

PERIODONTOLOJİDE MİKROBİYOLOJİK TETKİK YÖNTEMLERİ

MICROBIOLOGICAL ASSAYS IN PERIODONTOLOGY

EMEL ÖKTE*

ÖZET

Periodontal hastalıkların başlaması ve ilerlemesinde oral mikroorganizmalar primer bir rol oynamaktadır. Gingival oluk veya periodontal cep içerisindeki bakteri türlerinin en az 300 farklı suş içerdiği tahmin edilmektedir. Böylesine fazla suş çeşidinin varlığı ve bu suşlar arasındaki muhtemel ilişkiler nedeniyle, tüm klinik mikrobiyoloji dalında, periodontal hastalık mikrobiyolojisi en kompleks çalışma alanını oluşturmaktadır. Ayrıca periodontal mikroorganizma kompozisyonunun bireyden bireye farklılık göstermesi ve bakterilerin hem birbirleri, hem de konakçı ile aralarındaki kompleks ilişkiler nedeniyle, günümüzde sadece az sayıda suş ile periodontal hastalıkların bazı formları arasındaki bağlantı ortaya konabilmiştir. Bu bakteri türlerinin bazı periodontopatojenik potansiyelleri tanımlanmışsa da, total periodontal mikroflora hala tam olarak bilinmemekte ve bu nedenle konuyla ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Son yıllarda, periodontal hastalıklı bireylerin floralarının incelenmesinde, bilinen yöntemlerin yanısıra, daha yeni ve daha kolay mikrobiyolojik testler geliştirilerek, kullanılmaya başlanmıştır. Bu makalede periodontal hastalıklı bireylerin ağız floralarının değerlendirilmesinde günümüzde geçerliliğini koruyan bu mikrobiyolojik inceleme yöntemleri hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler : Periodontoloji, mikrobiyal tetkikler

SUMMARY

The oral microbiota plays a primary role in the initiation and progression of periodontal diseases. It is estimated that as many as 300 distinct bacterial species can inhabit the human gingival crevice or periodontal pocket. This large number of species and the interactions among these species makes the microbiology of periodontal disease one of the most complex areas of study in all of clinical microbiology. Because of individual microbial differences and the complex interactions between bacteria and the host and among bacteria, an association has been demonstrated only between some certain species and some forms of periodontal diseases. Although pathogenicity of some microorganisms are defined, there is still a gap in the knowledge of total periodontal microflora and therefore many studies related with this subject are still going on. In recent years new microbiological tests are also used for the evaluation of the flora of periodontitis patients. This paper describes the currently used microbiological evaluation methods.

Key words : Periodontology, microbial assays

Doç. Dr. GÜ Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı

GİRİŞ

Periodontal patojenlerin tanımlanmasında farklı orijinleri olan yöntemler kullanılmaktadır. Birincisi, mikrobiyolojik yöntemlerden geliştirilen faz kontrast ve karanlık alan mikroskopisi, bakterinin selektif ve non-selektif besi yerlerindeki kültürü, immünfloresan mikroskopisi ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gibi yöntemleri kapsamaktadır. Diğer test kategorisi ise, öncelikle medikal patojenlerin teş-

hisi için geliştirilmiş ve periodontal patojenlerin tespiti için daha sonra modifiye edilmişlerdir, nükleik asid prob teknikleri ve son yıllarda da polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi teknikler bu ikinci grupta bulunurlar. Üçüncü grup ise, sadece periodontal patojenler için, bilinen özelliklerine göre, spesifik olarak geliştirilmiştir, bir grup patojenin hedeflendiği benzoyl arginine naphthylamide (BANA) hidroliz yöntemi bu grupta yer almaktadır^{12+29+3031+3u+1,33}.

Faz kontrast ve karanlık alan mikroskopisi:

Bilinen en eski ve basit yöntem, bakteri morfotiplerinin gözlemlendiği faz kontrast mikroskopisidir^{26,27}. Bu yöntemde hastaların plak örnekleri direkt olarak mikroskoba alınarak, mikroorganizmalar şekil, büyüklük ve hareketliliği yönünden incelenir. Bu şekilde yapılan çalışma sonuçlarına göre, periodontal sağlıkta bakteri plağının, az sayıda hareketsiz koklar ile karakterize olduğu belirtilmiş, periodontal hastalıkta ise çok sayıda küçük, orta veya büyük boy spiroketler ve hareketli, kıvrık çubukların varlığı tanımlanmıştır^{26,28}. Ayrıca karanlık alan mikroskopisi ile subgingival plağın korondan apikale doğru bakteri morfotiplerindeki farklılıklar da gösterilmiştir³⁸. Bu yöntem, periodontal tedaviyi takiben, floradaki değişikliklerin incelenmesi ve özellikle hasta motivasyonunda faydalı olmasına rağmen, patojenlerin özel suşlarının tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır. Bu teknik ile mikroskopda izlenen küçük çubukların, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) veya dental plakda yer alan bir başka çubuk şekilli bakterinin olup olmadığının saptanamaması ise tekniğin dezavantajını oluşturmaktadır.

Kültür Yöntemi

Bakterilerin selektif ve non-selektif kültür yöntemi ile incelenmesi mikrobiyolojik yöntemler arasında "altın standart" olarak kabul edilmektedir⁴⁶. Bu yöntemde hastadan alınan plak örnekleri vorteks veya sonikasyon işlemi sonrasında, besi yerlerine ekilerek, aerobik veya anaerobik koşullarda inkübe edilir. Uygun inkübasyon periodunu takiben, kolonilerden subkültür yapılır. Bakteri suşları, koloni ve hücresel morfolojilerine göre, ayrıca gram boyası, şeker fermentasyonu ve biyokimyasal testler gibi yöntemlerle tanımlanırlar. Kültüre edilen suşların daha kolay tanımlanabilmesi amacıyla, enzimatik aktivitelerinin varlığının saptanmasında API ZYM^t Test ve RapiD NH^s sistem gibi ticari tanı kitleri de geliştirilmiştir^{39,56}. Böylece plak örneğindeki, canlı bakterilerin tipleri, sayıları ve rölatif oranları belirlenir. Hastadan alınan örneklerdeki tüm bakterilerin tek bir mikrobiyolojik yön-

temle tanımlanması mümkün olmamasına rağmen, bu yöntemle periodontal patojenler en geniş spektrumda izlenebilirler. Ancak, yanlış-negatif test oranının -minimuma indirilebilmesi için plak örneklerinin çok sayıda bölgeden alınması gerekmektedir²⁰. Ayrıca, periodontal hastalıkların tedavi planlamasında gerekli olan antibiyotik hassasiyet testlerinin uygulanmasında da tercih edilirler. Gelecekte, moleküler biyolojideki PCR gibi metodlar ile, antibiyotik resistansına neden olan plazmid veya diğer moleküllerin tanımlanabilmesi mümkün olsa da, günümüzde halen standart olan metod antimikrobiyal hassasiyet testidir^{60,62}.

Mikroorganizma sayılarının gözlemlenme sınırı, mikrobiyolojik sensitivite olarak adlandırılır³³. Kültür yönteminde hedef suşlar için bu sensitivite, non-selektif besi yeri ile 10⁴-10⁵ ve selektif besi yeri ile de 10³ dür⁵⁹. Mikroorganizmaların kültüre edilmesi, oldukça emek isteyen, pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir. Bir başka problem de, periodontal cepdeki bakterilerin tümünün kültüre edilememesidir, bakteri hücreleri ölü olabilir veya örnek alımı, sonikasyon, oksijenle temas ya da besi yerinde gerekli besin kaynakları yok ise canlılıklarını kaybedebilirler. Bu nedenle, hastadan alınan plak örneğindeki bakterinin kültüre edilememesi yanlış bir negatif cevaba neden olur.

İmmün ve nükleik asit prob teknikleri

Kültür yönteminden farklı olarak, sadece hedeflenen bakteri suşları veya ilişkili suşlar incelenebilir. Bu nedenle tanı, suşa spesifik ajanlar yardımı ile olur. İmmün değerlendirmelerde, suşa spesifik poliklonal antiserum veya monoklonal antikolar, bakteri antijenleri ile antijen-antikor kompleksini oluşturmak üzere muamele edilerek, hedef mikroorganizma aranır¹⁷.

Nükleik asit prob yönteminde ise, hedef mikroorganizmadaki nükleik asit sekanslarının hibridizasyonu için, total genomik, klonlanmış veya sentetik oligonükleotid prob olmak üzere, DNA veya RNA parçacığı kullanılır^{11,42,44}, immün değerlendirmeler ve nükleik asit problemlerinin uygulanmasında, değişik konfigürasyonlar mevcuttur, bunlar arasında immün-

^t API-System, Biomerieux, Montalieu, France
^s Innovative Diagnostic System, Norcross, GA, USA.

floresans mikroskopisi^{34,49,63}, membran immünoassay ve lateks aglütinasyon yöntemleri³⁶ ve ELISA¹³ gibi teknikler kullanılır. Bu tekniklerde, spesifik antikorların bakteri antijenlerine bağlanması, primer antikorun direkt olarak floresan marker ile işaretlenmesi (direkt immünfloresan) veya primer antikora spesifik, floresan sekonder antikor kullanarak (indirekt immünfloresan) uygulanmaktadır⁶¹. ELISA'da primer antikorun izlenmesi, enzimlerin katalizör olarak katıldığı kalometriksel reaksiyon ile sağlanır¹³.

immün ve nükleik asid prob tekniklerinin her ikisinde de kros-reaksiyon gözlemlenebilir. Ör: prob ile *A.actinomycescomitans*'ın incelenmesinde total genomik prob kullanıldığında, taksonomik olarak ilişkili olduğu hemofilus ile kros-reaksiyon izlenebilmektedir⁵², immünfloresan mikroskopisinin avantajı ise, kros-reaksiyon olup olmadığı, hücre morfolojisinin hedef suşa uygunluğu görsel olarak da incelenerek kontrol edilebilir. Diğer mikroorganizmalarla kros-reaksiyon olmaması, mikrobiyolojik spesifite olarak adlandırılır³³.

Periodontal patojenlerin immünolojik olarak saptanmasında farklı konfigürasyonlarda kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri, substrat olarak polisitiren partiküllerin kullanıldığı, partikül konsantrasyon floresan immünoassay (PCFIA)'dir²². Partiküller suşa spesifik antikorlar ile kaplanır ve hazırlanan plak örneği ile reaksiyona sokulur. Floresan sinyal ve takiben hedef bakterilerin muhtemel sayıları florometre kullanılarak saptanır. Ticari olarak geliştirilen ve son yıllarda Avrupa ve Amerika'da piyasaya sunulan immünoassay yöntemi olan Evalusite⁵ test ile klinikte pratik olarak, hedeflenen 3 mikroorganizma aranabilmektedir⁵¹. Bu yöntemde hastadan alınan plak örneğine deterjan katılarak, karıştırılır ve daha sonra filtreden geçirilerek kuyucuklara alınır. Kuyucuklardaki *A. actinomycescomitans*, *P. gingivalis* ve *Prevotella intermedia* suşlarına spesifik, membrana bağlı antikorlar, işlemde geçirilmiş plak örneği ile reaksiyona girer. Membran üzerinde oluşan antijen-antikor kompleksleri, ortama enzimle işaretli ikinci bir antikorla birlikte renkli bir enzim substratı da ilave edilerek saptanır.

§ Eastman Kodak Company, USA.

** Ommigene, Cambridge, MA, USA.

Ayrı noktalar 3 farklı susun varlığını belirler ve reaksiyonda gözlenen renk tonları bakterilerin rölatif olarak sayılarını verir. Sistemde pozitif ve negatif kontroller de mevcuttur ve bu işlem 10 dakika içinde tamamlanabilir. Her 3 suş için de tespit edilebilir mikroorganizma limiti ise yaklaşık olarak 5×10^4 ile 10^5 bakteri hücresidir.

Nükleik asid bazlı değerlendirmelerde, nükleik asid hibridizasyonu koloni^{19,30}, dot-veya slot-blot, ya da checkerboard hibridizasyonu metodları ile yapılmaktadır^{7,9,53}. Bakteriyel DNA'ya hibridize olan prob DNA, işaretlenerek veya reaksiyondaki renk değişikliği ile saptanmaktadır⁶. Checkerboard DNA-DNA hibridizasyonu özellikle oral mikroorganizma çalışmalarında kullanılmak üzere yeni geliştirilen bir tekniktir³⁹. Digoxigenin-işaretli, genomik DNA problemleri kullanılarak, hastadan alınan örneklerdeki canlı ya da cansız mikroorganizmalar ve miktarları da değerlendirilebilir.

Kültür yöntemi ile DNA prob karşılaştırıldığında, suşların saptanmasında prob yöntemi sıklıkla daha üstün bulunmaktadır^{39,45}, immünolojik metodlar ve DNA prob ile mikroorganizmalar canlılıklarını korumasalar da saptanabilmektedir. Tespit edilebilir mikroorganizma limiti ise immünolojik değerlendirmelerde 10^4 , PCFIA ile 10^3 ve DNA prob ile de 10^2 'dir.

Ticari bir laboratuvar olan Ommigene, tek tek veya havuzlama yöntemi ile alınan subgingival plak örneklerindeki 6 farklı periodontal patojenin varlığını ve yarı kantitatif olarak da sayısını saptamak amacıyla DNA prob testlerini piyasaya sunmaktadır. Bu testler arasında yer alan DMDx[®] metodunda ya tüm kromozomal DNA problemleri (*P. gingivalis* ve *P. intermedia* için) veya klonlanmış DNA parçacıkları (*A. actinomycescomitans* için) kullanılır^{14,2}. Bu yöntemle incelenerek şüpheli periodontal patojenler ile periodontitis arasında ilişki bulunmuşsa da⁴⁵, bu yöntemin kültür teknikleri ile korele edildiği çalışmalar sınırlıdır³³. Özellikle *P. gingivalis* için DMDx DNA prob tekniği ile yanlış negatif verilerin elde edilebileceği ve kültür sonuçlarından farklılığı nedeniyle, güvenilirliği tartışmalıdır⁵⁶.

Daha yeni olarak da, MicroProbe firması, ofiste uygulanabilecek ve periodontal patojenlerin yarı kantitatif olarak değerlendirilebildiği, Affirm™ DP' testi olan DNA prob analiz yöntemini geliştirmiştir. Hastadan alınan plak örneğindeki bakteri hücreleri deterjan varlığında ısıtılarak lizise uğratılır. Ekstrakte edilen DNA, çok kuyucuklu bir kasetin ilk kuyucuşuna yerleştirilir. Farklı özelliklere sahip sentetik oligonükleotid ile kaplı partiküller, ör: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* veya *P. intermedia* için, plastik kredi kartı benzeri taşıyıcılar içine yerleştirilir ve daha sonra makinanın robotik koluna tutturularak seri solüsyonlardan geçirilir. Ofiste yapılan bu bir saatlik işlem, laboratuarlarda yapılan nükleik asid hibridizasyonuna ait tüm basamakların bir replikasyonudur. İşlemin sonunda eğer hedeflenen sekanslar saptanabilirse, partiküller beyazdan maviye dönüşür, bu da hastadan alınan örnekte aranan bakterinin varlığını gösterir. Sentetik oligonükleotidler, bakteri hücrelerinden çok sayıda kopyalanmış olan, suşa-spesifik sekansda 16S ribosomal RNA ile hibridizasyonu sağlarlar. Çok sayıda kopyanın varlığı bu yöntemin sensitivitesini arttırır". *Bacteroides forsythus* için geliştirilen sentetik oligonükleotid probun, kültür yöntemi ile karşılaştırıldığında %100 sensitif ve %100 spesifik olduğu gösterilmiştir¹.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR ise daha yeni geliştirilen nükleik asid-bazlı bir değerlendirme yöntemidir^{14,48} ve bu yöntemi geliştiren Kary Mullis, Nobel ödülünü kazanmıştır⁴⁹. Bir tek mikroorganizmayı bile saptayabildiği için tüm mikrobiyolojik metodlar arasında en yüksek sensitiviteye sahiptir. PCR da DNA segmentlerinin taranmasında anahtar nokta, genellikle 18-28 baz uzunluğunda olan sentetik oligonükleotidlerden oluşan 2 DNA primerinin seçilmesidir. Bu primerler amplifiye edilecek olan DNA bölgesine göre seçilirler. Seçilen primerler, hastadan alınan plak örneğindeki çift zincirli DNA'yı içeren solüsyona ilave edilirler. Bu karışım, 90-95°C ısıtıldığında, çift zincirli DNA denatüre olarak tek zincirli DNA karışımı elde edilir. Isının 40-60 °C 'a indirilmesi ile DNA primerlerinin, tek zincirli

örnek DNA'daki spesifik bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Isının bu kez 70-75 °C'a çıkarılmasıyla tek zincirli DNA'lara bağlanmış olan 2 primerin ekstansiyonu veya primerlerin arasının dolması sağlanır. Yeni oluşturulan bu DNA zincirinin, örnek DNA'dan denatürasyonu için de ısı tekrar 90-95 °C'a çıkartılır. Denatürasyon, hibridizasyon ve ekstansiyon işlemlerinin tekrarı sonucunda DNA segmentinin kopyaları elde edilir. PCR ile 16S-23S ribosomal genleri arasındaki bölgeye ait primerler kullanılarak *A. actinomycetemcomitans* varlığı araştırılmıştır¹⁸. Bu yöntem ile az sayıda da olsa *A. actinomycetemcomitans* varlığının saptanmasının yanısıra, amplifiye edilen bölgenin restriksiyon analizi ile epidemiyolojik çalışmalar için suşlar arası farklılıklar da tanımlanabilir.

Tek bir reaksiyonda, multiple primerlerin, reverse primer ile kombine kullanımı ise multipleks PCR olarak adlandırılmaktadır^{16,54}. Amaç hastadan alınan tek bir örnekte birden fazla mikroorganizmanın incelenebilmesidir. Bilinen PCR'da ise, tek DNA geni amplifiye edilebilmekte, bu nedenle aranan her bakteri için ayrı reaksiyon gerekmektedir. Tran ve ark.⁵¹, geliştirdikleri modifiye multipleks yöntemi ile, hastalardan alınan plak örneklerinde mevcut en az 5 *A. actinomycetemcomitans* ve 33 *P. gingivalis* hücrelerinin bile saptanabildiğini belirtmişlerdir.

PCR'ın varyasyonu olan, arbitrarly primed polymerase chain reaction (AP-PCR)da ise DNA amplifikasyonu için primer olarak, tanımlanmış sekanslar yerine, rastgele sekanslardan seçilen DNA segmentleri kullanılır. Bu yöntemde bakteriyel enfeksiyonların kaynağını bulabilmek amacıyla aynı türe ait suşlar arasındaki farklılıklar izlenebilir. AP-PCR'ın en büyük avantajı DNA sekanslarının bilinmediği suşlara da uygulanabilmesidir⁴³. PCR reaksiyon solüsyonunda yer alan rastgele primerler, bakteriyel DNA'nın spesifik bölgelerine hibridize olurlar ve bu bölgeleri amplifiye ederler. Amplifikasyonlar termal cykler'da yapılır. PCR reaksiyonu ile amplifiye edilen DNA segmentleri agaroz jel elektroforezde ayrıştırılır, ve suşlar arasındaki bant dizilimi veya amplitipleri karşılaştırılır. AP-PCR, ör: *Streptococcus*²⁴, *Staphylococcus pyogenes* ve *Staphylococcus aureus*⁵⁸ ve *A. actinomycetemcomitans*^{2,40,41,43} gibi patojenlerin transmisyonunu izlemede kullanılmaktadır.

Enzim Teknikleri

Periodontal patojenlerin hızlı bir şekilde izlenebilmesi amacıyla immünolojik ve nükleik asid problemlerinin yanısıra, bazı enzim teknikleri de mevcuttur. Genelde bu testler ile spesifik bakteri suşları taranmaz, ancak tamamıyla olmasa da büyük bir çoğunluğu periodontal patojenler tarafından üretilen periodontal doku yıkım enzimlerinin varlığı ortaya konur. Kullanılan enzimler kollejenaz, peptidaz, tiripsin-benzeri enzimler, nötral proteazlar ve elastazlardır. Ör: kollejenaz hem konakçı hücrelerce, hem de çeşitli bakteriler tarafından üretilir. Periodontal uygulamalarda bakteri kollejenazı, konakçı kollejenazından jel elektroforez ile ayırd edilebilir ancak klinik olarak uygulanabilirliği sınırlıdır⁴⁷.

Bu alanda ticari olarak mevcut olan ve klinikte pratik olarak 15 dakika içinde uygulanabilecek Perio Scan" yönteminde trypsin-benzeri enzim kullanılmaktadır. *B. forsythus*, *P. gingivalis* ve *Treponema denticola* gibi bir grup periodontal patojen ve patojen olmayan bazı *Capnocytophaga* suşları da bu enzimi üretmektedirler²³. Bu enzimin varlığı, sentetik bir substratın (BANA) degradasyonu ile kolorometrik olarak değerlendirilir. Kartın üzerindeki mavi-siyah renk pozitif bir testi gösterir^{29,30,32,34}. Bu yöntem, *P. gingivalis* ve *T. denticola* için uygulanan ELISA yöntemi ile % 55-73, ve sondlamada kanama, cep derinliği gibi periodontal hastalıktaki klinik ölçümlerle de % 51-70 oranında uyumludur^{30,32}. Enzim teknikleri, hızlı ve ucuz olsalar da, tekniğin dezavantajı, reaksiyonun hangi suş ile geliştiğinin tam olarak bilinmemesidir²⁶.

Periodontal patojenlerde transmisyonun izlenmesi

Periodontal enfeksiyonların kişiden kişiye geçebileceği de belirtilmektedir⁶². Ayrıca, aynı türe ait tüm bakteri suşlarının da eşit virulans veya patojenik potansiyele sahip olmadıkları bilinmektedir⁶. Bu nedenle bakteriler aynı türde olsa ancak bir kısmı hastalık oluşturabilmektedir^{8,20}. Bu durum periodontal patojenlerin varlığına rağmen periodontal ataçman kay-

binin görülmemesini açıklamaktadır. Suşlar arası farklılıklar, biotipleme veya serotipleme ile ayırd edilmektedir³⁷, ancak bu yöntemlerle yeterli ayırım yapılamayabilir. Multilokus enzim elektroforezi³ ve antibiyotipleme de bu amaçla kullanılan yöntemlerdir. Ayrıca, restriksiyon endonükleaz analizi (REA) de suşlar arası farklılığın tespitinde kullanılmaktadır. REA ile subgingival plağın, mikrobiyal ekolojisinin yanısıra, transmisyon şekli, veya suşların nasıl kazanıldığı da incelenebilmektedir. Bu teknikte, bakteri susundan DNA izole edilir, uygun restriksiyon enzimi ile muamele edilir. Restriksiyon enzimleri, nükleotid baz çiftlerinin sekanlarına göre, DNA'ı spesifik bölgelerden kestikleri için, sonuçta elektroforezde bakterinin DNA dizilimi izlenir. Eğer 2 susun DNA band paternleri farklı ise, bu 2 susun genetik olarak farklı oldukları düşünülür. REA ile bakterinin tüm kromozomal yapısı incelenmiş olur⁵⁷.

Bakteri transmisyonunun incelenmesinde yukarıda anlatılmış olan AP-PCR yöntemi de kullanılmaktadır^{40,41,43,55}. Ayrıca hassas bir DNA tekniği olan Ribotiplerede de bakteri suşlarının genetik farklılıklarının ortaya çıkarılması hedeflenir^{43,55}. Ancak zaman alıcı ve zor bir yöntemdir.

Günümüzde periodontolojide dental plağın incelenmesine yönelik olan tetkik yöntemlerinin çoğu zahmetli olmaları nedeniyle genellikle araştırma seviyesinde kullanılmaktadır. Bu nedenle periodontal hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde ileri adımlar atılabilmesi için, klinikte pratik kullanımı olan daha yeni teknikler arayışına gidilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ali RW, Velcescu C, Jivanescu MC, Lofthus B, Skaug N. Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 23: 133-139, 1996.
2. Asikainen S, Chen C, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol Immunol*, 10: 65-68, 1995.
3. Bonta Y, Zambon JJ, Neiders M, Genco RJ. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque: comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res*, 64: 793-798, 1985.

Oral B Laboratories, Edwood City, CA, USA.

4. Bragd L, Dahlen G, VVikström M, Slols J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. *J Clin PerioOontol*, 14: 95-99, 1987.
5. Caugant DA, Selander RK, Olsen I. Differentiation between *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus* and *Haemophilus paraphrophilus* by multilocus enzyme electrophoresis. *J Gen Microbiol*, 136: 2135-2141, 1990.
6. Chuba PJ, Pelz K, Krekeler G, De Isele TS, Gobel U. Synthetic oligodeoxynucleotide probes for the rapid detection of bacteria associated with human periodontitis. *J Gen Microbiol*, 134: 1931-1938, 1988.
7. Colombo AP, Haffajee AD, Dewhirst FE, Paster BJ, Smith CM, Cugini MA, Socransky SS. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*, 25: 169-180, 1998.
8. De Buyser M, Morvan A, Grimont P, El Solh N. Characterization of *Staphylococcus* species by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J Gen Microbiol*, 135: 989-999, 1989.
9. Dibart S, Skobe Z, Snapp KR, Socransky SS, Smith CM, Kent R. Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally diseased patients using DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol*, 13: 30-35, 1998.
10. Dirienzo JM, Cornell S, Kazoroski L, Slots J. Probe-specific DNA fingerprinting applied to the epidemiology of localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 5:49-55, 1990.
11. Dix K, VVatanabe SM, McArdle S, Lee DI, Randolph C, Moncla B, Schwartz DE. Species-specific oligodeoxynucleotide probes for the identification of periodontal bacteria. *J Clin Microbiol*, 28: 319-323, 1990.
12. Drake CW, Hunt RJ, Beck JD, Zambon JJ. The distribution and interrelationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and BANA scores among older adults. *J Periodontol*, 64: 89-94, 1993.
13. Ebersole JL, Frey DE, Taubman MA, Smith DJ, Socransky SS, Tanner ACR. Serological identification of oral *Bacteroides* spp. by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 19: 639-644, 1984.
14. Engleberg NC, Eisenstein BI. Detection of microbial nucleic acids for diagnostic purposes. *Annu Rev Med*, 43: 147-155, 1992.
15. French CK, Savitt ED, Simon SL, Eklund SM, Chen MC, Klotz LC, Vaccaro KK. DNA probe detection of periodontal pathogens. *Oral Microbiol Immunol*, 1: 58-62, 1986.
16. Garcia L, Tercero JC, Legido B, Ramos JA, Alemany J, Sanz M. Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* by multiplex PCR. *J Periodontal Res*, 33: 59-64, 1998.
17. Gmür R, Guggenheim B. Monoclonal antibodies for the detection of periodontopathic bacteria. *Archs Oral Biol*, 35: 145S-151S, 1990.
18. Griffen AL, Leys EJ, Fuerst PA. Strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*, 7: 240-243, 1992.
19. Gunaratnam M, Smith GL, Socransky SS, Smith CM, Haffajee AD. Enumeration of subgingival species on primary isolation plates using colony lifts. *Oral Microbiol Immunol*, 7: 14-18, 1992.
20. Haffajee AD, Socransky SS. Effect of sampling strategy on the false-negative rate for detection of selected subgingival species. *Oral Microbiol Immunol*, 7: 57-59, 1992.
21. Han N, Hoover CI, Winkler JR, Clifford YNG, Armitage GC. Identification of genomic clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol*, 29: 1574- 1578, 1991.
22. Jolly ME, Wang CH, Ekenberg SJ, Zuelko MS, Kelso DM. Particle concentration fluorescence immunoassay (PCFIA): a new, rapid immunoassay technique with high sensitivity. *J Immunol Methods*, 67: 21-35, 1984.
23. Laughon BE, Syed SA, Loesche WJ. API ZYM system for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp., and spirochetes of oral origin. *J Clin Microbiol*, 15: 97-102, 1982.
24. Li Y, Caulfield PW. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol Immunol*, 13: 17-22, 1998.
25. Listgarten MA. Direct microscopy of periodontal pathogens. *Oral microbiol Immunol*, 1: 31-36, 1986.
26. Listgarten MA. Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. *J Periodontol*, 63: Suppl, 332-337, 1992.
27. Listgarten MA, Hellden L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol*, 5: 115-132, 1978.
28. Listgarten MA, Levin S. Positive correlation between the proportions of subgingival spirochetes and motile bacteria and susceptibility of human subjects to periodontal deterioration. *J Clin Periodontol*, 8: 122-138, 1981.
29. Loesche WJ. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *J Periodontol*. 63: Suppl. 1102-1109, 1992.

30. Loesche WJ, Bretz WA, Lopatin D, Stoll J, Rau CF, Hillenborg KL, Killoy WJ, Drisko CL, Williams R, Weber HP. Multi-center clinical evaluation of a chairside method for detecting certain periodontopathic bacteria in periodontal disease. *J Periodontol*. 61: 189-196, 1990.
31. Loesche WJ, Giordano J, Hujoel PP. The utility of the BANA test for monitoring anaerobic infections due to spirochetes (*Treponema denticola*) in periodontal disease. *J Dent Res*. 69: 1696-1702, 1990.
32. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol*. 30: 427-433, 1992.
33. Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, van Poperin N, Hujoel PP. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference Standard? *J Clin Microbiol*. 30: 418-426, 1992.
34. Loesche WJ, Syed SA, Stoll J. Trypsin-like activity in subgingival plaque. A diagnostic marker for spirochetes and periodontal disease? *J Periodontol*. 58: 266-273, 1987.
35. Mutlu S, Cebeci I, Kantarcı A. Peridontal hastalıklarda mikrobiyal etyolojik faktörlerin ve konak yanıtının incelenmesinde kullanılan laboratuvar teknikleri. TPD 4. Sempozyumu, 87-99, 1994.
36. Nisengard RJ, Mikulski I, McDuffie DM, Bronson P. Development of a rapid latex agglutination test for periodontal pathogens. *J Periodontol*. 63: 611-617, 1992.
37. Notten FJ, Nieman FH, Mixt FH. Antibiotypes of *Bacteroides gingivalis* assessed by antimicrobial disks and multivariate analysis. *J Clin Microbiol*. 22: 1020-1024, 1985.
38. Omar AA, Newman HN, Bulman J, Osborn J. Darkground microscopy of subgingival plaque from the top to the bottom of the periodontal pocket. *J Clin Periodontol*. 17: 364-370, 1990.
39. Papapanou PN, Madianos PN, Dahlen G, Sandros J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *Eur J Oral Sci*. 105: 389-396, 1997.
40. Preus HR, Haraszthy VI, Zambon JJ, Genco RJ. Differentiation of strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 31: 2773-2776, 1993.
41. Preus HR, Zambon JJ, Dunford RG, Genco RJ. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis. *J Periodontol*. 65: 2-7, 1994.
42. Priest FG, Cormenza AR, Tindall B. *Bacterial Diversity and Systematics*. Plenum Press, New York and London, 1994.
43. Saarela M, Asikainen S, Chen C, Alaluusua S, Slots J. Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction and ribotyping for subtyping *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Anaerobe*. 1:97-102, 1995.
44. Savitt ED, Keville MW, Peros WJ. DNA probes in the diagnosis of periodontal microorganisms. *Archs Oral Biol*. 35: 153S-159S, 1990.
45. Savitt ED, Strzempko MN, Vaccaro KK, Peros WJ, French CK. Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. *J Periodontol*. 59: 431-433, 1988.
46. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol*. 1: 48-55, 1986.
47. Slots J. Detection of colonies of *Bacteroides gingivalis* by a rapid fluorescence assay for trypsin-like activity. *Oral Microbiol Immunol*. 2: 139-141, 1987.
48. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction *Clin Infect Dis*. 20: S304-307, 1995.
49. Slots J, Hafström C, Rosling B, Dahlen G. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival smears by the indirect fluorescent-antibody technique. *J Periodontol Res*. 20: 613-620, 1985.
50. Smith GL, Socransky SS, Sansone C. "Reverse" DNA hybridization method for the rapid identification of subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*. 4: 141-145, 1989.
51. Snyder B, Zambon JJ, Reynolds HS, Ryerson CC, Genco RJ. Clinical significance of the Evalusite periodontal test: sensitivity in adult periodontitis. *J Dent Res*. 73: 305, 1994.
52. Strzempko MN, Simon SL, French CK, Lippke JA, Raia FF, Savitt ED, Vaccaro KK. A cross-reactivity study of whole genomic DNA probes for *Haemophilus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides intermedius*, and *Bacteroides gingivalis*. *J Dent Res*. 66: 1543-1546, 1987.
53. Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol*. 25: 85-98, 1998.
54. Tran SD, Rudney JD. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol*. 34: 2674-2678, 1996.

55. Van Steenberg TJM, Menard C, Tjihof CJ, Mouton C, De Graaf J. Comparison of three molecular typing methods in studies of transmission of Porphyromonas gingivalis. J Med Microbiol, 39: 416-421, 1993.
56. Van Steenberg TJM, Timmerman MF, Mikx FH, de Quincey G, van der Weijden GA, van der Velden U, de Graaf J. Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. J Clin Periodontol, 23: 955-959, 1996.
57. Van Steenberg TJM, Van der Velden U, Abbas F, de Graaf J. Microflora and bacterial DNA restriction enzyme analysis in young adults with periodontitis. J Periodontol, 62: 235-241, 1991.
58. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res, 18: 7213-7218, 1990.
59. Wolff LF, Anderson L, Sandberg GP, Reither L, Binsfeld CA, Corinaldesi G, Shelburne CE. Bacterial concentration fluorescence immunoassay (BCFIA) for the detection of periodontopathogens in plaque. J Periodontol, 63: 093-1101, 1992.
60. Zambon JJ. Principles of evaluation of the diagnostic value of subgingival bacteria. Ann Periodontol, 2: 138-148, 1997.
61. Zambon JJ, Bochacki V, Genco RJ. Immunological assays for putative periodontal pathogens. Oral Microbiol Immunol, 1: 39-44, 1986.
62. Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. Periodontology 2000, 7: 69-82, 1995.
63. Zambon JJ, Reynolds HS, Chen P, Genco RJ. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque. Comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of Bacteroides gingivalis. J Periodontol, 56: 32-40, 1985.

Yazışma adresi

Doç. Dr. Emel Ökte
Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Periodontoloji Anabilim Dalı
06510 Emek-Ankara