azalmanın olduğunu bildirmekte, bazıları ise (14,17) stimüle edilmeyen tükürük akışına dikkati çekmektedir. Bununla beraber diyabet ile tükürük sekresyonu arasında bir ilişkinin olmadığına işaret eden araştırıcılar (16) da vardır.

Tükürükteki glukoz oranı, diyabetiklerde daha yüksektir (14). Buna rağmen tükürüğün içeriğindeki protein, amilaz, lizozim, IgA, elektrolitler, tamponlama kapasitesi ve pH üzerine yapılan araştırmaların sonuçları ise hala tartışmalıdır (15-17).

Sandberg ve arkadaşları da (205), Tip II diyabetik hastalarda diyabetik olmayan kontrol hastalarına oranla anlamlı düzeyde fazla oranda ağız kuruluğunun bulunduğunu, bununla beraber hastalığın veya metabolik kontrolün seyrinin periodontal durumla bir ilişkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Diyabetik hastalar,

kontrol hastalarına oranla daha yüksek gingival indekse ve daha yüksek ya da aynı seviyede plak indeksi düzeylerine sahiptirler (206).

2-6.2 Diabetes Mellitus ve Diş Çürüğü

Kontrol altında olmayan diyabet hastalarında çürük insidansının artmış olduğunu bildiren çalışmalar bulunmakla beraber (207,208), Finlandiya'da yapılan bir çalışma (209), Tip II diyabet hastalığının diş çürüğü prevalansı üzerinde hiçbir etkisinin bulunmadığını göstermiştir.

Diyabetiklerde çürüğe eğilimin artması veya düşmesi, direkt olarak tükürük değişiklikleriyle ilgilidir (200). Tenovuo ve arkadaşlarına göre (210), diyabetiklerin tükürüğündeki yüksek glukoz miktarı, oral kaviteye kandan sızan glukozun neticesinde meydana gelmektedir. Bazı araştırmacılar da tükürüğün akışkanlık oranı ve pH'ının diyabetiklerde azalmış olduğunu bulmuşlardır (208). Diyabetik ratların tükürüklerinde asidik ve bazik pirolin zengini proteinler gibi değişikliğe uğramış proteinlerin bulunmakta olduğunu bildiren çalışmalar da vardır (211).

2-6.3 Diabetes Mellitus ve Kök Kanal Florası

Diyabetiklerde oral mikroflora, tükürükte ve kreviküler sıvıda yüksek glukoz miktarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu hastalarda kollajen üretimine engel olan ve fibroblastların proliferasyonunu yavaşlatan bakterilerden *Capnocytophaga* ile *Staphylococcus epidermidis*'in fazla sayıda bulunduğu bildirilmektedir (200). Diyabetikler, *Prevotella intermedia*, *P. melaninogenica*, *Bacteroides gracilis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Campylobacter rectus*'un normal seviyelerinden daha fazlasına sahip olduğu bildirilmektedir (212).

Bir hipotez, diyabetik hastalardaki önemli enfeksiyonlara olan duyarlılığı, bu hastalardaki pulpa nekrozlu dişlerin kök kanal mikrobiyal tablosunun farklı

oluşuna ve diyabetiklerin daha virulent mikrobiyal profile sahip olmalarına bağlamaya çalışmaktadır (213). Bir çok çalışmada, diyabetik ve nondiyabetik hastalardaki periodontal hastalıkla ilişkili bakteriyel flora araştırılmış fakat fark bulunamamıştır. Örneğin Tip I diyabetli çocuklar ve yetişkinler sulkuler flora açısından diğer nondiyabetik akranlarıyla karşılaştırılmış fakat anlamlı bir fark bulunamamıştır (214). Bununla beraber aynı gruplar 3 yıl takip edildiğinde diyabetli grubun derin sondlama bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde *Prevotella intermedia*'da artış görülmüştür (215). İnsüline bağımlı DM'lu hastalarda sağlıklı bireylere oranla daha fazla *Porphyromonas gingivalis* bulunduğu tespit edilmiştir (216). Geleneksel yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda, başka putatif periodontal patojenler ile metabolik kontrolün seviyesi arasında ise istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır. Çalışmalarda sadece klasik sınırlarıyla birlikte geleneksel kültür yöntemleri kullanılmıştır.

Konu ile ilgili yapılmış çalışmalar incelendiğinde (10,73,200,213-221) diyabetik olan ve olmayan bireylerin kök kanal floraları üzerindeki araştırmaların devam etmesi gereği anlaşılmaktadır.

2-6.4 Diabetes Mellitus ve Periapikal İyileşme

Biyolojik temeller, DM'nin gecikmiş iyileşme proçesine neden olan periapikal immün yanıtı etkilediğini göstermektedir. Bu nedenledir ki, periapikal lezyon ve post-treatment hastalıkların diyabeti olan bireylerde olmayan bireylerden daha yüksek oranda bulunduğu düşünülmektedir (10). İnsanlarda diyabet ile apikal periodontitis arasındaki muhtemel ilişkiyi ortaya çıkarmayı amaçlayan az sayıda çalışma göze çarpmaktadır (219-221).

Segura ve arkadaşları (10), 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada 32 diyabetli (Tip II) ve 38 kontrol hastasını incelemişlerdir. Çalışmanın sonuçları tabloda gösterilmektedir (istatistiksel olarak farklı olanlar koyu yazılmıştır) (Tablo 10).

Tablo 10. Diyabetli ve sağlıklı bireylerde endodontik açıdan ağzın durumu (10).

	Apikal periodontitisli birey sayısı (%)	*Kanal tedavili dişe sahip birey sayısı (%)*	*Kanal tedavili ve apikal periodon-titisli dişe sahip birey sayısı (%)*
Diyabetik	***26 (81)***	10 (31)	7 (70)
Kontrol	***22 (58)***	16 (42)	10 (63)
Toplam	48 (69)	26 (37)	17 (65)

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, diyabetik ve kontrol grupları arasında apikal periodontitisli dişlere sahip olma açısından anlamlı fark bulunmuştur.

Britto ve arkadaşları (220), diyabeti olan ve olmayan hastalarda endodontik tedavili ve endodontik tedavisi yapılmamış dişlerin periradiküler radyolusensilerinin prevalansını inceledikleri çalışmalarında endodontik tedavisi yapılmış ve lezyonlu, endodontik tedavisi yapılmış ama lezyonsuz, endodontik tedavisi yapılmamış ve lezyonlu diş gruplarının radyografik olarak incelenmiştir. Çalışmada, tedavi sonrasında rezidüel lezyonların en fazla oranda Tip II diyabetli erkek bireylerde görüldüğü bildirilmektedir ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Bu çalışmanın amacı, Tip II diyabetli ve sağlıklı bireylerde apikal periodontitis (AP), AP bulunmayan nekroz ve sekonder kök kanal enfeksiyonu tanısı konmuş dişlerde kök kanal mikroflorasının konvansiyonel kültür yöntemiyle belirlenmesidir. Ayrıca, endodontik floranın dirençli bir üyesi olan *E. faecalis*'in görülme sıklığının kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle saptanması hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada yer alan Tip II diyabetli ve sağlıklı bireyler, Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi kliniklerine başvuran kök kanal tedavisi endikasyonu konmuş bireylerden seçildi ve her hastadan tıbbi-dental hikaye alındı (Şekil 3). Mikrobiyolojik örnek toplanacağı ve bu işlemin ek bir külfet getirmeyeceği açıklanarak hasta onayı alındı. Bu aşamada etik uygunluk için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurulu'ndan 14.12.2005 tarih, 12/06 sayılı Etik Kurul Onayı alındı.

Tip II diyabetli (DM) bireylerin, son 3 ay içerisindeki medikal durumlarını ve diyabetin kontrol düzeyini belirleyebilmek amacıyla glukozlu hemoglobin (HbA_{1C}) testi yapıldı. Bu teste ait değerler, HbA_{1C} < %6 olduğunda kontrol düzeyi "iyi", HbA_{1C} %6.1- %7.5 arasında olduğunda kontrol düzeyi "orta", ve HbA_{1C} >%7.5 olduğunda ise kontrol düzeyi "düşük" olarak sınıflandırıldı (205) ve kaydedildi. Diyabet hikayesi olmayan (sağlıklı) bireylerin de açlık kan şekeri değerleri 120 mg/dl'nin altındaydı.

Her grupta 30 örnek olacak şekilde planlanan çalışmada 2 ana grup ve 3 alt grup belirlendi. DM'li sekonder enfeksiyonlu (Grup 1c) hasta grubunda ise ancak 23 uygun diş bulundu.

Grup1. Tip II diyabetli bireyler

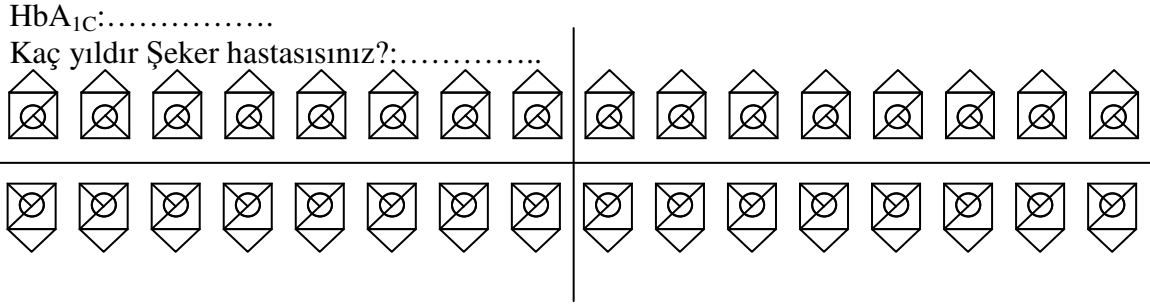
- Grup 1a. Apikal periodontitis (AP) bulunan dişler
- Grup 1b. AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişler
- Grup 1c. Sekonder kök kanal enfeksiyonlu dişler

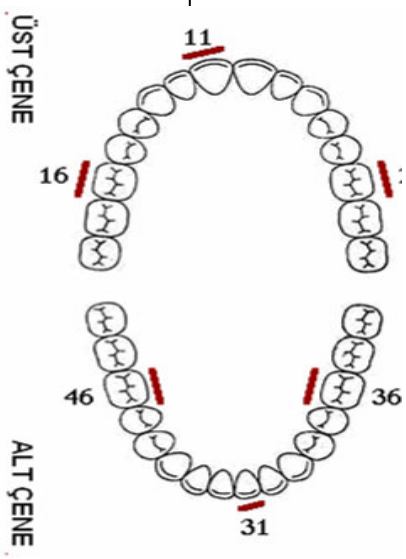
Grup2. Sağlıklı bireyler

- Grup 2a. AP bulunan dişler
- Grup 2b. AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişler
- Grup 2c. Sekonder kök kanal enfeksiyonlu dişler

Adı soyadı: Yaş: Tarih:
Doğum yeri: Cinsiyet:
Adres: tel: Eğitim durumu:
Mesleği:

Sistemik hastalıklar:……
Kullanılan ilaçlar :……
Son 3 ay içinde antibiyotik kullandı mı? Hayır ☐
HbA_{1C}:…….
Kaç yıldır Şeker hastasısınız?:……..





CI (Greene ve Vermillion)

0: Hiç diştaşı yok.
1: Supragingival diştaşı dişin 1/3'ünü örter.
2: Supragingival diştaşı dişin 1/3'ünden fazlasını örter,ancak 2/3'ünden fazlasını geçmez ve /veya küçük odaklar halinde subgingival diştaşları vardır.

3: Supragingival diştaşı dişin 2/3'ünden fazlasını örter ve /veya devamlı bir şerit halinde subgingival diştaşları vardır.

DI

0: Hiç debris ve diş renkleşmesi yok
1:Diş yüzeyinin 1/3' ünden fazlasını kaplayan yumuşak debris birikintisi var.
2: Diş yüzeyinin 1/3' ünden fazlasını ama 2/3' ünden az

kı smını kaplayan yumuşak debris birikintisi var.
3: Diş yüzeyinin 2/3' ünden fazlasını kaplayan yumuşak ikintisi var.

* Daire içindeki değerler CI, daire içinde olmayan değerler DI değerleridir.

ÖRNEK ALINAN DİŞ İÇİN

Diş No:……..
Tanı :……...
Grubu : a ☐ b ☐ c ☐
Mikroorganizma türünün sayısı:……
Mikroorganizmalar:
…… ……
…… ……
…… ……

Şekil 3. Hastalardan alınan anamnez.

Gruplara dahil edilecek hasta ve örnek alınacak dişlerde;

1. Son 3 ayda antibiyotik kullanmamış olması (26),
2. Tip II DM hastalarının, diyabet ilaçlarının yanında herhangi bir antibiyotik kullanmıyor olması,
3. Dental müdahale öncesi antibiyotik kullanımının zorunlu olduğu bir sistemik hastalığı bulunmaması (örn. Antibiyotik profilaksisi gereken hastalar),
4. Dişin devital olması,
5. Dişin önceden acil endodontik tedavi görmemiş olması,
6. Geçici restorasyonu bulunmaması,
7. Lastik örtü ile kolay izolasyon sağlanabilmesi,
8. Periapikal lezyon çaplarının, kökün 1/3' ünden az olması,
9. Kök kanallarının ağız ortamına açık olmaması,
10. Dişin tek köklü ve kanallı olması,
11. Daha önce kanal tedavisi yapılmış dişin periapikal radyolüsensi göstermesi veya semptomlu olması nedeniyle yenileme gerektiren dişler olması gibi kriterler arandı.

Çalışmamızda 59'u Tip II DM'li, 61'i sağlıklı olan 120 hastaya ait 173 farklı dişin kök kanalından mikrobiyolojik örnek alındı. Bazı hastaların birden fazla dişinden örnek alındı ve bu örnekler ilgili gruplara dahil edildi. Buna göre mevcut hasta ve diş dağılımı aşağıdaki gibi oluşturuldu.

Grup 1a. 22 farklı hastadan alınan 30 örnek,

Grup 1b. 20 farklı hastadan alınan 30 örnek,

Grup 1c. 17 farklı hastadan alınan 23 örnek,

Grup 2a. 18 farklı hastadan alınan 30 örnek,

Grup 2b. 21 farklı hastadan alınan 30 örnek,

Grup 2c. 22 farklı hastadan alınan 30 örnek.

Kök kanal örneklerinin 35'i üst santral dişlerden, 29'u üst lateral dişlerden, 19'u üst kanin dişlerden, 24'ü üst 2.premolar dişlerden, 14'ü alt santral dişlerden, 12'si alt lateral dişlerden, 21'i alt 1. premolar dişlerden, 19'u alt 2. premolar dişlerden elde edildi.

3-1 Deney Kurgusu ve Örnek Toplama Prosedürleri

İlgili dişten paralel teknik ile periapikal radyografi alındı. Örnek alınacak diş pomza ile temizlendikten sonra hastanın ağzını klorheksidin gargara solüsyonu ile (Klorheks %0.2, Drogsan, Türkiye) çalkalaması söylendi. Sodyum hipoklorit (%2.5, NaOCl) ile dezenfekte edilmiş lastik örtü, klemplerle uygulandı. Diş, lastik örtü ve klempler, %30'luk hidrojen peroksit ve %2.5'luk NaOCl ile tekrar dezenfekte edildi. Sonra, hatalı sonuçların oluşmasını engellemek için dezenfektanların etkisi %5'lik sodyum tiyosülfat ile inaktive edildi. Kanal ağızları veya mevcut kanal dolguları görülünceye kadar steril yüksek hızlı karbid frezler ile endodontik giriş sağlandı.

Daha sonra dişe göre apeksten uygun olarak belirlenen 15-25 numaralı K tipi eğe (K-file, Sjöding Sendoline, İsveç) ile Root ZX (J.Morita Corporation, Osaka, Japonya) elektronik apeks belirleyici kullanılarak dişin kanal boyu belirlendi. Kanal içerisine steril salin solüsyonu (40 µL) şırınga yardımıyla gönderildi. Dişe göre belirlenen 20-35 numaralı H tipi kanal eğesi (H-file, Sjöding Sendoline, İsveç) belirlenen kanal boyunda kök kanalı boyunca çevir-çek (reaming motion) hareketi ile kullanıldı ve dentin talaş örnekleri kök kanal duvarlarından açığa çıkarıldı. Kanal içeriği en az 3 steril kağıt koni (Paper points, Sjöding Sendoline, İsveç) ile emdirildi. Bu kağıt koniler, sapından steril tel makasıyla kesilen kanal eğesiyle beraber tiyoglikolat sıvı besiyeri (Merck & Co., Inc, Darmstadt, Germany) içerisine atıldı (Resim 1).

Aynı işlemler, kök kanalının yenilendiği olgularda (Grup 1c, 2c) da uygulandı. Bu olgularda koroner güta-perka steril Gates-Glidden frezler ile (Maillefer Instruments, Ballaigues, İsviçre), apikal kısımdaki gutta-perka ise steril H tipi eğeler yardımı ile uzaklaştırıldı. Kanal dolgusunun uzaklaştırılması esnasında hiçbir kimyasal solüsyon kullanılmadı. Kanal içerisine steril salin solusyonu (40 µL) gönderildi. Güta perkayı uzaklaştırmak için kullanılan son Hedström eğe ile aynı ebatlarda yeni bir H tipi eğe kanala yerleştirildi ve çevir-çek hareketi ile örnek alındı. Uygun ebatlarda en az 3 kağıt koniye kanal içeriği emdirildi ve bu kağıt konilerle beraber kullanılan kanal eğesi steril tel makasıyla kesilerek sıvı besiyeri içerisine atıldı.

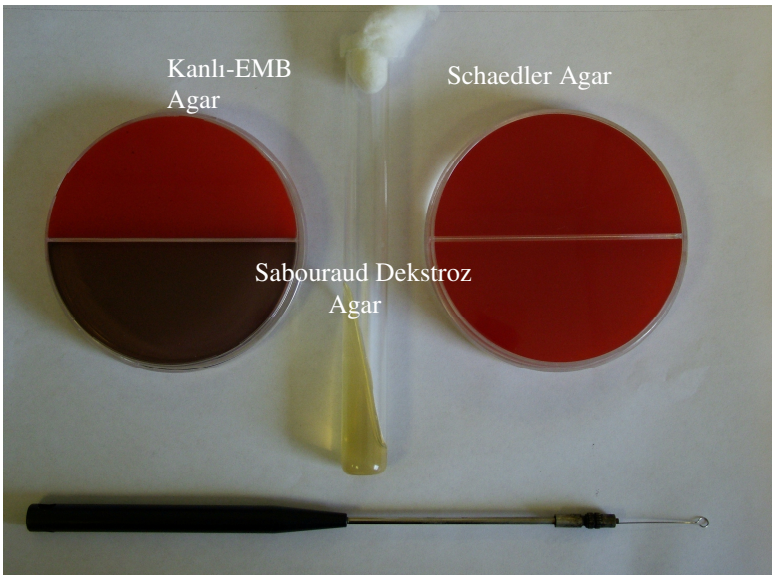
Resim1. Tiyoglikolat besi yeri.

3-2 Konvansiyonel Kültür Ekimi, İzolasyon ve Tanımlama

Tiyoglikolat besiyeri içerisindeki örnekler, anaerobik taşıma ortamı (anaerobik jar) içerisinde laboratuvara nakledildi. Anaerobik ortamın sağlanabilmesi için (%5 CO_2, %10 H_2 ve %85 N_2 Atmosferi) taşıma kabı içerisine anaerobik gaz paketi konuldu (AnaeroGen, OXOID Ltd, İngiltere), besi yerleri yerleştirildi, kapağı sıkıca kapatıldı ve 15 dakika içerisinde laboratuvara (Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Laboratuvarı) nakledildi (Resim 2).

Resim 2. AnaeroGen (solda) ve anaerobik taşıma ortamı (sağda).

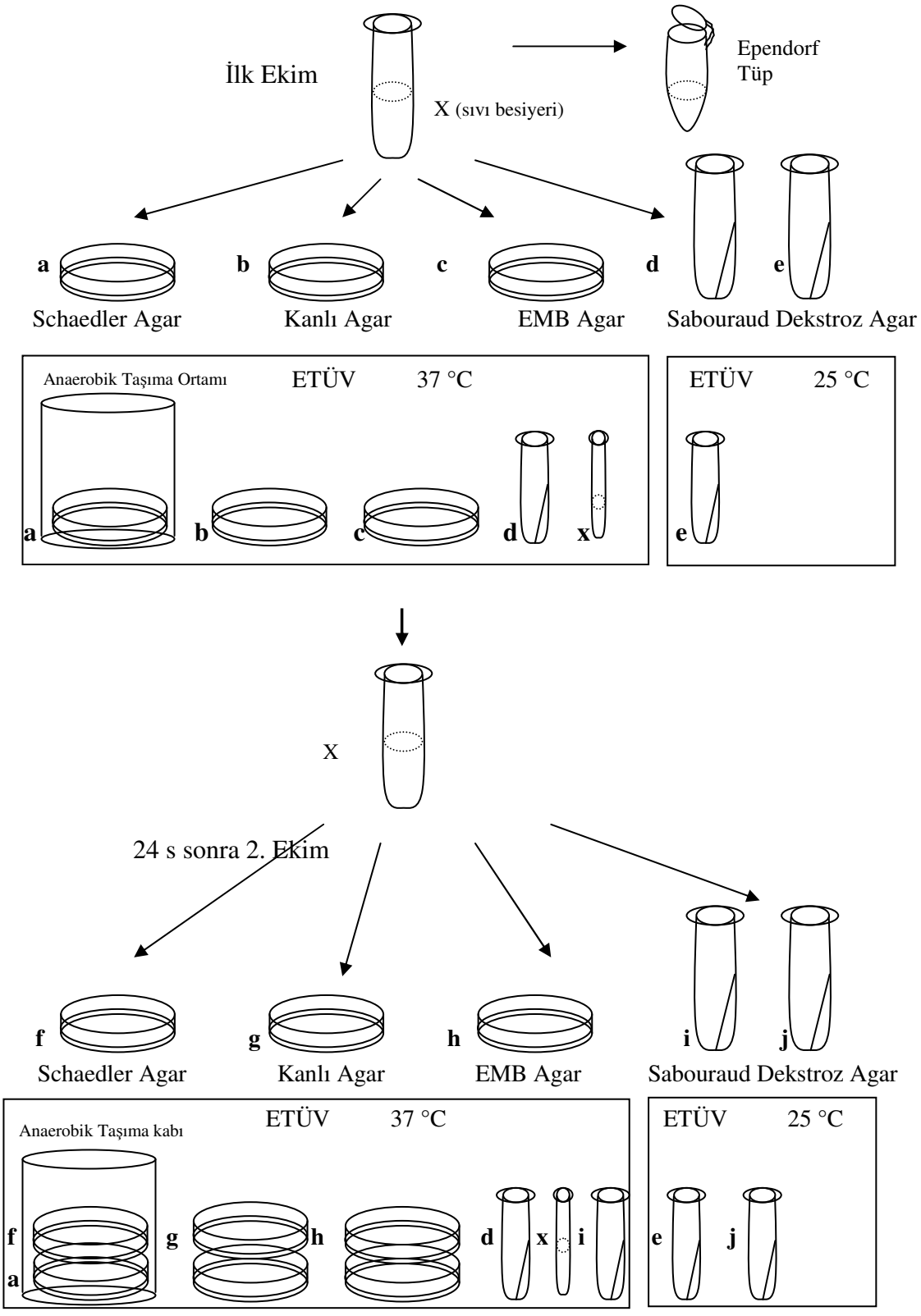
Laboratuvarda, bu örnekler tüp içerisinde 60 saniye süresince vorteks (Velp Scientifica, İtalya) yardımıyla karıştırıldı. Steril bir presel yardımıyla besiyeri tüpleri içindeki kanal aletleri ve kağıt koniler uzaklaştırıldı. Daha sonra bu tüplerden öze yardımıyla ilgili besiyerlerine hemen mikrobiyal ekim yapıldı. Anaerobik mikroorganizmalar için Schaedler agar besiyeri (BioMérieux, Marcy-L'Etoile, Fransa), aerobik ve fakültatif aerobikler için kanlı agar (Besimik, İstanbul, Türkiye) ve EMB Agar (Besimik, İstanbul, Türkiye), *Candida albicans* ve diğer mantarlar için Sabouraud dekstroz agar kullanıldı (Oxoid, OXOID Ltd, İngiltere) (Resim 3).



Resim 3. Kullanılan besi yerleri.

Ekim yapılan petriler, 37°C'de etüve kaldırıldı. Anaerobik ekimler, anaerobik taşıma kabı içerisinde (oksijensiz ortamda) 24 saat, kanlı-EMB agar petrileri anaerobik taşıma kabının dışarısında 24 saat, Sabouraud dekstroz agar petrileri ise her örnek için 25 ve 37°C olarak iki ayrı ortamda 48 saat boyunca inkübe edildi. Tiyoglikolat besiyerinden, 24 saat sonra geç üreyen mikroorganizmalar için ekimler aynen tekrarlandı. Bu ekimler, aerobik mikroorganizmalar için 3 gün, anaerobik mikroorganizmalar için 5 gün takip edildi.

PCR işlemi için, tiyoglikolat besiyerinden ilk ekimler yapıldıktan sonra, 1mL örnek alınarak steril bir ependorf tüpe aktarıldı. Bu tüp DNA ekstraksiyonu yapılıncaya kadar -20°C'de (Derin dondurucu, Arçelik, Türkiye) donduruldu. Konvansiyonel kültür işleminde örneklerin ekimi için takip edilen yol Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Konvansiyonel kültür işleminde örneklerin ekimi için takip edilen yol.

3-3 Mikrobiyal Tanımlama

Üreme saptanan örneklerden izole edilen mikroorganizmalar, boyut, şekil, kalınlık, kenar, yüzey, sertlik, yoğunluk, parlaklık, üreme özellikleri, Gram boyama, katalaz, oksidaz, koagülaz içermeleri veya hemoliz gibi ilk aşama testlerinin ardından uygun API sistemleri ile tanımlandı (Resim 4,5).

Kullanılan sistemler şunlardı:

Rapid ID 32A (BioMerieux SA, Marcyl'Etoile, Fransa): Zorunlu anaerop mikroorganizmalar için,

RapID ANA II System (Innovative Diagnostic System Inc., Atlanta, GA): Anaerobik Gram pozitif koklar için,

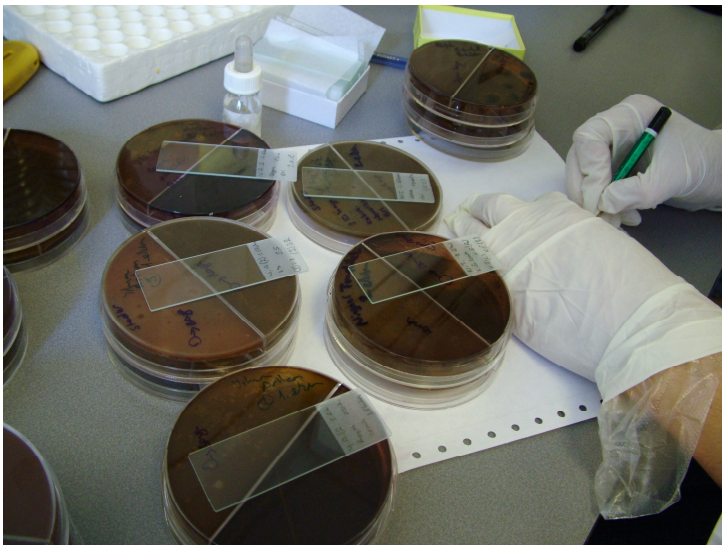
API Staph (BioMerieux SA, Marcyl'Etoile, Fransa): Stafilokok ve Mikrokok (Gram pozitif kok, katalaz pozitif) için,

Rapid ID 32 Strep (BioMerieux SA, Marcyl'Etoile, Fransa): Streptokoklar (Gram pozitif kok, katalaz negatif) için,

ID 32 E (BioMerieux SA, Marcyl'Etoile, Fransa): Enterokoklar için,

ID32 GN (BioMerieux SA, Marcyl'Etoile, Fransa): Gram negatif basiller için,

API 20 C Aux (BioMerieux SA, Marcyl'Etoile, Fransa): Mayalar için kullanıldı.



Resim 4. Koloni özelliklerinden köken alan tanımlama için hazırlık.

Resim 5. Mikrobiyolojik tanımlamada kullandığımız API sistemleri.

3-4 PCR İncelemesi İçin DNA Ekstraksiyonu

Ependorf tüp içerisindeki donmuş kök kanal örnekleri 37°C etüvde 10 dakika çözüldü ve vorteks yardımı ile 1 dakika homojenize edildi. Bu mikrobiyal süspansiyon 4500 devir/dakika'da 2 dakika süresince santrifüj edildi (MiniSpin Plus Eppendorf, Germany). Pelet kısmı hariç, süpernatant mikropipetle alınarak üzerine 200 µL ultra saf su eklendi. 4500 devir/dakika'da tekrar santrifüj edildi. Tekrar üstteki kısım (süpernatant*) alındı, dipte çöken kısım (pelet) bırakıldı. Üzerine 200 µL ultra saf su eklendi. Bu işlem her örnek için toplam 3 kez tekrarlandı. Örnekler en son santrifüjden sonra tekrar boşaltılıp 200 µL ultra saf su eklendikten sonra 10 dakika su banyosunda kaynatıldı. Daha sonra 5 dakika süresince buzda tutularak hızlıca soğutuldu. Örnekler bu sefer 4°C'de 9000G'de santrifüj (NF 800/800R, Nüve, Türkiye) edildi. PCR işlemine geçmeden önce süpernatant mikropipet yardımıyla alındı ve elde edilen her numune, PCR için steril yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.

3-4.1 PCR Uygulaması

PCR işleminde hedef mikroorganizma (*E. faecalis*) için şu primer çiftleri (Thermo Electron GmbH, Almanya) kullanıldı (36).

* Süpernatant: Presipite olmuş (çökelmiş) ve çözünmeyen katı madde üzerinde kalan sıvı kısım.

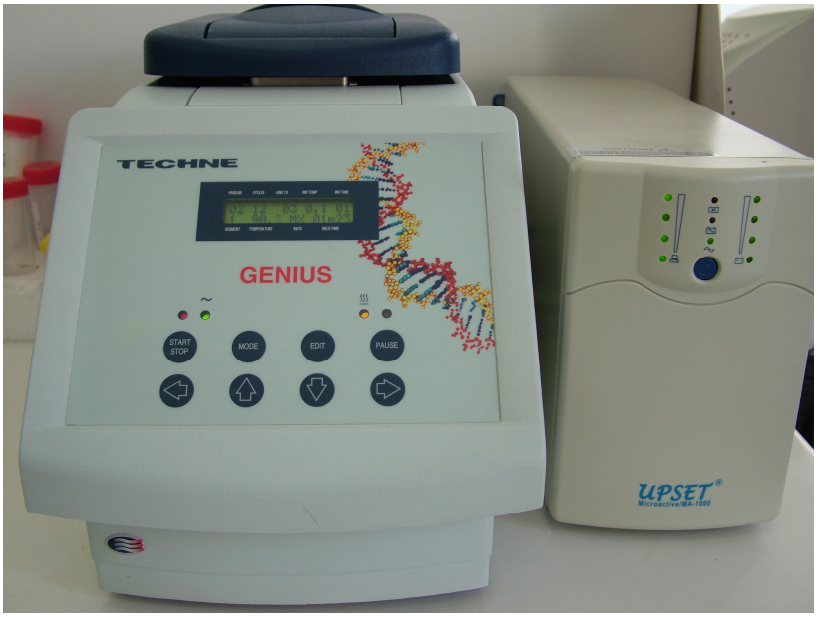
Amplikon* uzunluğu 310 bp.

5'-GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG-3'

5'-CCG TCA GGG GAC GTT CAG-3'

Karışım, şu şekilde yapıldı. 5 µL kanal örneği, 1µL her bir spesifik primerden, 5µL 10XPCR buffer (Takara Shuzo Co., Ltd., Japonya), 0.5 µL Taq DNA polimeraz (Fermentas International Inc, Kanada), 3 µL 25 mM'lık $MgCl_2$ (Fermentas International Inc, Kanada), 10mM'lık dNTP mix (Takara Shuzo Co., Ltd., Japonya) karışımından 5 µL kullanıldı. Geri kalan kısım 29.5 µL distile su ile 50 µLye tamamlandı.

PCR uygulaması, Techne Genius thermocycler (Techne Ltd, UK) cihazında yapıldı (Resim 6).



Resim 6. Çalışmamızda kullandığımız TECHNE marka PCR cihazı.

E. faecalis için ısı profili, denatürasyon basamağı 95°C'de 2 dakika, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde primer bağlanması 60°C'de 1 dakika, ekstansiyon basamağı 1 dakika, sonrasında ise ekstansiyon (uzama) basamağı 72°C'de 1 dakika olarak, final basamak ise 72°C'de 2 dakika uygulandı. Hemen Agaroz jel elektroforezi yapılamayacaksa amplikonlar -20°C'de saklandı.

* Amplikon: PCR ile çoğaltılan DNA parçası.

PCR amplikonlar, Tris-borat-EDTA buffer'da 4 V/cm'de %1.8 agaroz jel içerisinde elektroforez tankında (Biolab, Minicell®Primo EC320 Electrophoretic Gel System, Thermo Scientific, ABD) analiz edildi (Resim 7). Jel, 0.5 µg/mL etidiyum bromürle (Sigma, E-7637, Sigma-Aldrich Co, ABD) 15 dakika muamele edildi ve ultraviyole ışık altında görüntülendi (UV Transsiluminator 2000, Bio-Rad Laboratories, ABD) (Resim 8). Reaksiyonlar, uygun boyutlardaki bantların bulunması durumunda pozitif olarak tanımlandı. Boyut belirleyici olarak 100 bp DNA ladder kullanıldı.

Resim 7. Çalışmamızda kullandığımız agaroz jel elektroforez cihazı.

Resim 8. Çalışmamızda kullandığımız ultraviyole görüntüleme cihazı.

3-5 İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızda izole ettiğimiz mikroorganizmalar, Gram boyanma ve oksijen gereksinimlerine göre gruplandırılıp SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) programı yardımıyla Windows (Microsoft, USA) ortamında istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistiksel inceleme için Pearson ki-kare ($\chi 2$) testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda kök kanal örneklerini konvansiyonel kültür yöntemiyle incelediğimiz toplam 120 hastanın 64'ü erkek, 56'sı kadındı. Diyabet Tip II hastalarının (toplam 59 kişi) 36'sı erkek, 23'ü kadın, sağlıklı bireylerin (toplam 61 kişi) ise 28'i erkek, 33'ü kadındı.

Diyabetli bireyler 35-73, sağlıklı bireyler 21-82 yaş aralığında, tüm bireylerin yaş ortalaması 45.6 idi. Diyabet Tip II hasta grubunun yaş ortalaması 53.15, sağlıklı bireylerin yaş ortalaması 38.42 idi (Tablo 11). Diyabet Tip II hastalarının, ortalama olarak 7.84 yıldır diyabet hastalığı bulunmaktaydı.

DM grubu hastaların 14'ünün glukoz seviyesi (%23.72) $HbA_{1C} \leq$ %6, 25'inin (%42.37) HbA_{1C} %6.1-%7.5, 20'sinin (%33.89) HbA_{1C} >%7.5 düzeyindeydi. Dolayısıyla 59 diyabet Tip II hastasının 20'sinin diyabeti kontrol altında değildi (Tablo 12).

Konvansiyonel kültür ile toplam 173 farklı dişten alınan mikrobiyolojik örneklerde diş başına izole edilen mikroorganizma sayısı 2.89 idi. Ortalama mikroorganizma sayısı diyabetli AP'lilerde (Grup 1a) 2.73, diyabetli AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişlerde (Grup 1b) 2.93, diyabetli sekonder enfeksiyonlu dişlerde (Grup 1c) 2.86, sağlıklı AP'lilerde (Grup 2a) 2.83, sağlıklı AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişlerde (Grup 2b) 2.8, sağlıklı sekonder enfeksiyonlu dişlerde (Grup 2c) 3.2 olarak bulundu (Tablo 13).

Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen bireylerin cinsiyet ve yaş dağılımı.

	Tip II Diyabetli	**Sağlıklı**
Kadın (n)	23	33
Erkek (n)	36	28
Toplam (n)	59	61
Toplam hasta sayısı(n)	120	
Yaş Ortalaması	53.15	38.42

Tablo 12. Çalışmaya dahil edilen bireylerin diyabet kontrol düzeyine ve gruplara göre dağılımı.

HbA_{1C} Düzeyi	Grup 1a	Grup 1b	Grup 1c	Toplam
$HbA_{1C} \leq$ %6 (kişi)	6	5	3	14
HbA_{1C} %6.1- %7.5 (kişi)	11	6	8	25
HbA_{1C} >%7.5 (kişi)	5	9	6	20
Kaç yıldır diyabetli olduğu (ort)		7.84		

Tablo 13. Gruplardan izole edilen kök kanalı başına düşen ortalama mikroorganizma sayıları.

	Tip II Diyabetli			Sağlıklı		
	Grup 1a	Grup 1b	Grup 1c	Grup 2a	Grup 2b	Grup 2c
Kök kanalı başına düşen mikroorganizma sayısı (ort)	2.73	2.93	2.86	2.83	2.8	3.2
Toplam (ort)		2.84			2.94	
Toplam (ort)			2.89			

Çalışmamıza dahil ettiğimiz bireylerin OHI-S (basitleştirilmiş oral hijyen indeksi) ve DMFT indeksleri şu şekildeydi (Tablo 14).

Tablo 14. Çalışmaya dahil edilen bireylerin OHI-S ve DMFT indeksleri değerleri

	Grup 1a (n=22)	Grup 1b (n=20)	Grup 1c (n=17)	Grup 2a (n=18)	Grup 2b (n=21)	Grup 2c (n=22)
OHI-S	1.53	1.12	1.31	1.12	0.87	1.11
DMFT	12.68	10.95	8.94	9.83	9.23	6.68

Basitleştirilmiş oral hijyen skorları aşağıdaki şekilde gruplanarak incelendi (222).

İyi: 0.0-1.2

Zayıf: 1.3-3.0

Kötü: 3.1-6.0

Buna göre, Grup 1a oral hijyen bakımından “zayıf”, Grup 1b “iyi”, Grup 1c “zayıf”, Grup 2a “iyi”, Grup 2b “iyi”, Grup 2c “iyi” olarak bulundu.

OHI-S indeksinin gruplar arasında istatistiksel farklılığı bulunmadı (p=0.907). DMFT indeksleri açısından incelediğimizde de bir farklılık bulunmadı (p=0.995).

Çalışmamızda tüm gruplardan toplam 28 farklı cinse (genera) ait 69 farklı türde mikroorganizma izole edildi (Tablo 15).

Tablo 15. Gruplara göre kök kanallarından elde edilen bakteriyel türlerin prevalansı (%). En sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar kalın şekilde gösterilmiştir.

Mikroorganizmalar	Gram +/-	Oksijen Gereksinimi	Grup 1a (n=30)	Grup 1b (n=30)	Grup 1c (n=23)	Grup 2a (n=30)	Grup 2b (n=30)	Grup 2c (n=30)	TOPLAM
Actinomyces spp	+	Mikroaerofilik						4(13.3)	4(2.3)
A. naeslundii	+	Mikroaerofilik		2(6.6)	3(13)	2(6.6)		2(6.6)	9(5.2)
A. viscosus	+	Mikroaerofilik			3(13)			2(6.6)	5(2.9)
A. israelii	+	Mikroaerofilik	1(3.3)	1(3.3)	1(4.3)	2(6.6)			5(2.9)
Aerococcus viridans	+	Mikroaerofilik	1(3.3)			2(6.6)		1(3.3)	4(2.3)
Alfa hemolitik strep	+	Fakült.anaerop	1(3.3)			1(3.3)			2(1.15)
Bacillius spp	+	Aerop	3(10)		1(4.3)	2(6.6)			6(3.5)
B. lentus	+	Aerop	1(3.3)	1(3.3)		2(6.6)			4(2.3)
Bacteroides spp.	-	Anaerop	3(10)	4(13.3)	2(8.7)	3(10)	5(16.6)	1(3.3)	18(10.4)
B. distasonis	-	Anaerop					2(6.6)	1(3.3)	3(1.73)
B. gracilis	-	Anaerop	1(3.3)	2(6.6)		1(3.3)	1(3.3)	1(3.3)	6(3.5)
Bifidobacterium spp	+	Anaerop	**5(16.6)**	**6(20)**	**5(21.7)**	**8(26.6)**	2(6.6)	7(23.3)	33(19.1)
B. breve	+	Anaerop				1(3.3)			1(0.6)
Candida spp			2(6.6)	1(3.3)	2(8.7)			1(3.3)	6(3.5)
C. albicans								2(6.6)	2(1.15)
C. dubliniensis				3(10)					3(1.73)
Clostridium spp	+	Anaerop	1(3.3)	1(3.3)		2(6.6)	1(3.3)	1(3.3)	6(3.5)
Cl. Acetobutylicum	+	Anaerop	1(3.3)		2(8.7)	1(3.3)			4(2.3)
Cl. butyricum	+	Anaerop	1(3.3)	1(3.3)		1(3.3)		3(10)	6(3.5)
Cl. Clostridiforme	+	Anaerop	1(3.3)	1(3.3)		1(3.3)		1(3.3)	4(2.3)
E.coli	-	Aerop	2(6.6)	1(3.3)	2(8.7)		1(3.3)	2(6.6)	8(4.6)
Enterococcus spp	+	Fakült.anaerop		1(3.3)	3(13)		1(3.3)	1(3.3)	6(3.5)
E. faecalis	+	Fakült.anaerop			1(4.3)		1(3.3)	**8(26.6)**	10(5.8)

Tablo 15. Devam. Gruplara göre kök kanallarından elde edilen bakteriyel türlerin prevalansı (%). En sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar kalın şekilde gösterilmiştir.

Mikroorganizmalar	Gram +/-	Oksijen Gereksinimi	Grup 1a (n=30)	Grup 1b (n=30)	Grup 1c (n=23)	Grup 2a (n=30)	Grup 2b (n=30)	Grup 2c (n=30)	TOPLAM
Enterobacter spp	-	Fakült.anaerop			2(8.7)			1(3.3)	3(1.73)
E. cloacae	-	Fakült.anaerop	2(6.6)		1(4.3)	1(3.3)		1(3.3)	5(2.9)
Eubacterium spp	+	Anaerop	2(6.6)	1(3.3)		2(6.6)	1(3.3)	2(6.6)	8(4.6)
Eu. Alactolyticum	+	Anaerop						1(3.3)	1(0.6)
Eu. Lentum	+	Anaerop		2(6,6)	1(4,3)	4(13,3)	3(10)	1(3,3)	11(6,6)
Eu. Limosum	+	Anaerop	1(3,3)			1(3,3)			2(1,15)
Fusobacterium spp	-	Anaerop	1(3,3)	1(3,3)	2(8,7)	4(13,3)	4(13,3)	2(6,6)	14(8,1)
F. nucleatum	-	Anaerop	1(3,3)	2(6,6)	1(4,3)		3(10)	2(6,6)	9(5,2)
Gemella morbillorum	+	Fakült.anaerop	2(6,6)	1(3,3)		1(3,3)	2(6,6)	1(3,3)	7(4,04)
Koagülaz negatif staph.	+	Fakült.anaerop	4(13,3)	4(13,3)	4(17,4)	4(13,3)	5(16,6)	4(13,3)	25(14,5)
Lactobacillus spp	+	Mikroaerofilik	2(6,6)	**6(20)**	4(17,4)	4(13,3)	**6(20)**	4(13,3)	26(15,02)
L. acidophilus	+	Mikroaerofilik	2(6,6)	1(3,3)		1(3,3)	2(6,6)	1(3,3)	7(4,04)
L. paracasei	+	Mikroaerofilik						1(3,3)	1(0,6)
L. salivarius	+	Mikroaerofilik	1(3.3)		1(4.3)		1(3.3)		3(1.73)
Leuconostos spp	+	Aerop					1(3.3)		1(0.6)
Micrococcus spp	+	Aerop					1(3.3)		1(0.6)
Neisseria spp	-	Aerop	4(13.3)	**6(20)**	2(8.7)	3(10)	5(16.6)	4(13.3)	24(13.9)
Non E. D grubu strep.	+	Fakült.anaerop		3(10)		1(3.3)	1(3.3)	2(6.6)	7(4.04)

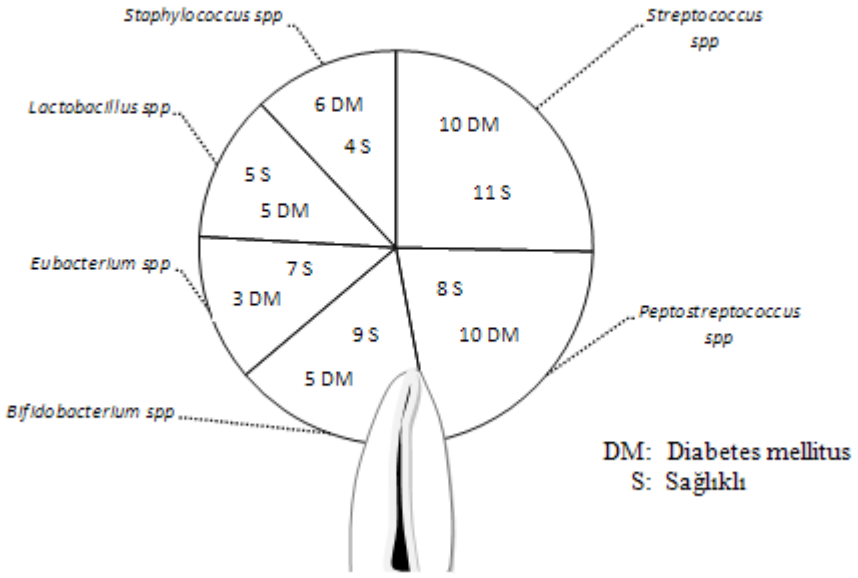
Tablo 15. Devam. Gruplara göre kök kanallarından elde edilen bakteriyel türlerin prevalansı (%). En sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar kalın şekilde gösterilmiştir.

Mikroorganizmalar	Gram +/-	Oksijen Gereksinimi	Grup 1a (n=30)	Grup 1b (n=30)	Grup 1c (n=23)	Grup 2a (n=30)	Grup 2b (n=30)	Grup 2c (n=30)	TOPLAM
Peptostreptococcus spp	+	Anaerop	4(13.3)	4(13.3)	1(4.3)	4(13.3)	**6(20)**	3(10)	22(12.7)
P. prevotii	+	Anaerop	3(10)			1(3.3)	1(3.3)		5(2.9)
P. micros	+	Anaerop	3(10)	1(3.3)		2(6.6)	2(6.6)	1(3.3)	9(5.2)
P. saccharolyticus	+	Anaerop		1(3.3)	1(4.3)	1(3.3)	1(3.3)		4(2.3)
Porphyromonas spp	-	Anaerop	2(6.6)	3(10)	1(4.3)	2(6.6)	3(10)	1(3.3)	12(6.9)
Propionibacterium spp	+	Anaerop						1(3.3)	1(0.6)
P. propionicum	+	Anaerop	1(3.3)	4(13.3)			1(3.3)	3(10)	9(5.2)
P. acnes	+	Anaerop			2(8.7)	1(3.3)		3(10)	6(3.5)
Proteus spp	-	Aerop		1(3.3)			2(6.6)		3(1.73)
Pseudomonas spp	-	Aerop			1(4.3)	3(10)		3(10)	7(4.04)
P. aeruginosa	-	Aerop			1(4.3)				1(0.6)
P. florescens	-	Aerop	2(6.6)						2(1.15)
Staphylococcus aureus	+	Fakült.anaerop	2(6.6)	4(13.3)	2(8.7)	1(3.3)	1(3.3)	1(3.3)	11(6.6)
S. lentus	+	Fakült.anaerop	3(10)	2(6.6)	1(4.3)	2(6.6)		1(3.3)	9(5.2)
S. saccharolyticus	+	Fakült.anaerop	1(3.3)			1(3.3)			2(1.15)

Tablo 15. Devam. Gruplara göre kök kanallarından elde edilen bakteriyel türlerin prevalansı (%). En sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar kalın şekilde gösterilmiştir.

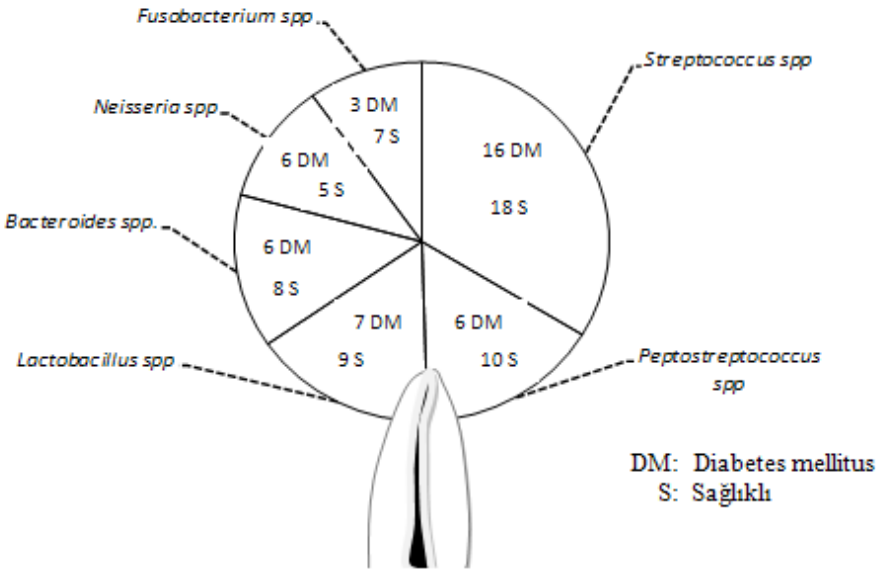
Mikroorganizmalar	Gram +/-	Oksijen Gereksinimi	Grup 1a (n=30)	Grup 1b (n=30)	Grup 1c (n=23)	Grup 2a (n=30)	Grup 2b (n=30)	Grup 2c (n=30)	TOPLAM
Streptococcus spp	+	Fakült.anaerop	3(10)	3(10)	3(13)	1(3.3)	2(6.6)	4(13.3)	16(9.24)
S. salivarius	+	Fakült.anaerop			2(8.7)				2(1.15)
S. intermedius	+	Fakült.anaerop	1(3.3)	4(13.3)	2(8.7)	3(10)	1(3.3)		11(6.6)
S. mitis	+	Fakült.anaerop		2(6.6)	1(4.3)	5(16.6)	3(10)		11(6.6)
S. mutans	+	Fakült.anaerop			1(4.3)	1(3.3)	4(13.3)	2(6.6)	8(4.6)
S. oralis	+	Fakült.anaerop	1(3.3)	2(6.6)			2(6.6)		5(2.9)
S. sanguis	+	Fakült.anaerop	2(6.6)	1(3.3)			3(10)	3(10)	9(5.2)
S. alactolyticus	+	Fakült.anaerop	2(6.6)	1(3.3)					3(1.73)
S. anginosus	+	Fakült.anaerop	1(3.3)	2(6.6)	3(13)	1(3.3)		2(6.6)	9(5.2)
S. constellatus	+	Fakült.anaerop			1(4.3)		2(6.6)	1(3.3)	4(2.3)
S. pneumonie	+	Fakült.anaerop		1(3.3)			1(3.3)		2(1.15)
Veillonella spp	-	Anaerop	4(13.3)			1(3.3)		2(6.6)	7(4.04)
V. parvula	-	Anaerop	1(3.3)						1(0.6)

Diyabetli AP'li dişlerde (Grup 1a) en sıklıkla izole edilen mikroorganizma grupları fakültatif anaeroplardan *Streptococcus spp* (%33) ve anaeroplardan *Peptostreptococcus spp* (%33) oldu. Sağlıklı AP'li dişlerde en sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar ise yine eşit oranlarda (%34) *Streptococcus spp* ve *Peptostreptococcus spp* oldu. Bu grupta en sıklıkla izole edilen diğer mikroorganizma grubunun *Bifidobacterium spp* (%30) olduğu görüldü. Her iki grubun (Grup 1a, 2a) en sıklıkla izole edilen mikroorganizmaları Şekil 5'de gösterildi.



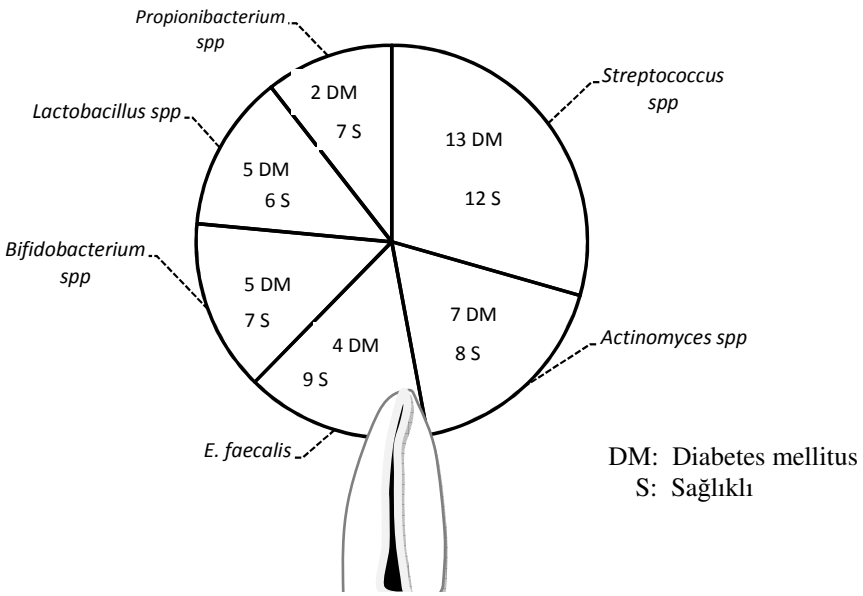
Şekil 5. Apikal periodontitisli kök kanallarında (Grup 1a,2a) en sık izole edilen mikroorganizmalar (şekilde gösterilen mikroorganizma türlerinin toplam sayıları dikkate alınmıştır, örn. *Bifidobacterium spp= Bifidobacterium spp+Bifidobacterium breve*).

Diyabetli, AP bulunmayan nekrotik pulpalı (Grup 1b) dişlerde en sıklıkla %53.3 oranında *Streptococcus spp* izole edildi. Daha sonra %23.3 oranında izole edilen *Lactobacillus spp* gelmektedir. Sağlıklı AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişlerde ise (Grup 2b) %60 oranında *Streptococcus spp*, %33 oranında *Peptostreptococcus spp* en sıklıkla izole edilen mikroorganizma gruplarıdır. Her iki grubun (Grup 1b, 2b) en sıklıkla izole edilen mikroorganizmaları Şekil 6'da gösterildi.



Şekil 6. Apikal periodontitis bulunmayan nekrotik kök kanallarında (Grup 1b,2b) en sık izole edilen mikroorganizmalar (şekilde gösterilen mikroorganizma türlerinin toplam sayıları dikkate alındı).

Diyabetli sekonder enfeksiyonlu dişlerde (Grup 1c) %56.5 oranında *Streptococcus spp* izole edildi. Bunu %30.4 ile *Actinomyces spp*, eşit oranlarda (%21.7) *Lactobacillus spp* ve *Bifidobacterium spp* takip etti. Sağlıklı sekonder enfeksiyonlu diş grubumuzda da (Grup 2c) *Streptococcus spp* %40 ile en fazla izole edilen mikroorganizma grubu oldu. Bunu %30 ile *Enterococcus spp*, %26.6 ile *Actinomyces spp* takip etti. Her iki grubun (Grup 1c, 2c) en sıklıkla izole edilen mikroorganizmaları Şekil 7'de gösterildi.



Şekil 7. Sekonder kök kanal enfeksiyonu bulunan dişlerde (Grup 1c, 2c) en sık izole edilen mikroorganizmalar (şekilde gösterilen mikroorganizma türlerinin toplam sayıları dikkate alındı).

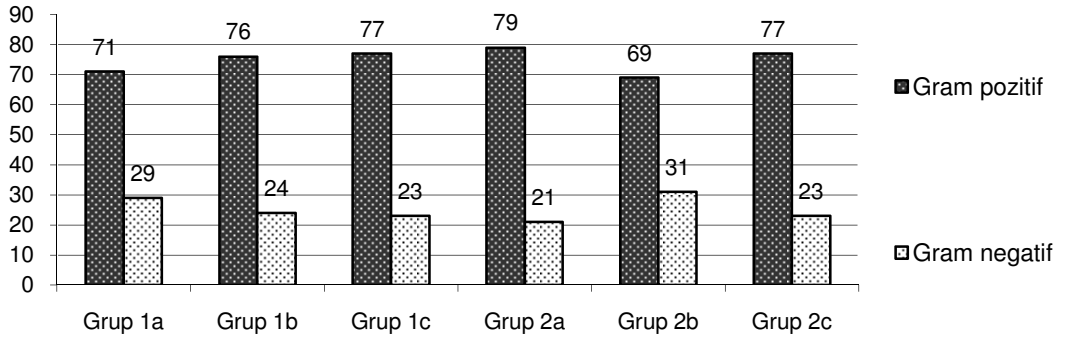
En fazla türde mikroorganizma bir dişten izole edildi ve bu dişten izole edilen mikroorganizma sayısı 7 idi. Bu diş, Grup 2c'ye aitti. Tek mikroorganizmanın izole edildiği diş ise 10 adetti.

Gram pozitif mikroorganizmaların tüm gruplarda gram negatiflerden anlamlı düzeyde fazla olduğu ($p<0.05$, Tablo 16, Grafik 1), gruplar arasındaki dağılımlarının ise anlamlı düzeyde farklı olmadığı bulundu ($p=0.173$, $p=0.368$).

Tablo 16. Mikroorganizmaların Gram boyanma özelliklerine göre dağılımları (Gram boyanma özelliğine göre diş başına düşen oran).

	Grup 1a	**Grup 1b**	**Grup 1c**	**Grup 2a**	**Grup 2b**	**Grup 2c**	**Toplam**
Gram Pozitif	57 (1.9)	64 (2.13)	49 (2.13)	67 (2.23)	58 (1.93)	72 (2.4)	367 (2.12)
Gram Negatif	23 (0.76)	20 (0.66)	15 (0.65)	18 (0.6)	26 (0.86)	21 (0.7)	123 (0.71)
Toplam	80 (2.66)	84 (2.8)	64 (2.78)	85 (2.83)	84 (2.8)	93 (3.1)	490 (2.83)

Grafik 1. Mikroorganizmaların Gram boyanma özelliklerine göre gruplara dağılımı (%).



Grup 1a'da en fazla sayıda (%41.25) mikroorganizma HbA_{1C} >%7.5 düzeyine sahip bireylerden elde edildi. Bu durum, Grup 1b'de de aynıydı ve oranı %41.6 olarak bulundu (Tablo 17). Diyabetli bireylerden izole edilen mikroorganizma sayıları HbA_{1C} seviyesi yükseldikçe artmakla beraber yapılan istatistiksel incelemede HbA_{1C} seviyesinin grupların sahip olduğu mikroorganizmaların toplamını (Tablo 16'da ara toplam) etkilemediği görüldü (Grup 1a için p=0.066, Grup 1b için p= 0.060, Grup 1c için p= 0.386).

İzole edilen mikroorganizmaları Gram boyanma özelliklerine göre ki-kare uygunluk testi ile istatistiksel olarak incelediğimizde Grup 1a'daki dişlerde diyabetin kontrol düzeyi azaldıkça Gram pozitif mikroorganizmaların sayısının anlamlı düzeyde arttığı görüldü (Gram pozitifler için p=0.034, Gram negatifler için p=0.835). Grup 1b'deki dişlerde ise diyabetin kontrol düzeyi azaldıkça Gram negatif mikroorganizmaların anlamlı düzeyde arttığı görüldü (Gram pozitifler için p=0.125, Gram negatifler için p=0.007). Grup 1c'deki olgularda diyabet düzeyiyle Gram pozitif ve negatif mikroorganizmalar arasında herhangi bir ilişki bulunamadı (Gram pozitifler için p=0.415, Gram negatifler için p=0.449).

Grup 1c'de HbA_{1C} %6.1- %7.5 düzeyinde bulunan bireylerden elde edilen mikroorganizma sayısı daha fazla olmakla beraber (%40.62) bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0.386).

Tablo 17. HbA_{1C} düzeylerine ve Gram boyanma özelliklerine göre mikroorganizma sayısı (%).

Diyabetin düzeyi	Gram boyanma	Grup 1a (n=30)	Grup 1b (n=30)	Grup 1c (n=23)
HbA_{1C} < %6 (14 hasta)	*Gram pozitif*	*11*	*14*	*12*
	Gram negatif	6	4	5
	Ara toplam	**17** (21.25)	**18** (21.42)	**17** (26.56)
HbA_{1C} %6.1- %7.5 (25 hasta)	*Gram pozitif*	*19*	*23*	*19*
	Gram negatif	11	8	7
	Ara toplam	**30** (37.5)	**31** (36.9)	**26** (40.62)
HbA_{1C} >%7.5 (20 hasta)	*Gram pozitif*	*27*	*27*	*18*
	Gram negatif	6	8	3
	Ara toplam	**33** (41.25)	**35** (41.6)	**21** (32.81)
TOPLAM		**80** (100)	**84** (100)	**64** (100)

Grup 1 a'da, Gram boyanma ve oksijen gereksinimlerine göre en sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar Gram pozitif fakültatif anaeroplar ile zorunlu anaeroplar oldu. En düşük sıklıkla Gram negatif fakültatif anaeroplar izole edildi. Grup 2a'da ise en sıklıkla Gram pozitif zorunlu anaeroplar izole edildi. Grup 1b, Grup 2b ve Grup 1c, Grup 2c'de, en sıklıkla Gram pozitif fakültatif anaeroplar izole edildi (Tablo 18).

Tablo 18. Gram boyanma ve oksijen gereksinimlerine göre mikroorganizmaların dağılımı.

	Grup 1a (n=30)	Grup 1b (n=30)	Grup 1c (n=23)	Grup 2a (n=30)	Grup 2b (n=30)	Grup 2c (n=30)
G(+) Fakültatif anaerop	23 (28.75)	31 (36.9)	24 (37.5)	22 (25.88)	29 (34.52)	30 (32.25)
G(-) Fakültatif anaerop	2 (2.5)	0 (0)	3 (4.6)	1 (1.17)	0 (0)	2 (2.15)
G(+) mikroaerofilik	7 (8.75)	10 (11.9)	12 (18.75)	11 (12.94)	9 (10.71)	15 (16.12)
G(-) Zorunlu anaerop	13 (16.25)	12 (14.28)	6 (9.3)	11 (12.94)	18 (21.42)	10 (10.75)
G(+) Zorunlu anaerop	23 (28.75)	22 (26.19)	12 (18.75)	30 (35.29)	18 (21.42)	27 (29.03)
G(+) Aerop	4 (5)	1 (1.19)	1 (1.56)	4 (4.70)	2 (2.38)	0 (0)
G(-) Aerop	8 (10)	8 (9.52)	6 (9.3)	6 (7.05)	8 (9.52)	9 (9.67)
Toplam	80 (100)	84 (100)	64 (100)	85 (100)	84 (100)	93 (100)

Gram boyanma ve oksijen gereksinimlerine göre izole edilen mikroorganizmaların gruplar arasında farkı olup olmadığına baktığımızda, hiçbir grupta fark olmadığı görüldü. Gram pozitif fakültatif anaeroplar için p=0.705, Gram negatif fakültatif anaeroplar için p=0.850, Gram pozitif mikroaerofilikler için p=0.698, Gram negatif zorunlu anaeroplar için p=0.479, Gram pozitif zorunlu anaeroplar için p=0.094, Gram pozitif aeroplar için p=0.513, Gram negatif aeroplar için p=0.649 bulundu.

Konvansiyonel kültür yönteminde elde ettiğimiz sonuçlara göre, tüm dişlerin %6.35'i (n=11) Kandida cinsi mantar hücreleri bulunduruyordu. Bu mikroorganizmaların 8'i DM'li bireylerden (%73), 3'ü sağlıklı bireylerden (%27) izole edildi. Hücrelerin 2'si Grup 1a'dan, 4'ü Grup 1b'den, 2'si Grup 1c'den, 3'ü Grup 2c'den izole edildi. İzole edilen dişlerin hepsi de farklı hastalara aitti (Tablo 19).

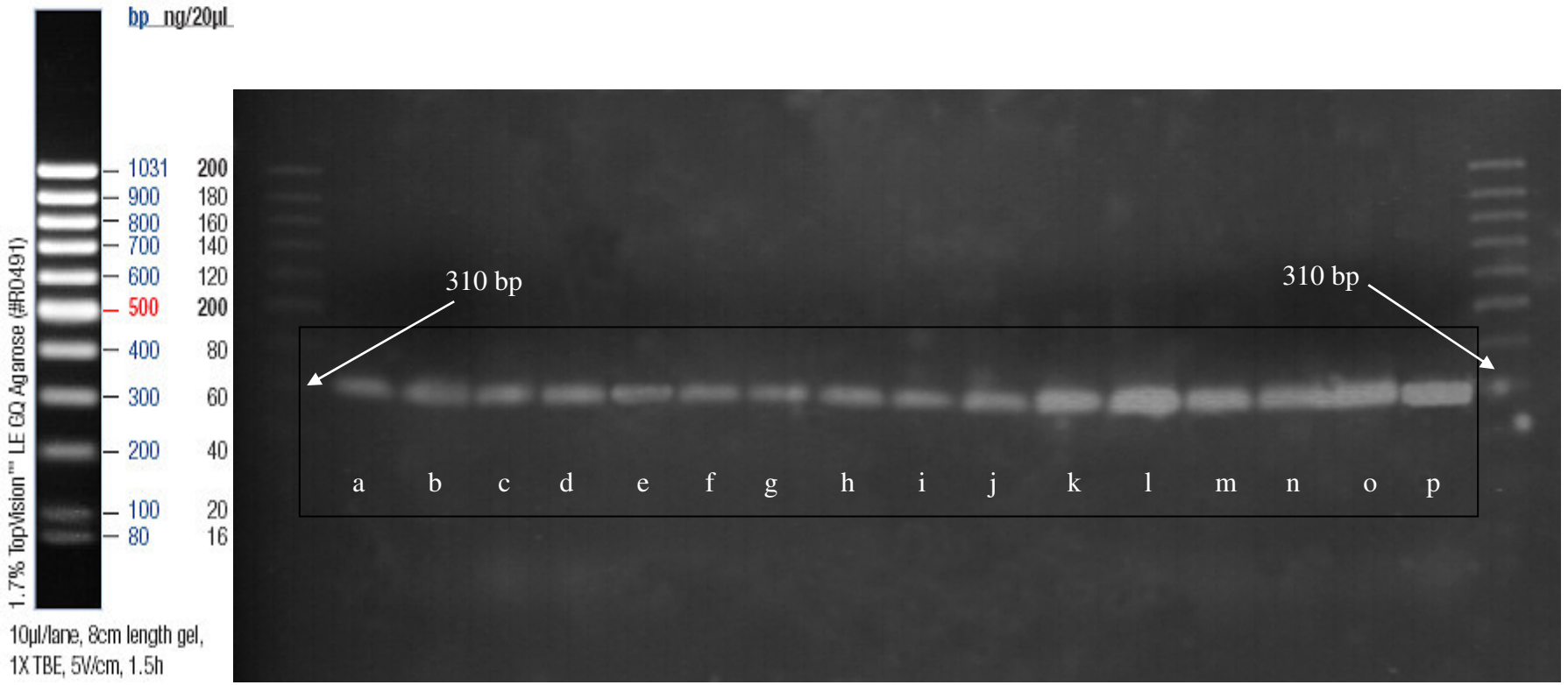
İzole edilen toplam 16 enterokok türünden 10'u, konvansiyonel kültür yönteminde *E. faecalis*, 6'sı *Enterococcus spp* olarak tanımlandı. *E. faecalis* en fazla sıklıkla Grup 2c'den izole edildi (Tablo 19).

Tablo 19. Konvansiyonel kültür yöntemiyle saptanan kandida ve enterokok türlerinin gruplara göre dağılımı. (^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p} : bkz.PCR görüntüsü, Resim 9).

	Grup 1a (n=30)	**Grup 1b (n=30)**	**Grup 1c (n=23)**	**Grup 2a (n=30)**	**Grup 2b (n=30)**	**Grup 2c (n=30)**	**Toplam (n=173)**
Candida spp	2 (6.6)	1 (3.33)	2 (8.69)	0 (0)	0 (0)	1 (3.33)	6 (3.46)
C. albicans	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (6.6)	2 (1.156)
C. dubliniensis	0 (0)	3 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (1.73)
Enterococcus spp (Kültür)	0 (0)	**1**^{a} (3.33)	**3**^{b,c,d} (13.04)	0 (0)	**1**^{e} (3.33)	**1**^{f} (3.33)	**6** (3.46)
E. faecalis (Kültür)	0 (0)	0 (0)	**1**^{g} (4.34)	0 (0)	**1**^{h} (3.33)	**8**^{i,j,k,l,m,n,o,p} (26.6)	**10** (5.78)
E.faecalis (PCR)	0 (0)	1 (3.33)	4 (17.39)	0 (0)	2 (6.66)	9 (30)	16 (9.24)

Konvansiyonel kültür yöntemine göre Grup 1c'de *E. faecalis* oranı %4.34, Grup 2c'de %26.6 bulundu. Sekonder kök kanal enfeksiyonu gruplarındaki toplam *E. faecalis* oranı ise %16.98 bulundu.

Örneklerden konvansiyonel kültür yöntemine göre izole edilen mikroorganizmalardan türü belirlenemeyen enterokoklar (*Enterococcus spp*) ve *E. faecalis* olarak tanımlananlar PCR yöntemiyle de incelendi. Kültürde *E. faecalis* olarak tanımlananların hepsi PCR yöntemiyle onaylandı (Resim 9). *Enterococcus spp* olarak tanımlanan örneklerin de *E. faecalis* olduğu görüldü. Bu durumda Grup 1c'de *E. faecalis* oranı %17.39'a, Grup 2c'de %30'a çıktı. Tüm gruplardaki *E. faecalis* oranı ise %9.24 olarak belirlendi (Resim 9).



Resim 9. PCR ile oluşan amplikonların elektroforez görüntüsü. 'a, b, c, d, e, f' hatları konvansiyonel kültür yönteminde *Enterococcus spp* olarak, 'g, h, i, j, k, l, m, n, o, p' hatları ise *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Burada örneklerin hepsinin PCR yöntemine göre *E. faecalis* olduğu görülmektedir (310 bp).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tip II diyabet hastalarının immün sisteminde birçok fonksiyonun etkilenmiş ve değişmiş olduğu bilinmektedir. Bu durum, gecikmiş iyileşme ve baskılanmış immün yanıt şeklinde ortaya çıkmaktadır (195). Kserostomi, enfeksiyon, artmış çürük insidansı, kandidozis, gingivitis, periodontal hastalık ve Burning mouth syndrome (195) gibi oral komplikasyon riskine sahip bu hastaların artmış periapikal yıkım insidansını, gecikmiş iyileşme ve baskılanmış immün sisteminin yarattığı boşluğu dolduracak olan tek silahımızın etkili kemomekanik preparasyonu takiben sızdırmaz bir kanal dolgusu olduğu gözükmektedir.

Sistemik koşulların, kök kanal florasının ana kaynağı olan oral florayı etkileyebileceğinden ve bu konuda literatürdeki bilginin azlığından yola çıkarak planladığımız çalışmada Tip II diyabetli bireylerin kök kanal florasının sağlıklı bireylerden farklı olup olmadığı incelendi.

Kullanılan Yöntem Açısından Çalışmanın Değerlendirilmesi

Kök kanallarından izole edilen mikroorganizma sayısı ve türü, kültür alma tekniğine ve örneklerin ekildiği besiyerlerine göre değişebilir. Kullanılan besiyerindeki anaerobizmin derecesi, inokulumun boyutu ve yaşı, otoklavlama süresince çoğu taşıyıcı besiyerinde anaerobik bakterilerin ölümüne neden olan toksik hidrojen peroksit ve süperoksit radikal varlığı gibi koşullar da kültür sonuçlarını etkileyebilir (77). Mantarlar, içerisinde antifungal bulunmayan neredeyse her besiyerinde (anaerobik olmamak koşuluyla) üremesine rağmen en kolay üredikleri ortam Saboraud dekstroz agardır (111,158). Bu besiyerinde pH oldukça asidik olduğu için çoğu bakterinin üremesi engellenir. Dolayısıyla konvansiyonel kültür yönteminde bazı mikroorganizmaların daha kolay üremesi ve tanımlanabilmesi için özel besiyerleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada da Saboraud dekstroz yanında anaerop mikroorganizmalar için özel olan Schaedler agar besiyeri kullanıldı (110-112,189,193).

Anaerobik mikroorganizmaların üremesi için petriler 5 gün, aerobik mikroorganizmalar için ise 3 gün süresince etüvde bekletildi ve örnekte bulunan

fakat daha yavaş üreyen mikroorganizmaların da tanımlanabilmesini sağlamak için takip edildi. Literatürde farklı inkübasyon sürelerinin kullanıldığı dikkati çekmektedir. Aerobik mikroorganizmalar için 3, anaerobik mikroorganizmalar için ise 7 (35,86) veya 14 güne kadar inkübasyon süresini kullanan araştırmacılar mevcuttur (26,90). Ancak uzayan sürenin ekim yapılan petrilerin kontaminasyon riskini arttırdığı bilinmektedir. Bu çalışmada aerop mikroorganizmalar için 3, anaerop mikroorganizmalar için 5 gün ilgili petriler takip edildi.

Kanaldan örneğin alınmasında kanallara sıvı besiyeri (33,37,86,223,224) ya da steril fizyolojik serum (26,36,38,39) gönderilip bunun kağıt konlarla emdirilmesi, kanal ağzının nitrojen gazına maruz bırakılması (90), kök kanalından eğeler yardımıyla dentin talaşının toplanması gibi yöntemler (32,64,225,226) uygulanmaktadır. Mikroorganizmaların kök kanal duvarıyla sement arasındaki mesafenin yarısına kadar penetre olabilmesi (1) nedeniyle kanal duvarlarından Hedström eğeler yardımıyla dentin talaş örnekleri toplama yolunu tercih ettik.

Bu çalışmada toplam 173 farklı dişten alınan mikrobiyolojik örneklerde kök kanalı başına izole edilen mikroorganizma sayısı 1-7 arasında değişmiş ve ortalama 2.89 olarak bulunmuştur. Diğer çalışmalarda kanal başına 4-7 farklı mikroorganizmanın bulunabileceği bildirilmiştir (26,29,87).

Çalışmaya Katılan Hasta Grubunda İntraoral ve Sistemik Koşulların Değerlendirilmesi (OHI-S, DMFT ve HbA_{1C})

Diyabetli bireylerin sistemik koşulları, ağız içi ortamın koşullarını (ağız kuruluğu, tükürük yapıtaşları, akış hızı vs) olumsuz olarak etkilemekte, bu yüzden diş çürükleri ve diş kayıpları sağlıklı bireylerden daha fazla görülmektedir. Periodontal yıkım ve periodontal ataçman kaybı da sağlıklılara oranla artmaktadır (10,14-18,195-211). Bu hastalarda, sağlıklı bireylere oranla daha fazla bulunan *S. epidermidis* ve *Capnocytophaga* türlerinin, fibroblast proliferasyonu ile kollajen yapımının inhibe edilmesinden sorumlu oldukları bildirilmiştir (227,228). Benzer koşullar, periapikal lezyonlu dişlerin endodontik tedavi sonrası prognozunu da etkileyebilir.

Hastaların DMFT indekslerinin, diyabetli ve sağlıklı bireyler arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması açısından önemli olduğu düşünülerek her hastanın DMFT indeksi değerleri elde edildi. DM'li grubun daha yüksek DMFT indeksi değerlerine sahip olduğu görüldü. Bu sonuç, diyabetli bireylerde periodontal yıkımın, periodontal ataçman kaybının, azalmış tükürük akış hızı ve tükürüğün yapısal fonksiyonlarının bozukluğu sebebiyle oluşan diş çürüklerinin ve kayıplarının sağlıklılardan daha fazla olduğunu bildiren çalışmaları desteklemektedir (10,14-18,195-211).

Tükürüğün yapısal fonksiyonlarında değişmeyle beraber periodontal sorunlar da dişler üzerinde eklenti oluşumunu (OHI-S) etkilemektedir. Bu nedenle hastaların OHI-S indeksi değerleri elde edildi ve bu değer DM'li hastalarda sağlıklı bireylerinkinden yüksek bulundu. Oral hijyen bakımından hiçbir grubumuz 'kötü' olarak sınıflandırılmadı. Bu durum, fakültemizde bölümümüze endodontik tedavi için başvuran hastaların öncelikle diştaşı temizliği ile oral hijyen motivasyonu sağlandıktan sonra tedavilerine başlanmasıyla ilişkiliydi. Literatürde, hastaların, kök kanal florasının oral hijyen düzeyini dikkate alarak incelendiği başka çalışmaya rastlanmamıştır.

OHI-S ve DMFT indeksleriyle beraber Tip II diyabet hastalarından, son 3 ay içerisindeki medikal durumlarını ve diyabetlerinin kontrol düzeyini belirleyebilmek amacıyla glukozlu hemoglobin (HbA_{1C}) test sonuçları elde edildi. Bu değerler, HbA_{1C} < %6 olduğunda kontrol düzeyi "iyi", HbA_{1C} %6,1- %7,5 arasında olduğunda kontrol düzeyi "orta" ve HbA_{1C} >%7,5 olduğunda kontrol düzeyi "düşük" olarak sınıflandırıldı ve kaydedildi (205).

Diyabetli bireylerde HbA_{1C} oranı yükseldikçe izole edilen mikroorganizma sayılarının arttığı görüldü (Grup 1c hariç). Bununla beraber elde ettiğimiz bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. İstatistiksel olarak anlamlı olmasada HbA_{1C} seviyesi yükseldikçe izole edilen mikroorganizma sayısında artış gözlenmiştir. Bu bulgu, diyabetin sistemik ve oral koşulları değiştirdiğini bildiren çalışmaların (11-18) sonuçlarını desteklemektedir.

Literatürde diyabetin varlığının ve seviyesinin, PMNL'lerin mobilitesini, adezyonunu, kemotaksisini, fagositozunu ve öldürücü etkisini etkilemekte olduğu (204,229), diyabetik koşullar altında enflamatuvar reaksiyonların daha büyük olduğu

(219), diyabetli hastaların dişeti oluğu sıvısında ve tükürüklerinde glukozun yüksek oranda bulunduğu, HbA_{1C} düzeyi yükseldikçe kontrol grubuna oranla diyabetiklerde periodontitisin daha ciddi formlarının görüldüğü bildirilmektedir (200). Klinik ve radyografik çalışmalar da, diyabetli hastalarda diyabetli olmayanlara oranla periradiküler lezyonların prevalansının daha büyük olduğunu göstermektedir (230). Fouad ve Burleson (221), DM'li hastalarda endodontik olarak etkilenmiş periodontal hastalıkların artmış olduğunu, bu hastalarda preoperatif periradiküler lezyon varlığında endodontik tedavi başarısının oldukça düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada (220) ise Tip II diyabetli erkek hastalarda endodontik tedavi sonrası rezidüel lezyon oranının kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu rapor edilmektedir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara ek olarak, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç (Grup 1c'de elde edilen sonuçlar hariç) diyabetli bireylerdeki endodontik tedavinin prognozunun sistemik (gecikmiş iyileşme) ve lokal oral koşullara (tükürük yapıtaşları) ilaveten diyabetin kontrol düzeyinden (HbA_{1C} düzeyiyle) ve mikroorganizmaların sayıca fazlalığından etkilendiği düşündürmektedir. Bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmakla birlikte Iwama ve arkadaşlarının (229) çalışması önemli bir ipucu teşkil etmektedir. 10 normal (Grup A), 20 DM'li sıçan (Grup B ve C) inceleyen araştırmacılar Grup A ve B'deki sıçanlara saf su (200 mL/kg/gün), Grup C'deki sıçanlara %30'luk sükroz solüsyonu (200 mL/kg/gün) vererek başlangıç, 2. ve 6. hafta vücut ağırlığı, glukoz toleransı, polimorfonükleer lökositlerin kemotaksisi ve anaerobik bakterilerin varlığı gibi parametreleri incelemişlerdir. Tüm gruplarda pulpektomiden önce, 2. haftada ve 6. haftalarda sıçanların vücut ağırlıkları açısından istatistiksel farklılık gözlenmediğini, ancak kan lökosit miktarının, sağlıklı sıçanlarda (Grup A) diyabetlilere oranla (Grup B ve C), glukoz düzeyinin diyabetlilerde (Grup B ve C) sağlıklı olanlara (Grup A) göre anlamlı düzeyde yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir. Kemotaksis gösteren hücre sayısının ise diyabetli olup sükrozla beslenenlerde (Grup C) sağlıklı (Grup A) ve diyabetli olup saf suyla beslenenlere (Grup B) göre anlamlı düzeyde düşük olduğunu bildirmişlerdir. Grupların hepsinde hakim mikroorganizmaların fakültatif anaerobik mikroorganizmalar olduğu, zorunlu anaerobik mikroorganizmaların ise ancak %20'lik oranı oluşturduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcılar diyabetli olup sükrozla beslenenlerde (Grup C) zorunlu

anaerobların her iki periyotta da sağlıklı (Grup A) ve diyabetli olup saf suyla beslenenler (Grup B)'den anlamlı düzeyde yüksek görüldüğü, diyabetli olup sükrozla beslenenlerdeki (grup C) zorunlu anaerobların ve Gram negatiflerin ise diğer gruplardakiler (Grup Ave B) den anlamlı düzeyde fazla olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçlara dayanarak, metabolik durumun Tip II diyabetli sıçanlarda bakteriyel enfeksiyona karşı genel konak direncini azaltabileceği ve mikrobiyal kompozisyonu etkileyebileceği düşünülebilir. Bu çalışmada, diyabetli AP'li (Grup 1a) dişlerde diyabetin kontrol düzeyi azaldıkça (diyabetin şiddeti arttıkça) Gram pozitif mikroorganizmaların, diyabetli nekrotik pulpalı dişlerde (Grup 1b) ise Gram negatif mikroorganizmaların oranının anlamlı düzeyde arttığı görüldü. Grup 1a'da elde edilen sonuç uyuşmamakla beraber, Grup 1b'de elde edilen sonuç, Iwama ve arkadaşlarının (229) elde ettikleri sonuçla paralellik göstermektedir. Diyabetli sekonder enfeksiyonlu dişlerde (Grup 1c) diyabetin kontrol düzeyiyle Gram pozitif ve negatif mikroorganizmalar arasında herhangi bir ilişki bulunmadı. Ayrıca, Grup 1c'de HbA_{1C} %6,1-%7,5 düzeyinde bulunan bireylerden elde edilen mikroorganizma sayısının daha fazla olması da istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Yamasaki ve arkadaşları (231), normal sıçanların enfekte kök kanalıyla ilişkideki periapikal dokularından elde edilen zorunlu anaerobik bakterilerin zamana bağlı olarak artmadığını, ancak Gram negatif bakterilerin 1-14 gün süresince artış gösterdiğini saptamışlardır. Bu sonuçlar, diyabetik sıçanlarda bakterilere karşı savunma görevinde fonksiyon görecek lökositlerin yeterli sayıda bulunmadığını öne süren çalışmaları (229,232-234) destekler niteliktedir.

İzole Edilen Mikroorganizmaların Gram Boyanma Özellikleri Açısından Değerlendirilmesi

Kök kanalındaki bakteriyel enfeksiyon ile diyabetin ilişkisinin incelendiği kısıtlı çalışmalardan elde edilen bulgular, bir sonucun ortaya çıkmasına yardımcı olmaktan uzaktır ve elde ettiğimiz sonuçları karşılaştırılacak çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Diyabetli bireylerde diyabetin kontrol düzeyiyle kök kanal florası ve bu floranın Gram boyanma özelliğiyle ilişkisinin incelendiği başka çalışmaya

rastlanmadı. Sonuçlar, DM'li bireylerin apikal periodontitisli dişlerindeki Gram pozitif mikroorganizmaların, artan HbA_{1C} düzeyi ile, bu bireylerdeki apikal lezyonların iyileşmesinin ya çok geç olduğunu ya da tam olarak hiç gerçekleşmediğini bildiren çalışmaları (10,219-221) desteklemektedir. Chavez Le Paz ve arkadaşları (235) Gram negatif mikroorganizmaların endodontik tedavi prosedürlerine Gram pozitif mikroorganizmalardan daha duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Bu nokta, kök kanallarında mevcut mikroorganizmaların Gram boyanma özelliklerine göre uygulanacak olan endodontik prosedürün (örn. kanal dezenfektanı) değişmesine kaynak teşkil edebilir. Gram pozitif mikroorganizmaların Gram negatiflerden daha dirençli olarak ortaya çıkmaları, hücre duvarı yapılarıyla, hücre duvarındaki glikopeptit yapılarıyla, sekrete ettikleri metabolik ürünlerle ilişkili olabilir (236). Gram negatif bakteriler, hücre duvarı olarak daha kompleks bir yapıya sahiptir. Dolayısıyla Gram pozitif mikroorganizmaların, kök kanal florasında hakim türler olarak ortaya çıkmasında bu özelliklerin etkili olduğu düşünülmektedir (237).

Bu çalışmada da, bu bilgileri destekler nitelikte tüm gruplarda Gram pozitif mikroorganizmalar floraya hakim grup olarak dikkati çekmiştir. Sydney ve Estrela (238) da, Gram pozitif mikroorganizmaların kemomekanik preparasyona daha dirençli olduğunu vurgulamış ve özellikle *Peptostreptococcus prevotii* ve *Clostridium histolyticum*'un baskınlığına dikkati çekmiştir. *P. prevotii,* bu çalışmada diyabetli bireylerde sadece apikal periodontitisli kanallardan (Grup 1a) izole edildi. Sağlıklı bireylerden ise AP'li (Grup 2a) ve AP bulunmayan nekrotik pulpalı (Grup 2b) dişlerde eşit oranlarda elde edildi.

Daha ileri ve hassas çalışmalar gerekmekle birlikte, Gram pozitif mikroorganizmaların, diyabetli bireylerin apikal periodontitisli dişlerinde diyabetin kontrol düzeyiyle pozitif ilişkide olması, bu bireylerdeki lezyonların prevalansının yüksekliğinin (10) ve iyileşme oranının kontrol grubundaki bireylerden daha düşük olmasının (220) altında yatan sistemik bir faktör olarak düşünülebilir.

Primer Endodontik Enfeksiyonlu Grupların Değerlendirilmesi

Primer endodontik enfeksiyonlu tüm gruplarda (Grup 1a, 1b, 2a, 2b) zorunlu anaerob mikroorganizmaların baskınlığı dikkati çekmiştir. Bu durum, zorunlu anaerobların, besin, düşük oksidasyon-redüksiyon potansiyeli, pH, ısı ve bakteriyel ilişkiler açısından ekolojik üreme koşullarına uygun ortamı sağladıklarını göstermektedir (7,26,92). Sundqvist (77) bu tür olguların fazla sayıda siyah pigmente Gram negatif anaeroplar içermekte olduğunu bildirmiş, Lana (30) ise Gram negatif anaerobların oranını %29 olarak açıklamıştır. Bu çalışmada Gram negatif zorunlu anaeroblar diyabetli bireylerin apikal periodontitisli dişlerinde (Grup 1a) %16.25, AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişlerinde (Grup 1b) %14.28, sağlıklı bireylerin apikal periodontitisli dişlerinde (Grup 2a) %12.94, AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişlerinde ise (Grup 2b) %21.42 oranlarında elde edilmiştir. Chu ve arkadaşları (239) primer endodontik enfeksiyonlu (apikal periodontitisli) dişlerde Gram negatif zorunlu anaerobların oranını %42, Gram pozitif zorunlu anaerobların oranını %27, Gram pozitif fakültatif anaerob oranını %21, Gram negatif fakültatif oranını %10 bulmuşlardır. Waltimo ve arkadaşları (240) ise %34 Gram pozitif fakültatif, %34 Gram negatif anaerop elde etmişlerdir. Bu çalışmada diyabetli primer endodontik enfeksiyonlu dişlerde (Grup 1a,1b) %41.6 (25/60) oranında, sağlıklı bireylerde ise %48.3 (29/60) oranında Gram negatif zorunlu anaerop mikroorganizma görüldü (bkz.Tablo 18). Bu sonuçlar, yukarıdaki çalışmaların sonuçlarıyla uyuşmaktadır.

Diyabetli ve apikal periodontitisli kanallarda (Grup 1a) eşit sayıda Gram pozitif fakültatif anaerop ve Gram pozitif zorunlu anaerop mikroorganizma saptandı (n,%= 23, 28.75). Apikal periodontitisli sağlıklı bireylerde ise Gram pozitif fakültatif anaerop oranı (n=22) %25.88, Gram pozitif zorunlu anaerop oranı (n=30) %35.29 bulundu. Sonuçlar, diğer çalışmalarla (7,26,30,77,93,239,240) paralellik göstermektedir.

Diğer yandan fakültatif anaerobik bakterilerin bu olgularda genellikle azınlıkta olduğu ve tedaviye dirençli vakalarda hakim bulunduğu da bildirilmiştir (9).

Kök kanal florasında fakültatif mikroorganizmalardan Streptokokların söz sahibi olduğu görüldü. Streptokoklar; diğer mikroorganizmalar, tükürük komponentleri, konak hücre, ekstraselüler matriks veya serum komponentleri gibi

oral kavitede yaygın olarak bulunan substratlara yapışmalarını sağlayan çeşitli yüzey protein adezinleri salgılar. Bu nedenle, oral kavitenin bakteri kolonilerinin birincil üyelerindendir (6). Bu da çalışmamızda streptokokların yüksek oranda izole edilmesini açıklamaktadır. Ayrıca, zorunlu anaerop bakterilerin *Streptococcus* gibi bazı fakültatiflerle beraber primer enfeksiyonlarda tipik olduğu bildirilmektedir (37).

Çalışmamızda tüm gruplarda yüksek oranda karşılaştığımız diğer bir mikroorganizma ise koagülaz-negatif stafilokoklardı. Bu gruptan *Staphylococcus saprophyticus* ve *Staphylococcus haemolyticus'*un klinik olarak en sıklıkla karşılaşılan türler olduğu bildirilmiştir (86). Koagülaz-negatif stafilokoklar genellikle non-patojenik olarak bilinir (19-21,23). *S. epidermidis*, immün sistemi baskılanmış kişilerde ve ortak kullanılan ortamlardan kaynaklı hastane enfeksiyonlarının yayılmasında söz sahibidir (86). Bu grup mikroorganizmalar bu yüzden pulpal ve periapikal hastalıklara veya persiste periapikal lezyonlara neden olan ana etkenlerden biri olarak düşünülmemekte (9,29), ancak başarısız endodontik vakaların kök kanallarında (9), kök apekslerinde (147) ve nekrotik dişlerden alınan örneklerde (86) bulunmaktadır.

Periapikal lezyonu bulunmayan nekrotik pulpalı dişlerden oluşan gruplar incelendiğinde (Grup 1b, 2b), her iki grupta da Gram pozitif fakültatif anaeropların floraya hakim olduğu görüldü. İkinci sırada ise her iki grupta da Gram pozitif zorunlu anaerop mikroorganizmalar baskın olarak görünmekteydi. Diyabetik hastaların AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişlerinden (Grup 1b) zorunlu anaeroblar %40.47 oranında, sağlıklılarda ise %42.84 oranında izole edildi. Bu sonuç, primer enfekte kök kanallarında (nekrotik dişlerde) zorunlu anaerobların florada hakim mikroorganizmalar olarak bulunduğu bildiren çalışmalarla uyuşmamaktadır (9,29,37,90,91). Bu tür vakalardan izole edilen bakterilerin genellikle *Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, Actinomyces*, fakültatif Streptokoklar*, Peptostreptococcus, Lactobacillius* ve *Eubakterium* genusuna ait olduğu bildirilmektedir (81,92-94). Bu çalışmada da *Porphyromonas, Fusobacterium,* Streptokoklar, *Peptostreptococcus, Lactobacillius* türlerinin sağlıklı ve diyabetli nekrotik pulpalı diş gruplarında diğer gruplardakinden daha fazla bulunduğu görülmüştür. Pulpanın histopatolojik incelemesinin yapıldığı bir çalışmada (241) Tip II diyabetli 7 hastadan çekilen çürüksüz dişlerin pulpası, 13 sağlıklı bireyin

pulpasıyla karşılaştırılmış, diyabetli bireylerin periodontal dokularında görülen anjiyopati ve bazal membranda kalınlaşmanın, pulpada da izlendiği bildirilmiştir. Diyabetli bireylerin pulpasının merkezinde, geniş ve az sayıdaki kan damarları sağlıklı bireylerin pulpalarında görülmemiş, her iki grubun pulpasında kalsifikasyon izlenmiş fakat diyabetiklerin pulpasındaki kalsifikasyonların daha sık ve orak şekilli olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise diyabetli 21 dental pulpa ile sağlıklı 20 dental pulpanın histopatolojik incelemesinde vasküler bir değişiklik izlenmemiş ancak diyabetli bireylerin pulpalarında şekilsiz kalsifiye kitlelerin mevcut olduğu bildirilmiştir (242). Diyabetiklerin dişetinde lümen daralmış, damar duvarının da kalınlaşmış olduğu gözlemlenmiştir (242). Diyabetli bireylerde, yaşa da bağlı olmakla birlikte, pulpada obliteratif endarterit sonucu sınırlı kollateral sirkülasyonun oluştuğu, PMNL inhibisyonuna bağlı nekroz ve enfeksiyon eğiliminin arttığı rapor edilmiştir (243). Bu hasarlı vaskülaritenin, pulpal dokunun beslenmesini ve tamirini de etkilediği, hatta ilerde anaerobik ortama kolayca dönüşecek olan mikroaerofilik bir ortamın gelişmesine zemin hazırlayabileceği ileri sürülmüştür (219).

Kök kanal florasında bulunan mikroorganizmalar oksijen gereksinimine göre karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla beraber diyabetli grupta (Grup 1b) sağlıklılara (Grup 2b) oranla daha çok Gram pozitif zorunlu anaerop ve Gram pozitif mikroaerofilik bakteri izole edildi. Bu durum mikroaerofilik ve anaerobik ortamın diyabetik hastalarda daha erken oluşmaya başlamasından kaynaklanmış olabilir.

Gomes ve arkadaşları (26) sekonder enfeksiyonlu 19 dişin hiçbirinde (%0) *Bacteroides* türü mikrorganizmaya rastlamazken, nekrotik pulpalı dişlerde %7.31 oranında (41 dişin 3'ünde) bu bakteri türüne rastlamışlardır. Çalışmamızda da benzer şekilde sağlıklı bireylerin nekrotik pulpalı dişlerinde (Grup 2b, 30 dişin 8'inde, %26.6) sekonder enfeksiyona oranla (30 dişin 3'ünde, %10) daha fazla *Bacteriodes* türüne rastlanmıştır. Sekonder enfeksiyonlu ve AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişler arasındaki benzer karşılaştırma diyabetik hastaların kök kanallarında yapıldığında nekrotik dişlerde (Grup 1b) %20 (30 dişin 6'sı), sekonder enfeksiyonlu dişlerde (Grup 1c) %8.7 (23 dişin 2'si) olarak bulunmuş ancak aynı kıyaslamanın yapıldığı başka çalışmaya rastlanmamıştır.

Fouad ve arkadaşları (73), 18 sağlıklı ve 6 diyabetli bireyin apikal periodontitisli ve periapikal radyolusensi göstermeyen nekrotik pulpalı dişlerinde endodontik açıdan önemli olan 10 mikroorganizmayı PCR tekniği kullanarak incelemişler, Enterokokların sadece sağlıklı bireylerin %14'ünde bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise konvansiyonel kültür yöntemine göre Enterokokların pozitif olduğu örnekler PCR ile incelendi ve primer enfeksiyonlardaki toplam Enterokokların oranı %2.5 (120 dişte 3 adet), diyabetli bireylerde %3.3 (30 dişte 1 adet), sağlıklı bireylerde %6.6 (30 dişte 2 adet) olarak bulundu. Demografik, coğrafik ve diyet alışkanlığındaki farklılıkların yanısıra bu çalışmada kültür yönteminde Enterokokların pozitif olduğu örneklerin PCR ile incelenmiş olması da çalışmaların sonuçlarını farklı kılmış olabilir. Aynı çalışmada Fouad (73) *Porphyromonas*'ların DM'li hastalarda (istatistiksel olarak anlamlı olmayan) artış gösterdiğini belirtirken çalışmamızda gruplar arasında sayısal benzerlik dikkati çekmektedir. Araştırıcı, özellikle semptomatik dişlerde bulunduğu düşünülen *F. nucleatum* (%82), *P.micros* (%50) ve *Streptecoccus* (%41) türlerinin, bu 10 mikroorganizma arasında en yüksek orandaki mikroorganizmalar olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada diyabetik ve nondiyabetik örneklerde, mikroorganizma sayıları açısından farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum diyabetin tipi ile glisemik kontrolün derecesinin parametre olarak incelenmemiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Bizim sonuçlarımıza göre de *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* ve *Streptococcus* türleri en çok izole edilen mikroorganizmalardan olmuştur. Ancak kültür yöntemi kullanıldığından ve örnek sayısının farklılığından dolayı elde edilen oranlar benzer değildir. Bu çalışmada *P. micros* %6.6, *Peptostreptococcus spp* %15, *F. nucleatum* %5, *Fusobacterium spp* %8.3, *Streptococcus* türleri %45.8 oranlarında elde edildi. Aynı araştırıcının bir başka çalışmasında (218) diyabetli ve sağlıklı toplam 22 bireyin 16 sında (%73, sağlıklıların %60'ında, diyabetlilerin %75'inde) *Eubacterium* türleri pozitif bulunmuş, bunların 9'unun (%56), *E. infirmum* olduğu ve diyabetlilerde sağlıklı bireylere oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulunduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda böyle bir ilişki saptanmadı. Sundqvist (94) de, 65 hastanın kültür yöntemiyle inceledikleri enfekte kök kanallarında %33 oranında *Eubacterium spp* bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmanın primer enfeksiyonlu dişleri içeren

gruplarında ise *Eubacterium*'ların sağlıklılarda (Grup 2a,2b) görülme oran %18, diyabetlilerde (Grup 1a,1b) %10'dur.

Periodontal açıdan incelendiğinde de benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir. Yuan K ve arkadaşları (217) *A. actinomycetemcomitans, F. nucleatum, E. corrodens, P. gingivalis* ve *P. intermedia*'nın diyabetli ve sağlıklı bireylerin periodontal olarak hastalıklı/enfekte bölgelerindeki prevalansını karşılaştırdıkları çalışmalarında *P. gingivalis* ve *E. corrodens*'in oranının Tervonen (244) ve Mandell (212)'in daha önceden kültür yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmalarında elde ettikleri oranlardan daha yüksek oranda bulunduğunu bildirmişler, bunu uyguladıkları PCR yönteminin daha fazla duyarlı olmasına ve hastalarının oral hijenlerinin daha kötü olmasına bağlamışlardır. Yuan K ve arkadaşları (217), incelenen bu 5 mikroorganizmanın diyabetik ve diyabetik olmayan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığının bulunmadığını bildirmişlerdir. Araştırıcılar, çalışmada sağlıklı ve diyabetli gruplar arasında yaş, cinsiyet, gingival indeks, plak indeksi, sondlama derinliği ve ataşman düzeyi, diyabetin süresi, tipi ve metabolik kontrolünün seviyesi açısından da fark görememişlerdir.

Sekonder Endodontik Enfeksiyonlu Grupların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada diyabetli ve sağlıklı bireylere ait sekonder enfeksiyonlu kök kanallarından (Grup 1c, 2c), kök kanalı başına elde edilen mikrorganizmaların sayısı Gram pozitif ve fakültatif anaerop mikroorganizmalar baskın olmak üzere kanal başına Grup 1c'de 2.86, Grup 2c'de 3.2' dir. Aynı ön tanıya sahip dişler için Cheung ve arkadaşları (86) bu oranı 2,9 olarak bildirmiştir. Literatürdeki çalışmalarda böyle dişlerde kanal başına 1-2 tür mikroorganizmanın bulunduğu ve bizim çalışmamızı destekler mahiyette Gram pozitiflerin ve fakültatif anaeropların hakim mikroorganizmalar olduğu görülmektedir (9,26,37,90,91).

Grup 2c'de Gram pozitif zorunlu anarop mikroorganizmaların floranın ikinci hakim türü olduğu göze çarpmaktadır. Sonuçlarımız, bu konuda yapılmış çalışmalarla da paralellik arz etmektedir (7,9,26,29,37,77,78,88,90). Pinheiro ve arkadaşları (90) persiste periapikal lezyonu bulunan 60 kök kanal dolgulu dişin

mikrobiyolojik olarak inceledikleri bir çalışmada, izole edilen türlerin %57,4'ünün fakültatif anaerop, %42,6'sının ise zorunlu anaeroplardan oluştuğunu ve Gram pozitif türlerin %83,3'lük bir oranla en hakim grup olduğunu bildirmişlerdir. Molander ve arkadaşları (9) da sekonder enfeksiyonlu kök kanallarında yaptıkları çalışmada izole edilen mikroorganizmaların %69'unun Gram pozitif fakültatif anaerop mikroorganizmalardan oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Sunde ve arkadaşları (146) ise, endodontik tedaviye cevap vermeyen dirençli apikal periodontitisli ve periapikal lezyonlu dişlerden izole edilen mikroorganizmaların ortalama yarısının (%51) anaerobik mikroorganizmalardan ve floranın %79,5'inin Gram pozitif türlerden oluştuğunu bildirmişlerdir.

Sekonder enfeksiyona bağlı endodontik tedavinin başarısızlığının nedeni intraradiküler enfeksiyon, yabancı cisim reaksiyonları, kolesterol kristalleri içeren kistler gibi faktörlerin yanı sıra (29,32,84,90,98-101,245) özellikle *Actinomyces israelii* ve *Propionibacterium propionicum* türleriyle ilişkili ekstraradiküler enfeksiyon (104) olarak kabul edilmektedir. Bizim çalışmamızda da *Actinomyces* türlerinin primer enfeksiyonlardan çok sekonder enfeksiyonlardan (Grup 1c,2c) izole edildiği görülmüştür. *Actinomyces* türleri ve *Propionibacterium acnes* en çok sekonder enfeksiyonlu dişlerde gözlenmiştir. *Pseudomonas aeroginosa* ise tek bir diyabetli sekonder enfeksiyonlu dişten izole edilmiştir. Tronstad ve arkadaşları (246) da sekonder enfeksiyonlu dişlerden kök ucunun rezeksiyonu sırasında kazıma yoluyla aldıkları tüm örneklerde *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Actinomyces* türlerinin, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* ve *Pseudomonas aeroginosa'*nın bulunduğunu bildirilmişlerdir. Ancak farklılıkların cerrahi yollarla alınan kültür örneklerinde çevre dokudan kontaminasyon ihtimalinden kaynaklandığı düşünülebilir. Abou-Rass ve arkadaşları (147), oral kaviteyle irtibatı bulunmayan (fistül, periodontal defekt, dişte çatlak-kırık) periapikal lezyonlu 13 endodontik tedavili dişin apikal bölgesinden cerrahi yöntemlerle aldıkları örneklerde fakültatif anaerobların %83.5 oranında floranın hakimleri olduklarını göstermişlerdir. Lezyon gövdesinden aldıkları 13 örneğin 5'inde *Streptococcus spp*'nin (5 örneğin 3'ünde tek başına) en hakim mikroorganizma olduğunu, apeksten aldıkları örneklerin 9'unda ise *Actinomyces* (3/13), *Propionibacterium* (2/13), *Streptococcus* (2/13) ve koagülaz negatif stafilokokların (2/13) tek başına izole edildiğini bildirmişlerdir. Bu

çalışmada da *Streptococcus*, *Actinomyces* ve *Propionibacterium* türleri sekonder enfeksiyonlu kök kanallarından (Grup 1c, 2c) en çok izole edilen mikroorganizmalardan olmakla birlikte fakültatif anaerobların florada hakim mikroorganizmalar olarak öne çıkması da sonuçlarda paralellik olduğunu göstermektedir.

Kaufman ve arkadaşları (88), periradiküler lezyonlu (36 diş) ve lezyonsuz (22 diş) endodontik tedavili dişlerdeki *Enterococcus* cinsinin prevalansını inceledikleri PCR çalışmasında 5'i lezyonsuz, 2'si lezyonlu olmak üzere 7 örnekte (%12,1) *Enterococcus* cinsi bakteriye rastlamışlar, periapikal lezyon ile *Enterococcus* mevcudiyeti arasında anlamlı düzeyde ters ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir. Elli sekiz örneğin 7'sini oluşturan diyabetik hastalardan ise enterokok izole edememişlerdir. Buna karşın Fouad ve arkadaşları (116), periapikal lezyonu bulunan sekonder enfeksiyonlu 37 vakanın 8'inde (%22), bunların 6'sını oluşturan diyabetik vakaların 2'sinde (%33) *Enterococcus* cinsi mikroorganizmanın bulunduğunu ve sağlıklı bireylerle kıyaslandığında istatistiksel bir farklılığın bulunmadığını bildirmişlerdir.

Roças ve arkadaşları (38), asemptomatik ve apikal periodontitisli 14 kök kanal tedavili dişte PCR analizine göre 10 örnekte (%71) *E. faecalis* bulunduğunu bildirilmişlerdir. *E. faecalis*'in periradiküler lezyonlu kanal dolgulu dişlerdeki varlığını inceleyen 1966 ile 2006 yılları arasında PCR ve konvansiyonel kültür yöntemleriyle yapılmış çalışmalarda görülme sıklığının % 0-77 arasında olduğu dikkati çekmektedir (9,27,29,32,36-38,86,88,90,114,116,153) (Tablo 8). Bu farklı sonuçlar, incelenen vakaların sayısına, örnek almada uygulanan yöntemlerdeki faklılıklara ve kök kanal floralarının kompozisyonunun farklı olmasına bağlı olabilir.

Çalışmamızda sekonder enfeksiyonlu vakaların %24.5'inde *E. faecalis* bulunuyordu. *E. faecalis*, diyabetli grupta (Grup 2c) en sık izole edilen mikroorganizma, sağlıklı grupta (Grup 1c) ise en sık izole edilen mikroorganizmalardan biriydi. *E. faecalis*'lerin 5'i diyabetli bireylerden (%80'i sekonder kök kanal enfeksiyonlu vakalardan), 11'i sağlıklı bireylerden (%82'si sekonder kök kanal enfeksiyonlu vakalardan) izole edildi. Örneklerden izole edilen Enterokok türü mikroorganizmaların %31.25'i diyabetli bireylerde bulunuyordu. Bu sonuç Fouad'ın (116) elde ettiği orana (%33) benzemektedir.

Sekonder enfeksiyonlarda enterokokların çoğunlukta olduğu ve rutin endodontik irigasyonda kullanılan bazı medikamentlerin enterokoklar üzerinde etkili olmadığı ortaya çıkmış ve bu nedenle bu mikroorganizmalar üzerine olan araştırmalar yoğunlaşmıştır. Mikroorganizmaların genotipik özelliklerinden tanımlandığı PCR gibi daha hassas yöntemler sayesinde enterokokların kök kanalı florasındaki oranları hakkında daha hızlı ve değerli sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Bu çalışmada da diyabetli bireylerdeki *E. faecalis* oranını net olarak saptayabilmek için konvansiyonel kültür yöntemine ek olarak PCR kullanıldı. Böylece bu sonuçların diyabetli bireylerde endodontik tedavinin başarısızlıkla sonuçlanmasının ve iyileşmedeki gecikmenin altında yatan sebebin bulunmasına katkı sağlayacağı düşünüldü. Bununla beraber PCR'ın bilinen avantajlarının yanında bazı dezavantajlarının da bulunduğu bilinmektedir. Örneğin hidroksiapatitin DNA için bağlayıcı bir yeteneğinin olduğu bildirilmektedir (245). DNA, dentin tarafından absorbe edildiği zaman bunu açığa çıkarmak zor olabilmekte (35,247), ölü bakterilerin DNA'sı koroner dentine bağlanabilmekte, bu sayede kök kanal örneği kontamine olabilmektedir. Bu, pozitif sonuç veren böyle bir DNA'nın yakalanması durumunda ilgili mikroorganizmanın kanalda örnek alındığı esnada canlı olup olmadığının bilinememesi sonucunu doğurur. Bu çalışmada biz, konvansiyonel kültür yönteminde sadece *Enterococcus spp* ve *E. faecalis*'in pozitif olduğu (tümü ortamda canlı olarak bulunmaktadır) örnekleri PCR yöntemiyle incelediğimiz için, sonuçlarımız PCR yönteminin bu dezavantajından etkilenmemiştir.

Çalışmamızda, izole edilen toplam 16 enterokok cinsi mikroorganizmanın 3'ü (%2.5) sekonder enfeksiyon bulunmayan vakalardan izole edildi. Apikal periodontitisli dişlerde (Grup 1a, 2a) *E. faecalis*'e rastlanmadı. Siqueira ve arkadaşları (31) endodontik tedavi görmemiş, periapikal radyolusensi gösteren dişler üzerinde DNA-DNA hibridizasyon tekniğiyle yaptıkları çalışmalarında tüm vakaların %8'inde *E. faecalis*'e rastlamışlar, bunların %11.5'inin kronik periapikal lezyonlu dişlerde, %3.7'sinin akut abseli dişlerde bulunduğunu bildirmişlerdir. Ferrari ve arkadaşları (3) ise apikal periodontitisli 25 dişin 3'ünde %12 oranında enterokok türleri izole etmişlerdir. Bizim çalışmamızda apikal periodontitisli dişlerde (Grup 1a, 2a) *E. faecalis*'e rastlanmaması, bu çalışmaların sonuçlarıyla uyuşmamaktadır. Apikal periodontitis bulunmayan nekrotik pulpalı dişlerde ise (Grup 1b, 2b)

diyabetlilerde 1 (Grup 1b, %3,3), sağlıklılarda 2 (Grup 2b, %6,6) enterokok türü mikroorganizmaya rastlandı. Bu gruplarda (Grup 1b, 2b) *E. faecalis* oranı %5 olarak elde edildi. Lana ve arkadaşları (30) bu bakteriyi 31 nekrotik pulpalı dişin sadece 1'inde (%3.22) saptamışlar, bu dişin kök kanalının da oral kaviteyle irtibat halinde bulunduğunu bildirmişlerdir. Literatürde *E. faecalis*'in primer enfeksiyonlu dişlerde %2-18 gibi düşük oranların yanısıra (3,26,30,31,39,69,73,240,248,249), %40 kadar yüksek oranda bulunabildiğini bildiren araştırmacılar da vardır (250). Sonuçlar, *E. faecalis*'in seanslar arasında yeterli örtüleme yapılmadığında veya fazla sayıda seans uygulanması neticesinde sekonder enfeksiyonlu dişlerden yüksek oranlarda izole edildiğini, yani bu mikroorganizmanın kök kanallarına tedavi esnasında girdiğini ileri süren araştırmaları desteklemektedir (29,100,124). Elde edilen farklı sonuçlar, örnek alımında uygulanan tekniklerin farklılıklarının yanı sıra örneğin bizim hastalarımızda olduğu gibi ağız hijyeni kontrol altında olan hasta grubunun incelenmesinden kaynaklanıyor olabilir. Kök kanal florasının incelendiği bazı çalışmaları gösteren Tablo 20, sonuçları karşılaştırmamıza yardımcı olacaktır.

Tablo 20. Son yıllarda endodontik mikroflorayı inceleyen çalışmalar ve çalışmamızla karşılaştırılması. **ND:** Sağlıklı **DM:** Diabetes mellitus **AP:** Apikal periodontitisli dişler **N:** Nekrotik pulpalı dişler **APRET:** Apikal periodontitisli kanal tedavili dişler **AAA:** Akut apikal abse.

Araştırmacı	***Yıl***	***Yöntem***	***n (kanal)***	***Hasta Grubu***	***Dişteki Tanı***	***Sonuç***
BU ÇALIŞMA	2008	Kültür-PCR (*E.feacalis)*	173	59 D, 61 ND	AP, N,RET	Sağlıklı AP'li dişlere sahip bireylerde en çok Gram pozitif zorunlu anaeroplar, %73 Candida DM'lilerde, %9.24 *E. faecalis,*
Sakamoto ve ark. (255)	2007	PCR	10	ND	AP	%30 *Bacteroides spp*, %30 *Pseudoramibacter alactolyticus,* %30 *F. nucleatum,*
Jacinto ve ark. (256)	2007	PCR	5	ND	Abseli dişler	%100 *Olsenella profusa*, %40 *P.gingivalis, Dialister pneumosintes, D. invisus, Lachnospiraceae oral klon, Staph. aureus, P.alactolyticus, P. micros ve E. faecalis*
Sassone ve ark. (257)	2007	DNA-DNA	111	ND	N	%89.3 *E. faecalis*, %89.3 *C. gracilis*, %89.3 *Leptotrichia buccalis*, %87.5 *Neisseria mucosa*, %86.6 *P. melaninogenica*, %85.7 *F. nucleatum*, %75.9 *E. saburreum*, %75 *S. anginosus*, %74.1 *V. parvula*, oral patojen olarak düşünülen bir çok bakteri primer enfeksiyondan sorumludur.
Sakamoto ve ark. (258)	2006	PCR	4	ND	AP	%100 *Bacteroides spp*, %75 *P. oralis*, %75 *Dialister spp*, %75 *Mogibacterium pumilum*
Sakamoto ve ark. (258)	2006	PCR	7	ND	Abseli dişler	%85.7 *F. nucleatum*, %57.1 *P. micros*
Jacinto ve ark. (259)	2006	Kültür	70	ND	Abseli dişler	%83 zorunlu anaerop, %47.5 gram negatif. %29 *Porphyromonas gingivalis*.
Chu ve ark. (239)	2005	Kültür	45	ND	AP	gram negatif zorunlu anaerobların oranını %42, gram pozitif zorunlu anaerobların oranını %27, gram pozitif fakültatif anaerob oranı %21, gram negatif fakültatif oranı %10 bulmuşlardır.
Chavez ve ark. (34)	2005	Kültür, GLC	100	ND	APRET	%34 *Streptococcus gordonii*, %22 *Enterococcus spp,* %21 *S. anginosus*.
Vianna ve ark. (260)	2005	Kültür, DNA Chip	20	ND	AP	Kültürde en çok *F. nucleatum, Gemella morbillorum, E. lentum*, DNA Chip ile en çok *M. Micros, F. nucleatum,T. forsythia*

Tablo 20. Devam. **ND:** Sağlıklı **DM:** Diabetes mellitus **AP:** Apikal periodontitisli dişler **N:**Nekrotik pulpalı dişler **APRET:** Apikal periodontitisli kanal tedavili dişler **AAA:** Akut apikal abse

Araştırmacı	*Yıl*	*Yöntem*	*n (kanal)*	*Hasta Grubu*	*Dişteki Tanı*	*Sonuç*
Waltimo ve ark. (240)	2005	Kültür	50	ND	AP	%34 gram pozitif fakültatif, %34 gram negatif anaerobik, %2 *E. faecalis*, %2 *C. albicans*
Kvist ve ark. (33)	2004	Kültür	96	ND	AP	%29 tek başına anaeroplar, %29 tek başına fakültatifler, %40 miks flora.
Gomes ve ark. (26)	2004	Kültür	19	ND	APRET	%75 gram pozitif, %44 fakültatif
Gomes ve ark. (26)	2004	Kültür	41	ND	N	%66 gram pozitif, %73 zorunlu anaerop
Siqueira ve ark. (36)	2004	PCR	22	ND	APRET	%77 *E. faecalis*, %9 *C. albicans*
Fouad ve ark. (218)	2003	PCR	22	17 ND, 5 DM	AP	Diyabetlilerin %75'inde *Eubacterium spp* pozitif, *E. infirmum* diyabetlilerde sağlıklılara oranla fazla (s)
Jacinto ve ark. (93)	2003	Kültür	48	ND	AP	%74.77 zorunlu anaerop, %39 gram negatif.
Pinheiro ve ark. (91)	2003	Kültür	30	ND	APRET	%80 gram pozitif, %58 fakültatif anaerop, %36.7 *E. faecalis*,%17 *P. prevotii,* %3 *C. albicans.*
Pinheiro ve ark. (90)	2003	Kültür	60	ND	APRET	%45 *E. faecalis*, %3.3 *C. albicans,*%83 gram pozitif, %57.4 fakültatif anaerop
Sunde ve ark. (146)	2002	Apikal bölge-den cerrahi ile kültür.	36	ND	APRET	%51 zorunlu anaerop, %80 gram pozitif, %5.5 *C. albicans*.
Fouad ve ark. (73)	2002	PCR	24	18 ND, 6 DM	AP+N	%14 *Enterococcus spp'*nin tamamı sağlıklılarda. *Porphyromonas spp* Dm'li hastalarda artmış (ns)
Cheung ve ark. (86)	2001	Kültür	18	ND	APRET	Aeorobik ve fakültatif anaeroblar bazı dişlerde kendiliğinden bulunur, ancak bu durum anaeroblar için geçerli değildir.

Tablo20. Devam. **ND:** Sağlıklı **DM:** Diabetes mellitus **AP:** Apikal periodontitisli dişler **N:**Nekrotik pulpalı dişler **APRET:** Apikal periodontitisli kanal tedavili dişler **AAA:** Akut apikal abse

Araştırmacı	*Yıl*	*Yöntem*	*n (kanal)*	*Hasta Grubu*	*Dişteki Tanı*	*Sonuç*
Hancock ve ark. (32)	2001	Kültür	54	ND	APRET	%2 *C. albicans*. %88 gram pozitif anaerop.
Lana ve ark. (30)	2001	Kültür	31	ND	N	%35 *F. nucleatum*, %10 *C. tropicalis*, %3 *E. faecalis*, %29 gram negatif zorunlu anaerop
Peciuliene ve ark. (37)	2001	Kültür	40	ND	APRET	%18 *C. albicans*, %64 *E. faecalis* (%30 saf kültür olarak)
Rolph ve ark. (153)	2001	PCR	15	ND	AP	%22 *A. naeslundii,* %11 *E. faecalis,* %0 *C. albicans*
Rolph ve ark. (153)	2001	PCR	26	ND	APRET	%22 *P.acnes*, %22 *P. granulosum*, %0 *E. faecalis*, %0 *C. albicans*.
Siqueira ve ark. (261)	2001	DNA-DNA, aspirasyon	27	ND	AAA	%29.6 *B. forsythus*, %29.6 *P. gingivalis*, %3.7 *E. faecalis*,
Siqueira ve ark. (62)	2001	PCR, aspirasyon	10	ND	AAA	%80 siyah pig.anaerop çomak, %70 *P. endodontalis*, %50 *T. denticola*
Rôças ve ark. (67)	2001	PCR	50	ND	N	%44 T. denticola, %30 P. gingivalis, %26 B. forsythus. %8 Kızıl kompleks, %66 kızıl kompleksin en az bir üyesi.
Siqueira ve ark. (61)	2000	PCR	21	ND	N	%52.4 *T. denticola*
Sundqvist ve ark. (29)	1998	Kültür	54	ND	APRET	%3.7 *C. albicans*, %38 *E. faecalis*,%87 gram pozitif, %42 anaerobik
Molander ve ark. (9)	1998	Kültür	100	ND	APRET	%69'unun gram pozitif fakültatif anaerop, %4.2 *C. albicans*, %47 *E. faecalis*
Abou-Rass ve ark.(147)	1998	Kültür	13	ND	APRET	%0 *C. albicans*

Kök kanal tedavisindeki başarısızlığın önemli bir kısmı da kandidalara yüklenmiştir. Diyabet ile oral floradaki mantarların ilişkisi birçok çalışma tarafından ortaya konulmuştur (192,251-253). Bazı çalışmalarda oral kandidanın bulunuşu ile diyabetin süresi ve glisemik kontrolün derecesi arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilirken (190,191), bazılarında (189,192,193), kandidanın glisemik kontrol düzeyiyle, hastalığın komplikasyonlarıyla, süresiyle, yaşla ve cinsiyet ile ilişkili olmadığı bildirilmektedir. Belazi ve arkadaşları (254), oral mukoza ve gargara örneklerinde 84 sağlıklı bireyin 34'ünün % 40 oranında, 128 diyabetik hastanın 82'sinin %64 oranında *C. albicans* pozitif olduğunu bulmuşlardır. İzole edilen türler arasında *C. dubliniensis* izole edilmemiş ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Oral kandida taşıma oranı, sağlıklı bireylerde diyabetiklere nazaran anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur.

Bu çalışmada toplam 11 vakadan elde edilen *Candida* cinsi mikroorganizmanın 8'i (%73) diyabetli bireylerdeydi. İzole edilen 3 *C. dubliniensis*'in tamamı diyabetli AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişlerde (Grup 1b) bulunmaktaydı. Diyabetli apikal periodontitisli dişlerde (Grup 1a) %6.6, diyabetli AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişlerde (Grup 1b) %13.3, diyabetli sekonder enfeksiyonlu dişlerde (Grup 1c) %8.7 oranında kandida cinsi mikroorganizma bulundu. Baumgartner ve arkadaşları (82), primer apikal periodontitisli kök kanallarından alınan 24 örneğin 5'inde (%21) PCR yöntemi ile *C. albicans* varlığını göstermiş, iğne aspirasyonu ile abseli 19 vakadan örnekler incelenmiş ve hiçbirinde *C. albicans* DNA'sına rastlamamışlardır. Siqueira ve arkadaşları ise (83), PCR yöntemiyle primer apikal periodontitisli 91 kanaldan aldıkları örneklerin sadece birinde (%1) mantar hücresine rastlamışlardır. Literatürde primer enfeksiyonlu dişlerden izole edilen mantar oranları %1-40 arasında değişmektedir (1-4,30,82,83). Primer enfeksiyonlu dişlerden mantarların bu geniş aralıktaki oranlarda izole edilmesi, kullanılan inceleme yöntemlerinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca seçici olmayan besiyeri kullanıldığında hava veya başka ortamlardan kaynaklanan kontamine kısımlar koloni morfolojisiyle karışabilmekte ve mantarlar gözden kaçabilmektedir. Yani orjinal kültürde bulunmasına rağmen, mantar kolonileri ekim için kullanılan petrilerde saptanamayabilir.

İncelediğimiz örneklerin sadece 2'sinden *C. albicans* izole edildi. Diğer 9 mantar hücresinin 3'ü *C. dubliniensis*, geri kalanı *Candida spp* olarak tanımlandı. *C. albicans*'ın yanında büyük çoğunlukta *Candida glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* ve *Saccharomyces* türleri'ni içeren mantarların oral kaviteden izole edildiği bildirilmektedir (4,49,65). Bu yüzden *Candida spp* olarak tanımladığımız mantar hücrelerinin *C. albicans* olmama ihtimalleri vardır. Lana ve arkadaşları (30) da, nekrotik pulpalı çürüksüz ve restorasyonsuz dişlerin kök kanallarından kanal tedavisi öncesinde alınan örneklerin 2'sinde (%7,4) *C. tropicalis* bulmuşlardır. Waltimo ve arkadaşlarının (85) sekonder enfeksiyonlu dişlerde yaptıkları araştırmada ise mantarların pozitif olduğu %7 olguda 48 farklı mantar türünün bulunduğu, *C. albicans*'ın en yaygın tür olduğu ve *C. glabrata, C. guilliermondii, C. inconspicua* ve *Geotrichum candidum*'un da kök kanallarından izole edildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada sağlıklı bireylerden izole edilen 3 *Candida* cinsi mikroorganizmanın tamamı sekonder enfeksiyonlu kök kanallarından (%9,9) izole edildi. Literatürde de sekonder enfeksiyonlu kök kanallarında maya hücrelerinin prevalansının %3-22 arasında değiştiği bildirilmektedir (9,29,32,36,37,84-86,90,110).

Diyabetli bireylerin endodontik florası incelenirken belirli mikroorganizmalar üzerine tek tek yoğunlaşarak mikroorganizmaların genotipik özelliklerinden temel alan daha spesifik teknikler (PCR, real time PCR vb) kullanılabilir. Bu sayede daha önce kök kanallarından izole edilmemiş mikroorganizmaların izolasyonu da mümkün olabilir. Sonuçlar incelendiğinde izole edilen toplam 11 *Candida* türü mikroorganizmanın 8'inin diyabetli bireylerin kök kanalından izole edilmesi, diyabetli bireylerin primer endodontik enfeksiyonlu dişlerinde diyabetin şiddeti arttıkça izole edilen mikroorganizma sayısının artması ve apikal periodontitisli dişlerde Gram pozitif mikroorganizmaların hakim olması diyabetik koşulların endodontik flora üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Diyabetlilerde apikal periodontitisin daha çok görülmesi (10) ve iyileşmenin çok geç ya da hiç gerçekleşmemesi (10,219-221) bu sonuçları desteklemektedir. Ayrıca oral kavitede yaygın olarak bulunan fırsatçı organizmalardan olan mantarlar, endodontik tedavi süresince kontaminant olarak kök kanallarına girebilirler. Bu durumda,

diyabetik hastalarda kemomekanik preparasyon yanında intra oral antimikrobiyal kontrolün önemi de ön plana çıkmaktadır. Sekonder enfeksiyonların önüne geçmek için diyabetli bireylerde kök kanal tedavisi öncesi oral floranın kontrol altına alınmasının, aseptik tedavi prosedürlerinin uygulanmasında daha hassas olunmasının ve kök kanallarında daha geniş spektrumlu antimikrobiyal materyallerin kullanılmasının gerekliliğini ortaya koyabilir. Kandidaların dirençli mikroorganizmalar olduğu, biyofilm oluşturma yetenekleri ve bunun rutin kök kanalı irigasyonu ve medikament uygulaması ile elimine edilemeyeceği dikkate alınmalıdır. İnatçı enfeksiyonların mikrobiyal kaynaklarının eliminasyonlarında tedavi stratejisinin değiştirilmesi gerekebilir (78).

Sonuç olarak;

1. DM'li bireyler ile sağlıklı bireylerin OHI-S ve DMFT indeksleri açısından gruplar arasında fark bulunmadı ($p > 0.05$).
2. Tüm gruplarda Gram pozitif mikroorganizmalar kanal florasında hakim mikroorganizmalar olarak görüldü.
3. Tip II diyabetli apikal periodontitisli (AP, Grup 1a) ve AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişlere sahip bireylerde (Grup 1b) HbA_{1C} seviyesi ile izole edilen mikroorganizma sayıları arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Aynı şekilde, Grup 1a'da HbA_{1C} seviyesi yükseldikçe Gram pozitif mikroorganizmaların, Grup 1b'de ise Gram negatif mikroorganizmaların sayıca artması anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).
4. Grup 1a'da en çok izole edilen mikroorganizmalar Gram pozitif fakültatif anaeroplar ile zorunlu anaeroplar, en az izole edilenler ise Gram negatif fakültatif anaeroplardır.
5. Sağlıklı AP'li dişlere sahip bireylerde (Grup 2a) en çok Gram pozitif zorunlu anaeroplar izole edilmiştir.
6. Tip II diyabetli ve sağlıklı AP bulunmayan nekrotik pulpalı dişlere sahip bireylerle (Grup 1b, Grup 2b) sekonder endodontik enfeksiyonlu dişlere sahip bireylerde (Grup 1c, Grup 2c) en sıklıkla Gram pozitif fakültatif anaeroplar izole edilmiştir.
7. Toplam 11 adet kandida cinsi mantarın 8'inin (%73) DM'li bireylerden izole edilmiş olması dikkat çekicidir.

8. Konvansiyonel kültür yönteminde izole edilen 16 adet enterokok türü mikroorganizmanın 10'u, *E. faecalis*, 6'sı *Enterococcus spp* olarak tanımlanmıştır. PCR yönteminde tüm enterokokların *E. facealis* olduğu anlaşılmıştır.
9. Oral kavitede yaygın olarak bulunan fırsatçı organizmalardan olan mayalar ve *E. faecalis*, endodontik tedavi sırasında kontaminant olarak kök kanallarına girebilirler. Özellikle bu mikroorganizmaların eliminasyonunun zor olduğu dikkate alınarak aseptik tedavi prosedürlerine önem verme gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

ÖZET

Tip II Diyabetin Farklı Tanılara Sahip Dişlerde Endodontik Mikrofloraya Etkisinin İncelenmesi

Kök kanalına ulaşan mikroorganizmaların ana kaynağı oral floradır. Normalde sağlıklı ağızlarda tükürük elektrolitleri, glikoproteinler ve antimikrobiyal enzimler oral mukozayı korur. Sağlıklı bireylerdeki tükürük içeriği, ağzın temizlenmesine yardım eder, potansiyel toksik yapıları parçalar, asiditeyi düzenler, bakteriyel toksinleri ve enzimleri nötralize edip mikroorganizmaları yok eder. Bazı sistemik ve lokal etkiler tükürüğün içeriğindeki ve miktarındaki değişim ile denge içinde olan bu ortamı değiştirir. Tip II Diabetes mellitus'lu bireylerin tükürüğündeki glukoz düzeyinin sağlıklılara oranla daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Tükürüğün içeriğindeki protein, amilaz, lizozim, IgA, elektrolitler, tamponlama kapasitesi ve pH üzerine yapılan araştırmaların sonuçları ise hala tartışmalıdır. Bazı araştırıcılar, diyabetik hastalarda tükürük sekresyonunda azalmanın olduğunu bildirmesine rağmen, böyle bir ilişkinin olmadığına işaret edenler de vardır.

Bu çalışmanın amacı, Tip II Diabetes mellitus hastalığı olan ve olmayan bireylerin apikal periodontitis (AP), AP bulunmayan nekroz ve sekonder kök kanal enfeksiyonlu dişlerinde endodontik floranın incelenmesidir. Çalışmaya yaşları 22-82 arasında değişen aynı coğrafi bölgede yaşayan 59 diyabetik ve 61 diyabetik olmayan bireyin 173 tek kök kanalına sahip dişleri dahil edilmiştir. Hastaların oral durumu DMFT, OHI-S ve radyografik incelemelerle, diyabetik hastaların sistemik durumu da HbA_{1c} düzeyiyle belirlendi. Diyabetik olmayanlarda açlık kan şekerinin düzeyi, diyabetik olanlarda ise HbA_{1c} düzeyi kaydedildi. Hastalar diyabetik olan ve olmayan şeklinde 2 ana gruba, her ana grup için 3 alt gruba ayrıldı. Kök kanalına girişi takiben steril Hedström eğeleri ve kağıt koniler yardımıyla toplanan örnekler tiyoglikolat besiyeri içeren tüpe taşındı. Mikrofloranın belirlenmesi için konvansiyonel kültür teknikleri kullanıldı. Tüm örnekler 5 gün anaerobik ortamda, 3 gün aerobik ortamda takip edildi. *E. faecalis*'in değerlendirilmesinde PCR bu mikroorganizmanın 16S rRNA geni kullanılarak yapıldı. Mikroorganizmaların Gram boyanma özellikleri, oksijen gereksinimleri ve bunların diyabetle ilişkileri gibi parametreler ki kare testi ile karşılaştırıldı.

Sonuçlar, *E. faecalis*'in tanımlanmasında PCR yönteminin kültür tabanlı yöntemlerden anlamlı düzeyde daha hassas olduğunu gösterdi. Kandida türleri diyabetik bireylerin tüm alt gruplarından izole edilmesine rağmen sağlıklı bireylerde sadece sekonder enfeksiyonlu vakalardan izole edildi. Diyabetiklerde primer enfeksiyonlu dişlerde artan HbA_{1C} düzeyiyle izole edilen mikroorganizma sayıları arasında pozitif bir ilişki bulundu. Aynı şekilde, diyabetli apikal periodontitisli dişlerde HbA_{1C} seviyesi yükseldikçe Gram pozitif mikroorganizmaların, apikal periodontitis bulunmayan nekrotik pulpalı dişlerde ise Gram negatif mikroorganizmaların sayıca artması anlamlı bulundu.

Çalışmanın sınırları içerisinde diyabetik bireylerin endodontik florası diyabetik olmayanlardan anlamlı bir farklılık göstermedi. Bu durum, diyabetik hastaların oral hijyeninin kontrol altında olmasıyla ilişkili olabilir. Sistemik hastalıkların endodontik flora üzerindeki olası etkileri için daha ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: Tip II Diyabet, Kültür, Flora, PCR, *E. faecalis.*

SUMMARY

Investigation of The Effects of Type II Diabetes on The Endodontic Microflora of Teeth with Different Diagnosis

The main cause of the microorganisms reaching deeper into the root canal is oral flora. Normally, in a healthy mouth, saliva electrolytes, glycoproteins and antimicrobial enzymes protects the oral mucosa. In healty persons, saliva composition serves to cleanse the mouth, clear potentially toxic substances, regulate acidity, neutralize bacterial toxins and enzymes and destroy microorganisms. Some of systemic and local effects can change the contents and amount of saliva causing changes in the balance. It is reported that the level of glucose in type II diabetic patients is higher than those of the non-diabetics. Findings regarding the salivary contents, i.e. total protein, amylase, lysozyme, IgA, electrolytes, buffer capacity and pH is still disputable. Even though some of the researchers have reported the reduced salivary secretion in diabetic patients, there are also some other researchers have claimed the opposite.

The aim of this study, to investigate the endodontic microflora of the patients with and without Type 2 diabetes mellitus having the diagnosis apical paradontitis (AP), necrosis without AP or secondary infection of root canal. The study included 173 teeth selected from the 59 diabetic and 61 non-diabetic subjects aged 21-82 from the same geographical area. Oral status was evaluated by DMFT, OHI-S index and radiographic examinations, whereas systemic status of diabetics was determined with the HbA_{1C} levels. A casual plasma glucose levels in non-diabetics and HbA_{1c} levels in diabetics was recorded. The patients were divided into two main groups as diabetics and nondiabetics and then 3 subgroups per main group. After accessing the canal, the root canal sample was collected with a sterile Headstrom file and paper-points that was transferred to a tube containing prereduced thioglycollate broth. Bacterial load was determined by traditional culture techniques.

All samples were cultured anaerobically for five days and aerobically for 3 days. Assessment of *Enterecoccus faecalis* was also accomplished by use of quantitative-polymerase chain reaction (PCR) directed against the 16S rRNA gene. The parameters of Gram staining, oxygen consumption and their relationship with diabetes of microorganisms was compared using the Chi-square test.

The results showed that, *E.faecalis* identification of the bacteria using PCR-based method was significantly more sensitive than culture-based procedures. Candida species were isolated in all of the diabetics, but in the retreatment cases of nondiabetics. We have found out a positive relationship between an increasing HbA_{1C} level and isolated microorganisms in teeth with primer infection of diabetics. It has been observed significant that HbA_{1C} level increased significantly in teeth with apical periodontitis of diabetics and gram positive microorganisms increased as well while gram negative microorganisms amounted in teeth with necrotic pulp without apical periodontitis.

Within the limitations of this study, endodontic flora of diabetics was not significantly different from that of the non-diabetics**.** This can be related to the fact that diabetic patients are under routine control orally. The possible effect of serious diseases on endodontic flora needs further investigation.

Key words: Tip II Diabetes, Culture, Flora, PCR, *E. faecalis.*

KAYNAKLAR

1. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11(1):6-9

2. Siqueira JF, Rocas IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93(2):174-8

3. Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J* 2005; 38(6):372-80

4. Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Observation of Saccharomyces cerevisiae in blood of patient undergoing root canal treatment. *Int Endod J* 1997; 30(5):313-7

5. Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, van Poperin N, Hujoel PP. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? *J Clin Microbiol* 1992; 30(2):418-26

6. Love R.M, Jenkinson H.F. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(2):171-83

7. 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(5):318-22

8. Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Orstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(2):128-37

9. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31(1):1-7

10. Segura EJ, Pinzon JA, Santos RJV, Ortega VE, Cabello CR, Ferrera PM. High prevalence of apical periodontitis amongst type 2 diabetic patients. *Int Endod J* 2005; 38(8):564-9

11. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994; 43(6):836-41

12. Mogensen CE. Progression of nephropathy in long-term diabetics with protein-uria and effect of initial anti-hypertensive treatment. *Scand J Clin Lab Invest* 1976; 36(4):383-8

13. Rhodus NL. Detection and management of the diabetic patient. *Comp Cont Edu Dent* 1987; 8(1):73-9

14. Belazi MA, Galli Tsinopoulou PH, Drakoulakos D, Fleva A, Papanayiotou PH. Salivary alterations in insulindependent diabetes mellitus. *Int J Paediatr Dent* 1998; 8(1):29-33

15. Thorstensson H, Olsson J, Falk H, Hugoson A. Some salivary factors in insulin-dependent diabetics. *Acta Odontol Scand* 1989; 47(3):175-83

16. Meurman JH, Collin HL, Niskaken L, Toyry J, Alakuiyala P, Keinanen S, Uusitupa M. Saliva in non-insulindependent diabetic patients and control subjects. The role of the autonomic nervous system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 86(1):69-76

17. Dodds WJ, Dodds AP. Effects of glycemic control on saliva flow-rates and protein composition in non-insulindependent diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 83(4):465-70

18. Sreebny LM, Yu A, Green A, Valdini A. Xerostomia in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1992; 15(7):900-4

19. Erganiş O, Öztürk A. Oral Mikrobiyoloji&İmmünoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, 2003 Bölüm 1:1-91

20. Bilgehan H. Mikroorganizmaların Sınıflandırılmaları ve Yapıları. In:Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Bilgehan H. 5.Baskı, Barış yayınları, 1992:1-64

21. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, 1999: 23-35

22. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Baskı 3, Barış yayınları, 2002, 97-109

23. Aydın M. Endodontik Mikrobiyoloji. In:Endodonti. Alaçam T. Barış Yayınları; 2000: 313-83

24. Erganiş O, Öztürk A. Oral Mikrobiyoloji&İmmünoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, 2003: Bölüm 2:91-110

25. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, 1999: 45-59

26. Gomes BP, 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(2):71-6

27. Möller AJR. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontologisk Tidskrift* 1966; 74:1-380

28. Siqueira JF, Rocas IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* 2001; 27(9):563-6

29. Sundqvist G, Fidgor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the out-come of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998: 85(1):86-93

30. 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(2):100-5

31. Siqueira JF, Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Actinomyces species, streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections. *J Endod* 2002; 28(3):168-72

32. Hancock HH 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91(5):579-86

33. Kvist T, Molander A, Dahlen G, Reit C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod* 2004; 30(8):572-6

34. Chávez de Paz L, Svensäter G, Dahlén G, Bergenholtz G. Streptococci from root canals in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100(2):232-41

35. Ng YL, Spratt D, Sriskantharajah S, Gulabivala K. Evaluation of Protocols for Field Decontamination Before Bacterial Sampling of Root Canals for Contemporary Microbiology Techniques. *J Endod* 2003; 29(5):317-20

36. Siqueira JF, Rocas IN. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(1):85-94

37. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001: 34(6):429-34

38. Rocas IN, Siqueira JF, Marcela CR. Aboim MC, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98(6):741-9

39. Rocas IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30(5):315-20.

40.www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Schaedler_Media.pdf

41. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11(4):266-73

42. Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque samples. *J Periodontal Res* 1996; 31(7):496-501

43. Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiol Immunol* 2001; 45(1):39-44

44. Amann RI, LudwigW,Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995; 59(1):143-69

45. Relman DA. The identification of uncultured microbial pathogens. *J Infect Dis* 1993; 168(1):1-8

46. Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science* 1999; 284(5418):1308-10.

47. Wade W. Unculturable bacteria the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med* 2002; 95(2):81-3

48. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994; 32(2):335-51

49. Hofstad T. Utility of newer techniques for classification and identification of pathogenic anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* 1994; 18(4):250-2

50. Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(4):1242-7

51. Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol* 2000; 38(7):2574-8

52. Kong F, Gordon S, Gilbert GL. Rapid-cycle PCR for detection and typing of Mycoplasma pneumoniae in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11):4256-9

53. Spratt D, Weightman AJ, Wade WG. Diversity of oral asaccharolytic Eubacterium species in periodontitis: identification of novel phylotypes representing uncultivated taxa. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14(1):56-9

54. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50

55. Whelen AC, Persing DH. The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory. *Annual Reviews in Microbiology* 1996; 50:349-73

56. Pitt TL, Saunders NA. Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium. *J Clin Pathol* 2000; 53(1):71-5

57. Siqueira JF, Rocas IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent* 2003; 31(5):333-9

58. Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endodontic Topics* 2004; 9(1):5-14

59. Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *J Periodontol* 2000 1995; 7:69-82

60. Siqueira JF, Rocas 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(6):744-8

61. Siqueira Jr JF, Rocas IN, Favieri A, Santos KRN. Detection of Treponema denticola in endodontic infections by 16S rRNA gene directed Polymerase Chain Reaction. *Oral Microbiology and Immunology* 2000; 15(5):335-7

62. Siqueira JF, Rocas IN, Oliveira JC, Santos KR. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA directed PCR. *J Endod* 2001; 27(3):164-7

63. Siqueira JF, Rocas IN, Favieri A, Oliveira JC, Santos KR. Polymerase chain reaction detection of Treponema denticola in endodontic infections within root canals. *Int Endod J* 2001; 34(4):280-4

64. Rocas IN, Siqueira Jr JF, Andrade AFB, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *Int Endod J* 2003; 36(1):20-6

65. Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16S rDNA PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod* 1997;23(7): 433-8

66. Goncalves RB, Mouton C. Molecular detection of Bacteroides forsythus in infected root canals. *J Endod* 1999; 25(5):336-40

67. Rocas IN, Siqueira Jr JF, Santos KR, Coelho AM. Red complex (Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis, and Treponema denticola) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91(4):468-71

68. Xia T, Baumgartner JC, David LL. Isolation and identification of Prevotella tannerae from endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15(4):273-5

69. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of blackpigmented Bacteroides species in root canal infections. *J Endod* 1989; 15(1):13-9

70. Oliveira JCM, Siqueira Jr JF, Alves GB, Hirata Jr R, Andrade AFB. Detection of Porphyromonas endodontalis in infected root canals by 16s rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *J Endod* 2000; 26(12):729-32

71. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2):134-44

72. Hashimura T, Sato M, Hoshino E. Detection of Slackia exigua, Mogibacterium timidum and Eubacterium saphenum from pulpal and periradicular samples using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. *Int Endod J* 2001; 34(6):463-70

73. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf JD. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9):3223-31

74. Rocas IN, Siqueira Jr JF. Identification of Dialister pneumosintes in acute periradicular abscesses of humans by nested PCR. *Anaerobe* 2002; 8(1):75-8

75. Siqueira JF, Rocas IN. Dialister pneumosintes can be a suspected endodontic pathogen. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94(4):494-8

76. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of Staphylococcus species in the oral cavity. *J Med Microbiol* 2001;50(11):940-6

77. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78(4):522-30

78. Dahlen G, Haapasalo M. Microbiology of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, eds Essential Endodontology: Prevention and treatment of Apical Periodontitis. St edn.Oxford.UK: Blackwell Sciences Ltd., 1998; p: 106-25

79. Loesche WJ, Gusberti F, Mettraux G, Higgins T, Syed S. Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. *Infect Immun* 1983; 42(2):659-67

80. Grenier D, Mayrand D. Nutritional relationships between oral bacteria. *Infect Immun* 1986; 53(3):616-20

81. Jung IY, Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod* 2000; 26(10):599-04

82. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of Candida albicans in infections of endodontic origin. *J Endod* 2000; 26(12):695-8

83. Siqueira JF, Rocas IN, Moraes SR, Santos KR. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. *Int Endod J* 2002; 35(4):345-51

84. Nair PN, 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. *J Endod* 1990; 16(12):580-8

85. Waltimo TM, Siren EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30(2):96-101

86. Cheung GSP, Ho MWM. Microbial flora of root canal–treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16(6):332-7

87. Sabeti M, Simon JH, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus are associated with symptomatic periapical pathosis. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(5):327-8

88. Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad AF. Enterococcus Spp. in Endodontically Treated Teeth with and without Periradicular Lesions. *J Endod* 2005; 31(12):851-56

89. 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(6):423-32

90. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36(1):1-11

91. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canals microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(2):100-3

92. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996; 29(4):235-41

93. Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ, Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(5):285-92

94. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canals infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7(5):257-62

95. Hannula J, Dogan B, Slots J, Okte E, Asikainen S. Subgingival strains of Candida albicans in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16(2):113-8

96. Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982; 90(3):200-6

97. Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Moller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res* 1982; 90(2):134-44

98. Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001; 34(1):1-10

99. Cheung GSP. Endodontic failures- changing the approach. *Int Dent J* 1996; 46(3):131-8

100. Siren EK, Haapasalo PP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997; 30(2):91-5

101. Ray HA, TropeM. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J* 1995; 28(1):12-8

102. Sjögren U, Fidgor 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(5):297-06

103. Nair PN, Sjögren U, Schumacher E, Sundqvist G. Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post-treatment follow-up. *Int Endod J* 1993; 26(4):225-33.

104. Nair PN, Schroeder HE. Periapical actinomycosis. *J Endod* 1984; 10(12):567-70

105. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Sundqvist G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *J Endod* 1990; 16(12):589-95

106. Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 81(1):93-102

107. Love RM. Enterococcus faecalis- a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34(5):399-05

108. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS. Colonization of Candida albicans on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol* 1997; 42(7):513-20

109. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS. Growth patterns of Candida albicans in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 84(1):68-73

110. 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(4):321-29

111. Waltimo TMT, Haapasalo M, Zehnder M, Meyer J. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. *Endodontic Topics* 2004; 9(13):66-78

112. Al-Karaawi Z M, Manfredi M, Waugh A C W, McCullough M J, Jorge J, Scully C, Porter S R. Molecular characterization of Candida spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17(1):44-9

113. Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(5):632-41

114. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of Enterococcus faecalis in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000; 26(10):593-5

115. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(5):308-20

116. Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS. Molecular detection of Enterococcus species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99(1):112-8

117. Colak M, Evcil S, Bayindir Y, Yigit N. The Effectiveness of Three Instrumentation Techniques on the Elimination of Enterococcus Faecalis from a Root Canal: An In Vitro Study. *J Contemp Dent Pract* 2005; 6(1):94-106

118. Giard JC, Hartke A, Flahaut S, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y. Starvation-induced multiresistance in Enterococcus faecalis JH2-2. *Curr Microbiol* 1996; 32(5):264-71

119. Hartke A, Giard JC, Laplace JM, Auffray Y. Survival of Enterococcus faecalis in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(11):4238-45

120. Flahaut S, Hartke A, Giard JC, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y. Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in Enterococcus faecalis. *FEMS Microbiol Lett* 1996a; 138(1):49-54

121. Flahaut S, Frere J, Boutibonnes P, Auffray Y. Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in Enterococcus faecalis. *Appl Environ Microbiol* 1996b; 62(7):2416-20

122. Flahaut S, Hartke A, Giard JC, Auffray Y. Alkaline stres response in Enterococcus faecalis: adaptation, cross protection, and changes in protein synthesis. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63(2):812-4

123. Lleò MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M, Canepari P. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Appl Microbiol* 2001; 91(6):1095-102

124. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of Enterococcus faecalis at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod* 2006; 32(2):104-9

125. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66(8):1375-9

126. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of Enterococcus faecalis to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35(3):221-8

127. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; 28(10):689-93

128. Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing Enterococcus faecalis within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 2006; 39(1):10-7

129. Sukawat C, Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three CH formulations on human dentin infected with Enterococcus faecalis. *J Endod* 2002; 28(2):102-4

130. Podbielski A, Spahr A, Haller B. Additive antimicrobial activity of CH and CHX on common endodontic bacterial pathogens. *J Endod* 2003; 29(5):340-5

131. Schlievert PM, Gahr PJ, Assimacopoulos AP, Dinges MM, Stoehr JA, Harmala JW et al. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of Enterococcus faecalis endocarditis. *Infect Immun* 1998; 66(1):218-23

132. Xiao J, Hook M, Weinstock GM, Murray BE. Conditional adherence of Enterococcus faecalis to extracellular matrix proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 21(4):287-95

133. Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz S, Narayana SV, Weinstock GM et al. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from Enterococcus faecalis. *J Biol Chem* 1999; 274(38):26939-45

134. Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Höök M, Murray BE. Enterococcus faecalis adhesin, Ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* 2000; 68(9):5218-24

135. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived Enterococcus faecalis strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; 67(1):193-200

136. Archimbaud C, Shankar N, Forestier C, Baghdayan A, Gilmore MS, Charbonne F, et al. In vitro adhesive properties and virulence factors of Enterococcus faecalis strains. *Res Microbiol* 2002; 153(2):75-80

137. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(10):4538-45

138. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic Exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(4):1628-35

139. Singh KV, Coque TM, Weinstock GM, Murray BE. In vivo testing of an Enterococcus faecalis efaA mutant and use of efaA homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 21(4):323-31

140. Wada K, Fujii E, Ishida H, Yoshioka T, Muraki T. Effect of lipoteichoic acid on dermal vascular permeability in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294(1):280-6

141. Telles PD, Hanks CT, Machado MA, Nör JE. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res* 2003; 82(6):466-70

142. Sannomiya P, Craig RA, Clewell DB, Suzuki A, Fujino M, Till GO, et al. Characterization of a class of nonformylated Enterococcus faecalis-derived neutrophil chemotactic peptides: the sex pheromones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(1):66-70

143. Huycke MM, Joyce W, Wack MF. Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of Enterococcus faecalis. *J Infect Dis* 1996; 173(3):743-6

144. Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, et al. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci* 1994; 107(11):3055-64

145. Ramamurthy NS, Xu JW, Bird J, Baxter A, Bhogal R, Wills R, et al. Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. *J Periodontal Res* 2002; 37(1):1-7

146. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002; 28(4):304-10

147. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1998; 31(1):39-47

148. Coburn PS, Hancock LE, Booth MC, Gilmore MS. A novel means of self-protection, unrelated to toxin activation, confers immunity to the bactericidal effects of the Enterococcus faecalis cytolysin. *Infect Immun* 1999; 67(7):3339-47

149. Day AM, Cove JH, Phillips-Jones MK. Cytolysin gene expression in Enterococcus faecalis is regulated in response to aerobiosis conditions. *Mol Genet Genomics* 2003; 269(1):31-9

150. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19(2):95-101

151. C.M. Sedgley,A.C. Nagel, C.E. Shelburne, D.B. Clewell, O. Appelbe, A. Molander, Quantitative real-time PCR detection of oral Enterococcus faecalis in humans. *Archives of Oral Biology* 2005; 50(6):575-83

152. Dahlen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15(5):309-12

153. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9):3282-9

154. Yücel A. Kantarcıoğlu S. Some important changes in taxonomy of Candida albicans. *Cerrahpaşa J Med* 1999; 30(3):236-46

155. Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of Candida albicans: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(1):130-80

156. Jacob LS, Flaitz CM, Nichols CM, Hicks MJ. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. *J Am Dent Assoc* 1998; 129(2):187-94

157. Lucas VS. Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. *Community Dent Oral Epidemiol* 1993; 21(5):313-6

158. Aydın M. Kandida cinsi mantarlar (C. Albicans). Ed. Cengiz, Mısırlıgil, Aydın. Tıp ve Diş Hekimliğinde Mikrobiyoloji. Sa: 1109, Güneş Yayınevi. 2004 Ankara

159. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Pathogenicity determinants of Candida. *Cerrahpaşa J Med* 2000; 31(3):172-86

160. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. *Trends Microbiol* 2001; 9(7):327-35

161. Monroy BT, Maldonado MV, Martínez FF, Barrios AB, Quindós G, Vargas S.L.O. Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus mutans colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10(1):27-39

162. Senet JM. Candida adherence phenomena, from commensalism to pathogenicity. *Int Microbiol* 1998; 1(2):117-22

163. Baksı BG, Sen BH, Denizci AA. Oral kaviteden izole edilen Candida albicans suşlarının koloni yapılarının taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi. *EÜ Dishek Fak Derg* 2005; 26:53-58

164. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast Candida albicans. *J Endod* 2002; 28(2):68-71

165. Zamany A, Safavi K, Spangberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(5):578-81

166. Waltimo TMT, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MPP. Susceptibility of oral Candida species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* 1999; 32(2):94-8

167. Siqueira JF, Rocas I, Lopes HP, Fernando ACM, Uzeda M. Elimination of Candida albicans Infection of the Radicular Dentin by Intracanal Medications. *J Endod* 2003; 29(8):502-4

168. 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(6):421-9

169. Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci* 2007; 115(1):77-80

170. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected singlespecies biofilms. *Int Endod J* 2006; 39(11):878-85

171. Ashman RB, Papadimitriou JM. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to Candida albicans infection. *Microbiol Rev* 1995; 59(4):646-72

172. Danley DL, Polakoff J. Rapid killing of monocytes in vitro by Candida albicans yeast cells. *Infect Immun* 1986; 51(1):307-13

173. Lomcali G, Sen BH, Cankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 1996;12(2):70-6

174. Khongkhunthian P, Reichart PA. Aspergillosis of the maxillary sinus as a complication of overfilling root canal material into the sinus: report of two cases. *J Endod* 2001; 27(7):476-8

175. Waltimo TMT, Ørstavik D, Siren EK, Haapasalo MPP. In vitro yeast infection of human dentin. *J Endod* 2000; 26(4): 207-9

176. Sen BH, Chugal 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(2):201-6

177. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Lopes HP, Elias CN, de Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod* 2002; 28(11):770-3

178. 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(3):216-20

179. Waltimo T, Kuusinen M, Jarvensivu A, Nyberg P, Vaananen A, Richardson M, Salo T, Tjaderhane L. Examination on Candida spp. in refractory periapical granulomas. *Int Endod J* 2003; 36(9):643-7

180. Sen BH, Akdeniz BG, Denizci AA. The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on Candida albicans. *Oral Surg Oral MedOral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90(5):651-5

181. Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Int Endod J* 2003; 36(2):100-5

182. Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue dissolution capacity and dentine disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(5):608-13

183. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 2002; 78(922):455-9

184. Guida RA. Candidiasis of the oropharynx and oesophagus. *Ear Nose Throat J* 1988; 67(11):832-40

185. Epstein JB, Truelove EL, Izutzu KL. Oral candidiasis: pathogenesis and host defense. *Rev Infect Dis* 1984; 6(1):96-106

186. Francis P, Walsh TJ. Current approaches to the management of fungal infections in cancer patients. *Oncology* 1992; 6(4):81-92

187. Bergmann OJ. Alterations in oral microflora and pathogenesis of acute oral infections during remission-induction therapy in patients with acute myeloid leukaemia. *Scand J Infect Dis* 1991; 23(3):355-66

188. Willis AM, Coulter WA, Sullivan DJ, Coleman DC, Hayes JR, Bell PM et al. Isolation of C. dubliniensis from insulin using diabetes mellitus patients. *J Oral Pathol Med* 2000; 29(2):86-90

189. Manfredi M, Al-Karaawi Z, McCullough MJ, Hurel S, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of Candida spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17(3):181-5

190. Guggenheimer J, Moore PA, Rossie K, Myers D, Mongelluzzo MB, Block HM et al. Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies. II. Prevalence and

characteristics of Candida and candidal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89(5):570-6

191. Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ. Oral candidal carriage and infection in insulin treated diabetic patients. *Diabet Med* 1999: 16(8):675-9

192. Hill LV, Tan MH, Pereira LH, Embil JA. Association of oral candidiasis with diabetic control. *J Clin Pathol* 1989; 42(5):502-5

193. Tapper-Jones LM, Aldred MJ, Walker DM, Hayes TM. Candidal infections and populations of Candida albicans in mouths of diabetics. *J Clin Pathol* 1981; 34(7):706-11

194. Moore LV, Moore WE, Riley C, Brooks CN, Burmeister JA, Smibert RM. Periodontal microflora of HIV positive subjects with gingivitis or adult periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64(1):48-56

195. Vernillo AT. Diabetes mellitus: relevance to dental treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91(3):263-70

196. Katz J. Elevated blood glucose levels in patients with severe periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2001; 28(7):710-2

197. Thomson WM, Slade GD, Beck JD, Elter JR, Spencer AJ, Chalmers JM. Incidence of periodontal attachment loss over 5 years among older South Australians. *J Clin Periodontol* 2004; 31(2):119-25

198. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non- insulin- dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991; 62(2):123-31

199. Chuang SF, Sung JM, Kuo SC, Huang JJ, Lee SY. Oral and dental manifestations in diabetic and nondiabetic uremic patients receiving hemodialysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99(6):689-95

200. Ponte E, Tabaj D, Maglione M, Melato M. Diabetes mellitus and oral disease. *Acta Diabetol* 2001; 38(2):57-62

201. Kornman KS. Patients are not equally susceptible to periodontitis: does this change dental practice and the dental curriculum? *J Dent Educ* 2001; 65(8):777-84

202. Aryeh BH, Serouya R, Kanter Y et al. Oral health and salivary composition in diabetic patients. *J Diabetes Complic* 1993; 7(1):57-62

203. Ogunbodede EO, Fatusi OA, Akintomide A, Kolawole K, Ajayi A. Oral Health Status in a Population of Nigerian Diabetics. *J Contemp Dent Pract* 2005; 4(6):75-84

204. Gin H, Aubertin J. Influence of glycemic normalisation by an artificial pancreas on phagocytic and bactericidal function of granulocytes in insulin-dependent diabetic patients. *J Clin Pathol* 1984; 37(9):1029-31

205. Sandberg GE, Sundberg HE, Fjellstrom CA, et al. Type 2 diabetes and oral health: a comparison between diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 50(1): 27-34

206. Pinson M, Hoffman WH, Garnick JJ, et al. Periodontal disease and type I diabetes mellitus in children and adolescents. *J Clin Periodontol* 1995; 22(2): 118-23

207. Jones R.B, McCallum R.M, Kay E.J et al, Oral health and oral health behaviour in a population of diabetic outpatient clinic attenders. *Commun. Dent. Oral Epidemiol* 1992; 20(4):204-7

208. Narhi TO, Meurman JH, Odont D, Ainamo A, Tilvis R. Oral health in ten elderly with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Spec Care Dentist* 1996; 16(3):116-22

209. Collin HL, Uusitupa M, Niskanen L et al. Caries in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod* 1998; 85(6):680-5

210. Tenovuo J, Alanen P, Larjava H, Vilikari J, Lehtonen OP. Oral health of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Dent Res* 1986; 94(4):338-46

211. Anderson LC, Yang SC, Xie H, Lamont RJ. The effects of streptozotocin diabetes on salivary-mediated bacterial aggregation and adherence. *Arch Oral Biol* 1994; 39(4):261-9

212. Mandell RL, Dirienzo J, Kent R, Joshipura K, Haber J. Microbiology of healthy and diseased periodontal sites in poorly controlled insulin-dependent diabetics. *J Periodontol* 1992; 63(4):274-9

213. Fouad AF. Diabetes Mellitus as a Modulating Factor of Endodontic Infections. *J Dental Edu* 2003; 67(4):459-67

214. Sbordone L, Ramaglia L, Barone A, Ciaglia RN, Tenore A, Iacono VJ. Periodontal status and selected cultivable anaerobic microflora of insulin-dependent juvenile diabetics. *J Periodontol* 1995; 66(6):452-61

215. Sbordone L, Ramaglia L, Barone A, Ciaglia RN, Iacono VJ. Periodontal status and subgingival microbiota of insulin-dependent juvenile diabetics: a 3-year longitudinal study. *J Periodontol* 1998; 69(2):120-8

216. Hugoson A, Koch G, Bergendal T, et al. Oral health of individuals aged 3-80 years in Jonkoping, Sweden in 1973,1983, and 1993: II. Review of clinical and radiographic findings. *Swedish Dent J* 1995; 19(6):243-60

217. Yuan K, Chang CJ, Hsu PC, Sun HS, Tseng CC, Wang JR. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. *J Periodont Res* 2001; 36(1):18-24

218. Fouad AF, Kum KY, Clawson ML, Barry J, Abenoja C, Zhu Q, Caimano M, Radolf JD. Molecular characterization of the presence of Eubacterium spp and Streptococcus spp in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(4):249-55

219. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod* 2003; 29(6):383-9

220. Britto LR, Katz J, Guelmann M, Heft M. Periradicular radiographic assessment in diabetic and control individuals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(4):449-52

221. Fouad AF, Burleson J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from and electronic patient record. *J Am Dent Assoc* 2003; 134(1):43-51

222. Yee R, David J, Khadka R. Oral cleanliness of 12-13-year-old and 15-year-old school children of Sunsari District, Nepal. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2006; 24(3):146-51

223. Chávez de Paz LE, Molander A, Dahlén G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *Int Endod J* 2004; 37(9):579-87

224. Möller AJR, Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP. Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. *Eur J Oral Sci* 2004; 112(3):207-15

225. Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR-based identification of Treponema maltophilum, T. amylovorum, T. medium, and T. lecithinolyticum in primary root canal infections. *Archives of Oral Biology* 2003; 48(7):495-502

226. de Souza CA, Teles RP, Souto R, Chaves MA, Colombo AP Endodontic Therapy Associated with Calcium Hydroxide As an Intracanal Dressing: Microbiologic Evaluation by the Checkerboard DNA-DNA Hybridization Technique. *J Endod* 2005; 31(2):79-83

227. Sánchez-Cordero S, Hoffman H, Stahl SS. Occurrence of staphylococcus in periodontal pockets of diabetic and nondiabetic adults. *J Periodontol.* 1979; 50(3):109-13

228. Mashimo PA, Yamamoto Y, Slots J, Park BH, Genco RJ. The periodontal microflora of juvenile diabetics. Culture, immunofluorescence, and serum antibody studies. *J Periodontol.* 1983; 54(7):420-30

229. Iwama A, Morimoto T, Tsuji M, Nakamura K, Higuchi N et al., Increased number of anaerobic bacteria in the infected root canal in type 2 diabetic rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(5):681-6

230. Falk H, Hugoson A, Thotstensson H. Number of teeth, prevalence of caries and periapical lesions in insulin-dependent diabetes. *Scand JDR* 1989; 97(3):198-206

231. Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka N, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod* 1992; 18(10):501-4

232. Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, et al. The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. *J Dent Res* 2003; 82(4):322-5

233. Gustke CJ, Stein SH, Hart TC, Hoffman WH, Hanes PJ, Russell CM, et al. HLA-DR Alleles are associated with IDDM, but not with impaired neutrophil chemotaxis in IDDM. *J Dent Res* 1998; 77(7):1497-503

234. Saiki O, Negoro S, Tsuyuguchi I, Yamanura Y. Depressed immunological defense mechanisms in mice with experimentally induced diabetes. *Infect Immun* 1980; 28(1):127-31

235. Chavez de Paz LE, Dahlen G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J* 2003; 36(7):500-8

236. Sriskandan S, Cohen J. Gram-positive sepsis. Mechanisms and diferences from gram-negative sepsis. *Infectious Disease Clinics of North America* 1999; 13(2):397-412

237. Soares JA, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Ito IY. Effect of biomechanical preparation and calcium hydroxide pastes on the anti-sepsis of root canal systems in dogs. *J App Oral Sci* 2005; 13(1):93-100

238. Sydney GB, Estrela C. Influence of root canal preparation on anaerobic bacteria in teeth with asymptomatic apical periodontitis. *Braz Endod J* 1996; 1(1):7-10

239. Chu FC, Tsang CS, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *J Endod* 2005; 31(6):424-9

240. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D, Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 2005; 31(12):863-6

241. Russell BG. The dental pulp in diabetes mellitus. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1967; 70(2):319-20

242. Bissada NF, Sharawy AM. Histologic study of gingival and pulpal vascular changes in human diabetics. *Egypt Dent J* 1970; 16(4):283-96

243. Tennenberg SD, Finkenauer B, Dwivedi A. Absence of lipopolysaccharide- induced inhibition of neutrophil apoptosis in patients with diabetes. *Arch Surg* 1999; 134(11):1229-34

244. Tervonen T, Oliver RC, Wolff LF, Bereuter J, Anderson LA, Aeppli DM. Prevalence of periodontal pathogens with varying metabolic control of diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1994; 21(6):375-9

245. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen: Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endodontic Topics* 2003; 6(1):3-28.

246. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3(2):86-90

247. Okazaki M, Yoshida Y, Yamaguchi S, Kaneno M, Elliott JC. Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals. *Biomaterials* 2001; 22(18):2459-64

248. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. *Microb Ecol Health Dis* 1993;6(6):269-75

249. Brook I, Frazier EH, Gher ME. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6(2):123-5

250. Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17(8):380-3

251. Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jörgensen E, Włoch S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25(8):411-5

252. Abu Elteen KH, Abu Alteen RM. The prevalence of Candida albicans populations in the mouths of complete denture wearers. *New Microbiol* 1998; 21(1):41-8

253. Ueta E, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T. Prevalence of diabetes mellitus in odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil supression. *J Oral Pathol Med* 1993; 22(4):168-74

254. Belazi M, Velegraki A, Fleva A, Gidarakou I, Papanaum L, Baka D, Daniilidou N and Karamitsos D. Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. *Mycoses* 2005; 48(3):192-6

255. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22(1):19-23

256. Jacinto RC, Gomes BP, Desai M, Rajendram D, Shah HN. Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high-performance liquid chromatography. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22(6):403-10

257. 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(6):390-7

258. Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21(2):112-22

259. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of Porphyromonas gingivalis isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J.* 2006; 39(1):62-70

260. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.*2005; 20(4):253-8

261. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001*; 92(4):451-7