

Apikal Periodontitisin Mikrobiyolojisi ve Tanı Yöntemleri

Microbiology Of Apical Periodontitis And Diagnostic Techniques

ÖZ

Giriş: Apikal periodontitis (kök kanal enfeksiyonu) mikroorganizmaların ve bu mikroorganizmaların metabolik ürünlerinin kök kanalından periradiküler alana geçişi sonucu oluşan sert doku rezorpsiyonu ve periodontal ligamentin yıkımı ile karakterize inflamatuvar ve enfeksiyöz bir hastalıktır. Apikal periodontitis mikrobiyal bir etiyojiye sahiptir. Mantarların, arkeaların ve virüslerin apikal periodontitis ile ilişkili olduğu bulunmuştur, fakat bakteriler kök kanal enfeksiyonlarına neden olan en yaygın ve baskın mikroorganizmalardır. Kanal içi bakteriler genellikle dentin kök kanalı duvarlarına yapışık, biyofilmler olarak gözlenir. Endodontik enfeksiyonlarda 500'den fazla bakteri türü tespit edilmiş olmasına rağmen, 20 ila 30 türden oluşan seçilmiş bir grup en sık tespit edilir ve temel mikrobiyom olarak kabul edilir. Zorunlu anaerobik türler, primer apikal periodontitisli dişlerin intraradiküler bakteri topluluklarında daha bol bulunurken, hem anaeroblar hem de fakültatifler tedavi sonrası gelişen apikal periodontitisli dişlerin bakteri topluluklarında baskındır. Geleneksel olarak, kök kanal enfeksiyonlarına neden olan bakteriler izolasyon, üreme, morfoloji ve biyokimyasal testlerle laboratuvar tanımlamasına dayanan kültürasyon temelli tekniklerle incelenmiştir. Ancak, mikrobiyolojik tanı söz konusu olduğunda ekim ve diğer geleneksel tanımlama yöntemlerinin çeşitli sınırlamaları olduğu gösterilmiştir. Son on yılda bu sınırlılıkların üstesinden gelmek için mikrobiyal moleküler tanı alanında birçok yöntem kullanılmış olup, bunların en önemlileri, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) teknolojisi ve türevleri, DNA-DNA hibridizasyon ve yeni nesil dizileme teknikleridir.

Sonuç: Bu derlemenin amacı kök kanal enfeksiyonlarını ve bu enfeksiyona sebep olan mikroorganizmaları ve tespit yöntemlerini mevcut literatür bilgisiyile gözden geçirmektir.

Anahtar Kelimeler: Kök Kanal Enfeksiyonları, Moleküler Yöntemler, Yeni Nesil Dizileme.

ABSTRACT

Objective: Apical periodontitis (root canal infection) is an inflammatory and infectious disease characterized by hard tissue resorption and destruction of the periodontal ligament caused by the passage of microorganisms and their metabolic products from the root canal to the periradicular space. Apical periodontitis has a microbial etiology. Fungi, archaea and viruses have been found to be associated with apical periodontitis, but bacteria are the most common and predominant microorganisms causing root canal infections. Intracanal bacteria are usually observed as biofilms adherent to the dentin root canal walls. Although more than 500 bacterial species have been identified in endodontic infections, a selected group of 20 to 30 species are most frequently detected and are considered the core microbiome. Obligate anaerobic species are more abundant in the intraradicular bacterial communities of teeth with primary apical periodontitis, while both anaerobes and facultative species predominate in the bacterial communities of teeth with post-treatment apical periodontitis. Traditionally, bacteria causing root canal infections have been studied by cultivation-based techniques based on isolation, growth, morphology and laboratory identification by biochemical tests. However, cultivation and other traditional identification methods have been shown to have several limitations when it comes to microbiologic diagnosis. In the last decade, microbial molecular diagnostics have been developed to overcome these limitations. In the last decade, many methods have been used in the field of microbial molecular diagnostics to overcome these limitations, such as polymerase chain reaction (PCR) technology and its derivatives, DNA-DNA hybridization and next generation sequencing techniques.

Conclusion: The aim of this review is to examine root canal infections and related microorganisms and their detection methods with the current literature.

Key Words: Root Canal Infections, Molecular Techniques, Next Generation Sequencing.

Melisa USLU¹

ORCID: 0000-0002-5758-9608

Sevinç AKTEMUR TÜRKER²

ORCID: 0000-0001-8740-2480

¹Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Endodonti AD.
Zonguldak, Türkiye

²Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi,
Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti AD.
Zonguldak, Türkiye



Geliş tarihi / Received: 19.03.2024

Kabul tarihi / Accepted: 11.06.2024

İletişim Adresi /Corresponding Address:

Sevinç AKTEMUR TÜRKER

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi,
Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti AD,
Zonguldak, Türkiye

E-posta/e-mail:sevincaktemur@hotmail.com

Apikal periodontitis kök kanalı enfeksiyonunun bir sonucu olup, mikrobiyal faktörler ve konak immün yanıtı arasındaki etkileşimden kaynaklanan periradiküler dokuların enflamasyonu ve yıkımı ile karakterizedir. Bakteriler apikal periodontitise neden olan başlıca enfeksiyöz ajanlardır ve genellikle kanal duvarlarına tutunan biyofilm topluluklarında organize olarak bulunurlar. Apikal periodontitisin etiolojisinde rol oynayan mikroorganizma çeşitliliği oldukça fazladır ve moleküler yöntemlerin gelişmesiyle birlikte kök kanal enfeksiyonlarına sebep olan mikroorganizmaların tespit edilebilirliği artmaktadır. Apikal periodontitisin oluşumu ve etken mikroorganizmaların tanımlanması, patojenik mekanizmalar hakkındaki bilginin artması, tanının iyileştirilmesi ve farklı tedavi stratejileri geliştirmesi açısından oldukça önemlidir. Bu derlemede apikal periodontitiste yer alan mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmaların tanı yöntemleri ile ilgili güncel bilimsel kanıtlar gözden geçirilerek, diş hekimlerinin kök kanalının mikrobiyal florası hakkındaki bilgi düzeyinin artırılması amaçlanmıştır.

Apikal Periodontitisin Mikrobiyolojisi

Apikal periodontitis, kök kanal sistemindeki enfeksiyonun sebep olduğu inflamatuvar bir hastalıktır (1). Kimyasal ve fiziksel faktörler periradiküler inflamasyonun gelişmesine neden olsa da apikal periodontitisin farklı formlarının oluşması ve varlığını devam ettirebilmesi için endodontik enfeksiyonun gerekli olduğu gösterilmiştir (2). 1894'te diş hekimi Willoughby Dayton Miller, kök kanalından aldığı örneklerin analizinde ilk kez bakteri ve apikal periodontitis arasındaki ilişkiyi göstermiştir (3). Kök kanalı örneklerinin mikroskopisini yapan Miller, o zamanlar bilinen üç temel morfolojideki hücreleri gözlemlemiştir: koklar, basiller ve spiroketler. Çeşitli morfolojik çalışmalarda günümüzde biyofilm olarak bilinen yapılara benzer bakteri kümeleri tespit edilmiştir (4). Yapılan çalışmalarla birlikte biyofilmin önemi anlaşılmıştır, bakteriyel biyofilmlerin görülme sıklığının yüksek olduğu ve biyofilm ile primer apikal periodontitis ve tedavi sonrası gelişen apikal periodontitis arasında güçlü bir ilişki olduğu görülmüştür (5). Biyofilm, bir yüzeye tutunmuş, kendiliğinden üretilen hücre dışı polimerik matriks içine alınmış bakteri hücrelerinden oluşan oldukça organize bir yapıdır. Biyofilmlerdeki organizmalar, büyüme hızı ve gen transkripsiyonu açısından değiştirilmiş bir fenotip sergiler. Biyofilm içerisindeki bakteri hücreleri planktonik bakteri hücrelerinden büyük ölçüde farklıdır. Biyofilmlerdeki bakterilerin fizyolojik özellikleri, kültür ortamındaki aynı

bakteriyle karşılaştırıldığında farklıdır, bunun nedeni mikroorganizmaların polimer matriks tarafından çevresel streslerden korunmasıdır. Biyofilm içindeki mikroorganizmaların, antimikrobiyal ajanlara ve konak savunma mekanizmalarına karşı planktonik olanlara göre yaklaşık 1000 kat daha dirençli olabileceği gösterilmiştir (6). Apikal periodontitise neden olan ana mikroorganizmalar bakteriler olarak bilirse de mantarlar, arkealar ve virusler apikal periodontitisin etiolojisinde yer alan diğer mikroorganizmalardır. Mantarlar ağız boşluğunda kolonize olabilen küf ve maya olmak üzere iki temel formda bulunabilen ökaryotik mikroorganizmalardır. En yaygın maya mantarı olan *Candida* cinsinin üyeleri oral kavitede kolonize olabilmelerine rağmen primer apikal periodontitis etiolojisinde çok sık görülmemektedir. Daha çok ısrarcı apikal periodontitis vakalarında tespit edilmektedirler (6). Arkealar bakterilerden oldukça farklı olup prokaryottur. Primer endodontik enfeksiyonlardan alınan örneklerde arkeaları tespit etmek zor olsa da *Methanobrevibacter oralis* benzeri bir filotip tespit edilmiştir (7).

Virüsler bir nükleik asit molekülü ve kapsidden oluşur. Kendi başlarına metabolizmaları yoktur. Viral genomu kopyalamak için canlı hücreleri enfekte etmeleri ve hücrenin mekanizmasından yararlanmaları gerekmektedir. Virüslerin vital pulpaya sahip dişlerin kök kanallarında bulunduğu tespit edilmiştir (8). Apikal periodontitis lezyonlarında HCMV (human cytomegalovirus) ve EBV (Epstein-Barr virus) de tespit edilmiştir (9). Normal koşullar altında dentin-pulpa kompleksi sterildir. Mine, dentin ve sement ile oral mikrobiyotadan izole bir hâldedir. Bu doğal tabakaların bütünlüğünün çeşitli yollarla (çürük, travma, çatlak, restoratif işlemler, diş taşı temizliği, cerrahi işlemler vb.) bozulması durumunda dentin-pulpa kompleksi ağız ortamına açılır. Ağız ortamına açılan bu kompleks çürük lezyonlarda bulunan mikroorganizmalar, tükürük, mikrobiyal dental plak tarafından etkilenir. Mikroorganizmaların ve onların ürünlerinin apikal ve lateral foramenlere veya furkasyona ulaşması periodontal dokuları doğrudan etkileyip patolojik değişikliklere sebep olabilir (10). Patojenite mikroorganizmaların hastalığa sebep olma yeteneği olarak ifade edilir. Virülans, bir mikroorganizmanın patojenitesini belirtir. Virülans faktörleri mikrobiyal ürünler, hücresel bileşenler veya patojeniteye katkıda bulunan stratejilerdir. Patojeniteye katkıda bulunan bakteri stratejisi olarak mikrobiyal rakiplere konakçı savunmalarına ve antimikrobiyal ajanlara karşı koruma sağlayan biyofilmlerin bir araya toplanması örnek verilebilir.

Bazı mikroorganizmalar belirli bir konakçıda rutin bir hastalığa neden olur ve bunlara birincil patojen denir. Bazı mikroorganizmalar yalnızca konak savunması bozulduğunda hastalığa sebep olur bunlara fırsatçı patojen denir. Normal mikrobiyotayı oluşturan bakteriler genellikle zararsız kommensaldır ve konakçıyla denge içinde yaşar. İnsan mikrobiyotasının en yararlı etkilerinden biri, diğer mikroorganizmaları dışlayarak konağı ekzojen enfeksiyonlardan koruma eğilimidir. Bununla birlikte bazı durumlarda sağlıklı bir bireyde direnç düşer. Bu durumdan ilk yararlananlar kommensal bakterilerdir. Endodontik enfeksiyonlarda ilk görülen bakterilerin çoğu konakçı-bakteri ilişkisindeki değişikliklerden yararlanarak fırsatçı patojen haline gelen oral mikrobiyotanın sakinleridir (11). Nekrotik pulpalı bir kök kanalı bakteriyel kolonizasyon için nemli, sıcak, besleyici anaerobik bir ortamdır. Bu ortamda aktif kan dolaşımının olmaması mikroorganizmaları konak savunmasından korur (12). Nekrotik kök kanalı bakteri üremesi için verimli bir ortamdır. Kök kanalı mikrobiyotasının bileşimini belirleyen başlıca ekolojik faktörler vardır. Bunlar sıcaklık, pH ve adezin reseptörlerdir. Kök kanal enfeksiyonu dinamik bir süreç olup farklı aşamalarda farklı mikroorganizma baskınlığı söz konusudur. Pulpa enfeksiyonunun başlangıcında fakültatif bakteriler baskındır (13). Birkaç hafta sonra pulpanın nekrozu ile birlikte kök kanalında oksijenin de tükenmesiyle anaerobik ortam oluşur. Bu ortamda zorunlu anaerob bakteriler hakim olur. Kök kanal sisteminde kolonize olan bakterilerin ana besin kaynakları nekrotik pulpa dokusu, doku sıvılarından gelen glikoproteinler, kök kanalına sızan eksuda, doku bileşenleri, tükürük ve diğer bakterilerin ürünleridir. Besinlerin en büyük miktarı ana kanalda yer aldığı için enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların büyük çoğunluğu burada yer alır. Oksijen seviyesindeki değişim mikrobiyotayı etkiler. Sakkarolitik türler enfeksiyonun başlangıcında baskınken çok geçmeden baskınlığı azalır (14). Nekrotik pulpa dokusu bakteriler için sınırlı bir besin kaynağı olarak kabul edilse de periradiküler inflamasyonu indüklenmesi kanala sızan eksudada bulunan proteinler ve glikoproteinler de sürdürülebilir bir besin kaynağıdır. Bazı türlerin kök kanalına yerleşmesi diğer türlerle olan etkileşimden etkilenmektedir. Bu bağlamda ilk kolonileşenler hangi türün kendileriyle birlikte yaşayacağını belirlemektedir. Bu etkileşimler pozitif veya negatif olabilir. Pozitif etkileşimler bakterilerin hayatta kalma kapasitelerini artırır. Bakteriler arası beslenme etkileşimi ekolojik belirleyicidir. Bir türün metabolik son ürününün diğer tür tarafından kullanımı veya bir türün ortamdaki oksijen gerilimini azaltması anaerobların üremesini sağlar. Besin ve alan için rekabet ve kommensalizm negatif etkileşime örnektir (15). Apikal periodontitis lokalizasyonuna göre kanal içi veya kanal dışı enfeksiyonlar olarak ayrılmaktadır. Kanal içi enfeksiyonlar kök kanal sistemi içerisindeki

mikroorganizmalar tarafından meydana gelmektedir. Mikroorganizmaların kök kanalı içerisinde giriş zamanına bağlı olarak üç alt sınıfa ayrılmaktadır. Primer apikal periodontitis, nekrotik pulpa dokusunu istila eden ve kolonize olan mikroorganizmalar tarafından oluşur. Sekonder apikal periodontitis; primer enfeksiyonlarda bulunmayan fakat tedavi işlemleri sırasında ya da sonrasında kök kanalı içerisine giren mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Israrcı apikal periodontitis ise kanal içine uygulanan antimikrobiyal işlemlere karşı dirençli olan ve tedavi edilmiş kök kanallarında yaşamını sürdürebilen dirençli mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Kanal dışı enfeksiyonlar; kanal içi enfeksiyonların devamı olarak inflame olan periradiküler dokulara mikrobiyal yayılımı ile karakterizedir. Kanal dışı enfeksiyonlar daha çok abse vakalarında meydana gelmekte ve tedavi sonrası gelişen apikal periodontitisin olası bir sebebi olarak da görülmektedir.

Anaerobik bakterilerin hakim olduğu kök kanal enfeksiyondur. Moleküler çalışmalar kök kanalı başına ortalama 10-20 tür olabileceğini ortaya koymuştur. Apikal periodontitis lezyonunun büyüklüğünün kök kanalındaki bakteri türü ve sayısı ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Primer apikal periodontitiste yer alan bakteri filotipleri ağız ortamında yer alan 13 filanın 9'unu içerir. Bu bakteriler; *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistes*, *TM7* ve *SRI* (16).

Primer apikal periodontitiste bulunmayan ancak profesyonel müdahaleden bir süre sonra kök kanalına ulaşan mikroorganizmalar sekonder apikal periodontitise neden olur. Kalıcı enfeksiyonlara primer veya sekonder enfeksiyonun üyesi olan ve antimikrobiyal tedaviden sonra kanalda zorlu ekolojik koşullara uyum sağlamayı başaran mikroorganizmalar neden olur. Kanal tedavili ve apikal periodontitisli dişlerin mikrobiyotası primer enfeksiyon mikrobiyotasına göre oldukça sınırlıdır. İyi bir şekilde kök kanal dolumu yapılmış bir kök kanalında 1-5 tür bulunmaktadır. Yeterli kanal dolumu sağlanmamış kanallardaki tür sayısı 10 - 20 türe kadar ulaşabilir (17). Tedavi sonrası hastalığın devam ettiği dişlerde bakteri hücrelerinin sayısı kanal başına 10^3 - 10^7 arasında değişmektedir (18). Çeşitli kültür ve moleküler biyoloji çalışmalar *Enterococcus faecalis*'in kök kanalında en sık görülen tür olduğunu ve vakaların %90'ına varan prevalansa sahip olduğunu göstermiştir (11). Kök kanal tedavili dişlerin *E. faecalis*'i bulundurması primer enfeksiyon vakalarına göre yaklaşık 9 kat daha fazladır (19). Endodontik tedavili dişlerde bulunan diğer bakteriler *P. alactolyticus*, *Propionibacterium türler*, *Filifaktör alocis*, *Dialister pneumosintes*, *Dialister invisus*,

Tannerella forsthia, *P. micra*, *Prevotella intermedia* ve *Treponema denticola* 'dır (20).

Mantarlar, sekonder enfeksiyon sırasında kontaminasyon yoluyla kök kanallarına erişirler veya primer endodontik mikrobiyotada dengesizliğe neden olan verimsiz kanal içi antimikrobiyal prosedürlerden sonra çoğalırlar. *Candida albicans*, kanal tedavisi görmüş dişlerde en fazla saptanan mantar türüdür (21). Bu türün dentini istila etme yeteneği ve kalsiyum hidroksite dirençli olması tedavi sonra kalıcılıkta etkili özellikleridir (22). Apikal periodontitis lezyonları kanal içi enfeksiyona yanıt olarak oluşur ve enfeksiyonun yayılmasına karşı büyük ölçüde etkili bir bariyer oluşturur. Çoğu durumda apikal periodontitis lezyonları, mikroorganizmaların periradiküler dokuları istila etmesini önlemede başarılı olur. Bununla birlikte, bazı özel durumlarda mikroorganizmalar bu savunma bariyerini aşabilir ve kanal dışı bir enfeksiyon oluşturabilir. Kanal dışı enfeksiyonun en yaygın şekli pürülan iltihaplanma ile karakterize akut apikal absesdir (23). *Actinomyces* spp., *Propionibacterium Propionicum* kanal dışı enfeksiyonlara neden olmaktadır (24).

Mikroorganizmaların Tanı Yöntemleri

Siqueria ve Roças endodontik mikrobiyoloji çalışmalarını mikroorganizmaların tespit edilme yöntemlerine göre 5 nesile ayırmıştır (Tablo 1) (25). Araştırmalarda kullanılan mikrobiyolojik yöntemler ya açık uçlu ya da kapalı uçlu bir yapıya sahiptir. Açık uçlu olanlar, numunedeki 'tüm' türlerin saptanmasına izin veren ve çeşitlilik (zenginlik ve göreceli bolluk) hakkında bilgi sağlayan çalışmalardır. Kapalı uçlu olanlar ise varlık/yokluk yaklaşımında, bazen yarı veya mutlak niceleme ile bir veya birkaç seçilmiş hedef türün saptanması esasına dayanmaktadır.

Kök kanallarındaki mikroorganizmaları tespit etmek için kapalı uçlu bir yöntem olan kültür yöntemi ve hem kapalı hem açık uçlu olan moleküler yöntemler kullanılabilir. Kültür çalışmaları apikal periodontitis enfeksiyöz etiyojisinin ve endodontik enfeksiyonlarda bulunan baskın kültüre edilebilir bakteri türlerinin belirlenmesine büyük katkı sağlamıştır. Kültür yöntemi ayrıca kök kanal tedavisine ve sistemik/lokal antibiyotiklere karşı bakteriyel duyarlılığı değerlendirmek için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat kültür çalışmalarının büyük çoğunluğu nicelik bildirmeden sadece türlerin mevcudiyeti hakkında bilgi sağlamaktadır. Ayrıca üretilmesi zor anaerobik türler için kültür yönteminin duyarlılığının daha düşük olması nedeniyle ortamda bulunan en baskın türler üretilerek tanımlanabilmektedir. Bu nedenle, kültür yönteminin endodontik mikrobiyotanın bileşimi ve tedaviden etkilenmeleri hakkında kapsamlı ve derin bir analiz sağlamalarını bakımından kısıtlılıkları mevcuttur. Bundan dolayı kök kanal enfeksiyonları için kültür yöntemine göre daha duyarlı olan, yüksek özgüllük ile mikrobiyal türlerin daha kısa sürede kesin olarak tanımlanmasına

olanak sağlayan moleküler tanı yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (25).

Endodontik mikrobiyolojide kullanılan moleküler yöntemler PZR bazlı yöntemler, DNA-DNA hibridizasyon yöntemleri ve gen sekanslama yöntemleri olmak üzere 3 başlık altında toplanabilir (26). PZR temelli metotlar arasında; Single Targeted, Multiplex, Nested, Revers transkriptaz ve Real Time yer almaktadır. DNA-DNA hibridizasyon metotları arasında; Floresans in-situ hibridizasyon (FISH), Checkerboard DNA-DNA Hibridizasyon, DNA Mikroçip yer almaktadır. Gen sekanslama metotları arasında ise Sanger Sekanslama ve Yeni nesil sekanslama yer almaktadır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli metotlar bakteri, virüs, mantar, protozoon ve parazit gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri kullanarak in vitro olarak çoğaltılması esasına dayanan yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. PZR; Ayrışma, Bağlanma ve Uzama olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır: Bu aşamalar bir termal döngü cihazında birbirini takip eden 30 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmektedir. Her PZR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır. Tüm döngüler tamamlandıktan sonra milyonlarca kopya oluşması sağlanmaktadır. Elde edilen ürün agaroz jel elektroforezi ile görüntülenebilmektedir. PZR yöntemi hedef sayısına ve kullanım amacına göre farklı şekillerde uygulanabilmektedir. Single Targeted PZR, tek bir hedefin olduğu, tek bir cins veya türe özgü tek bir primerin kullanıldığı en basit ve temel yöntemdir. Multiplex PZR, örnekte bulunabilecek çok sayıda mikroorganizmanın çoğaltılmasına imkan sağlayan, her hedef mikroorganizma için ayrı primerin kullanıldığı yöntemdir. Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu, revers-transkriptaz enzimi aracılığıyla bir RNA parçasından, hedef DNA dizisini tamamlayacak DNA zincirini (cDNA) sentezleyerek RNA hedeflerini çoğaltmak için geliştirilmiştir. Real-Time (Gerçek Zamanlı) nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif sonuç verebilen PZR yöntemidir. DNA hedeflerini tespit etmek için floresan işaretli nükleotit dizilerinden faydalanır. Her PZR döngüsü floresans salınımı ile moniterize edilerek reaksiyonun ilerlemesi gerçek zamanlı olarak gözlenebilmektedir (27).

Çalışmanın Nesli	Tanımlama Yöntemi	Yapısı	Tanım ve Bulgular
Birinci	Kültür	Açık uçlu (geniş skala)	Apikal periodontitis ile ilişkili birçok kültüre edilebilir tür ortaya çıkmıştır.
İkinci	Moleküler yöntemler (örnek: PZR ve türevleri, orijinal dama tahtası teşhisi)	Kapalı uçlu (türe özgü)	Birinci nesil çalışmalardan ulaşılan veriler doğrulanmış ve güçlendirilmiştir ve kültüre edilmesi zor bazı türler aday endodontik patojen grubuna dahil edilmiştir.
Üçüncü	Moleküler yöntemler (örnek: PZR-klonlama-dizileme, T-RFLP)	Açık uçlu (geniş skala)	Endodontik enfeksiyonlardaki bakteri çeşitliliğinin daha kapsamlı araştırılmasına olanak sağlanmıştır. Henüz yetiştirilmemiş ve karakterizasyonu yapılmamış bakteriler de tanımlanmıştır.
Dördüncü	Moleküler yöntemler (örnek: PZR,mikrodiziler)	Kapalı uçlu (türe özgü)	Kültüre edilebilir ve henüz kültüre edilmemiş bakterileri hedefleyen prevalansı araştırmak için geniş ölçekli klinik çalışmalar ve türlerin/filotiplerin endodontik enfeksiyonlarla ilişkisi tespit edilmiştir.
Beşinci	Moleküler yöntemler (örnek:pirodizileme-yeni nesil dizileme)	Açık uçlu (geniş skala)	Endodontik enfeksiyonların çeşitliliğinin derinlemesine ve daha kapsamlı bir analizine imkan sunar.

Tablo 1. Endodontik enfeksiyonlarda mikrobiyolojik tanımlamaya yönelik nesiller boyu çalışmalar.

Endodontik enfeksiyonlarla ilişkili mikrobiyomun profili, karmaşık mikrobiyotayı tanımlamak için geleneksel yöntemlerin sınırlamaları nedeniyle iyi karakterize edilememiştir. Bu nedenle endodontik mikrobiyomun derinlemesine dizilimi için yeni nesil dizileme (YND) teknolojilerini kullanılmaktadır. Yeni nesil dizileme teknolojisi sayesinde yüksek doğrulukta ve ultra hızlı olarak dizileme yapılabilmektedir. Bu yöntemle elde edilen genom dizisi başka hiçbir yöntemle elde edilemeyecek bir zengin ve özgün bir bilgi sağlamaktadır. Son yıllarda bu yöntemle yapılan araştırmalarda apikal periodontitisin etiolojisinde yer alan daha önce diğer moleküler yöntemlerle tespit edilememiş mikroorganizma türleri tespit edilmiştir (28).

Yeni Nesil Dizileme (YND)

Nükleik asit dizilemesi bir DNA veya RNA molekülünde bulunan nükleotidlerin sırasını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (29). 1977 yılında Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemi ile başlayan dizileme yöntemleri dizileme maliyetinin düşürülmesi ve dizileme süresinin kısaltılması amacıyla yeni nesil dizileme yöntemleri geliştirilmiştir; birinci nesil, ikinci nesil ve üçüncü nesil. Sanger sekanslama tekniği birinci nesil olarak kabul edilirken; 454 Roche, SOLID, Illumina HiSeq 2000 ve

IonTorrent platformları ikinci nesil, Pacific Bioscience ve Oxford Nanopore teknolojileri ise üçüncü nesil sekanslama olarak adlandırılmıştır (30). Sanger sekanslama tekniğinin zaman alan zahmetli bir yöntem olması sebebiyle maliyeti ve süresi kısa olan teknikler geliştirilmiştir. İlk büyük çaplı paralel sekanslama tekniği 54 Life Sciences firması tarafından geliştirilmiştir, bu teknik 500 kat daha hızlı ve 50 kat daha ucuz bir sekanslama hizmeti sağlayarak YND platformlarının ilk versiyonlarının ortaya çıkmasını sağlamıştır. YND platformlarında bir kütüphane oluşturma ve örnek amplifikasyonu *in vitro* olarak yapılır. Böylece örnek hazırlama ve kütüphane oluşturma işlemlerinin süresinin kısaltılması sağlanmaktadır (31). Bu sistemlerle yüksek doğrulukla ve oldukça hızlı dizileme yapılabilmektedir. Yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak birçok farklı organizmaların genomlarının dizilenmesi mümkündür (32). Yüksek verimli dizileme teknikleri, hem baskın hem de düşük miktarda bulunan taksonlar da dahil olmak üzere daha geniş bir bakteri taksonu tanımlama spektrumunu sağlayan büyük miktarda dizi okuması sağlamaktadır (33). Bu nedenle, YND analizleri kök kanallarında diğer moleküler temelli yöntemlere göre çok daha yüksek bir bakteri çeşitliliği ortaya koymaktadır (34).

YND teknolojisi ve biyoinformatik araçları, endodontik biyofilm topluluklarının deşifre edilmesi için uygun maliyetli ve yüksek verimli topluluk profilinin çıkarılmasına olanak tanımaktadır. Endodonti literatüründe kök kanallarındaki mikroorganizmaların tespit yönteminde yeni nesil dizileme yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (16, 35-38). YND tekniği daha önce tespit edilemeyen türlerin kök kanallarından tespit edilebilmesini olanak sağlamaktadır (39).

SONUÇ

Moleküler teknolojideki ilerlemeler, yeni patojenlerin keşfedilmesine, bazı spesifik bakteriler ile apikal periodontitis arasındaki nedensel ilişkilerin daha da güçlendirilmesine ve periradiküler hastalıkların patogeneze ışık tutulmasına olanak tanıyacak bir potansiyele sahiptir. Son on yılda apikal periodontitisin etiolojisinde yer alan birçok yeni mikroorganizmaların tanımlanması ve karakterizasyonunda YND teknikleri yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Gelecek yıllarda hızla gelişen bu teknoloji sayesinde, kök kanal enfeksiyonuna neden olan ve kök kanal tedavisine rağmen tedaviye dirençli olan yeni mikroorganizmalar tanımlanarak, bunlarla etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için yeni çalışmaların yapılması umut vadetmektedir.

KAYNAKLAR

1. Siqueira JF, Rôças IN. Microbiology of apical periodontitis. In: Dag Ørstavik editor. Essential Endodontology: Prevention and Treatment of Apical Periodontitis. John Wiley & Sons Ltd. 3rd ed. 2019. 91–142.
2. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ. Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:1407.
3. Willoughby Dayton Miller. *Zahnarzt.* 1984;28:375-376.
4. Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod.* 1995;21:70–3.
5. Rôças IN, Siqueira JF. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod.* 2010;6:45–52.
6. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, Cheung GSP. Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1748.
7. Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J.* 2002 ;35:321–29.
8. Siqueira JF, Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T. Searching for Archaea in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2005;31:719–22.
9. Glick M, Trope M, Bagasra O, Pliskin ME. Human immunodeficiency virus infection of fibroblasts of dental pulp in seropositive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;71:733–36.
10. Slots J, Sabeti M, Simon JH. Herpesviruses in periapical pathosis: An etiopathogenic relationship? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96:327–31.
11. Pashley DH. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *J Dent Res.* 1985;64:613–20.
12. Pinheiro ET, Gomes BPPA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36:1–11.
13. Tani Ishii N, Wang C Y, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1994;9:129–35.
14. Fabricious L, Dahlen G, Öhman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res.* 1982;90:134–44.
15. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. *Endod Topics.* 2003;6:3–28.
16. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among Oral Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66:486–505.
17. Saito D, De Toledo Leonardo R, Mazza Rodrigues JL, Tsai SM, Höfling JF, Gonçalves RB. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J Med Microbiol.* 2006;55:101–07.

18. Rôças IN, Siqueira JF, Aboim MCR, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98:741–49.
19. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001; 34:429–34.
20. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004;30:315–20.
21. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20:289-95.
22. Şen BH, Safavi KE, Spångberg LSW. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol.* 1997;42:513–20.
23. Waltimo TMT, Ørstavik D, Sirén EK, Haapasalo MPP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J.* 1999; 32:421–29.
24. Siqueira JF. Periapical Actinomycosis and infection with *Propionibacterium Propionicum*. *Endod Topics.* 2003;6:78–95.
25. Siqueira JF, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005; 31:411–23.
26. Paster BJ, Dewhirst FE. Molecular Microbial Diagnosis. *Periodontol* 2000;51:38.
27. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2001. ss. 100-110.
28. Shin JM, Luo T, Lee KH, Guerreiro D, Botero TM, McDonald NJ, Rickard AH. Deciphering Endodontic Microbial Communities by Next-generation Sequencing. *J Endod.* 2018;44(7):1080-87.
29. Darcan, C., & Türkyılmaz, O. (2018). Yeni Nesil Dizileme Teknolojisine Genel Bakış. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 5(1), 41-49.
30. Ronaghi M, Nygren M, Lundeberg J, Nyrén P. Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing. *Anal Biochem.* 1999; 267:65–71.
31. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005; 437:376–80.
32. Shin JM, Luo T, Lee KH, Guerreiro D, Botero TM, McDonald NJ, Rickard AH. Deciphering Endodontic Microbial Communities by Next-generation Sequencing. *J Endod.* 2018; 44:1080–87.
33. Manoil D, Al-Manei K, Belibasakis GN. A Systematic Review of the Root Canal Microbiota Associated with Apical Periodontitis: Lessons from Next-Generation Sequencing. *Proteomics Clin Appl.* 2020; 14(3):e1900060
34. Nardello LCL, Amado PPP, Franco DC, Cazares RXR, Nogales CG, Mayer MPA, Karygianni L, Thurnheer T, Pinheiro ET. Next-Generation Sequencing to Assess Potentially Active Bacteria in Endodontic Infections. *J Endod.* 2020;46:1105-12.
35. Kesim B, Ülger ST, Aslan G, Cudal H, Üstün Y, Küçük MÖ. Amplicon-based next-generation sequencing for comparative analysis of root canal microbiome of teeth with primary and persistent/secondary endodontic infections. *Clin Oral Investig.* 2023;27:995-1004.
36. Amaral RR, Love RM, Braga T, Souza Côrtes MI, Rachid CTCC, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Impact of root canal preparation using two single-file systems on the intra-radicular microbiome of teeth with primary apical periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2024;28:139.
37. Pérez-Carrasco V, Uroz-Torres D, Soriano M, Solana C, Ruiz-Linares M, Garcia-Salcedo JA, Arias-Moliz MT. Microbiome in paired root apices and periapical lesions and its association with clinical signs in persistent apical periodontitis using next-generation sequencing. *Int Endod J.* 2023;56:622-636.
38. Keskin C, Demiryürek EÖ, Onuk EE. Pyrosequencing Analysis of Cryogenically Ground Samples from Primary and Secondary/Persistent Endodontic Infections. *J Endod.* 2017;43:1309-16.