

ENDODONTİK MİKROBİYOLOJİDE KLASİK VE GÜNCEL TANI YÖNTEMLERİ

CLASSICAL AND CURRENT DIAGNOSTIC METHODS IN ENDODONTIC MICROBIOLOGY

Eda HASGÜL^{1a,b},  Fahriye KESKİN²,  Sevgi ÇİFTÇİ²,  Bülent YILMAZ³ 

¹ Doktora Öğrencisi, ^a İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, ^b İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti AD, İstanbul, Türkiye

² Profesör, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri AD, İstanbul, Türkiye

³ Doktor Öğretim Üyesi, İstinye Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti AD, İstanbul, Türkiye

Yayın Gönderilme Tarihi: 30.01.2024, Kabul Tarihi: 17.02.2025, Basım Tarihi: 27.03.2025

ÖZET:

Endodontik enfeksiyonlar diş pulpasının mikroorganizmalarca istilası sonucu oluşmaktadır. Mikroorganizmalar veya toksinleri öncelikle pulpaya ulaşarak pulpitislere, ardından periapikal bölgeyi etkileyerek periapikal doku hastalıklarına neden olmaktadır. Polimikrobiyal karakterde olan endodontik enfeksiyonlarda anaerob bakteriler baskın durumdadır. Bununla birlikte, kök kanallarında bakteriler dışında mantar, virüs ve arkealar da tanımlanmıştır. Kök kanallarındaki mikroorganizma çeşitliliğinin anlaşılması enfeksiyonun bütünüyle yok edilmesi, yeniden oluşabilecek bir enfeksiyonun önlenmesi ve tedaviye dirençli olgularda primer enfeksiyon etkeni dışındaki mikroorganizmaların tespiti noktasında fayda sağlamaktadır. Dolayısıyla endodontik tedavinin başarısı, endodontik uygulamaların mikrobiyolojik çalışmalarla birlikte yürütülmesi ile artmaktadır. Günümüzde endodontik mikrobiyolojide kültür yöntemi, enfeksiyon etkenlerinin saptanmasında hala standart tanı yöntemi olarak kullanılmaya devam etmektedir. Son yıllarda ise mikrobiyotanın çeşitliliğini belirleyebilmek için moleküler tanı yöntemleri ön plana çıkmaktadır. Bu makalenin amacı klinisyenlere endodonti alanında kullanılan mikrobiyolojik tanı yöntemlerini tanıtmak ve bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarını ortaya koymaktır.

Anahtar Kelimeler: Endodonti; mikrobiyolojik teknikler; enfeksiyon

ABSTRACT:

Endodontic infections result from the invasion of microorganisms into the dental pulp tissue. Microorganisms or their toxins primarily reach the pulp, leading to pulpitis and then affect the periapical area, causing periapical tissue diseases. Endodontic infections are polymicrobial, with anaerobic bacteria predominating. In addition to bacteria, fungi, viruses, and archaea have also been identified in root canals. Understanding the microbial diversity within root canals is essential for effective infection elimination, preventing reinfection and identifying microorganisms other than the primary infectious agent in treatment-resistant cases. Consequently, the success of endodontic treatment is enhanced when microbiological research is integrated into endodontic procedures. Currently, in endodontic microbiology culture methods remain the standard diagnostic tool for identifying the etiological agents of infections. In recent years, molecular diagnostic methods have gained prominence for assessing the diversity of the microbiota. The aim of this review is to provide an overview to clinicians about the microbiological diagnostic methods employed in

endodontics and to discuss the advantages and limitations of these methods.

Keywords: Endodontics; microbiological techniques; infection

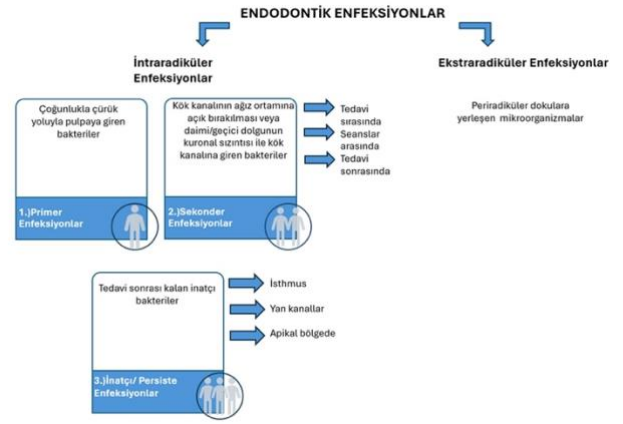
GİRİŞ

Endodontal hastalık fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal etkenlere bağlı olarak meydana gelmektedir. Mikrobiyal etkenlere bağlı gelişen endodontik enfeksiyonlar kök kanalı sisteminin enfeksiyonudur ve apikal periodontitisin başlıca etiyolojik nedenidir. Endodontik enfeksiyonların tedavisi pratikte mekanik debridman (örneğin kök kanallarından enfekte dokuların uzaklaştırılması), irrigasyon ve kanal içi medikaman uygulaması üzerine yönelmiş olsa da klinik başarıyı arttırmak için etkenin doğru tanımlanması, uygun antimikrobiyaller ile tedavinin başlaması ve sürdürülmesi hedeflenmelidir. Bu hedefe ancak doğru mikrobiyolojik tanı ile ulaşmak mümkündür. Antoni van Leeuwenhoek tarafından bakteri plağındaki mikroorganizmaların mikroskopla ilk kez tanımlanmasından bugüne dek mikrobiyolojik tanı yöntemlerinin sayısı hızla artış göstermiştir. Günümüzde endodonti alanında kullanılan mikrobiyolojik tanı yöntemleri; kültür yöntemleri, moleküler teknikler (DNA veya RNA problemleri), immünojenik yöntemler ve mikroskop teknikleri olarak sınıflandırılmaktadır (Bagg, MacFarlane, Poxton, Smith, 2005). Bu makalenin amacı, endodontide kullanılan mikrobiyolojik tanı yöntemlerindeki güncel gelişmeler konusunda okuyucuyu bilgilendirmektir.

ENDODONTİK ENFEKSİYONLAR

Endodontik enfeksiyon mine ve dentin boyunca ilerleyen mikroorganizmaların (çoğunlukla bakterilerin) uygun çevresel koşullarda öncelikle toksinleri ve sonrasında kendilerinin pulpayı işgal etmesi ile ilerleyen bir süreçtir. Endodontik enfeksiyonlara sebep olan bu bakteriler çeşitli nedenlerle ve endodontik tedavinin farklı aşamalarında kök kanallarına girmekte; kök kanalı veya kök kanalı dışında da yerleşebilmektedir. Her bir endodontik enfeksiyon tipinde farklı bakteri türleri bulunduğundan, etken spesifik tedavi stratejileri geliştirmek amacıyla enfeksiyonların doğru bir

şekilde sınıflandırılması önem arz etmektedir. (Şekil 1).



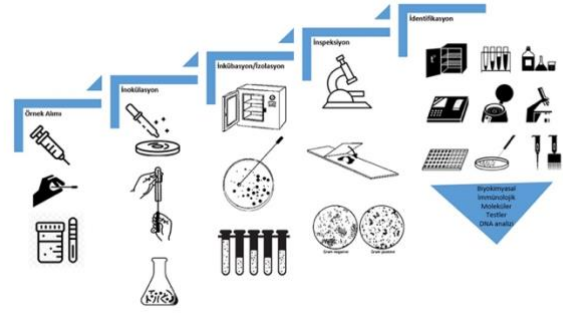
Şekil 1. Endodontik enfeksiyonların sınıflandırılması

Primer endodontik enfeksiyonlar, diş pulpasının mikroorganizmalar tarafından enfekte edilmesi sonucu oluşan enfeksiyonlardır. Primer endodontik enfeksiyonlar polimikrobiyal olup, pulpanın nekrozuna ve primer apikal periodontitise neden olmaktadır. Primer enfeksiyonların büyük çoğunluğunda, 20 ila 30 tür çekirdek mikrobiyotayı oluşturmaktadır. Bunlar arasında Gram negatif *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Porphyromonas endodontalis* (*P. endodontalis*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *Dialister* ve *Treponema* türleri; Gram pozitif *Parvimonas micra* (*P. micra*), *Filifactor alocis* (*F. alocis*), *Pseudoramibacter alactolyticus* (*P. alactolyticus*), *Olsenella uli* (*O. uli*), *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*), *Actinomyces*, *Streptococcus* ve *Propionibacterium* türleri bulunmaktadır (Fouad et al., 2002; Rôças & Siqueira, 2018). Baskın bakteriler ise *Bacteroides*, *Prophyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* ve *Camphylobacter* türleridir (Provenzano et al, 2013). **Sekonder endodontik enfeksiyonlar**, operasyonel işlemler sırasında iatrojenik olarak, tedavi seansları arasında geçici dolgu materyalinin sızdırması veya daimî restorasyonlardaki mikro sızıntı aracılığıyla kök kanallarına ulaşan mikroorganizmaların oluşturduğu ikincil enfeksiyonlardır. Sekonder endodontik enfeksiyonlarda esas olarak fakültatif anaerob gram-pozitif koklar ve çomaklar hâkimdir. Bu türler arasında *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus* ve *Actinomyces* yer almaktadır. Primer endodontik

enfeksiyonlarda genellikle baskılanmış bir temsil oranına sahip olan enterokoklar ve anaeroblar gibi mikroorganizmalar sekonder endodontik enfeksiyonlarda öne çıkmaktadır (Unnikrishnan, 2024). **İnatçı endodontik enfeksiyonlar** birincil veya ikincil endodontik enfeksiyonların parçası olan, kemomekanik preparasyona direnç gösteren ve tedavi edilen kök kanallarındaki zorlu şartlarda dahi hayatta kalabilen mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen enfeksiyonlardır. İnatçı enfeksiyonlardan sorumlu en yaygın türler *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *P. micra*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Dialister invisus* (*D. invisus*), *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), *T. forsythia* ve *Treponema denticola* (*T. denticola*) olarak bildirilmektedir (Pinto, Barbosa, Silva, Santos, Sassone, 2023). **Ekstraradiküler enfeksiyonlar**, mikroorganizmaların vücut savunma mekanizmalarını aşarak periradiküler dokulara girmesi sonucu oluşan enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonlarda en yaygın türler *Actinomyces*, *Streptococcus* ve *Propionibacterium propionicum* (*P. propionicum*) olarak bildirilmektedir.

ENDODONTİK ENFEKSİYONLARDA ÖRNEK ALIMI

Kök kanallarından örnek alınımında, steril kağıt konular kullanılarak rubber dam izolasyonu ile örnekler alınmalıdır. Rubber dam uygulamasından sonra, prosedürü daha verimli hale getirmek için hidrojen peroksit (%30) ile dişin kuron kısmı yıkanmalıdır (Fouad, 2017). Kök kanalından örnek alınmasında en yaygın olarak 3 veya 4 adet, steril, 25 veya 30 numara kağıt kon apikal foramende olacak şekilde kullanılmalıdır. Her bir kağıt kon, ana pulpal bölgedeki bakterilerle bir süspansiyon oluşturmak için pompalama hareketleriyle 60 saniye boyunca kök kanalının içinde bekletilmelidir (Teles, 2013). Örnek, anaerobik bir taşıma ortamı olan VMGA III (Viability Medium, Goteborg, Anaerobic)'e yerleştirilmeli ve doğrudan mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmelidir. Örneklerin laboratuvara ulaşmasını takiben steril bir besiyerine aktarılan örnekler, mikroorganizmaların üremesi için uygun fiziksel şartlar sağlanarak mikrobiyolojik tanıya hazır hale getirilmelidir (Şekil 2).



Şekil 2. Mikrobiyolojik test süreci

KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Endodontik işlemlere tabi tutulmuş bir kök kanalından elde edilen numunelerin kültüre edilmesi, dezenfeksiyona dirençli çeşitli mikroorganizmaların üretilmesini sağlar. Bu tür bakterilere, aynı zamanda sekonder endodontik enfeksiyonlarla da ilişkisi bulunan *Enterococcus*, *Actinomyces* ve *Propionibacterium* suşları örnek verilebilir (Wong, Manoil, Näsman, Belibasakis, Neelakantan, 2021). Buna rağmen, günümüzde ağız bakterilerinin yaklaşık %50'sinin henüz kültüre edilemediği bildirilmektedir (Olsen, Preza, Aas, Paster, 2009). Kültür işlemi ekilen örneklerin 37°C'de fakültatif anaerop ve zorunlu anaerop ortamlarda, yavaş üreyen mikroorganizma türlerinin koloniler oluşturmasına yetecek kadar uzun süre (zorunlu anaerobik bakteriler varlığında en az 2 hafta süre ile) inkübe edilmesi ile başlar (Fouad, 2017). İnkübasyon sonunda üreyen bakterileri sayıları CFU/ml cinsinden belirlenmelidir. Bakteriyel üremenin tespit edilmesinden sonra saf kültür elde etmek için tek koloniden ekim yapılmalıdır (Teles, 2013). Bundan sonra bakteri türlerini tanımlamak için morfolojik özelliklerini tayin etmek; biyokimyasal ve antibiyotik duyarlılık testleri uygulamak mümkün olmaktadır.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Disk difüzyon testi (Agar difüzyon testi): Bakteri izolatlarının farklı antibiyotiklere duyarlılığını belirlemek için kullanılmaktadır. Etkili bir antibiyotik büyük, kısmen etkili antibiyotik orta büyüklükte inhibisyon bölgesi üretirken; etkisiz bir antibiyotik bakteri büyümesini hiç etkilemeyebilir (EUCAST, 2021). **Dilüsyon yöntemleri:** Minimum inhibitör konsantrasyonunu (MIC) ve Minimum bakterisidal konsantrasyonunu (MBC) belirlemek için kullanılır. MIC, bakteri/mantarları inhibe

etmek için gerekli minimum konsantrasyonu ifade ederken; MBC, öldürmek için gerekli minimum konsantrasyondur.

E-test (Gradient strip test): Antimikrobiyal emdirilmiş bir şeridi agar pleyte yerleştirerek antimikrobiyal duyarlılığı belirlemenin bir yoludur. Duyarlı bir bakteri veya mantar türü, antibiyotik veya antifungal konsantrasyonunun yakınında üremeyecek ve böylece MİK belirlenecektir (BioMérieux, 2021). E- test kullanılarak yapılan bir araştırmada; *E. faecalis* amoksisilin, amoksisilin-klavulanik asit, vankomisin ve moksifloksasine tamamen duyarlı; eritromisin ve azitromisine dirençli olarak bulunmuştur (Pinheiro, Gomes, Drucker, Zaia, Ferraz, Souza-Filho, 2004).

MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Örnekten izole edilen DNA ve RNA'nın analiz edildiği moleküler teknikler, farklı mikrobiyal toplulukların araştırılmasına imkân vermektedir. Örneğin; endodontik enfeksiyonlardan daha önce bilinmeyen türlerin [*Bacteroides forsythus* (*B. forsythus*), *T. denticola*, *Dialister pneumosintes* (*D. pneumosintes*), *F. alocis*, *Treponema parvum* (*T. parvum*), *Treponema putidum* (*T. putidum*)] PZR ile izolasyonu mümkün olmuştur (Siqueira, 2002).

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

DNA'nın yüksek ısıda iki zincirinin ayrılarak tek sarmal haline gelmesine, sonrasında sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanarak zincirin uzamasının sağlanmasına ve bu döngünün belirli bir sayıda tekrarlanmasına dayanan bir yöntemdir (Mullis, 1990). PZR deneyi gerçekleştirmek için hedef DNA, Taq polimeraz, iki oligonükleotid primeri ve deoksiribonükleotid kaynağına ihtiyaç vardır. Amaçlanan PZR ürününün üretilip üretilmediğini kontrol etmek için ise en yaygın kullanılan yöntem agaroz jel elektroforezidir (Brown, 2010).

Konsensus (Broad-Range) PZR: Bir grup mikroorganizmada ortak olan belirli bir genin korunan bölgelerine tamamlayıcı olan primerler tasarlanan bu yöntemde, ortamdaki tüm mikrobiyal çeşitlilik araştırılabilmekte ve numunede bulunan herhangi bir bakteri türü tespit edilebilmektedir. Tür-tip spesifik PZR ile kıyaslandığında dejenere primerler başta olmak üzere konsensus primer tasarımının daha zor

olması ve spesifik tanımlamaya imkan vermemesi nedeniyle pozitif sonuç alınan örneklerde dizi analizi ya da cins-tür-tip spesifik testler gibi ikincil metotlarla yeniden tanımlamanın gerekli olması gibi bazı dezavantajları vardır (Sahiner, 2014).

İç içe (Nested) PZR: Bu yöntemde ikinci bir PZR reaksiyonunda şablon olarak birincil PZR amplifikasyonunun ürünü kullanılır. Hedef DNA'nın geleneksel PZR'den daha erken bir aşamada tespit edilmesine olanak tanıyan bir hassasiyet göstermektedir (Mandlik, Shah, Sharma, Desai, 2016). İç içe PZR, endodontik enfeksiyonlarda sıklıkla karşılaşılan *Treponema* cinslerinin tespit edilmesi için kullanılabilir (Siqueira & Rôças, 2003; Rosa, Signoretti, Montagner, Gomes, Jacinto, 2015).

Çoklu (Multipleks) PZR: İki veya daha fazla, farklı PZR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesi işlemidir. Farklı hedeflere özgü iki veya daha fazla primer seti aynı reaksiyon tüpüne konulur. Klinik örnekte birden fazla özel hedef dizi aynı anda çoğaltılabildiğinden, çoklu PZR analizleri farklı mikrobiyal türlerin eş zamanlı olarak tespit edilmesine olanak tanımaktadır (Siqueira & Rôças, 2005).

Gerçek Zamanlı (Real-Time) PZR: 2000'li yılların başında kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi patojenlerin sayıca tayininde kullanılmaya başlanmıştır (Lyons, Griffen, Leys, 2000). Bu PZR yönteminde ürün miktarı, reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probaların verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılmaktadır. Bu yöntemde kısaca; miktarı bilinen hedefe sahip örneğin, belli bir eşik değerinde floresan verdiği PZR siklusu tespit edilerek Cycle Threshold (CT) bir referans değer belirlenmekte ve buna göre bir standart eğri oluşturulmaktadır. Klinik örneğin CT değeri standart eğriyle karşılaştırılarak hedef nükleik asit miktarı hesaplanmaktadır (Mackay, Arden, Nitsche, 2002). En önemli özellikleri, ürünlerin analizinin reaksiyon sırasında yapılabilmesi ve klinik örnekteki hedef nükleik asitlerin tespitine ek olarak kantitatif ölçümünün de yapılabilmesidir. Bu amaçla, hedef bölge için tasarlanmış proplar kullanılabilirdiği gibi çift zincirli DNA'ya bağlanan "SYBR-Green I" de kullanılmaktadır (Fraher, O'Toole, Quigley, 2012).

Ters Transkripsiyon (Reverse Transcriptase) PZR: RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi ve tamamlayıcı DNA'nın da standart PZR yoluyla çoğaltılması yöntemidir. Bu yöntemde, başlangıçta RNA ters transkripsiyon reaksiyonu ile komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülür. Daha sonra, cDNA PZR ile çoğaltılır. Özellikle klonlama ve gen ekspresyon çalışmalarında ve virüslere ait RNA genomlarının saptanmasında kullanılır (Lübeck & Hoorfar, 2003).

PARMAK İZİ ANALİZİ (FINGERPRINTING)

Bu yöntemlerde farklı dizi ve/veya boyutlardaki PZR ürünleri bir jel veya kapiller üzerindeki farklı hareketleriyle ayrılmaktadır. **Denatüre Edici Gradyan Jel Elektforezi (DGGE) ve Terminal Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (T-RFLP)** en sık kullanılan parmak izi analizi yöntemleridir (Osborn, Moore, Timmis, 2000; Fraher, O'Toole, Quigley, 2012). Isı Gradyan Jel Elektforezi, Restriksiyon Enzim Analizi, Pulsed-Field Jel Elektforezi, Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi diğer yöntemler arasında sayılmaktadır. Kök kanalındaki en baskın olan kültüre edilmiş/ henüz kültüre edilememiş türleri belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır.

FLORESAN IN-SITU HİBRİDİZASYON (FISH)

Tek iplikli nükleik asit moleküllerinin, tamamlayıcı gen dizileri ile (enzim veya radyoaktif işaretli problarla) uygun koşullarda eşleşerek çift iplikli hibrit moleküller oluşturmasına hibridizasyon denir (Brown, 2010). Floresan işaretli prob ile hedefin işaretlenmesi ve floresan mikroskopunda görüntülenmesi prensibine dayanan FISH yöntemi ile kültüre gerek kalmadan mikroorganizmaların kısa sürede tanısının yanısıra; morfoloji, sayı, organizasyon ve alan dağılımının analizi de yapılabilmektedir. Bu yöntemle enfekte bölgedeki bakterilerin yerini belirlemek ve tanımlamak mümkün olduğundan endodontide periapikal lezyonların incelenmesinde kullanılmaktadır (Sunde et al. 2003).

DNA-DNA HİBRİDİZASYON (DNA-DNA HYBRIDIZATION MACRO-ARRAYS AND MICROARRAYS)

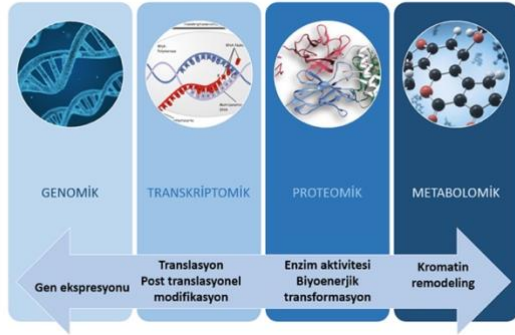
İki DNA molekülü arasındaki benzerlik derecesini belirlemek için kullanılan bir moleküler tekniktir. Farklı DNA ipliklerinden gelen tamamlayıcı diziler birbirine bağlanarak

kararlı hibrit moleküller oluşturulmaktadır. Bu hibritlerin kararlılığı, bağlanmanın gücünü ve DNA örnekleri arasındaki benzerlik derecesini gösteren erime sıcaklığının (Tm) ölçülmesi tekniğiyle değerlendirilmektedir (Vauterin,2006). Socransky ve ark. ikiden fazla sayıda DNA örneğinin hibridizasyonu için checkerboard DNA-DNA hibridizasyon yöntemini geliştirmiştir (Socransky, Smith, Martin, Paster, Dewhirst, Levin, 1994). Bu haliyle yöntem, tek veya çoklu klinik örneklerde birçok bakteri türünün varlığının aynı anda belirlenmesine olanak tanıdığından, büyük ölçekli epidemiyolojik araştırmalarda faydalı olmaktadır. **PIRODİZİLEME (PYROSEQUENCİNG)** Nükleotidlerin dizisini, nükleotid katılımı sırasındaki pirofosfat (PPi) salınımıyla birlikte oluşan ışımaya yoluyla belirleyen ve DNA sentezini gerçek zamanlı olarak izleyen bir dizileme yöntemidir (Ronaghi, Karamohamed, Pettersson, Uhlen, Nyren, 1996). Geleneksel Sanger dizilemesinden farklı olarak, bu yöntem floresanla etiketlenmiş nükleotidler kullanılmakta ve görselleştirme için elektroforeze dayanmamaktadır. Dolayısıyla, gerçek zamanlı veri analizi gerektiren uygulamalar için yararlı olmaktadır. Ayrıca bu teknoloji, tek bir çalışmada büyük miktarda veri sağlaması sayesinde yalnızca baskın topluluk üyelerinin değil, aynı zamanda düşük seviyede olan taksonların yani nadir biyosferin tespitine ve mutasyonların analizine de olanak tanımaktadır (Kunin, Engelbrekton, Ochman, Hugenholtz, 2010).

16S /18S RRNA GEN DİZİLEME (16S /18S RRNA GENE SEQUENCİNG)

Amplikon dizilemenin (hedeflenen segmentin PZR yoluyla çoğaltılması ve dizilenmesi) bir biçimidir ve genom içinde son derece spesifik bölgeleri hedef almaktadır. 16S rRNA geni; ribozomun 16S alt birimini kodlayan, tüm bakteriler ve arkealar içinde bulunan, bireysel türler ve suşlar arasında ayırt edici olabilecek yüksek değişkenlik gösteren ve yüksek derecede korunmuş bir bölge olduğundan mikroorganizmaların tanımlanması için ideal bir hedef olmaktadır (Byrne, Butler, Reynolds, Dashper, 2018). Diğer amplikon dizileme türleri arasında mantarları hedef alan 18S ve ITS dizilemesi de bulunmaktadır. Bu yöntem endodontide özellikle apikal periodontitisteki bakteriyel dağılımı belirlemek için sıklıkla kullanılmıştır (Korona-Glowniak et al.2021;

Ordinola-Zapata et al. 2023). Güncel bir araştırmada, 16S rRNA analizi ile kök kanalı kaynaklı apikal periodontitislere *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* en çok tespit edilen filumlar ve *Phocaeicola*, *Pseudomonas*, *Rothia* ve *Prevotella* öne çıkan cinsler olarak gösterilmektedir (Buonavoglia et al. 2023). Güncel başka bir araştırmada ise intraradiküler, çok türlü biyofilmlerin taksonomik bileşimi analiz edilmiştir. Bakteriyel toplulukların taksonomik tabanlı analizi 93 cins, 44 aile ve 8 şubeye ait 562 Operasyonel Taksonomik Birim (16S rRNA sekanslarında ayırt edilen en küçük filogenetik birim) ortaya çıkarmıştır (Matoso, Montagner, Grecca, Rampelotto, Kopper, 2024). 16S bazlı analiz, mikrobiyotanın bileşimi hakkındaki bilgimizde devrim yaratmasına rağmen, yalnızca taksonomik bilgi sağlamaktadır. Yani, 16S analizleri araştırmacılara sadece “kim var orada?” sorusunu sorma olanağı sağlamaktadır. OMIC tekniklerinin gelişimi bu durumu dramatik bir şekilde değiştirmiş; metagenomik, metatranskriptomik, metaproteomik ve metabolomik teknikler kullanılarak mikroorganizmalara “ne yapıyorsunuz?” sorusu sorulmaya başlanmıştır (Belibasakis, Belström, Eick, Gursoy, Johansson, Könönen, 2023). OMIC kavramı; gen ekspresyonundan, transkripsiyon, translasyon, protein sentezi, metabolik ürünler ve sonuçlara uzanan bir süreci tanımlamaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. OMIC kavramının kapsamı

Örneğin; proteomik ve metagenomik verilerin birleştirilmesi ile patojen ve dış çevresi dokular arasındaki biyolojik etkileşimlerin açıklanması mümkün olmuştur (Hoglund, Kwamin, Claesson, Dahlen, Johansson, Haubek, 2014). Bu yıl yayımlanan bir araştırmada, Pinheiro ve ark. endodontik enfeksiyonlarda mikrobiyal kompozisyonu, fonksiyonel belirteçleri ve antimikrobiyal direnç geni ekspresyonunu araştırmak amacıyla ilk kez metatranskriptomik tekniğini kullandıklarını bildirmektedir.

Araştırmanın sonucunda *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ve *Actinobacteria* baskın filumları temsil ederken; *Fusobacteria*, *Spirochetes* ve *Synergistetes* baskın olmayan filumlar arasında gösterilmektedir. Moonlight proteinleri kodlayan transkriptler yüksek oranda ifade edilmekte ve bu durum potansiyel olarak bakteriyel yapışma, biyofilm oluşumu, konak savunmasından kaçılması ve inflamasyon indüksiyonu ile ilişkili bulunmaktadır (Pinheiro et al. 2024).

İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER

Antikor üretimi için yapılan tüm analizler, uyarılmış antikorun antijenle etkileşiminin ölçümüne dayanmaktadır. (Hornbeck, 2015). En sık kullanılan **Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA))** yöntemi Engvall ve Perlmann tarafından tanımlanmış olup, sitokinler, lenfokinler, fosfoproteinler ve birçok rekombinant molekül de dahil olmak üzere çeşitli proteinlerin tespitinde temel bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Engvall & Perlmann, 1971). ELISA yöntemi ile antijen veya antikor aranması mümkündür. Örneğin, antikor aranması durumunda test, bilinen antijenin pleyttteki çukurların yüzeyine bağlanması (kaplama) süreciyle başlar. Antikor aranan örnek bu çukurlara konur. Uygun antikor varsa pleyttteki antijen ile birleşir. Daha sonra, ‘enzim ile işaretlenmiş insan globülini antiserumu’ eklenir. Bir süre beklenir ve yıkanır. İncelenmekte olan çukurdaki antijen-antikor kompleksi, eklenen enzim ile işaretlenmiş insan antiglobülinini de bağlayacağından yıkama ile uzaklaştırılamayacaktır (Premjeet et al. 2011). Daha sonra, pleyt yıkanır ve renk değişiminin oluşması için substrat eklenir; sisteme bağlanmış enzim bu substratı parçaladığında ortaya çıkan renk ile oluşan OD (optik yoğunluk) değeri ile sonuca gidilir (Hidayat & Wulandari, 2012). İnterlökin (IL)-1, IL-6, IL-10 ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) seviyeleri ölçülerek bakterilerin makrofajları uyarma yeteneğinin belirlenmesi, çıkan sonuçların klinik ve radyografik bulgular ile ilişkilendirilmesi amacıyla endodonti alanında ELISA testini kullanan araştırmalar bulunmaktadır (Martinho, Leite, Nascimento, Cirelli, Gomes, 2014; Cardoso et al. 2016).

MİKROSKOP YÖNTEMLERİ

Diş örneklerindeki mikroorganizmalar ilk defa 1684 yılında Leeuwenhoek tarafından mikroskopta gösterilmiştir (Leeuwenhoek, 1684). Daha sonra 1890 yılında Miller'in, pulpa dokusuyla ilişkili mikroorganizmaları ilk kez gözlemlemesinden bu yana, endodontik kökenli enfeksiyonlarda mikroorganizmalar suçlanmıştır (Miller, 1894). 1960'lı yıllara gelindiğinde ise endodontik enfeksiyonlarla ilgili mikrobiyolojik çalışmalarda esas olarak mikroskopi, aerobik kültür teknikleri ve biyokimyasal reaksiyonlar kullanılmıştır (Leavitt, Naidorf, Shugaevsky, 1958). Bu yöntemlerden mikroskopi, hızlı sonuçlar vermesi ve bakterilerin morfolojik özelliklerini ayırt etmesi yönünden avantajlıdır. Mikroskopik inceleme, Gram boyama yöntemi sonucunda Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin ayrımının sağlanması nedeniyle terapötik açıdan da önem taşımaktadır (Baumgartner, 2004). Buna karşın, bakteriyel morfolojiye ilişkin mikroskopik bulgular yanıltıcı olabilir; zira birçok tür pleomorfik (bakterilerin şekil ve büyüklük olarak varyasyonları) özellikler gösterebilmekte ve sonuçlar araştırmacının öznel yorumuna bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Siqueira & Rôças, 2005). Mikroskop altında görünmesi için belirli bir sayıda mikroorganizma hücrelerinin (örneğin, 104 bakteriyel hücre/ml sıvı) gerekli olması ve bazı bakterilerin görünür hale gelmesi için uygun boyalar ve/veya muameleye ihtiyaç duymasından dolayı mikroskopinin sınırlı duyarlılığı bulunmaktadır (Fredricks & Relman, 1999).

Klasik mikroskopik yöntemlerden olan **İmmüno Floresans Boyama (İF)** direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilmektedir. Direkt İF yönteminde, hedef proteini boyamak için boya ile konjüge edilmiş bir antikor kullanılmaktadır. İndirekt İF yönteminde ise önce birincil antikorun hedefe bağlanması sağlanmakta ve ardından birincil antikor, boya ile konjüge edilmiş ikincil antikor kullanılarak tespit edilmektedir (Im, Mareninov, Diaz, Yong, 2019). **Faz kontrast ve karanlık alan mikroskobu** ise mikroorganizmaların hareketini belirlemede ve spiroketlerin (endodontik enfeksiyonlarda özellikle Treponema cinsi) varlığını tespit etmede yararlı olmaktadır (Trope, Rosenberg, Tronstad, 1992).

Günümüzde endodonti alanındaki mikrobiyolojik incelemelerde; **Scanning Electron Microscopy (SEM)**, **Environmental Scanning Electron**

Microscopy (ESEM), **Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)**, **Transmission Electron Microscopy (TEM)** ve **Epifluorescence Microscopy (EFM)** kullanılmaktadır. Erken dönem araştırmalar büyük ölçüde geleneksel SEM'e dayanmaktadır. Endodonti alanında SEM genellikle kök kanalındaki bakteriyel sızıntıyı ve biyofilm gelişimini analiz etmekte kullanılmaktadır (Singh, 2022). SEM incelemesi için örneklerin gözlemden önce sabitlenmesi, dehidrate edilmesi, kurutulması veya dondurulması gerekmektedir (Mohammadi, Palazzi, Giardino, Shalavi, 2013). Bu yöntemde biyofilm incelemesindeki dezavantaj, numunelerin doğal durumlarını koruyamaması ile yaklaşık %95 su içeren ekstrasellüler polimerik maddelerin hücrelerin etrafını saran kalın jelatinimsi bir matris yerine lifler olarak görünmesi riskidir (Characklis & Marshall, 1990). Bu durum, tedavi edici endodontik stratejilerin in situ gözlemlenememesi veya test edilememesiyle sonuçlanmaktadır. Bu eksikliklerin üstesinden gelmek için ESEM geliştirilmiştir. ESEM'in en büyük avantajı, biyolojik dokular ve kök kanal bakterileri gibi nemli dokuların 'doğal' durumlarında görüntülenebilmesidir (Bergmans, Moisiadis, Meerbeek, Quirynen, Lambrecht, 2005). Son yıllarda ise CLSM, endodontide kullanılan yıkama solüsyon ve yöntemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması için giderek daha popüler hale gelmektedir (Yolcu, Tartuk, Kaya, Eskibağlar, 2021). Ancak, CLSM kullanarak biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkinliği incelemek, çeşitli floresan özelliklere sahip boyaların kullanılmasını gerektirmektedir. Bununla birlikte konfokal mikroskopta bakteriyel koagregasyon ve alan dağılımı incelemek, endodontik enfeksiyonlarda mikrobiyal patojenite hakkında önemli bilgiler sağlayabilmektedir. Bakterilerin koloni oluşturan birim (CFU) sayısını belirleyebilen mikrobiyolojik çalışmalar mevcut olsa da bu çalışmalar dentin içindeki bakterilerin alan dağılımı hakkında bilgi vermemektedir (Tandjung, Waltimo, Hauser, Heide, Decker, Weiger, 2007). Histolojik kesitlerin incelenmesi ise enfekte dentindeki bakterilerin dağılımını görselleştirmeye olanak tanırken, bakterilerin canlılığı hakkında bilgi sunamamaktadır. TEM tekniği, enfekte dentinal kanalların yüksek çözünürlüklü görüntülerini sağlamakla birlikte, zaman alıcıdır; numune hazırlığı için birden fazla adım gerektirmektedir (Arana-Chavez & Castro-

Filice, 2019). Buna karşılık, CLSM değerlendirmesi bütünsel biyolojik örneklerin ince kesitleri (0.3 µm'ye kadar) alınarak ve genellikle canlı boyama teknikleri ile bir arada kullanılarak mikrobiyal biyofilmlerin canlılık profili, strüktürü ve alan dağılımını belirlemeye yardımcı olmaktadır (Zapata et al. 2008). EFM tekniği; hücrelerin canlılığını, biyofilm yapısal organizasyonunu, mikrokoloni oluşumunu, biyofilm türlerinin pH seviyelerini ve biyofilm yapısının kimyasal bileşimini analiz etmek için kullanılmaktadır (Kishen, George, Kumar, 2006). Endodontik çalışmalarda iki türden oluşan biyofilmler, her iki organizma için ayrı ayrı iki floresan prob ile işlenmekte ve ardından EFM yardımıyla iki farklı dalga boyunda odaklanarak görüntülenebilmektedir (Garg, Mala, Kamath, 2021).

DİĞER GÜNCEL YÖNTEMLER

MATRİKS YARDIMLI LAZER DESORPSİYON/ İYONLAŞTIRMA-UÇUŞ ZAMANI- KÜTLE SPEKTROMETRESİ (MALDI-TOF MS)

Proteinler fonksiyon efektörleri olduğundan, mikrobiyal topluluklar (metaproteom) içindeki proteinlerin toplanmasını inceleyen proteomik yaklaşımlar, devam eden biyolojik süreçler hakkında bilgi verebilmektedir. Protein yapılı enzimler ve adezinler bakteriyel yapışma ve biyofilm oluşumundan, dolayısıyla patojeniteden sorumlu olarak gösterilmekte ve proteomik yaklaşımların konusu olabilmektedir (Lewis, 2001). Endodontik enfeksiyonlar sırasında mikroorganizmalarda yer alan süreçleri keşfetmek için metaproteomikler üzerinden yapılan çeşitli araştırmalar mevcuttur (Nandakumar, Madayiputhiya, Fouad, 2009; Francisco, Delboni, Lima, Xiao, Siqueira, Gomes, 2019). Metaproteomikleri kullanan çalışmalar ise protein analizine dayanan MALDI-TOF MS metoduna odaklanmaktadır (Ahlat, Aydin, Kaya, Baysallar, 2023). Diğer moleküler yöntemlere göre daha hızlı ve doğru sonuçlar veren MALDI-TOF MS ile; yumuşak iyonizasyon yaklaşımı ve bakteriyel proteinlerin iyonlara desorbsiyonu (substansın bir yüzeyden veya yüzey boyunca salınması) sayesinde spesifik kütle spektrumları tanımlanmakta ve bakterilerin kimliği dakikalar içinde belirlenmektedir (V. Ruelle, ElMoualij, Zorzi, Ledent, Pauw, 2004). Özellikle, konvansiyonel yöntemlerin yeterli olmadığı Gram pozitif çomakların, bazı nonfermantatif

bakterilerin ve anaerop bakterilerin tanımlanmasında MALDI-TOF MS'in üstün olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (Barbuddhe et al. 2008; Mellmann et al. 2008).

ENDOCATOR

Kültür bazlı ve moleküler teknikler; metodolojik varyasyonlara duyarlı, zaman alıcı, maliyetli olmaları ve özel eğitim ve karmaşık laboratuvar ekipmanları gerektirmelerinden dolayı kök kanalının dezenfeksiyonunu değerlendirmek amacıyla hasta başı kullanıma uygun değildir. Bu alandaki ihtiyaca yönelik olarak, hasta başı kullanıma yönelik mikrobiyolojik test yöntemlerini geliştirmek üzere çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Adenozin Trifosfat (ATP) molekülünün metabolik aktivitenin bir göstergesi olarak işlev görmesi, tüm canlı hücrelerde ve organik kalıntılarda evrensel olarak bulunması özelliklerinden faydalanarak geliştirilen Endocator isimli bir cihaz; kök kanallarındaki ATP seviyelerini 0 ile 100 arasında değişen bir puan olan Endoscore'a dönüştürerek değerlendirmektedir (Arcuri et al. 2024). Bu yenilikçi cihaz nekrotik dişler için bakteriyel dezenfeksiyonu doğrulamak amacıyla kullanılabilirken, vital dişler için obtürasyondan önce yeterli pulpa dokusunun çıkarılıp çıkarılmadığını kontrol etmek üzere de kullanılmaktadır (Singh & Bolla, 2024).

SONUÇ

Sonuç olarak, endodontik tedavide uzun yıllardır geniş spektrumlu antimikrobiyaller kullanılmaktadır. Rutin olmasa da bu türde antimikrobiyaller ile başarı sağlanamayan; tedaviye cevap vermeyen, ağrı ve şişlik gibi enfeksiyon bulgularının devam ettiği olgularda veya tedavi sonrası gelişebilen inatçı enfeksiyonlarda etkenin tam anlamıyla doğru tanımlanması ve etkene yönelik spesifik tedavinin uygulanması önem teşkil etmektedir. Bu bağlamda, endodontik tedaviye destek amaçlı mikrobiyolojik tanı yöntemleri hızla gelişmekte ve yapılan çalışmalar enfeksiyonların doğası hakkında bilgiler sunarak klinisyenler için rehber oluşturmaktadır. Endodontik mikrobiyolojide tanının birincil basamağı doğru numune alımı ve sonrasında uygun şartlarda laboratuvara ulaşımını sağlamaktır. Laboratuvar aşamasında ise kültür metodu endodonti alanında uzun yıllardır kök kanallarındaki mikroorganizmaları tanımlamak için kullanılmıştır. Son yıllarda, mikrobiyolojik

yöntemlerdeki teknolojik ilerlemeler sayesinde endodontik enfeksiyonlardaki mikrobiyal çeşitlilik hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Bununla birlikte, endodontik mikrobiyolojik tanıyı laboratuvar ortamından hasta başına taşımak, dolayısıyla klinik pratiğe entegre etmek amacıyla daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

Ahlat, M., Aydın, C., Kaya, S. & Baysallar, M. (2023). "Identification of Root Canal Microbiota Profiles of Periapical Tissue Diseases Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry." *Anaerobe* 84: 1027-91.

Arana-Chavez, V. E. & Castro-Filice, L. S. (2019). "Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM) for the Examination of Dental Hard Tissues." *Methods in Molecular Biology*, 1922: 325-332.

Arcuri, L., Gambarini, G., Zanza, A., Testarelli, L., Arcuri, C., Cross, R., et al. (2024). "Experimental Evaluation of a Novel Device to Quantify Canal Cleanliness: An In Vitro Study." *ORAL*, 4(2), 163-172.

Bagg, J., MacFarlane, T.W., Poxton, I.R. & Smith, A.J. (2005). *Essentials of Microbiology for Dental Students*. Oxford: Oxford Academic Press, 127-134.

Barbuddhe, S.B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., et al. (2008). "Rapid Identification and Typing of *Listeria* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry." *Applied and Environmental Microbiology*, 74/17: 5402.

Baumgartner, J., (2004). "Microbiological and Molecular Analysis of Endodontic Infections." *Endodontic Topics*, 7: 35-51.

Belibasakis, G. N., Belstrøm, D., Eick, S., Gursoy, U. K., Johansson, A. & Könönen, E. (2023). "Periodontal Microbiology and Microbial Etiology of Periodontal Diseases: Historical Concepts and Contemporary Perspectives." *Periodontology* 2000.

Bergmans, L., Moisiadis, P., Van Meerbeek, B., Quirynen, M. & Lambrecht, P. (2005).

"Microscopic Observation of Bacteria: Review Highlighting the Use of Environmental SEM." *International Endodontic Journal*, 38: 775-88.

BioMérieux. (2021). ETEST®. [çevrimiçi] www.biomerieux-usa.com. [Erişim tarihi: 23 Ekim 2024].

Brown, T. A. (2010). *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. 5th ed. Manchester: Blackwell Publishing.

Buonavoglia, A., Zamparini, F., Lanave, G., Pellegrini, F., Diakoudi, G., Spinelli, A., et al. (2023). "Endodontic Microbial Communities in Apical Periodontitis." *Journal of Endodontics*, 49/2: 178-189.

Byrne, S., Butler, C. A., Reynolds, E. C. & Dashper, S. G. (2018). "Taxonomy of Oral Bacteria." In *Methods in Microbiology*, Volker Gurtler, Jack T. Trevors (eds.), 45: 171-201. Academic Press.

Cardoso, F. G., Chung, A., Martinho, F. C., Camargo, C. H., Carvalho, C. A., Gomes, B. P., et al. (2016). "Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential." *Braz Dent J.*, 27/4: 412-418.

Characklis, W. G. & Marshall, K. C. (1990). *Biofilms: A Basis for an Interdisciplinary Approach*. New York: John Wiley and Sons, 3-15.

Claesson, R., Johansson, A., & Belibasakis, G. N. (2022). "Clinical Laboratory Diagnostics in Dentistry: Application of Microbiological Methods." *Front Oral Health*, 8/3: 983991.

Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). "Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): Quantitative Assay of Immunoglobulin G." *Immunochemistry*, 8: 871-879.

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (2021). "Antimicrobial Susceptibility Testing: EUCAST Disk Diffusion Method." [çevrimiçi] www.eucast.org [Erişim tarihi: 23 Ekim 2024].

Fouad, A. F., Barry, J., Caimano, M., Clawson, M., Zhu, Q., Carver, R., et al. (2002). "PCR-based Identification of Bacteria Associated with Endodontic Infections." *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3223-3231.

- Fouad, A. F. (2017). *Endodontic Microbiology* Second Edition. USA: John Wiley & Sons Inc.
- Fraher, M. H., O'Toole, P. W., & Quigley, E. M. (2012). "Techniques Used to Characterize the Gut Microbiota: A Guide for the Clinician." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 9/6: 312-322.
- Francisco, P. A., Delboni, M. G., Lima, A. R., Xiao, Y., Siqueira, W. L., & Gomes, B. (2019). "Proteomic Profile of Root Canal Contents in Teeth with Post-Treatment Endodontic Disease." *Int Endod J.*, 52: 451-460.
- Fredricks, D. N., & Relman, D. A. (1999). "Application of Polymerase Chain Reaction to the Diagnosis of Infectious Diseases." *Clin Infect Dis*, 29: 475-486.
- Garg, A., Mala, K., & Kamath, P. M. (2021). "Biofilm Models in Endodontics - A Narrative Review." *J Conserv Dent*, 24/1: 2-9.
- Hidayat, R., & Wulandari, P. (2012). "Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Technique Guideline." *Bioscientia Medicina: Journal of Biomedicine and Translational Research*, 5/5: 447-453.
- Hoglund Aberg, C., Kwamin, F., Claesson, R., Dahlen, G., Johansson, A., & Haubek, D. (2014). "Progression of Attachment Loss is Strongly Associated with Presence of the JP2 Genotype of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: A Prospective Cohort Study of a Young Adolescent Population." *J Clin Periodontol*, 41/3: 232-241.
- Hornbeck, P. (2015). "Enzyme-linked Immunosorbent Assays." *Curr. Protoc. Immunol.*, 110: 211-2123.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). "An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining." *Methods Mol Biol.*, 1897: 299-311.
- Kishen, A., George, S., & Kumar, R. (2006). "Enterococcus faecalis-Mediated Biomineralized Biofilm Formation on Root Canal Dentine In Vitro." *J Biomed Mater Res A*, 77: 406-415.
- Korona-Glowniak, I., Piatek, D., Fornal, E., Lukowiak, A., Gerasymchuk, Y., Kedziora, A., et al. (2021). "Patterns of Oral Microbiota in Patients with Apical Periodontitis." *J Clin Med.*, 10/12: 2707.
- Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H., & Hugenholtz, P. (2010). "Wrinkles in the Rare Biosphere: Pyrosequencing Errors Can Lead to Artificial Inflation of Diversity Estimates." *Environmental Microbiology*, 12: 118-123.
- Leavitt, J., Naidorf, I., & Shugaevsky, P. (1958). "The Bacterial Flora of Root Canals as Disclosed by a Culture Medium for Endodontics." *Oral Surg*, 11: 302-306.
- Leeuwenhoek, A. (1684). "Leeuwenhoek's Letter." *Philos Trans R Soc London*, 14: 568-574.
- Lewis, K. (2001). "Riddle of Biofilm Resistance." *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 999-1007.
- Lübeck, P. S., & Hoorfar, J. (2003). "PCR Technology and Applications to Zoonotic Food-Borne Bacterial Pathogens." *Methods Mol Biol.*, 216: 65-84.
- Lyons, S. R., Griffen, A. L., & Leys, E. J. (2000). "Quantitative Real-Time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and Total Bacteria." *J Clin Microbiol*, 38/6: 2362-2365.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A., (2002). "Real-Time PCR in Virology." *Nucleic Acids Res.*, 30/6: 1292-1305.
- Mandlik, J., Shah, N., Sharma, A., & Desai, M. (2016). "Microbial Identification in Endodontic Infections with an Emphasis on Molecular Diagnostic Methods: A Review." *IIOAB J*, 7: 60-70.
- Martinho, F. C., Leite, F. R., Nascimento, G. G., Cirelli, J. A., & Gomes, B. P. (2014). "Clinical Investigation of Bacterial Species and Endotoxin in Endodontic Infection and Evaluation of Root Canal Content Activity Against Macrophages by Cytokine Production." *Clin Oral Investig.*, 18/9: 2095-2102.
- Matoso, F. B., Montagner, F., Grecca, F. S., Rampelotto, P. H., & Kopper, P. M. P. (2024). "Microbial Composition and Diversity in Intraradicular Biofilm Formed In Situ: New Concepts Based on Next-Generation Sequencing." *Mol Oral Microbiol.*
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., et al., (2008). "Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria." *J Clin Microbiol*, 46/6: 1946-1954.

- Miller, W. (1894). "An Introduction in the Study of the Bacteriopathology of the Dental Pulp." *Dent Cosmos*, 36: 505.
- Mohammadi, Z., Palazzi, F., Giardino, L., & Shalavi, S. (2013). "Microbial Biofilms in Endodontic Infections: An Update Review." *Biomed J.*, 36/2: 59-70.
- Mullis, K. B., (1990). "The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction." *Scientific American*, 262/4: 56-65.
- Nandakumar, R., Madayiputhiya, N., & Fouad, A. F. (2009). "Proteomic Analysis of Endodontic Infections by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Oral Microbiol Immunol*, 24: 347-352.
- Olsen, I., Preza, D., Aas, A. J., & Paster, B. J. (2009). "Cultivated and Not-Yet-Cultivated Bacteria in Oral Biofilms." *Microbial Ecology in Health and Disease Informa*, 21/2: 65-71.
- Ordinola-Zapata, R., Costalonga, M., Nixdorf, D., Dietz, M., Schuweiler, D., Lima, B. P., et al. (2023). "Taxonomic Abundance in Primary and Secondary Root Canal Infections." *Int Endod J*, 56/2: 278-288.
- Osborn, A. M., Moore, E. R., & Timmis, K. N. (2000). "An Evaluation of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis for the Study of Microbial Community Structure and Dynamics." *Environmental Microbiology*, 2/1: 39-50.
- Pinheiro, E. T., Gomes, B. P. F. A., Drucker, D. B., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R., & Souza-Filho, F. J. (2004). "Antimicrobial Susceptibility of *Enterococcus faecalis* Isolated from Canals of Root Filled Teeth with Periapical Lesions." *Int Endod J*, 37/11: 756-763.
- Pinheiro, E. T., Karygianni, L., Candeiro, G. T. M., Vilela, B. G., Dantas, L. O., Pereira, A. C. C., et al., (2024). "Metatranscriptome and Resistome of the Endodontic Microbiome." *J Endod*, 50/8: 1059-1072.
- Pinto, K. P., Barbosa, A. F. A., Silva, E. J. N. L., Santos, A. P. P., & Sassone, L. M. (2023). "What Is the Microbial Profile in Persistent Endodontic Infections? A Scoping Review." *J Endod*, 49/7: 786-798.
- Premjeet, S., Deepika, G., Sudeep, B., Sonam, J., Sahil, K., Devashish, R., et al. (2011). "Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA), Basics and Its Application: A Comprehensive Review." *J. Pharm. Res*, 4/12: 4581-4583.
- Provenzano, J. C., Siqueira, J. F. Jr, Rôças, I. N., Domingues, R. R., Paes Leme, A. F., & Silva, M. R. (2013). "Metaproteome Analysis of Endodontic Infections in Association with Different Clinical Conditions." *Plos One*, 8: 76-108.
- Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. Jr, (2018). "Frequency and Levels of Candidate Endodontic Pathogens in Acute Apical Abscesses as Compared to Asymptomatic Apical Periodontitis." *PLoS One*, 13: 0190469.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., & Nyren, P. (1996). "Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release." *Anal Biochem*, 242/1: 84-89.
- Rosa, T. P., Signoretti, F. G., Montagner, F., Gomes, B. P., & Jacinto, R. C. (2015). "Prevalence of *Treponema* spp. in Endodontic Retreatment-Resistant Periapical Lesions." *Braz Oral Res*, 29: 6-18.
- Sahiner, F. (2014). "Current Problems and Recent Advances in the Molecular Diagnosis of Genital Human Papillomavirus Infections." *Mikrobiyol Bul*, 48/4: 689-706.
- Singh, S. (2022). "Microscopes in Conservative Dentistry and Endodontics Research." *J Conserv Dent*, 25/4: 333-337.
- Singh, S., & Bolla, N. (2024). "Endocator-Paradigm Shift in the Evaluation of Microbial Load in Root Canals." *J Conserv Dent Endod*, 27: 111-112.
- Siqueira, J. F. Jr. (2002). "Endodontic Infections: Concepts, Paradigms, and Perspectives." *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*, 94: 281-293.
- Siqueira, J. F. Jr., & Rôças, I. N. (2003). "*Treponema socranskii* in Primary Endodontic Infections as Detected by Nested PCR." *J Endod*, 29/4: 244-247.
- Siqueira, J. F. Jr., & Rôças, I. N. (2005). "Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 1—Current Molecular Technologies for Microbiological Diagnosis." *Journal of Endodontics*, 31: 411-423.

- Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., & Levin, A. E. (1994). "Checkerboard DNA-DNA Hybridization." *Biotechniques*, 17: 788-792.
- Sunde, P. T., Olsen, I., Göbel, U. B., Theegarten, D., Winter, S., Debelian, G. J., et al. (2003). "Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) for Direct Visualization of Bacteria in Periapical Lesions of Asymptomatic Root-Filled Teeth." *Microbiology (Reading)*, 149/5: 1095-1102.
- Tandjung, L., Waltimo, T., Hauser, I., Heide, P., Decker, E. M., & Weiger, R. (2007). "Octenidine in Root Canal and Dentine Disinfection Ex Vivo." *International Endodontic Journal*, 40: 845-851.
- Teles, A. M., Manso, M. C., Pina, C., & Cabeda, J. (2013). "A Review of Microbiological Root Canal Sampling: Updating an Emerging Picture." *Archives of Oral Research*, 9/1: 41-59.
- Trope, M., Rosenberg, E., & Tronstad, L. (1992). "Darkfield Microscopic Spirochete Count in the Differentiation of Endodontic and Periodontal Abscesses." *Journal of Endodontics*, 18: 82-86.
- Unnikrishnan, M. (2024). "Molecular Diagnostic Methods in Endodontics." *Acta Scientific Dental Sciences*, 8: 115-119.
- Vauterin, L. (2006). *Molecular Identification, Systematics and Population Structure of Prokaryotes*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 23-50.
- Ruelle, V., El Moualij, B., Zorzi, W., Ledent, P., & Pauw, E. D. (2004). "Rapid Identification of Environmental Bacterial Strains by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18: 2013-2019.
- Wong, J., Manoil, D., Näsman, P., Belibasakis, G. N., & Neelakantan, P. (2021). "Microbiological Aspects of Root Canal Infections and Disinfection Strategies: An Update Review on the Current Knowledge and Challenges." *Front Oral Health*, 2: 672887.
- Yolcu, E. N., Tartuk, G., Kaya, S., & Eskibağlar, M. (2021). "The Use of Confocal Laser Scanning Microscopy in Endodontics: A Literature Review." *Turk Endod J*, 6(2): 55-60.
- Zapata, R. O., Bramante, C. M., de Moraes, I. G., Bernardineli, N., Gasparoto, T. H., Graeff, M. S., et al. (2008). "Confocal Laser Scanning Microscopy Is Appropriate to Detect Viability of *Enterococcus faecalis* in Infected Dentin." *J Endod*, 34: 1198-201.