

KÖK KANAL PATOJENLERİNİN TESPİTİNDE KULLANILAN TANI YÖNTEMLERİ DIAGNOSTIC METHODS USED IN THE DETECTION OF ROOT CANAL PATHOGENS

Dt. Emre ÇİÇEK*

Yrd.Doç.Dr Bulem ÜREYEN KAYA*

Makale Kodu/Article code: 1140

Makale Gönderilme tarihi: 03.04.2013

Kabul Tarihi: 22.08.2013

ÖZET

Günümüzde kök kanal enfeksiyonlarının polimikrobiyal olduğu ve enfekte bir kök kanalında sayısı 3-12 arasında değişebilen bakteri türü bulunduğu bilinmektedir. Endodontide ağırlı alevlenmeler, periapikal yıkım ve inatçı enfeksiyonlar ile ilişkili spesifik bakteriler ve bu bakterilerin tanımlanması son derece önemli ve güncel konulardır. Kök kanal patojenlerinin tespit edilmesinde mikroskopi, kültür yöntemleri ve antibiyotik duyarlılık testleri, immünolojik ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde moleküler yöntemlerle denatürasyon, primerin bağlanması ve uzama olarak adlandırılan üç aşama ile DNA'nın in vitro replikasyonu sağlanmakta yani PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile bir genin milyonlarca kopyası elde edilebilmektedir. Bu derlemede amaç kök kanal patojenlerinin saptanmasında kullanılan yöntemler hakkında bilgi vermek ve moleküler genetik yöntemlerin tanıtılmasıdır. Özellikle mikrobiyal tanımlama için kullanılacak gen hedefleri, PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve spesifik kullanımlar için geliştirilen türevleri, endodontik mikrobiyal tanımlama açısından PZR kullanımının avantaj ve dezavantajlarının tartışılması hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Endodontik mikrobiyoloji, kök kanal patojenleri, Polimeraz zincir reaksiyonu, tanı yöntemleri

ABSTRACT

Nowadays, it is known that endodontic infections are polymicrobial and there are 3-12 kinds of bacteria in an infected root canal. Flare-ups, periapical destructions and persistent endodontic infections related bacteria and the identification of these bacteria are highly important and topical issues in endodontics. Microscopy, culture and antibiotic susceptibility testing, immunological and molecular biological methods have been used to detect pathogens in root canal. Today, *in vitro* DNA replication is provided by molecular methods in three stages named denaturation, primer binding and extension of primers, thus millions of copies of a gene can be achieved by PCR. The aim of this review is to provide information about the methods used to determine the root canal pathogens and to introduce the molecular genetic methods. Especially, it is aimed to discuss the gene targets for microbial identification, PCR and its derivatives for specific use, the advantages and disadvantages of PCR for microbial identification.

Keywords: Endodontic microbiology, diagnostic methods, polymerase chain reaction, root canal pathogens.

* Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Restoratif Diş Tedavisi AD

** Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Restoratif Diş Tedavisi AD



Endodontik hastalıklara neden olan patojenlerin tanımlanabilmesi kök kanal tedavisinin başarı oranını arttırmıştır. Geçmişten günümüze patojen bakterilerin tespit edilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde moleküler biyoloji gibi çeşitli alanlardaki gelişmeler sayesinde bir örnekte az sayıda (1-10) bakteri bulunsa dahi tespitleri kısa sürede yapılabilmektedir¹. Kök kanal patojenlerinin tespit edilmesinde mikroskopi, kültür yöntemleri ve antibiyotik duyarlılık testleri, immünolojik ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılmaktadır².

Mikroskopi

Mikrobiyal örneklerin mikroskopik incelenmesi kolay, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Ancak pek çok türün farklı morfolojik biçimlerde (pleomorfik) olabilmesi ve araştırmacıların öznel yorumlarının önemi, bakteriyel morfoloji ile ilgili mikroskopik bulguların güvenilirliğini azaltmaktadır. Mikroskopi, mikroorganizmaların tespitinde sınırlı duyarlılık ve özgüllük sağlamaktadır. Duyarlılığının sınırlı olması mikroskop altında incelenebilmesi için nispeten fazla miktarlarda (örn; 104 bakteriyel hücre/ sıvı mL) mikrobiyal hücreye ihtiyaç duymasından ileri gelmektedir³.

Mikrobiyolojik örnekler doğrudan mikroskop altında incelenebildiği gibi çeşitli yöntemlerle (gram boyama, floresan boyama, gümüş boyama) boyanarak da incelenebilir. Gram boyama mikrobiyolojide en fazla kullanılan yöntemlerden birisidir⁴.

Kültür

Kültür yöntemi, endodontik mikrofloranın incelenmesinde kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Kültür, uygun çevre koşullarını sağlayarak mikroorganizmaların laboratuvar ortamında çoğaltılması işlemidir. Mikrobiyal patojenler için gerekli unsurlar canlı sistemler (örneğin; bir konakta veya hücre kültüründe büyüme) veya yapay sistemler tarafından temin edilebilir. Yapay sistemler çoğu bakteriyel ve fungal enfeksiyonların mikrobiyolojik teşhisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların bu yapay ortamda yaşayabilmeleri için besin, ısı, nem, tuz konsantrasyonu, atmosfer, pH gibi uygun fizikokimyasal şartlara sahip olması gerekmektedir⁵.

Kültür işlemleri için örnekler hastadan alınır ve uygun ortamda laboratuvar ulaştırılır. Çeşitli besiyerlerine örneklerin ekimi yapılır ve aerobik veya anaerobik şartlarda kulture edilir. Uygun inkübasyon

periyodundan sonra koloniler gram boyama şekilleri, koloni ve hücre morfoloji, oksijen toleransı ve metabolik son ürün analizlerini içeren pek çok açıdan tanımlanır⁶. Bu teknik ile bir örnek içerisinde pek çok tür tanımlanabilir. Ayrıca bakterilerin mikrobiyal duyarlılıklarının incelenmesine de olanak sağlar. Bu avantajlarının yanında bu yöntem ile birçok mikroorganizma zor üretilmekte veya hiç üretilmemektedir, bu nedenle yanlış negatif sonuçlar oluşabilmektedir. Bakterilerin fenotipik özellikleri nedeniyle düşük özgüllüğe sahiptir ve bu nedenle mikrobiyal türlerin birbirinden ayrılmasında belirgin sınırlamaları bulunur. Düşük sayıdaki ve zor üreyen mikroorganizmaları hesaplamada düşük duyarlılığa sahiptir. Örneklerin taşınma tipine göre sonuçlar değişkenlik gösterebilir ve çoğu zaman diagnostik bir sonuç almak için çok yavaş kalmaktadır⁷⁻⁹.

Ayrıca bazı mikroorganizmalar çeşitli nedenlerden dolayı üretilmemektedir^{2,10,11}. Bunlar:

- 1) Suni kültür ortamları bakteriler için gereken besinleri ve büyüme faktörlerini içermemektedir.
- 2) Kültür ortamının kendisi bazı türler için toksik olup büyümeyi engelleyebilir.
- 3) Örnekteki diğer mikroorganizmalar, hedef türlerin üremelerini engelleyecek maddeler salgılayabilir.
- 4) Bir tür büyümek için başka bir türe ihtiyaç duyabilir.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Bu testler; hastalıkların teşhis ve tedavisinde, epidemiyolojik araştırmalarda ve yeni antimikrobiale ilaçların geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında disk difüzyon testi, dilüsyon yöntemleri ve E-test gibi çeşitli duyarlılık testleri uygulanmaktadır¹².

Disk difüzyon testi mikrobiyoloji laboratuvarlarında çoğunlukla tercih edilen kalitatif bir yöntemdir. Bakterilerin besiyerine ekimi yapıldıktan sonra, antibiyotik emdirilmiş diskler besiyerine yerleştirilir ve mikroorganizmaların üremesi (inkübasyon) için beklenir. Disklerin etrafında oluşan bakterisiz alanın çapı (inhibisyon zon çapı) ölçülerek bakterinin o antibiyotiğe duyarlılığı değerlendirilir^{13,14}. Disk difüzyon testlerinin en önemli avantajları ekonomik, çok denenmiş ve standardize edilmiş bir yöntem olmasıdır. Bu testte sonuçlar "duyarlı", "dirençli" ve "orta dirençli" şeklinde bildirilir¹².



E-test, antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin agar da belirlenebildiği kantitatif bir testtir. Test edilecek mikroorganizmalar agar üzerine ekilir. Çeşitli konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş şeritler agar üzerine yerleştirilir ve inkübasyon için beklenir. İnkübasyon sonrası şeritlerin etrafında damla şeklinde bir görüntü oluşur. Bu şeklin şeritle kesiştiği yer MİK değeridir¹⁵. Antibiyotik duyarlılık sonuçları bakterilerin MİK değerleri ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu (NCCLS) tarafından oluşturulan MİK standartlarının karşılaştırılmasıyla yorumlanır¹⁶.

İmmünojenik Yöntemler

İmmünojenik yöntemler hedef türleri doğrudan tespit etmek için spesifik mikrobiyal antijenleri tanıyan antikorların kullanıldığı testlerdir. Bir türe özel konak immunoglobulinleri hedef alan antikorlar dolaylı tespit analizi için kullanılabilir. Reaksiyon doğrudan ve dolaylı immunfloresan, flow sitometri ve enzim bağlı immünosorbent test (ELISA) gibi çeşitli tekniklerle gösterilebilir¹⁷. Kültür yöntemine bağlı tekniklerle karşılaştırıldığında hassasiyet açısından aralarında anlamlı bir farklılık yoktur. Bu yöntemlerin özellikle enfeksiyon oluşturan bakterilerin izole edilmesinin ve tanımlanmasının zor olduğu veya önceki enfeksiyonun doğrulanması gereken durumlarda kullanılması yararlıdır^{7, 9}.

ELISA, duyarlılığının yüksek olmasından dolayı endodontik araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır^{18,19}. Bu yöntemde antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen aramak mümkündür. Antikor aranacak ise bilinen antijen reaksiyonunun gerçekleşeceği kabın yüzeyine yapıştırılır ve hasta örneği kaba ilave edilir. Gerekli bekleme süresi sonrası yıkama işlemi sonunda ortamda aranan antikor varsa antijene yapışacaktır. Sonrasında bir enzimle birleştirilmiş başka bir antikor örneğe gönderilir. Antikorlar doğrudan ilgili oldukları antijene bağlanırlar ve ardından antikorla birleştirilmiş olan enzimin substratı gönderilir. Antijene bağlanmış olan antikorun üzerindeki enzim bu substratı başka bir maddeye çevirir ve bu durum genelde bir renk değişikliğine neden olur. Renk değişikliği aranan hedefin varlığına işaret eder¹⁰.

Doğrudan immunofloresans yönteminde incelenecek örnek içinde aranan antijeni tanıyan ve floresan boya ile birleştirilmiş antikorlar kullanılır. Antikorlar örneğe gönderilir ve örnekler floresan ışık veren mikroskop altında incelenir. İmmunofloresan

miroskopisi hücrelerin morfolojik yapılarını görüntüleyebildiğinden dolayı diğer immünojenik metotlara göre bir avantaj sağlayabilir, diğer organizmaların antikorlarının çapraz reaksiyonunun sebep olduğu yanlış-pozitif sonuçları azaltabilir ancak; ELISA spesifik mikroorganizmaların küçük miktarlarını tespit etmede daha hassas bir yöntemdir¹⁰.

Moleküler Genetik Yöntemler

Mikrobiyal çeşitliliğin ne kadar fazla olduğu kültürden bağımsız yöntemlerin kullanıldığı farklı alanlardaki pek çok çalışma ile gösterilmiştir²⁰⁻²². Gerçekte mikroorganizmaların kültür ortamında üretilen üyeleri tüm popülasyonun %1'inden daha azdır^{2,23,24}. Moleküler çalışmalar ağız ortamındaki bakterilerin yaklaşık %40-50'si²⁵ ile bağırsaktaki bakterilerin yaklaşık % 70'inin^{26,27} şimdiye kadar kültüre edilememiş bakteriler olduğunu göstermiştir.

Moleküler tanı yöntemleri sayesinde hem kültürü yapılabilen hem de yapılamayan bakteri türleri saptanabilir. Mikrobiyal tanımlama bakımından diğer yöntemlere göre avantajları şu şekilde sıralanabilir: Bu yöntemler yüksek özgüllük gösterir ve mikrobiyal türlerin kesin tanımlanmasına olanak sağlar, kültür yöntemine ve diğer moleküler biyolojik yöntemlere göre daha duyarlıdır, mikroorganizmaları tanımlamak amacıyla onların canlılıklarına gerek duymaz, genellikle daha kısa zamanda sonuç verirler, antimikrobiyal tedavi sırasında da kullanılabilirler, örnek miktarının az olması sorun yaratmaz, epidemiyolojik çalışmalar için çok sayıda örnek kullanıldığında örnekler düşük sıcaklıklarda saklanıp bir seferde incelenebilir^{28, 29}.

Günümüzde, araştırılan soruya bağlı olarak farklılık gösteren çok sayıda moleküler yöntem kullanılmaktadır. Geniş spektrumlu polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) belirli bir ortamdaki mikrobiyal çeşitliliği araştırmak için kullanılabilir. Mikrobiyal komünite yapısı Denatüre Edici Gradient Jel Elektrofrezisi (DGGE) ve Terminal Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (T-RFLP) gibi tekniklerle analiz edilebilir. **Floresan İn Situ Hibridizasyon** (FISH) belirli türlerin miktarını ölçebilir ve dokulardaki dağılımı hakkında bilgi verebilir. İç içe (Nested) PZR, Çoklu (Multipleks) PZR ve Gerçek Zamanlı (Real-Time) PZR gibi diğer uygulamalar da hedef türlerin tespitinde birçok klinik örneği taramak için kullanılabilir².



Mikrobiyal Tanımlama İçin Gen Hedefleri

Moleküler yöntemler mikrobiyal tanımlama için mikroorganizmanın kimliği hakkında bilgileri içeren belirli genlerden faydalanmaktadır. Bu nedenle, hedef genin tanımlanacak mikroorganizmaya özgü bir bölge içermesi gerekmektedir. Woese tarafından yapılan öncü çalışmaların ardından bütün canlı formlarında bulunan ribozomal RNA (rRNA) moleküllerini kodlayan genler (rDNA) bu canlıların tanımlanmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır³⁰.

Ribozom, ribozomal RNA ve proteinlerden oluşan ve hücrenin protein sentez yerlerine verilen isimdir. *Escherichia coli*'de, ribozomların yaklaşık üçte ikisi rRNA ve geri kalanı ise proteindir³¹. Ribozomların boyutları, partiküllerin ultra santrifüjlerde ne kadar hızla çöktüğünü gösteren Svedberg birimleri (S) ile ifade edilir. Bakteriler ve arkeler (prokaryotlar) 30S ve 50S'lik alt birimlerden oluşan 70S'lik ribozomlara sahiptir. 30S'lik alt birim yaklaşık 1540 nükleotitten oluşan 16S rRNA molekülüne sahiptir. 50S'lik alt birim yaklaşık 2900 nükleotid içeren 23S rRNA molekülü ile 120 nükleotit içeren 5S rRNA moleküllerine sahiptir³². Büyük alt birim genleri (23S ve 25S rDNA) ve küçük alt birim genleri (16S ve 18S rDNA) mikrobiyal tanımlama ve sınıflamada sıklıkla kullanılmaktadır. Küçük alt birim rDNA tüm canlı sistemlerinde evrimsel olarak en iyi korunmuş makromoleküller arasında yer almaktadır³¹.

Bütün mikroorganizmalarda bulunması, yeterli bilgiyi verecek kadar uzun, dizileme işlemi için yeterince kısa olması gibi özellikleri küçük alt birim rDNA'yı kullanmanın başlıca avantajlarını oluşturur³¹. Küçük alt birim rDNA bir türden diğerine değişiklik gösteren bölgeler (değişken bölgeler) ile belli bir nüfusun tüm üyelerinde aynı olan bölgeleri (korunmuş bölgeler) içerir. Değişken bölgeler bakterilerin türleri ve cinsleri hakkında en fazla bilgilere sahip bölgelerdir. Arkeler ve bakterilerin 16S rRNA'sı ve diğer ökaryotlar ve mantarların 18S rRNA'sı geniş bir şekilde incelenmiş ve yaşayan organizmaların filogenetik ilişkilerini tespit etmek için kullanılmıştır. Ek olarak kültür bağımsız yöntemleri kullanarak rDNA'dan elde edilen veriler bakteri türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması için kullanılabilir².

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Kary Mullis tarafından 1983 yılında bilim dünyasına tanıtılan PZR ile bir genden o genin milyonlarca kopyası elde edilebilmektedir³³. Bir

organizmadan herhangi bir geni izole etmek PZR ile mümkün olmaktadır³⁴. Yöntem, DNA'nın *in vitro* replikasyonu ve basit reaksiyonların tekrarlayan döngülerinden oluşmaktadır. Bir PZR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması ve uzama olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Öncelikle sıcaklık 92 °C'ye yükseltilerek çift sarmallı DNA'nın tek sarmala denatüre olması sağlanır (denatürasyon). Isı düşürüldüğünde oligonükleotid dizileri (primer) hedef DNA dizisindeki tamamlayıcı eşlerine yapışır. Primerler kopyalanacak DNA bölgesinin limitlerini tanımlar. Sıcaklığın arttırılması (72 °C) ile DNA polimeraz enzimi primerlere bağlanır, nükleotidler ikinci sarmalı oluşturmak için ana sarmala eklenir. Sentezlenen bu ürünler sonraki döngüler için şablon olarak rol oynar. Yeni döngülerle DNA'nın pek çok kopyası elde edilir ve bu özellik DNA hedeflerini tespit etmek için üstün bir hassaslık sağlar. PZR, mikrobiyal tanımlamada kullanılan diğer yöntemlere göre 10-100 kat daha hassastır^{1,9}. Hedeflenen PZR ürünlerinin saptanması ve doğrulanması için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında en yaygın kullanılanlarından biri agaroz jel elektroforezidir¹.

PZR teknolojisinin bilim dünyasına tanıtılmasıyla birçok türevi geliştirilmiştir. Bunlar arasında en sık kullanılanları:

İç-İçe PZR (Nested PZR)

İç-içe PZR ikinci bir PZR reaksiyonunda şablon olarak ilk PZR çoğaltma (amplifikasyon) ürünlerini kullanılmaktadır. İlk PZR ürünlerine ayrı bir primer set kullanılarak ikinci bir çoğaltma işlemi yapılır. Bu yöntem döngülerin toplam sayısının fazla olması nedeniyle geleneksel PZR yöntemine göre daha hassastır. PZR sonuçlarının ikinci halkasında kullanılan primer seti ilave özgüllük sağlamaktadır³⁵. İç-içe PZR'ın en büyük dezavantajı, çoğaltılmış ilk ürünlerin ikinci bir reaksiyon tüpüne taşınması sırasında oluşabilecek yüksek kontaminasyon ihtimalidir ve bu durumdan kaçınmak için özel önlemler alınması gerekebilir³⁶.

Ters Transkriptaz PZR (RT-PZR)

RT-PZR, ters transkriptaz enziminden yararlanarak bir RNA parçasından tamamlayıcı DNA sentezlemek ve RNA hedeflerini çoğaltmak için geliştirilmiştir. Çoğu RT-PZR iki adımlı bir yöntem kullanılmaktadır. İlk adımda ters transkriptaz RNA'yı tek parçalı tamamlayıcı DNA'ya dönüştürür. İkinci adımda,



tamamlayıcı DNA'nın ikinci parçasını oluşturmak için PZR primerleri, DNA polimeraz ve nükleotidler ilave edilir. İki parçalı DNA molekülü oluştuktan sonra artık geleneksel PZR ile çoğaltma işlemi yapılabilir³⁷.

Çoklu PZR (Multipleks PZR)

PZR yöntemlerinin büyük çoğunluğu tek bir mikrobiyal türün tespitine odaklanmaktadır. Çoklu PZR'de ise farklı hedefler için iki veya daha fazla primer seti aynı reaksiyon tüpünde sunulabilir. Böylece çoklu PZR'de aynı anda farklı mikrobiyal türlerin tespiti yapılabilir. Bu yöntemle türlerin tespiti için zamandan ve maliyetten kazanç sağlanır. Çoklu PZR'de kullanılan primerler tamamlayıcı parçaların eksik ve benzer yapışma sıcaklıklarına sahip olabilmelerinden dolayı dikkatli bir şekilde tasarlanmalıdır^{38, 39}.

Gerçek Zamanlı PZR (Real-Time PZR)

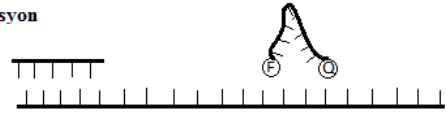
Çoğu PZR yöntemi kalitatif veya yarı kantitatifdir. Gerçek zamanlı PZR ise bundan farklı olarak reaksiyon boyunca ürünlerin devamlı olarak ölçülmesi ile karakterizedir⁴⁰. Gerçek zamanlı PZR, DNA hedeflerini tespit etmek ve çoğaltmak için *TaqMan* probu ve *molecular beacon* gibi işaretli oligonükleotid dizilerinden faydalanır⁴¹. *TaqMan* probu 20-30 baz uzunluğunda özel işaretli bir oligonükleotid dizisidir⁴². *TaqMan* probu 5' ucunda floresan boya (*reporter*), 3' ucunda ise baskılayıcı (*quencher*) boya içerir. Primerlerin uzama işlemi sırasında taq DNA polimeraz enzimi quencher boya ile reporter boyayı, hedef bölgesine yapışmış olan *TaqMan* probundan ayırır. Bu durum floresan yayılımı ile sonuçlanır ve cihaz floresan yayılımını ölçer² (Şekil 1).

Moleküler beacon saç tokası benzer yapıda oligonükleotid probudur. Probonun kolunun bir ucuna floresan işaretleyici diğer ucuna baskılayıcı (*quencher*) takılır. Serbest moleküler işaretçiler solüsyonda probun kol dizileri birbirine yakın durmaktadır. Bu durum floresan boyayı baskılamaktadır. Moleküler işaretçiler hedeflerine bağlandıklarında floresan boya ve quencher birbirinden ayrılır ve floresan yayılımı başlar⁴³ (Şekil 2).

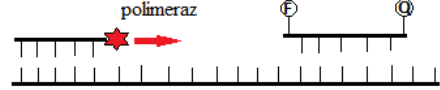
Her PZR döngüsü ile floresan salınımı monitörize edilerek reaksiyonun ilerlemesi gerçek zamanlı olarak kaydedilir ve örnekteki DNA miktarı ölçülür. Bu sayede her döngü sırasında PZR ürünleri ölçülmüş olur. PZR ürünlerinin doğrudan ölçülmesi reaksiyon aşamalarının gözlenmesine olanak

sağlamaktadır⁴⁴. Gerçek zamanlı PZR hedef türlerin miktarının yanı sıra klinik örneklerdeki toplam bakteri sayısını da verebilir. Testin hızlı olması (30-40 dk), agaroz jel kullanımına gerek duymadan doğrudan doğruya PZR ürünlerini ölçme ve teşhis etme yeteneği ve nükleik asitlerin kontaminasyonunun sınırlı olması bu yöntemin başlıca avantajlarıdır⁴⁵.

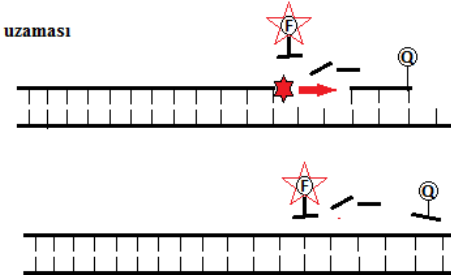
1) Denatürasyon



2) Primerlerin yapışması



3) Primerleri uzaması



TaqMan probu 5' ucunda floresan boya (*reporter*), 3' ucunda ise baskılayıcı (*quencher*) boya içerir. Primerlerin uzama işlemi sırasında taq DNA polimeraz enzimi quencher boya ile reporter boyayı, hedef bölgesine yapışmış olan *TaqMan* probundan ayırır. Bu durum floresan yayılımı ile sonuçlanır ve cihaz floresan yayılımını aynı anda ölçer.

Şekil 1. *Taqman* yöntemi



Moleküler işaretçiler hedeflerine bağlandıklarında floresan boya ve quencher birbirinden ayrılır ve bu durum floresan yayılımına sebep olur.

Şekil 2. *Moleküler beacon* yöntemi

Geniş Spektrumlu PZR (Broad-Range PZR)

Geniş spektrumlu PZR ile bir örnekteki bakteri çeşitliliği tespit edilebilir ve tanımlanabilir. Bu yönüyle

moleküler yöntemlerin aksine kültür yöntemine benzer⁴⁶. Geniş spektrumlu PZR örnekteki beklenmeyen türleri tespit edebilir ve bu konuda kültür yönteminden çok daha etkili ve hızlıdır. Doğrudan kültüre edilemeyen veya zor kültüre edilen bakteriyel patojenlerin tespit edimesine olanak tanır^{11,47,48}.

PZR teknolojisi kültür yöntemiyle ilgili kısıtlamaların üstesinden gelebilmek için kullanılmaktadır. Bununla birlikte eksiksiz değerlerdir. PZR teknolojisinin başlıca dezavantajları²:

1. Çoğu PZR analizi hedef mikroorganizmaları örneklerdeki miktarlarından ziyade niteliksel (kalitatif) olarak tespit etmeyi amaçlar. Ancak gerçek zamanlı PZR ile niceleyici (kantitatif) sonuçlar elde edilebilir.
2. Çoğu PZR analizi bir seferde sadece bir veya birkaç türü (çoklu PZR) tespit edebilir. Ancak geniş spektrumlu PZR bir komünitedeki hemen hemen tüm türlerin kimliği hakkında bilgi sağlayabilir.
3. Çoğu PZR analizi sadece hedef türleri tespit eder ve dolayısıyla beklenmedik türleri tespit etmede başarısız olur, ancak geniş spektrumlu PZR bu durumun üstesinden gelebilir.
4. Zahmetli ve pahalı bir yöntemdir.
5. Canlı hücrelerle birlikte ölü hücreler de tespit edilir.
6. Mantarlar gibi kalın hücre duvarına sahip mikroorganizmaların parçalanması ve bunun sonucu olarak DNA salınımı için ilave adımlara ihtiyaç duyulabilir.
7. PZR işlemleri sırasında bulaşmış DNA'lar sebebiyle yanlış pozitif sonuçlar meydana gelebilir. Çoğaltma ürünlerinin taşınması sırasında kontaminasyon ihtimaline karşı ilave önlemlerin alınması gerekebilir.
8. Klinik örneklerde bulunan nükleazlar ve enzim inhibitörleri nedeniyle yanlış negatif sonuçlar meydana gelebilir. Özellikle de hedef türlerin sayısı az ise küçük örnek hacimlerinin analizleri yanlış negatif sonuçlara neden olabilir.

PZR'nin yüksek hassasiyeti bazen dezavantaj yaratabilmektedir. Çünkü bir örnekteki çok az sayıdaki hücreyi dahi tespit edebilme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle hastalığın patogeneğinde etkinliği olmayan bakteriler dahi etkinmiş gibi algılanabilir. Endodontik bir hastalığın başlaması için gerekli mikroorganizma sayısı hakkında bir kanıt bulunmamaktadır. Endodontik enfeksiyonlar karışık (mixed) enfeksiyonlardır. Bakteri türleri hastalığın seyrinde farklı rol oynayabilirler ve

enfeksiyonun farklı aşamalarında baskın olabilirler. Teorik olarak kök kanalındaki tüm bakteri türlerinin endodontik patojen olarak dikkate alınması önemlidir²⁸. Bu nedenle kök kanalına kolonize olmuş tüm türlerin tespit edilmesi yüksek hassasiyete sahip bu yöntem ile mümkün olmaktadır. Ayrıca, gerçek zamanlı PZR gibi kantitatif moleküler yöntemlerin kullanımı enfeksiyon sürecinde belirli türlerin rolünü anlamamıza imkan tanımaktadır.

Herhangi bir yöntem ile bir örnekteki ölü hücrelerin tespit edilebilmesi bazı avantaj ve dezavantajları birlikte taşımaktadır. Örnekleme, taşıma ve izolasyon prosedürleri sırasında bakteriler ölmüş olsa dahi tespit edilmesi avantaj sağlarken^{49,50}, enfeksiyon alanında daha önceden ölmüş bakterilerin tespit edilerek yanlış pozitif sonuca neden olması ise yöntemde dezavantaja neden olur⁵¹. Pratikte, endodontik enfeksiyonlarda ölü hücrelerin DNA'larının tespit edilme olasılığı olmasına rağmen bu ihtimal düşüktür çünkü canlı hücrelerden ve hücre ölümüyle salınan Dnaaz enzimleri ortamdaki serbest DNA'yı parçalayabilir⁵². PZR'nin bu dezavantajını ortadan kaldırabilmek için hücre tanımlamasında daha büyük DNA dizileri kullanılabilir. Ayrıca RNA'lar DNA ile karşılaştırıldığında daha kararsız yapıda ve daha kısa yarılanma ömrüne sahip olmalarından dolayı daha hızlı bir şekilde bozulur⁵¹. Bu yüzden Ters Transkriptaz PZR vasıtasıyla RNA ve mRNA'yı hedef alan testler kullanılması canlı hücrelerin tespitinde daha güvenilir olmaktadır².

Sonuç olarak, endodontik patojenlerin tespit edilmesinde geleneksel olarak kullanılan mikroskopi ve kültür yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen, hassasiyet ve duyarlılıklarının daha üstün olduğu kanıtlanmış moleküler genetik yöntemlerin günümüzde kullanılması önemlidir. Ancak tüm bu yöntemlerin çalışma prensiplerinin anlaşılması eksik veya kusurlu kaldıkları durumların bilinmesi ve bu durumda alternatif yöntemlerin kullanılması önemli bir konudur. İmmunoloji ve moleküler genetik konularındaki gelişmeler endodontik patojenleri ve hastalık oluşturma sürecindeki görevlerini daha net olarak aydınlatacaktır.

KAYNAKLAR

1. Siqueira JF Jr, Roças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. J Dent 2003;31:333-9



2. Siqueira JF Jr, Roças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1-current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod* 2005;31(6):411-23.
3. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999;29(3):475-86; quiz 487-8.
4. Akgün N. Mikrobiyoloji kitabı. Ed. Nuray SERTER. Eskişehir, Anadolu üniversitesi yayınları, 1996; 257-75
5. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986;1:48-57.
6. Engelkirk PG, Duben-Engelkirk J, Dowell VR Jr. Principles and practice of clinical anaerobic bacteriology. Belmont, CA: Star Publishing Company; 1992.
7. Sixou M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis* 2003;9:54-62.
8. Tang YW, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem* 1997; 43: 2021-38.
9. Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontol* 2000 1995;7:69-82.
10. Baumgartner JC. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. *Endodontic Topics* 2004; 7: 35-51.
11. Wade W. Unculturable bacteria: the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med* 2002;95:81-3.
12. Gür D. Bakteriler için kullanılan antibiyotik duyarlılık testleri. *ANKEM Derg.* 1999; 13 (No:3): 322-324
13. Acar JF, Goldstein FW: Disk susceptibility test, "V Lorian, ed: Antibiotic in laboratory Medicine, 4. Baskı"s.1, Williams and Wilkins, Baltimore 1996.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standarts for Antimicrobial Disk Susceptibility Test-Sixth edition; Approved Standard M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa; 1997.
15. Baker CN, Stoker SA, Culver DH, Thornsberry CP: Comparison of E-test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J Clin Microbiol.* 1991 Mar;29:533-8.
16. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg* 2002; 94: 746-755.
17. Sanz M, Lau L, Herrera D ve ark. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetem-comitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004;31:1034-47.
18. Shah HN, Collins DM. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol* 1990; 40: 205-8.
19. Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Detection of immunoglobulins from explant cultures of periapical lesions. *J Endod* 1991; 17: 105-110
20. Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 1997;276:734-40.
21. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 2002;46:535-48.
22. Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4250-5
23. Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1991;29:2838-42.
24. Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science* 1999;284:1308-10
25. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, ve ark. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770-83.
26. Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4799-807.
27. Wilson KH, Blichington RB. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:2273-8.



28. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Top* 2003;6:3–28
29. Baumgartner JC, Hutter JW, Siqueira JF. Endodontic Microbiology and Treatment of Infections. In: Cohen S, Hargreaves KM, ed. *Pathways of the Pulp*. 2. Baskı . Canada; Mosby Elsevier; 2006. 580-607.
30. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987;51:221–71.
31. Atlas RM. Principles of microbiology, 2. Baskı. Dubuque: WCB Publishers, 1997
32. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of micro-organisms, 9. Baskı. Upper Saddle River, NJ; Prentice-Hall, 2000
33. Mullis KB, Ferre ´ F, Gibbs RA. The Polymerase Chain Reaction. Boston: Birkhauser, 1994.
34. Lee HC, Tirnady F. Blood Evidence. How DNA is Revolutionizing the Way We Solve Crimes. Cambridge, MA: Perseus Publishing, 2003.
35. Haqqi TM, Sarkar G, David CS, Sommer SS. Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1988;16:11844
36. McPherson MJ, Moller SG. PCR. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000;67-87.
37. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. baskı. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001;8.46–8.53.
38. Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR Primer. A Laboratory Manual. Plain View, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995
39. Hayden RT. In vitro nucleic acid amplification techniques. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J ve ark. ed. *Molecular Microbiology. Diagnostic Principles and Practice*. Washington, DC: ASM Press, 2004;43–69.
40. Belgrader P, Benett W, Hadley D, Richards J, Stratton P, Mariella R Jr, Milanovich F. PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science* 1999;284:449–50.
41. Cashion AK, Driscoll CJ, Sabek O. Emerging genetic technologies in clinical and research settings. *Biol Res Nurs* 2004;5:159–67
42. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986–94
43. Mhlanga MM, Malmberg L. Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. *Methods* 2001;25:463–71.
44. Wittwer CT, Kuskawa N. Real-time PCR. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, ve ark. ed. *Molecular Microbiology. Diagnostic Principles and Practice*. Washington, DC: ASM Press, 2004;71–84
45. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol* 2004;2:151–9.
46. Maiwald M. Broad-range PCR for detection and identification of bacteria. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, ve ark. ed. *Molecular Microbiology. Diagnostic Principles and Practice*. Washington, DC: ASM Press, 2004;379–90.
47. Relman DA. Emerging infections and newly-recognised pathogens. *Neth J Med* 1997;50:216–20.
48. Pitt TL, Saunders NA. Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium. *J Clin Pathol* 2000;53:71–5.
49. Wang R-F, Cao W-W, Cerniglia CE. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:1242–7
50. Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, ve ark. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* 2000;38:32–9
51. Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Meth* 2003;53:175–83.
52. Leduc A, Grenier D, Mayrand D. Outer membrane-associated deoxyribonuclease activity of *Porphyromonas gingivalis*. *Anaerobe* 1995;1:129–34

Yazışma Adresi

Arş.Gör.Dt. Emre ÇİÇEK
Department of Endodontic
Faculty of Dentistry
Suleyman Demirel University
ISPARTA/TURKEY
Tel: 0533 7254358 Faks: 0 246 2370607
E-mail address: dt.emrecicek@hotmail.com

