

PRİMER KÖK KANAL ENFEKSİYONLARINDA TANNERELLA FORSYTHIA PREVALANSININ 16S rRNA PCR İLE İNCELENMESİ

Prevalance of *Tannerella Forsythia* in Primary Root Canal Infections by 16S rRNA Based PCR

Özgür İlke Atasoy Ulusoy*

Doruk Engin***

Güliz Görgül**

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the prevalence of *Tannerella forsythia* in the primary infections of root canals and its association with different forms of periradicular diseases using Polymerase Chain Reaction (PCR).

Samples were collected from acute and chronic forms of periradicular diseases and abscesses. DNA extraction was performed using spin column DNA isolation kit and 16S rRNA gene based PCR analysis was performed. Chi-squared test was used for data analysis.

Tannerella forsythia DNA was detected in 18 (31,3%) of the total 58 samples, in 13 of 26 cases (50%) with acute apical periodontitis, three of seven cases (42,8%) with acute periradicular abscesses, and 2 of 25 cases (8%) with chronic asymptomatic periradicular lesions. It was found to be significantly related with acute apical periodontitis group ($p=0.002$).

T. forsythia must be considered as a potential endodontic pathogen associated with acute symptoms of periradicular disease.

Key words: Infection, PCR, root canal, rRNA, *Tannerella forsythia*

ÖZET

Bu çalışmanın amacı *Tannerella forsythia*'nın primer kök kanal enfeksiyonlarındaki prevalansını ve bu bakterinin değişik formlardaki periradiküler hastalıklar ile ilişkisini Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile incelemektir.

Örnekler, akut ve kronik formlardaki periradiküler hastalıklar ve abselerden elde edildi. Filtreli kolon DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı ve 16S rRNA gen bazlı PCR yürütüldü. Verilerin istatistiksel analizinde Ki - kare testi kullanıldı.

Akut apikal periodontitisli 26 vakanın 13'ünde (%50), akut periradiküler abseli 7 vakanın 3'ünde (%42,8) ve kronik asemptomatik periradiküler lezyonlu 25 vakanın 2'sinde (%8) olmak üzere toplam 58 vakanın 18'inde (%31,3) *Tannerella forsythia* DNA'sı saptandı. Bakteri varlığı ile akut apikal periodontitis grubu arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemli bulundu ($P=0.002$).

Tannerella forsythia periradiküler hasarın akut semptomları ile ilişkili potansiyel bir endodontik patojen olarak düşünülmelidir.

Anahtar sözcükler: Enfeksiyon, PCR, kök kanalı, rRNA, *Tannerella forsythia*

GİRİŞ

Bakterilerin kök kanal sistemine invazyonu ve ilerlemesi apikal periodontitise neden olmaktadır. Özellikle siyah pigmentli gram negatif anaerobların varlığı periodontal dokularda hasar oluşturmada ve periradiküler enfeksiyonların akut semptomları ve alevlenmeleri ile ilişkilendirilmektedir (1,2). Kırmızı kompleksin (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*) bir üyesi olan *Tannerella forsythia* (*T.forsythia*), gram

* Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti Anabilim Dalı, Dr. Dt

** Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti Anabilim Dalı, Prof. Dr.

*** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yrd. Doç.

negatif anaerob pleomorfik bir rod olarak bilinir ve ilk kez 1986'da Tanner ve ark (3) tarafından *Bacteroides* türü olarak bildirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin gelişimiyle mikroorganizmaların tanımlanması için uzun yıllardır 'altın standart' olarak kabul gören kültür yöntemleri sorgulanmaya başlanmıştır (4). Bu yöntemler kök kanallarında etkili olan ancak şimdiye kadar kültüre edilememiş çoğu mikroorganizmanın tanımlanmasını sağlamıştır. PCR ile *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Dialister pneumosintes* and *Prevotella tannerea* gibi mikroorganizmaların kök kanallarında, kültür yöntemleri ile saptanandan çok daha yüksek prevalanslarda buldukları ortaya çıkmıştır (5,6). PCR kullanılarak yapılan farklı çalışmalarda *T.forsythia*'nın prevalansı %4-52 arasında değişmektedir (1,5-11). Ayrıca bu bakterinin varlığı ile belirli semptomlar arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığı henüz bir netlik kazanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, primer kök kanal enfeksiyonlarında *T. forsythianın* varlığı ve prevalansının belirlenmesi ve periradiküler hasarın farklı tipleri ile bu bakteri arasındaki ilişkinin incelenmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalardan Örnek Alınması

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alınmasını takiben başlatıldı. Örnekler Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Tedavi ve Endodonti Anabilim Dalı'na başvuran, 20-70 yaş aralığına sahip 58 hastanın enfekte köklerinden elde edildi. Daha önce kök kanal tedavisi görmemiş, 4mm'den daha fazla cep derinliğine sahip olmayan, periapikal radyografilerinde değişen derecelerde radyolüsen siye sahip tek kanallı dişler seçildi. Örnek elde edilecek hastaların son üç ay içerisinde herhangi bir antibiyotik kullanmamış olmasına dikkat edildi.

Dişler gösterdikleri klinik semptomlara göre 3 gruba ayrıldı: Ağrılı ve/veya perküsyon hassasiyeti gösteren 26 vaka 'akut apikal periodontitis, lokalize veya diffüz şişlik bulunan 7 vaka 'akut periradiküler abse', bu semptomlardan hiç birine sahip olmayan 25 vaka 'kronik

asemptomatik periradiküler lezyon' grubu olarak sınıflandırıldı.

Tüm dişler pomza ve su ile temizlendikten sonra rubber dam ile izole edildi. Diş ve çevre dokular %3'lük hidrojen peroksit ile temizlenip %2.5'lük sodyum hipoklorit ile dekontamine edildi. Giriş kavitesinin hazırlanmasından sonra pulpa odasını içeren operasyon sahası %2.5 sodyum hipoklorit ile yıkandı ve %5 sodyum tiosülfat ile inaktive edildi. Eğer kök kanalı kuruyorsa kanala az miktarda steril salin solüsyonu uygulandı. Bakteri varlığını saptamak amacıyla incelenecek örnekler, K tipi eğe kullanılarak kök kanalında çevirme ve hafifçe kazıma hareketiyle elde edildi. Ardışık numaralı iki kağıt kon kanal içine sırasıyla yerleştirilip 1 dk süreyle tutuldu. Kanal içerisindeki sıvıyı emen kağıt konlar steril fosfat tamponlu salin solüsyonu içeren kriyotüplere aktarıldı. Örnekler DNA ekstraksiyonu işlemine kadar -80° C'ye ayarlanmış derin dondurucularda bekletildi.

Tüplerdeki örneklerin DNA ekstraksiyonları, filtreli kolon DNA saflaştırma kiti (AbsoGene Genomic DNA Isolation KIT, Turkey) kullanılarak yapıldı.

PCR Deneyleri

DNA saflaştırma işleminin her örnek için başarıyla gerçekleştirildiğinin doğrulanması amacıyla 16S rRNA genlerini hedef alan universal bakteriyel primerler (Uni16F and Uni16R) (Tablo 1) kullanıldı (12,13). Pozitif çıkan örneklerde *T.forsythia*'nın varlığının incelenmesi amacıyla Rocas ve ark(1) tarafından tanımlanan bu bakteriye özgül 16S rRNA gen primerleri kullanıldı (Tablo 1).

Her örnek için 50 µl PCR karışımı, 50 mM KCl, 8.3 pH'ya sahip 10 mM Tris-HCl, 0.001% (w/v) jelatin, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0.6 µM forward ve reverse primer, 0.03 U/µl Taq DNA polimeraz (Applied Biosystems, USA) ve yaklaşık 0.5 µg DNA örneği içerecek şekilde hazırlandı. Universal ve *T.forsythia*'ya özgül PCR Pelkin Elmer 9700 termal döndürücüde gerçekleştirildi. DNA denatürasyonu için reaksiyon tüpleri 95 °C' de 3 dakika inkübe edildi. Ardından 45 döngü boyunca 95°C'de 15 saniye, 57°C'de 45 saniye annealing(yapışma) ve 72°C'de 1 dakika extension(uzama) gerçekleştirildi.

rildi (Tablo 1). Son uzama için tüpler 72 °C'de 7 dakika inkübe edildi. *Tannerella forsythia*'dan ve *Escherichia coli*'den elde edilen ATCC 43037 ve K12 JM109 DNA

ekstraktları, *T. forsythia*'ya özgül ve universal bakteri PCR'ları için pozitif kontroller olarak kabul edildi.

Tablo 1. Deneyde *T.forsythia*'ya özgül PCR için kullanılan oligonükleotid primerler ve nükleotid dizileri, MgCl₂ konsantrasyonları, yapışma(annealing) ısıları ve amplicon boyları

Primer	Nükleotid dizisi	MgCl ₂ konsantrasyonu (mM)	Annealing ısı (°C)	Amplicon boyu (bp)
Uni16F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	2	57	1504
Uni16R	5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'			
BF-f ¹	5'-GCGTATGTAACCTGCCCGCA-3'	1.5	60	641
BF-r ¹	5'-TGCTTCAGTGTTCAGTTATACCT-3'			

Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelle yüklendi ve 100 V'da 45 dakika elektroforez işlemi uygulandı. Elektroforezi takiben jel 30 dakika 0.5 µg/ml'lik etidyum bromidde boyandı. Ardından 260 nm UV (ultraviyole) ışık altında transiluminasyon ile görüntülendi ve jel dökümantasyon sistemi (Syngene, MD, USA.) kullanılarak fotoğraflandı. 1504 bp (12,13) and 640 bp (1) baz çiftlik DNA bandları, universal ve *T.forsythia*'ya özgü PCR için kabul edildi.

Veriler Ki - kare testi (SPSS 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak analiz edildi.

BULGULAR

Tüm örnekler, Uni16F ve Uni16R universal bakteri primerlerine uyum gösteren

Tablo 2. *Tannerella forsythia* 'nın gruplara göre dağılımı

Gruplar	T.forsythia DNA (+) örnek sayıları, (%)	Toplam
Akut Apikal Periodontitis*	13, (50)	26
Akut Apikal Abse	3, (42,8)	7
Kronik Apikal Periodontitis	2, (8)	25
Toplam	18, (31,3)	58

*P=0.002

TARTIŞMA

Tannerella forsythia, kırmızı kompleks olarak tanımlanan bakteri grubunun bir üyesidir ve daha çok primer kök kanal enfeksiyonlarında saptanmaktadır. N-asetil muramik aside olan ihtiyacından dolayı, saf kültürlerde karışık kültür- lere göre daha zor üremektedir (14,15). Bu bakterinin zor üreyen karakterinden dolayı konvan-

1504 baz çiftlik ampliconlar göstermiştir. Bu bulgu, pü ve nekrotik pulpa gibi kök kanal içeriklerinin PCR'ı engellemediğini ve DNA ekstraksiyon yönteminin etkili bir şekilde yürütülmüş olduğunu göstermektedir.

Toplam 58 adet örneğin 18'inde (%31.3) *T.forsythia* DNA'sına rastlanmıştır. 26 adet akut apikal periodontitis vakasının 13'ünde (%50.0), yedi adet akut periradiküler absenin 3'ünde (%42.8), 25 adet kronik asemptomatik periapikal lezyonlu vakanın 2'sinde (%8) bakteri DNA'sı saptanmıştır (Tablo 2). *T.forsythia*'nın varlığı ile akut apikal periodontitis grubu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır (ki-kare p=0.002).

siyonel kültür yöntemleriyle prevalansı çok düşük saptanmaktadır. PCR gibi güncel moleküler mikrobiyolojik tekniklerin kullanılmasıyla *T.forsythia* gibi bazı bakterilerin kök kanallarındaki varlığına daha sık rastlanmaktadır. Bunun nedeni PCR'ın mikroorganizmaların tanımlanabilmesi için onların canlılıklarına ihtiyaç duymayışı olabilir.

Tannerella forsythia'nın enfekte kök kanallarında PCR kullanılarak saptanmış prevalansları, çalışmalarda % 4-66 arasında dağılım göstermektedir (1,5-11). Bu çalışmada saptanan prevalans % 31 olup aynı PCR tekniği ve örnekleme prosedürü kullanan diğer çalışmaların bulgularıyla uyum göstermektedir (1,6). Ancak prevalans değerlerimiz, Foschi ve ark(5) nin aynı teknik kullanarak saptamış olduklarından göreceli olarak yüksektir. Siqueira ve ark (7) PCR kullanarak yaptığı bir başka çalışmada *T.forsythia*'nın kök kanallarındaki varlığını % 4 olarak belirlemiştir, ancak bizim çalışmamızın aksine onlar örneklerini kökün sadece apikal üçlüsünden elde etmişlerdir. Siqueira ve Rocas(8) in Nested PCR kullanarak yaptıkları bir başka çalışmada, bakterinin yüzdesi toplam örneklerin %52'inde, akut vakaların da %40'ında saptanmıştır. Her ne kadar yöntem farklı olsa da, akut örneklerin %50'inde bakteri varlığının saptandığı bizim çalışmamızdaki abse ve asemptomatik gruplardaki prevalans değerleri, Siquiera ve Roças (8) in bulgularından daha düşüktür. Çalışma bulgularındaki tüm bu farklar, seçilen vakalardaki varyasyonlara, mikrobiyolojik örneklerin olası kontaminasyonuna, PCR tekniklerindeki çeşitliliğe ve seçilen popülasyonların coğrafi farklılıklarına bağlanabilir (16,17).

Bu çalışmada, *T.forsythia*'nın enfekte kök kanallarındaki varlığı ile akut apikal periodontitis grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. Bizim bilgilerimize göre önceki çalışmalarda böyle bir ilişki bulunamamıştır. Ancak virulans faktörleri, bakteri yükü, farklı bakteri türleri arasındaki ilişki ve genotipik özellikler, semptomların oluşması ve şiddetinde önemli rol oynayabilir (8,18,19). Huang ve ark (18) bakterilerin farklı genotipik özellikleri ve oluşan periodontal problem arasında anlamlı bir ilişki saptamışlardır. Ayrıca, *T.forsythia*'nın genetik dağılımı ile gingipain, lipopolisakkarit, alkalın fosfataz, propiyonat, izovalerat, fenilasetat ve bütirat gibi virulans faktörlerinin (20) endodontik hastalıklar üzerindeki etkilerini inceleyen daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

SONUÇ

Enfekte kök kanallarındaki yüksek prevalansına bağlı olarak, *T. forsythia*, potansiyel bir endodontik patojen olarak kabul edilme-

lidir. Ayrıca bu bakterinin akut periradiküler hastalık tipi ile ilişkisi bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Rocas IN, Siqueira JF Jr, Santos KR, Coelho AM. 'Red complex' (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 91: 468-71.
2. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R *et al*. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. J Clin Microbiol 2002; 40: 3223-31.
3. Tanner ACR, Listgarten MA, Ebersole JL, Strzempko MN. *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow-growing fusiform *Bacteroides* sp. from the human oral cavity. Int J Syst Bacteriol 1986; 36: 213-21.
4. Siqueira JF Jr, Rocas IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. J Dent 2003; 31: 333-9.
5. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. Oral Microbiol Immunol 2005; 20: 289-95.
6. Jung IY, Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. J Endod 2000; 26: 599-604.
7. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Alves FR, Santos KR. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. J Endod 2004; 30: 638-43.
8. Siqueira JF Jr, Rocas IN. *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. J Endod 2003; 29: 390-3.
9. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Moraes SR, Santos KR. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. Int Endod J 2002; 35: 345-51.
10. Saito D, Coutinho LL, Borges Saito CP, Tsai SM, Höfling JF, Gonçalves RB. Real-time polymerase chain reaction quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. J Endod 2009; 35: 1518-24.
11. Lacević A, Pojskić LK, Lojo NK, Ramić J, Bajrović K. *Tannerella forsythia* detected in infected

root canals using nested PCR. Am J Dent 2009; 22: 211-4.

12. Lu JJ, Perng CL, Lee SY, Wan CC. Use of PCR with Universal Primers and Restriction Endonuclease Digestions for Detection and Identification of Common Bacterial Pathogens in Cerebrospinal Fluid. J Clin Microbiol 2000; 38: 2076-80.

13. Niu SQ, Fukushima J, Jiang Y, Ishikawa Y, Ueda T, Matsumoto S. Analysis of Bacterial Community Structure in the Natural Circulation System Wastewater Bioreactor by Using a 16S rRNA Gene Clone Library. Microbiol Immunol 2006; 50: 937-50.

14. Wade W. Unculturable bacteria-the uncharacterized organisms that cause oral infections. J R Soc Med 2002; 95: 81-3.

15. Wyss C. Dependence of proliferation of *Bacteroides forsythus* on exogenous N-acetylmuramic acid. Infect Immun 1989; 57: 1757-9.

16. Baumgartner JC, Siqueira JF Jr, Xia T, Rocas IN. Geographical differences in bacteria

detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. J Endod 2004; 30: 141-4.

17. Siqueira JF, Jung IY, Rocas IN, Lee CY. Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; 99: 641-7.

18. Huang Y, Umeda M, Takeuchi Y, Ishizuka M, Yano-Higuchi K, Ishikawa I. Distribution of *Bacteroides forsythus* genotypes in a Japanese periodontitis population. Oral Microbiol Immunol 2003; 18: 208-14.

19. Hudspeth MK, Hunt Gerardo S, Maiden MF, Citron DM, Goldstein EJ. Characterization of *Bacteroides forsythus* strains from cat and dog bite wounds in humans and comparison with monkey and human oral strains. J Clin Microbiol 1999; 37: 2003-6.

Takemoto T, Kurihara H, Dahlen G. Characterization of *Bacteroides forsythus* isolates. J Clin Microbiol 1997; 35: 1378-81.

Yazışma Adresi:

Dr. Dt. Özgür İlke Atasoy ULUSOY
Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti Anabilim Dalı
8. Cad 06510 Emek/ ANKARA
Tel: 0.312.203 41 30
Faks: 0.312. 223 92 26
e-posta: ilkeatasoy@yahoo.com

Kısa Başlık: Enfekte kök kanallarında *T. Forsythia*'nın prevalansı