

Bölüm 4

ENDODONTİK MİKROBİYOTANIN TANIMLANMASINDA KÜLTÜR VE MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ

Cihan KÜDEN¹

GİRİŞ

Ağız boşluğunun mikrobiyotası pulpa ve periapikal hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. Tarihsel olarak, mikroskobu icadı ile dişler üzerinden alınan örneklerde mikroorganizmaların varlığı gösterilebilmiş olmasına rağmen endodontik enfeksiyonlar ve bakteriler arasındaki ilk neden-sonuç ilişkisi Dr. Miller tarafından 1890 yılında ortaya konmuştur (1). Bundan sonra gelişen ve bir asrı kapsayan araştırmalardan sonra, mikrobiyal büyüme, yayılma, biyofilm oluşturma ve virülans gibi endodontik enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmaların bilinmeyen özellikleri ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte, araştırmacılar mikrobiyotanın mutasyon, çekirdek algılama ve bilgi aktarımı yeteneklerinden dolayı, geniş bir aralığa sahip bu bakteri türlerinin hem bilim insanları hem de klinisyenler için ortaya koyduğu değişikliklere ve zorluklara ayak uydurabilmesi için baskı altındadır. Çeşitli moleküler biyolojik araştırma tekniklerinin geliştirilmesi ve yaygınlaşması, diş hekimliğinin ve ilgili tıp alanlarının, ağız mikrobiyolojisinin geniş dünyasına yetişebilmeyi sağlamıştır.

1. ORAL VE ENDODONTİK MİKROBİYOTA

İnsanların ağız boşluğunda yüzlerce bakteri türü yaşar ve bunlardan bazıları diş çürükleri, periodontitis ve kök kanal enfeksiyonları başta olmak üzere ağız hastalıklarının gelişiminde kilit rol oynar. Mantarlar, arkeler ve virüsler oral mikrobiyal ortam çeşitliliğine mevcut olmalarına rağmen bakteriler endodontik enfeksiyonlarda en sık görülen mikroorganizmalardır (2). Ağız boşluğu, çeşitli ve değişken bir dizi bakteri suşu tarafından kolonize edilmiş olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte bazı taksonların sağlıklı insan ağız boşluklarında yaygın

¹ Öğr. Gör. Dr., Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD., ckuden@cu.edu.tr.

olduğu gözlemlenmiştir. Bunlara Streptococcus, Veillonella, Granulicatella, Neisseria, Haemophilus, Corynebacterium, Rothia, Actinomyces, Prevotella, Capnocytophaga, Porphyromonas ve Fusobacterium dahil edilebilir (3, 4). Ancak bu cinslerin bazılarının kök kanal sistemi gibi önceden steril olan ağız bölgelerinde hastalıklara neden olabilecek fırsatçı patojenler içerdiği de göz ardı edilemez. Ayrıca, bazı türler birden fazla oral bölgede bulunurken, örneklenen bölgelerin her biri karakteristik mikrobiyom profillerine sahiptir ve muhtemelen her bölgenin mikro-ortamını yansıtan genel oral mikrobiyomun alt kümelerini barındırır (3). Sağlıklı ağız mikrobiyotasının yanı sıra, çeşitli araştırmalar belirli ağız hastalıklarının mikrobiyomları araştırılmıştır. Bu çalışmalar, hastalıklı bölgelerin sağlıklı mikrobiyotaya kıyasla farklı bakterileri barındırdığını göstermiştir. Ayrıca, hastalıklı bölgelerde tedavi etkinliğini etkileyebilecek mikro-ortamlar da bulunabileceği rapor edilmiştir (5). Fusobacterium, Treponema, Tannerella, Porphyromonas ve Prevotella gibi fırsatçı patojenik cinsler hastalıklı örneklerde daha yaygındır (2, 6). Bununla birlikte, tek bir organizmanın belirli hastalıklarla tutarlı bir şekilde ilişkili olduğu bildirilmemiştir. Tersine, ağız hastalıklarıyla ilişkilendirilen bakteriler de sağlıklı deneklerde gözlenmiştir (7).

Kök kanal hastalıkları polimikrobiyal enfeksiyonlar tarafından başlatılır. Bu bakteri topluluklarının mikrobiyal bileşimi, gelişen kök kanal ekolojisi ve türler arası etkileşimler tarafından desteklenen zamanla gelişir. Enfeksiyonun ilk evreleri sırasında, pulpa daha yüksek oksijen gerilimi ve ağız boşluğundan bol miktarda besin maddesi sunarak fakültatif bakterilerin gelişmesine izin verir. Bu aynı zamanda daha fazla bakteri sayımına ve genel çeşitliliğe yol açar (8). Öte yandan, daha yerleşik enfeksiyonlarda, özellikle kök kanalının apikal derinliklerinde bulunan karbonhidrattan yoksun, ancak protein açısından zengin, anaerobik ortam, asakkarolitik, zorunlu anaerobları destekler (2, 9, 10). Mikrobiyal eliminasyon kök kanal dezenfektanlarının eklenmesi ve tedavinin başlaması sırasında oksijen basıncındaki değişiklikler gibi pulpa ekolojisindeki iyatrojenik değişikliklerden de etkilenebilen dinamik bir süreçtir. Bu, zorlu ortamlarda gelişen ve kalıcı enfeksiyonlar oluşturma potansiyeline sahip belirli türlerin seçici baskısına katkıda bulunabilir (11, 12). Bakterilerin varlığını sürdürmesini sağlayan birkaç olası mekanizma, biyofilm oluşturma, dentin tübüllerine nüfuz etme ve dentin tübülünde kalma, besin maddesi tükenmiş ortamlarda hayatta kalma, konakçı yanıtını değiştirebilen virülans faktörlerine sahip olma ve antimikrobiyal ajanlara direnç gösterme yeteneklerini içermektedir (13, 14).

2. ENDODONTİK MİKROORGANİZMALARIN KÜLTÜRE DAYALI ANALİZİ

2.1. Kültür yöntemleri

Geleneksel olarak mikrobiyolojik kültür, endodontik mikrobiyotanın incelenmesi için tercih edilen bir araç olmuştur. Kültür, mikroorganizmaların laboratuvar ortamında uygun ortam koşulları sağlanarak çoğaltılması işlemidir. Mikrobiyal patojenler için gerekli bileşenler, canlı sistemler (örneğin, bir hayvan konakçısında veya hücre kültüründe büyüme) veya yapay sistemler (gerekli besinleri ve büyüme için koşulları toplayarak) sağlanabilir. Yapay sistemler, insanları etkileyen çoğu bakteriyel ve fungal enfeksiyonların mikrobiyolojik teşhisi için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mikroorganizmaların yapay ortamda çoğalabilmeleri için, gerekli besin maddelerine ve sıcaklık, nem, atmosfer, tuz konsantrasyonu ve pH dahil olmak üzere uygun fizikokimyasal koşullara sahip olmaları gerekir (15).

Kültür analizleri aşağıdaki adımları içerir (16):

- numune toplama ve taşıma
- dağıtma
- seyreltme
- yetiştirme
- izolasyon ve tanımlama.

Oral numuneler toplanır ve canlılığı koruyan, ancak destekleyici olmayan, anaerobik bir ortamda laboratuvara taşınır. Daha sonra sonikasyon veya vorteks karıştırma işlemleri ile dağıtılır, seyreltilir, çeşitli agar ortamlarında aerobik veya anaerobik koşullar altında yetiştirilir. Uygun bir kuluçka döneminden sonra, bireysel koloniler alt kültüre alınır ve koloni ve hücre morfoloji, Gram boyama modeli, oksijen toleransı, kapsamlı biyokimyasal karakterizasyon ve gaz-sıvı kromatografisiyle metabolik son ürün analizini içeren parametrelere dayalı çoklu fenotip analizi ile tanımlanır. Jel elektroforezi, ultraviyole ışık altında floresan ve seçilen antibiyotiklere duyarlılık testleri ile incelenen dış hücresel membran protein profili, bazı türlerin tanımlanması için gerekli olabilir (17). Önceden oluşturulmuş enzimleri test eden pazarlanan paketlenmiş kitler de çeşitli türlerin hızlı tanımlanmasında kullanılmaktadır.

Endodontik enfeksiyonların kültür analizleri, apikal periodontitisin etiolojisi, farklı klinik koşullarda endodontik mikrobiyotanın bileşimi, mikrobiyal eliminasyonda tedavi prosedürlerinin etkileri, endodontik mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılıkları hakkında önemli bir bilgi birikimi sağlamıştır. Ancak kültür yönteminin avantajları olduğu gibi endodontik mikrobiyotayı tanımlama-

sında yeterlilik açısından çeşitli dezavantajlara sahiptir ve Tablo 1'de gösterilmiştir. Kültür yöntemlerinin bazı önemli sınırlamaları, endodontik mikrobiyotanın kapsamlı bir analizini başarmayı zorlaştırmaktadır. Birçok mikrobiyal türün kültürlenmesindeki veya tanımlanmasındaki zorluklar özel bir öneme sahiptir.

Tablo 1. Kültür yöntemlerinin avantajları ve sınırlamaları (18, 19).

Avantajları	Sınırlamaları
1. Geniş kapsamlı doğa, beklenmedik türlerin tanımlanması	1. Çok sayıda mevcut mikrobiyal türün kültürlenmesinin imkansızlığı
2. Numunelerdeki canlı mikroorganizmaların miktarının belirlenmesine izin verir	2. Tüm canlı mikroorganizmalar geri kazanılamaz
3. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesine izin verir	3. Mikroorganizmalar bir kez izole edildikten sonra bir dizi teknik kullanılarak tanımlama gerektirir.
4. Fizyolojik çalışmalar mümkündür	4. Belirsiz fenotipik davranışa sahip suşların yanlış tanımlanması
5. Patojenite çalışmaları mümkündür	5. Düşük hassasiyet
6. Yaygın olarak bulunur	6. Numune taşıma prosedürüne sıkı bağımlılık
	7. Numunelerin hemen işlenmesi gerekir
	8. Pahalı, zaman alıcı ve zahmetli
	9. Özgüllük, ortamın bileşimine ve mikrobiyologun deneyimine bağlıdır.
	10. Zorunlu anaerobları izole etmek için kapsamlı uzmanlık ve özel ekipman gereklidir
	11. Çoğu anaerobik bakteriyi tanımlamak için uzun süreler gerekebilir (haftalar)

2.2. Kültür yöntemlerindeki sınırlamalar

Mikroorganizmalar beslenme ve fizyolojik ihtiyaçlarının karşılandığı doğal ortamlarında yaşar ve çoğalırlar. Bu mikroorganizmaların başarılı bir şekilde yetiştirilmesi, laboratuvarında büyüme gereksinimlerini belirleme ve yeniden üretme yeteneğimize dayanır. Ancak tüm mikroorganizmalar yapay koşullar altında yetiştirilemez ve bunun nedeni, çoğu mikroorganizmanın beslenme ve fizyolojik ihtiyaçlarının hala tam olarak bilinmemesi veya uygun ortamın oluşturulmamasıdır. Kültüre bağlı yaklaşımlarla iyi karakterize edildiği düşünülen, ancak kültürden bağımsız tekniklerle değerlendirildiğinde çok farklı olduğu kanıtlanan mikrobiyal ekosistemler bulunmaktadır (20). Kültürden bağımsız yöntemler kullanılarak birçok sucül ve karasal ortamın araştırılması ile, bu sistemlerin ekilebilir üyelerinin toplam mevcut popülasyonun %1'inden daha azını temsil ettiğini ortaya çıkarılmıştır (21, 22). Bu rakamlar genellikle mikroskopla doğrudan gözlemlenen bakteri sayısı ve türleri ile aynı numuneden yetiştirilen bakteri sayısı ve türleri ile karşılaştırılarak hesaplanır. Doğrudan gözlemlenen ve ekilebilir bakteriler arasındaki tutarsızlık, büyük plate sayısı anomalisi olarak adlandırılmıştır

(23). Yetiştirilebilir azınlığa karşı güçlü bir önyargı olduğu düşünüldüğünde bu sorun ön plana çıkmaktadır - mikrobiyologların %99,9'undan fazlasının ekilebilir mikroorganizmaların %1'i üzerinde çalıştığı tahmin edilmektedir (24).

16S rRNA geninin amplifikasyonunu takiben klonlama ve dizilemeyi içeren kültürden bağımsız moleküler biyoloji yöntemleri, son zamanlarda çeşitli ortamlarda bakteri çeşitliliğini belirlemek için kullanılmıştır. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, tanınan bakteri filumlarının sayısı 1987'de 11 iken Mayıs 2020 itibariyle, LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) tarafından 41 bakteri filumu resmen kabul edilmiştir ve bunların yarısının henüz ekilmemiş temsilcileri bulunmaktadır (25, 26). Kültürlenebilir üyeler içeren filumlardan birkaçı çok sayıda ekilebilir taksona sahipken, büyük çoğunluğu filumdaki çeşitliliğin tam spektrumunu temsil etmek için çok az sayıda yetiştirilebilir temsilci içermektedir (27, 28).

Bakteriler yetiştirilemiyorsa, fenotipe dayalı yöntemlerle tanımlanamazlar. Pek çok bakterinin üremesi için gerekli olan gereksinimlerden nispeten habersiz kalırken, kültüre dayalı olmayan tanımlama yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu, klinik örnekleri mikrobiyolojik olarak incelerken birçok patojenin fark edilmeden geçmesini önleyebilir.

Belirli bir türün yetiştirilmemiş olmasının, bu türün sonsuza kadar yetiştirilmesinin imkansız kalacağı anlamına gelmediğini belirtmekte fayda var. Örneğin, çok sayıda zorunlu anaerobik bakteri 100 yıl önce kültürlenememiştir, ancak anaerobik kültür tekniklerindeki daha sonraki gelişmeler bu sorunun çözülmesine büyük ölçüde yardımcı olmuştur. Çoğu ortamda bulunan çok çeşitli mikroorganizmaları izole etmek için tek bir yöntemin veya kültür ortamının uygun olmadığı varsayılmalıdır (29). Birçoğu klinik olarak önemli olabilen, daha önce ekilmemiş bakterilerin yetiştirilmesine izin veren spesifik yaklaşımlar ve kültür ortamları geliştirmeye yönelik artan bir eğilim vardır. Stratejiler, örneklerin alındığı doğal ortama mümkün olduğunca yakın kültür koşullarının uygulanmasına dayanabilir. Bu amacı gerçekleştirmek için son zamanlarda gösterilen çabalar, aşağıdakileri dahil ederek bir miktar başarı elde edilebilmiştir: Az miktarda besin eklenmiş veya hiç eklenmemiş agar besiyeri kullanımı (geleneksel kültür prosedürleri genellikle bir sisteme aşırı besin sağlar, bu da daha az besin gerektiren bakterilerin aşırı büyümesiyle sonuçlanır); nispeten uzun kuluçka süreleri (30 günden fazla); ve doğal çevreye özgü maddelerin yapay büyüme ortamına dahil edilmesi (30, 31).

3. MOLEKÜLER ANALİZ TEKNİKLERİ

Artık kültüre bağlı tekniklerin mikrobiyal popülasyonların çeşitliliğini güçlü bir şekilde yeterli olmadığı kabul edilmiştir. Henüz ekilmemiş mikrobiyal dünyanın, ekilebilir dünyayı çok aştığının kabul edilmesi, mikrobiyolojide büyük bir devrime neden olmuştur.

Moleküler biyoloji yöntemlerinin tıbbi mikrobiyolojiye önemli bir katkısı, önceden bilinmeyen insan patojenlerinin tanımlanmasıyla ilgilidir (32). Ayrıca moleküler çalışmalar, ağız boşluğundaki bakteri türlerinin %50'den fazlasının (3, 33, 34) ve bağırsak ve kolonda olan bakteri türlerinden yaklaşık %80'inin (35) bilinmeyen ve henüz ekilmemiş bakteriler olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, insan mikrobiyotasının ekilmemiş veya keşfedilememiş bu oranında bir dizi karakterize edilmemiş patojenin bulunabileceğini anlamak önemli olarak karşımıza çıkmaktadır. Mikroorganizmaların incelenmesi için çok sayıda moleküler biyoloji yöntemi vardır ve belirli bir yaklaşımın seçimi, ele alınan ve araştırılan sorulara bağlıdır.

3.1. Mikrobiyal Tanımlama İçin Gen Hedefleri

Her canlı organizma, yalnızca kendi türünde benzersiz ve spesifik olarak bulunan belirli genler içinde diziler taşımaktadır. Bir tür içindeki her bir birey aynı zamanda kendi imza DNA dizilerine sahiptir. Bu benzersiz diziler, moleküler biyoloji yöntemlerini kullanarak her türün ve hatta bir tür içindeki her bir bireyin tanımlanmasını mümkün kılan önemli genomik bilgileri getirir.

Mikrobiyal tanımlama için moleküler yaklaşımlar, mikrobiyal kimlik hakkında açıklayıcı bilgiler içeren belirli genlere dayanmaktadır. İdeal olarak, mikrobiyal tanımlama için hedef olarak kullanılacak bir gen, her türe özgü bölgeleri içermelidir. Housekeeping fonksiyonlarını kodlayan genler, filogenetik sınıflandırmayı çıkarmak için tercih edilmektedir, çünkü bunlar genellikle her yerde bulunurlar ve zamanla yavaş yavaş gelişen fonksiyonel sabitlik sergilemeye eğilimlidirler (36, 37).

Bakteriyel tanımlama için birkaç gen, hedef olarak seçilmiştir. Bu genlerin tümü olmasa da bazıları, bakteri türlerinin büyük bir çoğunluğu tarafından paylaşılır. Bakteriyel tanımlama için 16S rRNA ve 23S rRNA genleri, 16S-23S rRNA geni dahili kopyalanmış dizileri, RNA polimerazın β -alt birimini kodlayan *rpoB* geni, ısı şoku proteinini kodlayan *groEL* geni, DNA girazın β -alt birimini kodlayan *gyrB* geni, *tuf* geni ve homolog rekombinasyon kodlayan *recA* geni önerilen genler arasında yer almaktadır (38, 39).

Woese (36) tarafından yapılan öncü çalışmaların ardından, yaşamın tüm hücrel formlarında bulunan rRNA moleküllerini kodlayan genler, yani Bacteria, Archaea ve Eucarya alanları, neredeyse tüm canlı organizmaların kapsamlı tanımlanması ve bunların arasındaki doğal ilişkilerinin çıkarımı için yaygın olarak kullanılmıştır. rRNA, hücrenin oldukça karmaşık translasyon aparatının merkezi bileşenidir ve bu translasyon fonksiyonunun aslına uygunluğu ve sürdürülmesi kritik olduğundan, rRNA'nın bazı bölgeleri o kadar yüksek oranda korunur ki, farklı organizmalardan gelen genleri hizalamak için kullanılabilirler (36). Kodun

çevrilmesi için daha az kritik olan diğer bölgeler, daha az seçici baskı altındadır ve her türün benzersiz bir diziyeye sahip olması için yeterli çeşitlilik gösterir. Mikrobiyal tanımlama için küçük alt birim rRNA genlerini kullanmanın avantajları, tüm organizmalarda bulunması, oldukça bilgilendirici olacak kadar uzun ve kolayca dizilenebilecek kadar kısa olması (özellikle otomatik DNA dizileycilerin ortaya çıkmasıyla), ve filogenetik ilişkileri ortaya çıkarmak için güvenilirlik sağlar (36). Bu nedenle, bakteri ve arkelerin 16S rRNA geni (veya 16S rDNA) ve mantarların ve diğer ökaryotların 18S rRNA geni (veya 18S rDNA) kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve tanımlama için kullanılmıştır.

3.2. PCR ve Türevleri

PCR süreci 1983 yılında Kary Mullis tarafından tasarlandı ve o zamandan beri, bir genin bir kopyasının, o genin milyonlarca hatta milyarlarca kopyasına, sadece birkaç dakika ila birkaç saat içinde amplifikasyonunu sağlayarak moleküler biyoloji alanında devrim yaratmıştır (40). PCR kullanarak herhangi bir organizmadan esasen herhangi bir geni izole etmek mümkündür, bu da bu tekniği genom dizileme projelerinin temel taşı haline getirmiştir (41). Tanıtıldığından bu yana, artan sayıda çeşitli uygulamalar için PCR ile ilişkili teknolojiler üretilmiştir. Klinik teşhis teknolojisindeki belki de en yaygın ilerleme, mikrobiyal patojenlerin tespiti için PCR uygulamasından gelmiştir (42, 43). PCR yöntemi, tekrarlayan denatürasyon döngüleri, primer tavlama ve uzatma aşamaları yoluyla DNA'nın in vitro replikasyonuna dayanmaktadır. Kısaca yöntem, birkaç amplifikasyon döngüsünde tekrarlanan üç adımdan oluşur:

1. Şablon görevi gören hedef DNA, zincirleri bir arada tutan hidrojen bağlarını kırmaya yetecek kadar yüksek sıcaklıklarda denatüre edilir (eritilir), böylece DNA'yı tek zincirli halde serbest bırakır.
2. İki kısa oligonükleotid (primerler), hedef DNA'nın karşıt zincirleri üzerindeki tamamlayıcı dizilere tavllanır. Primerler, amplifiye edilmiş DNA dizisinin iki ucunu tanımlar.
3. Yeni DNA'nın tamamlayıcı bir ikinci dizisi, aşırı deoksiribonükleosit trifosfatların mevcudiyetinde termostabil bir DNA polimeraz tarafından tavllanmış her primerin uzatılması yoluyla sentezlenir. Daha önce sentezlenmiş tüm ürünler, takip eden her döngüde yeni primer uzatma reaksiyonları için şablon görevi görür. Sonuç, yeni ürünlerin üstel amplifikasyonudur.

3.2.1. Türe özgü PCR

Bir numunedeki bir hedef türü saptamak için en basit yaklaşımlardan biri, türe özgü bir PCR tahlili kullanmaktır. Bu yöntemle, belirli bir türün genomik dizilerini tavlama üzere tasarlanan primerler, bu türün doğrudan klinik örneklerde, hedeflenmemiş türlerin bir arka planının varlığında ve ekime gerek kalmadan tespit edilmesi için kullanılır.

3.2.2. Multiplex PCR

Çoğu PCR analizi, bireysel reaksiyonlar yoluyla tek bir türün saptanmasına odaklanmıştır. Multiplex PCR, tek bir reaksiyonda birkaç diziyi aynı anda amplifiye etmek için birden fazla primer çiftinin kullanıldığı bir işlemdir (44). Klinik bir numunede birden fazla benzersiz hedef sekans aynı anda amplifiye edilebildiğinden, çoklu PCR testleri farklı türlerin eşzamanlı olarak saptanmasına izin verdiği için gereken zaman ve harcamayı en aza indirmek için multiplex PCR testleri kullanılmıştır.

3.2.3. Nested PCR

Nested PCR (nPCR), bir ilk reaksiyonda bir dış primer çifti ile DNA'nın bir hedef bölgesini amplifiye eden ve ardından bir dahili primer çifti kullanılarak ikinci bir amplifikasyonu izleyen geleneksel bir PCR yöntemidir (45). İlk PCR ürünleri, ilk ürünlere dahili olarak tavlanan ve daha kısa bir amplifiye fragman oluşturan ayrı bir primer seti ile ikinci amplifikasyon turunda şablon olarak kullanılır. Bu yaklaşım, türe özgü PCR ile karşılaştırıldığında artan hassasiyet gösterir. Artan hassasiyet, büyük toplam döngü sayısından kaynaklanmaktadır. Ek olarak, hedef DNA, amplifikasyonun ilk turunda amplifiye edilir, ardından örnekte bulunan hedeflenmemiş DNA ve inhibitörlerin indirgenmesi sağlanır. PCR'nin ikinci turunda kullanılan primer seti, ek özgüllük ile sonuçlanır.

3.2.4. Ters transkriptaz-PCR

Ters transkriptaz-PCR (RT-PCR), RNA hedeflerini yükseltmek için geliştirilmiştir ve bir RNA şablonundan tamamlayıcı DNA (cDNA) zincirini sentezleyebilen ters transkriptaz enziminin kullanımından yararlanmaktadır. Çoğu RT-PCR analizi iki aşamalı bir yaklaşım ile kullanır. İlk adımda, ters transkriptaz, RNA'yı tek sarmallı cDNA'ya dönüştürür. İkinci adımda, ikinci cDNA zincirini oluşturmak için PCR primerleri, DNA polimeraz ve nükleotitler eklenir. Çift sarmallı DNA oluşturulduktan sonra, geleneksel PCR'de olduğu gibi amplifikasyon için şablon olarak kullanılabilir (46). RT-PCR işlemi, şablon olarak doğrudan RNA ile kullanılarak tek adımlı bir yaklaşıma dönüştürülebilir. Bu yaklaşımda, *Thermus thermophilus* bakterisinden elde edilenler gibi hem ters transkriptaz hem de DNA polimeraz aktivitelerine sahip bir enzim kullanılır.

3.2.5. Quantitative PCR

Geleneksel PCR tahlilleri kalitatif veya yarı kantitatif olacak şekilde ayarlanabilir. Temel olarak, quantitative PCR (qPCR) üç farklı analiz kullanılarak gerçekleştirilebilir: most probable number (MPN)-PCR, competitive PCR ve real-time PCR (47). Bunlardan real-time PCR yöntemi, çoğunlukla diğer qPCR testlerinden daha doğru ve kesin olan yüksek verimli bir teknik olduğu için en yaygın kullanılan yaklaşım olmuştur ve PCR sonrası manipülasyon adımları gerektirme-

diğinden kontaminasyon risklerini azaltır (47). Real-time PCR analizleri, klinik numunelerdeki toplam bakterinin yanı sıra bireysel hedef türlerin miktarının belirlenmesine izin verir.

3.2.6. PCR tabanlı mikrobiyal tipleme

PCR teknolojisi, mikroorganizmaların klonal analizi için de kullanılabilir. Bu amaç için kullanılan PCR tekniklerinin bir örneği, aynı zamanda rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) olarak da adlandırılan arbitrarıly primed PCR'yi (AP-PCR) içerir (48). AP-PCR, aynı türden iki izolatin ilişkili olup olmadığını belirlemek için nispeten hızlı bir araçtır. Bu yöntem, eşleşmeyen baz eşleşmesine izin veren koşullar altında belirtilmemiş DNA hedef bölgelerine tavlanan tek bir 10 ila 20 baz uzunluğunda rastgele dizili primerin kullanımına dayanmaktadır. Düşük sıklıkta rastgele dizili bir primerin kullanılması, kusurlu eşleşmelerin olduğu bölgelerde kullanıma hazırlamaya izin verir.

3.2.7. Broad-range PCR ve klon kitaplığı analizi

Broad-range PCR, çeşitli ortamlarda tüm mikrobiyal çeşitliliği araştırmak için yaygın olarak kullanılmıştır. Broad-range PCR'de primerler, bir grup mikroorganizma tarafından paylaşılan belirli bir genin korunmuş bölgelerini tamamlayıcı olacak şekilde tasarlanmıştır. Örneğin, 16S rRNA geninin korunmuş bölgelerini tamamlayıcı olan primerler, dizileme ve daha fazla bakteri tanımlaması için amplifiye edilmiş dizinin değişken iç bölgelerinden yararlanmak amacıyla kullanılmıştır (49). Broad-range PCR'nin gücü, seçiciliğin görece yokluğunda ortaya çıkmaktadır, böylece prensipte bir numunede bulunan her türlü bakteri saptanabilir ve tanımlanabilir. Bu yön, kültür ile yetiştirmeye benzer ve türe özgü moleküler yaklaşımların aksinedir (50). Böylece geniş aralıklı PCR beklenmeyi tespit edebilir ve bu açıdan kültürden çok daha etkili ve doğrudur.

4. KÖK KANAL ENFEKSİYONLARININ MİKROBİYAL PROFİLLERİ

Endodontik enfeksiyonlar, mikroorganizmaların pulpal boşluğa ulaşımını betimleyen didaktik olarak üç kategoriye ayrılabilir (13). Primer endodontik enfeksiyonlara, ilk pulpa invazyonu ve ardından nekrotik dokuların kolonizasyonunda yer alan mikroorganizmalar neden olur. Sekonder endodontik enfeksiyonlara, profesyonel müdahaleye ikincil olarak, cerrahi prosedürler sırasında iyatrojenik olarak veya mikro sızıntıya izin veren restorasyonlar ile koronal perkolasyon yoluyla kök kanalına giren mikroorganizmalar neden olur. İnatçı endodontik enfeksiyonlara, birincil veya ikincil enfeksiyonun parçası olan, kemo-mekanik debridman prosedürlerine direnen ve tedavi edilen kök kanallarının besin ve oksijen açısından fakir ortamında hayatta kalan mikroorganizmalar neden olur.

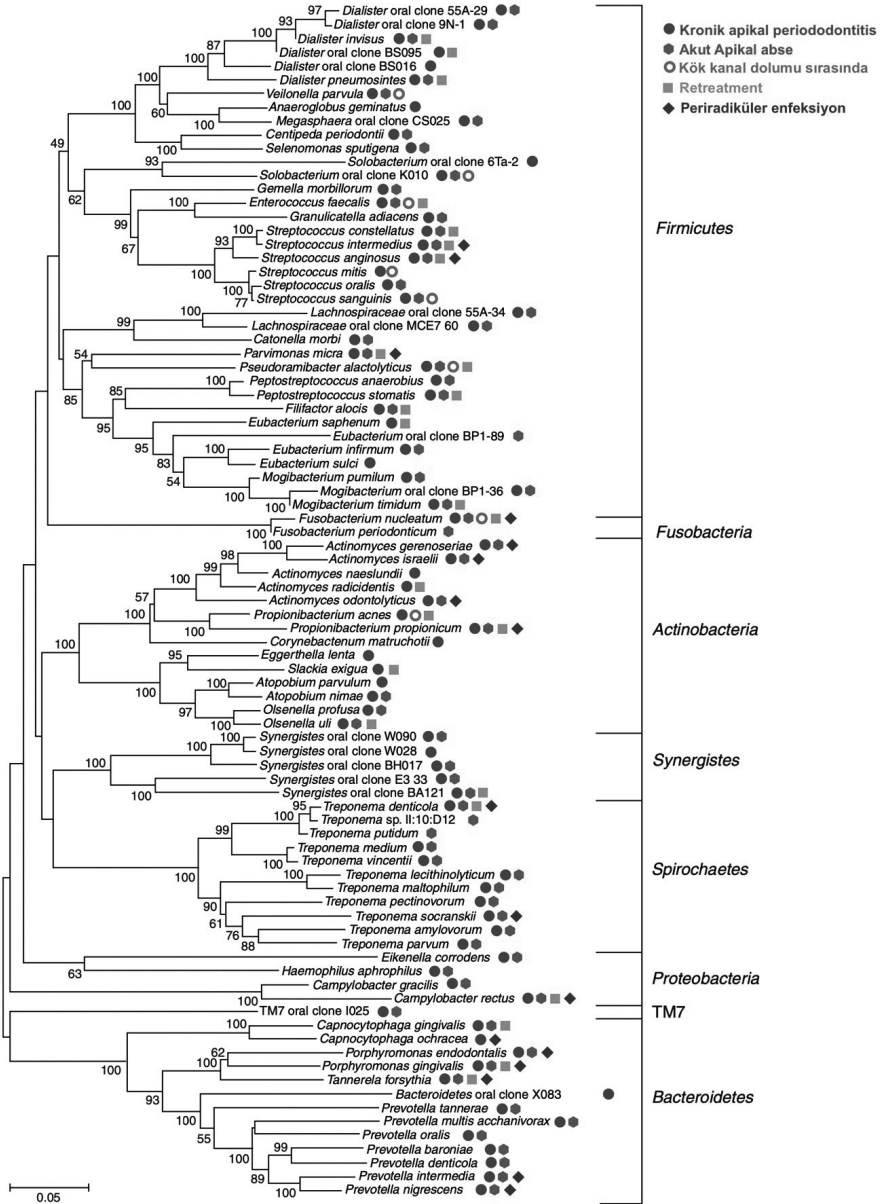
Bu karmaşık ve dinamik polimikrobiyal mikoorganizma profillerinin tanımlanması oldukça ve ileri altyapı teknolojileri gerektirmektedir. PCR, çeşitli insan oral florasından doğrudan doğruya birçok yeni müşkülpesent veya henüz ekilmemiş bakteriyel patojenlerin tanımlanmasına izin vermiştir (51). PCR ve 16S rRNA gen klon kitaplığı yapısı kullanılarak, bir numunede bulunan hemen hemen her bakteri türü, yetiştirilip yetiştirilemeyeceğine veya daha önce bilinmediğine bakılmaksızın tanımlanabilir. En çok kullanılan protokol aşağıdaki gibidir. Başlangıçta, toplu DNA doğrudan örneklerden ekstrakte edilir. Daha sonra, 16S rRNA geni, genin korunmuş bölgelerine özgü primerler (geniş aralıklı veya evrensel primerler) ile PCR yoluyla toplu DNA'dan izole edilir. Primer çiftleri arasındaki daha uzun mesafeler genellikle daha az hassasiyetle sonuçlanır, ancak bu, doğru tanımlama için daha değişken dizi bilgisi sağlar ve daha küçük boyutlara bölünmüş gibi görünen PCR reaktiflerindeki kontaminantlardan DNA amplifikasyonu riskini azaltabilir (50). Geniş aralıklı primerlerle amplifikasyon, numunedeki hemen hemen tüm bakterilerden amplifiye edilen 16S rRNA geninin bir karışımı ile sonuçlanır. Karışık enfeksiyonlarda, konsorsiyumu oluşturan farklı türlere ait karışık ürünler bulunduğu için, PCR ürünlerinin doğrudan dizilenmesi yapılamamaktadır. PCR ürünleri daha sonra *Escherichia coli* hücrelerini dönüştürmek için kullanılan bir plazmit vektörüne klonlanır ve numuneden bir 16S rRNA genleri kütüphanesi oluşturulur. Klonlama prosedürü, dizileri, dizileme yoluyla ayrı ayrı karakterize edilebilmeleri için ayırmak için kullanılır.

Klonlanmış genler tek tek dizilendikten sonra, elde edilen diziler, tanımlama için genellikle World Wide Web aracılığıyla Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veya veri tabanlarına gönderilir. Ribozomal Veritabanı Projesi II (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Kamuya açık veri tabanlarında benzerlik aramaları kullanılarak ön tanımlama yapılabilir. 16S rRNA gen dizisindeki %98,5-99 özdeşlik, bir bakteriyi tür düzeyinde tanımlamak için kullanılan en çok kabul edilen kriter olmuştur (38, 52). Bir dizi, kamuya açık veri tabanlarında tanımlanmış türlerden veya klonlardan gelen diğer dizilere düşük benzerlik skorları (~%98,5-99) gösteriyorsa, potansiyel olarak yeni bir türü temsil eder (52).

Bu yeni türler genellikle ekilmemiş ve şimdiye kadar bilinmeyen bakteri taksonları olarak kabul edilir ve resmi olmayan bir isim verilir. Genellikle, filogenetik ağaçtaki en yakın komşularının cinsi, ardından bir harf ve sayı kodu kullanılır, örneğin, *Synergistes* oral klonu BA121, *Dialister* oral klonu BS095 ve *Peptostreptococcus* oral klonu CK035.

Benzerlik arayışına ek olarak, çok daha doğru bir değerlendirme sağladığı için filogenetik analiz yapılmalıdır (50). Bu yaklaşımla, farklı türlerden 16S rRNA gen dizileri, korunan bölgelere dayalı olarak hizalanır ve daha sonra, bir filogenetik ağaç oluşturmak için değişken bölgelerde bulunan farklılıkların sayısına dayalı hesaplamalar kullanılır. Çeşitli bakteri filotipleri (veya taksonları) arasındaki ilişkiler özel biyoinformatik yazılım ile analiz edilir ve sonuçlar dendrogramlarda

veya Şekil 1'de gösterildiği gibi filogenetik ağaçlarda gösterilir. 16S rRNA geni, diziler önceden ekilmemiş ve karakterize edilmemiş bakterilerden türetilmiş olsa bile, bakteriler arasında filogenetik ilişkiler kurmak için kullanılabilir.



Şekil 1. Endodontik enfeksiyonlarda moleküler biyoloji yöntemleriyle ortaya konan bakteriyel çeşitlilik. Endodontik patojenler ve bunların ilgili filumlarını ve ilişkili oldukları klinik durumları gösteren 16S rRNA gen karşılaştırmalarına dayanan filogenetik ağaç. Ölçek çubuğu, bölge başına nükleotid ikamelerinin sayısını gösterir ⁽⁵⁰⁾.

SONUÇ

Apikal periodontitis enfeksiyöz bir hastalık olduğundan, endodontik tedavinin mantığı, tartışmasız olarak meydana gelen enfeksiyonu ortadan kaldırmak ve/veya mikroorganizmaların kök kanalını veya periradiküler dokuları enfekte etmesini veya yeniden enfekte etmesini önlemektir. Herhangi bir sağlık hizmeti mesleğinin temel ilkesi, etkili önleme ve tedavi için bir çerçeve sağlayan hastalık etiyojisi ve patogenezinin tam olarak anlaşılmasıdır. Bu bağlamda, farklı hastalık formlarıyla ilişkili endodontik mikrobiyotayı anlamak ve tanımlamak, yüksek kaliteli ve sağlam bir bilimsel temele dayanan bir endodontik uygulamanın temelidir.

Bir mikroorganizmanın yetiştirilme yeteneğinin getirdiği sınırlamalar, moleküler tanımlama yöntemlerinin kullanılmasıyla aşılabılır. Endodontik enfeksiyonların araştırılmasında çeşitli moleküler yöntemler uygulanmış veya uygulanma potansiyeline sahiptir. Belirli bir yaklaşımın seçimi, cevaplanacak sorulara bağlıdır. Moleküler çalışmaların çoğu, farklı endodontik enfeksiyon türlerinde tür kompozisyonu konusunu ele almıştır. Bununla birlikte, şu anda, bir numunedeki tüm bakteri türlerinin kapsamlı bir listesini sağlayabilecek mevcut bir teknik yoktur. Sonuç olarak, endodontik bakteri topluluklarının daha iyi bir resmini sunmak için çeşitli teknikler kullanılmıştır. Amaç endodontik ortamdaki bakteri çeşitliliğinin genişliğini araştırmaksa, en azından metagenomik yaklaşımın ekonomik ve prosedürel olarak uygulanabilir olmamasına rağmen, geniş aralıklı PCR ve ardından 16S rRNA gen klon kütüphanesi analizi tercih edilen yöntem olabilir.

Bu tür güncel yöntemler ile elde edilen bilgiler, daha etkili, önleyici ve tedavi edici protokollerin geliştirilmesine katkıda bulunma potansiyeline sahiptir. Ayrıca, endodontik bakterilerin bir envanterinin oluşturulması, diğer insan bölgele-
rindeki hastalıklar için potansiyel patojenik tür kaynaklarının gelecekteki araştırmalarına da yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

- Siqueira JF Jr (2008). Microbiology of apical periodontitis. In: Essential endodontology. Ørstavik D, Pitt Ford T, editors. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard Ltd, pp. 135–196.w).
1. Cruse WP, Bellizzi R. A historic review of endodontics, 1689-1963, part 2. *Journal of endodontics*. 1980;6(4):532-5
 2. Siqueira Jr J, Rôças I. Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of dental research*. 2009;88(11):969-81
 3. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(11):5721-32
 4. Zaura E, Keijsers BJ, Huse SM, et al. Defining the healthy” core microbiome” of oral microbial communities. *BMC microbiology*. 2009;9(1):1-12
 5. Özok A, Persoon I, Huse S, et al. Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. *International endodontic journal*. 2012;45(6):530-41

6. Santos AL, Siqueira Jr JF, Rôças IN, et al. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PLoS One*. 2011;6(11):e28088
7. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, et al. The oral metagenome in health and disease. *The ISME journal*. 2012;6(1):46-56
8. Siqueira Jr J. Microbiology of apical periodontitis. In: Ørstavik D PT, editor. *Essential endodontology*. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 135-96.
9. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*. 1965;20(3):340-9
10. Möller ÅJ, Fabricius L, Dahlen G, et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *European Journal of Oral Sciences*. 1981;89(6):475-84
11. Nair PR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of endodontics*. 1987;13(1):29-39
12. Haapasalo M, Shen Y, Riccucci D. Reasons for persistent and emerging post treatment endodontic disease. *Endodontic topics*. 2008;18(1):31-50
13. Siqueira JF. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2002;94(3):281-93. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.126163>.
14. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2009;107(6):870-8
15. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral microbiology and immunology*. 1986;1(1):48-55
16. Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, et al. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 2003;69(12):7210-5
17. Willis AT. *Anaerobic bacteriology: clinical and laboratory practice*: Butterworth-Heinemann; 2014.
18. Jensen JB, Parmar M. Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Molecular neurobiology*. 2006;34(3):153-61
19. Hajek A. *Oral history methodology*: SAGE Publications, Ltd.; 2014.
20. Hugenholtz P, Pace NR. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends in biotechnology*. 1996;14(6):190-7
21. Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*. 1995;59(1):143-69
22. Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*. 1990;345(6270):63-5
23. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2004;68(4):669-85
24. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5(1):48-56
25. Rappé MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*. 2003;57(1):369-94
26. Keller M, Zengler K. Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(2):141-50
27. Hugenholtz P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*. 2002;3(2):1-8
28. Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet*. 2004;38:525-52
29. Green BD, Keller M. Capturing the uncultivated majority. *Current opinion in biotechnology*. 2006;17(3):236-40
30. Breznak JA. Phylogenetic diversity and physiology of termite gut spirochetes. *Integrative and Comparative Biology*. 2002;42(2):313-8

31. Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, et al. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(8):4748-55
32. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clinical infectious diseases*. 1999;475-86
33. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, et al. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(8):3944-55
34. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology*. 2001;183(12):3770-83
35. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-8
36. Woese CR. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(15):8392-6
37. Wade WG. Non-culturable bacteria in complex commensal populations. *Advances in applied microbiology*. 2004;54(54):93-106
38. Drancourt M, Raoult D. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(9):4311-5
39. Ke D, Picard FJ, Martineau F, et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(11):3497-503
40. Mullis KB. The polymerase chain reaction: Springer science & business media; 1994.
41. Lee H, Tirnady F. Blood evidence: How DNA is revolutionizing the way we solve crimes: Basic Books; 2003.
42. Whelen AC, Persing DH. The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory. *Annual review of microbiology*. 1996;50(1):349-73
43. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *Cmaj*. 2000;163(3):301-9
44. Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic acids research*. 1988;16(23):11141-56
45. Haqqi TM, Sarkar G, David CS, et al. Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic acids research*. 1988;16(24):11844
46. Sambrook J, Russell DW. Fragmentation of DNA by sonication. *Cold spring harbor protocols*. 2006;2006(4):pdb.prot4538
47. Sharma S, Radl V, Hai B, et al. Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2007;68(3):445-52
48. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*. 1990;18(24):7213-8
49. Göbel UB. Phylogenetic amplification for the detection of uncultured bacteria and the analysis of complex microbiota. *Journal of Microbiological Methods*. 1995;23(1):117-28
50. Fouad AF. Endodontic microbiology: John Wiley & Sons; 2017.
51. Wade W. Unculturable bacteria--the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med*. 2002;95(2):81-3.10.1258/jrsm.95.2.81.
52. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, et al. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*. 2006;42:80-7.10.1111/j.1600-0757.2006.00174.x.