

**İNSAN DİŞLERİNDE PERİAPİKAL HASTALIKLARA SEBEP OLAN
BAZI PATOJEN BAKTERİLERİN POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU VE *PORPHROMONAS GINGIVALIS*' İN EŞ ZAMANLI
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE NİCEL OLARAK TESPİTİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

İbrahim ARAZ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Şubat 2012

ÖZET

Akut apikal inflamasyon, periapikal dokularda hasara yol açan sınırlandırılmış veya yaygın likefaksiyon şeklinde olabilen lezyonlardır. Her ne kadar oluşan enfeksiyon bakterilere ve pulpada nekroz oluşturan iritan başka maddelere bağlı olabileceği ileri sürülse de mikroorganizmalar dişin pulpası ve periapikal dokuları ile ilgili hastalıklarda en önemli etiyolojik faktörler olarak kabul edilmektedir. Kanal içindeki bakteriler de periapikal lezyona sebep olabilir. Bu nedenle bakteriler kanal içinden ve kök kanal sisteminden uzaklaştırılmalıdır. Bu sayede tedavide başarı sağlanabilir. Kök kanalı içinde inflamasyona (abse) yol açan çok sayıda bakteri bulunmaktadır ve bu karışık flora hem aerobik hem de anaerobik mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Son yıllarda kök kanalı enfeksiyonları ve periapikal hastalıkların büyük çoğunluğundan anaerobik bakterilerin sorumlu olduğu rapor edilmektedir. Bu nedenle kanal içindeki aerob veya anaerob tüm mikroorganizmalar, kök kanal sisteminden uzaklaştırılmadığı sürece tedavide başarısızlıklar olabilecektir. Son yıllarda toplumumuzda uygunsuz antibiyotik kullanımı veya çoklu ilaç direncine sahip

mikroorganizmaların sayısında artış görülmesi nedeniyle özellikle inatçı ve tekrarlayan enfeksiyonlarda kanal içinde bulunan mikroorganizmaların türlerinin belirlenmesi, tedavi için gerekli antibiyotik seçimine karar verilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle enfekte alanlardan alınan örneklerin kültürünü yapılması gibi klasik, konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak mikroorganizma türünün tespit edilmesi gerekmektedir. Ancak ağız içi bakterilerinin çoğunun geç ve güç üreyen bakteriler olması, bir kısmının anaerob koşullarda inkübasyon sürelerinin uzun olması nedeniyle kültür yöntemi ile tespiti uzun zaman almaktadır. Bununla birlikte karışık floradan tür düzeyinde tanımlanması çok fazla besiyeri ve tanımlama kiti kullanımı gerektirdiği için masraflı ve zor olmakta, ayrıca her mikroorganizma türünün de *in vitro* kültürünün yapılabilmesi mümkün olamamaktadır. Bu çalışmada kök kanal enfeksiyonlarında en sık görülen bakterilerin tanımlanmasında hızlı, özgül ve güvenilir bir yöntem olarak kabul edilen ve karışık flora içinde bile hızlı tür tayinine imkân sağlayan polimeraz zincir yöntemi (PZR) ve mikroorganizmaların nicel değerlendirilmesinde kullanılan nicel eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) teknikleri uygulanmıştır. Materyal olarak pulpal ve periapikal enfeksiyon hastalıkları olan dişlerin kök kanalından aseptik şartlarda kültür örnekleri Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti bölümünde alınmıştır. Alınan örneklerin DNA izolasyonları yapılmış ve *Porphyromonas gingivalis* türü bakteri için tasarlanan 16S rRNA bölgesine özgü primerlerle PZR işlemi yapılmıştır. Daha sonra *Porphyromonas gingivalis* türü PZR pozitif olarak bulunan örneklerden eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) lightcycler 480 (Roche, İsviçre) ile nicel analizleri yapılmıştır.

Bilim Kodu : 203.1.105.Moleküler Hücre Biyolojisi
Anahtar Kelimeler : Moleküler Hücre Biyolojisi, Endodontal Mikroorganizmalar, Eş Zamanlı PZR
Sayfa Adedi : 56
Tez Yöneticisi : Prof.Dr. Leyla AÇIK

**DETECTION OF SOME PATHOGEN BACTERIA WHICH CAUSES
PERIAPICAL DISEASES AT HUMAN TEETH BY POLYMERASE
CHAIN REACTION AND QUANTITATIVE DETECTION OF
PORPHYROMONAS GINGIVALIS BY REAL TIME POLYMERASE
CHAIN REACTION**

(M. Sc. Thesis)

İbrahim ARAZ

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

February 2012

ABSTRACT

Acute apical inflammation which is a localized or defused liquefaction lesion has caused periapical tissue damage. Although it has been claimed that infections has become due to the bacteria and nonbacterial irritants as well dental pulp and periapical tissue infections, microorganisms has been accepted as the most important etiologic factors at these kind of infections. The presence of bacteria in the canal may cause periapical lesion, too. For this reason the bacteria must be removed from the interdental or the root canal system. So, the treatment will be successful. There are many bacteria existing in the root canal that may lead to inflammation (abscess) and this flora contains either aerobic or anaerobic microorganisms. It has been reported that anaerobic microorganisms were mostly responsible for the root canal infections and periapical diseases. Recently, because of the inappropriate usage of the antibiotic and the elevation in the number of multidrug resistant microorganisms in our society, there may be failures in the treatment if the aerobic and anaerobic bacteria couldn't be removed of the root canal. Especially for the resistant and recurrent infections,

type identifications of the microorganisms in the root canal shall be important for the antibiotic selection in treatment. Thus, classical, conventional microbiological methods such as culture are needed. But this will take time because of the fastidious and/or slowly growing bacteria and also some of them are uncultivable bacteria. Besides for identification of the species within a mix population/flora will be needed more media, chemical agents and identification kits. So this will take long time and cost will be higher. On the other hand, it was impossible to type every isolated strains by in vitro cultures. Polimerase chain reaction (PCR) is accepted as a rapid, specific, sensitive and reliable technique which enables identification of the species even among a mixed flora specifically. Real time PCR (qPCR) technique is a kind of PCR technique which gives a quantitative results besides typing the microorganisms. These techniques will be used in this study. Interdental samples taken from the patients aseptically from the root canal of the patients who has pulpal and periapical infections in Ankara University Faculty of Dentistry, Department of Endodontics. Then the bacterial DNA were isolated from the samples and amplification of the DNA samples with oligonucleotid primers targeted to the type specific region of 16S rRNA of *Porphyromonas gingivalis* strain in the study. Then electrophoresis of the PCR samples in agarose gel and imaging of them were done. The PCR products will be processed with the real time PCR technique by using species-specific oligonucleotide primers with a dye in 5'-3' in the lightcyler 480 quantitatively (Roche®, İsviçre).

Science code	: 203.1.105. Molecular Cell Biology
Key Words	: Molecular Cell Biology, Endodontic Microorganisms, Real Time PCR(qPCR)
Page Number	: 56
Adviser	: Prof.Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren Danışmanım Prof. Dr. Leyla AÇIK'a, örnekleri toplamama yardımcı olan Ankara Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti bölümü Öğretim Üyesi Doç.Dr. Semra SEVİMAY'a ve Araştırma Görevlisi Ayşegül TOLA'ya, yine kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Başkanı Yrd. Doç. Dr. Gülçin AKÇA'ya, manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli eşim Ebru AKYOL ARAZ' a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SEMBOL VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kök Kanal Hastalıkları.....	4
2.1.1. Kök kanal hastalıklarının sınıflandırılması.....	5
2.2. Kök Kanal Hastalıklara Sebep Olan Mikroorganizmalar.....	7
2.2.1. Bakterilerin sınıflandırılması.....	7
2.2.2. Enfekte kök kanalında bulunan mikroorganizmalar.....	9
2.2.3. Bu çalışmada kullanılan anaerop mikroorganizmalar.....	13
2.3. Mikroorganizmaların Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler.....	15
2.3.1. Kültür yöntemi.....	15
2.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	16
2.3.3. PZR çalışma şartlarını etkileyen faktörler.....	19

Sayfa

2.3.4. PZR'ın kullanım alanları.....	20
2.3.5. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.....	21
3. MATERYAL VE METOT.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kök kanal materyali	23
3.1.2. Tampon ve çözeltiler.....	24
3.2. Metot.....	26
3.2.1. Kök kanallarından örnek alınması	26
3.2.2. DNA izolasyonu.....	27
3.2.3. DNA yoğunluğunu ve saflığının ölçülmesi.....	28
3.2.4. PZR deneyleri.....	29
3.2.5. Eş zamanlı PZR deneyleri.....	32
4.BULGULAR.....	34
4.1. PZR Kullanılarak Bakteri Tür Tespiti.....	34
4.2. Eş Zamanlı PZR Sonucu Elde Edilen Bulgular.....	42
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	56

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Endodontik Enfeksiyonlarda Etken Olan Bakteriler	8
Çizelge 3.1. Bakteri Primer Dizileri.....	25
Çizelge 3.2. <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Actinomyces israelii</i> , <i>Prevotella nigrescens</i> , <i>Treponema denticola</i> PZR Programları	30
Çizelge 4.1. PZR Sonucu Örneklerde Saptanan Bakteri Türleri (Bakteri saptanan örnekler(+) ile bakteri saptanmayan örnekler ise(-) gösterilmiştir.).....	34
Çizelge 4.2. Örneklerdeki <i>Porphyromonas gingivalis</i> Kopya Sayıları.....	45

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Gerçekleşen Basamaklar	17
Şekil 4.1. <i>Porphyromonas gingivalis</i> Agaroz Jel Görüntüsü.....	37
Şekil 4.2. <i>Peptostreptococcus micros</i> Agaroz Jel Görüntüsü.....	38
Şekil 4.3. <i>Prevotella nigrescens</i> Agaroz Jel Görüntüsü	39
Şekil 4.4. <i>Treponema denticola</i> Agaroz Jel Görüntüsü	40
Şekil 4.5. <i>Actinomyces israelii</i> Agaroz Jel Görüntüsü	41
Şekil 4.6. Light Cyclers 480 Cihazın Kalibrasyon Çalışması.....	42
Şekil 4.7. Standart Eğrileri.....	43
Şekil 4.8. Çalışılan <i>Porphyromonas gingivalis</i> Örneklerinin Tm (Primerlerin Bağlanma Sıcaklığı).....	44
Şekil 4.9. Çalışılan Örneklerin Çoğalma Eğrileri.....	46

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Kullanılan Sıcaklık Döngüsü PZR Cihazı	29
Resim 3.2. Elektroforez Tankı ve Tabağı.....	31
Resim 3.3. Light Cycler 480 Eş Zamanlı PZR Cihazı.....	32
Resim 3.4. Light Cycler 480 Eş Zamanlı PZR Programı.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
bp	Baz çifti
gr	Gram
mM	Mili molar
Tm	Primerlerin bağlanma sıcaklığı
µl	Mikro litre
µM	Mikro molar
Kısaltmalar	Açıklama
A	Adenin
C	Sitozin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EIA	Enzim Immunoassays
ELISA	Antikorların Tanımlanması (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
FRET	floresans rezonans enerji transferi
G	Guanin
IF	İmmunofloresans
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo nükleik asit
rRNA	Ribozomal Ribo nükleik asit
T	Timin

1. GİRİŞ

Periapikal doku hastalıkları, dişlerin periapikal dokularında hasara yol açan nekrotik diş pulpasındaki mikrobiyal veya mikrobiyal olmayan iritanlara yanıt olarak oluşan, pulpa kaynaklı şiddetli bir iltihapsal yanıt, lokalize veya diffüz likefaksiyon lezyonlardır. Dişlerin kök kanalı içinde abseye yol açan çok sayıda bakteri bulunmaktadır ve bu karışık flora hem aerobik hem de anaerobik mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Yapılan araştırmalarda kök kanalı enfeksiyonları ve periapikal hastalıkların büyük çoğunluğundan anaerobik bakterilerin sorumlu olduğu görülmüştür.

Ancak anaerobik bakterilerin tanımlanması, geleneksel kültür yöntemleri kullanıldığında, 7-14 gün sürebilmektedir.

Son yıllarda anaerobik mikroorganizmaların tespit edilmesinde moleküler yaklaşımlar kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla kullanılan moleküler yöntemlerden günümüzde en sık kullanılanı 'Polimeraz Zincir Reaksiyonu'dur (PZR).

PZR dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. PZR genel olarak 3 aşamada gerçekleşir. DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligo nükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (primer bağlanması), sonra zincirin uzaması (polimerizasyon) (çift iplikli DNA'ların sentezi). Bu döngüler yaklaşık 35-45 kez belirli sayıda tekrarlanır. Bu üç adım (denatürasyon/primer bağlanması/DNA sentezi) bir PZR döngüsünü oluşturur. Her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşir [1].

Bu çalışmada kök kanal enfeksiyonlarında en sık görülen bakterilerin tanımlanmasında hızlı, özgül ve güvenilir bir yöntem olarak kabul edilen ve karışık flora içinde bile hızlı tür tayinine imkan sağlayan polimeraz zincir yöntemi (PZR) ve mikroorganizmaların nicel değerlendirilmesinde kullanılan eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) teknikleri uygulanmıştır. Materyal olarak periapikal enfeksiyon hastalıkları olan dişlerin kök kanalından aseptik şartlarda alınan örnekler kullanıldı. Örnekler Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti kliniğine başvuran hastalardan alınmıştır. Alınan örneklerin DNA izolasyonları yapılmış ve *Porphyromonas gingivalis* türü bakteri için tasarlanan 16S rRNA bölgesine özgü primerlerle PZR işlemi yapılmıştır. Daha sonra *P. gingivalis* türü PZR pozitif olarak bulunan örneklerden eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) (lightcycler 480, Roche, İsviçre) ile nicel analizleri yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Baumgartner'a göre, ilk kez 1890 yılında pulpa hastalığı ile bakteri varlığı arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür [2].

1965 yılında yapılan bir çalışmada, bakterilerin pulpal ve periradiküler hasara neden oldukları kanıtlanmış olup, bu çalışmada pulpaları ekspozite edilen farelerde mikroorganizma bulunmadığında kendi kendine iyileşme gözlenirken, mikroorganizma varlığında pulpa nekrozu ve periradiküler lezyon oluşumu saptanmıştır [2].

Pulpa ve periapikal enfeksiyonlar polimikrobiyaldir ve endodontik enfeksiyonlardaki bakterilerin çoğu anaerobiktir. 1970'den önce kültür yöntemlerindeki zorluklar nedeniyle endodontik enfeksiyonlardan yalnızca birkaç tür izole edilebilmekteydi. Kültür yöntemlerindeki gelişmeyle, endodontik enfeksiyonlarda, apikal lezyonla ilişkili her enfekte kanal başına saptanabilen mikroorganizma sayısı 12'ye ulaşmıştır. Enfekte kök kanallarındaki bakteri sayısı ile periradiküler radyolüsensilerin boyutu arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır [3].

2.1. Kök Kanal Hastalıkları

Kök kanal enfeksiyonu terimi ile ifade edilen hastalık, bakterilerin pulpayı tamamen istila ettiği, pulpada kan dolaşımının tamamen durduğu, periapikal dokuların da olaya iştirak ettiği, anaerob bakterilerin hakim olduğu, kronikleşme eğiliminde olan bir enfeksiyondur. Pulpitis ile başlar, periapikal periodontitis ile önce akut sonra kronik olarak devam eder. Tedavi edilmezse iyileşmez [4].

Periapikal iltihaplar her zaman akut bir safha ile başlamazlar. Akut bir başlangıç bulunabileceği gibi, önce şiddet ve frekansı küçük irritasyonlar ile kronik başlayan ve sonradan akutlaşabilen bir durumda izlenebilir. Ancak kronik iltihapların klinik bakımdan sessiz olması, hastanın hekim tarafından çoğunlukla akut aşamada görülmesine ve böylece periapikal iltihapların çoğunlukla akut başladığı izlenimi alınmasına neden olur [5].

Çeşitli bağ dokusunun birlikte bulunduğu bu alanlardaki iltihaplanmalar tedavi edilmediği takdirde apseleşme aşamasına kadar gelinebilir. Bu apseler akut olabildikleri gibi, bir fistül ile ağız içine açılarak veya organizmanın rezorptif faaliyetleri ile de kronikleşebilir [5].

Kök kanal hastalıkları klinik bulgularına ve histolojik durumlarına göre akut apikal periodontitis, kronik apikal periodontitis, akut apikal apse, kronik apikal apse, kondensing osteitis olarak sınıflandırılır [6].

2.1.1. Kök kanal hastalıklarının sınıflandırılması

Akut apikal periodontitis

Akut apikal periodontitis genellikle devital pulpadan kaynaklanan apikal periodonsiyumun akut enflamasyonu olarak tanımlanır. Kök kanal sisteminin enfeksiyonu veya travmatik yaralanmalar yolu ile ortaya çıkan nekrotik dokular ve ürünler periradiküler dokuların enflamasyonuna neden olabilir [7].

Kronik Apikal Periodontitis

Kronik periapikal enflamasyonda, kök kanalı içerisindeki bakteri ve konak cevabı arasında denge bulunmaktadır. Eğer bu denge bozulursa, akut iltihabi reaksiyon şiddetli semptomlarla gelişir [8].

Bu iltihabi reaksiyonlar farklı faktörlerin lokal olarak üretimi sonucu veya immun reaksiyonun bir sonucu olarak kendi kendine oluşmaktadır.

Plimorf nüveli lökositlerin birikimi sonucu iltihabi eksuda ile bağlantılı olan likefaksiyon nekrozu oluşur. Bu bölgede bakteri kolonileri, nekrotik doku kalıntıları, antijen, ekzotoksin, endotoksin ve çeşitli bakteriyel enzimler vardır [5].

Kronik apikal periodontitis dental veya periapikal granuloma olarak adlandırılabilir.

Akut apikal apse

Periapikal bağ dokusunun ileri eksudasyonu ve lökosit infiltrasyonu bulunan periapikal bağ dokusunun semptomatik iltihabi reaksiyonudur. Akut apikal periodontitisin komşu kemiğe genişlemesi akut apikal apseye neden olur [6].

Kronik apikal apse

Pulpal irritanlara karşı periapikal bağ dokusunun uzun süreli ve düşük yüzeyli iltihabi reaksiyonudur. Parulis ve fistül ağzından drenaj ile karakterlidir. Kronik apikal apse kronik apikal periodontitisden veya periapikal granülom içine kanal irritanlarının devamlı geçişi ile veya akut periapikal abseden gelişir. Fistül ağzı koagülüm veya epitelyal gelişim ile tıkanığında hafif ağrılı semptomlar oluşur. Bu semptomik evrede subakut apikal apse düşünülebilir. Kronik apikal apsede histolojik olarak oluşan bölgeler apeks çevresindeki pü bulunması dışında periapikal granülomlarla karıştırılabilir. Eksudatif bölgede çok sayıda nötrofilik lökositler vardır. Fistül çoğunlukla granümatöz dokuyla çevrilidir, fakat stratifiye skuamöz epitelle de sınırlı olabilir [6].

Kondensing osteitis (Pulpoperiapikal osteoskleroz)

Düşük düzeyli ve uzun süreli pulpal irritasyona karşı periapikal kemiğin produktif bir tepkisi olarak kemik yoğunluğunda artma olur. Bu durum minarellerin yoğunluklarının artmasından dolayı değil, osteoblastik hiperaktiviteden dolayıdır. Kemik trabeküllerinin kalınlığı artar ve kemik iliği boşlukları ortadan kalkar. Birim alandan daha fazla kemik dokusu vardır. Daha çok gençlerde kronik iltihaplı alt azı dişlerde görülür. Kök kanal tedavisini takiben normal trabeküler yapı tekrar kazanılır [6].

2.2. Kök Kanal Hastalıklarına Sebep Olan Mikroorganizmalar

Genel olarak bakteriler aerob, fakültatif anaerob ve zorunlu anaerob olarak sınıflandırılırlar. Aerob bakteriler, üremeleri için oksijene ihtiyaç duyarlar. Fakültatif anaerob bakteriler, üremelerini artırmak için oksijen kullanırlar ancak oksijen eksikliğinde de üreyebilirler. Zorunlu anaerob bakteriler ise sadece oksijen yokluğunda üreyebilirler [9].

Kök kanalına ulaşabilen, periapikse girebilen ve hastalık yapabilen mikroorganizmaların büyük çoğunluğu bakterilerdir. Bu bakterilerin büyük bir bölümü ise anaerobiktir. Bu nedenle endodontik mikrobiyoloji, büyük ölçüde anaerobik bakteriyoloji üzerine kuruludur [10].

2.2.1. Bakterilerin sınıflandırılması

Klinik diş hekimliğinde bakteriyel taksonomi ve sınıflandırma oluşturulması önemlidir. Bunun iki önemli sebebi vardır; birincisi odontojenik enfeksiyonların etyoloji ve patogenezinin anlaşılmasını sağlar. İkincisi ise ortamda bulunan mikroorganizmaya göre tedavi seçenekleri değişebileceğinden, inatçı enfeksiyonlarda hangi bakteri türlerinin etken olabileceğinin bilinmesi önemlidir.

Çizelge 2.1.'de Endodontik enfeksiyonlarda etken olan bakteriler verilmiştir [11].

Çizelge 2.1. Endodontik enfeksiyonlarda etken olan bakterilerin sınıflandırılması

Gram – Koklar	Gram – Çubuklar	Gram + Koklar	Gram + Çubuklar
Anaerobik Bakteriler			
<i>Veillonella</i>	<i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Bacteroides</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Campylobacter</i> <i>Selenomonas</i> <i>Treponema</i>	<i>Peptostreptokoklar</i>	<i>Eubacterium</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Actinomyces</i>
<i>Fakültatif ve aerobic bakteriler</i>			
<i>Neisseria</i>	<i>Actinobacillus</i> <i>Haemophilus</i> <i>Eikenella</i> <i>Capnocytophaga</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Escherichia</i> <i>Citrobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Xantomonas</i> <i>Proteus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Gemella</i> <i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcus</i>	<i>Propionibacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Actinomyces</i> <i>Bacillus</i> <i>Corynebacterium</i>

2.2.2. Enfekte kök kanalında bulunan mikroorganizmalar

Ağız boşluğu, nazofarenks ve gastrointestinal kanaldaki herhangi bir mikroorganizma, pulpa veya kök kanalını enfekte edebilir. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre enfekte kök kanallarından en sık izole edilen mikroorganizmalar; Alfa Hemolitik Streptokoklar, Gamma Hemolitik Streptokoklar ve Enterokoklardır. *Staphylococcus aureus* ve Beta Hemolitik Streptokoklara daha az oranda rastlanmıştır [9,12,13].

Streptococcus cinsi

Gram pozitif, yuvarlak veya oval şekilli, sporsuz, genellikle hareketsiz, aerob veya fakültatif anaerob olan Streptokoklar uzun zincirler yapmalarına rağmen bazen ikişer ikişer veya kısa zincirler halinde de görülebilirler. Pek çok çalışmada Alfa Hemolitik Streptokokların enfekte kök kanallarında bulunan mikroorganizmalar olduğu bildirilmiştir [14].

Bu grupta *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sangius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus milleri* sayılabilir. *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus salivarius* ise enfekte kök kanal florasında en sık bulunan iki türdür. Bu mikroorganizmalar ortamda bulunan oksijeni tüketerek anaerob patojen bakterilerin üremesini artırır [15,16].

Sıklıkla izole edilen diğer bir grupta genellikle sindirim sisteminde bulunan, bu sebeple enterokok olarak bilinen *Streptococcus faecalis* (*Enterococcus faecalis*)'tir [17].

Bu mikroorganizma düşük virülansa sahip olmakla beraber patojendir. Kök kanallarında sık rastlanır ve antimikrobiyal ajanlara dirençli olduğu için ortadan kaldırılmaları oldukça güçtür. Patojenitesi yüksek olan beta hemolitik streptokoklar ve daha düşük patojeniteye sahip olan non-hemolitik streptokoklar da daha az sıklıkla olmakla beraber kök kanal kültürlerinde ayırt edilmektedirler [16].

Staphylococcus cinsi

Gram pozitif, yuvarlak, hareketsiz, sporsuz, aerob bakterilerdir. Stafilokoklar normal ağız florasında sıklıkla bulunmalarına rağmen kök kanal enfeksiyonlarında çok önemli değildirler. *Staphylococcus aureus* patojendir ancak endodontik kültürde düşük oranda izole edilmektedir. Antiseptik ve dezenfektanlara ise oldukça dirençlidir [16].

Actinomyces cinsi

Gram pozitif, dallanan, filaman şeklindeki anaerob veya fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. Geçmişte bunların mantarlarla bakteriler arasında yer aldıkları düşünülmüştür. Bugün ise hücre duvarı bileşeni ve penisiline hassasiyet gibi birçok bakımdan mantarlardan çok bakterilere daha yakın oldukları bilinmektedir. *Actinomyces israelii*, sıklıkla derin çürük lezyonlarında bulunmakla beraber konvansiyonel endodontik tedavi ve uzayan antibiyotik tedavisine cevap vermeyen ve tedavinin tamamlanması için cerrahi müdahaleye gereksinim duyulan inatçı periapikal enfeksiyonlardan izole edilebilmektedirler [16,18].

Bacteroides cinsi

Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, zorunlu anaerop, pleomorfik çubuklardır. Üremesi için ortamda kan ve K vitaminine ihtiyaç duyan, yavaş üreyen bir organizmadır. Melanin üretmesine bağlı olarak siyah koloniler oluşturur. Patojenitesine yardım eden kollogenaz gibi hidrolitik enzimler yanında başka bakteriler için toksik olan amonyak ve hidrojen sülfid oluşturur [10].

Porphyromonas ve *Prevotella* cinsi

Endodontik enfeksiyonlarda %30 ila %50 oranında sıklıkla izole edilen, siyah pigmentli bakteri türleri daha önceleri *Bacteroides* cinsi içinde yer alırken, son yıllarda asakkarolitik olan türleri *Porphyromonas* adı altında ayrı bir cins olarak yeniden sınıflandırılmıştır. Bunlar *Porphyromonas asaccharolyticus*, *Porphyromonas gingivalis* ve *Porphyromonas endodontalis*'tir [19].

Sakkarolitik olan siyah pigmentli bakteriler ise *Prevotella* olarak isimlendirilmiştir. Bunlar ise *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella intermedia* ve *Prevotella corporis*'tir. *Porphyromonas gingivalis* ve *Porphyromonas endodontalis* sadece akut enfeksiyonlarda izole edilirken, *Prevotella intermedia* hem semptomatik hemde asemptomatik enfeksiyonlarda bulunmaktadır [20,21].

Yapılan çalışmalarda; *Prevotella intermedia* soyunun, *Prevotella nigrescens* olarak ayrı bir tür içerdiği ve *Prevotella nigrescens*'in endodontik orijinli enfeksiyonlarda daha sık izole edildiği bildirilmiştir [22,23].

Peptostreptococcus cinsi

Anaerop streptokoklar Peptostreptokok olarak adlandırılır. Yüksek oranda proteolitik olmaları ve pulpa nekrozu halinde tipik olan düşük oksijenli ortamda üreme kabiliyetine sahip olmaları patojenitelerinde önemli rol oynamaktadır [24].

Peptococcus cinsi

Anaerop stafilokoklar Peptokok olarak adlandırılır. Periapikal enfeksiyonlarda Bakteriodes türleri ile birlikte izole edildikleri bildirilmiştir. Bu organizmaların kombinasyonu kronik periapikal lezyonları alevlendirmektedir [24].

Bifidobacterium cinsi

Gram pozitif, hareketsiz, dallanabilen, zorunlu anaerob çomaklardır. Ortamda fazla CO₂ bulunduğunda O₂'i daha fazla tolare eder. Hücre lipidlerinde poligliserol ve fosfolipitler bulunur. Bunlar konak doku için toksiktir. Derin dentin çürüklerinde izole edilebilir. Kök kanalında pek sık olmamakla birlikte bulunabilecek Bifidobakteriumlar şunlardır: *B.bifidum*, *B.dentium* [10].

Spirochaete cinsi

Endoplazmik flajelli, hareketli bakterilerdir. İki aileye ayrılırlar. Birinci ailede Spiroket, Treponema, Cristispira ve Borrelia cinsleri bulunur. İkinci ailede sadece Leptospira cinsi bulunur. Enfekte kök kanalına girebilen spiroketler; *T.macrodentium*, *T.minutum*, *T. orale*, *T.paraluiscuniculi*, *T.refringes*, *T.scoliodontum*, *T.vincentii*'dir [10].

2.2.3. Bu çalışmada kullanılan anaerop mikroorganizmalar

Peptostreptococcus micros

Ağız, üst solunum yolu bağırsak, vajen ve derinin normal florasında bulunan anaerop bakteridir. Özellikle yumuşak doku apselerinden izole edilirler. Ayrıca ağız patolojisinde predominant anaerop kok olarak rol oynar. İlerleyeci tip periodontit ve endodontik apselere sebep olurlar [24].

Prevotella nigrescens

Gram negatif anaerob bir basildir. Bu bakteri tüm mukoza yüzeylerinde, özellikle tonsil ve dil kriptlerinde, diş plaklarında, diş eti yarıklarında ve gastrointestinal sistemde normal flora elemanı olarak bulunurlar. Kök kanal enfeksiyonlarında %16.7 oranında da *P. gingivalis* ve *P. endodontalis* gibi bakterilerle beraber bulunmaktadır. Piyore ve gingivit gibi peridontal hastalıklarda diğer anaerop gram negatif basillerle birlikte önemli rol oynarlar [10,25].

Porphyromonas gingivalis

Fermantasyon yapmayan, siyah pigmentli zorunlu gram negatif bir anaerob roddur. Boyutları 0.5 µm-1.2 µm arasındadır ve kokobasil görünümündedir. *P.gingivalis*, birincil ekolojik ortamı ağız kavitesinde bulunan önemli bir periodontal patojendir. Çoğunlukla subgingival bölgelerde ve dişeti oluğunda bulunur; dil ve tonsillerden de izole edilebilmektedir. Daha çok periodontal sorunlu dişlerin periodonsiyumlarında rastlanılsa da, son yıllarda yapılan moleküler mikrobiyolojik çalışmalar *P.gingivalisin* enfekte kök kanalının da başlıca patojenlerinden biri olduğunu göstermiştir. *P.gingivalis*, kök kanalındaki karışık anaerobik floranın bir üyesidir. Özellikle abseli dişler ve semptomatik periradiküler lezyonlardan izole edilebilmektedir [26].

Actinomyces israelii

İnsanlarda ağız boşluğunda (tonsillalar, dişler), gastrointestinal sistemde (apendiks, kolon) ve genital bölgede normal flora üyesi olarak bulunan, nadiren hastalığa neden olan anaerobik gram pozitif bir bakteridir [27].

Actinomikoz olguların yarısı servikofasiyal bölgede görülen infeksiyonlardır. Bu olguların da çoğunluğu ağızda ve mandibulada infeksiyon şeklinde görülür. Oral kavitenin iyatrojenik travmalarını veya cerrahi operasyonları takip eden birkaç hafta veya ay sonra enfeksiyon gelişmesini takiben periodontit veya kök kanal infeksiyonlarına yol açabilmektedir. Ayrıca *A.israelii* diğer fakültatif anaerob ve mikroaerofil bakterilerle beraber nekrotik pulpit, periapikal abselerde sıklıkla görülen bakterilerdendir [28].

Treponema denticola

Treponema denticola gram (-), hareketli, asakkarolitik, spiral şekilli anaerobik bir spirokettir. *Treponema denticola*nın virülans faktörleri flagellum (kamçı), endotoksin (lipopolisakkarit), proteinaz enzimleri, major kılıf proteini (Msp)'dir. *Treponema denticola*nın dış zarı diğer gram (-) bakterilere benzerken, dış membrandaki lipid kompozisyonu gram (+) bakterilere (lipoteikoik asit tabakasının bulunması nedeniyle) benzemektedir [29].

T.denticola periradiküler abse patogenezinde *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* gibi kırmızı kompleks grubundaki bakterilerle beraber bulunmaktadır [30].

2.3. Mikroorganizmaların Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

Mikroorganizmaların (bakterilerin) cins ve türlerini ayırmada Mikroskopi, Gram Boyama, Kültür Teknikleri (Aerobik ve Anaerobik Teknikler), Immunolojik Testler [İmmunofloresans (IF), Enzim Immunoassay (EIA), Latex Aglutinasyon, Immunodot/Blot, Flow Sitometri, Enzyme-linked Immunosorbent Assay], Moleküler Testler [Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), DNA-DNA Hibridizasyon] gibi yöntemler kullanılmaktadır.

2.3.1. Kültür yöntemi

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan en yaygın yöntem kültür yöntemidir. Kültür işlemleri, mikroorganizmaların laboratuvar koşullarında üretilmesini esas almaktadır [2].

Bu teknik, bir örnek içerisindeki çok çeşitli bakteri türlerin tanımlanmasına izin vermektedir. Ancak kültür yönteminin bazı eksik yönleri bulunmaktadır [31].

- a)** Kültür yöntemleri, birçok mikroorganizmayı zor üretmekte veya hiç üretememekte, bu nedenle yanlış negatif sonuçlar doğurabilmektedir.
- b)** Çoğu zaman diagnostik bir sonuç almak için çok yavaş kalmaktadır.
- c)** Bakterilerin fenotipik özellikleri nedeniyle düşük özgüllüğe sahiptir ve bu nedenle mikrobiyal türlerin birbirinden ayrılmasında belirgin sınırlamaları bulunur.
- d)** Düşük sayıdaki ve zor üreyen mikroorganizmaları hesaplamada düşük duyarlılığa sahiptir.
- e)** Örneklerin taşınma tipine göre sonuçlar değişkenlik gösterebilir. Örneklerin taşınma ortamı anaerobik bakterilerin yaşamasına izin vermelidir.
- f)** Zaman alıcı ve pahalıdır [2,32].

2.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), *in vitro* koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PZR; basit, özgül ve hassas bir tekniktir. PZR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır [1,33].

DNA zincirinin açılması

Kalıp DNA 92-95 °C de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir [34,35].

Primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması

Reaksiyon sıcaklığının, 37-65 °C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir [36].

Primer uzaması

DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polymerase 72 °C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır [37].

PZR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır [35].

PZR optimizasyon

PZR teknolojisinin gelişmesiyle çok farklı PZR uygulamaları da ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, yeni PZR uygulamasının düzenli ve optimum bir şekilde çalışması için her laboratuarda yeniden ayarlanması gerekmektedir [35].

Eğer PZR şartları yeni PZR uygulaması için uygun bir şekilde yeniden ayarlanmazsa bazı problemlerle karşılaşılabilir [35,36,37].

Bu problemler; PZR dan beklenen ürün ya az alınır yada hiç alınmaz, primerlerin yanlış bağlanmasından dolayı özgül olmayan bantlar oluşabilir, primer-dimer oluşumu ortaya çıkabilir ve bu oluşumlar çoğaltma işlemini yavaşlatır, yeni sentezlenen DNA dizilerinde mutasyon veya istenilenden farklı diziler ortaya çıkabilir.

2.3.3. PZR çalışma şartlarını etkileyen faktörler

Enzim konsantrasyonu

Diğer PZR şartları optimum seviyede olduğu zaman 100 µl reaksiyon için önerilen *Taq* DNA polimeraz enzim yoğunluğu 1-2.5 ünedir. Fakat enzim gereksinimi kullanılan kalıp DNA veya primere göre değişebilir. Enzim yoğunluğu düşük olursa elde edilecek ürün (DNA) az olur. Enzim yoğunluğu yüksek olursa özgül olmayan bantlar ortaya çıkabilir [36,37,39].

Magnezyum konsantrasyonu

PZR uygulamalarında magnezyum (Mg) iyon yoğunluğunu ayarlamak önemlidir. Çünkü Mg yoğunluğu primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışmasını, kalıp DNA'nın açılma sıcaklığını, PZR sonucunda elde edilen DNA kalitesini, primer-dimer bağ oluşumlarını, enzim aktivitesi ve güvenilirliğini etkilemektedir. Ayrıca, *Taq* DNA polimeraz enziminin iyi bir şekilde çalışabilmesi için; kalıp DNA, primerler ve nükleotid bazları üzerinde serbest Mg iyonlarının bulunması gerekir. Bu yüzden 0.5-2.5 mM arasında Mg iyonlarının dNTP yoğunluğu içerisinde bulunması gerekmektedir [35,36].

Deoksinükleotid trifosfatlar (dNTPs)

Her bir deoksinükleotid (A, G, C, T) yoğunluğu 20- 200 µM arasında olduğunda genellikle PZR uygulamalarından iyi sonuç alınabilmektedir. Bu dört bazın yoğunluk içerisindeki oranı eşit olmalıdır. Başlangıç stok solüsyonu 10 mM kadar seyreltildikten sonra, küçük hacimlere ayrılarak 20 °C de saklanmalıdır. dNTP yoğunluğunun yüksek olması yeni sentezlenen DNA dizilerinde istenilenden farklı dizilerin hatalı olarak ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu yüzden mümkün olduğu kadar düşük yoğunlukta dNTP' leri kullanmak PZR özgüllüğünü ve güvenilirliğini artırmaktadır [35,36,40].

Diğer reaksiyon unsurları

PZR uygulamalarında genel olarak 10-50 mM arasında Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8.3-8.8) kullanılır. Bu tampon çözeltinin 20 °C de pH' sı 6.8 ile 7.8 arasında değişir. PZR karışımı içerisine 50 mM KCl ilave edilirse primer bağlanmasını kolaylaştırır. Fakat 50 mM' ın üzerindeki KCl veya 50 mM NaCl Taq DNA polimeraz aktivitesini engeller. Ayrıca, PZR solüsyonuna Jelatin (gelatin), bovine serum albümin veya Tween 20 deterjanı eklenirse enzimin daha iyi çalışmasına yardımcı olurlar. Fakat bu maddeler eklenmeden de PZR protokolleri çok iyi bir şekilde çalışabilmektedir [36,41,42].

2.3.4. PZR'ın kullanım alanları

PZR kalıtsal hastalıklarda hastanın ve taşıyıcının tanısında, prenatal tanıda, klinik örneklerde patojen organizmaların tanısında, Adli tıpta Onkogenezin araştırılmasında, problemlerin oluşturulmasında, klonlamada, gen ekspresyon araştırmalarında, DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında, bilinmeyen dizilerin tayininde, geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evriminin aydınlatılmasında, *in vitro* fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanmasında, DNA protein etkileşiminin araştırılmasında (footprinting) kullanılabilir [43].

2.3.5. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle, kısa sürede nicel sonuç verebilen bir PZR çeşididir. Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar; LightCyler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIO-RAD)'dır. LightCyler sisteminin uygulanmasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Syber green 1) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan Syber green 1 miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir [44,45,46].

Bu uygulamada, floresans artışı her zaman özgün çoğaltmayı göstermeyebilir. Çünkü, çift sarmal DNA'ya giren Syber green 1 ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin erime eğrisi analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü erime eğrisi değerine sahiptir. PZR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir [47].

Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca Syber green 1 boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak ampikonun T_m derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait T_m derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T_m derecesiyle karşılaştırılarak, PZR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir. LightCyler'in diğer bir uygulama şekli, hedefe özgül problemler kullanmaktır. Burada problemlerle testin özgüllüğü artırılmıştır. Problemlerden biri 3' ucundan floresans boyayla işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boyayla (acceptor dye) işaretlenmiştir. Problemler, hedef

amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır [48].

FRET (Fluoresance resonance energy transfer) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine, diğer bir ifadeyle PZR döngüsü süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır. TaqMan sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom (floresans veren) maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probu 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein= 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı (quencher) florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Proba hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her döngüde üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır [47,48].

Eş Zamanlı PZR, kısa sürede nicel sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan çoğalma esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren problemler kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir [49].

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kök kanal materyali

Bu tez çalışmasında enfekte kök kanallarından örnek almak için öncelikle Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan Etik Kurul Raporu alındı. Örnekler, Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı'na kök kanal tedavisi için başvuran ve yaş aralığı 18-70 arasında değişen 30 hastanın kök kanallarından alındı. Özellikle hastaların son üç ay içerisinde herhangi bir antibiyotik kullanmamış ve herhangi bir sistematik hastalığı olmamasına dikkat edildi.

3.1.2. Tampon ve çözeltiler

Örnek alırken kullanılan materyaller

- %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi
- % 2.5' lik sodyum hipoklorit ($NaOCl$)
- steril elmas fissür frez
- % 5'lik sodyum tiyosülfat
- steril salin çözeltisi
- 15 numaralı K tipi eğe
- Kağıt konlar

DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

- Proteinaz K
- AL Buffer
- Saf Ethanol
- AW1 Tamponu
- AW2 Tamponu
- AE Tamponu

PZR için kullanılan çözeltiler

- Taq polimeraz tamponu (10X) : 100 mM Tris-HCl (Ph 8,3), 500 mM KCL 1mg/ml jelatin
- $MgCl_2$: 25mM
- Nükleotit karışımı: 10mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- Taq polimeraz 5 u/µl
- Distile su
- Primerler: Kullanılan primer dizileri Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Bakteri primer dizileri

Bakteri tür adları		Oligonükleotid dizisi	
1	<i>Prevotella nigrescens</i>	F	5' ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG 3'
		R	5' CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A 3'
2	<i>Peptostreptococcus micros</i>	F	5' TCG AAC GTG ATT TTT GTG GA 3'
		R	5' TCC AGA GTT CCC ACC TCT 3'
3	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	F	5' AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG 3'
		R	5' ACT GTT AGC AAC AAC TAC CGA TGT 3'
4	<i>Treponema denticola</i>	F	5' TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T 3'
		R	5' TCA AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA 3'
5	<i>Actinomyces israelii</i>	F	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'
		R	5' CCA AAA CAC CAC AAA AGT GA 3'

Agoroz jel elektroforez için kullanılan materyaller

- % 2'lik agaroz jel: 2 gr agaroz 100 ml TAE tamponu içerisinde çözülerek hazırlandı.
- TAE tamponu (Tris asetat tamponu): 242 gr Tris base, 57,1 ml glisial asetik asit, 100 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) distile suda çözülerek hazırlandı.
- Yükleme tamponu: %40 sukroz, %0,025 bromfenol mavisi, %0,25 ksilen siyanol
- Etidyum bromür: 10mg/ml derişimde hazırlandı.

Eş zamanlı PZR’de kullanılan materyaller

- Distile su
- $MgCl_2$: 25mM
- Enzim (Taq polimeraz) + Tampon karışımı: 1a (Enzim) , 1b (Tampon)
1b’den 60 µl 1a’ya aktarılarak hazırlandı.
- Primerler: 20 µM.
- Problar: 20 µM

P. gingivalis Standartları: Gazi Diş Hekimliği Oral Mikrobiyoloji bölümünden alınan Saf *P. gingivalis* bakteri kolonisi DNA izolasyonu yapıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Kök kanallarından örnek alınması

Örnek alınacak dişler pomza ve su ile temizlendi. Sonra rubber-dam izolasyonu yapıldı. Diş kronu %3’lük hidrojen peroksit ve % 2,5’luk sodyum hipoklorit (NaOCl) ile dezenfekte edildi. Endodontik giriş kavileri steril elmas fissür frezlerle açıldı. Giriş kavitesi açıldıktan sonra pulpa odası % 2,5’luk sodyum hipoklorit ile yıkandı. Ardından bu çözeltinin % 5’lik sodyum tiyosülfat ile aktivasyonu giderildi. 15 numaralı K tipi eğe kullanılarak kök ucuna doğru girildi ve çalışma uzunluğu tespit edildi. Eğe ile kök kanalında çevirme ve hafifçe kazıma işlemi yapıldı. Kök kanalı kuru olduğu durumlarda az miktarda steril salin çözeltisi uygulandı. Kanala uygun kâğıt kon, eğe ile aynı seviyeye kadar yerleştirilip kanaldaki sıvıyı emmesi sağlandı. Bu işlem birkaç kez tekrarlandı. Herbir kâğıt kon kanal içerisinde birer dakika bekletildi. Örnek alma işleminden sonra kâğıt konlar steril ependorflara yerleştirildi. Tüpler, DNA izolasyonu öncesi -80 °C’ ye ayarlanmış derin dondurucularda depolandı ve bekletildi (Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı). Herbir hastanın bir dişinden örnek alındı ve toplamda 30 kanal örneği elde edildi.

3.2.2. DNA izolasyonu

Bu çalışmada DNA'larının izolasyonu için; QIAGEN QIA amp DNA Mini Kit (Lot No: 12694534, Kat No: 51306 Qiagen Sciences, Maryland, 20874, USA) doku ekstraksiyon kiti kullanıldı. Uygulamada üretici firmanın önerilerine sadık kalındı.

Toplanan kanal örnekleri 1,5 µl lik tüplere alındı. Üzerlerine 200µl AL tamponu ve 20µl proteinaz k ilave edildi ve tüpler 15 sn vortexlendi. Sonra tüpler 56 °C'de 10 dakika bekletildi. Sonra örnekler kit içinden çıkan filtreli mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 200 µl etanol eklenerek 8000 rmp de 1 dakika santrifüj edildi. Sonra alta kalan sıvı döküldü ve filtreli mikrosantrifüj yeni mikrosantrifüj tüpüne kondu. Sonra üzerine 500 µl AW1 tamponun'dan eklendi ve 8000 rmp de 1 dakika santrifüj edildi. Sonra yine alt mikrosantrifüj tüpü değiştirildi ve üzerine 500 µl AW2 tamponu eklendi 14000 rmp de 3 dakika santrifüj edildi. Son olarak filtreli tüp normal 1,5 µl mikrosantrifüj tüpüne kondu ve üzerine 200 µl AE tamponu eklenip 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonra 8000 rmp de 1 dakika santrifüj edildi. Bu son aşamadan sonra filtre içinde ki DNA alta ki mikrosantrifüj tüpünde toplandı ve DNA PZR da kullanılmak üzere -20 °C ye kaldırıldı.

3.2.3 DNA yoğunlugunu ve saflığının ölçülmesi

P. gingivalis DNA'sının molekül ağırlığı ve saflığı nano drop cihazı ile ölçüldü ve DNA'nın molekül ağırlığı 12,3 ng/μl, saflığı (260/280) ise 1,83 olarak bulundu. Daha sonra DNA'nın kopya sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı.

MA= Moleküler Ağırlık (g/mol) , 1 mol = 6×10^{23} molekül (kopya)

$$\text{Kopya miktarı/ml} = \frac{6 \times 10^{23} (\text{kopya/mol}) \times \text{Yoğunluk (g/}\mu\text{l)}}{\text{Moleküler Ağırlık (MA)}}$$

DNA'nın kopya sayısı $4,86 \times 10^7$ bulundu. Sonra bu DNA'dan 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 standartları hazırlandı.

Çizelge 3.2. *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces israelii*, *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola* PZR programları

TERMAL PZR PROGRAMLARI	
<i>Peptostreptococcus micros</i>	1- 94 °C 5 dakika 2- 94 °C 1 dakika 3- 55 °C 1 dakika 4- 72 °C 1.30 dakika 5- 72 °C 1 dakika
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1- 95 °C 2 dakika 2- 94 °C 30 saniye 3- 60 °C 1 dakika 4- 72 °C 2 dakika 5- 72 °C 10 dakika
<i>Actinomyces israelii</i>	1- 94 °C 1 dakika 2- 55 °C 1 dakika 3- 72 °C 2.30 dakika
<i>Prevotella nigrescens</i>	1- 94 °C 30 saniye 2- 95 °C 30 saniye 3- 55 °C 1 dakika 4- 72 °C 2 dakika 5- 72 °C 10 dakika
<i>Treponema denticola</i>	1- 95 °C 2 dakika 2- 95 °C 30 saniye 3- 60 °C 1 dakika 4- 72 °C 1 dakika 5- 72 °C 2 dakika

Light cycler 480 Eş zamanlı PZR cihazında *P. gingivalis* özgü yapılan program resim 3.4’de gösterilmiştir.

Programs

Program Name	enzim aktivasyonu						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0

Program Name	amplifikasyon						
Cycles	45	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
50	Single	00:00:15	2.20		0	0	0
72	None	00:00:25	4.40		0	0	0

Program Name	melting curve						
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:01	4.40		0	0	0
55	None	00:01:00	2.20		0	0	0
95	Continuous		0.11	5	0	0	0

Program Name	cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2.20		0	0	0

Resim 3.4. Light cycler 480 eş zamanlı PZR programı

4.BULGULAR

4.1. PZR Kullanılarak Bakteri Tür Tespiti

Periapikal apsesi olan 30 ayrı hastanın kök kanalından örnekler alındı. Örneklerin DNA'ları metotta belirtildiği gibi izole edildi. Daha sonra her bir DNA *P. micros*, , *P. gingivalis*, *A. israelii*, *P. nigrescens*, *T. denticola*, türlerine özgü primerlerle metotta belirtildiği gibi Polimeraz Zincir Reaksiyonuna tabi tutuldu. Çalışmamızdaki periapikal apse örneklerinde PZR sonucu tespit edilen bakteriler Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1.PZR sonucu bakteri saptanan örnekler(+) ile bakteri saptanmayan örnekler ise(-) gösterilmiştir.

Bakteri tür isimleri Örnek Numarası	<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	+	-	-	+
4	-	-	-	+	+
5	-	+	-	+	-
6	+	-	-	-	+
7	-	+	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	+	-	+
10	-	-	+	+	+

Çizelge 4.1. (Devam) PZR sonucu bakteri saptanan örnekler(+) ile bakteri saptanmayan örnekler ise(-) gösterilmiştir.

11	+	-	+	-	-
12	-	-	+	-	+
13	-	+	+	-	-
14	-	-	+	+	+
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	+	+
17	+	-	-	-	-
18	+	-	+	-	-
19	-	+	-	-	-
20	-	+	+	+	-
21	-	+	-	-	-
22	+	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-
24	-	-	-	+	+
25	-	+	-	-	-
26	-	+	-	-	-
27	-	+	-	-	-
28	-	+	-	-	-
29	+	-	-	-	-
30	-	-	+	+	-
Toplam (+) sayısı	6	11	9	8	9
(+) yüzdesi	%20	%36.6	%30	%26.6	%30

P. gingivalis bakterisine özgü primerlerle yapılan PZR sonucunda 240 bp büyüklüğünde DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 4.1) Çizelge 4.1'e göre toplam 30 adet örneğin 11 tanesinde *P. gingivalis* bakterisi pozitif bulunmuştur. *P. gingivalis* bakterisine rastlanma sıklığı %36.6 olarak hesaplanmıştır.

P. micros özgü primerlerle yapılan PZR sonucunda 404 bp büyüklüğünde DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 4.2) Çizelge 4.1'e göre toplam 30 adet örneğin 9 tanesinde *P. micros* bakterisi pozitif bulunmuştur. *P. micros* bakterisine rastlanma sıklığı %30 olarak hesaplanmıştır.

P. nigrescens özgü primerlerle yapılan PZR sonucunda 116 bp büyüklüğünde DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 4.3) Çizelge 4.1'e göre toplam 30 adet örneğin 9 tanesinde *P. nigrescens* bakterisi pozitif bulunmuştur. *P. nigrescens* bakterisine rastlanma sıklığı %30 olarak hesaplanmıştır.

T. denticola özgü primerlerle yapılan PZR sonucunda 516 bp büyüklüğünde DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 4.4) Çizelge 4.1'e göre toplam 30 adet örneğin 8 tanesinde *T. denticola* bakterisi pozitif bulunmuştur. *T. denticola* bakterisine rastlanma sıklığı %26.6 olarak hesaplanmıştır.

A. israelii özgü primerlerle yapılan PZR sonucunda 370 bp büyüklüğünde DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 4.5) Çizelge 4.1'e göre toplam 30 adet örneğin 6 tanesinde *A. israelii* bakterisi pozitif bulunmuştur. *A. israelii* bakterisine rastlanma sıklığı %20 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. Örneklerdeki *P. gingivalis* kopya sayıları

Hasta örnek numarası	<i>P. gingivalis</i> kopya sayısı
3	$3,48 \cdot 10^4$
5	$1,08 \cdot 10^3$
7	$3,29 \cdot 10^3$
13	$1,15 \cdot 10^4$
18	$5,08 \cdot 10^3$
19	$3,29 \cdot 10^3$
20	$1,75 \cdot 10^5$
21	$1,02 \cdot 10^5$
25	$2,68 \cdot 10^4$
26	$2,13 \cdot 10^4$
27	$1,50 \cdot 10^5$
28	$1,55 \cdot 10^4$

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Periapikal doku hastalıkları, dişlerin periapikal dokularında hasara yol açan nekrotik diş pulpasındaki mikrobiyal veya mikrobiyal olmayan iritanlara yanıt olarak oluşan, pulpa kaynaklı şiddetli bir iltihapsal yanıt, lokalize veya diffüz likefaksiyon lezyonlardır. Her ne kadar oluşan enfeksiyon bakterilere ve pulpada nekroz oluşturan iritan başka maddelere bağlı olabileceği ileri sürülse de mikroorganizmalar dişin pulpası ve periapikal dokuları ile ilgili hastalıklarda en önemli etiyolojik faktörler olarak kabul edilmektedir. Kanal içindeki bakteriler de periapikal lezyona sebep olabilir [6].

Enfekte kök kanalları hem aerobik hem de anaerobik mikroorganizmalar içeren karışık bir flora içerir. Ancak kök kanalı enfeksiyonları ve periapikal hastalıkların büyük çoğunluğundan anaerobik bakteriler sorumlu tutulmaktadır [50].

Bu nedenle endodontik mikrobiyoloji büyük ölçüde anaerobik bakteriyoloji üzerine kurulmaktadır. Pulpa ve periapikal doku hastalıklarından sorumlu olan mikroorganizmaların belirlenmesinde, kanalın doldurulmaya hazır olup olmadığının saptanmasında, temizleme ve ilaç tedavisine karşın dirençli ve ısrarlı bir enfeksiyonun giderilemediği durumlarda mikroorganizmaların ve bunların özgül olarak duyarlı bulundukları antibiyotik ve diğer ilaçların belirlenmesinde “kültür tekniğinden” yararlanılmaktadır. Ancak bu yöntemle zorunlu anaerob bakterilerin tespit edilebilme zamanı 9-10 gün gibi uzun süre almakta hatta 14 güne uzayabilmektedir [51].

Son yıllarda geliştirilen moleküler teknikler, mikroorganizmaların tespitinde kültür tekniklerine alternatif olarak görülmekte ve kültür tekniklerine göre daha hızlı ve daha hassas olması nedeniyle endodontik enfeksiyonların etiyopatogenezinin belirlenmesinde önem kazanmaktadır. Bu teknikler bakteri türlerinin belirlenmesinin yanısıra diğer teknikler ile üremesi zor veya imkânsız olan mikroorganizmaların tespitine de izin vermektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu son zamanlarda anaerobik

bakterileri içine alan birçok mikroorganizmaların tespitinde kullanılan moleküler tekniklerden biridir. PZR DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılması (denatürasyon) sentetik oligo nükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (primer bağlanması) sonra zincirin uzaması (polimerizasyon) (çift iplikli DNA'ların sentezi) şeklindedir. Bu döngüler yaklaşık 35-45 kez belirli sayıda tekrarlanması esasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon/primer bağlanması/DNA sentezi) bir PZR döngüsünü oluşturur. Her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşir [1].

Çalışmamızda henüz endodontik mikrobiyolojinin tespitinde yeni bir yöntem olan Polimeraz zincir reaksiyonu ile enfekte kök kanallarında bazı bakterilerin tespiti ve bu bakterilerden *P. Gingivalis*'in Eş zamanlı PZR ile nicel tayini yapılmıştır. Yapılan benzer çalışmalarda da kök kanalı enfeksiyonları ve periapikal hastalıkların büyük çoğunluğundan anaerobik bakterilere rastlanmıştır.

Siqueira ve Roças (2003) kültür yöntemleri ile belirlenmesi çok zor olan *Bacteroides forsythus*'un varlığını PZR yöntemi ile endodontik enfeksiyona sahip 50 dişten 26'sında saptamışlardır [52].

Siqueira ve Roças (2003) kök kanallarında *Troponema socranskii*'nin varlığını PZR yöntemiyle araştırmışlar, primer enfeksiyona sahip dişlerin % 35'inde bu mikroorganizmanın bulunduğunu bildirmişlerdir [53].

Siqueira ve Roças (2003) apse oluşumundan sorumlu olduğu düşünülen *Pseudoramibacter alactolyticus*'u 21 örnekte PZR metodu ile incelemiş ve vakaların % 70'inde saptamışlardır [54].

Siqueira ve Roças (2004) 22 adet tekrarlayan tedavi gerektiren vakada, % 77 oranında *Enterococcus fecalis*'e rastlamışlardır [55].

Siqueira ve Roças (2009) 42 yetişkin acil endodontik tedaviye ihtiyaç duyan akut apikal apseli hastalardan alınan pirulan aspiratlardan izole edilen bakteriyel DNA lar, spesifik problemler kullanılarak PZR ile tiplendirilmiştir. Sıklıkla tespit edilen bakterilerin; %64 oranında *Fusobacterium nucleatum*, %52 oranında *Parvimonas micra* (eskiden *Peptostreptococcus micros*), %48 oranında *Porphyromonas endodontalis*, %45 oranında *Olsenella uli*, %38 oranında *Streptococcii*, % 38 oranında *Eikenella corrodens*, % 36 oranında *Bacteroides clone*, %36 oranında *Prevotella baroniae*, %36 oranında *Treponema denticola*, %31 oranında *Dialister invisus* türleri bildirilmiştir [56].

Yang ve arkadaşları (2010) endodontik periapikal apseli pediatrik hasta grubunun PCR-DGGE (Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis), tekniği ile incelenmiş, tespit edilen bakterilerin sıklık sırasına göre *Prevotella* (%24), *Fusobacterium* (%17.7), *Porphyromonas* (%13.9), *Lactobacillus* (%11.3), *Peptostreptococcus* (%8.3), *Streptococcus* (%6.4), *Eubacterium* (%3.8), *Campylobacter* (%3.3), *Treponema* (%2.6), ve *Bulleidia* (%2.6) türlerinin olduğu tespit edilmiştir [57].

Montagner ve arkadaşları (2010) kök kanal enfeksiyonlarında *Treponema* türlerinin varlığı ve bulunma sıklıkları Nested PZR ile tespit edilmiştir. *T. socranskii*, *T. denticola*, *T. medium* ve *T. amylovorum* türleri olduğu bildirilmiştir [58].

Siqueira ve arkadaşları (2011) 9 akut, 8 kronik apse enfeksiyonlu bakteriyel tiplendirilmesinde akut apselerde en sık olarak *Firmicutes* ailesi(%52), %17 *Fusobacteria*, %13 *Bacteroidetes* türleri olmasına karşılık kronik enfeksiyonlularda yine dominant olarak *Firmicutes* ailesi(%59), %14 *Bacteroidetes*, %10 *Actinobacteria* türleri bildirilmiştir [59].

Buonavoglia ve arkadaşları (2011) 71 periapikal periodontitisli hastanın PZR tekniği ile 21 tanesinde periodontitis açısından kırmızı grupta yer alan bakteriler olduğu, bunların içinde de özellikle %19,7 *T.denticola*, %14.1 *T.forsythia* ve %8.5 *P. gingivalis* olarak rapor edilmiştir [60].

Son yıllarda yapılan bu çalışmalarda daha önce tespiti zor veya imkânsız olan mikroorganizmaların yeni metodlarla kolay biçimde tespit edildiği bildirilmiş ve bu mikroorganizmaların ne tür enfeksiyona sebep oldukları belirlenmeye başlanmıştır. Ancak nicel olarak yapılan araştırmalar çok fazla sayıda mevcut değildir.

Çalışmamızda bir çok araştırmada kullanılan PZR ve Eş zamanlı PZR teknikleri bazı mikroorganizmaların tespiti ve *P.gingivalis*'in nicel olarak tayininin yapılması sonucunda kök kanallarındaki hastalığa neden olan patojen bakterilerin kısa sürede tespiti, bu mikroorganizmaların ne tür enfeksiyonlara sebep olduklarını belirlenmesini ve kök kanal mikrobiyolojisinin daha çabuk değerlendirilmesi için fayda sağlanacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1- Mullis, K., “The unusual origin of the polymerase chain reaction”, *Scientific American*, 262:36-43 (1990).
- 2- Baumgartner, J.C., Hutter, J.W., Siqueira, J.F., “Endodontic Microbiology and Treatment of Infections” In: Cohen S, Hargreaves KM, editors, Pathways of the Pulp. 2nd ed. Canada, **Mosby Elsevier**, 580-607 (2006).
- 3- Bystrom, A., Happonen, R.P., Sjogren, U., Sundqvist, G., “ Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis” *Endod Dent Traumatol*, 3: 58-63 (1987).
- 4- Aydın M. “Endodontik Mikrobiyoloji Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji” *Güneş Yayınevi*, 24.109 (2004).
- 5- Çalışkan M.K., “Endodontide Tanı ve Tedaviler” *Nobel Kitapevleri* 125 (2006).
- 6- Alaçam, T., “Endodonti” 2. baskı. Ankara , *Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları*, 84-92-95-98 (2000).
- 7- Nair, P.N.R., “Pathobiology of the periapex” In Cohen S, Burns RC. Pathways of the pulp. 8th ed. St. Louis” *CV Mosby Co*, 457-500 (2002).
- 8- Nair, P.N.R., “Apical periodontitis” a dynamic encounter between root canal infection and host response, *Periodontology* 2000, 13:121-148 (1997).
- 9- Seltzer, S., “Endodontology: Biologic Considerations in Endodontic Procedures” 2nd ed. Philadelphia, *Lea and Febiger*, 326-344 (1998).
- 10- Aydın, M., “Endodontik Mikrobiyoloji” Alaçam T. ed. Endodonti 2. baskı. Ankara: *Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları*, 313-384 (2000).
- 11- Dahlen, G., Haapasalo, M., “Microbiology of apical periodontitis” In: Ørstavik D, Ford TRP, editors. Essential Endodontology Prevention and Treatment of Apical Periodontitis. 1st ed. Oxford: **Blackwell Publishing Company**, 106-130 (1998).
- 12- Morse, D.R., “Microbiology and pharmacology” Cohen S, Burns RC, editors. Pathways of the pulp . 2nd ed. St.Louis: The C.V. **Mosby Company**, 321-339 (1980).
- 13- Seltzer, S., Farber, P.A., “Microbiologic factors in endodontology” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 78: 634-645 (1994).

- 14- Tomic-Karovic, K., Jelinek, E., “Comparative study of the bacterial flora in the surrounding, the root canals and sockets of deciduous molars” *Int Dent J*, 21:375-88, (1971).
- 15- Schuster, G.S., “Oral Microbiology and Infectious Disease” 3rd ed. Philadelphia: **B.C.Decker Inc.**, 562-548 (1990).
- 16- Ang, Ö., “Ağız Mikrobiyolojisi” İstanbul: **Nobel Tıp Kitapevi**, 359-379 (1990).
- 17- Ryan, K.J., Ray, C.G., “Ed. Sherris Medical Microbiology” 4th ed. **Mc Graw Hill**, 294-5 (2004).
- 18- Borssen, E., Sundqvist, G., “Actinomyces of infected dental root canals1” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 51: 643-648 (1981).
- 19- Van Winkelhoff, A.J., Van Steenberghe, T.J., De Graaff, J., “Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis” Its role in endodontal infections. *J Endod*, 18: 431-434 (1992).
- 20- Baumgartner, J.C., “Endodontic Microbiology” Walton, R.E., Torabinejad, M., editors. “Principles and practise of Endodontics” 3rd ed. Philadelphia: **W.B. Saunders Company**, 282-294 (2002).
- 21- Griffiee, M.B., Patterson, S.S., Miller, C.H., Kafrawy, A.H., Newton, C.W., “The relationship of Bacteroides melaninogenicus to symptoms associated with pulpal necrosis” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 50: 457- 461 (1980).
- 22- Bae, K.S., Baumgartner, J.C., Shearer, T.R., David, L.L., “Occurrence of Prevotella nigrescens and Prevotella intermedia in infections of endodontic origin” *J Endod*, 23: 620-623 (1997).
- 23- Dougherty, W.J., Bae, K.S., Watkins, B.J., Baumgartner, J.C., “Blackpigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals” *J Endod*, 24: 356-358 (1998).
- 24- Schuster, G.S., “Oral Microbiology and Infectious Disease” 3rd ed. Philadelphia: **B.C.Decker Inc.**, 562-548 (1990).
- 25- Gomes, B.P., Pinheiro, E.T., Gadê-Neto, C.R., Sousa, E.L., Ferraz, C.C., Zaia, A.A., Teixeira, F.B., Souza-Filho, F.J. “Microbiological examination of infected dental root canals” Source Endodontics, Dental School of Piracicaba, State University of Campinas-UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil. bpgomes@fop.unicamp.br , *Oral Microbiol Immunol*, 19(2): 71-6 (2004).

- 26- Jacinto, R.C., Gomes, B.P.F.A., Shah, H.N., Ferraz, C.C., Zaia, A.A., Souza Filho, F.J., “Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections” *Int Endod J*, 39: 62-70 (2006).
- 27- Xia, T., Baumgartner, C., David, L.L., “Isolation and identification of *Prevotella tanneriae* from endodontic infections” *Oral Microbiol Immunol*, 15(4): 273-275 (2000).
- 28- Ledezma-Rasillo, G., Flores-Reyes, H., Gonzalez-Amaro, A.M., Garrocho-Rangel, A., Ruiz-Rodriguez Mdel, S., Pozos-Guillen, A.J., “Identification of cultivable microorganisms from primary teeth with necrotic pulps. Source Facultad de Estomatologia” Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. *J Clin Pediatr Dent*, 34(4):329-33 (2010).
- 29- Cengiz, A.T., “Tıp ve Diş hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji” Ankara: *Güneş Kitapevi* (2004).
- 30- Ozbek, S.M., Ozbek, A., “Real-time polymerase chain reaction of "red complex" (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*) in periradicular abscesses” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 110(5):670-4 (2010).
- 31- Fredricks, D.N., Relman, D.A., “Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases” *Clin Infect Dis*, 29: 475-86 (1999).
- 32- Wyss, C., “Dependence of proliferation of *Bacteroides forsythus* on exogenous N-acetylmuramic acid” *Infect Immun*, 57: 1757-9 (1989).
- 33- Saiki, R.K.S., Scharf, F., Faloona, K.B., Mullis, G.T., Horn, H.A., Erlich and N. Arnheim. “Enzymatic amplification of B-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia” *Science*, 230:1350-1354 (1985).
- 34- Watson, J.D., M.Gilman, J., Witkowski and M. Zoller, “The polymerase chain reaction” In: *Recombinant DNA*. Second Edition, 79-98 (1992).
- 35- Hadidi, A.L., Levy, Podleskis, E.V., “Polymerase chain reaction technology in plant pathology “ In: *Molecular Methods in Plant Pathology*, 167-187 (1995).
- 36- Innis, M.A. and D.H. Gelfand. “Optimization of PCRs In Innis” M.A, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J (eds.). *PCR protocols A guide to methods and applications*. Academic, 3-12 (1990).
- 37- Erlich, H.A., D. H. Gelfand and J. J. Sninsky. “Recent advances in polymerase chain reaction” *Science*, 252:1643-1650 (1991).

- 38- İnternet: ANDY VIERSTRATE “Principle of the PCR 199”
<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> (2010)
- 39- Yang, X., A. Hadidi and S.M., Garnsey. “Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts” *Phytopathology*, 82: 279 (1992).
- 40- Weising, K., H. Nybom., K. Wolff, and W. Meyer, “DNA Fingerprinting in plants and fungi” *CRS Press*, Florida, (1995).
- 41- Demeke, T. and F.P. Adams, “The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR” *BioTechniques*, 12: 332-335 (1992).
- 42- Henson J. M. and Frech, R., “The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis” *Annual Review of Phytopathology*, 31:81-109 (1993).
- 43- Akar, N., “Klinik Moleküler Patoloji’ye Giriş” 2. Baskı. *An tıp Yayınları*, (1999).
- 44- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P. M., “Real-time quantitative PCR” *Gen. Res.*, 6: 986-994 (1996).
- 45- Grove, D. S., “Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using” Taqman and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 *Sequence Detector Journal of Biomolecular Techniques*, 10: 11-16 (1999).
- 46- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjogreen, J., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., “The real-time polymerase chain reaction” *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 95-125 (2006).
- 47- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. and Gelfand, D. H., “Detection of spesific polymerase chain reaction product by utilizing the 5’-3’ exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 7276-7280 (1991).
- 48- Livak, K.J., Fiood, S.J.A., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., “Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization” *Gen. Res.*, 4: 357-362 (1995).
- 49- Morris, T., Robertson, B., Gallagher, M., “Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system” *J. Clin. Microbiol.*, 34: 2933-2936 (1996).

- 50- Siqueira, J.F., Roças, I.N., Moraes, S.R., Santos, K.R.N., “Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections” *Int Endod J*, 35: 345-51 (2002).
- 51- Atasoy, Ö.İ., “Enfekte kök kanallarında *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* ve bu bakterilere ait virülans faktörlerinin moleküler mikrobiyolojik teknikler ile incelenmesi” **Gazi Üniv.**, Ankara 03/2005-23 (2007).
- 52- Siqueira, J.F., Roças, I.N., “Bacteroides forsythus in primary endodontic infections as detected by nested PCR” *J Endod*, 29(6): 390-393 (2003).
- 53- Siqueira, J.F., Roças, I.N., “Treponema socranskii in primary endodontic infections as detected by nested PCR” *J Endod*, 29(4): 244-247 (2003).
- 54- Siqueira, J.F., Roças, I.N., “Pseudoramibacter alactolyticus in primary endodontic infections” *J Endod*, 29(11): 735-738 (2003).
- 55- Siqueira, J.F., Roças, I.N., “Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 97: 85-94 (2004).
- 56- Siqueira, J.F., Roças, I.N., “The microbiota of acute apical abscesses” *J Dent Res.*, 88(1):61-5 (2009).
- 57- Yang Q.B., Fan L.N., Shi Q., “Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, cloning, and sequence analysis of bacteria associated with acute periapical abscesses in children” *J Endod*, 36(2):218-23 (2010).
- 58- Montagner F., Jacinto R.C., Signoretti F.G., Gomes B.P., “Treponema species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates” *J Endod*, 36(11):1796-9 (2010).
- 59- Siqueira J.F., Rôças I.N., Jesus E.C., Santos A.L., Rosado A.S., Tiedje J.M., “Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections” *PLoS One* 6(11):e28088 (2011).
- 60- Buonavoglia A., Latronico F., Pirani C., Greco M.F., Corrente M., Prati C., “Symptomatic and asymptomatic apical periodontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation” *University of Bologna*, Italy (2011).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ARAZ, İbrahim
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 14.10.1985 İskenderun
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (544) 437 33 76
 e-mail : ibrahim_araz@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Biyoloji Bölümü	2012
Lisans	Gazi Üniversitesi Kırşehir Kampüsü/ Biyoloji Bölümü	2008
Lise	İskenderun Şemsettin Mursaloğlu Lisesi	2002

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-2010	Gazi Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Oral Mikrobiyoloji Laboratuvarı	Biyolog
2010-2012	Ankalab Laboratuvarları	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce