



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

**ENDODONTİK İNFEKSİYONLARIN YENİ NESİL
SEKANSLAMA METODUYLA ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

Cangül KESKİN

Samsun
Nisan-2016



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

ENDODONTİK İNFEKSİYONLARIN YENİ NESİL SEKANSLAMA METODUYLA ANALİZİ

DOKTORA TEZİ

Cangül KESKİN

Danışman
Doç. Dr. Ebru ÖZSEZER DEMİRYÜREK

Samsun
Nisan-2016

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Cangül KESKİN tarafından Doç. Dr. Ebru ÖZSEZER DEMİRYÜREK Danışmanlığında hazırlanan **Endodontik İnfeksiyonların Yeni Nesil Sekanslama Metoduyla Analizi** başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 29/04/2016 tarihinde yapılan sınav ile Endodonti Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hamdi Oğuz YOLDAŞ

Üye : Prof. Dr. Tamer TAŞDEMİR

Üye : Doç. Dr. Ertan Emek ONUK

Üye : Doç. Dr. Ebru DEMİRYÜREK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Elif KALYONCUOĞLU

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /

Doç. Dr. Aydın HİM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde bana yol gösteren danışmanım Sayın Doç. Dr. Ebru ÖZSEZER DEMİRYÜREK'e,

Tez çalışmamın ilk gününden itibaren proje başvurusu ve laboratuvar çalışmaları aşamalarında büyük özveri ile yardımını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ertan Emek ONUK'a ve Sayın Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ'ye,

Kriyojenik pulverizasyon işlemlerinde yardımlarını esirgemeyen İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Fakültesi Malzeme ve Metalürji Bölümü Araş. Gör. Emre TEKOĞLU'na,

Doktora eğitimim boyunca bana destek olan ve üzerimde emeği geçen tüm saygıdeğer Endodonti Anabilim Dalı Öğretim Görevlilerine ve Anabilim Dalı asistan arkadaşlarıma,

Teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel Teknik Araştırma Kurumu Hızlı Destek Programı 115S127 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖZET
ENDODONTİK İNFEKSİYONLARIN YENİ NESİL SEKANSLAMA
METODUYLA ANALİZİ

Amaç: Bu tez çalışmasının amacı primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda kanal içindeki mikrobiyotanın yeni nesil sekanslama tekniği ile bakteriyel komünite profilini araştırmaktır. Çalışmanın sıfır hipotezi, primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyonlar arasında mikrobiyal komünite profilleri açısından fark olmadığıdır.

Materyal ve Metot: Çalışmaya 20 primer endodontik ve 20 sekonder/persistan endodontik infeksiyonlu 40 diş dahil edildi. Dişler travmatik şekilde çekildikten sonra kriyojenik pulverizasyonla toz haline getirildi. Toz haline getirilen örneklerden mikrobiyal DNA ekstrakte edildi. 16S rRNA geninin V4 bölgesinde 454 GS FLX pirosekanslama analizi uygulandı.

Bulgular: 40 örnekten toplam 2.606.128 dizi okuması, örnek başına 64.700 adet kaliteli okuma gerçekleştirildi. Çalışmada toplam 14 filum, 29 sınıf, 47 takım, 85 aile, 160 cins ve 368 tür saptandı. Her iki grupta en sık saptanan filum Proteobacteria oldu. İki grup arasında filum, cins ve tür sayısı açısından anlamlı fark saptanmadı ($P>0,005$). 4 primer endodontik infeksiyon örneğinde *Methanibrevibacter oralis* ve *Candidatus nitrosoarchaeum limnia* arkeaları saptandı.

Sonuç: Sekonder/persistan endodontik infeksiyonların mikrobiyal komünitelerinin primer endodontik infeksiyonlar kadar çeşitli ve zengin olduğu gösterilmiştir. Primer endodontik infeksiyonlardan ilk defa Thaumarchaeota filumuna ait *Candidatus nitrosoarchaeum limnia* türü saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Endodontik infeksiyonlar; endodontik mikrobiyoloji; pirosekanslama; pulverizasyon

Cangül KESKİN, Doktora Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Nisan-2016

ABSTRACT
NEXT GENERATION SEQUENCING ANALYSIS OF ENDODONTIC
INFECTIONS

Aim: This thesis study aims to investigate the intracanal microbial profiles of primary and secondary/persistent endodontic infections using next generation pyrosequencing method. The null hypothesis was that there is no difference in diversity of overall bacterial community profiles of primary and secondary/persistent endodontic infections.

Material and Method: The study included a total of 40 teeth, which 20 of them with primary endodontic infection and 20 with secondary/persistent endodontic infections. Following atraumatic extraction, the specimens were cryogenically pulverized. Microbial DNA was extracted from tooth powders. 454 GS FLX pyrosequencing analysis was performed to V4 region of 16S rRNA gene.

Results: Pyrosequencing analysis resulted a total of 2.606.128 sequences from 40 specimens and 64.700 high quality sequences per specimen. 14 phylum, 29 class, 47 order, 85 family, 160 genera and 368 species were detected in all specimens. There was no statistically significant difference regarding diversity and richness of phylum, genera and species ($P>0.005$). *Methanibrevibacter oralis* and *Candidatus nitrosoarchaeum limnia* archaeas were identified from 4 samples.

Conclusion: The present pyrosequencing study demonstrates that persistent infections have as diverse bacterial community as primary infections. The archaea *Candidatus nitrosoarchaeum limnia* was detected in root canal of a tooth with endodontic infection for the first time.

Keywords: Endodontic infections; endodontic microbiology; pulverization; pyrosequencing

Cangül KESKİN, Ph.D. Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, April-2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

°:	Derece
%:	Yüzde
°C:	Derece santigrat
sn:	Saniye
mm:	Milimetre
µm:	Mikrometre
dk:	Dakika
ISO:	International Organization for Standardization
SPSS:	Statistical Package for Social Sciences
DNA:	Deoksiribonükleik asit
RNA:	Ribonükleik asit
rDNA:	Ribozomal DNA
rRNA:	Ribozomal RNA
Ig:	İmmunoglobulin
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
HCMV:	Human CitomegaloVirus
EPB:	Epstein Barr virüsü
VBNC:	Viable but not cultivable
Spp:	Several species
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
FISH:	Floresan in situ hibridizasyon
dNTP:	Dideoksinükleotit
ddNTP:	İşaretlenmiş dideoksinükleotit
YNS:	Yeni nesil sekanslama
ATP:	Adenozin trifosfat
APS:	Adenozin 5' fosfosülfat
Nm:	Nanometre
CCD:	Couple charged device
NTP:	Nükleosin trifosfat
V1-V9:	Hiperdeğişken bölgeler
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
PAI:	Periapikal İndeks
Gr:	Gram
No:	Numara
EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
Tris-HCl:	Trizma hidroklorit
G:	Gravitasyonel kuvvet
µL:	mikrolitre
ng:	Nanogram
QIIME:	Quantitative Insights Into Microbial Ecology

OTU:	Operasyonel taksonomik birim
AMOVA:	Molecular analysis of variance
N:	Örnek sayısı
M5NR:	Non-redundant protein database
UV:	Ultraviyole
pH:	Power of hydrogen
bp:	Baz çifti
kb:	Kilobaz
DGGE:	Denatüre gradyant jel elektroforezi



İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Endodontik infeksiyonların keşfi	5
2.2. Oral Kavitenin Mikrobiyolojisi	5
2.2.1. Sağlıklı İnsan Mikrobiyomu	5
2.2.2. Oral Mikrobiyomun Sistemik Sağlıkta Rolü	6
2.2.3. Sağlıklı Oral Mikrobiyomu Oluşturan Mikroorganizmalar	7
2.3. Mikroorganizmaların Pulpaya Ulaşım Yolları	11
2.4. Endodontik Mikrobiyom	14
2.5. Endodontik İnfeksiyon Tipleri	16
2.5.1. Primer Endodontik İnfeksiyonlar	17
2.5.2. Sekonder ve Persistan Endodontik İnfeksiyonlar	21
2.6. Endodontik Mikroorganizmalar Üzerindeki Coğrafik Etki	27
2.7. Kök Kanal Patojenlerinin Saptanmasında Kullanılan Geleneksel Yöntemler	27
2.7.1. Mikroskopi	27
2.7.2. Kültür yöntemi	28
2.7.3. Antibiyotik duyarlılık testleri	29
2.7.4. İmmünolojik yöntemleri	29
2.8. Kök Kanal Patojenlerinin Saptanmasında Kullanılan Güncel Yöntemler	30
2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Metotlar	32

2.8.2. DNA-DNA Hibridizasyonu	34
2.8.3. Gen Sekanslama	36
2.8.4. Biyoinformatik	44
2.8.5. Metagenomik Tekniklerin Limitasyonları	46
2.9. Kök Kanallarından Örnek Almada Kullanılan Teknikler	47
2.9.1. Kağıt kon ile örnek alma	47
2.9.2. Dentin tıraşlama ile örnek alma	48
2.9.3. Pulverizasyon	49
3. MATERYAL VE METOT	50
3.1. Örnek Hazırlanması ve Örneklerin Pulverizasyonu	50
3.2. Örneklerden DNA Ekstraksiyonu	57
3.3. 16S rRNA Geninin Yeni Nesil Sekanslama Metoduyla Analizi ve Biyoinformatik Analiz	58
3.4. İstatistiksel Analiz	59
4. BULGULAR	60
5. TARTIŞMA	70
5.1. Çalışmanın Tasarımı ve Metodolojisi	70
5.2. Primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda saptanan mikroorganizma profilleri	80
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
KAYNAKLAR	96
EK	117
ÖZGEÇMİŞ	119

1. GİRİŞ

Apikal periodontitis kök kanalındaki infeksiyonun diş kökü çevresindeki dokulara yayılıp gelişmesiyle meydana gelen bakteriyel biyofilm kaynaklı yaygın bir hastalıktır (Siqueira ve Rocas, 2009). Bakterilerin endodontik infeksiyonların etiolojisinde rol oynadığı ve bu etiolojinin heterojenik kaynaklı olduğu, yani tek bir bakteri türünün sorumlu patojen olmadığı kanıtlanmıştır (Tronstad ve Titterud Sunde, 2003). Böylece endodontik infeksiyonların incelenmesinde hedef patojen temelli çalışmaların yerini mikrobiyal komünite temelli çalışmalar almıştır.

Primer endodontik infeksiyonlar, nekrotize pulpaya ilk kez giriş sağlayan bakterilerin organizasyonu ile meydana gelen ve anaerobik bakterilerin çoğunlukta olduğu bir polimikrobiyal infeksiyondur (Siqueira ve Rocas, 2009). Sekonder endodontik infeksiyonlara, primer infeksiyonda ortamda olmayan ancak kök kanal sistemine hekim tarafından müdahale edildikten sonra oral floradan kök kanal sistemine geçiş sağlayan bakteriler neden olurlar (Ricucci ve Siqueira, 2010). Persistan endodontik infeksiyonlarda ise, kök kanal tedavisi esnasında kullanılan antimikrobiyallere direnç sağlamış ve böylece inatçı infeksiyonların gelişmesine neden olmuş mikroorganizmalar bulunurlar (Siqueira ve Rocas, 2008). Siqueira ve Rocas, sekonder ve persistan endodontik infeksiyonların klinik olarak ayırt edilemeyeceğini bildirmişlerdir (Siqueira ve Rocas, 2008). Endodontik infeksiyonların meydana gelmesinde multibakteriyel kombinasyonlar rol oynadığından başarılı bir endodontik tedavinin amacı kök kanal sisteminde yer alan tüm bu bakteri yükünün kalitatif ve kantitatif olarak azaltılmasıdır (Subramanian ve Mickel, 2009). Ancak kök kanal sisteminin etkili temizlenmesine, şekillendirilmesine, sızdırmaz şekilde doldurulmasına ve dişe uygun bir restorasyonun yapılmasına rağmen endodontik tedavi başarısızlığı olarak persistan endodontik infeksiyonlar gelişebilmektedir.

Endodontik infeksiyonlar tüm dünyada orofasiyal ağrı, lokalize ve yaygın dental infeksiyonlar ve diş kayıplarının başlıca nedeni olarak gösterilmiştir (Eckerbom ve ark., 1992). Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 5.1 milyon primer endodontik infeksiyon vakasının tedavi edildiği rapor edilmiştir. (Amerikan Diş Hekimleri Birliği, 2007; Hsiao ve ark., 2012; Fouad ve Burleson, 2003). Uygulanan endodontik tedavilerin %70'ini vital pulpalı dişlerin, %30'unu primer ve

sekonder/persistan infeksiyon vakalarının oluşturduğu tahmin edilmektedir (Fouad ve Burleson, 2003). Bu da yılda 500.000'i aşkın endodontik infeksiyon hastası anlamına gelir. Ülkemizde 2012 yılı içinde sadece Sağlık Bakanlığı'na bağlı kurumlarda yapılmış 1.572 milyon kök kanal tedavisi rapor edilmiştir, ancak ilgili indekslerde vital-infekte pulpa ayrımı yapılmadığından tedavi edilen endodontik infeksiyonlu vaka sayısına ulaşılammıştır (Sağlık Bakanlığı Faaliyet raporu, 2012). İnfeksiyon varlığında yapılan endodontik tedavinin başarısının ve dişlerin kurtarılma oranının ciddi şekilde düştüğü gösterilmiştir (Tronstad ve Titterud Sunde, 2003; Fouad ve Burleson, 2003). Buna ek olarak dental infeksiyonların, yayılarak mediastenit, fatal nekrotizan fasiit (Bonapart ve ark., 1995) veya beyin apselerine (Corson ve ark., 2001) yol açacak sistemik komplikasyonlar oluşturduğu bildirilmiştir.

Endodontik infeksiyonlar geçmişte kültür yöntemleriyle analiz edilmiştir ancak güncel çalışmalar oral mikrobiotanın %50'sinden fazlasının kültür yöntemleriyle temsil edilemediğini ortaya koymuştur (Paster ve ark., 2001). Güncel metotlar, oral florada 700'den fazla bakteri türünü tanımlamıştır. Bu bakterilerin %50'si 16S rRNA gen sekanslama ile saptanmıştır (Paster ve ark., 2001). Bununla beraber, moleküler çalışmalarda, farklı coğrafi bölgelerde yaşayan ve aynı endodontik infeksiyona sahip bireylerde saptanan mikrobiotanın, bakteriyel türlerin dağılımı ve sayısı bakımından anlamlı farklılıklar gösterdiğini rapor edilmiştir (Siqueira ve Rocas, 2009). Bu verilerin ışığı altında, günümüzde belirli bir populasyondan alınan örneklerde, komünite profil çalışmaları yapılmıştır (Hong ve ark., 2013; Tzanetakı ve ark., 2015). Bu çalışmalar sayesinde, endodontik infeksiyonlarda yeni türlerin identifikasyonu yapılmıştır (Schirrmeister ve ark., 2009; Tennert ve ark., 2013). Coğrafyalar arası mikrobiotadaki kalitatif ve kantitatif farklılıklara rağmen, dünyanın her yerinde kök kanal tedavisi sırasında kullanılan dezenfektan materyaller ve protokolleri genellikle aynıdır. Bu durum, tüm kurallara uygun endodontik tedavi uygulanmasına rağmen tedavi başarısızlıklarının varlığını açıklamada önemli bir noktadır.

Kök kanal sistemi, kanallar arası bağlantılar, ana kanaldan ayrılan yan kanallar gibi düzensizlikleri ve dentin tübüllerini içeren kompleks bir yapı gösterir (Vertucci, 1984). Bu anatomik yapı, mikrobiyoloji çalışmaları için kök kanal

mikrobiotasını ideal şekilde temsil eden bir örnek alınmasını engeller. Kök kanallarından örnek almak için en sık kullanılan teknik steril kağıt kon ile örnek alma tekniğidir. Ancak, kanala yerleştirilen kağıt konun yalnızca ana kanal ile temasa geçebilmesi ve dolayısıyla ana kanalda yer alan mikroorganizmalardan örnek alınması; kanal sistemindeki düzensizliklerde, yan kanallarda ve dentin tübüllerinde yer aldığı bilinen mikroorganizmaların çalışmalarda saptanamayacağı anlamına gelmektedir. Pulverizasyon, çekilmiş dişlerin likit nitrojen sıcaklığında dondurulup mekanik etkiyle toz haline getirildiği, dolayısıyla kök kanal sisteminin total mikrobiotasının temsil edilebilme şansının daha yüksek olduğu bir örnekleme tekniğidir (Alves ve ark., 2009). Pulverizasyon tekniğinin, kağıt kon ile örnek alma tekniğine göre daha çok sayıda ve daha fazla türde bakteriyi saptayabildiği gösterilmiştir (Tran ve ark., 2013)

Çalışmamızın amaçları Samsun ve çevre illerden, diş çekimi için üniversitemize başvuran hastaların primer veya sekonder/persistan endodontik infeksiyon tanısıyla çekilen dişlerinden pulverizasyon tekniği ile elde edilen mikrobiyal DNA'nın yeni nesil sekanslama tekniği olan pirosekanslama metodu ile metagenomik analizini yapmak ve elde ettiğimiz bulgular sayesinde farklı hastalıklarda saptanan mikrobiyal komüniteleri karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Endodontik infeksiyonların keşfi

Kök kanallarında canlı organizmaların varlığından bahseden ilk kişi, 17. yüzyılda yaşamış bilim insanı Antony van Leeuwenhoek'tur (Dobell, 1932). Ancak kök kanalındaki bu mikroorganizmaların apikal periodontitis ile ilişkilendirilmeleri 200 yıl sonra olmuştur. Robert Koch'un laboratuvarında çalışan Amerikalı diş hekimi Willoughby Dayton Miller (1890), "The Microorganisms of the Human Mouth" adlı kitabında çürük ve çürük olmayan dişleri karşılaştırarak dentin tübüllerinde bakteri invazyonundan bahsetmiştir. 1894 yılında Miller'ın apikal periodontitisle bakteriler arasında bir ilişki olabileceğini belirttiği, endodonti için dönüm noktası olan çalışması yayınlanmıştır. Miller bu çalışmada, kök kanallarından elde ettiği örneklerde o zamanın sınıflamasıyla kok, basil ve spiroket morfolojisindeki bakterileri saptamıştır. Endodontik mikrobiyotanın morfolojik olarak kökün koronal, orta ve apikal üçlüsünde farklılık gösterdiğini rapor etmiştir. Ayrıca spiroketlerin apseli vakalarda daha çok bulunduğunu belirtmiştir ve bu tür bakterilerin apse gelişiminde rolü olabileceğini bildirmiştir. Çalışmalarının sonuçlarına göre Miller (1894), bu bakterilerin apikal periodontitisin gelişiminde rolü olabileceği hipotezini kurmuştur.

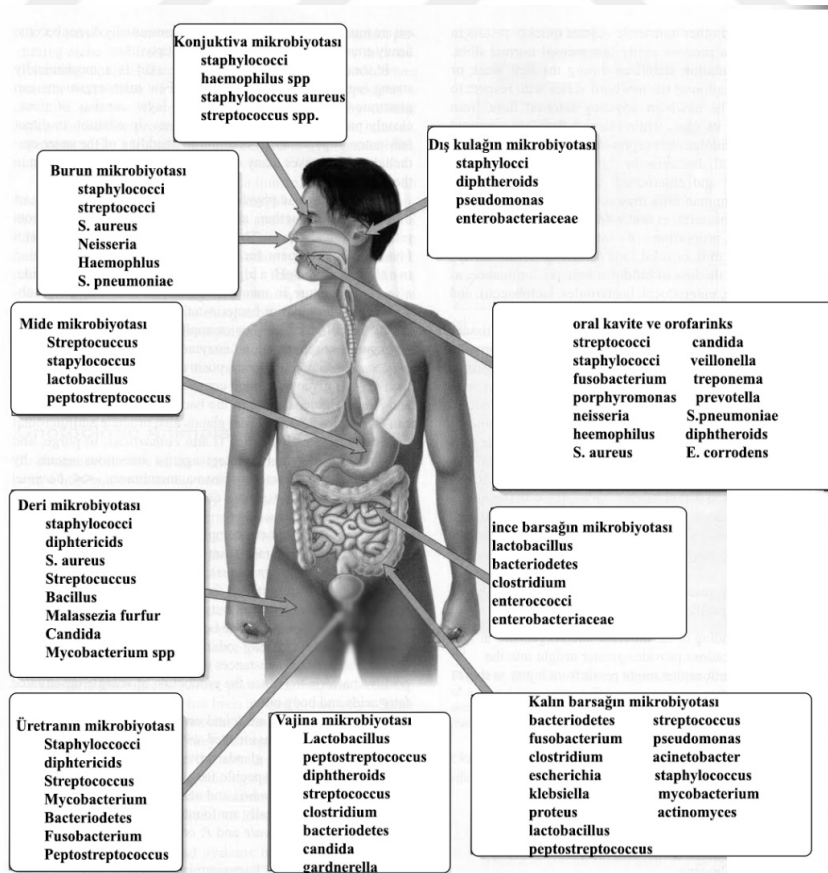
20. yüzyılın ilk yarısında bakteriyel invazyon teorisi boş tüp teorisinin gölgesinde kalmış (Rickert ve Dixon, 1931; Dixon ve Rickert, 1933) ve 60'lı yıllarda Keyes ve Kakehashi'nin çalışmalarına kadar da ispatlanamamıştır. Keyes (1960), genobiyotik hayvanlarda, karyojenik gıdalarla beslendikleri halde diş çürüğünün meydana gelmediğini göstermiştir. Kakehashi ve ark. (1965), immunokompresif ve kontrol grubundaki normal sıçanların pulpa dokusunu ağız ortamına açık bıraktıkları çalışmalarında, mikroorganizma varlığının endodontik infeksiyonların gelişmesindeki önemini göstermişlerdir. 20 yıl sonra Kakehashi ve ark.'nın çalışması benzer koşullar altında tekrar edilmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Patterson ve Watts, 1987). Günümüzde, endodontik infeksiyonların primer etiyolojik faktörününün patojen mikroorganizmalar olduğu bilinmektedir (Love, 2009).

Sundqvist (1976), travma sonrası nekrotik hale gelmiş kök kanallarından aldığı örnekleri anaerobik kültür teknikleri uygulayarak incelemiş ve sonuç olarak bakterilerin sadece radyolojik olarak apikal periodontitis tanısı konmuş dişlerden izole edilebildiğini göstermiştir. Möller ve ark. (1981), hayvan çalışmalarında devital hale getirdikleri maymun dişi pulparlarında, ancak ortama bakteri girişi sağlanırsa apikal periodontitis gelişebildiğini rapor etmiştir. Bu çalışmalar, apikal periodontitisin infeksiyöz bir hastalık olduğu kadar, nekrotik pulpanın tek başına apikal periodontitise neden olamayacağını gösterdikleri için de oldukça önemlidir.

2.2 Oral Kavitenin Mikrobiyolojisi

2.2.1 Sağlıklı İnsan Mikrobiyomu

Sağlıklı insan vücudu hem sağlığı idame ettirmede hem de hastalıkların gelişmesinde rol oynayan konağa özgü birçok mikroorganizma toplulukları içerir. Patojenik, kommensal ve simbiyotik olabilen bu mikroorganizmaların meydana getirdikleri ekolojik topluluğa “mikrobiyom” adı verilir.



Şekil 1. Sağlıklı insan mikrobiyomu (McGraw-Hill, 2009'dan uyarlanmıştır)

Mikrobiyom ve bu mikrobiyomu oluşturan mikroorganizmaların genetik materyalleri insan mikrobiyotasını oluşturur. İnsan ve mikrobiyotası supraorganizmayı meydana getirirler (Lederberg ve McCray, 2001). İnsan mikrobiyomundaki üye sayısı insan vücudunu oluşturan hücre sayısından 10 kat daha fazladır (Turnbaugh ve ark., 2009). İnsan vücudunda çeşitli mikroorganizmaların bulunduğu birçok mikrobiyom vardır. Mikroorganizmalar kendilerine özgü belirli atmosferik ve besinsel içeriği olan ekosistemler oluştururlar ve bu ekosistemler mikroorganizmaların kendileri içinde ve konakla olan simbiyotik ilişkilerinin devamlılığını sağlarlar. Bu karmaşık mikrobiyomlar deride, oral kavitede, farinkste, vajinal mukoza ve barsak mukozasında normal şartlar altında bulunurlar ve konak sağlığının sürdürülmesinde rol oynarlar (Wilson, 2008) (Şekil 1).

2.2.2 Oral Mikrobiyomun Sistemik Sağlıkta Rolü

Kommensal mikrobiyota oral ve sistemik sağlığın korunmasında önemli rol oynar. Bakteriler arasında ekolojik dengenin sağlanmasıyla patolojik değişiklikler ve hastalık oluşumu önlenir. Oral mikrobiyom üyelerinin varlığı patojen türlerin kolonizasyonunu engeller, buna kolonizasyon direnci fenomeni denir (Vollard ve Clasener, 1994). Ağız içindeki birçok yüzey, flora üyesi mikroorganizmalar tarafından kolonize edildiğinden patojen türlerin tutunacağı yüzey alanı az orandadır. Bu fenomenin etkisi antimikrobiyal kullanımında flora üyeleri zarar görüp *Candida* ve *S. aureus* türleri fırsatçı infeksiyonlara yol açtığına ortaya çıkar (Sullivan ve ark., 2001).

Bazı flora bakterilerinin patojen türler üzerine antagonistik etkisi de vardır. *S. salivarius* K12 suşu periodontitis ve halitozis ile ilişkilendirilmiş Gram negatif türlere inhibe edici etki gösteren bakteriosin üretir (Burton ve ark., 2006; Wescombe ve ark., 2009).

Oral mikrobiyotanın başka bir faydalı özelliği de nitrat metabolizması ve kardiyovasküler sistemle ilişkisidir. Sindirilen nitratin %25'i entero-saliva yoluya ağız ortamına geri döner. Oral bakteriler nitrati nitrite indirgerler, bu nitrit gastrik emilimle kan akımına geçer ve nitrit oksite dönüştürülür. Nitrit oksit bu mekanizma ile damar esnekliğini ve elastikiyetini sağlarken, antihipertansif etki de gösterir

(Kapil ve ark., 2010). Oral bakterilerin bu mekanizmadaki rolleri antimikrobiyal gargara kullanan deneklerde nitrat alımına rağmen plazmadaki nitrit oranının düşük bulunmasıyla ortaya konmuştur (Govoni ve ark., 2008). Ratlarda antimikrobiyal kullanımının nitrat seviyesini düşürerek düşük kan basıncına yol açtığı rapor edilmiştir. Nitrat metabolizmasının sağlıklı işleyişi hipotansiyon ve ilgili kardiyovasküler bozuklukların önlenmesi açısından önemli bulunmuştur (Pettersson ve ark. 2009).

2.2.3 Sağlıklı Oral Mikrobiyomu Oluşturan Mikroorganizmalar

Oral mikrobiyom üyeleri insanlarda en sık görülen iki infeksiyöz hastalığın, diş çürüğünün ve periodontal hastalığın nedeni olmaktadır. Bu mikrobiyomu bakteriler, virüsler, protozonlar, mantarlar ve arkealar farklı sayı ve kompozisyonda meydana getirmektedirler. Oral mikrobiyomda bulunan bakteriler 1000'den fazla bakteri türü içeren kolon mikrobiyomundan sonraki en karmaşık mikrobiyomu oluşturur (Dewhirst ve ark., 2010; Human Genome Project Consortium, 2012). Oral mikrobiyom, simbiyotik ilişkide olan mikroorganizmaların sürekli kolonizasyonunun sonucudur. Ancak, uygun koşullar meydana geldiğinde, normal oral mikrobiyom üyeleri patojen hale gelebilirler. Patojenite bir mikroorganizmanın hastalık yapma becerisi olarak tanımlanmaktadır (Baumgartner ve ark., 2008). Fırsatçı patojenler diş pulpası veya periradiküler dokular gibi vücudun normal steril alanlarına ulaştıklarında hastalıklara neden olabilirler. Mikroorganizmaların patojenite dereceleri “virülans” olarak adlandırılır. Patojenik cevap ise, mikroorganizmalara konak tarafından oluşturulan nonspesifik inflamatuvar ve spesifik immünolojik reaksiyonları içerir (Baumgartner ve ark., 2008).

Oral mikrobiyomun içeriğini kesin olarak belirlemek güçtür. Özel bir mikroorganizma türünün uzun dönemli kolonizasyonunu da kestirmek oldukça güçtür. Çünkü oral mikrobiyom oral kavitenin çevreyle olan devamlı ilişkisinden ötürü dış ortamlara açık dinamik bir yapıdadır. Dolayısıyla oral mikrobiyom vücuttaki diğer mikrobiyomlardan farklı olarak gıda, hava, su, sosyal temas gibi yollarla dış ortama ve başka bireylerin oral mikrobiyomuna karşı kendini savunacak şekilde evrimleşmiştir. Bununla beraber oral mikrobiyomda kolonize olamayan birçok bakteri türü de vardır. Buna sebep olarak ekzojen bakterilerin oral yüzeylere

tutunmasını sağlayan reseptörlerden yoksun olmaları ve konağın bağışıklık sistemi tarafından elimine edilmeleri gösterilmiştir (Wade, 2013). Oral hijyen uygulamaları da mikrobiyal ekosistem üzerine yıkıcı etki göstermektedir.

İnsan mikrobiyomu “temel mikrobiyom” ve “değişken mikrobiyom” olmak üzere ikiye ayrılır (Turnbaugh ve ark., 2007). Temel mikrobiyom her bireyde ortak bulunur ve sağlıklı koşullar altında vücudun farklı bölgelerindeki predominant türlerce oluşturulurken; değişken mikrobiyom bireye özgüdür ve bireyin yaşam tarzı, fenotipik ve genotipik belirleyicilerin etkisi altında evrimleşmiştir (Turnbaugh ve ark., 2007; Zaura ve ark. 2009) (Şekil 2). Temel mikrobiyomu oluşturan baskın filotipler homeostazinin idamesini sağlar.



Şekil 2. Temel ve değişken insan mikrobiyotası ve meydana gelmelerine etki eden faktörler (Zaura, 2009'dan uyarlanmıştır)

Virüsler

Oral mikrobiyomda virüsler genellikle hastalıklarla ilişkili halde bulunurlar. Kabakulak ve kuduz virüsleri tükürük bezlerini infekte ederler ve hasta bireylerin tükürüklerinden izole edilebilirler. HIV ve hepatit gibi kanla bulaşan virüsler gingival sulkus sıvısından oral ortama geçebilirler. Üst solunum yolu infeksiyonu

etkeni virüsler hastalığın akut fazında oral ortamda bulunabilirler (Wade, 2013). Herpes simpleks virüsü vücuda ilk girdiğinde gingivostomatite yol açar ve trigeminal ganglionlara yerleşir. Bağışıklık sistemini tehdit eden bir dış etkene cevaben yeniden aktif olabilir (Scott ve ark., 1997).

Prida ve ark. (2012), virüslerin oral ekosistemdeki rolünü araştırdıkları metagenomik çalışmalarında 5 farklı bireyden 60-90 gün boyunca tükürük örneği alıp virüslerin 16S rRNA incelemesini yapmışlardır. Elde edilen virom sekanslarının birçoğunu bakteriyi infekte eden virüsler olan bakteriyofajların oluşturması, yazarlara göre oral mikrobiyomdaki bakterilerin çeşitliliği ve sayısı düşünüldüğünde normal kabul edilmekteydi.

Protozonlar

Günümüze kadar sadece iki protozon normal oral mikrobiyomdan izole edilmiştir. Bunlar, *Entamoeba gingivalis* ile *Trichomonas tenax*'tır. Oral hijyeni düşük hastalarda saptanmaları nedeniyle önceleri patojen olarak değerlendirilseler de zayıf oral hijyenle ilişkilerinin beslenme amaçlı olduğu belirlenmiştir. Protozonlar için, fazla miktardaki gıda debris ve bakteriler önemli besin kaynaklarıdır (Wantland ve ark., 1958).

Funguslar

Sağlıklı insanların oral mikrobiyomunda fungusların varlığını araştıran metagenomik bir çalışmada 20 sağlıklı denegin oral mikrobiyomunda 85 fungus cinsi saptanmıştır. *Candida* başta olmak üzere bu cinsler; *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Cryptococcus*'tur (Ghannoum ve ark., 2010).

Candida cinsine mensup birçok fungus iyi huylu, kommensal veya fırsatçı patojen özellik gösterebilmektedir. *Candida*, prevalansı yaşla artacak şekilde toplumun neredeyse yarısında semptom oluşturmaksızın bulunmaktadır (Arendorf ve Walker, 1979). *Candida* cinsine mensup 200'e yakın fungus türünün yedi tanesi oral kaviteden izole edilmiştir. *C. albicans* oral kaviteden en sık izole edilen *Candida* cinsi üyesidir. Diğer türler rastlanma sıklığına göre; *C. glabrata*, *C.*

tropicalis, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis*'tir (Sen ve Baksi, 2009).

Candida türleri supragingival ve subgingival dental plaktan (Eliasson ve ark., 2006; Beighton ve Lynch, 1995; de Carvalho ve ark., 2006), primer radiküler dentin çürüğünden (Lynch ve Beighton, 1994; Beighton ve Lynch, 1995) ve koronal dentin çürüğünden izole edilmiştir (Hossain ve ark., 2003).

Arkealar

Arkealar oral mikrobiyomun çok küçük bir kısmını meydana getirirler ve oral mikrobiyomda bulunan arkealar ise çoğunluğu metanojen grubuna mensup az sayıda türü içerir. Metanojen arkealar insanların, geviş getiren hayvanların ve termitlerin sindirim sistemlerinde bulunur ve patojen olarak kabul edilmezler (Lepp ve ark., 2004). Sağlıklı bireylerin oral kavitealarında bulunabilirler ancak görülme sıklıkları ve sayıları periodontal hastalıkla doğru orantılı olarak artar. Günümüze dek saptanmış arkealar türleri *Methanobrevibacter oralis* ve iki isimlendirilmemiş *Methanobrevibacter* sınıfı üyesi; *M. curvum/congolense* ve *M. mazeii*'dir (Lepp ve ark., 2004; Matarazzo ve ark., 2011).

Bakteriler

Oral kavitede 700'den fazla bakteri türü bulunmaktadır ve bu bakteriler oral kavitenin sağlığının ve fizyolojik koşullarının idame ettirilmesinden sorumludur (Zarco ve ark., 2012). Oral kavitede dişler, gingival sulkus, dil, yanaklar, sert ve yumuşak damak ve tonsiller olmak üzere farklı mikrobiyal toplulukların tutunup gelişebileceği farklı özelliklerde yüzeyler vardır (Dewhirst ve ark., 2010). Aas ve ark. (2005), farklı bakterilerin aynı oral kavite içinde farklı bölgelerde kolonize olmayı tercih ettiğini; maksillanın, sert damağın, yumuşak damağın ve hatta dilin dorsal kısmı ile lateral kısmının birbirinden farklı bakteriyel profiller gösterdiğini rapor etmiştir.

Sağlıklı ve hastalıklı bakteriyel flora birbirlerinden oldukça farklıdır. Bu farklılık öncelikle sağlıklı koşullar altındaki temel mikrobiyom profilini araştırma gereksinimini doğurmuştur (Aas ve ark., 2005). Bu sayede hem sağlıklı mikrobiyomun tanımını daha sağlıklı yapabilmek hem de sağlıktan hastalığa geçişte

meydana gelen moleküler değişiklikleri ortaya koymak mümkün olacaktır. Çeşitli moleküler genetik çalışmalarında birbirleriyle ilişkileri bulunmayan farklı bireylerden aynı bakteriyel DNA sekansı (dizi) elde edilmiştir (Zaura ve ark., 2009; Bik ve ark., 2010). Bununla beraber, Bik ve ark. (2010) örnek birey başına yapılan çalışmalar arasındaki en kapsamlı DNA sekans okumasını gerçekleştirdikleri çalışmalarında bireyler arasında mikroorganizmaların cinsleri ve miktarları açısından belirgin farklılıkların da olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar çalışmalarında, özetle sağlıklı bir oral kavitede en sık saptanan cinslerin sırasıyla; *Streptococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Gamella*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Nisseria*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Eubacteria* ve *Propionibacterium* olduğunu rapor etmişlerdir (Aas ve ark., 2005; Jenkinson ve Lamont, 2005; Wilson, 2008; Bik ve ark., 2010). Filum düzeyinde; Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes, TM7, Sulphur River 1 (SR1), Choloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus ve Acidobacteria olmak üzere 13 ayrı filum saptanmıştır.

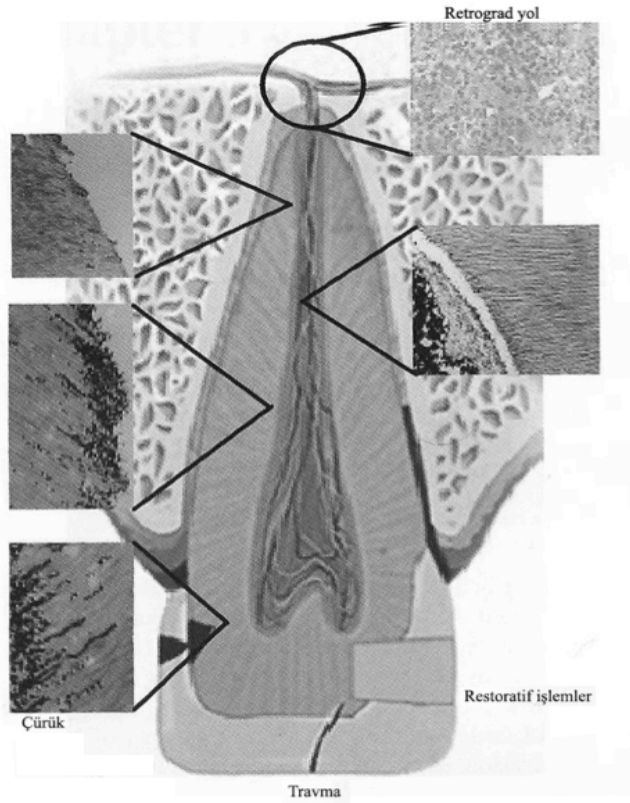
Zaura ve ark. (2010), üç sağlıklı deneğin oral kavitesinde çeşitli bölgelerden aldıkları örneklerin metagenomik incelemesi sonucu temel mikrobiyomu sekiz bakteri filumunun oluşturduğunu rapor etmiştir. Bu filumlar saptanma sıklıklarına göre, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes ve TM7 olarak belirtilmiştir.

2.3 Mikroorganizmaların Pulpaya Ulaşım Yolları

Dentinin üzerini örten mine ve sement dokuları, normal şartlar altında oral kavitedeki mikroorganizmaların pulpodentinal komplekse girişini engelleyerek pulpodentinal kompleksin koruyuculuğunu yapar. Bu dokuların bütünlüğü patoloji, travma, restoratif, protetik veya periodontal işlemler sonucunda bozulduğunda dentin tübülleri oral kavitedeki bakteri ve ekzojen ürünlerin pulpa ve periradiküler dokulara ulaşımı için geçiş kanalları görevi görür (Siqueira ve Rocas, 2011) (Şekil 3). Dentin tübülleri tüm dentin boyunca uzanırken, pulpaya komşu dentinde en geniş çapa (2.5 µm), mine ve sement yakınındayken ise en dar çapa (0.9 µm) ulaşır (Garberoglio ve Brännström 1976). Ancak dentin tübüllerinin en dar çapı bile,

boyutları ortalama 0.2-0.7 µm arasında değişen mikroorganizmaların tübüllere penetrasyonunu engelleyemez (Siqueira ve Rocas, 2011). Mikroorganizmaların pulpaya ilk ulaştıkları andan tüm kök kanal sisteminin infeksiyonuna kadar geçen süre tahmin edilemez; ancak pulpası nekrotik dişlerde invazyonun daha hızlı gerçekleştiği bilinmektedir (Nagaoka ve ark. 1995). Canlı pulpodentinal komplekste dentin lenfinin hareketi, tübüler skleroz ve reperatif dentin formasyonu gibi savunma mekanizmaları bakteri invazyonuna direnç gösterir. Eğer infeksiyon bu yollarla elimine edilemezse pulpitis, pulpa nekrozu ve inflamatuvar periapikal doku hastalıkları meydana gelir (Love, 2009).

Mikroorganizmaların invazyonu en sık koronal yolla meydana gelmektedir. Mikroorganizmalar, rk lezyonu, abrazyon, erozyon, atrizyon, çatlak ve travma gibi sebeplerle diş dokularının kaybı sonucunda pulpaya ulaşabilir. Hatalı operatif işlemlerde tükürük kontaminasyonu ve sızdıran restorasyonlar pulpanın istilasına yol açabilir. Dentin kalınlığının aşırı azalmadığı ve dentin permeabilitesinin aşırı artmadığı koşullarda, pulpa vitalitesini koruduğu müddetçe dentin, ağız ortamına açık olsa bile kritik bir infeksiyon geçiş yolu teşkil etmez (Siqueira ve Rocas, 2011). Vital dentinde tübül içeriği tam olarak bilinmese de, albumin ve immunoglobulin G (IgG) içeren seruma benzediği ne sürülmüştür (Knutsson ve ark., 1994). Tübüller kavite preparasyonundan sonra fibrinojen gibi kan proteinleri de içerebilirler (Knutsson ve ark., 1994; Izumi ve ark. 1998). Alveol kemiği, periodontal ligament ve tükürükten köken alan benzer moleküller devital radiküler ve koronal dentin tübüllerinde yer alabilir. Yapılan *in vitro* alışmalarda albumin, fibrinojen ve IgG içeren dentin tübüllerinin bakteri invazyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Pashley ve ark., 1982; Hahn ve Overton, 1997; Love 2002). Bu moleküller, bakteri hücreleriyle reaksiyona girmekte veya tübülleri fiziksel olarak tıkayarak permeabiliteyi azaltmaktadır.



Şekil 3. Mikroorganizmaların pulpaya giriş yolları (Love, 2004'ten uyarlanmıştır)

Mikroorganizmalar ve ürünleri ilerleyen periodontal hastalık veya periodontal prosedürler sonucunda foramen apikale, aksesuar kanallar, lateral kanallar ve furkasyon kanalları yoluyla retrograd olarak da pulpaya ulaşabilirler. İatrojenik kök perforasyonları da bakterilerin periodontal dokular ile pulpa arasında bağlantı yolu oluşturur. Periodontal cep derinliğinin apikal foramene kadar ilerlediği durumlarda burada bulunan ana kan damarlarının hasarı sonucu pulpa nekrozu meydana geldiği gösterilmiştir (Langeland ve ark., 1974). Mikrobiyal dental plağın major bakterileri *Streptococcus* ve *Actinomyces* türleri, dentin tübüllerinde ve pulpada infeksiyon başlatabilmekte ve *Prevotella intermedia* ve *Porphyromonas gingivalis* gibi türlerin kolonizasyonunu kolaylaştırarak infeksiyonun gelişmesine yol açmaktadırlar. Sağlam bir sement dokusu bakteri invazyonunun sınırlanması için esastır. Sementin zarar gördüğü durumlarda dentin tübüllerinde bakteri penetrasyon derinliğinin arttığı gösterilmiştir (Haapasalo ve Orstavik, 1987). Oral

kaviteye açık hale gelmiş sement ince ve devamlılık göstermeyen yapıda bir dokudur (Moskow, 1969) ve Sharpey liflerinin bağlantı noktalarında yüzey defektleri gösterir (Adriaens ve ark., 1987). Sement dokusunun yüzeyinde dişeti oluşu sıvısı, bakteri enzimleri ve asidik ürünlere maruz kalması sonucu fiziksel ve kimyasal değişiklikler meydana gelir (Daly ve ark., 1982; Eide ve ark., 1984). Dolayısıyla bakterilerin dentin tübüllerine invazyonu, sement tabakası hasar gördükten sonra meydana gelir. Benzer şekilde, periodontal prosedürler sonucu sement dokusunun tahrip edilmesi ve/veya uzaklaştırılması bakterilerin radiküler dentine invazyonunu kolaylaştırır.

Mikroorganizmaların pulpaya giriş yollarından bir diğerinin anakorezis olduğu iddia edilmiştir (Gier ve Mitchell, 1968). Anakoreziste, mikroorganizmalar damarı terk edip doku hasarı olan bölgeye kan veya lenf yoluyla ulaşır bu dokularda infeksiyona yol açarlar (Robinson ve Boling, 1941). Ancak bu yolla kök kanal infeksiyonunun gelişebileceğine dair açık bir kanıt yoktur. Deneysel olarak infekte edilmiş kan akımı kullanılan bir çalışmada; ancak bakteriyemi esnasında overenströmantasyon yapılarak periodontal kan damarlarına hasar verilip, kanal içine kan akımı sağlandığında kanalda bakteriye rastlanmıştır (Delivanis ve Fan, 1984). Anakorezis teorisine karşı başka bir sav, Möller ve ark. (1981) tarafından, 6 ay boyunca takip ettikleri aseptik nekrotik pulpalı dişlerde bu süre zarfında bakteri saptamadıkları çalışmalarına rapor edilmiştir. Bununla beraber travmaya uğramış dişlerde, anakorezis endodontik infeksiyonların nedenlerinden biri olarak kabul edilse de; mevcut kanıtlar bu dişlerin mine çatlaklarından açığa çıkan dentin yoluyla infekte olduğunu göstermektedir (Love, 1996; Love ve Jenkinson, 2002).

2.4 Endodontik Mikrobiyom

Oral kavitede yer alan tüm bakterilerin kök kanal boşluğunu istila etmek için eşit fırsatı vardır ancak infekte kök kanallarından yalnızca sınırlı ve belirli bir grup bakteri izole edilir (Kantz ve Henry, 1974). Kök kanallarını istila potansiyeli olan bakteri sayısı ile istila eden bakteri sayısı arasındaki farkı kök kanalının çevresel şartları belirler. Oral kavitede yaşayan birçok bakteri türü dentin tübüllerini invaze edecek virülans özellikleri göstermez veya tübüller içinde hayatta kalamazlar. Bu anaerobik ortamda mikrobiyomun içeriğini belirleyen, mikroorganizmalar

arasındaki ilişki ve besin miktarıdır. Kök kanal infeksiyonu, farklı bakteri türlerinin farklı zamanlarda baskın olduğu dinamik bir süreçtir. Mikrobiyom içeriğindeki değişiklikler özellikle oksijen gerilimi ve besin varlığı gibi çevresel şartlara bağlı meydana gelir. Pulpal infeksiyon sürecinin başlangıcında fakültatif bakteriler baskın olurlar. Günler, haftalar sonra kök kanallarındaki oksijen nekroz ve fakültatif bakteri aktivitesi sonucunda tükenir. Oksijen desteği kan akımının olmamasıyla kesilir. Anaerobik bir çevre gelişir ve zorunlu anaerobik bakterilerin yaşaması ve büyümesi için elverişli bir ortam oluşur. Zamanla özellikle, kanal apikalinde anaerobik şartlar daha da belirginleşir, sonuç olarak anaeroblar fakültatif bakteriler oranla artarak mikrobiyomun dominant türleri olurlar (Siqueira ve Rocas, 2011).

Çürük lezyonunda veya tükürükte bulunan bakteriler, pulpa dokusunda doğrudan veya dentin tübülleri yoluyla bakteriyel ürünlerini göndererek indirekt yollarla pulpaya ulaşırlar. Pulpaya genellikle karyojenik bakterilerden birkaçı ilk olarak ulaşırlar. Pulpal inflamasyonun erken dönemlerinde pulpada saptanan immunoglobulinlerin *A. israelii*, *A. naeslundii*, *Eubacterium alactolyticum*, *L. casei*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *S. mutans* ve *Veillonella parvum*'a özgü oldukları saptanmıştır (Hoshino, 1984). Bu bakteriler hem konak savunmasına karşı koymak hem de besin bulup yaşamlarını devam ettirmek zorunda olan sakkarolitik türlerdir ve kök kanal sistemine giriş sağlayan ilk bakteri türleri olmalarından ötürü öncü patojenler olarak adlandırılırlar. Öncü patojen türleri apikal periodontitisin başlangıcında büyük önem taşır çünkü kök kanal sistemindeki ekoloji öncü türlere bağlı olarak gelişir (Sundqvist, 1994).

Erken pulpitiste *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Actinomyces* ve *Rothia* cinsleri floraya egemen bakteri cinsleridir. Pulpaya giriş sağlayan bakteriler pulpodental kompleksi izleyerek kanal ağızlarına doğru ilerlerler. Sakkarolitik bakteriler bağ dokunun ekstraselüler komponentini ve dokulardaki oligosakkaritleri parçalamaya başlarlar. Bu dönem “karbohidrat fermentasyon fazı” olarak adlandırılır. İnfeksiyonun bu erken fazında ortamda proteolitik bakteriler ya hiç yoktur ya da çok az sayıda bulunurlar. Bakterilerin kanal ağızlarına ulaşmalarıyla pulpada venöz staz meydana gelir. Azalan veya duran kan akımının etkisiyle bakterilerin sayıları logaritmik olarak artar ve pulpa nekrotik hale gelir.

Nekrotik pulpada aktif kan dolaşımı olmadığından bakteriler konak savunmasından da korunurlar (Aydın, 2012).

Azalan kan akımı ve artan bakteri popülasyonu kök kanal sisteminin ekolojik ortamını anaeroblar lehine değiştirir. Redüksiyon potansiyeli düşerken, ortamdaki sakkarolitik bakteriler karbohidratlar tükenmeye başladığından azalmaya ve yerlerini hem sakkarolitik hem de proteolitik bakterilere bırakırlar. Bu evre glikolipit fermentasyon fazı olarak isimlendirilir. Bu evrede kök kanal sisteminin baskın bakteri cinslerini *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* ve *Prevotella* oluşturur. *Bacteroidetes pneumosintes*, *B. ureolyticus*, *P. denticola*, *P. buccae* ve *Eubacterium* türleri önce koronal daha sonra radiküler pulpada sayıca artmaya başlar (Sundqvist, 1992). Artan bakteri sayısı, bakteri ürünleri ve immun reaksiyonlar sonucu foramen apikalede ikinci venöz staz meydana gelir. Protein fermentasyon fazının başlamasıyla bakteri çeşitliliğinde azalma meydana gelir ve ekolojiye uyum sağlayan bakterilerin sayısı artar. *Actinomyces*, *Bacteroidetes*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Selemonas*, *Veillonella* ve *Wolinella* cinslerinin üyeleri üçüncü fazın en baskın bakteri cinsleridir (Stashenko ve ark., 1994).

2.5 Endodontik İnfeksiyon Tipleri

Endodontik infeksiyonlar anatomik konumlarına göre intraradiküler infeksiyonlar ve ekstraradiküler infeksiyonlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. İnteraradiküler endodontik infeksiyonlara, kök kanal sisteminde kolonize olan mikroorganizmalar neden olur. İnteraradiküler infeksiyonlar da, mikroorganizmaların kanala giriş zamanına göre primer, sekonder ve persistan endodontik infeksiyonlar olarak üçe ayrılırlar. Primer endodontik infeksiyonlara, nekrotik pulpaya yeni girmiş ve kolonize olmuş mikroorganizmalar neden olur. Sekonder infeksiyonlar, primer infeksiyonun gelişmesinde yer almayan ancak kök kanalına hekim müdahalesinden sonra ulaşan mikroorganizmalar tarafından oluşturulur. Persistan endodontik infeksiyonlara, primer veya sekonder infeksiyonun üyesi olmuş, bir şekilde antimikrobiyal ajanlara direnç sağlamış ve kök kanal dolgusu yapılmış kanallardaki olumsuz çevresel şartlarda hayatını idame ettirebilmiş dirençli türler sebep olur (Siqueira ve Rocas, 2004). Genellikle sekonder ve persistan infeksiyonlar

linik olarak ayırt edilemezler (Siqueira ve Rocas, 2009). Eğer infeksiyonun belirti ve bulguları, önceden infekte olmadığı kesin olarak bilinen bir dişte meydana geliyorsa; sekonder infeksiyonlar persistan infeksiyonlardan ayrılabilirler.

Ekstraradiküler endodontik infeksiyon inflame periradiküler dokuların mikrobiyal invazyonuyla karakterizedir ve intraradiküler infeksiyonların sekeliidir. Ekstraradiküler infeksiyonlar intraradiküler infeksiyonla ilişkili olabilir veya olmayabilir (Siqueira ve Rocas, 2011).

2.5.1 Primer Endodontik İnfeksiyonlar

Primer Endodontik İnfeksiyonlarda Yer Alan Bakteriler

Primer intraradiküler infeksiyonlar nekrotik pulpa dokusunun infeksiyonudur. Primer endodontik infeksiyonlardaki mikroorganizmalar, pulpanın inflamasyonunda ve pulpa nekrozuna doğru ilerleyen bakteri invazyonunun erken aşamalarında rol almış olabilirler veya pulpa nekrozu sonrası değişen çevre şartlarından avantaj sağlayıp sonradan kök kanal sistemine yerleşebilirler.

Primer infeksiyonlar anaerobik bakterilerin baskın olduğu karışık bir komünite ile karakterizedir. Her kök kanalındaki bakteriyel hücre sayısı 10^3 ile 10^8 arasında değişir (Sakamoto ve ark., 2007; Siqueira ve ark., 2007; Sundqvist, 1976). Moleküler çalışmalar her infekte kanalda ortalama 10-20 tür ve filotip saptamıştır (Munson ve ark., 2002; Rocas ve Siqueira, 2008). Semptomlara sinüs yolunun eşlik ettiği kök kanallarında bu sayı ortalama 17'dir (Rocas ve Siqueria, 2008). Apikal periodontitis lezyonunun boyutu ile kanalın içerdiği bakteri ve hücre sayısı doğru orantılıdır (Rocas ve Siqueira, 2008; Siqueira ve ark., 2007; Sundqvist, 1976). Moleküler bir çalışmadan lezyon boyutuyla kanaldaki takson (canlıların sınıflandırılmasında kullanılan ortak birim) grupları arasında direkt orantı göstermiştir. Küçük lezyonlar (< 5 mm) 12 takson içerirken, 5 mm ile 10 mm arasında boyutlanan lezyonlar 16 takson ve 10 mm'den büyük lezyonlar 20 tür içerirler. Büyük lezyonlarla ilişkili bazı kanallar 40 takson dahi içerebilir. Lezyon ne kadar büyükse kanal içindeki bakteri çeşitliliği ve yoğunluğu da o kadar fazladır (Rocas ve Siqueria, 2008).

Apse vakaları dahil primer infeksiyonlarda gösterilen en yaygın türler Gram negatif (*Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* ve *Veillonella*) ve Gram pozitif (*Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* ve *Eubacterium*) bakteri gruplarına aittir (Sundqvist, 1994) (Tablo 1). Primer infeksiyonlarda bakteriyel prevalans saptama ve tanımlama yöntemlerinin hassasiyeti ve tanımlanması, örnekleme teknikleri, coğrafik lokasyon, klinik tanı ile hastalık sınıflandırmasının doğruluğu ve çeşitliliğine bağlı olarak çalışmadan çalışmaya farklılık gösterir. İyi tasarlanmış ve yürütülmüş çalışmalarda saptanan türlerin aynı olması beklenir (Siqueria ve Rocas, 2011).

Tablo 1. Apikal periodontitis teşhisi konmuş kök kanallarından izole edilen bakterilerin görülme sıklıkları (%) (Sundqvist, 1994'ten uyarlanmıştır.)

Bakteri	Saptanma sıklığı (%)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	48
<i>Streptococcus spp</i>	40
<i>Bacteroidetes spp</i>	35
<i>Prevotella intermedia</i>	34
<i>Parvimonas micra</i>	34
<i>Pseudorami bacter</i>	34
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	31
<i>Lactobacillus spp</i>	32
<i>Eubacterium lentum</i>	31
<i>Fusobacterium spp</i>	29
<i>Campylobacter spp</i>	25
<i>Peptostreptococcus spp</i>	15
<i>Actinomyces spp</i>	15
<i>Mogibacterium timidum</i>	11
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	11
<i>Eubacterium brachy</i>	9
<i>Selenomonas sputigena</i>	9
<i>Veillonella parvula</i>	9
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	9
<i>Prevotella buccae</i>	9
<i>Prevotella oralis</i>	8
<i>Propionibacterium propionicum</i>	8
<i>Prevotella denticola</i>	6
<i>Prevotella loescheii</i>	6
<i>Eubacterium nodatum</i>	6

Primer infeksiyonlarda endodontik mikrobiyomun yaklaşık %40-55'ini kültüre edilememiş türler oluşturur (Munson ve ark., 2002; Sakamoto ve ark., 2006). Kronik apikal periodontitisli ve periapikal apseli dişlerin kök kanallarından elde edilen örneklerin incelenmesinde ise mikrobiyomun %30-38'ini kültüre edilememiş türler oluşturur (Munson ve ark., 2002). İnfekte kök kanallarındaki bakteriyel çeşitliliği araştıran moleküler çalışmalarda kültüre edilemeyen filotiplerin çeşitli kuşaklara ait olduğu gösterilmiştir. Kök kanalları, *Synergistes*, *Dialister*, *Prevotella*, *Solobacterium*, *Olsenella*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Megasphaera*, *Veillonella* ve *Selenomonas* cinslerini içerdiği kadar, TM7 filumu veya *Lachnospiraceae* ailesiyle ilişkili bakteriler de içerir (Rolph ve ark., 2001; Munson ve ark., 2002; Rocas ve Siqueira, 2005; Rocas ve Siqueira, 2006). Sakamoto ve ark. (2006), moleküler teknikleri kullandıkları çalışmalarında primer endodontik infeksiyonlarda en sık rastlanan bakterilerin kültüre edilemeyen türler olduğunu rapor etmişlerdir. Endodontik infeksiyonlarda bulunan ve kültüre edilemeyen iki filotipi *Synergistes* klonu BA121 ve *Bacteroidetes* klonu X083 oluşturur (Rocas ve Siqueira, 2005, 2008; Siqueira ve Rocas, 2005). Endodontik infeksiyonlardan alınan örneklerde bu filotiplerin saptanması onların apikal periodontitisin patogeneğinde önceden beri rol oynayan saptanamamış türler olduğu görüşünü ortaya atmıştır (Siqueira ve Rocas, 2011).

Akut apikal apseler infekte kök kanalında yer alan ve periradiküler dokularda ekstradiküler bir infeksiyon başlatmak ve pürülan inflamasyonu uyarmak için işgal eden bakterilerce meydana gelirler. Klinik olarak hastalık ağrı ve/veya şişliğe neden olur ve sinüslere ve fasial lojlara yayılarak selülit ve diğer komplikasyonlara yol açar. Endodontik apselerde rol alan mikrobiyom karışıktır ve anaerobik bakteriler baskındır (Siqueira ve ark., 2004; Khemaleelakul ve ark., 2002). Çalışmalar, moleküler teknoloji ile direkt karşılaştırma yoluyla her apse vakasında ortalama 12-18 takson olduğunu göstermiştir, kronik vakalarda ise bu sayının 7-12 olduğu bildirilmiştir (Sakamoto ve ark., 2006; Siqueira ve ark., 2004). Kültüre edilemeyen türler periapikal apselerde bulunan tüm taksonların %40'ını oluştururlar ve gen klonu kütüphanelerinde toplanan gen sekanslarının %30'dan fazlasını meydana getirirler (Sakamoto ve ark., 2006).

Apikal periodontitisin mikrobiyal nedenleri ortaya konmuş olsa bile tek bir türün varlığının hastalığın herhangi bir semptomu veya bulgusuyla özel ilişkisi olduğuna dair bir kanıt yoktur. Bazı anaerobik Gram negatif bakteriler lezyonlarla ilişkilendirilmiştir, ancak aynı türler aynı sıklıkla asemptomatik vakalarda da bulunabilir. Dolayısıyla semptomatik endodontik infeksiyonlarda, zorunlu patojenik türlerin varlığından başka faktörlerin de rol oynaması gerekir (Siqueira ve Rocas, 2011). Bu faktörler arasında, aynı türün suşlarının virülans yeteneğindeki değişiklikler, karışık infeksiyonlarda türler arası sinerjistik ve additif etkileşim, bakteri hücre sayısı, virülans faktörlerinin ekspresyonunu etkileyen çevresel şartlar, konak direnci ve eşlik eden herpesvirüs infeksiyonu sayılabilir (Siqueira, 2003; Siqueira ve Barnett, 2004).

Kesitsel çalışmalara göre bakterilerin sayısındaki artış semptomlar ortaya çıkmadan meydana gelir (Siquiera ve ark., 2004). Endodontik infeksiyon sürecinde mikrobiyom, akut periradiküler inflamasyona yol açacak sayı ve virülansa ulaşarak hastalık meydana getirme eşiğini geçebilir. Denatüre gradient jel elektroforezi ve terminal restriksiyon uzunluk polimorfizmi analizlerinin kullanıldığı moleküler çalışmalar, semptomatik dişlerdeki endodontik bakteri komünitelerinin yapısının asemptomatik vakalarda görülen türlerden farklı olduğunu göstermiştir. Semptomatik vakalarda, asemptomatik vakalarla karşılaştırıldıklarında; baskın olan filotiplerin farklı olduğu ve komüniteyi oluşturan mikroorganizma sayısının da daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Siquiera ve ark., 2004). Mikrobiyal komünite yapısındaki değişiklikler, semptomlar ortaya çıkmadan meydana gelme eğilimindedir. Meydana gelen değişiklikler, muhtemelen yeni patojenik türlerin ortaya çıkmasından veya bakteriyel komünitedeki türlerin yeniden organize olmalarından kaynaklanır. Dominant türlerin tipinde ve sayısındaki farklar ve ortaya çıkan bakteriyel ilişkiler tüm bakteriyel komünitenin virülansını etkileyebilir (Siqueira ve Rocas, 2011).

Primer Endodontik İnfeksiyonlarda Yer Alan Funguslar

Funguslar primer intraradiküler infeksiyonlarda da görülebilirler. Moleküler bir çalışmada primer infekte kanalların %21'inde *C. albicans* görüldüğü rapor edilmiştir (Baumgartner ve ark., 2000).

Primer Endodontik İnfeksiyonlarda Yer Alan Arkealar

Siqueira ve ark. (2005), çalışmalarında primer endodontik infeksiyonlarda arkeaları göstermeyi başaramasa da, Vianna ve ark. (2006a; 2006b) yaptıkları çalışmalarında primer infekte kanallarda *M. oralis* benzeri filotiplerin saptandığını rapor etmişlerdir.

Primer Endodontik İnfeksiyonlarda Yer Alan Virüsler

Virüsler canlı konak hücrelerine duydukları ihtiyaçtan ötürü nekrotik pulpalı kanallarda yer alamazlar. Kök kanallarında virüsler sadece insan immun yetersizlik virüsü ile infekte bireylerde görülmüştür. Human sitomegalovirüs (HCMV) ve Epstein-Barr virüsü (EBV) apikal periodontitis lezyonlarında canlı konak hücreleri varlığında tespit edilmiştir. HCMV ve EBV'nin viral infeksiyon ile replikasyonunun direkt sonucu olarak veya lokal konak savunmasını viral olarak zayıflatarak apikal periodontitisin gelişmesinde rol oynayabilecekleri belirtilmiştir. (Sabeti ve Slots, 2004).

Kök kanallarında artan bakteriyel popülasyon virüs ile infekte hücrelerin periradiküler dokulara itilmesine neden olabilir. Bakterilerin yol açtığı doku hasarının uyarıp yeniden aktif hale getirdiği HCMV ve/veya EBV periradiküler ortamda konak savunmasını zayıflatır, bunu konaktaki infeksiyöz ajanlara yanıt verecek lokal savunma hücrelerinin potansiyelini değiştirerek yapar. Herpes virüsle infekte inflamatuvar hücreler proinflamatuvar sitokin salınımı için uyarılır (Slots ve ark., 2003). HCMV ve/veya EBV infeksiyonuna dair kanıtlar semptomatik apikal periodontitis lezyonlarında, büyük lezyonlarda, HIV pozitif hastaların apikal lezyonlarında daha da sık görülmektedir (Saboia-Dantas ve ark., 2007).

2.5.2 Sekonder ve Persistan Endodontik İnfeksiyonlar

Persistan ve sekonder infeksiyonlar genellikle, klinik olarak ayırt edilemezler. İnfekte olmadığı bilinen vital pulpada tedavi sonrası gelişen apikal apse gibi infeksiyöz komplikasyonlar veya tedavi sırasında apikal periodontitis teşhisi konmamış ancak takip radyograflarında periradiküler radyolusensiliğin saptandığı istisnai vakalar varlığında sekonder infeksiyonları persistan infeksiyonlardan ayırt etmek daha kolay olur. Persistan ve sekonder infeksiyonlar

persistan eksuda, geçmeyen semptomlar, seanslar arası akut alevlenme ve tedavi başarısızlığı gibi çeşitli klinik sorunlardan sorumlu olabilirler. Bu infeksiyonlar kök kanal tedavisi sonrasında oluşan apikal periodontitis lezyonlarıyla karakterizedirler (Siqueira ve Rocas, 2011). Endodontik infeksiyonlar konusunda araştırma yapan yazarlar sekonder ve persistan infeksiyonları aynı başlık altında ele almışlardır (Siqueira ve Rocas, 2011). Çalışmalarda ise sekonder ve persistan endodontik infeksiyonlar, sekonder endodontik infeksiyon veya sekonder/persistan endodontik infeksiyon olarak isimlendirilmiştir (Cavirini ve ark., 2008; Gomes ve ark., 2012).

Sekonder Endodontik İnfeksiyonlar

Sekonder endodontik infeksiyonlarda yer alan mikroorganizmalar primer infeksiyonda yer almayan, kök kanal sistemine tedavi sırasında, seanslar arasında veya kök kanal tedavisi sonrasında giriş sağlayan patojenik türlerdir. Kök kanal sisteminin tedavi esnasında kontaminasyonuna sebep olan etkenler arasında, dental plak artıkları, temizlenmemiş çürükler, sızdıran lastik örtü, kullanılan aletlerin ve solusyonların kontaminasyonu yer alır. Seanslar arasında bakteriler, uygulanan geçici restorasyon materyalinin sızıntısı, kırılması, düşmesi veya dişin kırılması nedeniyle kök kanal sistemine giriş sağlarlar (Siqueira, 1997). Siqueira ve Lima, önceden infeksiyon bulguları göstermemiş vital bir mandibular molar dişin kök kanal tedavisi esnasında gelişen infeksiyöz bulgu ve semptomları nedeniyle kök kanalının mikrobiyal incelemesini yapmışlar ve iki koagülaz-negatif stafilokok grubu bakteriyi; *S. epidermidis* ve *S. xylosum*'u saptamışlardır (2002). Bu vaka sunumunda sekonder endodontik infeksiyonun gelişmesinin sebebinin kullanılan kanal aletinin deri mikrobiyomu ile kontaminasyonu olabileceği bildirilmiştir.

Hangi yolla girerse girsin mikroorganizmalar kök kanal sisteminde hayatta kalır ve çoğalırlarsa sekonder infeksiyona sebep olabilirler. Kanal içi dezenfeksiyon işlemlerine direnç göstermeleri halinde ise sekonder infeksiyon persistan infeksiyona dönüşebilir. Kök kanal dolgusu tamamlanırken kanal içinde kalan patojen bakteri varlığı tedavinin başarısız olma ihtimalini artırır (Siqueira, 2001).

Kök Kanal Dolgusu Aşamasında Bakteriler

Primer endodontik infeksiyonlar kök kanal sistemindeki bakteriler için peptit ve aminoasitlerce zengin bir besin desteği sağlayarak anaerobik proteolitik türlerin

artmasını sağlarlar. Kök kanallarının biyomekanik enstrümantasyonunun tamamlandığı bir dişte nekrotik pulpa artıklarının çoğu temizlenmiştir (Peculie ve ark., 2008). Ancak, etkili antimikrobiyal işlemler dahi infekte kök kanal sisteminden bakterileri tamamen elimine etmekte başarısız olabilir. Bu persistan bakterilerin direnç göstermesinden veya ulaşılamayan alanlarda yer almasından kaynaklanır. Direncin nedeni ne olursa olsun, kök kanal sistemindeki bakteriyel çeşitlilik ve bakteri sayısı tedavi sonrasında önemli oranda azalır. Yapılan çalışmalarda kök kanallarının kemomekanik preparasyonundan sonra alınan örneklerde, her vakada ortalama 1-5 bakteriyel tür saptanmıştır ve 10^2 ile 10^5 arasında bakteriyel hücre sayısı rapor edilmiştir (Byström ve Sundqvist, 1985; Sakamoto ve ark., 2007; Siquiera ve ark., 2007).

Tedavi sonrası persistan infeksiyon gelişmesinden sorumlu tutulabilecek tek bir bakteri türü yoktur. Primer infeksiyonlarda sık rastlanan Gram negatifler kemomekanik işlemler ve kanal içi medikasyon uygulamasıyla elimine edilirler. *F. nucleatum*, *Prevotella* türleri, *C. rectus* enstrümantasyon ve medikasyon kullanımı sonrası kök kanal sisteminden izole edilebilen nadir Gram negatif bakterilerdendir (Byström ve Sundqvist, 1985; Gomes ve ark., 1996; Peters ve ark., 2002). Çalışmalar enstrümantasyon ve medikasyon uygulamalarına direnç gösteren türlerin daha çok Gram pozitifler olduğunu belirtmiştir. *Streptococcus* türleri, *P. alactolyticus*, *P. micra*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* ve *Lactobacillus* türleri, *E. faecalis* ve *O. uli* gibi bakteriyel türlerin persistan infeksiyonlu vakalarda daha çok saptanmış olan çalışmalar Gram pozitif bakterilerin dolgu tamamlanmış kök kanal sisteminin zor koşullarında hayatta kalabilen dirençli türler olduğu görüşünü ortaya koymuştur (Sjögren ve ark., 1997; Peculie ve ark., 2001; Chavez ve ark., 2005).

Biyomekanik preparasyon ve kanal içi medikasyon işlemleri sonrasında kök kanal sisteminde bakteri varlığı her zaman infeksiyöz komplikasyonlara neden olmaz. Kök kanal sisteminde rezidüel bakteri varlığında periapikal lezyonların iyileştiğini gösteren çalışmalar bu görüşü desteklemektedir (Sjögren ve ark., 1997; Fabricius ve ark., 2006). Rezidüel bakteriler kök kanal dolgu tamandıktan sonra dolgu materyalinin toksisitesi, bakterinin besinle olan ilişkisinin kesilmesi sonucunda ölebilirler. Hayatta kalsalar bile patolojik bir değişiklik teşkil edecek sayıya ve virülans eşiğine ulaşamayabilirler. Ancak bunun tam aksine, besin

kıtlığına adapte olabilir ve çoğalıp patojenik özellik kazanacak virülans seviyesine erişebilirler. Kök kanal sistemindeki rezidüel bakterilerin kök kanal tedavisinin prognozuna olan etkisini belirleyen en önemli faktör konak savunmasıdır. Eğer mikroorganizmaların sayısı ve virülansı konak savunmasını aşarsa hastalık meydana gelir. (Siqueira ve Rocas, 2011).

Persistan Endodontik İnfeksiyonlar

Persistan apikal periodontitiste mikrobiyom primer infeksiyonlara göre daha az çeşitlilik gösterir. Radyolojik olarak kabul edilebilir bir kök kanal dolgusu varlığında kanallardan ortalama 1-5 bakteri türü izole edilebilirken; yetersiz bir kök kanal dolgusunda bu sayı primer endodontik infeksiyonlardaki sayıya yükselerek ortalama 10-30 bakteri türüne çıkar (Sundqvist ve ark., 1998; Siqueira ve Rocas, 2004; Sakamoto ve ark., 2008). Kanal başı ortalama bakteriyel hücre sayısı ise 10^3 - 10^7 kadardır (Peculien ve ark., 2001; Sedgley ve ark., 2006).

Persistan endodontik infeksiyonlu kök kanallarında Enterokoklar, mikrobiyomun %29-77'sini oluştururlar (Peculien ve ark., 2000; Peculien ve ark., 2001; Siqueira ve ark., 2002; Pinheiro ve ark., 2003). *E. faecalis* persistan infeksiyon vakalarının %90'ından izole edilmiştir. Persistan endodontik infeksiyonlu dişler primer infeksiyonlara göre 9 kat fazla *E. faecalis* içerirler (Siqueira ve Rocas, 2011). *E. faecalis*'in birden fazla seansta tedavi edilen ve seanslar arası oral kaviteye açık bırakılan dişlerden daha yüksek oranda izole edilmesi Enterokok türlerinin kök kanal sistemine tedavi esnasında veya seanslar arasında giriş yapmış sekonder istilacı bir bakteri olduğu görüşünün ortaya atılmasına sebep olmuştur (Hancock ve ark., 2001; Siren ve ark., 1997).

E. faecalis'in dentin tübüllerine penetre olabilmesi ve biyofilm oluşturma yeteneği kanal içi dezenfeksiyon prosedürlerinden kaçınabilmesini sağlar (Siqueira ve ark., 1996). Bu mikroorganizmalar, kanal içi medikamanı olarak uygulanan kalsiyum hidroksitin yarattığı yüksek pH aralığında hücre duvarındaki proton pompası sayesinde hayatta kalabilmekte ve primer infeksiyonlardaki patojen türlerin aksine kök kanallarında tek başına kolonize olabilmektedir (Evans ve ark., 2002). Zor çevresel şartlara gen ekspresyonunu regüle ederek adapte olan *E. faecalis* canlı fakat kültüre edilemeyen (VBNC-viable but non-cultivable) hale gelebilir. Bu

özelliği, uyumsuz çevresel şartlarla karşılaşıldığında gösterilen bir savunma mekanizmasıdır. VBNC halinde bakteri kültürde büyüme yeteneğini kaybeder ancak canlılığını ve patojenitesini devam ettirir ve optimal şartlar karşılandığında çoğalabilirler (Lleo ve ark., 2001). Çalışmalar *E. faecalis*'in besin eksikliğinde hayatta kalabildiğini ve besin kaynakları oluştuğunda çoğaldığını göstermiştir (Figdor ve ark., 2003; Lleo ve ark., 2001).

Persistan endodontik infeksiyonlu dişlerin kök kanallarındaki mikrobiyom profilleri bireyden bireye değişir, bu da belirli bakteriyel kombinasyonların tedavi başarısızlığında rol oynadığını gösterir (Rocas ve ark., 2004; Sakamoto ve ark., 2008). Persistan endodontik infeksiyonlu dişlerin kök kanallarında saptanan diğer bakterileri *Streptococci* ve anaerobik türler oluşturur. *P. alactolyticus*, *P. propionicum*, *F. alocis*, *D. pneumosintes*, *D. invisus*, *T. forsythia*, *P. micra*, *P. intermedia* ve *T. denticola* persistan infeksiyonlu vakalardan izole edilmiştir (Siqueira ve Rocas, 2004; Siqueira ve Rocas, 2005). Persistan endodontik infeksiyonlu kök kanallarından izole edilen taksonun %55'ini kültüre edilemeyen türler oluşturur ve bu türler kök kanalındaki mikrobiyomun çoğunluğunu da temsil ediyor olabilirler (Rocas ve ark., 2008). Bacteriodes klonu X083 ve Synergistes klonu BA121 gibi kültüre edilemeyen filotipler persistan endodontik infeksiyonlu kök kanallarındaki baskın bakteriler olduğu bildirilmiştir (Sakamoto ve ark., 2008; Rocas ve ark., 2008).

Tablo 2. Farklı klinik koşullarda endodontik mikrobiyomun ana belirleyici özellikleri
(Siqueira ve Roças, 2009'dan uyarlanmıştır)

	Primer infeksiyonlar		Persistan infeksiyonlar	Persistan/sekonder infeksiyonlar
	Kronik Apikal Periodontitis	Akut apikal apse	Dolgu aşamasında	Tedavi edilmiş dişler
Komünite	Karışık	Karışık	Karışık, bazen tek	Karışık, bazen tek
N (takson/vaka)	10-20	10-20	1-5	Yeterli tedavilerde 1-5, Yetersiz tedavilerde 2-30
Kültüre edilemeyen bakteriler	%40-55	%40	%42	%55
En sık saptanan grup	Gram negatif/Gram pozitif anaeroblar	Gram negatif anaeroblar	Gram pozitif fakültatifler/anaeroblar	Gram pozitif fakültatifler
En sık saptanan takson	<i>Treponema spp.</i> <i>T. forsythia</i> <i>Porphyromonas spp.</i> <i>Dialister spp.</i> <i>F. alocis</i> <i>P. alactolyticus</i> <i>F. nucleatum</i> <i>Synergistes spp.</i> <i>E. corrodens</i> <i>Prevotella spp.</i> <i>Olsenella spp.</i> <i>P. micra</i> <i>Peptostreptococcus</i>	<i>Treponema spp.</i> <i>T. forsythia</i> <i>Porphyromonas spp.</i> <i>Dialister spp.</i> <i>F. nucleatum</i> <i>E. corrodens</i> <i>Prevotella spp.</i> <i>Olsenella spp.</i> <i>P. micra</i>	<i>S. mitis</i> Diğer streptokoklar <i>Propionibacterium spp.</i> <i>F. nucleatum</i> <i>Prevotella spp.</i> <i>P. alactolyticus</i> <i>P. micra</i> <i>Lactobacilli</i> <i>Olsenella spp.</i> <i>Actinomyces spp.</i> <i>P.aeruginosa</i> Enterik rodlar	<i>E. faecalis</i> <i>C. albicans</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>P. alactolyticus</i> <i>P. propionicum</i> <i>F. alocis</i> <i>Dialister spp.</i> <i>Actinomyces spp.</i> <i>P. aeruginosa</i> Enterik rodlar

2.6 Endodontik Mikroorganizmalar Üzerindeki Coğrafik Etki

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, endodontik infeksiyonlara dahil olan türlerin sıklığının dikkate değer bir farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu farklılıkların identifikasyon metotlarındaki varyasyonlardan kaynaklandığı düşünülmesine rağmen, coğrafyanın kanal mikrobiyom içeriği üzerindeki etkisinden şüphelenilmiştir. Dünyanın farklı bölgelerinde oral mikrobiyom popülasyonlarının farklı olabileceği düşünülmüştür. Birbirinden uzak coğrafik bölgelerden elde edilen mikrobiyolojik bulguların karşılaştırılmasında moleküler yaklaşımlar en uygun metotlardır. İdeal şartlarda, doğru sonuçlara ulaşmak için farklı ülkelerden alınan örnekler aynı laboratuvarlarda analiz edilmelidir (Siqueira ve Rocas, 2011). Örneklerin uzaktaki bir laboratuvara ulaştırılması sırasında geçen süre örneklerin kültür tekniği ile analizi için uygun değildir. Moleküler metotlar DNA tespitine dayanır. DNA değişmeden kalır ve uygun koşullarda saklandığında uzun süre tespit için kullanılabilir (Young ve ark., 2007). Bu nedenle örnekler her zaman düzenlenebilir ve taşıma koşullarından ötürü bilgi kaybı önlenemez. Türe spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılan bir çalışmada, iki uzak coğrafi bölgeden toplanan apse örneklerinde seçilmiş bakteriyel türlerin miktarı ve varlığı araştırılmıştır. Sonuçlarda, bu iki bölge arasında önemli farklılıkların olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma ile, endodontik mikrobiyota içeriğine coğrafik faktörlerin etki edebileceği gösterilmiştir (Siqueira ve Rocas, 2009).

2.7 Kök Kanal Patojenlerinin Saptanmasında Kullanılan Geleneksel Yöntemler

Kök kanal patojenlerinin tespitinde mikroskopi, kültür yöntemleri, antibiyotik duyarlılık testleri, immünolojik ve moleküler biyolojik teknikler kullanılmaktadır.

2.7.1 Mikroskopi

Hızlı ve ucuz bir yöntem olmasının yanında mikroorganizmaların morfolojik değerlendirilmesine dayandığı için duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça sınırlıdır. Mikrobiyolojik örnekler doğrudan mikroskop altında incelenebildiği gibi gram boyama ve floresan boyama gibi çeşitli yöntemlerle boyanarak da incelenebilir.

2.7.2 Kültür Yöntemi

Kültür, uygun evre koşullarını sağlayarak mikroorganizmaların laboratuvar ortamında çoğaltılması işlemidir. Kültür analizi temel olarak; örnek toplanması, örneklerin saklanması/taşınması, dispersiyonu, dilüsyonu, kültüre edilmesi, izolasyonu ve identifikasyonu basamaklarından oluşur. Mikrobiyal patojenler için gerekli unsurlar canlı veya yapay ortamlar tarafından temin edilebilir. Mikroorganizmaların bu yapay ortamda yaşayabilmeleri için besin, ısı, nem, tuz konsantrasyonu, atmosfer, pH gibi uygun fizikokimyasal şartlara sahip olması gerekmektedir (Slots, 1986). Birçok mikroorganizmanın hayatta kalmak ve çoğalmak için ihtiyaç duyduğu koşullar henüz bilinmemektedir. Ayrıca kültür ortamının kendisi bazı türler için toksik olabilmektedir (Rodrigues-Valera, 2002). Bu nedenle birçok mikroorganizma kültür teknikleriyle saptanamamıştır. Ward ve ark. (1990), ile Amann ve ark. (1995) kültür teknikleriyle saptanmış mikroorganizmaların bilinen total mikrobiyotanın %1'inden azını oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir. Kültür metotlarıyla saptandığı kabul edilen ekosistem üyelerinin kültürden bağımsız metotlarla analizinde birçok mikroorganizmanın bilinenden çok daha farklı özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Hugenholtz ve Pace, 1996).

Bir mikroorganizmanın kültüre edilebilmesi her zaman başarılı bir şekilde identifiye edilebileceği anlamına gelmez. Kültür yöntemi bakterilerin fenotipik özelliklerine dayandığı için düşük özgüllüğe sahiptir ve bu nedenle mikrobiyal türlerin birbirlerinden ayrılmasında belirgin sınırlamaları bulunur. Çünkü her mikroorganizmanın kendine özgü bir fenotipi yoktur ve fenotipler mikroorganizmanın yaşadığı çevresel şartlara ve ortamdaki diğer mikroorganizmalara bağlı olarak değişebilmektedir (Tang ve ark., 1997).

Kültür Yöntemlerinin Sınırları (Love, 2004)

- Geniş mikrobiyal türlerin kültüre edilmesine imkan vermez. Bazı mikroorganizmalar kültür ortamında ya gelişemezler ya da çok zor gelişebilirler. Bu, hatalı negatif sonuca neden olur ve bazı zorunlu veya kültüre edilemeyen mikroorganizmaların patojenik rolünün daha azmış gibi değerlendirilmesine neden olur.

- Tüm canlı türlerini saptayacak duyarlılıkta değildir. Az sayıdaki mikroorganizmaları belirlemede yetersizdir.
- İzolasyon işleminden sonra mikroorganizmaların çeşitli tekniklerle identifikasyonu yapılmalıdır.
- Yalnızca fenotipik özelliklere dayanarak suşların identifikasyonunun yapılması yüksek hata potansiyeli içerir.
- Örnek taşıma koşulları tekniğin duyarlılığı üzerinde büyük etki göstermektedir. Anaerobik bakterilerin hayatta kalmasına olanak tanıyacak şekilde taşınmalıdır fakat bu da fakültatif bakterin aşırı artmasına neden olabilir.
- Hassasiyeti ekim ortamına ve mikrobiyotaya bağlı olarak düşüktür. Buna fenotipik özelliklerin belirsizliği, konverjan veya diverjan türlerin oluşması ve mikrobiyoloğun deneyimi gibi çeşitli faktörler etki eder.
- Anaerobların izolasyonu için özel ekipman ve şartlar gerekmektedir.
- Anaerobik bakterilerin birçoğunun saptanabilmesi için günler gerekir. Tanı amaçlı kullanılmak açısından yavaştır.

2.7.3 Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Disk difüzyon testi, dilüsyon yöntemleri ve E-test gibi testler, hastalıkların tanı ve tedavisinde, epidemiyolojik araştırmalarda ve yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Gür, 1999).

2.7.4 İmmünolojik Yöntemler

İmmünolojik yöntemlerin özellikle infeksiyon oluşturan bakterilerin izole edilmesinin ve tanımlanmasının zor olduğu veya önceki infeksiyonun doğrulanması gerektiği durumlarda kullanılması önerilir. Hedef türleri doğrudan tespit etmek için spesifik mikrobiyal antijenleri tanıyan antikörlerin kullanıldığı testlerdir. Bu amaçla, türe spesifik özel konak immunoglobulinleri hedef alan antikörler kullanılabilir. Reaksiyon, doğrudan ve dolaylı olarak immunofloresan, flow sitometri ve enzim bağlı immünosorbent test (ELISA) gibi çeşitli tekniklerle gösterilebilir (Sanz ve ark., 2004).

2.8 Kök Kanal Patojenlerinin Saptanmasında Kullanılan Güncel Yöntemler

Moleküler çalışmalar, oral mikrobiyomdaki bakterilerin yaklaşık %40-50'sini ve bağırsaktaki bakterilerin %70'ini henüz kültüre edilememiş bakterilerin oluşturduğunu göstermiştir (Suau ve ark., 1999; Paster ve ark., 2001). Mikroorganizmaların kültüre edilememesinin birçok sebebi vardır. Yapay kültür ortamı besin ve büyüme faktörleri açısından yetersiz olabilir. Laboratuvar ortamında kültür işlemi mikrobiyal türlerin büyüme ihtiyaçlarının bazılarını karşılayabilir. Bununla birlikte, mikroorganizmaların yaşamlarını devam ettirebilmek için konağın kullandığı spesifik büyüme faktörleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Kültür ortamının kendisi bazı türlere toksik olabilir ve büyümeyi engelleyebilir (Siqueira ve Rocas, 2011).

Örnekteki (kültür ortamındaki) diğer mikroorganizmalar araştırılan türleri engelleyen maddeler üretebilir. Bir tür üremek için başka türlere ihtiyaç duyabilir. Örneğin, *T. forsythia* mutlaka N-asetil muramik aside ihtiyaç duyar. Saf kültürde çok zayıf üremekte iken diğer türlerle kültüre edildiğinde iyi ürettiği gösterilmiştir (Siqueira ve Rocas, 2011).

Bakteriler arası iletişimi sağlayan quorum-sensing denen ve sinyal üreten bakterinin lokal yoğunluğuna göre bazı bakterilerin gen ekspresyonunu koordine ettiği sistem bozulabilir. Bu sistem doğal biofilmlerde türlerin üremesini yönetmek açısından önemli olabilir ve çevresel faktörlerden etkilenir. Solid ortamdaki bakterilerin ayrışması birbirleri arasındaki iletişimi bozabilir ve bazı türlerin kültüre edilememesine yol açabilir (Siqueira ve Rocas, 2011).

Moleküler tanı metotları sayesinde hem kültürü yapılabilen hem de yapılamayan bakteri türleri saptanabilir. Moleküler çalışmalar, mikrobiyal çeşitliliği doğru şekilde göstermede kültür elde etmeye bağlı identifikasyon metotlarının yetersiz olduklarını göstermiştir (Siquiera ve Rocas, 2011). Mikrobiyal tanımlamada moleküler tanı metotlarının diğer yöntemlere göre avantajları şunlardır: bu yöntemler yüksek özgüllük gösterir ve mikrobiyal türlerin kesin olarak tanımlanmasına olanak sağlar, kültür yöntemine göre daha duyarlıdır, mikroorganizmaları tanımlayabilmek için onların canlı olmalarına ihtiyaç duymaz

ve kültür yöntemine göre daha kısa sürede sonuç verirler (Sundqvist ve Figdor, 2003; Siqueira ve Rocas, 2011).

DNA temelli teknikler, günümüzde oral infeksiyöz hastalıklardan, oral kanserlere ve sistemik hastalıklarda rol oynayan mikroorganizma türlerinin ve komplekslerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Tüm bakterilerde 16S rDNA geni bulunur. Bu genin tüm bakterilerde bulunan korunmuş bölgeleri ve bir türden başka bir türe değişiklik gösteren hiperdeğişken bölgeleri vardır. Bu gen sayesinde spesifik identifikasyon gerçekleştirilmektedir. Hastalıklarla ilişkili mikroorganizma profillerinin tespit edilmesi ile erken tanı aşamasında ve hastalığa yatkın bireyleri belirlemede kullanılacak moleküler tanı metotlarının üretimi kaçınılmazdır (Paster ve Dewhirst, 2009).

Siqueira ve Rocas (2009), endodontik infeksiyonlarda yer alan mikroorganizmaların incelendiği çalışmalarda kullanılan metotları beş gruba ayırmıştır:

Birinci jenerasyon çalışmalar: Bu çalışmalar açık uçlu kültür tekniklerini içermektedir.

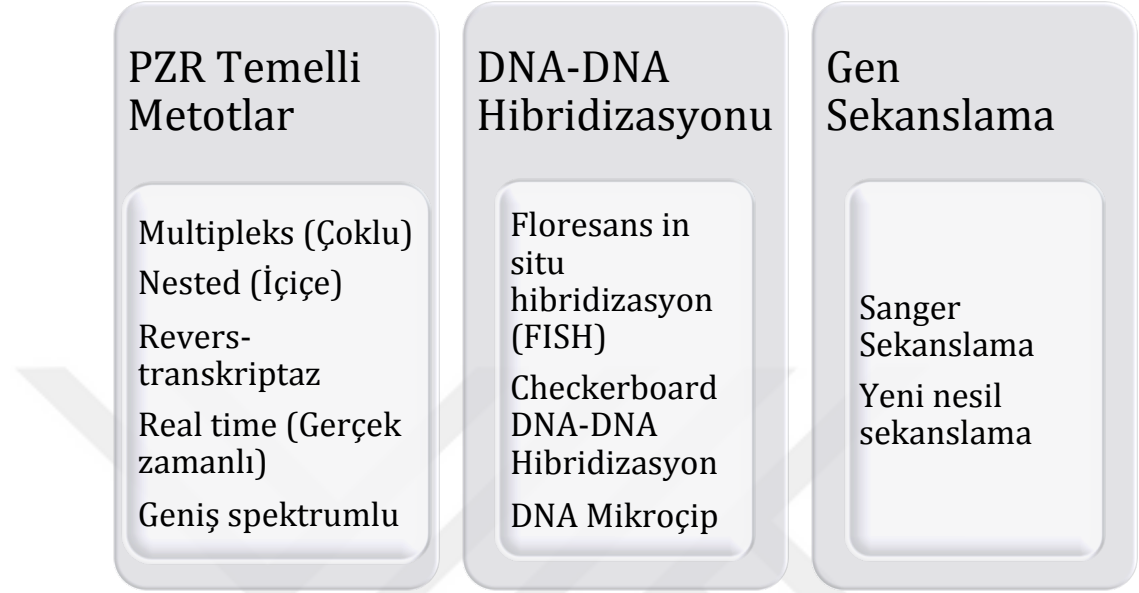
İkinci jenerasyon çalışmalar: Bu çalışmalar kapalı uçlu moleküler teknikleri içermektedir. Türe spesifik PZR ile checkerboard hibridizasyon ikinci jenerasyon çalışmalarındandır.

Üçüncü jenerasyon çalışmalar: Bu çalışmalar açık uçlu moleküler teknikleri kapsar. Geniş spektrumlu PZR, Sanger sekanslama ve Terminal-restriksiyon fragman polimorfizmi (T-RFLP) üçüncü jenerasyon çalışmalarındandır.

Dördüncü jenerasyon çalışmalar: Bu çalışmalar kapalı uçlu moleküler yöntemleri içerir. PZR ile reverse-capture checkerboard hibridizasyon dördüncü jenerasyon çalışmalarını oluşturur.

Beşinci jenerasyon çalışmalar: Bu çalışmalar geniş kapsamlı açık uçlu genetik analizleri içerir. Mikrobiyom profili oluşturmak ve türlerin yüksek verimlilikte saptanabilmeleri için en uygun metot olarak önerilmektedir (Siqueira ve ark., 2012). Yeni nesil DNA dizileme teknikleri beşinci jenerasyon çalışmalarda kullanılmaktadır.

Paster ve Dewhirst'e göre (2009) ise mikrobiyal moleküler analizler üç gruba ayrılırlar. Bunlar PZR temelli metotlar, DNA-DNA hibridizasyon metotları ve gen sekanslama metotlarıdır (Şekil 4).



Şekil 4. Moleküler biyolojik tekniklerin sınıflandırılması (Paster ve Dewhirst, 2009'dan uyarlanmıştır)

2.8.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Metotlar

PZR; bakteri, virüs, mantar, parazit ve protozon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik tamamlayıcı oligonükleotitler ve polimeraz enzimleri kullanılarak *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan bir tekniktir (Mullis ve ark., 1994). Tekrar eden ısıtma ve soğutma döngüleri enzimleri aktive ve inaktive ederek, DNA'nın spesifik bir bölgesinin birçok kopyasının oluşturmasını sağlar.

PZR genel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta çift sarmal yapıda olan DNA örneğini 90-95°C arasında belirli bir süre bekleterek tek sarmal hale getirilir. Böylece DNA dizisinin belirli bölgelerine özgü sentezlenen primerlerin bu bölgelere bağlanmalarına ortam sağlanmaktadır. İkinci basamakta sıcaklık 50°C ila 70°C arasında belirli bir sıcaklığa indirilerek primerlerin tek sarmal DNA dizilerine bağlanmaları gerçekleştirilmektedir. Kendilerine özgü yerlere bağlanan primerler bu bölgelere karşılık gelen yeni DNA sarmalının

sentezlenmesinin başlangıç noktasını oluştururlar. Reaksiyonun son basamağında, DNA polimeraz enzimi primerden itibaren nükleotit dizisi boyunca 5' - 3' yönünde yeni nükleotitler ekleyerek çift sarmal DNA'nın sentezlenmesini sağlamaktadır (Bayraç ve ark., 2012). Her bir yeni kopya, sonraki döngülerde amplifikasyonlar için bir kalıp görevi görür. 30 döngüden sonra, tek bir başlangıç molekülünden hedef dizinin milyonlarca kopyası elde edilmiş olur. PZR böylece birkaç saatte hedef bir dizinin milyonlarca tipik kopyalarını yaratabilir.

Polimeraz zincir reaksiyonu kullanıldığı alanlara göre farklı şekillerde modifiye edilmiştir.

Multipleks (Çoklu) Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZR işleminin süresini ve maliyetini düşürmek amacıyla, tek bir reaksiyon solusyonu içinde birden fazla primer setleri kullanılarak her bir primer setine özgü farklı uzunluklarda hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması işlemidir (Hayden, 2004).

Nested (İç-içe) Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İkinci bir PZR reaksiyonunda ilk PZR ürünleri ayrı bir primer seti olarak kabul edilip amplifikasyona uğrar. Bu yöntem, döngülerin toplam sayılarının fazla olmasından ötürü geleneksel PZR'den daha hassas ve spesifik olarak kabul edilir (Haqqi ve ark, 1988). Nested PZR metodunun en önemli dezavantajı, ilk aşama amplifikasyon ürünlerinin ikinci reaksiyon tüpüne transferi sırasında yüksek kontaminasyon olasılığıdır.

Revers-transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Revers-transkriptaz enziminden faydalanarak bir RNA parçasından, hedef DNA dizisini tamamlayacak DNA zincirini sentezlemek ve RNA hedeflerini çoğaltmak için geliştirilmiştir. Revers-transkriptaz PZR iki adımlı bir yöntem kullanmaktadır. İlk adımda revers-transkriptaz RNA'yı tek parçalı tamamlayıcı DNA'ya dönüştürür. İkinci adımda, komplementer DNA'nın ikinci parçasını oluşturmak için PZR primerleri, DNA polimeraz ve nükleotitler ilave edilir. İki parçalı DNA molekülü oluştuktan sonra artık geleneksel PZR ile amplifikasyon yapılabilir (Sambrook ve Russell, 2001).

Real Time (Gerçek Zamanlı) Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı PZR, DNA hedeflerini tespit etmek ve çoğaltmak için işaretli nükleotit dizilerinden faydalanır. Her PZR döngüsü floresans salınımı ile moniterize edilerek reaksiyonun ilerlemesi gerçek zamanlı olarak kaydedilir ve örnekteki DNA miktarı ölçülür. Gerçek zamanlı PZR, hedef türlerin miktarının yanında klinik örneklerdeki toplam bakteri sayısını da verebilir (Cashion ve ark., 2004).

Geniş spektrumlu Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Geniş spektrumlu PZR ile bir örnekteki bakteri çeşitliliği tespit edilebilir ve tanımlanabilir (Maiwald, 2004).

PZR uygulamalarında hedef DNA bölgesinin amplifikasyonunu sağlamak için gerekli olan primerlerin sentezlenmesinde DNA'nın dizi bilgisine sahip olmak gerekmektedir. Yani, PZR daha önce çalışılmamış gen parçalarını veya genomun başka parçalarının identifikasyonu için kullanılamaz. Bu da, dizisi bilinmeyen DNA örneklerinin amplifikasyonunun yapılamamasına neden olur (Siqueira ve Rocas, 2011).

Gerçek zamanlı PZR hariç PZR analizleri mikroorganizmaların miktarı hakkında bilgi vermez. Çoğu PZR analizi mikrobiyomdaki tüm türleri aynı anda saptayamaz (Siqueira ve Rocas, 2011). İlâveten, DNA parçasının uzunluğu da PZR tekniklerinin uygulanabilirliği için önemlidir; 100 kb'dan büyük DNA parçaları PZR ile çoğaltılamazlar (Brown, 2015). Klinik örnekler amplifikasyon reaksiyonunu azaltabilen veya durdurabilen enzim inhibitörleri içerebilir. Ayrıca kalitatif şekilde identifikasyon için kullanılan çoğu PZR analizleri, hedef mikroorganizmayı belirler ancak mikroorganizmanın örnekteki miktarını belirleyemez. Geniş spektrumlu PZR bu dezavantajı ortadan kaldırmakla birlikte zaman alıcı ve pahalı bir tekniktir (Siqueira ve Rocas, 2011).

2.8.2 DNA-DNA Hibridizasyonu

Nükleik asit hibridizasyonu, farklı biyolojik kaynaklı tek sarmal iki adet DNA veya RNA zincirinin tek bir yapı haline gelmesi işlemidir. Hibridizasyon tekniklerinin amacı çoğunlukla bazı türlerin genomundaki belirli nükleik asit

sekanslarının belirlenmesi veya yerinin tayin edilmesidir. Hibridizasyon yönteminde, tanımlanması gereken DNA, RNA veya protein sekansını gösteren bir hedef molekül, bir de prob molekülü vardır. Prob, hedef diziyi tamamlayan ve belirli bir DNA veya RNA bölgesini tespit etmek için kullanılan nükleotit dizisidir. Bu dizi birkaç baz çifti veya binlerce baz çiftinden oluşabilir. Hibridizasyon aşaması üç temel adımda gerçekleşmektedir. İlk aşamada özgül olmayan bağlanmaları en aza indirmek amacıyla katı ortamda hibridizasyonu planlanan membranın bloklanması yer alır. Daha sonra hedef DNA ile prob birleşir. Son olarak hibridize olmayan problemlerin yıkanması ve görüntülenmesi yer alır (Bayraç ve ark., 2012).

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

FISH, bir kromozom veya gerilmiş DNA molekülü üzerindeki işaretlenmiş nükleotitlerin pozisyonunun doğrudan görüntülenmesini sağlar. FISH prensip olarak, hedef DNA sekansı tek sarmallı hale denatüre edildikten sonra, tamamlayıcı prob DNA sekansının haptenlerle veya florokromlarla işaretlenmesi esasına dayanır. Genomda istenilen hedef DNA bölgesi, eş zamanlı ve floresan ışığa veren problemler yardımı ile işaretlenerek floresan mikroskopunda görüntülenir. (Paster ve Dewhirst, 2009). İncelenecek hücre örneği bir mikroskop lamı üzerinde kurutulur ve formamit uygulamasıyla kromozomlar denatüre edilir. Bu işlemler sırasında, ana karakteristik metafaz morfolojileri korunur. Probun kromozomal DNA ile hibritlendiği pozisyon, işaretli DNA'dan elde edilen floresan sinyalin saptanması ile görüntülenir (Brown, 2015).

Checkerboard DNA-DNA Hibridizasyonu

Socransky ve ark. (1994), checkerboard DNA-DNA hibridizasyonu metodunu geliştirmiştir. Bu metottan destek membranı üzerinde aynı anda 45 DNA örneğinin hibridizasyonunu sağlar. Hibridizasyon sinyalleri, kimyasal ışıldama yapan substratın görüntülenmesiyle takip edilir. Bu metot, bir veya birden fazla klinik örnekte bulunan çok sayıda bakteri türlerinin varlığını anında belirlemeye olanak tanır. Diagnostik amaçlardan ziyade, sağlık ve hastalıkta oral mikrobiyomun analizi çalışmalarında kullanılmaktadır (Paster ve Dewhirst, 2009). Checkerboard DNA-DNA hibridizasyonunun belirleme kapasitesi ortalama 10^3 - 10^4 hücredir (Siqueira ve Rocas, 2011).

DNA Mikrodizin

Transkripsiyonun genomik bir ölçekte değerlendirilmesi, tüm genomu barındıran DNA mikrodizin teknolojisi ile sağlanabilmiştir. Bir mikroorganizmanın tüm genleri mikroskop lamı ölçeğinde bir alana toplanabilir ve binlerce genin ekspresyon seviyeleri tek bir deneyde eş zamanlı olarak belirlenebilir. DNA mikrodizin teknolojisi, genlerin ve gen polimorfizmlerinin araştırılması, ekspresyon analizleri, potansiyel terapötik ajanların geliştirilmesi, genlerin sınıflandırılması gibi birçok alanda kullanılabilir. Ancak, hibridizasyon ve etiketlemede yaşanan sorunlar, farklı çiplerin eş hassasiyette olmaması, farklı çiplerle elde edilen sonuçların henüz karşılaştırılmıyor olması, optimizasyon ve standardizasyon sorunları nedeniyle semikantitatif olarak kabul edilmektedir (Bal ve Budak, 2012).

2.8.3 Gen Sekanslama

DNA sekanslama veya dizi analizi DNA primer yapılarının tayininde ve nükleotit baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayalı bir yöntemdir (Ward ve ark., 1990). DNA sekanslamada birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntem Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi ile günümüzde daha yaygın olarak kullanılan Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemidir (Maxam ve ark., 1977; Sanger ve ark., 1977).

Woese ve ark. (1985; 1987), mikroorganizmalar arası filogenetik ilişkilerin, mikroorganizmaların genetik kodlarının evrensel ve sabit bir bölgesinin kıyaslanması ile saptanabileceğini ortaya koymuştur. Bakteriler için bu evrensel bölgeler 5S rDNA, 16S rDNA ve 23S rDNA'yı kodlayan genlerden meydana gelmektedir. Bakterilerde filogenetik analizlerde identifikasyon için en sık kullanılan DNA sekansı 16S rDNA genidir (Tortoli, 2003). 16S rDNA geninin saklanmış ve hiperdeğişken bölgeleri vardır. Gen, 9 adet hiperdeğişken bölgeye sahiptir. Taksonomik sınıflandırmalar için tüm genom dizilimi yerine bu hiperdeğişken bölgelerden bir tanesinin dizilimini yapmak yeterlidir (Woese, 1987).

Sanger Zincir Sonlanma Yöntemi (Dideoksi Yöntemi)

Sanger sekanslama yöntemi, yeni nesil sekanslama yöntemlerinin geliştirilmesinden önce, 30 yıl boyunca DNA sekanslama teknolojisinin altın standardı olarak kabul edilmiştir. Sanger sekanslama işlemi özet olarak, DNA saflaştırma, DNA sentezi, boyayla işaretlenmiş dideoksinükleotitler (ddNTP) ile zincir sonlandırma metoduyla işaretleme, kapiller elektroforez ve floresans saptama basamaklarından oluşur. Dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. Dizi analizi yapılırken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir karışım kalıp DNA zinciri, bir primer, dNTP'lerin dördü ve az miktarda ddNTP'lerden birini içerir. Özgül zincir sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelir (Klug ve ark., 2000). Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yan yana yürütülür. Uygulanan elektriksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP'nin tipine göre okunur (Klug ve ark., 2000).

Sanger tekniği yıllar boyunca 800 baza kadar uzayan okumalar sağlayacak şekilde gelişmiştir (Gharizadeh ve ark., 2007). Sanger sekanslama oral mikrobiyoloji alanına, sağlıklı mikrobiyomun, çürük, periodontitis, periimplantitis ve halitosis ile ilişkili mikrobiyomların incelenmesiyle büyük katkılar sağlamıştır (Siqueira ve ark., 2012). 13 filuma ait 1000'den fazla mikroorganizma türü ortaya konmuştur (Dewhirst ve ark., 2010). Ancak 800 baz okumak için gereken zamanın uzunluğu, ilk 15-40 bazın düşük kalitede olması, baz başına harcanan sarf malzemenin göreceli olarak pahalı olması bu tekniğin dezavantajlarını teşkil eder (Gharizadeh ve ark., 2007).

Yeni Nesil Sekanslama (YNS) Teknolojileri

Sanger sekanslama tekniği kullanılarak uzun DNA bölgelerinin dizilenmesinin uzun süre alan zahmetli işlemler olması nedeniyle; İnsan Genom Projesi planlanırken maliyeti ve süresi görece kısa alternatif teknikler geliştirilmiştir

(Metzker, 2009). Önceleri, Sanger yöntemi otomatik elektroforez cihazlarının kullanımıyla modifiye edilmeye çalışılmıştır. 454 Life Sciences firmasının geliştirdiği ilk büyük çaplı paralel sekanslama tekniği, 500 kat daha hızlı ve 50 kat daha ucuz bir sekanslama hizmeti sunarak Yeni Nesil Sekanslama (YNS) platformlarının ilk versiyonlarının ortaya çıkmasına zemin oluşturmuştur (Ronaghi ve ark., 1999). Bir yıl sonra Solexa firması Genome Analyzer'ı ve Agencourt firması da SOLID sistemlerini piyasaya sürmüştür (Schuster, 2008).

YNS'nin, Sanger sekanslama tekniği ile kıyaslandığında, hız ve maliyetin yanı sıra örnek hazırlama basamaklarını kolaylaştırması avantajı da vardır. Sanger sekanslamada klonlama ve amplifikasyon basamakları *in vivo* yapılmaktadır. *In vivo* klonlamada, DNA parçaları plazmide bağlanır ve bakteriye yerleştirilir. Bu bakteri plazmidi amplifiye etmek üzere proliferer olur. Her bakteri kolonisi teker teker toplanır ve plazmid DNA'sı sekanslama için izole edilir. YNS platformlarında ise kütüphane oluşturma ve örnek amplifikasyonu *in vitro* olarak yapılır. Bu sayede örnek hazırlama ve kütüphane oluşturma işlemlerinin süresinin haftalardan saatlere indirilmesi sağlanır (Ronaghi ve ark., 1999).

Sanger sekanslama tekniği birinci nesil olarak kabul edilirken; 454 Roche, SOLID, Illumina HiSeq 2000 ve IonTorrent platformları yeni/ikinci nesil sekanslama metotları arasında gösterilmiştir. Son yıllarda, Pacific Bioscience ve Oxford Nanopore teknolojileri, "yeni-yeni" veya üçüncü nesil sekanslama olarak adlandırılmıştır. Oxford Nanopore teknolojisi, bazı kaynaklarda dördüncü nesil sekanslama olarak da sınıflandırılmaktadır. Dolayısıyla yeni nesil sekanslama sistemlerinin, evrensel bir sınıflandırılmasının yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır (Schuster, 2008) (Şekil 5).

<p>454 Sekanslama / Roche</p> <ul style="list-style-type: none"> • GS Junior System • GS FLX System • GS FLX Titanium System <p>Illumina (Solexa)</p> <ul style="list-style-type: none"> • HiSeq System • Genome Analyzer IIX • MiSeq System <p>Applied Biosystems-Life Technologies</p> <ul style="list-style-type: none"> • SOLID 5500 • SOLID 5500xl <p>Ion Torrent- Life Technologies</p> <ul style="list-style-type: none"> • Personal Genome Machine (PGM) • Proton 	<p>Yeni Nesil Sekanslama</p> <p>Amplifiye Tek Molekül Sekanslama</p> <p>İkinci Nesil Sekanslama</p>
<p>Helicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Helicos Genetic Analysis System <p>Pacific Biosciences</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pac Bio RS <p>Oxford Nanopore Technologies</p> <ul style="list-style-type: none"> • GridION • MinION 	<p>Üçüncü Nesil Sekanslama</p> <p>Yeni-yeni Nesil Sekanslama</p>

Şekil 5. Yeni nesil sekanslama tekniklerinin sınıflandırılması (Shuster, 2008'den uyarlanmıştır)

Roche 454 Sistemi (Pirosekanslama)

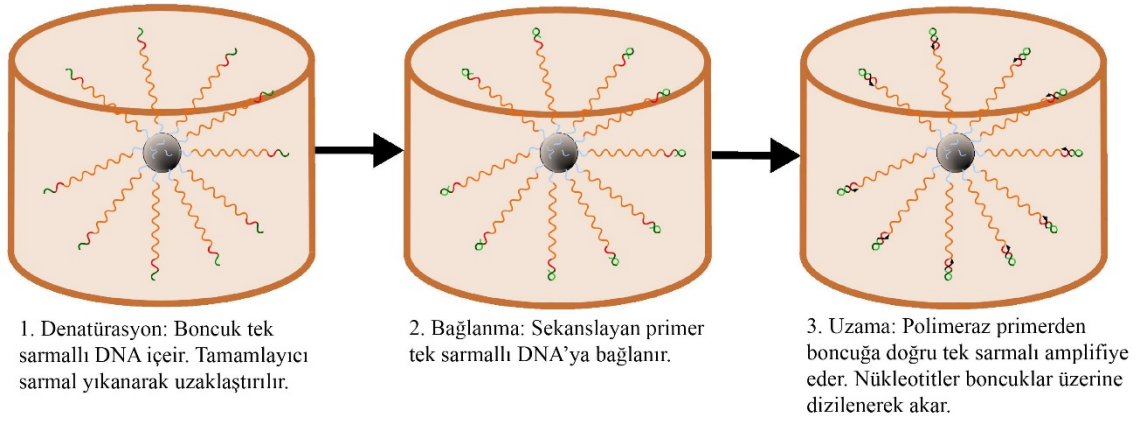
Roche 454 sistemi, pirosekanslama teknolojisini kullanan ilk ticari yeni nesil sekanslama teknolojisidir (Ronaghi ve ark., 1999) (Şekil 6). Cihazın çalışma prensibi nükleotitlerin birleşmesi sırasında ortaya çıkan pirofosfatın saptanması esasına dayanır (Ronaghi, 2001).



Şekil 6. GS FLX pirosekanslama sistemi (Viestraete, 2012'den uyarlanmıştır)

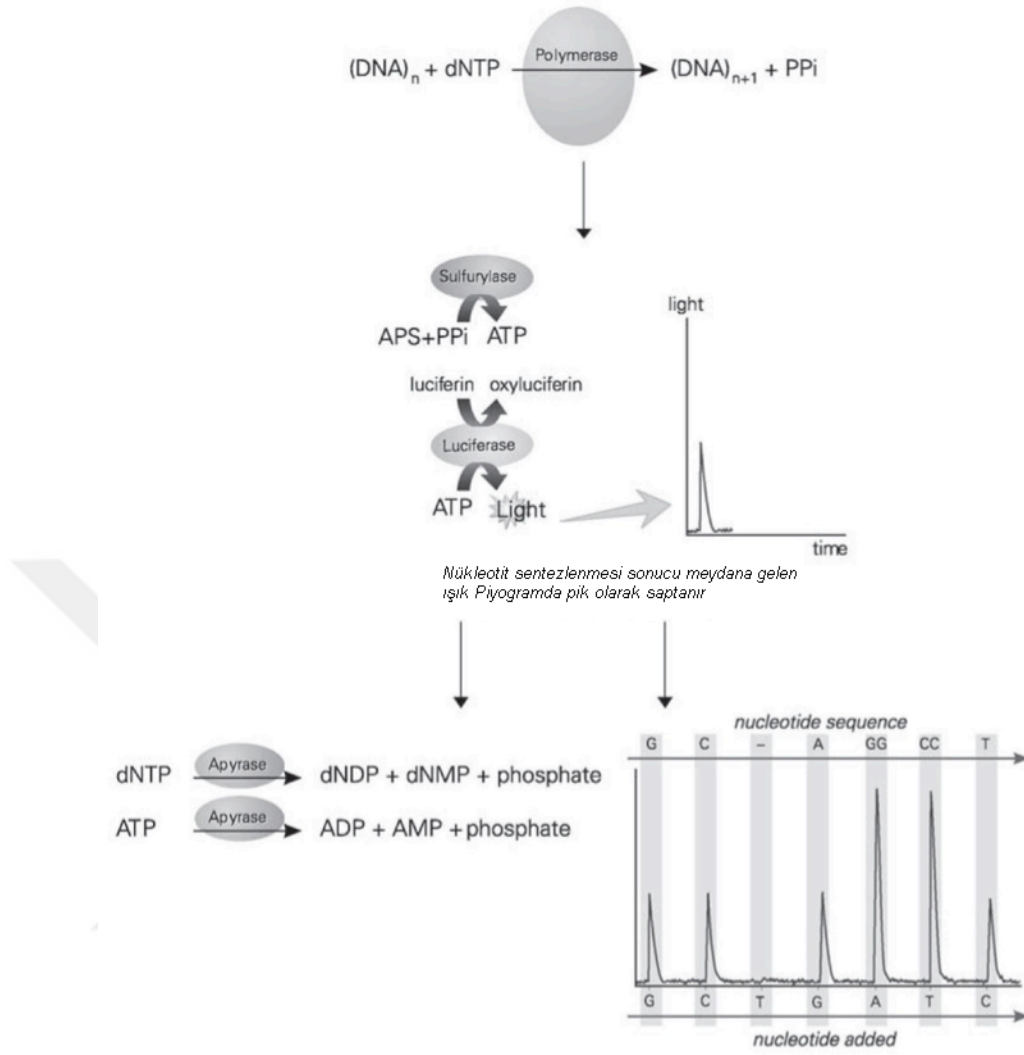
Pirosekanslama teknolojisi, genel olarak DNA kalıp hazırlama, gen sekanslama, görüntüleme ve veri analizi basamaklarından oluşur. DNA izole edilir, bölünür, özel adaptörlere bağlanıp tek sarmal haline getirilir. Emülsiyon PZR işlemi, hücre içermeyen bir sistemin içinde sekanslama kalıplarının hazırlanması ve klonal amplifikasyon için kullanılır. Emülsiyon PZR, genomik DNA'nın kaybını engellediği için oldukça avantajlı bir işlemdir. Yağ-su bazlı emülsiyon solüsyonu şablon içindeki kuyucuklarda yer alır. Emülsiyonun aköz kısmı PZR ajanlarını, sekanslanacak DNA parçalarını ve boncuk üzerindeki oligonükleotitleri içerir (Şekil 7). Her bir boncuk üzerinde bir oligonükleotit primeri bulunur ve her boncuğun kuyucuk içindeki yeri sabittir. Bu oligonükleotit primeri kütüphane meydana getirilirken kullanılan eşleyici sekansın tamamlayıcısıdır (Ronaghi, 2001).

Reaksiyona dahil olan dört enzim; DNA polimeraz, ATP sülfürilaz, lüsiferaz ve apirazdır. Adenozin 5' fosfosülfat (APS) ve lüsiferin de substrat olarak reaksiyona dahil olurlar (Ronaghi, 2001).



Şekil 7. Hedef DNA'nın denatürasyonu, bağlanma ve uzatılma reaksiyonlarında kuyucuk içindeki her bir boncuğun etrafındaki oligonükleotit kullanılır (Viestraete, 2012'den uyarlanmıştır)

Nükleotitler DNA sarmalının açık 3' ucuna bağlanır ve bu reaksiyon sonucu ortama pirofosfat (PPi) salınımı olur. Adenozin 5' fosfosülfat (APS) ile pirofosfat, sülfürlaz varlığında ATP'ye dönüşür. Açığa çıkan ATP, lüsiferaz enzimi sayesinde lüsiferinin oksilüsiferine dönüşmesini sağlar. Bu reaksiyon sonucunda ortama maksimum 560 nm dalga boyunda ışık salınır. Işık, CCD kamera tarafından saptanır ve piyogramda pik sinyal olarak kaydedilir. Sentez boyunca DNA, tamamlayıcı nükleotitler tarafından genişletilir ve DNA sekansı ekrandaki piyogramda incelenir. Apiraz enzimi ATP'yi ve reaksiyona katılmayan NTP'yi indirger (Ronaghi, 2001) (Şekil 8).

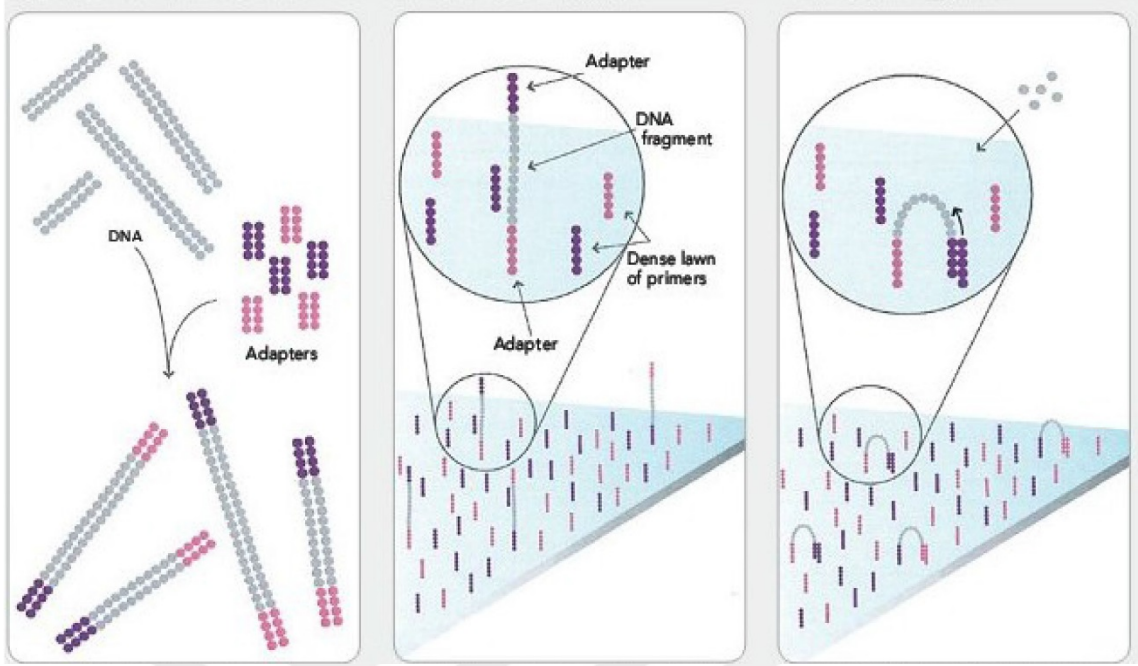


Şekil 8. Pirosekanslama reaksiyonu (Marsh ve ark., 2005)

Illumina Genome Analyzer (GA)/HiSeq Sistemi

Illumina sistemi de 454 platformu gibi senteze dayalı sekanslama prensibine bağlı çalışır. Illumina sekanslama kütüphane oluşturma, köprü amplifikasyonu ve reversibl sonlanma sekanslaması basamaklarından oluşur (Şekil 9). Lam yüzeyine ve kalıp DNA'ya kovalent olarak bağlanmış küçük adaptör molekülleri içerir. Bağlanmış bu parçalar birkaç kez PZR ile çoğaltılarak klonal koloniler oluşturulur. Dört tip ddNTP eklenir ve dahil edilmeyen nükleotitler yıkanıp uzaklaştırılırken; sonlandırıcı baz, işlemi geçici olarak sonlandırır. ddNTP'lerdeki floresans boya, lazer ışını ile uyarılıp görünür hale gelir ve CCD tarafından algılanıp kaydedilir (Varshney ve ark., 2009).

1. Genomik DNA örneğinin hazırlanması 2. DNA'nın yüzeye tutunması 3. Köprü amplifikasyonu



Şekil 9. Illumina GA'da köprü amplifikasyonu oluşturulması (Viestraete, 2012)

2010 yılında Illumina HiSeq 2000 piyasaya sürülmüştür. HiSeq 2000, amplicon ve bakteri örneği sekanslanması için uygundur. Kendi sınıfındaki diğer platformlarla karşılaştırıldığında en ucuz sekanslama platformu olarak en yüksek çıktı kapasitesine sahiptir (Liu ve ark., 2012).

Applied Biosystems SOLID Sistemi (AB SOLID)

Sekanslayıcı hibridizasyon ve ligasyon (bağlanma) yoluyla dizileme yöntemini kullanır. Dizilemeden önce DNA emülsiyon PZR ile çoğaltılır. Elde edilen boncukların her birinde aynı DNA'nın kopyaları bulunmaktadır, bu boncuklar bir cam lamın üzerine yerleştirilir. Sonuçta, Illumina dizilemesine benzer sayı ve uzunluklarda diziler elde edilir. Ancak okuma uzunluğu Illumina ile kıyaslandığında düşüktür. Buna rağmen SOLID sistemi, Liu ve ark. (2012) tarafından en hassas ve doğru sonuçları veren yeni nesil sekanslama tekniği olarak rapor edilmiştir.

Kompakt Bireysel Genom Cihazı Sekanslayıcıları

Ion bireysel genom cihazı ve MiSeq, Ion Torrent ve Illumina tarafından üretilmiş küçük boyutlu ve hızlı sonuç veren cihazlardır. Ancak sınırlı bilgi

sağladıklarından klinik uygulamalar ve küçük laboratuvarlarda kullanımları hedeflenmiştir (Liu ve ark. 2012).

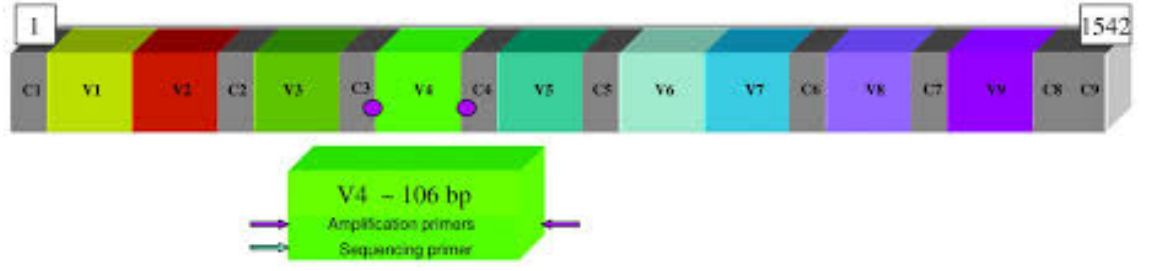
Üçüncü Nesil Genom Sekanslama

Üçüncü nesil genom sekanslama cihazlarının, sekanslama öncesinde PZR uygulanmasına ihtiyaç duymaması ve sinyallerinin gerçek zamanlı saptanabilmesi gibi önceki nesil sekanslama platformlarından ayıran iki önemli özelliği vardır. PZR'nin uygulanmaması DNA hazırlama süresini kısaltır ve PZR'ye bağlı gelişebilecek hataları elimine eder (Timp ve ark., 2010).

2.8.4 Biyoinformatik

Biyoinformatik, moleküler biyoloji başta olmak üzere biyolojinin çeşitli dallarında elde edilen geniş hacimli verilerin analizi için bilgisayar teknolojisi ve veri işleme programlarını içeren disiplinlerarası bir alandır (Baloğlu ve ark., 2012).

Yeni nesil gen sekanslama ve mikrodizin yöntemleri, kısa okumalar elde ettiğinden genin belirli bir bölgesinin okunmasının ilgili bakterinin identifikasyonu için yeterli olduğu temeline dayanır. Bu evrensel gen bakteriler için 16S rRNA'nın dokuz hiperdeğişken bölgelerini kodlayan genlerdir (Woese, 1987). Hiperdeğişken bölgelerin kullanılması ve kısa okumalar iki tip hataya neden olmaktadır. 1. tip hata; aynı iki genin farklı genler olarak belirlenmesidir. 2. tip hata ise; farklı iki genin aynı gen olarak tanımlanmasıdır (Siqueira ve ark., 2011). Günümüzde tüm genin dizilemesini yapabilecek hızlı ve maliyeti uygun bir seçenek henüz mevcut olmadığından, DNA mikrodizileme ve yeni nesil sekanslama platformları 1. ve 2. tip hataları minimize etmeye çalışmaktadır. Biyoinformatik ile bu analizlerle elde edilen verileri işlemlerden geçirmek, temizlemek, düzenlemek ve kıyaslanabilir hale getirmek mümkün olmuştur. Bu sayede 454 GS FLX pirosekanslama platformlarında 1. tip hata oranı %1'in de altına çekilebilmiştir (Reeder ve Knight, 2010). Güncel yeni nesil sekanslama metodlarını kıyaslayan bir çalışmada, 454 GS FLX pirosekanslama platformunun doğruluk oranı %99.9 olarak belirlenmiştir (Quince ve ark., 2009).



Şekil 10. 16S rDNA geninin saklanmış (conserved-C) ve hiperdeğişken (V) bölgeleri (Petrosino ve ark., 2009)

Biyoinformatiğin uygulama alanları zamanla hızla genişlemiştir. Bu alanlar şöyle özetlenebilir (Baloğlu ve ark., 2012):

1. DNA ve protein dizilimi araştırmaları
2. Makromoleküler yapıların üç boyutlu dizilim araştırmaları
3. Küçük moleküllerin ligandlarıyla etkileşimlerinin araştırılması
4. Biyolojik veritabanlarının oluşturulması
5. Biyolojik informasyonun paylaşımının kolaylaştırılması
6. Veri analizi ve iletiminin kolaylaştırılması
7. Gen ürünleri için bilgi ağlarının oluşturulması
8. Biyolojik faaliyet süreçlerinin simülasyonu

Veri tabanları internet kullanıcılarına açık, ücretsiz olarak kullanılabilen biyolojik verilerin organizasyon ve depolama alanlarıdır. Biyolojik veri tabanları içeriklerine göre birincil, ikincil ve özelleşmiş veri tabanları olarak üç kategoride incelenmektedir. Birincil veri tabanları çalışmayı yapan araştırmacılar tarafından saptanan ve sisteme yüklenen ham verilerden oluşmaktadır (Altschul ve ark., 1990). Birincil veri tabanları, Japonya DNA Databank, Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı ve Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (GenBank); “Uluslararası Nükleotit Dizi Veri Tabanı Birliği” adı altında birleştirilmiştir. GenBank veri tabanı 1988 yılında kurulmuştur (GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov, 2016). Veri aramanın yanında, aranan veriyle diğer veriler arasında anlamlı ilişkiler kurarak çapraz referanslama yapabilmekte ve aranan genin nükleotit sekansına ilaveten o gene ait DNA ve protein sekans bilgilerine, genin tüm genomdaki pozisyonunu gösteren harita bilgilerine ve o gen/sekansla ilişkili literatür özetlerine erişim sağlamaktadır (Altschul ve ark., 1990). GenBank veri tabanında sekansların

analizini yapmak için çeşitli programlar kullanılmaktadır. Bu programlardan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - Basit Lokal Hizalama ve Arama Motoru), sekansı bilinen ancak tanımlanmamış genlerin, veri tabanına yüklenen tüm sekanslarla karşılaştırarak yüksek oranda benzerlik gösteren gen veya gen bölgelerinin listesini sunmaktadır. Başka bir anlatımla, elde edilen DNA/RNA/protein serisinin genom haritası çıkarılmış organizmaların genomlarıyla karşılaştırıp eldeki serinin hangi genle ne kadar benzer olduğunu sayısal olarak E-değeri (expect value) şeklinde verir. BLAST aynı zamanda aranan nükleotit veya protein sekansının veri tabanında yer alan organizmaların sekanslarıyla benzerlik oranını da gözönüne alarak hizalama yapmaktadır (Huang, 1994).

İkincil veri tabanları sekanslara ait daha detaylı fonksiyonel işlenmiş verileri içerir. Nükleotit sekansı ait olduğu protein sekansına çevrilerek, proteinlere ait fonksiyonel ve metabolik bilgiler elde edilmektedir. Özelleştirilmiş veri tabanları ise, özel bir araştırmaya veya tek bir organizmaya özgü olabilirler. Örneğin, Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü tarafından meydana getirilmiş “Mikrodizin Gen İfade” veri tabanı sadece mikrodizileme çalışmalarından elde edilmiş verilerden oluşan bir özelleşmiş veri tabanıdır (Baloğlu ve ark., 2012).

2.8.5 Metagenomik Tekniklerin Limitasyonları

Metagenomik analizler, incelenen komünite üyelerinin “kimlik”lerini ortaya koyar ancak saptadığı üyelerin gen ekspresyona, ekspresyon dinamiklerine, metabolik fonksiyonlarına dair, başka bir deyişle buldukları komünitede “ne yaptıkları”na dair bilgi sağlamazlar (Warnecke ve Hugenholtz, 2007). Dolayısıyla komünite üyelerinin birbirleriyle ilişkileri, örneğin alındığı spesifik zaman ve yer parametrelerindeki aktiviteleri ve bu aktivitelerin çevresel etkenlerle dinamik ilişkisi açığa çıkarılamaz (Moran, 2009). Metagenomik teknikler, mikroorganizmayı etkilemiş, ancak DNA seviyesinde bir değişikliğe sebep olmamış durumların saptamasında da kullanılamaz. Bir organizmanın veya genin fonksiyonel aktivitelerini araştırmak için metatranskriptomik analizler uygulanmalıdır (Urich ve ark., 2008).

Moleküler metodların başka bir dezavantajı, bir mikroorganizmanın canlı mı ölü mü olduğunun nükleotit diziliminden anlaşılabilmesidir (Sundqvist ve Figdor,

2003). Dolayısıyla DNA'sından o mikroorganizmanın, kök kanal mikrobiyomunun araştırılan andaki üyesi mi; yoksa kök kanal sistemine giriş yapmış ancak şartlara uyum sağlayamayıp canlılığını kaybetmiş bir mikroorganizma mı olduğu anlaşılabilir. Ölü mikroorganizmaların kök kanal sisteminde diğer mikroorganizmalar tarafından sindirildiği varsayılsa da, DNA'larının varlığını ne kadar süre devam ettirdikleri bilinmemektedir. DNA'nın hidroksiapatite yüksek afinitesi olduğu ve hidroksiapatit yüzeyinde uzun süre varlığını devam ettirebildiği bilinmektedir (Bernardi, 1965). Young ve ark. (2007), diş dokusunda *E. faecalis* DNA'sının hücre ölümünden 1 yıl sonra bile PZR tarafından saptanabildiğini bildirmişlerdir. Bu durum farklı endodontik mikrobiyomların elde edilmesini, saptanmasını ve analizini zorlaştırmaktadır.

2.9 Kök Kanallarından Örnek Almada Kullanılan Teknikler

Mikrobiyomun analizi için kullanılacak metot ne olursa olsun; numunenin uygun şekilde alınması en kritik aşamadır. Alınan örneğin kök kanal sistemi mikrobiyotasını en uygun şekilde temsil etmesi gerekmektedir. Nonmikrobiyal etiyolojiye sahip postendodontik infeksiyonlar hariç kültür tekniklerinin veya kültürden bağımsız tekniklerin mikroorganizmaları saptama oranı, çeşitli anatomik ve metodolojik faktörlere bağlıdır. Sayılarının az olmasının yanı sıra mikroorganizmaların istmus, lateral kanal ve kanal içi düzensizliklerde bulunmaları, en duyarlı saptama yöntemlerinin bile yetersiz kaldığı durumlardır (Sundqvist ve Figdor, 2003).

2.9.1 Kağıt kon ile örnek alma

Kök kanallarındaki eski dolgu materyal artıkları, medikaman ajanlar veya pulpa artıkları, steril serum veya örnek taşıma solüsyonu ile kanalların irrigasyonu ile uzaklaştırılır. Kanal duvarında devamlı ileri-geri hareketlerle kullanılan el eğesi yardımıyla kanal duvarlarındaki biyofilm tabakası parçalanarak, uygun bir örnek almaya çalışılır. Kök kanalları steril serum veya örnek taşıma solüsyonu ile doldurulur. Örnek steril kağıt konularla alınıp taşıma ortamına aktarılır. Kök kanal sistemindeki tüm sıvı toplanana kadar kağıt konularla yapılan işlemler tekrarlanır. Kullanılan son kağıt kon ile apikal bölgenin en uç kısımlarından örnek alınır (Möller, 1966).

Kök kanal sisteminin, lateral kanallar, istmuslar, kör boşluklar içeren kompleks bir anatomi gösterdiği bilinmektedir. Mikroorganizmaların yerleştiği bu anatomik düzensizlikler, kök kanal sisteminin dezenfeksiyonunda zorluklar çıkardığı gibi kağıt kon ile örnek alma işleminde de bazı problemlere neden olmaktadır (Sathorn ve ark., 2007). Tran ve ark. (2013), kağıt konlar ile örnek alma işleminin yanlış negatif sonuçlara yol açtığını göstermiştir. Kağıt konlar, şekil ve yapılarından ötürü, kanal içindeki anatomik düzensizliklere temas edemediğinden, bu düzensizliklerde yer alan mikroorganizmaların örneğinin alınmasında yetersiz kalır.

Van der Horst ve ark. (2013), steril kağıt konların bakteriyel DNA kontaminasyonuna neden olduğunu rapor etmiştir. Kağıt konların, pirosekanslama ve denatüre gradyant jel elektroforezi gibi analiz yöntemlerinin uygulanacağı profil çıkarma çalışmalarında kullanımının uygun olmadığı belirtilmiştir.

Persistan infeksiyonların araştırılmasında, kağıt konların kullanılabilmesi için eski kök kanal dolgusu tamamen uzaklaştırılmalıdır. Ancak çalışmalar, kök kanal dolgu materyallerinin yüzeyinde de mikroorganizmaların kolonize olabileceğini göstermiş ve çalışmalarda kök kanal dolgu materyallerinin de incelenmesini önermişlerdir (Takemura ve ark., 2004; George ve ark., 2010; Karygianni ve ark., 2015). Kök kanal dolgu materyallerinin sertleşme sonrası büzülme gibi fiziksel özellikleri dentin ve dolgu arayüzüne mikroorganizma girişini kolaylaştırmaktadır. Güta perka konlarının uygun olmayan saklama koşulları ve işlem esnasında kontaminasyonları, yüzeylerinde mikroorganizma bulaşına yol açabilmektedir (Gomes ve ark., 2005; Naval ve ark., 2011). Karygianni ve ark. (2015), kök kanal sisteminden aldıkları örneğe ek olarak, uzaklaştırdıkları obtürasyon materyalinin mikrobiyal analizini yaptıkları çalışmalarında dokuz bakteri türünü sadece dolgu materyalinden izole etmişlerdir.

2.9.2 Dentin tıraşlama ile örnek alma

Bakterilerin dentin tübüllerini infekte edebildikleri gösterilmiştir (Siqueira ve Rocas, 2011) Bu nedenle Haapasalo ve Orstavik (1987), bakterilerin daha iyi saptanabilmeleri için infekte dentinden örnek alınmasını önermiştir. Bu teknik, kök kanal boşluğuna komşu dentin tabakasının, gates glidden frezler veya kanal

eğeleriyle tıraşlanarak dentin talaşlarının toplanması esasına dayanır. Özellikle, dezenfektan materyallerin antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirildiği *in vivo* çalışmalarda bu teknik sıklıkla kullanılmaktadır (Moqbel ve ark. 2014; Kamberi ve ark., 2012).

2.9.3 Pulverizasyon

Pulverizasyon, bir materyalin ezilerek öğütülmesi anlamına gelmektedir. Kriyojenik öğütücüler adli tıpta kartilaj ve kemik gibi vital dokulardan DNA ekstraksiyonu amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Fisher ve ark., 1993). Diş hekimliğinde de kullanılan kriyojenik pulverizasyon tekniğinde, aseptik şartlarda çekilen dişlerin kök yüzeyleri kontaminasyonu engellemek için dezenfektanlarla temizlenir. İşlemden önce köklerin dış yüzeylerinden alınan bir örnek ile sterillik kontrolü yapılır. Dişlerin kronları uzaklaştırılmış halde tamamı veya incelenecek bölgesi hazırlanıp steril kaplarda likit nitrojen kullanılarak dondurulur. Dondurulmuş parçalar steril kaplarda öğütücü makineler kullanılarak toz haline getirilir (Tran ve ark., 2013).

Pulverizasyon tekniğinin kök kanal sisteminin mikrobiyal analizinde kullanımının en büyük avantajı, kök kanal sisteminin daha kapsamlı ve mikrobiyomu daha iyi temsil eden bir örnek alınmasını sağlamasıdır. Tran ve ark. (2013), steril kağıt konularla aldıkları örneklerde hiç üreme saptamazken; aynı dişlerin pulverizasyonu ile elde ettikleri örneklerde bakteriyel üreme göstermişlerdir. Ancak incelenecek dişlerin çekilmesini gerektirdiği için *in vivo* çalışmalarda kullanımı uygun değildir. Kök yüzeyleri kontaminasyona açık olduğundan aseptik şekilde uygulanması gereken hassas bir tekniktir (Tran ve ark., 2013).

3. MATERYAL ve METOT

Primer veya sekonder/persistan endodontik infeksiyon tanısı ve çekim endikasyonu konan dişlerden kriyojenik pulverizasyon sonrası izole edilen mikrobiyal DNA'nın pirosekanslama metodu ile metagenomik analizini yapmayı ve infeksiyonlara özgü mikrobiyom profilini çıkarmayı amaçlayan çalışmamıza Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından verilen 25.07.2014 tarihli ve B.30.2.ODM.0.20.08/1134 sayılı etik kurulu onay raporu alınarak başlandı.

3.1 Örnek Hazırlanması ve Örneklerin Pulverizasyonu

Çalışmada, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı'nda yapılan muayene sonucunda çekimlerine karar verilmiş dişler kullanıldı. Protetik amaçla çekim endikasyonu konmuş veya kanal tedavisi yaptırmak istemediklerinden ilgili dişlerinin çekimini talep eden hastalar, Endodonti Anabilim Dalı'nda ikinci bir muayeneye tabii tutuldu. Muayeneler sonucunda, 18-65 yaşları arasında, sistemik olarak sağlıklı, gönüllü olur formunu imzalayan hastaların yapılan radyolojik incelemeler sonucunda belirgin periradiküler radyolüsent lezyon saptanmış dişleri çalışmaya dahil edildi. Hastaların tedavi öncesindeki üç aylık periyotta antibiyotik kullanmamış olmasına, sistemik hastalığı bulunmamasına, örnek olarak seçilecek dişlerin oral ortama açık pulpa odası varlığı göstermemesine dikkat edildi. Uygun koşulları sağlamayan ve tedavi sürecine uyum göstermeyen hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

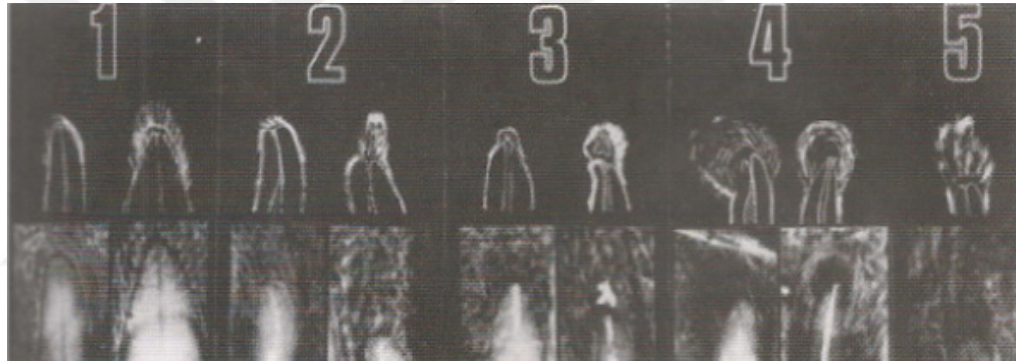
Hastaların klinik ve radyolojik muayenesinde ortopantomografları ve/veya ilgili dişlerin periapikal radyografileri değerlendirildi. Dişlerde mevcut olan radyolüsent lezyon Orstavik'in belirlediği Periapikal indeks (PAI) kriterlerine uygun olarak değerlendirildi (1986). PAI indeksi radyografiler üzerinde apikal periodontitisi, lezyonun artan boyutuna ve şekline göre 1'den başlayıp 5'e kadar ilerleyen bir skala kullanarak değerlendiren bir sistemdir (Şekil 11).

PAI skorları şu şekilde tanımlanmıştır:

1. Normal periapikal periodonsiyum
2. Kemik yapısında minimal değişiklikler mevcut

3. Kemikte mineral kaybı ile birlikte görülen yapısal değişiklikler mevcut
4. Sınırları kesin ve iyi tanımlanabilen radyolusensi gözlenen apikal periodontitis varlığı
5. Geniş radyolusent alanlar gösteren yaygın apikal periodontitis varlığı (Orstavik, 1986).

PAI skorlamaları iki farklı klinisyen tarafından yapıldı. Klinisyenler tarafından örnekler değerlendirilmeden önce 10 apikal periodontitis vakasının radyolojik görüntüsü PAI'ye göre değerlendirildi ve kalibrasyonları Cohen Kappa katsayısı ile saptandı. Periapikal indeks skoru 3 ve 3'ten yüksek olan dişler seçildi. Kappa testine göre klinisyenler arasında %94 uyum tespit edildi.

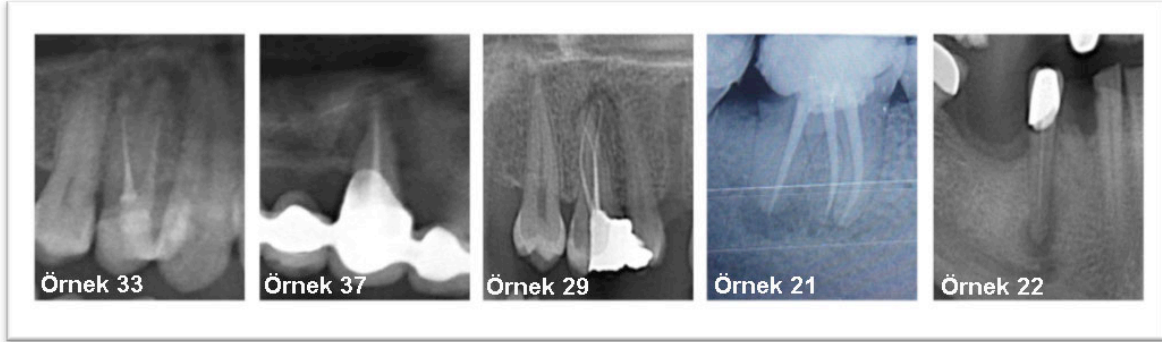


Şekil 11. Periapikal İndeks Skorlama Sistemi (Orstavik, 1986)

Endodontik enfeksiyonun türüne göre hastalar iki gruba ayrıldı. Primer endodontik enfeksiyon grubunu, yapılan muayene sonucunda kronik apikal periodontitis veya kronik apikal apse tanısı konulan dişler oluşturdu (Şekil 12). Persistan/sekonder enfeksiyon grubunda ise en az 1 yıl önce bir diş hekimi tarafından kök kanal tedavisi yapılmış dişler yer aldı. Persistan/sekonder enfeksiyon grubuna kök kanal dolgu kalitesi radyolojik olarak Tronstad ve ark.'nın (2000) kriterlerine göre “yeterli” olarak tanımlanan, daimi koronal restorasyonu mevcut ancak belirgin periradiküler radyolusensi gösteren dişler dahil edildi (Şekil 13). Hastalardan lokal anestezi ve çekim işlemleri ile çalışmaya dahil edilmeleriyle ilgili iki ayrı aydınlatılmış onam alındı.



Şekil 12. Primer infeksiyon grubuna dahil edilen dişlerden bazılarının radyografik görüntüleri



Şekil 13. Sekonder/Persistan infeksiyon grubuna dahil edilen dişlerden bazılarının radyografik görüntüleri

Çekim işlemleri aseptik koşullarda steril aletler kullanılarak atravmatik olarak gerçekleştirildi. İşlem öncesinde, hastalara bir dk boyunca %0.12'lik klorheksidin glukonat ile gargara yaptırıldı ve cerrahi operasyon alanı aynı solüsyon kullanılarak yıkandı. Çekim sonrasında diş yüzeyi steril salin solüsyonu ile yıkandı ve 15 numaralı steril periodontal küret kullanılarak kök yüzeyindeki apikal periodontitis lezyonu dahil tüm yumuşak dokular uzaklaştırıldı. Kök yüzeyleri önce %3'lük hidrojen peroksit daha sonra %5.25'lik sodyum hipoklorit solüsyonları kullanılarak dezenfekte edildi. Sodyum hipoklorit solüsyonunun kök yüzeylerindeki inaktivasyonu için ise steril %5'lik sodyum tiyosülfat solüsyonu kullanıldı. Solüsyonlar kök yüzeylerine steril gazlı bezlerle ovularak uygulandı.

Dişler, mine-sement birleşim hattından kronlarından ayrıldı. Her kesim işlemi asepsi korunarak steril klinik piyasemen ve steril elmas diskler kullanılarak yapıldı. Her dişin kesimi için farklı steril elmas separey disk kullanılırken; klinik piyasemen steril alüminyum folyolarla kaplandı ve her kullanım sonrasında

piyasemenin yüzeyi sırasıyla %96'lık etanol ve %5'lik sodyum hipoklorit solüsyonlarıyla silindi. Daha sonra klinik piyasemen, 15 dakika taşınabilir ultraviyole sterilizasyon cihazı (Gentra, İstanbul, Türkiye) ile ultraviyole ışığı uygulanarak steril hale getirildi. Kronlarından ayrılan kökler 15-mL'lik steril Falcon tüplere yerleştirildi ve -20°C 'de saklandı.

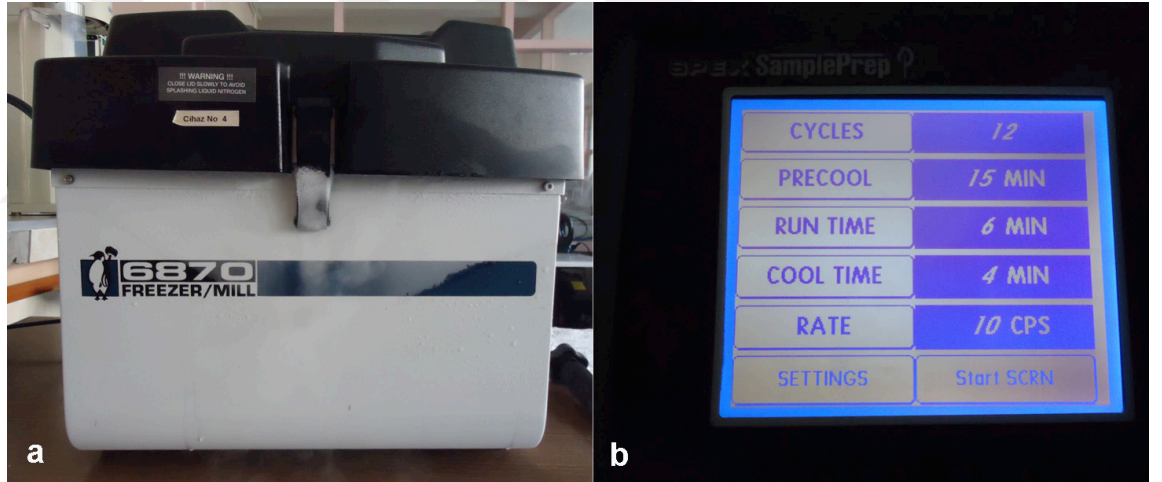
Dezenfeksiyon ve kronların uzaklaştırılması sonrasında, kök yüzeylerinde herhangi bir mezofilik ve psikrofilik mikroorganizma varlığının belirlenmesi için sterilite kontrolü yapıldı. Bu amaçla kök örneklerinden steril swablarla örnekleme yapılarak kanlı ağara iki seri yayma tarzı ekim yapıldı. Birinci seri 37°C 'de 24-72 saat inkübasyona bırakılarak mezofilik mikroorganizmalar araştırıldı. İkinci seri ise psikrofilik mikroorganizmaların varlığı için 18°C 'de 24-72 saat inkübasyonda bırakıldı. İnkübasyon sonrası hiçbir besiyerinde üreme saptanmadı ve tüm örnekler çalışmaya dahil edildi (Şekil 14).



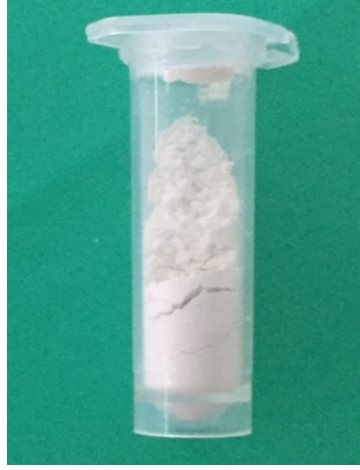
Şekil 14. 72 saatlik inkübasyon sonrası üreme saptanmayan besiyerleri

Bir sonraki aşama sterilite kontrolü yapılmış olan köklerin DNA ekstraksiyonu için toz haline getirilmesi oldu. Kriyojenik pulverizasyon işlemi

İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'ndeki Toz Proses Laboratuvarında gerçekleştirildi. Köklerin öğütülmesi için 6870 numaralı kriyojenik öğütücü (Spex, Metuchen, NJ, ABD) likit nitrojen sıcaklığında (-185 - -200°C) kullanıldı (Şekil 15a). Hazne işlemiden 15 dk öncesinde likit nitrojene gömüldü. 15 dk boyunca dondurulan örnekler, manyetik olarak ileri geri hareket eden darbe çubuğunun, 25 mL'lik haznenin iki ucunu kapatan sabit paslanmaz çelik tıkaçlara salınım yaparak çarpmasıyla toz haline getirildi. Darbe çubuğunun frekans değeri 10'a ayarlandı, saniyede her iki uca 10'ar olmak üzere toplamda 20 darbe uygulandı (Şekil 15b). Tek bir örneğin toz haline getirilmesi 6 dk öğütme ve 4 dk soğutma olmak üzere toplam 10 dk süren işlemin 12 kez tekrar edilmesiyle tamamlandı (Şekil 16). Öğütme siklusları arasında, darbe çubuklarının meydana getireceği ısıyı düşürmek için 4 dakikalık dinlenme süresi ile soğutma uygulandı.



Şekil 15. a) Köklerin öğütülmesinde kullanılan kriyojenik öğütücü cihazı, b) Kriyojenik öğütme işleminde kullanılan parametreler



Şekil 16. Kriyojenik pulverzasyon sonrasında öğütülüp toz haline getirilmiş örnekler

Paslanmaz çelik uçların, darbe çubuğunun ve haznelerin dezenfeksiyonu için sırasıyla aletler, 1 dk boyunca nötral deterjan kullanılarak fırçalandı. 1 dk %96'lık etanol ile yıkandı ve 1 dk boyunca %5.25'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda bekletildi. 70°C'de kurutulan aletler 15 dk taşınabilir ultraviyole sterilizasyon cihazı (Gentra, İstanbul, Türkiye) kullanılarak ultraviyole ışığı ile steril hale getirildi.

Kriyojenik öğütme işleminden önce ve sonra örnekler hassas tartı (Precisa, Precisa Gravimetrics, Dietikon, İsviçre) ile tartılarak elde edilen tozların verimliliği saptandı (Tablo 3). Örneklerden elde edilen ortalama verimlilik değeri %70,86 olarak bulundu.

Tablo 3. Kriyojenik öğütme işlemi öncesinde ve sonrasında yapılan ağırlık ölçüm değerleri ve işlemin verimliliği (%)

Örnek No	Diş no	Öğütmeden önce (gr)	Öğütmeden sonra (gr)	Verimlilik (%)
1	35	0,26	0,18	69,23
2	33	0,19	0,11	57,89
3	24	0,31	0,23	74,19
4	27	0,47	0,39	82,98
5	32	0,17	0,09	52,94
6	42	0,19	0,11	57,89
7	23	0,28	0,2	71,43
8	46	0,41	0,33	80,49
9	17	0,47	0,39	82,98
10	23	0,18	0,1	55,56
11	16	0,45	0,37	82,22
12	33	0,15	0,07	46,67
13	28	0,30	0,22	73,33
14	26	0,42	0,34	80,95
15	36	0,42	0,34	80,95
16	38	0,39	0,31	79,49
17	37	0,46	0,38	82,61
18	35	0,21	0,13	61,90
19	36	0,47	0,39	82,98
20	37	0,48	0,4	83,33
21	46	0,45	0,37	82,22
22	35	0,25	0,17	68,00
23	45	0,19	0,11	57,89
24	37	0,49	0,41	83,67
25	45	0,20	0,12	60,00
26	47	0,39	0,31	79,49
27	37	0,31	0,23	74,19
28	27	0,40	0,32	80,00
29	26	0,45	0,37	82,22
30	41	0,16	0,08	50,00
31	46	0,48	0,4	83,33
32	31	0,16	0,08	50,00
33	24	0,25	0,17	68,00
34	26	0,38	0,3	78,95
35	25	0,28	0,2	71,43
36	11	0,22	0,14	63,64
37	13	0,28	0,2	71,43
38	41	0,13	0,05	38,46
39	23	0,26	0,18	69,23
40	26	0,45	0,37	82,22

3.2 Örneklerden DNA Ekstraksiyonu

Kök tozlarından DNA ekstraksiyonu amacıyla, ticari Bakteriyel Genomik DNA İzolasyon Kiti (Norgen Biotek Corp., ON, Kanada) üretici firma talimatnamesi doğrultusunda bazı modifikasyonlar yapılarak kullanıldı. Gram pozitif bakterilerden DNA ekstraksiyonunda kullanmak için 0.33 gr Tris-HCl, 0.07 gr EDTA, 120 mL Triton X-100, 0.2 gr Lizozim ve 10 mL steril distile sudan oluşan 10 ml Lizozim lizis buffer hazırlandı. Her bir örneğe 180 µL Lizozim lizis buffer eklendi ve örnekler su banyosunda 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Örnekler her 10 dk'da bir toplamda 3 kez vortekslendi. Daha sonra örneklere 250 µL Lizis solüsyonu ve 12 µL Proteinaz K eklendi. Mikrosantrifüj tüpleri, vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 55°C'de 30 dk boyunca inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında, tüplere 500 µL bağlayıcı solüsyon eklendi ve tüpler homojen bir karışım elde edilene kadar vortekslendi. Karışımın 750 µL'si toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş spin kolonlara aktarıldı. Aktarılan bu karışım 8,000 g'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Yüzeyde kalan sıvı uzaklaştırıldı ve karışım tekrar 8,000 g'de 3 dk santrifüj edildi. 500 µL yıkama solüsyonu tüpe eklendi ve 14,000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası yüzeyde kalan sıvı uzaklaştırıldı. Karışıma 500 µL yıkama solüsyonu daha ilave edildi ve 1 dk boyunca 14,000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon 1.7 mL'lik elüsyon tüpüne alındı. 200 µL elüsyon buffer solüsyonu eklendi. Karışım, önce 6,000 g'de 1 dk sonra 14,000 g'de 2 dk santrifüj edildi. Spin kolon atılarak elüsyon bufferda genomik DNA izolasyonu tamamlanmış oldu. Elde edilen genomik DNA - 20°C'de saklandı.

Ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen DNA'nın saflık ve miktar tayini Thermoscientific Nanodrop 2000 Spektrofotometre cihazı (ThermoFisher Scientific, Wilmington, Delaware, ABD) ile yapıldı. Cihazın kalibrasyonu kullanılan ticari ekstraksiyon kitinde bulunan elüsyon buffer ile yapıldı. Ardından ekstrakte edilmiş örneklerden 2'şer µL alınarak DNA konsantrasyon ölçümleri yapıldı. DNA konsantrasyonları kaydedildi ve konsantrasyonu 20 ng/µL'den az olan örnekler pirosekanslama analizi öncesinde lineer amplifikasyon uygulanmak üzere işaretlendi.

3.3 16S rRNA Geninin Yeni Nesil Sekanslama Metoduyla Analizi ve Biyoinformatik Analiz

Ekstrakte edilen bakteriyel 16S rDNA örneklerinin yeni nesil sekanslama işlemleri ve elde edilen verilerin biyoinformatik analizleri İstanbul Üniversitesi Teknokent Hizmet Binası'ndaki Done Genetik ve Biyoinformatik Şirketi'nde yapıldı. Çalışmada 16S rDNA'nın V4 bölgesi ve 16S universal Eubakteriyel primerlerinden 515F kullanıldı. Mikroorganizmaların tayini için kullanılan V4 bölgesine ait primer dizileri şunlardır:

515 GTGCCAGCMGCCGCGGTAA

806 RGGACTACVSGGGTATCTAAT

İlk aşamada 30 döngülü PZR (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD), HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, Kanada) kullanılarak her bir örnek için ayrı ayrı gerçekleştirildi. PZR parametreleri sırasıyla, denatürasyon için 94°C'de 3 dk, denatürasyon sonrası primerlerin bağlaması için toplam 28 döngü 94°C'de 30 sn, 1 döngü 53°C'de 40 sn ve uzatma için 72°C'de 1 dk olarak belirlendi.

PZR sonrasında elde edilen tüm ampliconlar aynı konsantrasyonda olacak şekilde seyreltildi ve Agencourt Ampure Beads kiti (Agencourt Bioscience Corporation, MA, ABD) kullanılarak saflaştırıldı. Örnekler 454 GS FLX Titanyum Pirosekanslama platformu (Roche, Penzberg, Almanya) kullanılarak dizilendi.

Ham veri setleri Anderson ve ark.'nın (2013) önerdiği kalite kontrol kriterlerine göre her örnekten alınan her okuma için ayrı ayrı değerlendirildi. Dizileme sonrasında elde edilen Q25 dizi verilerinde barkod içermeyen ve 150 baz çiftinden kısa diziler verilerden çıkartıldı. Benzer şekilde, tutarsız baz okumalarına sahip ve yüksek homopolimer bölge içeren (6 baz çiftinden büyük) veriler analizden çıkarıldı (Anderson ve ark., 2013). Elde edilen dizi verileri maksimum %3'lük farklılık eşik değeri (%97 benzerlik) göz önüne alınarak operasyonel taksonomik birimler (operational taxonomic units - OTU) tespit edildi. OTU grupları, Hugenholtz ve ark.'nın (2006) sınıflandırması kullanılarak M5RN veri tabanı ile BLASTn kullanılarak taksonomik olarak sınıflandırıldı. Tespit edilen türler göz

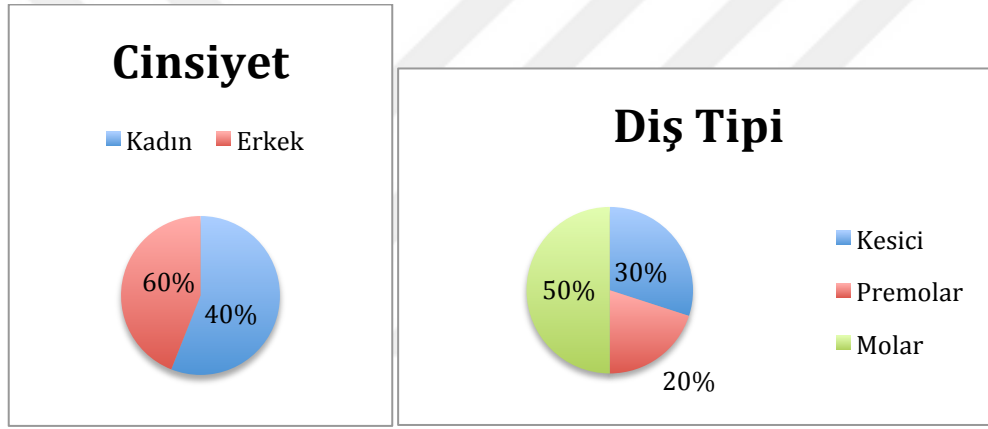
önüne alınarak, örnekler ve primer ile sekonder/persistan endodontik infeksiyon grupları arasındaki anlamlı farklar ve taksonomik profil farklılıklarının belirlenmesi için QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) paketleri kullanıldı.

3.4 İstatistiksel Analiz

Çalışmaya dahil edilecek dişlerin PAI skorlarının belirlenmesinde iki klinisyenin kalibrasyonunun tespiti için Cohen Kappa katsayısı hesaplandı. Verilerin tanımlayıcı istatistikleri yapılarak ortalama, standart sapma, median, standart hata ve %95 güven aralığı değerleri hesaplandı. Primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyon gruplarında yer alan örneklerin hasta yaşı, cinsiyeti ve diş tipi (kesici, premolar ve molar) dağılımları açısından değerlendirilmesi için tanımlayıcı istatistikler ve Student's t testi uygulandı. Primer ve sekonder/persistan infeksiyon grupları arasında filum, cins ve tür düzeyinde saptanan OTU'lar arasında çeşitlilik ve zenginlik bakımından istatistiksel fark olup olmadığı değerlendirmek için bağımsız örneklem t-testi uygulandı. Belirli bir taksonomik grubun primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda varlığının karşılaştırmalı değerlendirilmesi için Wilcoxon Rank Sum testi uygulandı. Bu istatistiksel analizlerde IBM SPSS 21 (Chicago, IL, ABD) istatistik programı kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

Çalışmada 40 farklı hastanın çekilen 40 dişinden elde edilen bakteriyel DNA dizileri incelenmiştir. Çalışmaya 20 primer infeksiyonlu ve 20 sekonder/persistan infeksiyonlu diş dahil edilmiştir. Hastaların yaş ortalamalarının $34,77 \pm 14,04$ olduğu hesaplanmış ve hastaların %60'ını kadınların oluşturduğu saptanmıştır (n=24). Diş tipi açısından değerlendirildiğinde, çalışmada 20 molar (%50), 8 premolar (%20) ve 12 kesici (%30) diş kullanılmıştır (Şekil 17). Çekilen dişlerin cinsiyet, yaş, endodontik infeksiyon ve diş tipine göre dağılımları Tablo 4'te verilmiştir. Primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyon grupları arasında diş tipinin dağılımı açısından anlamlı fark saptanmamıştır ($P > 0,05$).



Şekil 17. Örneklerin alındıkları bireylerin cinsiyeti ve diş tipine göre dağılımları (%)

Dişlerin klinik ve radyolojik bulguları doğrultusunda klinik teşhisleri ve infeksiyon türüne göre dağılımları Tablo 5'te verilmiştir. Dezenfeksiyon işlemi sonrasında yapılan ekimlerde diş yüzeylerinde üreme saptanmadığından çalışma dışı bırakılan örnek olmamıştır. Çalışma kapsamında sekanslanan 40 örnekten toplam 2.606.128 dizi okuması elde edilmiştir. Sekanslama sonucunda örnek başına ortalama 64.700 adet yüksek kalitede okuma yapılmıştır. Kontaminasyondan şüphelenilen okumaların toplam okumaların %0.1'inden az olduğu saptanmıştır. Elde edilen okuma verileri, kalite skorları temel alınarak filtrelendikten sonra M5NR (non-redundant protein database) veritabanında yer alan hedef mikrobiyal genomları üzerinde en az %97 eşleşme sağlayacak şekilde taksonomik profillendirme yapılmıştır. Bu veriler göz önüne alınarak, Archaea ve Bacteria grubundaki türler belirlenmiş, örnek içindeki okuma sayıları ve birbirlerine göre

kıyaslamalı oranları saptanmıştır. Örneklerde elde edilen okuma miktarları Şekil 18’de gösterilmiştir.

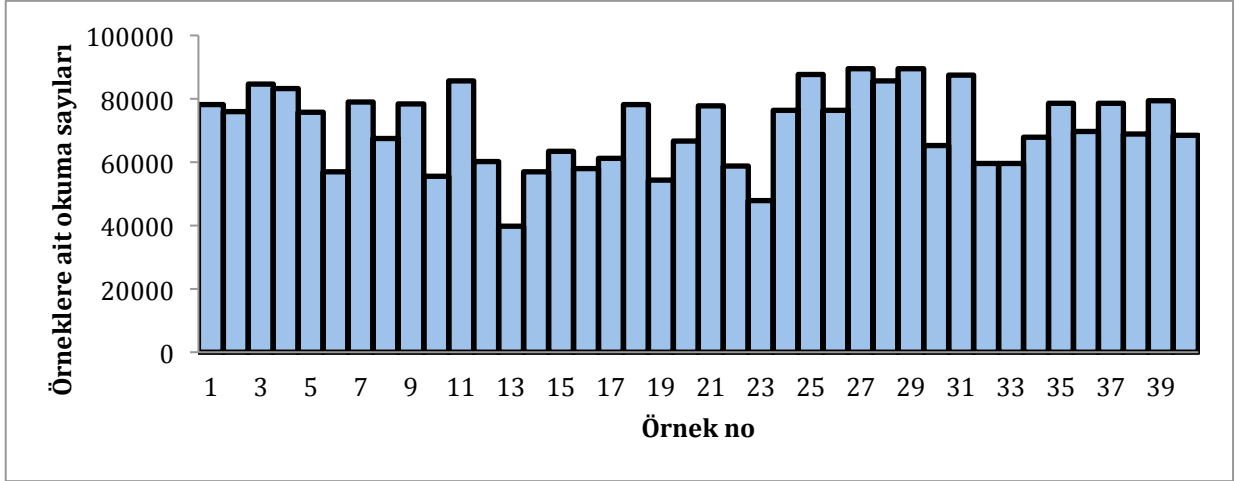
Tablo 4. Çalışmada kullanılan örneklerin alındığı hastaların cinsiyet ve yaşa göre, örnek alınan dişlerin tipi ve endodontik infeksiyon türüne göre dağılımları

Örnek no	Cinsiyet	Yaş	Diş no	İnfeksiyon türü
1	Erkek	45	35	Primer
2	Erkek	26	33	Primer
3	Erkek	21	24	Primer
4	Kadın	42	27	Primer
5	Kadın	37	32	Primer
6	Kadın	56	42	Primer
7	Erkek	58	23	Primer
8	Kadın	18	46	Primer
9	Erkek	18	17	Primer
10	Kadın	47	23	Primer
11	Kadın	19	16	Primer
12	Erkek	37	33	Primer
13	Erkek	18	28	Primer
14	Kadın	18	26	Primer
15	Kadın	34	36	Primer
16	Kadın	19	38	Primer
17	Kadın	34	37	Primer
18	Erkek	29	35	Primer
19	Erkek	37	36	Primer
20	Kadın	21	37	Primer
21	Kadın	33	46	Persistan
22	Kadın	45	35	Persistan
23	Kadın	56	45	Persistan
24	Erkek	56	37	Persistan
25	Kadın	38	45	Persistan
26	Kadın	28	47	Persistan
27	Erkek	34	37	Persistan
28	Kadın	20	27	Persistan
29	Kadın	32	26	Persistan
30	Kadın	30	41	Persistan
31	Erkek	21	46	Persistan
32	Erkek	59	31	Persistan
33	Kadın	34	24	Persistan
34	Erkek	21	26	Persistan
35	Kadın	20	25	Persistan
36	Erkek	56	11	Persistan
37	Erkek	59	13	Persistan
38	Kadın	46	41	Persistan
39	Kadın	48	23	Persistan
40	Kadın	21	26	Persistan

Tablo 5. Amerikan Endodonti Birliği'nin önerdiği pulpal ve periradiküler hastalıkların klinik sınıflaması uyarınca çalışmaya dahil edilen örneklerin periradiküler hastalıklarının dağılımı

Örnek no	Klinik Teşhis	İnfeksiyon Türü
1	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
2	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
3	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
4	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
5	Kronik Apikal Apse	Primer
6	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
7	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
8	Kronik Apikal Apse	Primer
9	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
10	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
11	Kronik Apikal Apse	Primer
12	Kronik Apikal Apse	Primer
13	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
14	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
15	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
16	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
17	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
18	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
19	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
20	Kronik Apikal Periodontitis	Primer
21-40	Tedavi sonrası gelişen Apikal Periodontitis	Sekonder/Persistan

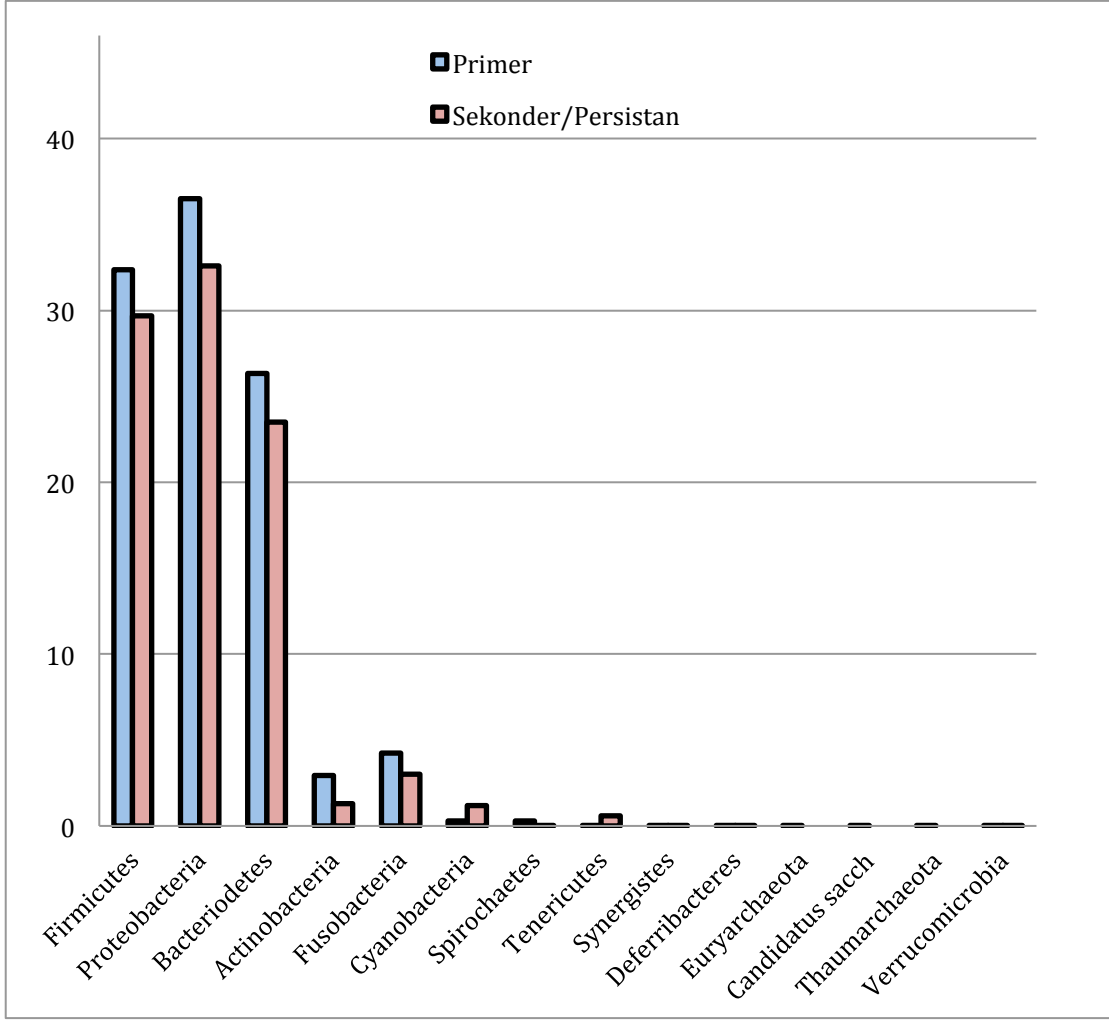
Operasyonel taksonomik birimlerin zenginliği değerlendirildiğinde çalışmada 40 örnekte toplam 14 filum, 29 sınıf, 47 takım, 85 aile, 160 cins ve 368 tür saptanmıştır. Saptanan mikroorganizmaların %10'u (38 bakteri) cins seviyesine kadar, kalanların tamamı ise tür seviyesine kadar identifiye edilmiştir.



Şekil 18. Örneklerden elde edilen okuma sayıları

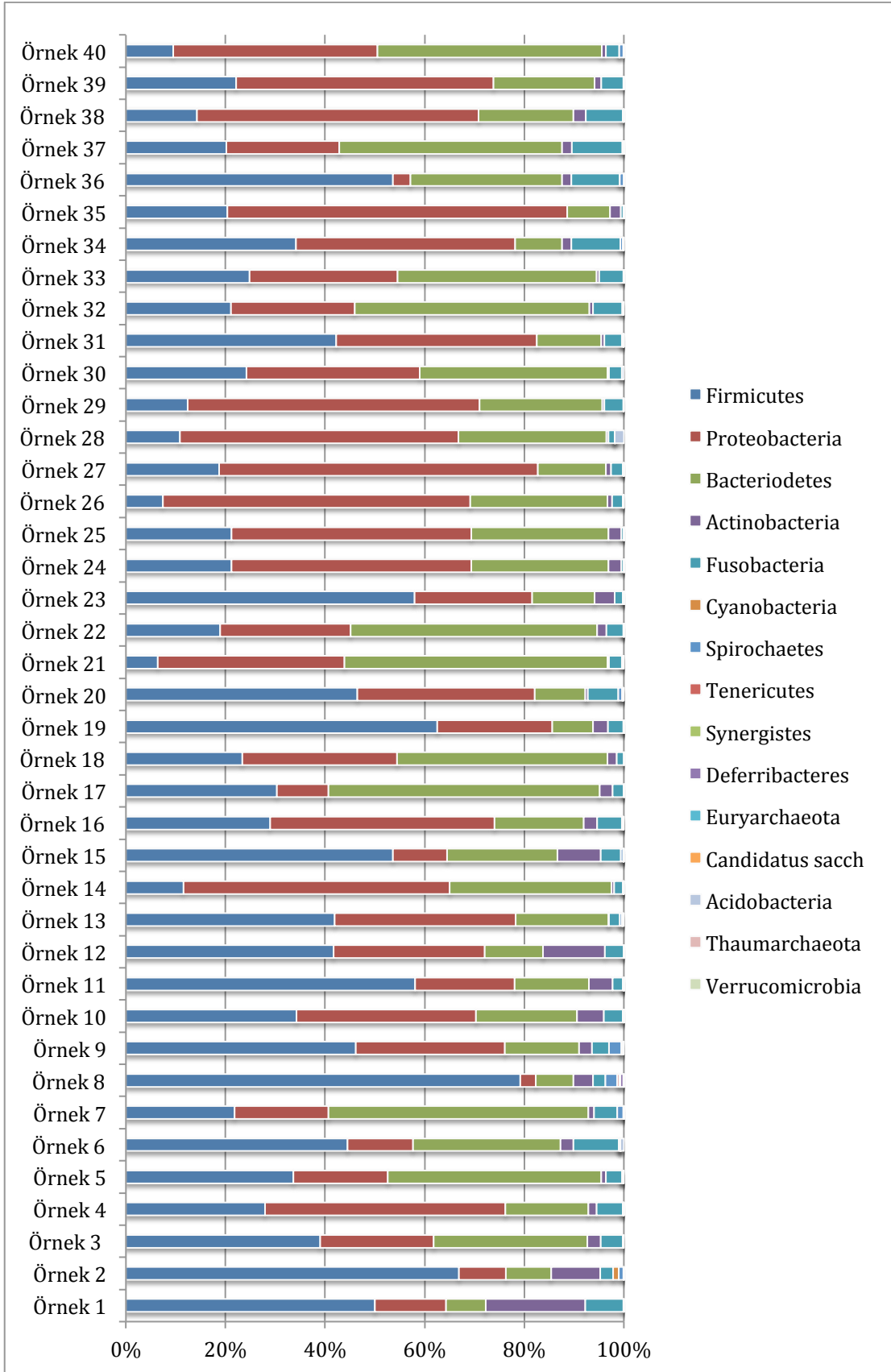
Tüm örneklerde toplamda 14 filum saptandı; bu filumların bulunma sıklığı sırasıyla Proteobacteria (%33.49), Firmicutes (%32.37), Bacteroidetes (%26.35), Fusobacteria (%4.24), Actinobacteria (%2.94), Spirochaetes (%0.33), Acidobacteria (%0.13), Cyanobacteria (%0.032), Tenericutes (%0.031), Deferribacteres (%0.023), Synergistes (%0.003), Verrucomicrobia (%0.004), Candidatus Saccharibacteria (%0,002), Euryarchaeota (%0,0005) ve Thaumarchaeota (%0,0001) olarak kaydedildi (Şekil 19). Hem primer hem de sekonder/persistan infeksiyon grubundan en sık saptanan filum Proteobacteria olmuştur. Proteobacteria filumu primer infeksiyon grubunda %36.17 oranında, sekonder/persistan infeksiyon grubunda ise %35.81 oranında saptanmıştır. Proteobacteria sıklığı açısından her iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($P > 0.05$). Sekonder/persistan infeksiyon grubunda Cyanobacteria, Tenericutes ve Acidobacteria, primer infeksiyon grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($P < 0.05$).

Her örnekte saptanan bakterilerin filum seviyesinde temsilleri ve saptanma oranları yüzde olarak Şekil 20’de sunulmuştur.



Şekil 19. Çalışmada saptanan filumların örneklerde saptanma oranları (%)

Primer infeksiyon grubundaki örneklerde örnek başına ortalama filum sayısı 9.6 ± 1.6 iken; sekonder/persistan infeksiyon grubunda bu sayı 8.4 ± 1.3 olarak saptanmıştır. Bağımsız örneklem t-testi sonucunda filum zenginliği açısından iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($P = 0.245$).



Şekil 20. Her örnekte saptanan filumlar miktarının dağılımı (%)

Arkea grubuna ait Euryarchaeota ve Thaumarchaeota filumları, sadece primer infeksiyon grubunda yer alan 3 farklı dişte, sırasıyla Örnek 3'te %0.0005, Örnek 8'de %0.0001 ve Örnek 16'da %0.0001 sıklık oranlarıyla saptanmıştır (sırasıyla Örnek 3, 8 ve 16). Euryarchaeota filumuna mensup *M. oralis*, tür seviyesinde incelendiğinde toplam OTU'nun %0.0006'sını oluşturmuştur. Thaumarchaeota filumuna mensup *Candidatus nitrosoarchaeum limnia*'nın, tür seviyesinde incelendiğinde toplam OTU'nun %0.0001'ini meydana getirdiği saptanmıştır. Sekonder/persistan infeksiyon grubunda Arkea saptanmamıştır.

Cins seviyesinde incelendiğinde OTU'ların çoğunluğunu meydana getiren cinsler düşük miktarda saptanmıştır (<%1). Toplamda, primer endodontik infeksiyon grubunda 162 cins; sekonder/persistan endodontik infeksiyon grubunda ise 157 cins saptanmıştır. Primer infeksiyon grubunda örnek başına saptanan cins sayısı ortalama 77.6 ± 13.1 iken; bu sayı sekonder/persistan infeksiyon grubunda ortalama 70.9 ± 17.8 olarak hesaplanmıştır. Bağımsız örneklem t-testi sonucunda cins çeşitliliği ve sayısı açısından primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyon grupları arasında anlamlı fark ortaya çıkmamıştır ($P = 0.358$). Cins seviyesinde en sık rastlanan taksonlar; *Prevotella* (%19.6), *Porphyromonas* (%16.5), *Neisseria* (%13.2), *Lactobacillus* (%11.7), *Parvimonas* (%11.1), *Streptococcus* (%10.7), *Enterococcus* (%3.5), *Campylobacter* (%1.1) ve *Granulicatella* (%1) olmuştur. Primer infeksiyon grubunda en sık rastlanan cins *Prevotella* (%23.5) iken, sekonder/persistan infeksiyon grubunda en sık rastlanan cins *Fusobacterium* olmuştur (%18.4).

Cins seviyesinde, %1 ile %0.001 arasında sıklık oranıyla 85 adet takson saptanmıştır. Kalan 68 cinsin %0.001'den de az oranda bulunduğu tespit edilmiştir. Tüm örneklerde, *Selenomonas* %0.94, *Actinomyces* %0.9, *Rothia* %0.89, *Aggregatibacter* %0.88, *Actinobaculum* %0.71, *Atopobium* %0.58, *Capnocytophaga* %0.42, *Phocaeicola* %0.4, *Treponema* %0.30, *Oribacterium* %0.21, *Filifactor* %0.2, *Dialister* %0.17, *Tannerella* %0.14, *Bergeyella* %0.08, *Moryella* %0.07, *Peptostreptococcus* %0.04, *Moraxella* %0.02, *Bifidobacterium* %0.009, *Synergistes* %0.009, *Veillonella* %0.007 ve *Eikenella* %0.002 oranlarıyla saptanmıştır. Tablo 6 cins seviyesinde en sık saptanan türlerin total ve endodontik

infeksiyonun türüne göre gruplar arasındaki dağılımını ve istatistiksel ilişkilerini göstermektedir.

Tablo 6. Saptanma miktarı %0.0001'den fazla olan veya gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanan cinslerin tüm örneklerde ve gruplara göre dağılımları (%)

Cins	Total miktar	Primer infeksiyon	Sekonder/persistan infeksiyon	P*
<i>Prevotella</i>	0.196	0.235	0.157	.002
<i>Porphyromonas</i>	0.165	0.168	0.164	.9
<i>Fusobacterium</i>	0.157	0.126	0.184	.2
<i>Neisseria</i>	0.132	0.140	0.124	.2
<i>Lactobacillus</i>	0.117	0.096	0.138	.005
<i>Parvimonas</i>	0.111	0.121	0.102	.2
<i>Streptococcus</i>	0.107	0.094	0.12	.005
<i>Enterococcus</i>	0.035	0.020	0.051	.004
<i>Campylobacter</i>	0.011	0.021	0.001	.001
<i>Granulicatella</i>	0.010	0.009	0.011	.8
<i>Selenomonas</i>	0.009	0.001	0.008	.5
<i>Actinomyces</i>	0.009	0.011	0.007	.7
<i>Synergistes</i>	0.009	0.011	0.008	.7
<i>Rothia</i>	0.008	0.005	0.012	.5
<i>Aggregatibacter</i>	0.008	0.009	0.008	.4
<i>Heamophilus</i>	0.007	0.008	0.007	.4
<i>Actinobaculum</i>	0.007	0.009	0.004	.005
<i>Eubacterium</i>	0.007	0.007	0.007	.9
<i>Megasphaera</i>	0.006	0.007	0.006	.2
<i>Propionibacterium</i>	0.005	0.005	0.005	.2
<i>Atopobium</i>	0.005	0.005	0.006	.4
<i>Leptotrichia</i>	0.005	0.005	0.006	.2
<i>Gemella</i>	0.005	0.005	0.005	.08
<i>Capnocytophaga</i>	0.004	0.004	0.004	.06
<i>Phocaeicola</i>	0.004	0.004	0.004	.03
<i>Treponema</i>	0.003	0.003	0.002	.02
<i>Actinobacillus</i>	0.002	0.002	0.002	.03
<i>Oribacterium</i>	0.002	0.002	0.002	.03

Tablo 6 (Devamı)

Cins	Total miktar	Primer enfeksiyon	Sekonder/persistan enfeksiyon	P*
<i>Filifactor</i>	0.002	0.001	0.002	.02
<i>Dialister</i>	0.001	0.002	0.001	.03
<i>Tannerella</i>	0.001	0.002	0.001	.05
<i>Vagococcus</i>	0.001	0.001	0.001	.09
<i>Kingella</i>	0.001	0.001	0.001	.09
<i>Bergeyella</i>	0.0008	0.0009	0.0006	.1
<i>Moryella</i>	0.0007	0.001	0.0004	.3
<i>Abiotrophia</i>	0.0007	0	0.0014	.05
<i>Cornybacterium</i>	0.0007	0.0009	0.0005	.3
<i>Solobacterium</i>	0.0005	0.0007	<0.0005	.4
<i>Peptostreptococcus</i>	<0.0005	0.0005	<0.0005	.1
<i>Anaerobacterium</i>	<0.0005	<0.0005	<0.0005	.8
<i>Moraxella</i>	<0.0005	<0.0005	<0.0005	.2
<i>Bifidobacterium</i>	<0.0005	<0.0005	<0.0005	.2
<i>Eikenella</i>	<0.0005	<0.0005	0	.02
<i>Veillonella</i>	<0.0005	<0.0005	<0.0005	.2
<i>Desulfobulbus</i>	<0.0005	<0.0005	<0.0005	.2
<i>Campylobacter</i>	<0.0005	<0.0005	<0.0005	.05
<i>Ralstonia</i>	<0.0005	0	<0.0005	.05
<i>Pseudoramibacter</i>	<0.0005	<0.0005	<0.0005	.03
<i>Slackia</i>	<0.0005	<0.0005	0	.02
<i>Olsenella</i>	<0.0005	<0.0005	0.00009	.4
<i>Kurthia</i>	<0.0005	0	0.00006	.02
<i>Sphingomonas</i>	<0.0005	0	0.00004	.04
<i>Caulobacter</i>	<0.0005	<0.0005	<0.0005	.5
<i>Sphingomonas</i>	<0.0005	<0.0005	<0.0005	.9
<i>Candidatus nitrosoarchaeum</i>	<0.0005	<0.0005	0	.05
<i>Methanobrevibacter</i>	<0.0005	<0.0005	0	.05

Koyu yazılan sayılar primer ve sekonder/persistan endodontik enfeksiyon grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı ilişkiyi gösterir.

*Wilcoxon rank toplamları testi sonucu

Eikenella, *Slackia*, *Candidatus nitrosoarchaeum* ve *Methanobrevibacter* cinsleri primer endodontik infeksiyonlarda bulunur iken; sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda saptanamamıştır. *Prevotella* cinsinin primer endodontik infeksiyonlarda saptanma oranı sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda saptanma oranından anlamlı derecede yüksek bulundu ($P < 0.05$).

Fusobacterium cinsi sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda primer endodontik infeksiyonlarda saptandığından daha yüksek oranda saptanmıştır; ancak iki endodontik infeksiyon grubu *Fusobacterium* cins miktarı açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır ($P = 0.636$).

Lactobacillus, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Ralstonia* cinslerinin sekonder/persistan infeksiyonlarda, primer infeksiyonlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunduğu saptanmıştır ($P < 0.05$). *Abiotrophia*, *Kurthia* ve *Sphingomonas* cinslerinin varlığına yalnızca sekonder/persistan infeksiyonlu dişlerde rastlanmıştır.

5. TARTIŞMA

5.1. Çalışmanın Tasarımı ve Metodolojisi

Endodontik infeksiyonlarda etiyolojik faktörlere yönelik, pratik ve kısa sürede sonuç veren tanı araçları günümüzde şimdilik mevcut değildir. Moleküler çalışmalar, farklı coğrafi bölgelerde yaşayan ve aynı tür endodontik infeksiyona sahip bireylerde saptanan mikrobiotanın, bakteriyel türlerin dağılımı ve sayısı bakımından anlamlı farklılıklar gösterdiğini rapor etmiştir (Siqueira ve Rocas, 2009). Bu verilerin ışığı altında, farklı popülasyonlardan alınan örneklerde, açık uçlu moleküler metotlar kullanılarak komünite profil çalışmaları yapılmıştır (Hong ve ark., 2013; Alves ve ark., 2009). Ülkemizde dişlerde meydana gelen primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda yer alan mikroorganizmaların identifikasyonu ile ilgili rapor edilmiş bir komünite profil çalışması bulunmamaktadır. Endodontik tedavi sıklıkla ampirik veya uluslararası tedavi rehberleri uyarınca yapılmaktadır. Bu yolla duyarlı mikroorganizmalar elimine edilse de persiste mikroorganizmalar hastalığı devam ettirebilmektedir. Endodontik infeksiyonlarla ilişkili bakteriyel komünite profillerinin ortaya konulması, kanıta dayalı tedavi prosedürlerinin oluşturulması için atılacak ilk adımdır.

Çalışmamız, primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyon tanısıyla diş çekimi için üniversitemize başvuran 40 hastanın çekilen dişlerini kriyojenik pulverizasyon işleminden geçirerek elde ettiğimiz mikrobiyal DNA'nın pirosekanslama metodu ile metagenomik analizini yapmayı ve infeksiyonlara özgü mikrobiyota profilini çıkarmayı amaçlamıştır. Çalışma tasarımında gruplarda yer alması gereken örnek sayısı yapılan power analizi sonucunda %99 güven aralığında ve %5 duyarlılığa sahip olacak şekilde statisticalsolutions.net/pss_clc.php programı kullanılarak basit tesadüfi örnekleme ile n=9 örnek olarak belirlenmiştir. Tübitak Hızlı Destek programı tarafından desteklenen çalışmamıza, program bütçesi dahilinde mümkün olan en fazla sayıda olacak şekilde toplamda 40 örnek dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen örnek sayısının endodonti literatüründe mevcut diğer pirosekanslama çalışmalarıyla kıyaslandığında yeterli olduğu kanaatindeyiz. Li ve ark. (2010) 7 örnek, Santos ve ark. (2011) 17 örnek, Siqueria ve ark. (2011) 10 örnek, Özok ve ark. (2012) 23 örnek, Anderson ve ark. (2013) 50 örnek ve Tzanetakis ve ark. (2015) 48 örnek üzerinde çalışmışlardır. Çalışmalar

incelendiğinde örnek sayısının ilk araştırmanın yapıldığı 2010'dan günümüze artmakta olduğu görülmektedir. Bu durumun yeni nesil sekanslama platformlarının yaygınlaşmasının ve zamanla maliyetlerinin azalmasının sonucu olabileceği görüşündeyiz. Li ve ark. (2010) çalışmalarında 7 primer endodontik infeksiyon gösteren örnekten toplamda 28.590 mikrobiyal gen sekansı elde etmiştir. Çalışmamızda 40 örnekten 2.606.128 sekans okuması elde edilmiştir. Bu durum, örnek başına 64.700 mikrobiyal gen sekansı elde edildiği anlamına gelmektedir.

DeLong ve ark.'na (2006), göre metagenomik analizler amaçlarına göre ikiye ayrılır. İlki “orada ne var?” sorusunu cevaplamayı hedefleyen, komünite üyelerinin tamamının identifikasyonunu yapan genom sekans temelli metotlar, ikincisi ise ilk sorudan alınan yanıtta sonra gelen ve komünite üyelerinin fonksiyonel analizi ile potansiyel fenotipik özelliklerin saptanması ve karakterizasyonunu amaçlayan, “orada ne yapıyorlar?” sorusuna yanıt arayan proteomik metotlardır. Ancak ikinci amaca yönelik sorular ilk amaca yönelik yanıtlar elde edilemeden araştırılmaz. Bizim çalışmamız ilk soruya yanıt bulmak üzere tasarlanmıştır. Kök kanal infeksiyonlarında yer alan kanal içi komünite üyelerinin tamamının geleneksel kültür yöntemleriyle üretilmelerinin günümüzde mümkün olmaması, fenotipik metotların bazı türler arası ayırım yapmakta yetersizliği ve mevcut metotların az sayıdaki türleri saptamadaki sınırlamaları nedeniyle, kanal içi mikrobiyal komünite tam olarak ortaya konamamış ve mikroorganizmaların gerçek insidansları ve klinik spektrumları anlaşılammıştır (Ward ve ark., 1990; Amann ve ark., 1995). DNA sekans analizi, mikrobiyal komünite üyelerinin tespitinde ve incelenmesinde altın standart olarak kabul edilmiştir (McCourt ve ark., 2013). Çalışmamızda bu amaçla analiz yöntemi olarak yeni nesil DNA sekanslama tekniğini kullanan 454 GS FLX Titanyum pirosekanslama platformu seçilmiştir.

İnfekte kök kanallarında bulunan mikroorganizmaları tespit etmek için kağıt konların, Hedström tipi kanal eğelerinin veya ilgili dişin kendisinin çekilip kullanıldığı çeşitli metotlar vardır (Möller, 1966; Haapasalo ve Orstavik, 1987; Tran ve ark., 2013). Kağıt konlar ve eğeler kullanılarak alınan örneklerin mikroorganizma çeşitliliği ve sayısı, kağıt konların ve kanal eğelerinin kök kanal sisteminde temas ettiği yüzeylerle yani sadece ana kanalla sınırlı kalmaktadır. İnfeksiyonda rol alan mikroorganizmaların tamamını temsil eden ve sayıca az olan

önceden saptanamamış mikroorganizmaların varlığını araştıran profil çalışmaları için kök kanal sistemindeki düzensizliklerde, yan kanallar ve dentin tübüllerinin içinde yer alan bakterilerin de alınan örneklerde temsil edilmeleri önem taşımaktadır. Tran ve ark. (2013) çekilmiş dişlerin köklerini *E. faecalis* ile infekte ettikleri çalışmalarında kağıt kon kullanarak örnekleme ile kriyojenik pulverizasyon tekniklerini karşılaştırmış ve pulverizasyon tekniği ile istatistiksel olarak anlamlı oranda daha fazla sayıda bakterinin temsil edilebildiğini rapor etmişlerdir. Dentin duvarının kanal eğeleriyle tıraşlanıp örnek toplandığı teknikte pulverizasyon tekniğini karşılaştıran bir çalışma henüz yoktur, ancak kanal eğelerinin de kağıt konlar gibi kanalların istmus, lateral kanallar gibi irregüler alanlarına temas edemeyeceği ve dentin tübüllerinden örnek toplayamayacağı görüşündeyiz. Bununla beraber, kağıt kon ve dentin tıraşlama teknikleri, çeşitli antimikrobiyal ajanlarının etkinliklerini değerlendiren *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda daha fazla tercih edilmektedir (White ve ark., 1999; Pawar ve ark., 2012; Tulsani ve ark., 2014). Van der Horst ve ark. (2013) paketi yeni açılmış ve steril olduğu kabul edilen kağıt konların kontamine bakteriyel DNA içerebildiğini rapor etmişlerdir ve bu nedenle mikrobiyal profil oluşturmayı amaçlayan sekanslama veya DGGE gibi açık uçlu tekniklerde örnek almak için kağıt konların kullanılmasının hatalı sonuçlara yol açabileceğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda kök kanal sisteminin anatomik özelliklerinin, örnek alınmasına ve maksimum bakteriyel DNA eldesine engel teşkil etmesini engellemek ve kağıt konlar üzerindeki potansiyel bakteriyel DNA'nın kontaminasyonunu önlemek için kriyojenik pulverizasyon tekniği seçilmiştir.

Senges ve ark. (2011), kök kanal dolgu materyali olarak kullanılan güta perkanın, tükürük veya serumla teması sonucu yüzeyinde glikoprotein ve polisakkarit yapıda bir tabakanın meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Yazarlar çalışmalarında, albümin ve fibronektinden zengin bu organik tabakanın özellikle Gram pozitif bakterilerin adezyonunu ve biyofilm formasyonunu kolaylaştırdığını belirtmiş ve bu nedenle mikrobiyal analizlerde kök kanal dolgusundan da örnek alınmasının gerekliliğini vurgulamışlardır (Senges ve ark., 2011). Kök kanal dolgu materyallerinin kanal dolgusu sonrası boyutsal olarak büzülmeleri sonucu dentin-dolgu arayüzünde meydana gelen boşluğun bakterilerce istilası ile materyallerin üretim ve klinik uygulamalar esnasındaki kontaminasyonu da güta perka yüzeyinde mikroorganizma kolonizasyonuna imkan tanıyabilir (Gomes ve ark., 2005; Nawal

ve ark., 2011; Demiryürek ve ark., 2012). Kanal dolgusu sonrasında güta perka yüzeyinde bakteri adezyonu ve biyofilm varlığı *in vivo* bir çalışma ile gösterilmiştir (Karygianni ve ark., 2015). Karygianni ve ark. (2015), persistan endodontik infeksiyonlu dişlerin kök kanallarından kağıt kon ile örnek almış ve aynı zamanda kanallardan söktüğü güta perkanın yüzeyini de mikroorganizma varlığı açısından incelemişlerdir. 16S rRNA gen sekanslama ve geçirimli elektron mikroskopu kullanılan çalışmada kök kanallarında saptanamayan 9 bakteri türü sadece güta perka yüzeyinde identifiye edilmiştir. Adib ve ark. (2004), çalışmalarında, mikroorganizmaların kök kanal sistemi içinde dentinde olduğu kadar güta perka yüzeylerinde de kolonize olabildiklerini rapor etmişlerdir. Bu çalışmalar güta perkanın çinko oksit içeriğinin bakteriyel aktivite ve kolonizasyonu engelleyecek güçte antimikrobiyal özellik sağlamadığını rapor eden Moorer ve Genet'i (1982) desteklemektedir. Çalışmamızda kullanılan kriyojenik pulverizasyon yöntemi, persistan endodontik infeksiyon grubunda tüm kök kanal dolgusundan örnek alınmasına olanak sağlamıştır. Güta perka termoplastik yapısından ötürü toz haline getirmesi güç bir materyaldir (Tanomaru ve ark., 2007). Ancak kriyojenik pulverizasyonda likit nitrojen derecesinde materyalin kırılabilirliği artırılarak (Haselden, 1971) toz haline getirilmesi mümkün olmuştur. Bu sayede güta perka yüzeyinde kolonize olan mikroorganizmaların da identifiye edilebildiği görüşündeyiz.

Kriyojenik öğütme cihazları, adli tıpta kırık, diş ve kemik gibi dokulardan DNA ekstraksiyonu amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Fisher ve ark., 1993). Dişlerin toz haline getirilmesi için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Smith ve ark. (1993), parçalara ayırdıkları dişleri, havaneli ve havan kullanarak toz haline getirmişler ancak bu tür çalışmalarda kontaminasyonun engellenemeyeceğini ve bu durumun ekstrakte edilen DNA'nın saflığını olumsuz yönde etkileyeceğini bildirmişlerdir. Kriyojenik öğütme cihazları, steril şartlarda sert ve yumuşak dokuların pulverizasyonuna imkan vermektedir (Fisher ve ark., 1993). Sweet ve Hildebrand (1998), ilk defa insan dişini kriyojenik olarak öğütmüş ve konak DNA ekstraksiyonu yapmışlardır. Yazarlar çalışmalarında, insan molar dişlerinden DNA eldesi için kriyojenik öğütme cihazının havan kullanarak öğütme teknikleriyle kıyaslandığında daha etkili ve kolay bir seçenek olduğunu rapor etmişlerdir (Sweet ve Hildebrand, 1998). Çalışmamızda da aynı tipte kriyojenik öğütücü kullanılmış,

ancak farklı parametreler uygulanmıştır. Çalışmamızda dişlerin kronları uzaklaştırıldığından mineden daha az sert olan dentin, sement ve pulpa dokularının pulverizasyonu için cihaz çalıştırılırken “stroke (darbe)” parametresinin sayısı düşürülmüştür. Çalışmamızda uyguladığımız parametrelerdeki modifikasyonlar, aynı kriyojenik öğütme cihazını kullanarak çekilmiş dişlerden DNA ekstraksiyonu yapan Alves ve ark. (2009) ile Özok ve ark.’nın (2012) çalışmalarında önerilen parametreler doğrultusunda yapılmıştır. Kriyojenik öğütücüde işlemlerin likit nitrojen sıcaklığında kapalı ve steril bir sistemde yapılıyor olması kontaminasyon kontrolü açısından avantaj sağlamaktadır (Sweet ve Hildebrand, 1998). Ayrıca kriyojenik öğütme cihazının parçalarının sterilizasyonunun yapılabilmesi örnekler arası çapraz kontaminasyon riskini elimine etmektedir. Kriyojenik öğütme cihazında numuneleri taşımak için kullanılan silindirik kaplar güçlendirilmiş çelik ile polikarbonattan yapılmıştır ve cihaz aynı anda kontaminasyon olmadan dört farklı örneğin öğütme işlemini yapabilmektedir (Şekil 20). Örnekleri taşıyan silindirik kapların sterilizasyon protokolü Özok ve ark. (2012) tarafından önerildiği şekilde sırasıyla nötral deterjan, %96’lık alkol, 70°C’lik kuru hava ve 15 dakika U.V. sterilizasyon cihazı (Gentra, İstanbul, Türkiye) kullanılarak yapılmıştır.

Kriyojenik pulverizasyon tekniğinin dezavantajı örnek olarak incelenecek dişlerin cihaza yerleştirilmek için çekilmeleri gerekmesidir (Tran ve ark., 2013). Dişlerin çekim ile kaybindan ötürü kriyojenik pulverizasyonun endodontik tedavide kullanılan antimikrobiyal ajanların etkinliğini ölçen ve farklı zamanlarda birden fazla numune alınmasını gerektiren çalışmalarda kullanılmasının uygun olmadığı belirtilmiştir (Tran ve ark., 2013). Özok ve ark. (2012) kriyojenik pulverizasyon tekniğinin endodontik infeksiyonlarda rol oynayan tüm mikrobiyal komünitenin analizinde ve profil çalışmalarında kullanımının uygun olduğunu belirtmiştir. Çalışmamızda kriyojenik pulverizasyon tekniği, endodontik infeksiyonlarda yer alan tüm mikroorganizmaların saptanması ve bir mikrobiyota profili oluşturulması amaçlandığından tercih edilmiştir.

Çalışmamıza, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı’nda yapılan klinik ve radyolojik muayeneler sonucu, çekim endikasyonu konan veya endodontik tedavi ile ağızda tutulabilme şansı olmasına rağmen hasta isteği ile çekimine karar verilmiş dişleri dahil edilmiş

ve ilgili hastalar Endodonti Anabilim dalında ikinci bir klinik ve radyografik değerlendirmeden geçirilmiştir. Dolayısıyla, çekim endikasyonu kesinleşen endodontik infeksiyonlu dişlerin çalışmaya dahil edilmesiyle kriyojenik pulverizasyonun örnek kaybı dezavantajı ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Pulverizasyon tekniğinin bir başka sınırlayıcı faktörü de, çekimleri infeksiyon akut durumdayken yapılamadığından, akut apikal apse teşhisi konmuş dişlerin kök kanal sistemi içinde yer alan mikroorganizmaların bu teknik kullanılarak incelenmelerinin mümkün olmamasıdır. Bu sebeple çalışmamıza kronik infeksiyon bulgularına sahip dişler dahil edilmiştir.



Şekil 20. Kriyojenik pulverizasyon cihazının prosesten hemen sonraki görüntüsü
Örnekler, steril edilebilir polikarbonat ve güçlendirilmiş çelik tüplerde dış ortama temas olmaksızın proses edilirler

Çalışmamızda, kriyojenik pulverizasyon işlemi öncesinde ve sonrasında yapılan ağırlık ölçümlerinden ortalama %29.14'lük bir ağırlık kaybı gerçekleştiği saptanmıştır. Bu örnek başına ortalama 0.08 gr'lık bir madde kaybı demektir. Bu

sonuç kriyojenik pulverizasyon tekniğinin bile %100 verimli bir değerlendirme sağlayamadığını göstermektedir.

Endodontik infeksiyon çalışmalarında kök kanallarından örnek alınırken çalışma alanının kontaminasyonundan kaçınılmalıdır (Möller, 1966). Endodontik infeksiyonlarda rol almayan ancak örnek alma işlemi sırasında ve/veya sonrasında uygulanan laboratuvar işlemleri esnasında numuneyi kontamine eden bakterilerin genetik materyalleri yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. Bu amaçla Möller (1966) mikrobiyolojik çalışmalarda çalışma alanının dezenfeksiyonu için %30'lük hidrojen peroksit ve %5'lik veya %10'lük iyodin kullanılmasını önermiştir. Dezenfeksiyon solüsyonlarının seçimi ve uygulanmasındaki primer faktör çalışmada kullanılacak olan analiz yöntemidir (Ng ve ark., 2003). Kültür yöntemleri ile bakterilerin saptanabilmeleri için canlı olmaları esastır; bu nedenle iyodin gibi yüksek bakterisit özelliği olan dezenfektan ajanlar, kültür yöntemlerinin kullanılacağı çalışmalarda yüzey dezenfeksiyonu için uygundur (Tennen ve ark., 2000). Kültür tekniği ile canlı olmayan mikroorganizmalar saptanamazlar. Ancak moleküler biyoloji ve genetik çalışmalarında bakterilerin saptanabilmeleri için canlı veya ölü olması fark etmemektedir, analiz için uygun baz uzunluğunda bakteriyel DNA varlığı yeterli olmaktadır. Bu nedenle örneklerdeki kontamine bakterileri sadece öldürmekle kalmayacak; yüzeylerdeki bakteriyel DNA'yı da ortadan kaldıracak bir dezenfektan ajan kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Ng ve ark., 2003). Sodyum hipoklorit bakterileri öldürmesinin yanı sıra bakteriyel DNA'nın tek iplikçikli yapısına zarar vermektedir. Böylece moleküler biyoloji ve genetik tekniklerle analizi yapılacak yeterli uzunlukta DNA baz serisi elde edilememektedir (Takehara ve ark., 1994). Bu amaçla çalışmamızda, dişlerin kök yüzeylerinin dezenfeksiyon protokolünde %3'lük hidrojen peroksit ve %5.25'lik sodyum hipoklorit kullanılmıştır. Takehara ve ark.'nın (1994) raporları ışığında, %5.25'lik sodyum hipokloritin 5 dakika kullanımının kök yüzeyinde ölü bakteriyel DNA'nın saptanması sorununu çözebileceği görüşündeyiz. Ancak Ng ve ark. (2003), çalışma sahasının tamamen dekontaminasyonunu sağlayabilecek bir dezenfeksiyon ajanının mevcut olmadığı ve deney öncesinde örneklerin sterillik kontrollerinin yapılmasının esas olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda sterillite kontrolleri için, örneklerin dış yüzeylerinden alınan sürüntüler kanlı agarı iki seri ekim yapılarak, hem psikofilik hem de mezofilik mikroorganizmaların varlığı araştırılmıştır. Sodyum

hipokloritin kök yüzeylerinde antimikrobiyal etkinliğinin devam etmesi yanlış negatif sonuçlara yol açabilir. Bu nedenle sodyum hipokloritin antimikrobiyal etkinliğini durdurmak amacıyla %5'lik sodyum tiyosülfat solüsyonu kök yüzeylerine steril gazlı bezlerle uygulanmıştır. Sonuç olarak, dezenfeksiyon protokolü sonrasında yapılan sterilite kontrollerinde herhangi bir bakteriyel üreme saptanmamıştır. Çalışmanın sonuçları dahilinde, kriyojenik pulverizasyon işlemleri uygulanacak olan örneklerde dezenfeksiyonun 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit, ardından 5 dakika %5.25'lik sodyum hipoklorit ve son olarak 5 dakika %5'lik sodyum tiyosülfat kullanılarak yapılmasının etkili olduğu görüşündeyiz. Çekilmiş dişlerin kriyojenik pulverizasyonu için kök yüzeylerinde dezenfektan ajan kullanan iki çalışma bulunmaktadır. Siqueira ve ark. (2011), 10 primer endodontik infeksiyonlu çekilmiş dişin kök yüzey dezenfeksiyonunda %3'lük hidrojen peroksit, %2.5'lik sodyum hipoklorit ve %5'lik sodyum tiyosülfat kullanmışlarken, Özok ve ark. (2012) %0.5'lik sodyum hipoklorit ve konsantrasyonunu belirtmedikleri sodyum tiyosülfat solüsyonlarını kullanmışlardır. Her iki çalışmada da dezenfeksiyon protokolü sonrasında yapılan sterilite kontrolleri sonucu kontamine örnek rapor edilmemiştir (Siqueira ve ark., 2011; Özok ve ark., 2012). Yazarlar çalışmalarında sterilite kontrolünde PZR kullandıklarını rapor etmişlerdir. Moleküler bir teknik olarak PZR ölü bakteriyel DNA'yı saptayabilir, ancak oral floradan kontamine olabilecek bakterilerin tamamını saptayabilme kabiliyeti yoktur (Siqueira ve Rocas, 2011). Dolayısıyla çalışmamızda Siqueria ve ark.'nın (2011) kullandıkları dezenfeksiyon protokolü, sodyum hipoklorit konsantrasyonu Nd ve ark.'nın (2003) önerisi doğrultusunda bakteriyel DNA'yı parçalayabilmesi için %5.25 olacak şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır.

Kültür teknikleri bir mikrobiyotada kültüre edilebilen bakterilerin “hangi türler oldukları”nın yanısıra “mikrobiyotadaki görevleri”ni de ortaya koyabilmektedir. Kültür teknikleriyle ilgili problem ise her bakterinin kültüre edilememesidir. Paster ve ark. (2001), oral mikrobiyotada yer alan mikroorganizmaların çoğunluğunu kültüre edilemeyen türlerin oluşturduğunu bildirmişlerdir. Metagenomik teknikleri kullanan mikrobiyom profil çalışmaları, incelenecek komünitede bulunan tüm mikroorganizmaların varlığını ve miktarını araştırmayı amaçlamaktadır. Siqueira ve ark. (2012), pirosekanslama analizlerini, endodontik mikrobiyolojide kullanılan moleküler metotların en geniş kapsamlısı

olarak tanımlamışlardır. Pirosekanslama ve diğer yeni nesil dizileme teknikleri beşinci ve son jenerasyon çalışmalar olarak sınıflandırılmıştır (Siqueira ve ark., 2012). Pirosekanslama tekniği, endodontide kullanılan moleküler teknikler ve geleneksel Sanger sekanslama ile karşılaştırıldığında, aynı anda binlerce sekans okumasına imkan sağlayabilmesi, yüksek duyarlılığa sahip sonuçlar elde etmesi ve az sayıdaki mikroorganizmaların da identifikasyonunu sağlaması (Gharizadeh ve ark., 2007) gibi üstün avantajları nedeniyle çalışmamızda analiz metodu olarak seçilmiştir. Li ve ark. (2010), primer endodontik infeksiyonların analizinde Sanger sekanslama ile pirosekanslamayı karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, aynı örneklerden pirosekanslama tekniği ile toplamda 13 bakteriyel filum ve 179 cins saptarlarken, Sanger sekanslama tekniğini kullanarak 8 filum ve 25 cins saptadıklarını rapor etmişlerdir. Örnek toplama yöntemi olarak kağıt konun seçildiği bu çalışmada Sanger sekanslama ile elde edilen okuma sayısı 337 iken bu sayı pirosekanslama ile 200.129 olarak bildirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, pirosekanslamanın, Sanger sekanslama ile kıyaslandığında anlamlı oranda daha fazla veri sağladığı ve endodontik mikrobiyotanın bakteriyel çeşitliliğini daha doğru saptayabildiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2010). Metodolojisinde kriyojenik pulverizasyonun ve pirosekanslama tekniğinin kullanıldığı iki çalışmada araştırmacılar, yalnızca primer infeksiyonlu dişleri analiz etmişler ve Özok ve ark. (2012) 23 örnekten uygun kalitede 301.298 sekans okuması; Siqueira ve ark. (2011) ise 10 örnekten 9818 sekans okuması elde etmişlerdir. Bu iki çalışma arasındaki sekans sayısı farklılıklarının muhtemel sebebinin, Özok ve ark.'nın (2012) tüm diş dokusunu kullanırken; Siqueira ve ark.'nın (2011) köklerin yalnızca apikal kısımlarını çalışmaya dahil etmesi olduğu görüşünderiz. Çalışmamızda toplam 40 örnekten 2.607.549 sayıda, örnek başına ortalama 64.700 sekans okuması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sekans okumaları, Anderson ve ark.'nın (2013) önerdiği kalite kontrol kriterlerine göre değerlendirilmiş ve sonuçta 2.606.128 kaliteli sekans okuması biyoinformatik analizde kullanılmıştır. Kısa baz çiftine sahip okumaların değerlendirilmeden çıkarılmasındaki sebep, kısa baz çiftlerinin ilgili bakterinin kimliğine dair yeterli bilgi sağlamamasıdır. Dahası homopolimerlerin varlığı bakteriyi ait olmadığı bir filuma aitmiş gibi gösterebilmekte ve bu nedenle komünitede bulunmayan bir bakteri, nadir saptanan bir tür olarak yanlış identifiye edilebilmektedir. 16S rRNA geninin başlangıçtaki

500 baz çiftinin sekanslanmasının bakterilerin büyük bir çoğunluğunun identifikasyonu için yeterli olacağı görüşü kabul edilmiştir (Clarridge, 2004). Mevcut tüm yeni nesil sekanslama platformları kısa sekans okumaları üretmektedir (Siqueira ve ark., 2012). Bu kısa sekans okumalarının meydana getireceği olumsuzlukları elimine etmek için, sekanslama teknikleri 16S rRNA geninin hiperdeğişken bölgeleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Klonlama, Sanger sekanslama ve yeni nesil sekanslama çalışmalarında yapılan analizlerde, yalnızca bu belirli bölgelerin kullanılmasının mikroorganizmaların identifikasyonu için yeterli veri sağladığı bildirilmiştir (Huse ve ark., 2008; Nasidze ve ark., 2009). 16S rDNA geninde sabit bölgeler ve dokuz adet hiperdeğişken bölge tanımlanmıştır. Hiperdeğişken bölgeler V1'den V9'a kadar numaralandırılarak adlandırılmıştır (Woese, 1987). Hiperdeğişken bölgeler kullanılarak bir türe spesifik identifikasyon yapılabildiği ve farklı cins veya türler arasında ayırım yapılabildiği rapor edilmiştir. Ancak, çalışmalarda kullanılması önerilen standart bir hiperdeğişken bölge yoktur (Yang ve ark., 2002; Becker ve ark., 2004). İncelenecek taksonomik birimlerin özellikleri, primerden sağlanacak filogenetik bilginin kapsamı ve sekanslama platformu ile primer uzunluğunun uyumu, hiperdeğişken bölgelerin ve primerlerin seçimi göz önüne alınarak gerçekleştirilmelidir (Kuczynski ve ark., 2012). Örneğin, bakteri çalışmalarında sıklıkla kullanılan F27-R338 primer çifti, bağırsak mikrobiyotasının önemli bir üyesi olan *Bifidobacterium*'a duyarlı değildir; bu nedenle bu primerin bağırsak mikrobiyotasının inceleneceği metagenomik çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmesi uygun olmayacaktır (Hayashi ve ark., 2004). Yeni nesil sekanslamanın endodontik infeksiyonlarda rol alan komünitelerin mikrobiyotalarını incelemek için kullanıldığı çalışmalarda sıklıkla V1, V2, V4 ve V6 bölgeleri kullanılmaktadır. (Siqueira ve ark., 2011; Özok ve ark., 2012; Anderson ve ark., 2013). Liu ve ark. (2008), V4 bölgesinin F515 primerinin kullanılmasının, V6 bölgesiyle kıyaslandığında bakteri ve arkea çalışmalarının taksonomik identifikasyonunda daha duyarlı ve doğru sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir. Youssef ve ark. (2009), tür çeşitliliğinin saptanması açısından, V4 bölgesinden elde edilen veriler ile 16S rRNA'nın tamamının kullanılarak elde edilen veriler arasında fark saptayamadıklarını rapor etmişlerdir. Bu araştırmalardan yola çıkarak, çalışmamızda pirosekanslama analizinde filumdan türe kadar tüm filogenetik basamakların tayini ve bakteriler arası ayırım için V4 hiperdeğişken

bölgesi seçilmiş ve kullanılmıştır. V4 bölgesi yaklaşık olarak 254 baz çiftinden meydana gelmektedir (Youssef ve ark., 2009). Baz çifti uzunluğu açısından da V4 bölgesinin 454 GS FLX pirosekanslama platformunda kullanılması uygundur (Schmalenberger ve ark., 2001). Schmalenberger ve ark., (2001) V4-5 bölgelerinin kullanılmasının mikrobiyom profil çalışmalarında etkili ve pratik olduğunu rapor etmişlerdir. Dünya Mikrobiyom Projesi grubu da analizlerinde V4 bölgesini kullanmaktadır (www.earthmicrobiome.org, 2015). Santos ve ark. (2011), akut ve kronik endodontik infeksiyonlardan kağıt kon tekniği ile elde ettikleri örnekleri pirosekanslama tekniği ile inceledikleri çalışmalarında da ilgili genin V4 hiperdeğişken bölgesini kullanmışlardır.

Sekanslama platformlarındaki gelişmeler sayesinde yapılan her çalışma ile büyük hacimli veriler elde edilmektedir. Bu verilere ulaşımın ve verilerin değerlendirilmesinin hızlı ve pratik olması adına uluslararası veri tabanları oluşturulmuştur (Kalaycıoğlu, 2013).

Biyoinformatik, Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi tarafından biyoloji, bilgisayar bilimi ve bilgi teknolojilerinin birlikte kullanıldığı bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır (www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/bioinformatics, 2016). BLAST yazılımı Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi tarafından geliştirilmiştir ve biyoinformatik uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Kalaycıoğlu, 2013). Çalışmamızda da, elde edilen ham verilerin biyoinformatik analizinde, bu konuda en sık kullanılan birincil biyolojik veri tabanı olan GenBank ve BLAST kullanılmıştır. BLAST analizinde, elde edilen gen sekansı GenBank veri tabanında yer alan sekanslar ile karşılaştırılır. Aynı veya en yüksek benzerliğe sahip eşleşmelerdeki benzerlik oranı yüzde olarak verilir (Altschul ve ark., 1997; Johnson ve ark., 2008).

Bu çalışmada, pirosekanslama sonucu elde edilen gen sekansı ile Genbank'ta eşleşen sekans ile aynı mikroorganizma türüne ait olduğu kararını vermek için iki sekans arasında en az %97'lik bir benzerlik gözetilmiştir. Stackebrandt ve Goebel (1994), bu %97'lik eşik değeri kriterini önermişlerdir. Bu değer, günümüzde bu konudaki çalışmalarda da sıklıkla kullanılmaktadır (Santos ve ark., 2011; Özok ve ark., 2012; Vengerfeldt ve ark., 2014).

5.2 Primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda saptanan mikroorganizma profilleri

Çalışmamızın sonuçlarına göre, hem primer hem de sekonder/persistan endodontik infeksiyon grubunda en fazla sayıda yer alan filum Proteobacteria (%33.49) olarak saptanmıştır. Siqueira ve ark., (2011) Brezilya toplumundan primer endodontik infeksiyonlu 10 örnekte yürüttükleri pirosekanslama çalışmalarında, çalışmamızla uyumlu şekilde en sık olarak Proteobacteria (%43) filumunu saptadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, çalışmalarında kriyojenik pulverizasyon tekniğini köklerin yalnızca apikal 4-6 mm'lik kısımlarına uygulamışlarken; çalışmamızda köklerin tamamı kriyojenik pulverizasyonla öğütülmüş ve tamamından DNA ekstraksiyonu yapılmıştır (Siqueira ve ark., 2011). Anderson ve ark., (2013), Sudan toplumundan 50 persistan endodontik infeksiyon örneğinde, semptomatik ve asemptomatik vakalarda yer alan mikroorganizma komünitelerini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, semptomatik persistan endodontik infeksiyon vakalarından en sık Firmicutes (%38.5) filumunu; asemptomatik persistan endodontik infeksiyon vakalarından ise en sık Proteobacteria (%32.4) filumunu tanımlamışlardır (Anderson ve ark., 2013). Anderson ve ark.'nın çalışmalarında, asemptomatik persistan infeksiyonlarda en sık saptadıkları filumun Proteobacteria olması çalışmamızın sonuçlarıyla uyumludur. Bu benzerliğin, karşılaştırılan deney gruplarına dahil edilen örneklerin asemptomatik infeksiyonlara sahip dişler olmalarıyla açıklanabileceği görüşündeyiz. Bununla beraber, Proteobacteria'yı en sık rastlanan filum olarak rapor eden çalışmamızda ve Siqueira ve ark.'nın (2011) çalışmalarında, örnek eldesinde kriyojenik pulverizasyon metodu kullanılırken; Anderson ve ark. (2013), kağıt kon ile örnek alma tekniğini kullanmışlardır. Anderson ve ark. (2013) ve Siqueira ve ark. (2011) çalışmamızla benzer şekilde Roche 454 GS FLX Titanyum pirosekanslama platformunu kullanmışlardır.

Çalışmamızda primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyon gruplarında en sık saptanan ikinci filum Firmicutes (%32.37) olmuştur. Siqueira ve ark. (2011) da çalışmamızla uyumlu şekilde Firmicutes filumunu en sık saptanan ikinci filum olarak bildirirken (%25); Kore toplumunda yapılan bir çalışma bu filumu endodontik infeksiyonlarda en fazla sayıda saptanan bakteri filumu olarak rapor etmektedir (Hsiao ve ark., 2012).

Hsiao ve ark. (2012), Kore toplumunda 8 akut endodontik infeksiyonlu bireyin hem oral mikrobiyotasından (yanak mukozası, ile dilin lateral yüzeyinden sürüntü ile alınan örnekler ve supragingival plak örnekleri birleştirilmiş) hem apikal apselerinden aspirasyon ile hem de apseli dişlerin kök kanallarından kağıt konlar ile ayrı ayrı örnek almış ve örnekleri pirosekanslama tekniği ile incelemiştir. Araştırmacılar, apikal apse içeriğinden ve kök kanallarından sırasıyla %33.1 ve %38.7 oranlarıyla en sık olarak Firmicutes filumunu saptadıklarını rapor etmişlerdir. Hsiao ve ark. (2012) apikal apse örneklerini incelemişken, çalışmamıza kronik endodontik infeksiyonlar dahil edilmiştir. Çalışma gruplarının farklı oluşturulması, örnek toplamada kullanılan farklı teknikler ve çalışmaların farklı coğrafi bölgelerde yürütülmelerinin sonuçlardaki farklılıklara sebep olmuş olabileceği görüşündeyiz.

Santos ve ark. (2011) Brezilya toplumunda, Özok ve ark. (2012) ise Hollanda toplumundaki örneklerde yürüttükleri çalışmalarında da en fazla sayıda saptanan bakteri filumu olarak Firmicutes'i rapor etmişlerdir. Özok ve ark. (2012), primer endodontik infeksiyonlu 23 dişin kök kanallarının apikal ve koronal mikrobiyotalarının içeriğini karşılaştırma amacıyla kriyojenik pulverizasyon tekniğini kullanmışlardır. Araştırmacılar, elde ettikleri DNA'nın analizinde 454 pirosekanslama platformunu kullanmışlar ve totalde Firmicutes filumunu %48 oranıyla en sık saptanan filum olarak bildirmişlerdir. Koronal bölgede Actinobacteria'nın, apikal bölgede ise Proteobacteria'nın sıklıkla saptandığı bildirilmiştir (Özok ve ark., 2012). Özok ve ark. (2012), çalışmamızla aynı örnek alma tekniği ile pirosekanslama platformunu kullanmışlardır; ancak çalışmamızdan farklı olarak araştırmacılar örnekleri koronal ve apikal olmak üzere ayırmışlar ve 16S rDNA'nın farklı hiperdeğişken bölgelerini (V5-6) kullanmışlardır. Ayrıca çalışmaların farklı coğrafyalarda yürütülmeleri de farklı sonuçlar üzerinde etkili olmuş olabilir.

Santos ve ark. (2011), 9 semptomatik apikal apse ile 8 kronik apikal periodontitis vakasında yer alan bakteriyel komünite üyelerini pirosekanslama tekniği kullanarak karşılaştırmış ve her iki grupta da en sık Firmicutes filumunu saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmamıza semptomatik durumdaki dişler ve akut infeksiyonlar dahil edilmediğinden çalışma gruplarının farklı oluşturulmaları ve Santos ve ark.'nın (2011) örnek almada kağıt kon tekniğini kullanmış olmaları sonuçlardaki farklılıklara sebep olmuş olabilir.

Kore toplumunda yapılan diğer iki yeni nesil sekanslama çalışması ise Bacteroidetes filumunu en sık rastlanan mikroorganizma türü olarak bildirmiştir (Li ve ark., 2010; Hong ve ark., 2013). Li ve ark.'nın (2010) çalışması endodontik infeksiyonların analizinde pirosekanslama platformunu kullanan ilk çalışma olmasının yanı sıra; pirosekanslamayı Sanger sekanslama ile karşılaştıran ve pirosekanslamanın avantajlarını ortaya koyan bir çalışmadır. Li ve ark. (2010), çalışmalarında 7 primer endodontik infeksiyon örneğini incelemişler ve Bacteroidetes filumunu %59.4 gibi yüksek bir oranla en sık saptanan filum olarak rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda en sık saptanan filum olan Proteobacteria ise bu çalışmada %3.1 oranında rapor edilmiştir (Li ve ark., 2010). Li ve ark.'nın (2010) çalışmasında yalnızca 7 primer endodontik infeksiyon örneğinin incelenmiş olması ve çalışmamızla karşılaştırıldığında örnek başına düşük miktarda sekans elde edilmiş olması (47 sekans) çalışmalar arası farklılıkların sebebi olarak gösterilebilir. Ayrıca Li ve ark. (2010), veri eldesinde 454 GS-FLX pirosekanslama platformunu kullanmışlarken; çalışmamızda platformun güncel versiyonu olan 454 GS FLX titanyum platformu kullanılmıştır. Üretici firma, 454 GS FLX Titanyum platformunun, bir önceki 454 GS FLX platformuna göre daha hassas, kapsamlı ve büyük boyutlarda saptama ve okumalara imkan verdiğini belirtmektedir (www.454.com/products/gs-flx-system, 2016). Li ve ark. (2010), analiz öncesinde örneklerin toplanmasında çalışmamızdan farklı olarak kağıt kon tekniğini kullanmışlardır.

Hong ve ark. (2013), 10 primer ve 8 persistan endodontik infeksiyonlardan kağıt kon tekniği ile aldığı örneklerin pirosekanslama ile analizi yaptıkları çalışmalarında Bacteroidetes'i (%29.6) en sık saptanan filum olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada Firmicutes %23.2 oranıyla en sık saptanan ikinci filum olarak rapor edilmiştir. Hong ve ark. (2013), çalışmalarında çalışmamızdakiyle aynı pirosekanslama platformunu kullanmışlardır; ancak kullanılan örnek alma teknikleri, bireyler arası muhtemel mikrobiyota farklılıkları, çalışmaların farklı coğrafyalarda yürütülmeleri gibi faktörlerin, çalışmaların sonuçları arasındaki farklılıklara neden olmuş olabileceği görüşündeyiz.

Çalışmalar incelendiğinde görülmektedir ki, örnek alma tekniği ne olursa olsun hem primer hem de sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda en sık görülen üç filum sıralamaları saptanma oranları çalışmalara göre farklılıklar

göstermese dahi; Proteobacteria, Firmicutes ve Bacteroidetes olmaktadır. Bizim çalışmamızda da önceki çalışmalarla uyumlu olarak en sık rastlanan 3 filum sırasıyla Proteobacteria (%33.49), Firmicutes (%32.37) ve Bacteroidetes (%26.35) filumlarıdır.

Çalışmamızda, sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda, primer endodontik infeksiyonlara göre Cyanobacteria, Tenericutes ve Acidobacteria filumları daha fazla saptanmıştır. Tzanetakis ve ark. (2015), çalışmalarında, bulgularımızı destekler şekilde, Tenericutes filumunun persistan infeksiyonlarda primer infeksiyonlara göre daha fazla bulunduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda filum seviyesinde takson zenginliği ve çeşitliliği açısından primer endodontik infeksiyonlar ile sekonder/persistan endodontik infeksiyonlar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Açık uçlu moleküler tekniklerin kullanılmasıyla, sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda yer alan mikrobiyal komüniteye dair güncel bilgiler ortaya konmuştur. Günümüze kadar 4 çalışma yeni nesil sekanslama teknolojilerinden faydalanarak sekonder/persistan endodontik infeksiyonları incelemiştir (Hong ve ark., 2013; Anderson ve ark., 2013; Vengerfeldt ve ark., 2014; Tzanetakis ve ark., 2015). Bu çalışmaların tamamı persistan endodontik infeksiyonlarda bulunan mikrobiyotanın, önceki çalışmaların sonuçlarına göre varsayılandan çok daha geniş ve çeşitli olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak bu çalışmaların metodolojileri incelendiğinde tamamında örnek alınırken kağıt kon tekniğinin kullanıldığı ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bu dört çalışma içinden yalnızca Tzanetakis ve ark. (2015), kağıt kon tekniği kullanmakla birlikte, kanallar içinden çıkarttıkları kök kanal dolgusundan da örnek aldıklarını belirtmiştir. Yaptığımız literatür taramasında, daha önce kök kanal tedavisi yapılmış ve sekonder/persistan endodontik infeksiyon gösteren dişlerden kriyojenik pulverizasyonla örnek alındığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızın bu konuda ileride yapılması planlanan çalışmalara rehber olacağını düşünmekteyiz.

Tzanetakis ve ark. (2015), araştırmalarında primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyonları pirosekanslama yöntemiyle değerlendirmiş; filum, cins ve tür zenginliği açısından sekonder/persistan endodontik infeksiyonların içeriğini, primer endodontik infeksiyon grubundan anlamlı oranda daha yüksek bulmuştur. Yazarlar, persistan endodontik infeksiyonların da primer infeksiyonlar gibi

polimikrobiyal olduğu ve tek veya az sayıda patojen tarafından meydana getirilmediği görüşünü ortaya atmışlardır. Ancak bu görüşün doğrulanması için ileri çalışmaların gerekliliğini vurgulamışlardır. Çünkü, çalışmada sekonder/persistan endodontik infeksiyon grubuna dahil edilen örneklerde, kanal tedavilerinin %79'unun radyografik apekten 3-6 mm geride sonlandığı ve kök kanal dolgularının heterojen görünüme sahip olduğunu belirtilmiştir. Kök kanal tedavisi radyografik apekten 0-2 mm'den daha geride sonlandırıldığında endodontik tedavinin başarı oranının düştüğü bilinmektedir (Tronstad ve ark., 2000). Kök kanal tedavisi yetersiz yapılmış persistan endodontik infeksiyonlu dişlerde kanal içi mikrobiyota çeşitliliğinin ve zenginliğinin, primer endodontik infeksiyonlardakine benzerlik gösterebileceği birçok çalışmada bildirilmiştir (Cheung ve Ho, 2001; Peculien ve ark., 2001; Hancock ve ark., 2001). Bu çalışmada yazarlar, persistan endodontik infeksiyon grubunun OTU zenginliğinin yüksek olmasının sebebinin, çalışmaya, mevcut kanal tedavisi kalitesi yetersiz olan örneklerin dahil edilmesi olabileceğini de belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, sekonder/persistan endodontik infeksiyon grubuna dahil edilen dişler radyolojik olarak Tronstad ve ark.'nın (2000) kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Yapılan inceleme sonucunda kök kanal tedavisi radyolojik apekten 0-2 mm mesafede sonlandırılmış ve kök kanal dolgusunda önemli boşluklar bulunmayan, ancak periradiküler radyolusensisi bulunan ve PAI skoru 3 ve 3'ten yüksek dişler çalışmamıza dahil edilmiştir. Çalışmamızda bu koşullar altında, sekonder/persistan endodontik infeksiyonlu dişlerde yer alan mikroorganizmaların filum, cins ve tür seviyelerinde saptanma oranı ve çeşitlilik açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Çalışmamızın sonuçları, Tzanetakakis ve ark.'nın (2015), sekonder/persistan endodontik infeksiyonların primer endodontik infeksiyonlara göre anlamlı oranda fazla sayıda ve çeşitli mikrobiyal komüniteye sahip oldukları görüşünü desteklemektedir. Bu farklılıklara sekonder/persistan endodontik infeksiyon grupları oluşturulurken birbirinden farklı kriterler kullanılmasının ve örnek toplama işlemlerinin farklı olmasının neden olmuş olabileceği kanaatindeyiz. Bu bulgular ışığında, sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda yer alan mikroorganizmaların çeşitlilik ve miktar açısından primer endodontik infeksiyonlar kadar zengin olduğunu bildirmekteyiz.

Anderson ve ark. (2012), sekonder/persistan endodontik infeksiyonları araştırmak amacıyla hem kültür hem de moleküler genetik metotları kullandıkları çalışmalarında, endodontik infeksiyonlardan ilk defa *Exiguobacterium aurantiacum*, *Rummeliibacillus stabekisii*, *Bacillus pynus* türlerini ve *Kurthia* cinsini identifiye ettiklerini rapor etmişlerdir. *Kurthia* cinsine mensup *K. gibsonii* periodontoloji alanındaki bir çalışmada marjinal periodontitis ile ilişkilendirilmiştir (Heggendorn ve ark., 2014). Çalışmamızda da, *Kurthia* cinsi Anderson ve ark.'nın (2012) sonuçlarını destekler nitelikte, sekonder/persistan endodontik infeksiyon grubundaki 5 örnekten identifiye edilmiştir. Çalışmamız sonuçlarına göre *Kurthia*'nın cins düzeyinde mevcut OTU'nun %0.0003'n oluşturduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda Firmicutes filumunun yesi olan *Vagococcus*'un, cins seviyesinde mevcut OTU'nun %0.15'ini meydana getirdiği saptanmıştır. Sonuçlarımıza göre *Vagococcus* cinsi yaygın şekilde, 20 primer endodontik infeksiyonlu örneğin 15'inden ve 20 sekonder/persistan endodontik infeksiyonlu örneğin ise 13'nden olmak üzere, toplam 28 örnekte saptanmıştır. Ancak bu identifikasyon cins seviyesinde yapılmış olup, tür seviyesine kadar detaylandırılmamıştır. *Vagococcus* cinsine mensup *V. fluvialis*, ilk defa Schirrmester ve ark. (2009) tarafından persistan infeksiyonlu bir dişten identifiye edilmiştir. *V. fluvialis* 1997 yılında Teixeira tarafından yapılan bir çalışmada keşfedilmiştir ve 2009 yılına kadar saptandığı bireylerde infeksiyöz hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Teixeira ve ark., 1997; Schirrmester ve ark., 2009). *V. fluvialis* taksonomik ve fenotipik olarak *E. faecalis*'e çok yakındır ve bu nedenle doğru identifikasyonu için gelişmiş moleküler ve kimyasal tekniklerin kullanılması gerekmektedir (Teixeira ve ark., 1997). *V. fluvialis*'in yanlış identifikasyonu *E. faecalis*'in saptanma oranına dair yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir.

Schirrmester ve ark. (2009), çalışmalarında *Solobacterium moorei* türünü inceledikleri 10 örneğin 6'sından identifiye etmişlerdir. *S. moorei*, Firmicutes filumunun *Solobacterium* cinsine mensup tek bakteri türüdür, anaerobik Gram pozitif bir bakteridir ve klinikte bakteriyemi görülen vakalarda tespit edilmiştir (Pedersen ve ark., 2011). Çalışmamızda *S. moorei*'nin tür seviyesinde incelendiğinde mevcut tüm OTU'nun %0.05'ini meydana getirdiği saptanmıştır.

Granulicatella adiacens, Firmicutes filumununun *Abiotrophia* cinsine mensup, oral kavite, bağırsak ve genitoüriner sistemde sıklıkla bulunan bir bakteridir (Vandana ve ark., 2010). Ancak, oral, genitoüriner ve bağırsak mikrobiyomunda bulunmasına rağmen santral sinir sisteminin, endovasküler dokuların, eklemlerin ve çene kemiklerinin infeksiyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca endokardit, bakteriyemi ve septik artrit de rol oynadığı bildirilmiştir (Bizzarro ve ark., 2011). Siqueira ve Rocas (2006), primer endodontik infeksiyonları inceledikleri çalışmalarında *G. adiacens* ve Firmicutes filumunun *Catonella* cinsine ait *C. morbi* türlerinin primer endodontik infeksiyonlarda rol oynadığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da *Granulicatella*, cins seviyesine kadar tanımlanmış ve bu seviyede mevcut OTU'lerin %0.01'ini meydana getirdiği saptanmıştır. Ayrıca *Granulicatella* cinsi, hem primer endodontik infeksiyon grubundan (5/20) hem de persistan endodontik infeksiyon grubundan (3/20) tanımlanmıştır. Çalışmamızda *Catonella* cins seviyesine kadar tanımlanmış ve hem primer endodontik infeksiyonlardan hem de sekonder endodontik infeksiyonlarda saptanmıştır. Toplamda, cins seviyesindeki OTU'nun %0.09'unu meydana getirdiği belirlenmiştir. Çalışmamız, Siqueira ve Rocas (2006)'ın bulgularını desteklemekle birlikte; sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda da *Granulicatella* ve *Catonella* cinslerini tanımlayabilmiştir.

A. defective, *Abiotrophia* cinsine mensup bir başka bakteridir. Çalışmamızda bu tür, tür seviyesinde OTU'ların %0.072'sinde ve yalnızca sekonder/persistan endodontik infeksiyon grubundaki örneklerde saptanmıştır. *A. defective*, oral mikrobiyotanın bir üyesidir ve kronik maksiller sinus infeksiyonlarıyla ilişkilendirilmiştir (Guzman ve ark., 1989). *A. defective*, çalışmamızda sekonder/persistan endodontik infeksiyon grubundaki örneklerden 12 tanesinde tespit edilmiştir (12/20). Örnek alınan dişler maksiller posterior dişler olmasına rağmen çalışma öncesinde deneklerden alınan tıbbi hikayede sinüzit bulgusuna rastlanmamıştır.

Moraxella osloensis, aerobik, oksidaz pozitif, hareketsiz, Gram negatif bir bakteri olarak, insan deri florasında ve mukozal yüzeylerde bulunmaktadır. *M. osloensis*'in bakteriyemiye, santral venöz katetere bağlı infeksiyonlara, pnömoni, menenjit ve endoftalmitise sebep olduğu belirtilmiştir (Hadano ve ark., 2012). Literatürde kök kanal sisteminde *M. osloensis* varlığı Anderson ve ark. (2012) ile

Tennert ve ark. (2014) tarafından yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Bizim alışmamızda *Morexella* cins seviyesinde %0.02 oranında saptanmıştır.

Atopobium rimae Actinobacteria filumuna ait Gram pozitif laktik asit üreten bir bakteridir. Literatürde, marjinal periodontitis ve primer endodontik infeksiyon vakalarında saptanmış ve patojen olmaya aday bir tür olarak nitelendirilmiştir (Kumar ve ark., 2003; Siqueira ve ark., 2005). Bizim alışmamızda *A. rimae* tür seviyesindeki OTU'ların %0.005'inde saptanmıştır.

Çalışmamızda *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinsleri, sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda primer endodontik infeksiyonlarla karşılaştırıldığında anlamlı oranda yüksek miktarlarda bulunmuşlardır. Literatürde, Hong ve ark. (2013), Anderson ve ark. (2013) ve Tzanetakakis ve ark. (2015) alışmamızla uyumlu şekilde, sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinslerini primer endodontik infeksiyonlara kıyasla anlamlı oranda yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmaların tamamı çalışmamızdan farklı şekilde kağıt kon tekniğini kullanmış olsalar da; çalışmamıza benzer şekilde açık uçlu genetik temelli analiz tekniklerini kullanmışlardır.

Enterococcus, Firmicutes filumuna ait endospor oluşturmayan fakültatif anaerob Gram pozitif bir bakteri cinsidir (Schleifer ve Kippler-Balz, 1984). Endodontik infeksiyonların kültür yöntemleriyle incelenmesinden beri *E. faecalis* persistan infeksiyonlardaki rolüyle dikkat çekmiştir. Çeşitli alışmalar, *E. faecalis*'in sıklıkla başarısız endodontik tedavili dişlerden izole edildiğini belirtmektedir (Molander ve ark., 1998; Sundqvist ve ark., 1998). Hatta bu vakalarda *E. faecalis*'in tek başına başarısızlık nedeni olduğu rapor edilirken (Molander ve ark., 1998; Sundqvist ve ark., 1998; Pinheiro ve ark., 2003); primer ve sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda saptanan *E. faecalis* miktarının anlamlı farklılık göstermediğini bildiren çalışmalar da vardır (Rocas ve ark., 2004; Tzanetakakis ve ark., 2015). Zhang ve ark. (2015), yürüttükleri meta analiz çalışmasında, persistan infeksiyonlarda *E. faecalis*'in primer infeksiyonlardakinden daha sık bulunduğunu ve kök kanal tedavisi başladıktan sonra kanala giriş sağladığını bildirmişlerdir. *E. faecalis*'in tükürükte saptanma oranı %18.8 ile %40.5 aralığında değişmektedir. Tükürükte saptanma oranı ile persistan infeksiyonlardan izole edilme oranının bağlantılı olduğunu bildiren çalışmalar vardır (Souto ve Colombo, 2008; Zhu ve ark., 2010; Wang ve ark., 2012). Bu alışmalar, *E.*

faecalis'in kanala girmesini engellemek ve tedavi başarısını arttırmak için, endodontik tedavi esnasında lastik örtü takılmasının basit ve kritik önem taşıyan bir önlem olduğunu hatırlatmaktadır. Başka bir görüş de *E. faecalis*'in nekrotik pulpada bulunduğu ve endodontik tedavi esnasında uygulanan antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gösterdiği (Love, 2001). *E. faecalis* endojen proton pompası sayesinde kalsiyum hidroksit gibi yüksek alkali ajanlara direnç gösterebilir ve diğer bakterilerin hayatta kalamayacağı koşullarda yaşamını sürdürebilir (Nakajo ve ark., 2004). Ayrıca dentin tübüllerine penetre olabilir ve serum varlığında kollajene tutunabilir (Gomes ve ark., 2003). *E. faecalis*'in persistan endodontik infeksiyonlu dişlerden izole edilme oranı %24-77 arasındadır (Stuart ve ark., 2006). Zakaria ve ark. (2015), 16S rRNA gen klon kütüphanesi analizinde 12 hastanın persistan endodontik infeksiyonlu dişlerinin apikallerindeki lezyonları incelemiş ve örneklerin hiçbirinde *E. faecalis* saptayamamışlardır. Çalışmamızda örnekler kök kanal sisteminden elde edilirken, Zakaria ve ark.'nın (2015) çalışmasında örneklerin periapikal lezyon içerisinden toplanması farklı sonuçlara yol açmış olabilir. Bizim çalışmamızda *E. faecalis*, persistan endodontik infeksiyonlardan, primer endodontik infeksiyonlara göre daha fazla sayıda ve sık saptanmıştır. Ancak, tür seviyesinde toplam bulunma oranı %0.07, göreceli olarak düşük miktardadır. Çalışmamızın sonuçları Tzanetakakis ve ark.'nın (2015), *Enterococcus* cinsinin bulunma oranı ile ilgili rapor ettiği sonuçlarla (%0.01) uyumludur ve her iki çalışmada da gen sekanslama teknikleri kullanıldığı için uyumlu sonuçlar elde edilmiş olabilir. Zhang ve ark. (2015), yüksek *E. faecalis* oranını bildirdikleri çalışmalarında PZR ve kültür tekniklerinin kullanıldığı 10 yayını analiz etmişlerdir. Çalışmaların sonuçları arasındaki uyumsuzlukların farklı mikrobiyolojik tekniklerin kullanılmasından kaynaklanabileceği kanısındayız. Zhang ve ark.'nın (2015) analiz ettiği yayınlarda Siqueira ve Rocas'ın (2009) sınıflamasına göre birinci jenerasyon açık uçlu kültür teknikleri ve ikinci jenerasyon kapalı uçlu moleküler teknikler kullanılırken, çalışmamızda beşinci jenerasyon geniş kapsamlı açık uçlu pirosekanslama platformu kullanılmıştır.

Endodontik infeksiyonların ana sebebi bakteriler olsa da virüsler, funguslar ve arkealar gibi diğer mikroorganizmaların da hastalık oluşumunda rol oynayabileceği belirtilmiştir (Baumgartner ve ark., 2000; Li ve ark., 2009). Arkealar 1977'de ilk tanımlandıklarında önce bakteri alemine dahil edilmiş (Woese ve Fox,

1977), daha sonra bakteri ve ökaryotlardan farklı üçüncü bir alem olarak tanımlanmıştır (Jarrell ve ark., 2013). Ekstrem çevresel şartlarda yaşamlarını devam ettirebilen arkealar önceleri doğal ekosistemlerden izole edilip incelenmişlerdir (Dridi ve ark. 2011). Ancak çalışmalar arkeaların insan mikrobiyotasının özellikle gastrointestinal sistemin, üreme sisteminin, deri ve oral mikrobiyotasının bir üyesi olduğunu göstermiştir (Eckburg ve ark., 2005; Dridi ve ark., 2009). Günümüzde arkeaların patojenik özellik gösterdiğine dair bir kanıt yoktur. Ancak kolon kanseri, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve obezite ile arkea varlığı arasında muhtemel ilişkiler gösterilmiştir (Scanlan ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2009; Lee ve ark., 2013; Mira-Pascual ve ark., 2014). Arkealar, periodontitis teşhisi konan hastaların subgingival plaklarından ve dil dorsumlarından izole edilmiştir ve periodontitis hastalığının şiddeti ile varlıkları doğrudan ilişkilendirilmiştir. Vianna ve ark. (2006a; 2009) çalışmalarında metanojen bir arkea olan *M. oralis*'in primer endodontik infeksiyonların gelişiminde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. Vickermann ve ark. (2007), semptomatik endodontik infeksiyonların 1/20'sinde ve asemptomatik endodontik infeksiyonların 1/14'ünde arkea varlığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda asemptomatik olan primer endodontik infeksiyon grubunun 4/20'sinde arkea tespit edilmiştir. Jiang ve ark. (2009), primer endodontik infeksiyonların %38'inde ve sekonder endodontik infeksiyonların %17'sinde arkea saptandığını rapor etmişlerdir. Efenberger ve ark. (2015), çalışmalarında %85 oranında arkea saptadıklarını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, Polonya'da 20 hasta üzerinde yürüttükleri çalışmalarında elde ettikleri yüksek arkea oranını ve sonuçlarının mevcut çalışmalarla çelişmesini, farklı mikrobiyal profile sahip populasyonlarda yapılan çalışmalar olmasına ve örnek seçimindeki farklılığa bağlamışlardır. Ancak Efenberger ve ark. (2015), çalışmalarında örnek topladıkların dişlerin klinik durumlarına yer vermemişlerdir. Subramanian ve ark. (2009), persistan endodontik infeksiyonlu dişlerde apikal rezeksiyon sonrası apikal lezyonu ve rezeke edilen kök ucunu incelemişler ve 34 örneğin sadece 1'inde *M. oralis* saptamıştır. Çalışmamızda primer endodontik infeksiyon grubunda arkea saptanırken; sekonder/persistan endodontik infeksiyon grubundaki örneklerin hiçbirinden arkea identifiye edilmemiştir.

Endodontik infeksiyonlardan günümüze kadar izole edilmiş tüm arkealar Metanojenik arkealardır ve en sık rapor edilen tür *M. oralis* olmuştur (Vickerman ve

ark., 2007; Vianna ve ark., 2006a; 2009). Çalışmamızda da *M. oralis* primer infeksiyon grubuna ait örneklerde saptanmıştır. Kök kanal sistemindeki arkeaların patojenik özellik taşıyıp taşımadıkları ve virülans özellik gösterip göstermedikleri hususu henüz aydınlatılamamıştır (Efenberger ve ark., 2015). Araştırmalar, arkeaların kök kanal sisteminin kolonizasyonu için, sayıca çok daha üstün olan bakterilerle birlikte hareket edebileceğini ortaya koymuşlardır (Lepp ve ark., 2004). Metanojenik arkealar, fermentasyon yapabilen ve aynı zamanda gerçek patojen ve fırsatçı patojen olan bakterilerin çoğalmasını sağlayabilirler (Vianna ve ark., 2008). Metanojenler aynı zamanda ağır metalleri işleyerek bizmut, selenyum, telluryum gibi daha toksik ürünler meydana getirebilmektedirler (Michalke ve ark., 2008). Çeşitli farmasötik ve kozmetik ürünlerle alınan bu ağır metallere daha fazla maruz kalınmasıyla birlikte; insan mikrobiyotasında bulunan metanojen arkeaların bu ürünlerin toksisitelerini arttırdıkları düşünülmektedir (Meyer ve ark., 2008). Ancak oral mikrobiyomda bulunan metanojen arkeaların böyle bir özelliği henüz ispatlanamamıştır.

Metanojenik arkealar türler arası hidrojen transferi yaparlar. Arkealar ile sülfat-indirgeyici bakteriler ve *Treponema* cinsi bakteriler arasında, hidrojene bağlı bir ilişki olabileceği öne sürülmüştür (Vianna ve ark., 2008). Çalışmamızda tür seviyesinde *M. oralis*, OTU'lar arasında %0.0006 sıklıkta ve primer endodontik infeksiyon örneklerinin 3'ünde saptanmıştır. Bu 3 örnek *Treponema* cinsi açısından incelendiğinde *Treponema parvum*'un 40 örnek içinden yalnızca bu örneklerden birinde saptandığı (Örnek 8), *Treponema medium* ve *Treponema socranskii* türlerinin saptanma oranının *M. oralis* içeren örneklerde içermeyen örneklere göre daha yüksek olduğu görüldü. Çalışmanın limitasyonları dahilinde *Treponema* cinsi bakterilerin saptanmasıyla *M. oralis*'in varlığı arasında bir ilişki olduğundan bahsedebilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, amonyağı metabolize eden bir arkea olan Thaumarchaeota filumu primer endodontik infeksiyon grubundaki bir örnekte saptanmıştır. Tür seviyesinde Thaumarchaeota filumuna mensup olan *Candidatus nitrosoarchaeum limnia* tüm örneklere oranla %0.0001 miktarında bulunmuştur. Thaumarchaeota filumu 2008'de keşfedilip isimlendirilmiş yeni bir arkea filumudur (Brochier-Armanet ve ark., 2008). Thaumarchaeota'nın amonyağı oksidize ederek doğada nitrojen ve karbon döngüsünde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ancak, bunu

hangi mekanizmayla yaptığı henüz açıklığa kavuşmamıştır. Sıklıkla topraktan, okyanustan ve su kaynaklarından izole edilmiştir. Thaumarchaeota, -1°C 'den 97°C 'ye kadar çok geniş bir sıcaklık aralığında ve 2.5 ile 9 arası pH değerlerinde yaşamını sürdürebilir (Erguder ve ark., 2009). Caporaso ve ark. (2011) ile Probst ve ark. (2013) Thaumarchaeota'yı ilk defa insan deri florasında tanımlamışlardır. Ancak Thaumarchaeota'nın patojenik özelliği olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Probst ve ark. (2013) Thaumarchaeota filumunun önceki çalışmalarda metodolojik olarak gözden kaçırılmış veya eksik değerlendirilmiş olabileceğini; çünkü kendi çalışmalarında yaygın bir şekilde her örnekten izole edildiğini ve miktar olarak Metanojenik arkealardan daha sık saptandığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda, Thaumarchaeota endodontik infeksiyonlardan ilk defa tanımlanmıştır. Thaumarchaeota amonyağı oksidize edebilen Betaproteobacteria ve Gammaproteobacteria bakterilerinin yanında bu özelliğe sahip olduğu bilinen tek mikroorganizmadır (Kowalchuk ve Stephen, 2001). Thaumarchaeota'nın bu aktivitesi bazı mikroorganizmalar için besin kaynağı oluşturabileceği gibi bazı türler için toksik olabilir.

Thaumarchaeota'nın amonyağı metabolize edip kök kanal sisteminin pH'sını etkileyebileceği hipotezi ileri çalışmalar tarafından test edilmelidir. Ayrıca ileri çalışmalar, Thaumarchaeota'nın kök kanal sistemindeki diğer mikroorganizmalarla potansiyel aktif ilişkilerini araştırmalıdır. Arkeaların insan mikrobiyomunun üyesi olmalarının yanında, endodontik infeksiyonların gelişmesinde rol oynayabileceği düşünüldüğünde; varsa konakta meydana getirdikleri immün yanıtların varlığının ve mevcut antimikrobiyal protokollerin arkealar üzerindeki etkilerinin de araştırılması gerektiği görüşündeyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Primer veya sekonder/persistan endodontik infeksiyon tanısı konan dişlerden kriyojenik pulverizasyon işlemi sonrasında izole edilen mikrobiyal DNA'nın pirosekanslama metodu ile metagenomik analizini yapmayı amaçlayan bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Çalışma kapsamında sekanslanan 20 primer ve 20 sekonder/persistan endodontik infeksiyon grubuna ait 40 örnekten toplamda 2.606.128 dizi okuması elde edilmiştir. Sekanslama sonucunda örnek başına ortalama 64.700 adet yüksek kalitede okuma yapılmıştır. Kontaminasyondan şüphelenilen okumaların toplam okumaların % 0.1'inden az olduğu saptanmıştır.
2. OTU zenginliği değerlendirildiğinde çalışmada 40 örnekte toplam 14 filum, 29 sınıf, 47 takım, 85 aile, 160 cins ve 368 tür saptanmıştır.
3. Tüm örneklerde filum seviyesinde sırasıyla, Proteobacteria (%33,49), Firmicutes (%32,37), Bacteroidetes (%26,35), Fusobacteria (%4,24), Actinobacteria (%2,94), Spirochaetes (%0,33), Acidobacteria (%0,13), Cyanobacteria (%0,032), Tenericutes (%0,031), Deferribacteres (%0,023), Synergistes (%0,003), Verrucomicrobia (%0,004), Candidatus Saccharibacteria (%0,002), Euryarchaeota (%0,0005) ve Thaumarchaeota (%0,0001) saptandı.
4. Primer infeksiyon grubundaki örneklerde örnek başına ortalama filum sayısı $9,6 \pm 1,6$ iken; sekonder/persistan infeksiyon grubunda bu sayı $8,4 \pm 1,3$ olarak saptanmıştır. Saptanan filum sayısı açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır.
5. Primer infeksiyon grubunda örnek başına saptanan cins sayısı ortalama $77,6 \pm 13,1$ iken; bu sayı sekonder/persistan infeksiyon grubunda ortalama $70,9 \pm 17,8$ olarak saptanmıştır. Saptanan cins sayısı açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır.
6. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Ralstonia* cinsleri sekonder/persistan infeksiyonlarda, primer infeksiyonlara göre anlamlı oranda yüksek saptanmıştır. *Abiotrophia*, *Kurthia* ve *Sphingomonas* cinslerinin varlığına yalnızca sekonder/persistan infeksiyonlu dişlerde rastlanmıştır.

7. *Enterococcus* cinsinin saptanma oranı çalışmamızda sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda primer endodontik infeksiyon grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulunsa da, diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında düşük miktarda saptanmıştır.
8. Çalışmamızın sonuçlarına göre sekonder/persistan endodontik infeksiyonlarda kök kanal sisteminde bulunan mikroorganizmalar komünite çeşitliliği ve miktar açısından primer endodontik infeksiyonlar kadar zengin bulunmuştur.
9. Primer endodontik infeksiyon grubundaki 3 örnekte Arkea grubuna ait Euryarchaeota ve Thaumarchaeota filumları saptanmıştır. Euryarchaeota filumuna mensup *M. oralis*, tür seviyesinde incelendiğinde toplam OTU'nun % 0,0006'sını oluşturmuştur. Thaumarchaeota filumuna mensup *Candidatus nitrosoarchaeum limnia*'nın, tür seviyesinde incelendiğinde toplam OTU'nun % 0,0001'ini meydana getirdiği saptanmıştır. Sekonder/persistan infeksiyon grubunda Arkea saptanmamıştır.
10. Arkealar metagenomik tekniklerle, kök kanal infeksiyonlarından tanımlanmış olanlardan; ileri çalışmalar, bu mikroorganizmaların patojenik özellik taşıyıp taşımadıkları araştırılmalı ve mevcut kök kanal dezenfeksiyon prosedürlerinin bu mikroorganizmalar üzerindeki etkilerini değerlendirmelidir.
11. Saptanan mikroorganizmaların komünitedeki rollerinin daha iyi belirlenmesi ve patojenite özelliklerinin saptanması için ileri çalışmalar proteomik analizler kullanılarak yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-5732.
- Adib V, Spratt D, Ng YL, Gulibivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J.* 2004;37(8):542-551.
- Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol.* 1987;59(8):493-503.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;3(3):403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389-3402.
- Alves FR, Siqueira JF, Carmo FL, Santos AL, Peixoto RS, Rôças IN, Rosado AS. Bacterial community profiling of cryogenically ground samples from the apical and coronal root segments of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2009;35(4):486-492.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 1995;59(1):143-169.
- American Dental Association: 2005-2006 Survey of dental services rendered. Chicago: American Dental Association; 2007.
- Anderson AC, Al-Ahmad A, Elamin F. Comparison of the bacterial composition and structure in symptomatic and asymptomatic endodontic infections associated with root-filled teeth using pyrosequencing. *Plos One.* 2013;8:e84960.
- Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J.* 1979;147(10):267-272.
- Aydın M. Temel ve Endodontik Mikrobiyoloji. Alaçam, T. Editör Endodonti'de, 2. Baskı, Ankara, Özyurt Matbaacılık. 2012;589-616.
- Bal SH ve Budak F. Mikroarray teknolojisi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg.* 2012;38(2):227-233.
- Baloğlu MC, Bayraç AT, Sadi G, Bayraç C. Biyoinformatik. Karataş, M. Editör Moleküler Biyoloji'de, 1. Baskı, Ankara, Nobel Akademi. 2012;311-340.

- Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2000;26(12):695.
- Bayraç AT, Baloğlu MC, Bayraç C, Cansız S. Rekombinant DNA Teknolojisi. Karataş, M. Editör *Moleküler Biyoloji'de*, 1. Baskı, Ankara, Nobel Akademi. 2012;277-287.
- Becker K, Harmsen D, Mellman A, Meier C, Schumann P, Peters G, von Eiff C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):4899-4995.
- Beighton D, Lynch E. Comparison of selected microflora of plaque and underlying carious dentine associated with primary root caries lesions. *Caries Res.* 1995;29(2):154-158.
- Bernardi G. Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite. *Nature.* 1965;206:779-783.
- Bik EM, Long CD, Armitage GC. Bacterial diversity in the oral cavity of ten healthy individuals. *ISME J.* 2010;4(8):962-974.
- Bizzarro MJ, Callan DA, Farrel PA, Dembry LM, Gallagher PG. *Granulicatella adiacens* and early-onset sepsis in neonate. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1971-1973.
- Bonapart IE, Stevens HP, Kerver AJ, Rietveld AP. Rare complications of an odontogenic abscess: mediastinitis, thoracic empyema and cardiac tamponade. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(5):610-613.
- Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P. Mesophilic crenarchaeota: Proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Rev Microbiol.* 2008;6(3):245-252.
- Brown TA. *Genomlar 3.* 3. Baskı, Ankara, Nobel Akademi. 2015.
- Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ, Speiser G, Tagg JR. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* k12 on oral malodour parameters. *J Appl Microbiol.* 2006;100(4):754-764.
- Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.* 1985;18(1):35.
- Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzales A. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biology.* 2011;12(5):50.
- Cashion AK, Driscoll CJ, Sabek O. Emerging genetic technologies in clinical and research settings. *Biol Res Nurs.* 2004;5(3):159-167.

- Cavrini F, Pirani C, Foschi F, Montebugnoli L, Sambri V, Prati C. Detection of *Treponema denticola* in root canal systems in primary and secondary endodontic infections. A correlation with clinical symptoms. *New Microbiol.* 2008;31(1):67-73.
- Chavez de Paz L, Svensater G, Dahlen G, Bergenholtz G. Streptococci from root canal in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(2):232.
- Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(6):332-337.
- Clarridge JE, 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):840-862.
- Corson MA, Postlethwaite KP, Seymour RA. Are dental infections a cause of brain abscess? Case reports and review of the literature. *Oral Diseases.* 2001;7(1):61-65.
- Daly C, Seymour G, Kieser J, Corbet E. Histological assessment of periodontally involved cementum. *J Clin Periodontol.* 1982;9(3):266-274.
- De Carvalho FB, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Solidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2006;51(11):1024-1028.
- Delivanis PD, Fan VS. The localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled and overinstrumented canals. *J Endod.* 1984;10(11):521.
- DeLong EF, Preston CM, Mincer T, Rich V, Hallam SJ, Frigaard NU, Martinez A, Sullivan MB, Edwards R, Rodriguez BB, Chisholm SW, Karl D. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science.* 2006;311(5760):496-503.
- Demiryürek EO, Onuk EE, Yüksel G, Çiftçi A. Evaluation of microbial contamination of resilon and gutta-percha cones and their antimicrobial activities. *Afr J Microbiol Res.* 2012;6(2):6275-6280.
- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-5017.
- Dixon C, Rickert U. Tissue tolerance to foreign materials. *J Am Dent Assoc.* 1933;20(8):1458-2472.
- Dobell C. Antony van Leewenhoek and his "little animals", London, 1932, Staples Press Limited.

- Dridi B, Henry M, El Khechine A. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Metanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using improved DNA detection protocol. *Plos ONE*. 2009;4(9):e7063.
- Dridi B, Raoult D, Drancourt M. Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes. *Anaerobe*. 2011;17(2):56-63.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-1638.
- Eckerbom M, Magnusson T, Martinsson T. Reasons for and incidence of tooth mortality in a Swedish population. *Endod Dent Traumatol*. 1992;8(6):230-234.
- Efenberger M, Agier J, Pawlowska E, Blaszczyk EW. Archaea prevalence in inflamed pulp tissues. *Clin Immunol*. 2015;40(2):194-200.
- 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.
- Eide B, Lie T, Selvig KA. Surface coatings on dental cementum incident to periodontal disease. II. Scanning electron microscope confirmation of a mineralized cuticle. *J Clin Periodontol*. 1984;11(2):565-575.
- Eliasson L, Carlen A, Almstahl A, Wikstrom M, Lingstrom P. Dental plaque pH and micro-organisms during hyposalivation. *J Dent Res*. 2006;85(4):334-338.
- Erguder TH, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(5):855-869.
- 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):221-228.
- Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller AJR. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(4):278.
- Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(4):234.
- Fisher DL, Holland MM, Mitchell L, Sledzik PS, Wilcox AW, Wadhams M. Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone. *J Forensic Sci*. 1993;38(1):60-68.

- Fouad AF, Burleson J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *J Am Dent Assoc.* 2003;134(1):43-51.
- Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol.* 1976; 21(6):355.
- Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>, 2016.
- George S, Basrani B, Kishen A. Possibilities of gutta percha centered infection in endodontically treated teeth: an in vitro study. 2010;36(7):1241-1244.
- Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobione) in healthy individuals. *Plos Pathogens.* 2010;6(1):e1000713.
- Gharizadeh B, Ghaderi M, Nyren P. Pyrosequencing technology for short DNA sequencing and whole genome sequencing. *Technology.* 2007;47(2):129-132.
- Gier RE, Mitchell DF. Anachoretic effect of pulpitis. *J Dent Res.* 1968;47(4):564.
- 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.
- Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine teeth in vitro. *Int Endod J.* 2003;36(4):267-275.
- Gomes BP, Vianna ME, Matsumoto CU, Rossi Vde P, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(4):512-517.
- Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod.* 2012;38(8):1082-1086.
- Govoni M, Jansson EA, Weitzberg E, Lundberg JO. The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry/Official J Nitric Oxide Soc.* 2008,19(4):333-337.
- Gür D. Bakteriler için kullanılan antibiyotik duyarlılık testleri. *ANKEM Derg.* 1999;13:322-324.

- Guzman CA, Pruzzo C, Li Pira G. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infect Immun.* 1989;57(6):1834-1838.
- Haapasalo M ve Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.*1987;66(8):1375-1379.
- Hadano Y, Ito K, Suzuki J. *Morexella osloensis*: an unusual case of central venous catheter infection in a cancer patient. *Int J Gen Med.* 2012;875-877.
- Hahn CL ve Overton B. The effects of immunoglobulins on the connective permeability of human dentine in vitro. *Arch Oral Biol.* 1997;42(12):835-843.
- Hancock HH III, 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):579-586.
- Haqqi TM, Sarkar G, David CS, Sommer SS. Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(24):11844.
- Haselden G. Cryogenic fundamentals. Academic Press New York. 1971.
- Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Evaluation of three different forward primers by terminal restriction fragment length polymorphism analysis for determination of fecal *Bifidobacterium* spp. in healthy subjects. *Microbiol Immunol.* 2004;48(1):1-6.
- Hayden RT. In vitro nucleic acid amplification techniques. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, editors. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice.* 1st Ed., Washington, DC: ASM Press. 2004;43-69.
- Heggendorn FL, Gonçalves LS, Dias EP, Heggendorn C, Lutterbach MT. Detection of sulphate-reducing bacteria and others cultivable facultative bacteria in dental tissues. *Acta Stomatol Cro.* 2012;48(2),116-122.
- Hong BY, Lee TK, Lim SM. Microbial analysis in primary and persistent endodontics infections by using pyrosequencing. *J Endod.* 2013;39(9):1136-40.
- Hoshino E. Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *J Dent Res.* 1984;64(10):1195.
- Hossain H, Ansari F, Shulz-Weidner N, Wetzel WE, Chakraborty T, Domann E. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(5):302-308.

- Huang X. On global sequence alignment. *Comput Appl Biosci*. 1994;10(3):227-235.
- Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Mark Welch D, Relman DA, Sogin ML. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet*. 2008;4(11):e1000255.
- Hsiao WL, Li KL, Jones C, Fraser-Liggett CM, Fouad AF. Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics*. 2012;13(1):345-360.
<http://www.eartmicrobiome.org/emp-standard-protocols>, 2016.
- <http://www.454.com/products/gs-flx-system>, 2016.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/bioinformatics>, 2016.
- <http://www.ucmp.berkeley.edu/archaea/archaea.html>, 2016.
- <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/publication.pdf>, 2016.
- Hugenholtz P ve Pace NR. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. 1996;14(6):190-197.
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-214.
- Izumi T, Yamada K, Inoue H, Watanabe K, Nishigawa Y. Fibrinogen/fibrin and fibronectin in the dentin-pulp complex after cavity preparation in rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;86(5):587-591.
- Jarrell KF, Ding Y, Nair DB, Siu S. Surface appendages of archae: structure, function, genetics and assembly. *Life*. 2013;3(1):86-117.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 2005;13(12):589-595.
- Jiang YT, Xia WW, Li CL. Preliminary study of the presence and association of bacteria and archaea in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 2009;42(12):1096-1103.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk J, McGinnis A, Madden TL. NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(4):5-9.
- Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965;20(3):340-349.

- Kalaycıoğlu AT. Nükleotit dizilerinin aminoasit formatına dönüştürülmesi ve dünya veri tabanlarındaki verilerle karşılaştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2013;19(2):359-363.
- Kamberi B, Bajrami D, Stavileci M, Omeragić S, Dragidella F, Kocani F. The antibacterial efficacy of Biopure MTAD in root canal contaminated with *Enterococcus faecalis*. *ISRN dentistry*, 2012.
- Kantz WE, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. *Arch Oral Biol.* 1974; 19(1):91-96.
- Karygianni L, Anderson AC, Tennert C, Kollmar K, Altenburger MJ, Hellwig E, Al-Ahmad A. Supplementary sampling of obturation materials enhances microbial analysis of endodontic treatment failures: a proof of principle study. *Clin Oral Invest.* 2015;19(2):319-327.
- Kapil V, Milsom AB, Okorie M, Maleki-Toyserkani S, Akram F, Rehman F. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension.* 2010;56(2):274-281.
- Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol.* 1960;1(4):304-320.
- Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(6):746.
- Klug SW, Cummings WR. *Concepts of Genetics*, Prentice Hall, New Jersey 2000; 745.
- Knutsson G, Jontell M, Bergenholtz G. Determination of plasma proteins in dentinal fluid from cavities prepared in healthy young human teeth. *Arch Oral Biol.* 1994;39(3):185-190.
- Kowalchuk GA, Stephen JR. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Rev Microbiol.* 2001;55(1):485-529.
- Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D, Knight R. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews.* 2012;13(1):47-57.
- Kumar PS, Griffen AL, Barton JA. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003;82(5):338-344.
- Langeland K, Rodrigues H, Dowden W. Periodontal disease, bacteria and pulp histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1974;37(2):257.
- Lederberg J, McCray AT. "Ome Sweet" Omics- a genealogical treasury of words. *Scientist.* 2001;15(7):8.

- Lee KN, Lee OY, Koh DH. Association between symptoms of irritable bowel syndrome and methane and hydrogen on lactulose breath test. *J Korean Med Sci.* 2013;28(6):901-907.
- Lepp PW, Brinig MM, Ouverney CC, Palm K, Armitage GC, Relman DA. Methanogenic archaea and human periodontal disease. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america.* 2004;101(16):6176-6181.
- Li H, Chen V, Chen Y. Herpesviruses in endodontic pathoses: association of Epstein-Barr with irreversible pulpitis and apical periodontitis. *J Endod.* 2009;26(1):695-677.
- Li Y, Hsiao WW, Nandakumar R. Analyzing endodontics infections by deep coverage pyrosequencing. *J Dent Res.* 2010;89(9):980-984.
- Liu Z, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acid Res.* 2008;36(18):e120.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012;doi:10.1155/2012/251364.
- Lleo MM, Bonato B, Tafi MC, Signoreto C, Boaretti M, Canepari P. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but nonculturable state. *J Appl Microbiol.* 2001;91(6):1095.
- Love RM. Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury. *Endod Dent Traumatol.* 1996;12(6):289.
- Love RM. *Enterococcus faecalis*- a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001;34(5):399-405.
- Love RM. The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(1):32-37.
- Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):171.
- Love RM. Microbiology of caries and dentinal tubule infection. In: Fouad AF, editor. *Endodontic Microbiology.* 1st Ed., Iowa, Wiley- Blackwell Inc. 2009;164-178.
- Lynch E, Beighton D. A comparison of primary root caries lesions classified according to colour. *Caries Res.* 1994;28(4):233-239.
- Maiwald M. Broad-range PCR for detection and identification of bacteria. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, editors. *Molecular Microbiology:*

- Diagnostic Principles and Practice. 1st Ed., Washington, DC: ASM Press. 2004;379-390.
- Matarazzo F, Ribeiro AC, Feres M, Faveri M, Mayer MP. Diversity and quantitative analysis of archaea in aggressive periodontitis and periodontally healthy subjects. *J Clin Periodontol*.2011;38(7):621-627.
- Maxam A, Gilbert W. A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(2):560-564.
- McCourt C, Maxwell P, Catherwood M, Salto-Tellez M. Validation of next generation sequencing technologies in comparison to current diagnostic gold standards for BRAF, EGFR and KRAS mutational analysis. *Cancer Res*. 2013;73:57.
- Meyer J, Michalke K, Kouril T, Hensel R. Volatilisation of metals and metalloids: an inherent feature of methanoarchaea? *Sys Appl Microbiol*. 2008;31(2):81-87.
- Metzker ML. Sequencing technologies- the next generation. *Nature*. 2009;11(1):31-46.
- Michalke K, Schmidt A, Huber B. Role of intestinal microbiota transformation of bismuth and other metals and metalloids into volatile methyl and hydride derivatives in humans and mice. *Appl Environment Microbiol*. 2008;74(10):3069-3075.
- Miller WD. *The micro-organisms of the human mouth*. Philadelphia: The S.S. White Dental Manufacturing Co. 1890.
- Miller WD. *An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp*. Dent Cosmos. 1894;36:505.
- Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol*. 2014;8(2):79-81.
- Molander A, Reit C, Dahlen G. Microbial status of root filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998;31(1):1-7.
- Moorer WR, Genet JM. Evidence for antibacterial activity of endodontic gutta-percha cones. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982;53(5):503-506.
- Moqbel NM, Ibrahima SM, Eid GE, Ibrahim HK. Effect of intracanal medicament gel materials separate and in combination in the elimination of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Tanta Dent J*. 2014;11(3):199-205.

- Moran MA. Metatranscriptomics: eavesdropping on Complex microbial communities. *Microbes*. 2009;4:329-335.
- Möller AJR. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies. Odontol Tidskr*. 1966;74(5):1-380.
- Möller AJR, Fabricius L, Dahlen G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res*. 1981;89(6):475.
- Moskow B. Calculus attachment in cemental separations. *J Periodontol*. 1969;40(3):125-130.
- Mullis KB, Ferre F, Gibbs RA. *The polymerase chain reaction*. Boston: Birkhauser, 1994.
- Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res*. 2002;81(11):761.
- Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod*. 1995;21(2):70.
- Nakajo K, Nakazawa F, Iwaku M. Alkali-resistant bacteria in root canal systems. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(6):390-394.
- Nasidze I, Quinque D, Li J, Li M, Tang K, Stoneking M. Comparative analysis of human saliva microbiome diversity by barcoded pyrosequencing and cloning approaches. *Anal Biochem*. 2009;391(1):64-68.
- Naval RR, Parande M, Sehgal R, Rao NR, Naik A. A comparative evaluation of 3 root canal filling systems. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111(3):387-393.
- Ng Y, 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):317-320.
- Ørstavik D, Kerekes K, Eriksen HM. The periapical index: a scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis. *Dent Traumatol*. 1986;2(1):20-34.
- Özok AR, Persoon IF, Huse SM, Keijser BJJ, Wesselink PR, Crielaard W, Zaura E. Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. *Int Endod J*. 2012;45(6):530-541.
- Pashley DH, Nelson R, Kepler E. The effects of plasma and salivary constituents on dentin permeability. *J Dent Res*. 1982;61(8):978-981.

- Paster BJ ve Dewhirst FE. Molecular microbial Diagnosis. Periodontol 2000. 2009;51(1):38-44.
- Patterson RC ve Watts A. Further studies on the exposed germ-free dental pulp. Int Endod J. 1987;20(3):112-121.
- Pawar R, Alqaied A, Safavi K, Boyko J, Kaufman B. Influence of an apical negative pressure irrigation system on bacterial elimination during endodontic therapy: a prospective randomized clinical study. J Endod. 2012;38(9):1177-1181.
- Peculiene V, Balciuniene I, Eriksen H, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root filled canals in a Lithuanian population. J Endod. 2000;26(10):593-595.
- Peculiene 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.
- Peculiene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Rutkunas V. Microorganisms in root canal infections: a review. Stomatologica. 2008;10(1):4-9.
- Pedersen RM, Holt HM, Justesen US. *Solobacterium moorei* bacteremia: identification, antimicrobial susceptibility, and clinical characteristics. J Clin Microbiol. 2011;49(7):2766-2768.
- Peters LB, van Winkelhoff Aji Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. Int Endod J. 2002;35(1):13.
- Petersson J, Carlstrom M, Schreiber O, Philipson M, Christoffersson G, Jagare A. Gastroprotective and blood pressure lowering effects of dietary nitrate are abolished by an antiseptic mouthwash. Free Radical Biology & Medicine. 2009;46(8):1068-1075.
- Petrosino JF, Highlanger S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. Clin Chem. 2009;55(5):856-866.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003;36(1):1-11.
- Prida DT, Saltzman J, Haynes M, Rohwer F, Davis-Long C, White 3rd RA. Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. The ISME Journal. 2012;6(5):915-926.
- Probst AJ, Auerback AK, Moissl-Eichinger. Archaea on human skin. Plos ONE. 2013;8(6):e65388.

- Quince C, Lanzen A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM, Sloan WT. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods*. 2009;6(9):639-641.
- Reeder J, Knight R. Rapid denoising of pyrosequencing amplicon data: exploiting the rank-abundance distribution. *Nat Methods*. 2010;7(9):668-669.
- Rickert U, Dixon C. The controlling of root surgery. *Proceeding of the 8th International Dental Congress, Paris, 1931; Section IIIa:15-22.*
- Robinson HBG, Boling LR. The anachoretic effect in pulpitis. *Bacteriologic studies. J Am Dent Assoc*. 1941;28:268.
- Rocas IN, Siqueira JF Jr, 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.
- Rocas IN, Jung IY, Lee CY. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root filled teeth in a South Korean population. *J Endod*. 2004;30(7):504-508.
- Rocas IN, Siqueira JF Jr. Detection of novel oral species and phylotypes in symptomatic endodontic infections including abscesses. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;250(2):279.
- Rocas IN, Siqueira JF Jr. Characterization of *Dialister* species in infected root canals. *J Endod*. 2006;32(11):1057.
- Rocas IN, Hulsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal treated teeth from a German population. *J Endod*. 2008;34(8):926.
- Rocas IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2008;46(11):3599-3606.
- Rodrigues-Valera F. Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environ Microbiol*. 2002;4(11):628-633.
- Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2001;39(9):3282.
- Ronaghi M, Nygren M, Lundeberg L, Nyren P. Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing. *Anal Biochem*. 1999;267(1):65-71.
- Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*. 2001;11(1):3-11.
- Sabeti M, Slots J. Herpesviral-bacterial coinfection in periapical pathosis. *J Endod*. 2004;30(2):69.

- Saboia-Dantas CJ, Coutrin de Toledo LF, Sampaio-Filho HR, Siquiera JF Jr. Herpesviruses in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(5):320.
- Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rocas IN, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(2):112.
- Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rocas IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(1):19.
- Sakamoto M, Siquiera JF Jr, Rocas IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(4):275.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001;8:46-51.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977;74(12):5463-5467.
- Santos LA, Siqueira JF Jr, Rocas IN. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PLoS One.* 2011;6(11):e28088.
- Sanz M, Lau L, Herrera D. Methods of detection of *Actinobacillus actinomyetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsthia* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol.* 2004;31(12):1034-1047.
- Sathorn C, Parashos P, Messer HH. How useful is root canal culturing in predicting treatment outcome? *J Endod.* 2007;33(3):220-225.
- Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiol.* 2008;8(1):79.
- Scott DA, Coulter WA, Lamey PJ. Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review. *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 1997;26(10):441-447.
- Schirrmeister JF, Liebenow AL, Braun G, Wittmer A, Hellwig E. Detection and eradication of microorganisms in root filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. *J Endod.* 2009;33(5):536-540.
- Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. As *Enterococcus faecalis*

- comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1984;34(1):31-34.
- Schuster SC. Next generation sequencing transforms today's biology. *Nat. Methods.* 2008;200(8):16-18.
- Schmalberger A, Schwinger F, Tebbe CC. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(8):3557-3563.
- Sedgley C, Nagel A, Dahlen G, Reit C, Molander A. Realtime quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod.* 2006;32(3):173.
- Sen BH, Safavi KE, Spanberg LS. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol.* 1997;42(7):513.
- Sen BH, Baksi G. Fungi in endodontic infections. In: Fouad AF, editor. *Endodontic Microbiology.* 1st Ed., Iowa, Wiley- Blackwell Inc. 2009;164-178.
- Senges C, Wrbas KT, Altenburger M, Follo M, Spitzmüller B, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Bacterial and *Candida albicans* adhesion on different root canal filling materials and sealers. *J Endod.* 2011;37(9):1247-52.
- Siqueira JF Jr, de Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996;22(6):674.
- Siqueira JF Jr. Tratamento das infecções endodônticas. Rio de Janeiro :MEDSI, 1997.
- Siqueira JF Jr. Aetiology of the endodontic failure: why well treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001;34(1):1-10.
- Siqueira JF Jr, Lima KC. *Staphylococcus epidermidis* and *staphylococcus xylosus* in a secondary root canal infection with persistent symptoms: a case report. 2002;28(2):61-63.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN, Lopes HP, Elias CN, de Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod.* 2002;28(11):770.
- Siqueira JF Jr, 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):168-172.
- Siqueira JF Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J.* 2003;36(7):453-460.

- Siqueira JF Jr, Rocas IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(6):363-368.
- Siqueira JF Jr, Barnett F. Interappointment pain: mechanisms, diagnosis, and treatment. *Endod Topics.* 2004;7(1):93.
- Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(5):632-639.
- Siqueira JF Jr, 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):85-89.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN, Cunha CD. Novel bacterial phylotypes in endodontic infections. *J Dent Res.* 2005;84(6):565-569.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3314-3318.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN, Baumgartner JC, Xia T. Searching for Archaea in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2005;31(10):719-725.
- Siqueira JF, Rocas IN. *Catonella morbi* and *Granulicatella adiacens*: new species in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(2):359-364.
- Siqueira JF Jr, Magalhaes KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod.* 2007;33(6):667-672.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN, Paiva SS, Guimaraes-Pinto T, Magalhaes KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(1):122-130.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN, Paiva SSM, Magalhaes KM, Guimaraes-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(4):266-269.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *J Oral Microbiol.* 2009;1-12.

- Siqueira JF Jr, Rocas IN. Microbiology and treatment of endodontic infections. In KN, Hargreaves, editor. Pathways of the Pulp 10th Ed., Toronto, Mosby Elsevier. 2011; 560-578.
- Siqueira JF Jr, Alves FR, Rocas IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. J Endod. 2011;37(11):1499-1503.
- Siqueira JF Jr, Fouad AF, Rocas IN. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. J Oral Microbiol. 2012;4:1-15.
- Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1997;30(5):297.
- Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo NJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. Int Endod J. 1997;30(2):91-95.
- Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. Oral Microbiol Immunol. 1986;1(1):48-57.
- Slots J, Sabeti M, Simon JH. Herpesviruses in periapical pathosis: an etiopathogenic relationship. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003;96(3):327.
- Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria?. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993;90(10):4384-8.
- Socransky SS, Smith, C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. Biotechniques. 1994;17(4):788-792.
- Souto R, Colombo AP. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. Arch Oral Biol. 2008;53(2):155-160.
- Stackebrandt E, ve Goebel DM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology. 1994;44(4),846-849.
- Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994;78(4):494.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006;32(2):93-98.

- Suau A, Bonnet R, Sutren M. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within human gut. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(11):4799-4807.
- Subramanian K, Mickel AK, Kumar AD. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod.* 2009;35(7):950-957.
- Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet Infectious Diseases.* 2001;1(2):101-114.
- Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps (Odontological Dissertation no.7), Umea, Sweden, 1976, University of Umea.
- Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992;18(9):427.
- Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78(4):522.
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(1):86.
- Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Top.* 2003;6(1):3-28.
- Sweet D, Hildebrand D. Recovery of DNA from human teeth by cryogenic grinding. *J Foren Sci.* 1998;43(6):1199-1202.
- Takehara Y, Yamaoka K, Sato EF, Yoshioka T, Utsumi K. DNA damage by various forms of active oxygens and its inhibition by different scavengers using plasmid DNA. *Physiol Chem Phys Med NMR.* 1994;26(3):215-226.
- Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. *Eur J Oral Sci.* 2004;112(6):523-529.
- Tang YW, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem.* 1997;43(11):2021-2038.
- Tanomaru FM, Silveira GF, Tanomaru JMG, Bier CS. Evaluation of the thermoplasticity of different gutta-percha cones and Resilon. *Aus Endod J.* 2007;33(1):623-626.
- Teixeira LM, Carvalho MG, Merquior VL, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Facklam RR. Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*,

- including strains isolated from human sources. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2778-2781.
- Tennen R, Setlow B, Davis KL, Loshon CA, Setlow P. Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by iodine, gluteraldehyde and nitrous acid. *J Appl Microbiol.* 2000;89(2):330-338.
- Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, Hellwig E, Al-Ahmad A. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod.* 2014;31(5):670-677.
- Timp W, Mirsaidov M, Wang J, Comer A, Aksimentiev A, Timp G. Nanopore sequencing: electrical measurements of the code of life. *IEEE Transactions on Nanotechnology.* 2010;9(3):281-294.
- Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(2):319–354.
- Tran K, Torabinejad M, Shabahang S, Retamozo B, Aprecio RM, Chen J. Comparison of efficacy of pulverization and sterile paper point techniques for sampling root canals. *J Endod.* 2013;39(8):1057-1059.
- Tronstad L, Asbjørnsen K, Døving L, Pedersen I, Eriksen HM. Influence of coronal restorations on the periapical health of endodontically treated teeth. *Dent Traumatol.* 2000;16(5): 218-221.
- Tronstad L, Sunde PT. The evolving new understanding of endodontic infections. *Endod Topics.* 2003;6(1):57-77.
- Tulsani SG, Chikkanarasaiah N, Bethur S. An in Vivo Comparison of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite and Biopure MTAD against *Enterococcus Faecalis* in Primary Teeth: A qPCR Study. *J Clin Ped Dent.* 2014;39(1):30-34.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett Cm, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project: a strategy to understand the microbial components of the human genetic and metabolic landscape and how they contribute to normal physiology and predisposition to disease. *Nature.* 2007;449(7164):804-810.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatkunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009;457(7228):480-484.
- Tzanetakis GN, Azcarate-Peril MA, Zachaki S, Panopoulos P, Kontakiotis EG, Madianos PN, Divaris K. Comparison of bacterial community composition

- of primary and persistent endodontic infections using pyrosequencing. *J Endod.* 2015;41:1226-1233.
- Urich T, Lanzen A, Qi J, Huson DH, Schleper C, Schuster SC. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. *PlosOne.* 2009;3:e2527.
- Vandana KE, Mukhopadhyay C, Rau NR, Ajith V, Rajath P. Native valve endocarditis and femoral embolism due to *Granulicatella adiacens*: a rare case report. *Braz J Infect Dis.* 2010;14(6):634–636.
- Van der Horst J, Buijs MJ, Laine ML, Wismeijer D, Loos BG, Crielaard W, Zaura E. Sterile paper points as a bacterial DNA-contamination source in microbiome profiles of clinical samples. 2013;41(12):1297-1301.
- Varshney RK, Nayak SN, May GD, Jackson SA. Next generation sequencing Technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends Biotechnol.* 2009;27(9):522-530.
- Vengerfeldt V, Spilka K, Saag M, Preem JK, Oopkaup K, Truu J, Mandar R. Highly diverse microbiota in dental root canals in cases of apical periodontitis (Data of Illumina sequencing). *J Endod.* 2014;40(11):1778-1783.
- Vertucci FJ. Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984;58(5):589-599.
- Vierstraete A. Next generation sequencing for dummies. Ghent University Department of Biology, 2012.
- Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2006a;44(4):1274-1282.
- Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J.* 2006b;39(6):484-492.
- Vianna ME, Holtgraewe S, Seyfarth I. Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease. *J Bacteriol.* 2008;190(10):3779-3785.
- Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. T-RFLP-based *mcrA* gene analysis of methanogenic archaea in association with oral infections and evidence of a novel *Methanobrevibacter* phylotype. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(5):417-422.

- Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *J Med Microbiol.* 2007;56(1):110-118.
- Vollard EJ, Clasener HA. Colonization resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1994;38(10):409-414.
- Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research.* 2013;69(1):137-143.
- Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo M. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J.* 1999;32(6):421.
- Wang QQ, Zhang CF, Chu CH. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int J Oral Sci.* 2012;4(1):19-23.
- Wantland WW, Wantland EM, Remo JW, Windquist DL. Studies on human mouth protozoa. *J Dent Res.* 1958;37(5):949-950.
- Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature.* 1990;345:63-65.
- Warnecke F, Hugenholtz P. Building on basic metagenomics with complementary Technologies. *Genome Biol.* 2007;8(12):231.
- Wescombe PA, Heng NC, Burton JP, Chilcott CN, Tagg JR. Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics. *Future Microbiology.* 2009;4(7):819-835.
- Wilson M. *Bacteriology of Humans: An Ecological Perspective.* 1st Edition, Malden, MA: Blackwell Publishing Ltd. 2008; 204-260.
- White RR, Janer LR, Hays GL. Residual antimicrobial activity associated with a chlorhexidine endodontic irrigant used with sodium hypochlorite. *Am J Dent.* 1999;12(3):148-150.
- Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *PNAS.* 1977;74(11):5088-5090.
- Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Sys Appl Microbiol.* 1985;6(2):143-151.
- Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987;51(2):221-271.
- Yang S, Lin S, Kelen GD, Quinn TC, Dick JD, Gaydos CA, Rothman RE. Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and

- identification to species level of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol.* 2002;40(9):3449-3454.
- Young G, Turner S, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Bacterial DNA persists for extended periods after cell death. *J Endod.* 2007;33(12):1417-1420.
- Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, Najjar FZ, Roe BA. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(16):5227-5236.
- Zakaria MN, Takeshita T, Shibata Y, Maeda H, Wada N, Akamine A, Yamashita Y. Microbial community in persistent apical periodontitis: a 16S rRNA gene clone library analysis. *Int Endod J.* 2015;48:717-728.
- Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Diseases.* 2012;18(2):109-120.
- Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. 2009;259(1):12.
- Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *PNAS.* 2009;106(7):2365-2370.
- Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review. *J Endod.* 2015;41(8):1207-1213.
- Zhu X, Wang Q, Zhang C. Prevalence, phenotype and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canal of patients with persistent apical periodontitis. *J Endod.* 2010;36(12):1950-1955.

EK: ETİK KURUL RAPORU



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/1136

25.07.2014

Sayın : Doç.Dr .Ebru ÖZSEZER DEMİRYÜREK

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Endodontik İnfeksiyonların Yeni Nesil Sekanslama Metoduyla Analizi** başlıklı OMÜ KAEK 2014/ 704 Karar nolu Endodonti çalışması nitelikli araştırma projeniz: Amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre 26.06.2014 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra *başlanmasına* oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Doç.Dr.A.Tevfik SÜNTER
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Başkan Yrd


T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

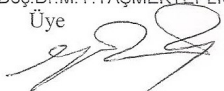
TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI	KARAR TARİHİ
25	2014/697-723(2014/705-695)	26.06.2014

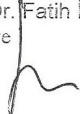
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 26.06.2014 tarihinde Doç.Dr.A.Tevfik SÜNTER

Başkanlığında toplandı

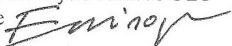
Prof.Dr.Abdulkerim BEDİR
Başkan MAZERETLİ



Doç.Dr.A.Tevfik SÜNTER
Başkan Yardımcısı



Doç.Dr.M.Y.TAŞMEKTEPLİGİL
Üye


Y. Doç. Dr. Fatih İLKAYA
Üye


Prf.Dr..Dr.Hulusi ATMACA
Üye MAZERETLİ


Y. Doç. Dr. İlyas EMİNOĞLU
Üye



Osman YUMBUL
Üye


Doç.Dr. Canan AKBAYRAK
Üye

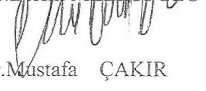

Prf..Dr. Fatma AYDIN
Üye MAZERETLİ



Doç.Dr.Emine SENTUNÇ
Üye


Prf.Dr.Cafer POLAT
Üye


Uz.Dr.Nuruллаh DİKMEN
Üye


Yrd.Doç.Dr.Berfin MELİKOĞLU
Üye


Yrd.Doç.Dr.Mustafa ÇAKIR
Üye


Yrd.Doç.Dr.Gülay AYDIN
Üye

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

ASLI GİBİDİR
Ali ÖZTÜRK
OMÜ Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Sekreteri

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Cangül KESKİN

Doğum Yeri: Samsun

Doğum Tarihi: 11.06.1988

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (ÜDS (2010)=96, YDS (2015)=91)

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Gülsüm Sami Kefeli İlköğretim Okulu, 1994-2002
Samsun Anadolu Lisesi, 2002-2006
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği
Fakültesi, 2006-2011

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği
Fakültesi Endodonti AD, 2011-

E-posta: canglkarabulut@gmail.com