

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**KÖK KANALI MİKROORGANİZMALARININ
ELEKTRONİK BURUN SİSTEMİ KULLANILARAK TESPİTİ**

Proje No: SBT-07-38

Doktora Tez Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Özgür ER

Diş Hekimliği Fakültesi/Diş Hekimliği Klinik Bilimler

Yasemin KAHRAMAN

Diş Hekimliği Fakültesi/Diş Hekimliği Klinik Bilimler

Nisan 2010

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Asistan arkadaşlarım ve bölüm personeline,

Verilerinin değerlendirilmesinde teknik konularda fikirlerinden yararlandığımız Prof. Dr. Musa Hakan ASYALI' ya,

Deney aşamasında gerekli laboratuvar ortamını sağlayan, yardımları ve bilgilerinden yararlandığımız Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Hatice Özbilge ve Yrd. Doç. Dr. Esmâ KAYA' ya,

Desteklerinden ötürü Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne,

Teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT.....	6
1. GİRİŞ VE AMAÇ	7
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 KÖK KANAL ENFEKSİYONLARININ MİKROBİYOLOJİSİ	8
2.1.1. Mikroorganizmaların Pulpaya Ulaşma Yolları	8
2.2. KÖK KANALI PATOJENLERİ	9
2.3. KÖK KANALINDAKİ MİKROBİYAL EKOSİSTEM	13
2.3.1 Anaerobik Ortam	13
2.3.2 Mikroorganizmalar Arası Etkileşim	14
2.3.3 Besin Mevcudiyeti	15
2.4. ENDODONTİK ENFEKSİYONLARDA BAKTERİYEL PATOJENİTE	16
2.4.1. Mikrobiyal Virülans Faktörler	17
2.5 ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLEN PATOJENLER.....	20
2.5.1 <i>E. Faecalis</i>	20
2.5.2 <i>S. sanguinis</i>	21
2.5.3 <i>F. Nucleatum</i>	21

2.5.4 <i>P. Gingivalis</i>	21
2.5.5. <i>P. Alactolitiycus</i>	22
2.5.6 <i>C. albicans</i>	22
2.5.7. <i>C. Glabrata</i>	23
2. 6. ORAL MİKROORGANİZMALARİ BELİRLEME YÖNTEMLERİ	23
2. 6. 1 Kültür Yöntemleri	23
2. 6. 2 Faz-kontrast ve Karanlık Alan Mikroskopisi	24
2. 6. 3 İmmünolojik Yöntemler ve Enzimatik Teknikler	24
2. 6. 4 Moleküler Yöntemler	24
2.7. KOKU ÖLÇÜMÜ, ELEKTRONİK BURUN SİSTEMLERİ.....	25
2. 7. 1. EB Sisteminin Uygulama Alanları	27
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	30
3. 1. KOKU VERİLERİNİN ALINMASI VE EB SİSTEMİNİN EĞİTİMİ.....	30
3. 2. DİŞLERİN HAZIRLANMASI VE KOKU VERİLERİNİN ALINMASI	37
4.BULGULAR.....	43
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	49
6.KAYNAKLAR	57

KÖK KANALI MİKROORGANİZMALARININ ELEKTRONİK BURUN SİSTEMİ KULLANILARAK TESPİTİ

ÖZET

Pulpa ve periradiküler doku hastalıklarının çoğu hem aerop hem de anaerob mikroorganizmaları içeren karışık bir mikroflora ile ilişkilidir. Hekim tedavi ile ilgili etkili bir yöntem belirleyebilmek için mikroorganizma varlığı ile endodontik hastalık arasındaki yakın ilişkiyi kavramalıdır.

Endodontik enfeksiyonlardaki bakteri türlerini ortaya çıkarmak için kültür ve moleküler metotlar kullanılmaktadır. Son yıllarda moleküler yöntemlerdeki gelişmelere rağmen her iki metodun da bir takım dezavantajları bulunmaktadır.

Elektronik burun terimi, insan koku duyusunu taklit edebilen bir elektronik sistemi tanımlar. Elektronik burun sistemleri tıp alanında ve mikrobiyolojik araştırmalarda başarıyla kullanılmaktadır. Bu sistemlerinin en önemli özelliği, koku çeşitlerini çok kısa bir süre içerisinde insan burnundaki hassasiyet derecesinde algılayıp ayrıştırabilmesi ve sonucu objektif olarak sunmasıdır.

Bu çalışmada, kök kanal enfeksiyonlarında sıklıkla görülen 7 mikroorganizma türünün elektronik burun sistemi kullanarak tespiti değerlendirilmiştir.

Çalışmada öncelikle mikroorganizma süspansiyonlarının koku verileri alınarak elektronik burun sisteminin eğitimi ve hangi analizlerin bir sonraki uygulamada kullanılacağı belirlenmiş ardından hazırlanan mikroorganizma süspansiyonları çekilmiş dişler içerisine inokule edildikten sonra koku verileri alınarak sınıflandırma yapılmıştır.

Elektronik burun sistemi ile uygun sınıflandırma yöntemi kullanılarak hangi tür olduğu bilinmeyen mikroorganizmaların %80 başarı ile sınıflandırılabilceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Elektronik burun, kök kanal enfeksiyonu, mikrobiyoloji, bakteri, mantar.

DETECTION OF ROOT CANAL MICROORGANISMS USING ELECTRONIC NOSE SYSTEM

ABSTRACT

Most diseases of pulp and periradicular tissues are associated with mixed microflora including both aerobic and anaerobic microorganisms. Clinicians must understand the close relationship between the presence of microorganisms and endodontic disease process to determine an effective procedure with respect to the treatment.

Culture and molecular methods are used to detect bacterial species in root canal infections. Despite the advances in molecular methods recently, both the culture and the molecular methods have several disadvantages.

The term electronic nose describes an electronic system that is able to mimic the human sense of smell. Electronic nose systems have already been used with success in the medical science and microbiological research. The most important property of electronic nose systems is the ability to detect different odour types in a short period of time with almost sensitivity of human nose. Furthermore, the result of process using electronic nose system is objective.

The aim of this study was to detect 7 different microorganism species which are frequently seen in root canal infections, using electronic nose instrument.

First obtaining the odour datas from the suspensions of microorganisms, the training of electronic nose system and the analysis that would be used in the next application determined. The suspensions of microorganisms were inoculated to the extracted teeth and then the odour datas were obtained and classified.

Using the proper classification method, the unknown microorganism species could be classified with 80% accuracy.

Keywords: Electronic nose, root canal infection, microbiology, bacteria, fungi.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Pulpa ve periradiküler doku hastalıklarının çoğu hem aerop hem de anaerop mikroorganizmaları içeren karışık bir mikroflora ile ilişkili olarak oluşmaktadır. Kök kanal tedavisi, mikroorganizmaları kök kanalından mümkün olduğunca uzaklaştırmak ve iyi bir tıkama sağlayarak dentin kanallarında kalan inatçı mikroorganizmaların tekrar çoğalıp kök kanallarında yeni bir enfeksiyon başlatmasını engellemek amacıyla yapılır. Bununla beraber, kök kanallarında bulunabilen bu tür mikroorganizmaların varlığı, prognozu olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

Pulpa ve periradiküler doku hastalıklarına sebep olan mikroorganizmaların belirlenmesi, tedavinin başarısı açısından önem taşımaktadır. Kök kanal enfeksiyonlarının mikrobiyal içeriği genel olarak kültüre dayalı metotlarla araştırılmaktadır. Kültür dışında, mikroskopi, enzimatik teknikler, immunolojik teknikler ve moleküler teknikler de bu amaçla kullanılmaktadır. Son yıllarda mikrobiyal patojenlerin araştırılmasında moleküler tekniklerin kullanıldığı çalışmalar hız kazanmıştır. Ancak hem mikrobiyolojik kültür hem de moleküler biyolojik metotların bazı dezavantajları mevcuttur.

Elektronik burun (EB) sistemi, insanın koku algılama sistemi temel alınarak geliştirilmiş bir cihazdır. Bu cihazın yapısında, kokuları ve uçucu bileşenleri algılayan bir sistem ile örüntü tanıma (pattern recognition) sistemleri bulunmaktadır. EB sistemi, basit olarak bir sensör dizisi kullanarak karmaşık kokuları sezer ve birbirinden ayırt eder. Birçok uygulama alanı bulunan EB sistemi, tıp alanında çeşitli hastalıkların teşhisinde, mikroorganizmaların sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. Diş hekimliğinde ise ağız kokusunun tespitinde ve enfekte kök kanalları ile bakteriler arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

Enfekte kök kanallarında başarılı bir tedavinin gerçekleştirilebilmesi için kök kanalından mikroorganizmaların uzaklaştırılması zorunludur. Endodontik hastalıklara neden olan patojenlerin tam olarak bilinmesi tedavi planlaması açısından önem taşımaktadır. Hekimin etkili bir tedavi yöntemi geliştirebilmesi, mikroorganizma varlığı ile endodontik hastalık arasındaki yakın ilişkiyi kavramasına bağlıdır.

Bu çalışmanın amacı, endodontik enfeksiyon etkeni 7 mikroorganizmanın EB sistemi yardımıyla sınıflandırılmasının araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KÖK KANAL ENFEKSİYONLARININ MİKROBİYOLOJİSİ

Mikroorganizmalar insan vücudunun tüm yüzeylerinde kolonize olmuşlardır. Kolonizasyon basit olarak, biyokimyasal ve fiziksel koşullar üremek için yeterli olduğunda mikroorganizmaların konağa yerleşip yaşamasıdır. Asıl olarak 10^{13} ökaryotik hücreden oluşmuş insan vücudunun 10^{14} bakteri ihtiva ettiği tahmin edilmektedir (1). Normal flora, mikroorganizmaların simbiyotik olarak konakçıda daimi kolonizasyonu sonucu oluşur. Ancak uygun koşullar sağlandığında normal oral flora üyeleri, fırsatçı patojen olabilirler. Fıratçı patojenler, pulpa ve periapikal dokular gibi vücudun steril alanlarına ulaştıklarında hastalığa yol açar. Patojenik doku hasarı, mikroorganizmalara karşı konak dokunun cevabını kapsar. Konakçı bu durumda özgül olmayan ve özgül immün cevapla karşılık verir (2).

Pulpa patolojilerinin ve periapikal lezyonların birincil etiyolojik nedeni mikroorganizmalardır (3, 4). Oral mikrobiyolojinin babası Miller, 1894 yılında pulpa hastalığında bakterilerin varlığını tespit eden ilk araştırmacıdır (4). Kakehashi ve ark. (5) pulpa ve periradiküler hastalıklara bakterilerin neden olduğunu kanıtlayan klasik çalışmayı 1965 yılında yayınlamışlardır. Bu araştırmacılar, germ-free farelerin oral kaviteye açık pulpalarında ve periradiküler dokularında patolojik değişikliklerin meydana gelmediğini, oysa ağız florası ile kontamine olan fare grubunda pulpa nekrozu ve periapikal lezyonların oluştuğunu tespit etmişlerdir. Sonuçta araştırmacılar bir dokuda mikrobiyal flora bulunmasının veya bulunmamasının, dokunun patolojik yıkımında veya iyileşmesinde asıl belirleyici faktör olduğu sonucuna varmışlardır (5). Möller ve ark. (6) 1981 yılında maymunlar üzerinde yaptıkları çalışmada, devitalize ettikleri pulpalarından sadece bakterilerle enfekte edilenlerde periapikal bölgede lezyon oluştuğunu bildirmişlerdir.

Ağız kavitesinden 300'den fazla bakteri türünün kültürü yapılabilirken, kök kanal enfeksiyonlarında sadece sınırlı sayıda bakteri türü izole edilmektedir (7). Bu mikroorganizmalardan en sık görülenler: *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, ve *Lactobacillus* türleridir (7, 8). Enfekte kök kanalında ortalama 1- 12 farklı tür bakteri mevcuttur ve CFU (Colony forming units) sayısı 10^2 - 10^8 arasındadır (9).

2.1.1. Mikroorganizmaların Pulpaya Ulaşma Yolları

Mikroorganizmalar kök kanal sistemine çeşitli yollar ile ulaşmaktadır.

Koronal Yol: Mikroorganizmalar pulpa boşluğuna en çok çürük yolu ile ulaşırlar. Bakteriler dentin tübüllerine girer ve burada çoğalırlar. Bakterilerin birçoğunun çapı 1 μ m den az iken,

dentin tübül çapları 1- 4 µm arasında değişir. Mine ya da sement tabakası yok olmuşsa, mikroplar pulpaya açık tübüllerden ulaşabilirler. Sağlıklı bir pulpa mikrobiyal invazyona karşı dirençlidir. Dentin tübüllerindeki bakteri hareketi, odontoblastlar, mineralize kristaller ve çeşitli makromoleküller tarafından kısıtlanır. Bakteriler ve yan ürünleri pulpa açılımı olmaksızın pulpayı indirekt olarak etkileyebilir. Bazı çalışmalarda açık dentin tübüllerine komşu pulpada inflamatuvar reaksiyon ispat edilmiştir (10, 11). İnflamatuvar reaksiyonlar pulpa nekrozu ile sonuçlanabildiği halde, büyük bir kısmı iyileşerek tamir olabilir (12).

Sağlıklı bir pulpa travma sonucu açıldığında, inflamasyon, nekroz ve bakteri infiltrasyonunun 2 hafta sonra bile pulpanın ancak 2 mm içerisine ilerleyebildiği gösterilmiştir (13). Bunun aksine nekrotik bir pulpa hızla istila edilir. Odontoblastların ölümünü takiben boş dentin tübüller, mikropların pulpa boşluğuna girişini kolaylaştırabilir (12). Mikroorganizmalar, restoratif işlemler, travma ya da anormal diş gelişimi sonucu pulpanın direkt açıldığı durumlarda da pulpaya ulaşabilirler (12).

Retrograd Yol: Enfekte kök kanal sisteminden, tübüller, lateral ya da aksesuar kanallar, furkasyon kanalları ve apikal foramina yoluyla çıkan irritanların etraftaki ataşmanı direkt olarak etkilediğine inanılmaktadır. Ancak periodontal hastalığın doğrudan pulpal hastalığa neden olup olmadığı ile ilgili tartışmalı görüşler mevcuttur (14- 16). Sement dokusunun periodontal tedavi sırasında kaldırılması, dentin tübüllerini ağız florasına açık hale getirir. Yapılan bir çalışmada kök düzeltmesini takiben pulpa iltihabı, açık dentin tübüllerine bakteri penetrasyonu ve termal hassasiyet gösterilmiştir (17). Kobayashi ve ark. (18) ileri düzey periodontit hastalarının kök kanallarındaki bakteri ile periodontal ceplerindeki bakterileri karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, hem periodontal alanda hem de pulpada bakteri mevcudiyeti durumunda, periodontal cep ya da sulkusun, kök kanal enfeksiyonunda yer alan bakterinin kaynağı olduğuna inanmaktadır (18).

Anakorezis: Bakterilerin pulpaya diğer bir geçiş yolu olan anakorezis, mikropların, kan ya da lenf yolu ile pulpitli bir diş gibi inflamasyonlu alana ulaşmasıdır. *Brucella abortus*, streptokok ve stafilokok gibi bakterilerin köpeklere intravenöz olarak enjekte edilerek, bu bakterilerin hastalıklı periapikal bölgeden ve iltihaplı pulpa dokusundan izole edildiğini ileri süren deneysel araştırma (19) sonuçlarına karşın, başka bir çalışmada sistemik olarak enjekte edildiğinde bakterileri, kedilerin doldurulmamış kök kanallarındaki sıvıdan izole edilemediği belirtilmiştir (20). Anakorezis hayvan çalışmalarında gösterilmiş olsa da önemli hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (2). Ancak travmaya uğramış dişler bu yolla enfekte olabilir (21).

2. 2. KÖK KANALI PATOJENLERİ

Kök kanallarındaki mikrofloranın bileşimi yıllar boyunca oldukça çok araştırmanın odağı olmuştur. Polimikrobiyal etkileşimler ve besin gereksinimleri endodontik enfeksiyonlardan

sorumlu mikroorganizmaların kültürünü ve tanımlanmasını oldukça zorlaştırmaktadır. 1970'lerden önce anaerobik tekniklerdeki yetersizlikten dolayı az sayıda anaerop türü belirlenebilmiştir. Zaman içinde mikrobiyolojik kültür yöntemlerinin gelişmesiyle, kök kanalı mikroflorası daha detaylı olarak incelenmiş ve buradaki mikroorganizmalar ayrıntılı olarak tespit edilebilmiştir. Böylelikle pulpa ve periapikal hastalıkların patolojisinde rol oynayan anaerop bakterilerin önemi ortaya çıkmıştır. Ancak gelişmiş kültür tekniklerine rağmen hala kültürü yapılamayan birçok mikroorganizma mevcuttur. Enfekte kök kanalında var olan bakteriler, oral kavitenin total mikroflorası ile karşılaştırıldığında kısıtlı gruplarla sınırlıdır (7).

Yapılan araştırmalarda (22, 23), enfekte kök kanallarında bulunan mikroorganizmaların baskın olarak zorunlu anaerop oldukları, *Enterococcus faecalis* gibi fakültatif anaerop bakteriler bulunduğu, ayrıca çeşitli maya hücrelerinin de bulunduğu bildirilmiştir. Kök kanal enfeksiyonlarında sıklıkla görülen mikroorganizma türleri Tablo 2. 1'de verilmiştir (24).

Tablo 2. 1. Kök kanal enfeksiyonlarında sıklıkla görülen mikroorganizma türleri (24)

Zorunlu anaeroplara	Fakültatif anaeroplara
Gr pozitif koklar • <i>Streptococcus</i> • <i>Peptostreptococcus</i>	Gr pozitif koklar • <i>Streptococcus</i> • <i>Enterococcus</i>
Gr pozitif çomaklar • <i>Actinomyces</i> • <i>Lactobacillus</i> • <i>Bifidobacterium</i> • <i>Propionibacterium</i> • <i>Eubacterium</i>	Gr pozitif çomaklar • <i>Actinomyces</i> • <i>Lactobacillus</i>
Gr negatif koklar • <i>Veillonella</i>	Gr negatif koklar • <i>Neisseria</i>
Gr negatif çomaklar • <i>Porphyromonas</i> • <i>Prevotella</i> • <i>Fusobacterium</i>	Gr negatif çomaklar • <i>Capnocytophaga</i> • <i>Eikenella</i>
• <i>Selenomonas</i>	
• <i>Campylobacter</i>	
Spiroketler • <i>Treponema</i>	Mantarlar • <i>Candida</i>

Sundqvist ve ark. (25) nekrotik pulpalı 72 tek köklü dişin kök kanallarını araştırdıkları çalışmalarında, bakterilerin %90'ından fazlasını anaeroplara oluşturduğunu bildirmektedir.

Baumgartner ve Falker (26) pulpaları çürük nedeni ile açılmış periapikal lezyonu bulunan kök kanallarının apikal 5 mm'lik bölümünde 50 suş izole ettiklerini ve bu mikroorganizmaların %68'ini zorunlu anaeroplara oluşturduğunu belirtmiştir.

Sundqvist (27) 1992 yılında yaptığı çalışmada pulpaları nekrotik 65 tek köklü diştten elde ettiği mikrobiyolojik örnekleri incelemiş, bunların %90'ının anaerop bakteriler olduğunu göstermiştir.

Moğol (28) 2002 yılında, asemptomatik periapikal lezyonlu dişlerin kök kanalı mikroflorasını belirlemek için yaptığı çalışmada, örnek alınan 47 kök kanalından 46 tanesinde (97%) zorunlu anaerop bakterilerin bulunduğunu bildirmiştir.

Le Goff ve ark. (8) çürük görülmeyen nekrotik pulpalı dişlerin mikrobiyotasını inceledikleri çalışmalarında, 26 tek köklü diştten mikrobiyolojik örnekler alınmış, bunlardan mikroorganizma görülen 18 tanesi analiz edilmiş ve toplam 84 bakteri türünün izole edildiği örneklerin %81'inin zorunlu anaerop, %19'unun da fakültatif anaeroplara olduğu bildirilmiştir.

Abou Rass ve ark. (29) pulpası kapalı periapikal lezyonlu dişlerde yaptıkları çalışmada mikroorganizma çeşitliliğini araştırmışlar, çalışmada 13 periapikal lezyonlu hastadan cerrahi yolla alınan örnekleri incelemişlerdir. Periapikal lezyonlu dişlerin kök kanallarındaki mikroorganizmaların çok sayıda değişik türleri içeren, çoğunlukla anaerobik, özellikle de Gram (-) bakteriler olduğunu bulmuşlardır. Alınan örneklerin %63.6'sı zorunlu anaerop, %36.4'ü fakültatif anaerop olarak belirlenmiştir.

Delboni ve ark. (30) 2007 yılındaki çalışmalarında 30 tane periapikal lezyonlu, kök kanalı dolgu yapılmış diştten toplam 114 mikroorganizma izole etmişlerdir. Bunlardan %81.5'i fakültatif anaerop, %18.5'i zorunlu anaerop olarak bulunmuştur. İzole edilen mikroorganizmalardan %86'sı Gram (+), %14'ü Gram (-) olarak rapor edilmiştir.

Pinherio ve ark. (31) inatçı periapikal lezyonlu dişleri inceledikleri bir çalışmalarında, 60 kanal dolgu diştten 51 tanesinde mikroorganizma elde etmiştir. Çoğu örnekte kanal başına 1 ya da 2 tür mikroorganizma bulunmuştur. İzole edilen bakterilerden %57.4'ü fakültatif anaerob, %83.3'ü Gr (+) türlerdir.

Nekrotik pulpalı 52 anterior (kesici) dişin kök kanallarının araştırıldığı bir çalışmada örneklerin %78.8'inden mikroorganizma izole edilmiştir. İzolatların %30.1'ini zorunlu anaerop, %53'ünü fakültatif anaeroplara oluştururken kök kanallarının %51.7'sinde birden fazla mikroorganizma türü tespit edilmiştir (32).

Gomes ve ark. (33) 2004 yılında yaptıkları çalışmalarında 41 nekrotik (birincil enfeksiyonlu) ve 19 kanal tedavisi başarısız olmuş (ikincil enfeksiyonlu) dişin kök kanal mikrobiyotasını incelemişler, nekrotik kanallardan (60/41) 188 bakteri türü izole edilmiş, bunların 124'ü Gram (+), 137'si zorunlu anaerop olarak tespit edilmişlerdir. İkincil enfeksiyonlu dişlerden izole edilen 36 bakteri türünden 27 tanesi Gram (+), 16 tanesi de fakültatif anaerop olarak bulunmuştur (33).

Bakteriler, araştırmalarda en çok çalışılan mikrobiyal patojen olsalar da, mantarlar da enfekte kök kanalları ile ilgilidir. Mantarlar pulpaya, dentin tübüllerinden, derin çürüklerden veya kök kanal tedavisi esnasında ağız florasından inokule olurlar (23, 34). █

Enfekte kök kanallarında mantarlar, birincil enfeksiyonlar ile karşılaştırıldığında inatçı ya da ikincil enfeksiyonlarda daha sık bulunmaktadır (3, 23, 35, 36). Waltimo ve ark. 1997 yılında yaptıkları bir çalışmada inatçı endodontik enfeksiyonun olduğu 967 olgudan mikrobiyolojik örnekler alarak incelemişler ve mikroorganizma bulunan 692 örneğin 47 (%7) tanesinde mantar ayırt etmişlerdir (23). Bu çalışma ile araştırmacılar geleneksel yöntemlerle yapılan kök kanalı tedavisi sonrası oluşan inatçı apikal periodontit olgularında mantarların önemli rol oynayabilecekleri sonucuna varmıştır (23).

Sundqvist ve ark. (35) 1998 yılında yaptıkları çalışmada, kanal tedavisi başarısız olmuş 24 olgunun 2 tanesinde *Candida albicans* bulmuşlardır.

Molander ve ark. (37) 1998 yılında, daha önce kök kanalı tedavisi yapılmış apikal periodontitli 100 dişte yaptıkları bir çalışmada yalnızca 3 kanalda (%3) *C. albicans* izole etmişlerdir.

Hancock ve ark. (38) 2001 yılında yaptıkları çalışmada, periapikal lezyonu olan 54 tane kök kanal dolgulu dişin mikroflorasını incelemişler, 34 dişte üreme gözlenirken, *C. albicans* bulunma oranı %3 olarak bulunmuştur.

Cheung&Hu (39) 2001 yılında yaptıkları çalışmada, periapikal lezyonu olan, kanal dolgulu asemptomatik dişlerin mikroflorasını incelemiş, çalışılan 18 örnekten 12 tanesinde mikroorganizma izole edilmiştir. Bu araştırmada, 2 örnekte mantara (*C. albicans*) rastlanmıştır.

Baumgartner ve ark. (40) 2000 yılında yaptıkları çalışmada, rastgele seçilen periapikal lezyonlu enfekte kök kanallarında polimerize zincir reaksiyonu (PZR) tekniği kullanarak *C. albicans* oranını %21 olarak bulmuşlardır.

Siqueira ve ark. (41) tedavi görmemiş kronik periradiküler lezyonu bulunan dişlerde SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) ile yaptıkları çalışmada 15 örnekten 1 tanesinde mantara benzeyen (yeastlike) hücrelere rastlamışlardır. Siqueira ve ark. 2002 yılında PZR metodu kullanarak yaptıkları çalışmada, apikal periodontitli 91 kök kanalından yalnızca 1 tanesinde maya izole edebilmişlerdir.

2.3. KÖK KANALINDAKİ MİKROBİYAL EKOSİSTEM

Kök kanalı içindeki mikroorganizmaların üremeleri ve kolonizasyonlarını etkileyen çeşitli ekolojik öğeler bulunmaktadır. Kök kanal enfeksiyonlarındaki mikroflora popülasyonu sabit değildir, zamanla değişir.

Mikrobiyal floranın kompozisyonunu;

- 1) Anaerobik ortam,
- 2) Mikroorganizmalar arasındaki etkileşim ve
- 3) Besin maddelerinin mevcudiyeti tayin eder.

2.3.1 Anaerobik Ortam

Kök kanal sisteminin dinamiği ile ilgili yapılan çalışmalar sonucu, endodontik çevrenin, anaerop mikrofloranın belirli oranlarda gelişimine olanak sağlayan, seçici bir habitat olduğu gösterilmiştir (9).

Anaerop bakterilerin üremelerini etkileyen başlıca üç önemli faktör vardır:

- i) Ortamın oksijen konsantrasyonu,
- ii) Ortamdaki süperoksit radikal konsantrasyonu ve peroksitler,
- iii) Ortamın oksido-redüksiyon potansiyalidir.

i) Oksijen konsantrasyonu: Anaerop bakteriler metabolizmaları ve üremeleri için gerekli enerjiyi fermentasyon reaksiyonlarından sağlarlar. Anaeroplara, moleküler oksijeni kullanamadıkları gibi, oksijen bu bakteriler üzerinde tam olarak bilinmeyen nedenlerle doğrudan toksik etki oluşturmaktadır. Kök kanalı gibi kapalı bir ortamda oksijen konsantrasyonu apikal doğrultuda yavaş yavaş azalır. Zamanla, enfekte pulpa nekrozu oral çevreye açılmamış dişte ne kadar uzun süre var olursa o kadar fazla oksijen tüketilir, böylece anaeroplara hayatta kalmak ve çoğalmak için daha iyi koşullar sağlanmış olur. Bunun sonucu olarak, zorunlu anaeroplara ve fakültatif organizmaların üremesi desteklenmiş olur (27).

ii) Süperoksit radikalleri ve peroksitler: Oksijen kullanan bakterilerin üreyebilmeleri için oksijen gereklidir. Bu bakteriler kendilerini toksik süperoksit radikallerinden ve peroksitlerden koruyan enzimlere sahiptirler. Bunlardan süperoksit dismutaz, toksik süperoksit radikallerinin, toksisitesi daha düşük olan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize ederken, katalaz enzimi de hidrojen peroksitten su ve oksijen oluşumunu sağlar. Zorunlu anaerop bakteriler ise kendilerini toksik oksijen radikallerinden koruyan süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerine sahip değildirler. Mikroaerofilik bakteriler oksijen bulunan ortamlarda

üreyebilmelerine rağmen, en iyi karbondioksitli ve düşük oksijenli ortamlarda ürerler. Fakültatif anaeroplara, oksijen varlığında veya yokluğunda üreyebilir, hem katalaz hem de süperoksit dismutaz enzimlerine sahiptirler (42).

iii) Oksido-redüksiyon potansiyeli (Eh): Anaeroplara üremesinde önemli rol oynayan diğer bir faktör de Eh'dır. Bir ortamın Eh'ı, elektron verme eğiliminin ölçümü olup, ortamda indirgenen maddelerin bulunması Eh'ının düşmesine yol açar. Anaeroplara ancak düşük ya da negatif Eh bulunan ortamlarda üreyebilirler (43).

2.3.2 Mikroorganizmalar Arası Etkileşim

Enfekte kök kanallarından alınan mikrobiyolojik örnekler incelendiğinde bazı bakteri türlerinin genellikle bir arada bulundukları gözlenmektedir (44).

Mikroorganizmalar arası etkileşimin kök kanalı ekolojisinde önemi büyüktür ve endodontik ortama uyumlu polimikrobiyal floranın oluşumunu sağlamaktadır (45). Endodontik floranın ekolojisini etkileyen mikroorganizmalar arası etkileşimler, pozitif (sinerjik) veya negatif (antagonist) yönde olabilir.

Sundqvist (44) 1992 yılındaki çalışmasında, kök kanal enfeksiyonlarında en sık bulunan türlerden biri olan *Fusobacterium nucleatum* ile *Peptostreptococcus anaerobius*, *Campylobacter rectus* ve *Porphyromonas endodontalis* arasında pozitif ilişki tespit etmiştir. Yine *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *P.anaerobius*'un *Eubacteriler* ile arasında pozitif ilişki bulunmaktadır (27).

Çoğu streptokok türünün, *Capnocytophaga achracea* ve *Veillonella parvula*'nın ise diğer bakteriler ile ya antagonist ilişkide oldukları ya da hiçbir bağlantılarının olmadığı tespit edilmiştir (44). Ayrıca, *Actinomyces israelii*'nin *Propionibacterium propionicum* dışındaki hiçbir bakteri türü ile bağlantısı olmadığı görülmüştür. *P. propionicum* ile *Actinomyces* türleri arasında sinerjik ilişki bulunmuştur (44).

Porphyromonas türlerinin *F.nucleatum*'la birlikte yaptığı aktivasyon desteğinde, Feuille ve ark. (46) farede lezyon model yardımıyla *F.nucleatum*'un *Porphyromonas gingivalis*'le birlikte yumuşak doku yıkımında sinerjik etki gösterdiğini ve bunun sonucunda dişin nekroz olduğunu rapor etmişlerdir.

Dahlen ve ark.'nın (47) yaptıkları çalışmada, enfekte maymun dişlerinin çürük kuronlarında sekiz bakteri çeşidi izole edildiği bildirilmiştir. Bunlar mikroorganizmaların farklı çeşitlerinin birleşmesine bağlı olarak farklı iltihabi cevapları meydana getirmektedir. *P. anaerobius*, *Prevotella oralis*, *Fusobacterium necrophorum*'un karışımı bakteriler arasında en etkili olan karışımdır ve şiddetli lezyonlara neden olmaktadır. Oysa bu mikroorganizmalar diğer kombinasyonlarda veya tek başlarına yaşayamamaktadır ve daha az inflamasyon

oluşturmaktadır. Bu faktörler endodontik enfeksiyondaki sinerjinin etkisine açıklık getirmektedir (7).

2.3.3 Besin Mevcudiyeti

Besin türü ve mevcudiyeti mikrobiyal gelişme için önemli bir faktördür. Parçalanmış pulpa dokusu ve doku sıvıları kök kanalındaki besin maddelerinin önemli kaynaklarını oluştururlar (27, 44).

Kök kanalındaki çevresel koşullar, aminoasit ve peptidleri fermente edebilen anaerob bakterilerin üremesine izin verirken, öncelikle karbonhidratların fermentasyonu ile enerji sağlayan bakteriler için uygun beslenme koşulları bulunmadığından bu türler sınırlı kalabilir. Bu durum, ağız kavitesine açık kök kanallarının koronal kısmında streptokoklar gibi fakültatif anaeroplara, apikal kısmında da zorunlu anaeroplara baskın olmasının sebebinin açıklanmaktadır (48).

Ter Steeg ve van der Hoeven (49) kök kanal florasının dinamiği ile ilgili önemli ipuçlarını ortaya koydukları çalışmalarında, subgingival plak organizmalarının serum içindeki üreme sıralarını incelemişler, üremelerin üç faza ayrılabilirliğini bildirmişlerdir. Birinci fazda, serumdaki düşük karbonhidrat içeriği hızlı üreyen sakkarolitik bakteriler tarafından tüketilmiş ve bu da laktik asit ile formik asit üretilmesine yol açmıştır. İkinci fazda, proteinler hidrolize edilmiş, bir miktar amino asit fermentasyonu olmuş ve serum glikoproteinlerinden ayrılmış olan karbonhidratların kalan miktarı kullanılmıştır. *P. intermedia*, *Veillonella parvula*, *F. nucleatum* ve *Eubacterium* türleri, ikinci faz sırasında baskın olarak üreyen mikroorganizmalardır. Üçüncü fazda, yoğun protein ayrışması meydana gelmiştir. Bu fazın baskın mikroorganizmaları *P. micros*, *F. nucleatum* ve *Eubacterium* olmuştur (49). Diğer bir çalışmada (50), yine subgingival plak organizmalarının kültürünün serum içinde üremesi sonucu *P. micros*'un baskın tür olduğu gösterilmiştir. *P. micros*'un ekolojik çevresi, onun serum proteinlerini ayrıştırarak, peptid ve amino asit oluşumunu sağlayan peptidaz aktivitesi ile ilgili olabilir (49). Bu amino asitler, *P. micros* tarafından kullanılabilir gibi, serumda bulunan proteolitik aktivitesi olmayan ya da çok az olan diğer bakteriler tarafından da kullanılabilir (49).

Besinsel olarak mikroorganizmaların bazı türlerinin metabolik yıkım ürünleri, diğer türlerin besin zincirinin bir kısmını oluşturabilmektedir (7). Siyah pigmentli anaerobik rodlar (*Prevotella* ve *Porphyromonas* türleri) üremek için vitamin K ve hemine ihtiyaç duyarlar. Vitamin K, diğer bakteriler tarafından üretilir (51). Hemin, hemoglobinin parçalanması sonucu ortaya çıkar, ancak bazı bakteriler de hemini üretebilirler. Örneğin *C. rectus*'un *Porphyromonas* türlerinin üremesini, hemini üreterek stimüle ettiğini gösteren bir çalışma bulunmaktadır (52).

2.4. ENDODONTİK ENFEKSİYONLARDA BAKTERİYEL PATOJENİTE

Kök kanalını enfekte eden her oral mikroorganizmanın periapikal dokuları da enfekte etme olasılığı bulunmaktadır. Bu sonuca dayanarak tüm oral mikroflora üyeleri kök kanalı ve periapikal dokuların enfeksiyonunda birer patojen olarak görülebilir (7). Bununla birlikte, kök kanal patojenlerinin hastalık yapabilmesi için bazı şartlar gerekmektedir:

1. Mikroorganizmalar periradiküler hastalığı başlatıp sürdürebilmek için yeterli sayıda bulunmalıdır.
2. Mikroorganizmalar kök kanal enfeksiyonu oluşturabilmesi için virülans faktörlere sahip olmalıdır.
3. Kök kanal sistemine yaygın olarak yerleşmiş mikroorganizmalar virülans faktörleriyle periapikal dokulara geçip patojen hale gelebilmelidir.
4. Kök kanal ortamı, mikroorganizmaların yaşamasına ve çoğalmasına izin vermeli ve sinyal salgılayarak virülans genleri uyaramalıdır.
5. Kök kanal patojenleri, konak dokuda savunmayı başlatarak doku hasarına yol açabilmelidir (53).

Fabricius (54) yaptığı maymun deneyinde enfekte kök kanal dokusundan izole edilen orijinal bakteri veya bakteri gruplarını (*P. oralis* ve 11 diğer tür) çeşitli kombinasyonlarda veya tek tek diğer maymunların kök kanallarının içine inoküle etmiştir. Her bir bakteri türü tek tek inoküle edildiği zaman sadece hafif bir apikal periodontit gelişirken, kombinasyonlar halinde verildiğinde çok şiddetli periapikal reaksiyonlar meydana gelmiştir (54). Bu çalışma kök kanalında patojenite gücü için bakterilerin aralarında oluşturdukları sinerjinin ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Kök kanalında kolonize olabilen herhangi bir mikroflora az ya da çok şiddetle bir hastalığa yol açabilir. Bu olayda tek bir patojen rol almaz. Deneysel araştırmalar anaeroplara hem akut hem de kronik enfeksiyonlardaki önemini göstermekle birlikte, araştırmalar ayrıca, anaerobik enfeksiyonun yerleşmesi için fakültatif ve Gram (+) mikroorganizmaların önemini de ispat etmişlerdir (47, 48, 55- 57). Ekolojik ve çevresel faktörler, kök kanal enfeksiyonunda mikrobiyal floranın kompozisyonu belirlemektedir. Sonuç olarak patojenite, daha çok mikrobiyal grup ya da kombinasyonlarla ilişkilidir ve tek bakteri türünün özgünlüğünün düşük olmasını izah eder (58). Yani periapikal hastalık kök kanalındaki farklı kompleks mikroorganizmaların kombine aktivasyonu ile meydana gelir.

2.4.1. Mikrobiyal Virölans Faktörler

Kök kanalında var olan mikroorganizmalar tarafından üretilen birçok virölans faktörlerinin birleşimi endodontik mikrobiyal floranın patojenite derecesini belirler (59).

Mikrobiyal virölans faktörler, yapısal bileşenler ve mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ürünleri kapsar.

i) Yapısal Bileşenler

Lipopolisakkarit (LPS) (Endotoksin): Endotoksinler, lipopolisakkarit yapıda moleküller olup G (-) bakterilerin hücre duvarında yer alırlar (60). LPS, bakterinin ölümünden sonra çoğalma ve üreme aşamasında ortama yayılmaktadır. LPS'in patolojik etkisi endotelyal hücreler ve makrofajlar arasındaki etkileşimler sonucu oluşmaktadır. LPS'ler endotelyal hücrelere, adezyon moleküllerinin, interlökinlerin (IL) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) gibi birkaç moleküler mediatörün salgılanması için sinyal göndermektedir. TNF- α , LPS'in zarar veren etkilerini oluşturmakta birincil sorumlu mediatördür. LPS, periapikal lezyonlu dişlerin dentin duvarlarından ve kök kanallarından elde edilen örneklerinde bulunmuştur (61). Dahlen ve Bergenholtz'un yaptıkları çalışmada LPS ve endotoksinler enfekte kök kanallarında gözlemlenmiş ve var olan Gram (-) bakterilerin sayısı ile ilişkili bulunmuştur (62).

Peptidoglikan Tabaka: Peptidoglikan birçok özdeş alt birimden oluşan kompleks polimer bir yapıdır. Gram (+) bakterilerde peptidoglikan tabaka 40- 100 katmandan oluşmuş olup, hücre duvarının ağırlıkça %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır. Gram (-) bakterilerde ise yalnızca bir veya iki katman olup hücre duvarının ağırlıkça %5-10'unu oluşturur (63). Peptidoglikan, apikal periodontit lezyonlarının patogeneğinde rol oynayabilecek birçok biyolojik etkiyi başlatabilir (64).

Lipoteioik asit: Lipoteioik asit (LTA) gibi anyonik polimerler, Gram (+) bakteri hücre duvarının kuru ağırlığının %50'sini oluşturan major bileşenlerdir. Dolaylı olarak doku hasarı başlatabilen etkileri bulunmaktadır. Makrofaj ve kompleman sistemini aktive etmek gibi biyolojik etkileri LPS ile benzerlik gösterdiği için LPS'in Gr (+) bakteri karşılığı olarak değerlendirilebilir (63).

Dış zar proteinleri: Gram (-) bakterilerin dış zarının ağırlıkça yaklaşık %50'si proteinler içermektedir. Bakterilerin konak hücreye tutunmasında rol oynarlar.

Ekstraselüler veziküller: Gram (-) bakteriler ekstraselüler veziküller meydana getirirler. Ekstraselüler veziküllerin zarları, bakteri hücre zarına benzer, aynı özellikte yüzey antijenine sahip olduğu için, antikorların bakteriye direkt bağlanmasına engel olur. Böylece konakçının enfeksiyona karşı humoral cevabını azaltır. Bu veziküllerde enzimler ya da toksik ajanlar

bulunabilir. Ekstraselüler veziküllerin konakçı dokuda hemagglünasyon, hemoliz, bakteriyel adezyon ve proteolitik aktivasyonda rol oynadığı düşünülmektedir (2).

Lipoproteinler: Lipoproteinler genellikle Gram (-) bakterilerin hücre duvarında bulunur ve dış zarı peptidoglikan tabakaya bağlar. Makrofajlar yoluyla IL-1 β , IL-6, IL-12 ve TNF- α salınmasını uyardıkları gösterilmiştir (65).

Fimbria (pili): Birçok Gram (-) bakteri fimbria olarak adlandırılan uzantılar içerir. Fimbrialar bakterilerin konak doku ya da diğer mikroorganizmalara tutunmasında rol alırlar (2)

Kapsül: Hem Gram (+) hem de Gram (-) bakterilerde bulunan kapsül, bakteri yüzeyinin topografisini değiştirerek bakteriyi fagositozdan korur.

Flagel: Bakteriyel flajeller, bakterinin hareketini sağlayan, sitoplazmik zardan dışarı doğru uzanan çıkıntılardır. Bakterilerin fagositozdan kaçmasında rol oynarlar.

Bakteriyel DNA: Bakteri DNA'sı, metilsizlenmiş CG (sitozin, guanin) dinükleotidli (CpG) DNA dizisi mevcudiyeti bakımından memeli DNA'sından farklıdır. Yapısal özelliklerinden dolayı immün sistem hücreleri bakteri DNA'sını tehlike olarak algılayabilir. Bunun sonucunda çeşitli sitokinler ortaya çıkarılırlar (66).

ii) Mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ürünler

Enzimler: Kök kanalında görülen mikroorganizmalar kollejenaz, hyaluronidaz, fibrinolizinler ve proteazlar gibi çeşitli enzimler üretirler. Bu enzimler direkt olarak toksik değildir ama konak dokusundaki organizmaların yayılmasına yardım etmektedir. Mikroorganizmalar, kan pıhtısı ve diğer konak savunmasıyla ilişkili çeşitli plazma proteinlerini yıkan enzimler üretmektedirler (61).

Eksotoksinler: Eksotoksinler, endotoksinlerin aksine yaşayan mikroorganizmalar tarafından salgılanan antijenik, nonpiyojenik, termolabil polipeptidlerdir ve bunlar toksoidlere dönüşebilirler. Lökotoksinler, marjinal periodontitin bazı tiplerinin patogeneziyle ilişkili en iyi bilinen eksotoksinlerdir. Lökosit hücre membranlarında küçük delikler oluşturup hücrenin lizisine neden olmaktadır (67). Lökotoksin, *F. necrophorum* (68) ve *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (69) çeşitleri tarafından üretilir. Bununla birlikte *Fusobacterium* türlerinden, *F. nucleatum* en sık rastlanan endodontik patojendir ve bu mikroorganizma herhangi bir eksotoksin üretmez. *A. actinomycetemcomitans* yüksek miktarda kapnofilik veya karbondioksit seven bir organizmadır ama kök kanal ortamında yaşayamamaktadır. Bu yüzden, eksotoksinler endodontik floranın patojenitesinde önemli bir role sahip değildir.

Bakteriyel peptid (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP): fMLP, güçlü bir kemoatraktan ve polimorfonükleer lökosit (PMNL) ve makrofajlar için kuvvetli bir aktivatör olarak dikkate alınan bakteriyel bir peptiddir (63).

Isı şoku proteinleri: Asıl görevleri mikroorganizmaların çeşitli koşullar altında hayatlarını sürdürmelerine olanak sağlamak olan ısı şoku proteinleri, yüksek derecede korunmuş proteinlerdendir. Bakterilerin konak hücreye tutunmasında rol oynarlar. Apoptozisi kolaylaştırdığı ve bu etkinin muhtemelen konağın antibakteriyel cevabını inhibe ettiği rapor edilmiştir (70).

Metabolik son ürünler: Bakterilerin metabolizması sonucu ortaya çıkan çeşitli son ürünlerin konağa toksik etkileri olabilir. Uçucu sülfür bileşikleri, kısa zincirli yağ asitleri, poliaminler, indol ve amonyak gibi çeşitli metabolik son ürünler virülans faktörleri arasında göz önünde bulundurulabilir.

Uçucu sülfür bileşikleri, sülfidril içeren amino asitlerin desülfürasyonu sonucu ortaya çıkar. Örneğin hidrojen sülfür, sisteinin; metil merkaptan ise metioninin desülfürasyonu ile oluşur. Kök kanal patojeni olmaya aday bakteriler de dahil olmak üzere pek çok oral bakteri türünün uçucu sülfür bileşikleri oluşturabildikleri gösterilmiştir (50, 71). *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *F. nucleatum*, *Parvimonas micra* (daha önceden *Peptostreptococcus/Micromonas micros*), *Actinomyces* türleri, ve *Eubacterium* türleri bu bakterilere örnek olarak verilebilir (50). Uçucu sülfür bileşiklerinin, kök kanal bakterileri tarafından, kök kanalına penetre olan doku sıvıları ya da eksudada bulunan serbest sülfür amino asitlerinden oluşturulduğu düşünülmektedir. Kök kanalındaki bazı bakteri türlerinin proteolitik aktivitesi ayrıca, uçucu sülfür bileşikleri oluşturmak için diğer bakterilere uygun substrat sağlayabilir. Bu maddeler konak hücrelerine son derece toksik etki gösterebilmektedir (72). Her ne kadar enfekte kök kanallarında uçucu sülfür bileşiklerinin üretilmesi ile ilgili olarak yapılmış bir çalışma bulunmasa da bu bileşiklerin nekrotik kök kanallarında birikerek periradiküler dokulara zarar verecek seviyelere ulaşabilmesi mümkündür (63).

Kök kanal bakterileri tarafından salınan **kısa zincirli yağ asitleri**, uçucu (propiyonik, butirik, isobütirik, valerik, isovalerik, asetik ve formik asit) ve uçucu olmayan (laktik ve süksinik asit) asitleri içerir (73). Kısa zincirli yağ asitleri nötrofil kemotaksisi, degranülasyon ve fagositozu etkiler (2).

Poliaminler, amino asitlerin dekarboksilasyonu sonucu mikroorganizmalar tarafından üretilir. Putresin, spermidin ve kadavrin poliaminlere örnek olarak verilebilir. Poliaminler hücre canlılığının devamında, hücre proliferasyonunda inflamasyon sürecinin düzenlenmesinde rol alan bileşiklerdir (74, 75).

Bakterilerin metabolik son ürünü olan **indol** ve **amonyak** da konak hücrelerine toksik olabilmektedir (76, 77).

Enfekte kök kanalındaki bakteriyel birlikteliğin içeriği, bakterilerin konsantrasyonları kadar son ürünlerin çeşitliliğini de belirler. Bir yandan bazı bileşikler, bazı mikroorganizma türleri tarafından tüketilir ve indirgenebilirken, diğer yandan ortaya çıkan metabolitler periradiküler dokularda birikerek toksik seviyelere ulaşabilir.

Kısa zincirli yağ asitleri, poliaminler ve özellikle de uçucu sülfür bileşikleri gibi birçok son ürünün anaerobik kök kanal enfeksiyonlarının tipik kokusundan sorumlu oldukları bildirilmiştir (63).

2.5 ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLEN PATOJENLER

Bu tez çalışmasında kök kanal patojenlerinden 5 bakteri *E. faecalis*, *Streptococcus sanguinis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *Pseudoramibacter alactolyticus* ve 2 maya *C. albicans*, *Candida glabrata* kullanıldı.

2.5.1 *E. faecalis*

Enterekoklar tek tek, ikili veya kısa zincir oluşturan katalaz (-), gram (+) koklardır. Enterekoklar fakültatif anaerob bakterilerdir, oksijen varlığında ve yokluğunda yaşama yeteneğindedirler. Daha zor koşullarda da üreyebilme yeteneğine sahiptirler; örneğin %6.5 NaCl konsantrasyonunda ve pH 9.6'da üremelerini sürdürebilirler. Optimum üreme ısı 35°C (10-45°C) olup, 60°C'de 30 dakika canlılıklarını sürdürebilirler. Kanlı agarda 24 saatlik inkübasyon sonunda geniş beyaz koloniler oluştururlar (78).

E. faecalis kök kanal başarısızlığında genellikle yüksek oranda bulunmakta ve kök kanalında tek mikroorganizma olarak veya floranın major komponenti olarak yaşayabilmektedir (79).

Kök kanalı dolgusu tamamlanmış apikal periodontitli dişlerde en sık rastlanan mikroorganizmalardan biri de *E. faecalis*'tir. Çeşitli çalışmalarda tekrarlayan kök kanal tedavilerinden %29 ile %77 oranlarında izole edildiği gösterilmiştir (31, 35, 37, 38, 80- 82). Buna karşın tedavi görmemiş enfekte kök kanallarında bulunma sıklığı %5 veya daha azdır (7, 83-85). Buna karşın, başarısız olmuş kök kanal tedavilerinin mikrobiyotasının araştırıldığı bir çalışmada, *E. faecalis*'in baskın tür olmadığı gösterilmiştir (86).

E. faecalis litik enzimler, sitolizin, tutunma maddesi, feromon ve lipoteikoik asit gibi virülans faktörlere sahiptir (87). *E. faecalis* lenfositlerin aktivitesini baskılayabilmektedir (88). Kök kanalında yeterli besin kaynağına sahip olana kadar uzun süre açlığa dayanmaktadır. Mevcut olduğunda, açlıktan ölmüş hücrelerin serumunu besin kaynağı olarak kullanarak yaşamını devam ettirebilir (89).

2.5.2 *S. sanguinis*

Streptokok cinsi içinde Lancefield sınıflandırmasına (90) göre C grubuna, Sherman'a göre (91) viridans grubuna ait bir bakteridir. Streptokok cinsine ait 16S r RNA analizine dayanan güncel sınıflamaya göre tanımlanan 7 gruptan birisi olan *Sanguinis* grubuna ait bir türdür (92- 94). Ağızda kalıcı flora üyelerindendir. Gr (+), zincir yapan, katalaz negatif, sporsuz, hareketsiz, fakültatif anaerob koklardır (95).

Daha önceden *S. sanguis* olarak bilinen bu tür, Latin gramer kurallarına uygun olması amacıyla *S. sanguinis* olarak tekrar adlandırılmıştır (96).

Yapılan çalışmalarda enfekte kök kanalından izole edildiği gösterilmiştir (97- 99)

2.5.3 *F. nucleatum*

Uzun, ince fusiform yapıda, Gr (-), zorunlu anaerob basillerdir. Üreyebilmeleri için besi yerlerine serum, glikoz ve askorbik asit gibi maddelerin eklenmesi gerekir. *F. nucleatum*'un anaerob kanlı agarda kolonileri ekmek kırıntısı görünümündedir. *Fusobacterium*'lar, türler arasında farklılık göstermek üzere değişik oranlarda asetik, propiyonik, süksinik, laktik, formik ve valerik asit oluştururlar. Proteinleri parçaladıklarında hidrojen sülfür ve indol oluştururlar, bu bileşikler üretildikleri ortamdaki kötü kokunun nedenidir. *Fusobacterium*'ların virülans faktörleri arasında adezinler (örn.lektin), antifagositik maddeler (örn.LPS), doku yıkımına neden olan oluşumlardan fosfolipaz C yer almaktadır (100). Periodontitli bireylerde ve periodontal apse varlığında *F. nucleatum* tespit edilmiştir (101). Sundqvist (7) yapmış olduğu çalışmada, enfekte kök kanallarında prevalansı en yüksek bakteri olarak *F. nucleatum*'u göstermiştir. Yapılan çalışmalarda (27, 102, 103) enfekte kök kanallarında varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca flare-up (akut alevlenme) oluşumunda *Fusobacterium* türlerinin de rolü gösterilmiştir (104). Deneysel bir çalışmada maymunların dişlerinin kök kanallarında *F. nucleatum*'un LPS'inin periapikal inflamasyon ve kemik rezorpsiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (105).

2.5.4 *P. gingivalis*

Gr (-), anaerob, hareketsiz, kısa rodlerden koka doğru değişen morfolojiye sahip mikroorganizmalardır. Oluşturduğu ekstraselüler veziküller ve kapsül sayesinde fagositozdan korunur. Anaerob koşullarda 4- 6 günlük inkübasyondan sonra ürer. Bu bakteri özellikle ilk izolasyonda hemin ve vitamin K gereksinimi duyar. Agar kolonileri küçük, düzgün kenarlı, konvektir. Besi yeri uygunsa 7- 10.uncu günde pigment yaparlar. Bu pigment ilk günlerde siyah olmayabilir, daha sonra siyahlaşabilir (106). Önemli bir periodontopatojendir (107). *P. gingivalis*, apseli dişleri de kapsayan semptomatik periradiküler lezyonlarla ilişkilendirilmiştir (25, 108). *Porphyromonas*'ların oral kavitedeki en patojenik türlerden biri olmasında rol

oyunayan bazı virölans faktörleri bulunmaktadır. Bunlar fimbria, kapsül, LPS, ekstraselüler veziküller ve hidrolitik enzimlerdir. Bu faktörler konakçı defansını bozmalarının yanı sıra doku yıkımını da başlatırlar (77). Endodontik orijinli periapikal apselerde Van Winkelhoff ve ark. (107) *P. gingivalis* oranını %12 olarak bulmuşlardır.

2.5.5. *P. alactolyticus*

Gr (+), sporsuz, kapsülsüz, çoğunlukla hareketsiz, zorunlu anaerob bakterilerdir. Düzensiz bir morfolojiye sahiplerdir, bazı suşlar çomakcık, bazıları kokoid formda görünür. Zincir oluşturabilirler. *P. alactolyticus* sakkarolitik, fermentasyon sonucu formik asit, asetik asit, kaproik asit, bütirik asit ve hidrojen oluştururlar (109, 110). Uygun besi yerlerinde çok yavaş, güç ürerler. Bu bakterilerin üremesi için 5- 7 gün kadar inkübe etmek gerekir (111). 1997 yılında *Eubacterium alactolyticum* yeniden sınıflandırılmış *P. alactolyticus* olarak adlandırılmıştır (110). Endodontik enfeksiyonlardan çeşitli oranlarda izole edilmiştir (7, 18, 25, 27, 35, 37, 83, 112). *P. alactolyticus* genellikle karışık enfeksiyonlarda görülür. Sundqvist (27) kök kanal enfeksiyonlarında mikroorganizmalar arası durumu değerlendirmiş, *P. alactolyticus*'un *P. endodontalis*, *P. intermedia*, *P. anaerobicus* ve *Eubacterium lentum* ile pozitif ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca *F. nucleatum* ile koagregasyon yaptığı gösterilen bir çalışma bulunmaktadır (113).

2.5.6 *C. albicans*

C. albicans yuvarlak veya oval, tomurcuklanma yaparak üreyen bir mikroorganizmadır. Bu mikroorganizmaların izolasyonu sorunsuzdur. *C. albicans*'ı üretmek için en sık kullanılan besi yeri Saboraud dekstrozu agar (SDA) dır; %2 ya da %4 glukoz içeren formülleri kullanılabilir. Koloniler düzgün, grimsi beyaz, nemli görünümlü, yumuşak ve peynir kokuludur. *C. albicans* hücre duvarında üç önemli yapı yer alır. Bunlar; β -glukan, kitin ve mannoproteinlerdir. Hepsi kuvvetli antijeniktir (114).

Mantarların patogeneğinde rol oynayan virölans faktörleri; çeşitli çevresel koşullara adapte olabilme, çeşitli yüzeylere adezyon, hidrolitik enzimleri üretebilmesi, morfolojik değişim, biyofilm oluşumu, konak defansının immünomodülasyonu ve defanstan kurtulabilmesidir (36).

Oral kavitede pseudomembranöz kandidiyaz, kronik atrofik kandidiyaz, kronik hiperplastik kandidiyaz şekillerine rastlanır (115). Tedavi edilmemiş kök çürüklerinin dentin tübüllerindeki ve tedavi görmüş kök kanallı periapikal patolojili vakalardaki *Candida*'ların konu edildiği çalışmalar ancak mikrobiyolojik tekniklerin gelişmesiyle ortaya çıkmıştır (116, 117).

Baumgartner ve ark.'nın 2000 (40) yılında yaptıkları çalışmada enfekte kök kanalında (daha önce tedavi edilmemiş) *C. albicans* oranı %21 olarak bulunmuştur.

Sundqvist ve ark. 1998 yılında yaptıkları çalışmada kanal tedavisi başarısız olmuş 24 olgunun 2 tanesinde *C. albicans* bulmuşlardır (35).

2.5.7. *C. glabrata*

C. albicans'la karşılaştırıldığı zaman *C. glabrata* ile ilgili ne yazık ki az sayıda araştırma yapılmıştır. *C. glabrata*, tüm çevresel koşullar altında küçük dimorfik olmayan patojen bir mantardır. *C. glabrata* 37 C° üzerindeki sıcaklıklarda pseudohif oluşturmamayan tek *Candida* türüdür. *C. glabrata* blastosporları (0-4 µm) *C. albicans* blastosporlarından (4-6 µm) belirgin olarak daha küçüktür. *C. glabrata*, SAD'da boyutsal olarak küçük olması dışında diğer *Candida* türlerinden ayırt edilmesi zor düzgün, parlak, krem rengi koloniler oluşturur (118).

C. glabrata önceleri *Torulopsis* cinsinde sınıflandırılmıştır. *Candida* cinsi 1913 yılına kadar adlandırılmamakla birlikte *Torulopsis* cinsi 1894'te tanımlanmıştır. *C. glabrata* aslında pseudohif oluşturmaması nedeniyle *Torulopsis* cinsinde yer almıştır. Bununla birlikte 1978 yılında, pseudohif oluşturma yeteneğinin *Candida* cinsi üyeleri için güvenilir bir ayırt edici faktör olmadığı belirlenmiştir ve *T. glabrata*'nın *Candida* cinsinde sınıflandırılabilceği ortaya atılmıştır (118).

Waltimo ve ark. (23) inatçı endodontik enfeksiyonlardan en sık *C. albicans* izole ederken, izole edilen diğer *Candida* türleri arasında *C. glabrata*'yı da göstermişlerdir.

2. 6. ORAL MİKROORGANİZMALARI BELİRLEME YÖNTEMLERİ

Oral patojenleri belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır:

2. 6. 1 Kültür Yöntemleri

Geleneksel olarak oral patojenler bakteriyel kültür yöntemleri ile belirlenmektedir. Fakat bakteriyel kültür yöntemleri klinik olarak tüm patojenleri belirleyebilmek için yeterli olmamaktadır. Bununla birlikte oral patojenlerin önemli bir kısmı bakteriyel kültür yöntemi ile tanımlanabilmektedir. Rutin kültür yöntemlerinin dışında seçici kültürel yöntemler de bulunmaktadır. Rutin kültürel yöntemler 10^4 - 10^5 bakteri belirleyebilecek kadar duyarlıyken, bu sayı seçici kültürel yöntemlerde 10^3 bakteriye kadar inmiştir. Kültürel yöntemlerle bölgeyi enfekte eden tanımlanmamış türlerin tanımlanması sağlanabilir, antibiyotik direnci ya da duyarlılığı belirlenebilir. Bunun yanı sıra alınan kültür örneği içerisinde hastayı enfekte eden mikroorganizmalar olsalar bile uygun besin ve ortam gibi şartların eksikliğinde üremeyerek hatalı sonuçlar verebilirler. Diğer dezavantajları ise kültüre edilemeyen bakterileri belirleyememesi, çok zaman alması, referans laboratuvar testlerine ihtiyaç duyması ve pahalı olması sayılabilir (119, 120).

2. 6. 2 Faz-kontrast ve Karanlık Alan Mikroskopisi

Bu yöntemler bize plak örneklerindeki bakterilerin boyutları, şekilleri ve motiliteleri hakkında fikir verir. Plak örneklerinin karşılaştırılmasında mikrobiyal değişimleri gösterir ve hiçbir zaman bakteri türleri konusunda bilgi vermez (119).

2. 6. 3 İmmünolojik Yöntemler ve Enzimatik Teknikler

İmmünolojik yöntemlerde, hedef mikroorganizmaya karşı üretilen ve özgün işaretleyiciler ile işaretlenen antikorlar kullanılır. Ayrıca, immüno florans, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELİSA) gibi yöntemlerle özgün ve hızlı sonuçlara ulaşılabilir. Bu metodun da antikorların üretilme zorluğu ve duyarlılığının (10^4 - 10^5 bakteri) az oluşu gibi dezavantajları vardır. Benzoyl-DL-Arginine-Naphthylamide Testi (BANA- Test) gibi enzimatik yöntemler hızlı ve maliyetsizdirler fakat bu metotla hedef bakterinin miktarı güvenilir bir şekilde tayin edilemez ve reaksiyonun bir veya daha fazla türe bağlı olup olmadığı anlaşılamaz (119).

2. 6. 4 Moleküler Yöntemler

Son yıllarda patojen mikroorganizmaların belirlenmesi için moleküler tekniklerden sıkça faydalanılmaktadır. Moleküler tanı yöntemleri; DNA probe tekniği ve PZR'dir. DNA probe tekniği, patojen mikroorganizmaların belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tekniğin geleneksel mikrobiyolojik yöntemlere göre iki büyük avantajı bulunmaktadır. Birincisi bu yöntem 10^2 bakteriyi belirleyebilecek kadar hassastır. İkincisi ise klinikte alınan örneklerden direkt mikroorganizma tayini yapılabilmesidir. Bu yöntemle mikroorganizmanın tespiti için canlılık gibi mecburiyet yoktur. Buna karşın oldukça pahalı yöntemler olmaları ve radyoaktif maddeler ile çalışma yapılması gibi dezavantajları mevcuttur (119).

PZR diğer bir moleküler teknik olup, son yıllarda biyoloji, tıp, genetik gibi alanlarda oldukça ilgi görmektedir. PZR yöntemi moleküler teknolojiye en önemli gelişmelerden biridir. Çok hassas bir tekniktir, radyoaktiviteye ihtiyaç duymaz. Bir türe ait farklı tipteki organizmaların ve mikroorganizma geçiş yollarının belirlenmesinde kullanışlı olduğu bulunmuştur (119).

PZR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Yöntem basitçe, tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır. PZR bir çeşit in-vitro klonlamadır. PZR reaksiyonu, DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligo nükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyonu), sonra zincirin uzaması (polimerizasyon) (çift iplikli DNA'ların sentezi) ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanması esasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon/hibridizasyon/polimerizasyon) bir PZR döngüsünü oluşturur. Her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşir (119). Tipik bir PZR reaksiyonu 25- 40 tur PZR döngüsünden oluşur. Bakteri tanımlanması için genellikle basit bir

PZR turu kullanılmakla birlikte bazı durumlarda nested PZR, multiplex PZR, (real time) RT-PZR gibi farklı PZR yöntemleri de kullanılabilir (121).

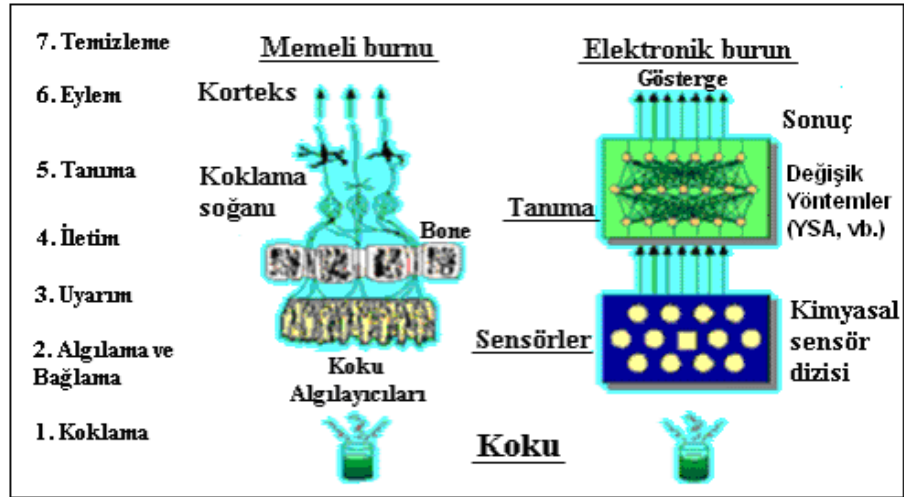
PZR yöntemi, DNA probe tekniğine göre daha hassas bulunmuştur (119).

Son yıllarda, kimyasal sensör sistemlerindeki ve teknolojiye ilerlemelere bağlı olarak geliştirilmiş olan elektronik burun sistemleri tıp, gıda, çevre vb. pek çok alanda hızlı ve basit koku analizini mümkün kılmakta ve bu sistemlerin mikroorganizmaların tespiti ve sınıflandırmasında kullanılabileceği düşünülmektedir (122).

2.7. KOKU ÖLÇÜMÜ, ELEKTRONİK BURUN SİSTEMLERİ

Gördüğümüz ya da duyduğumuz şeyleri tarif etmek bizim için oldukça kolaydır. Ancak, algıladığımız kokuyu isimlendirmekte çoğu zaman güçlük çekeriz. Onu başka bir kokuya benzeterek ya da onun bizde uyandırdığı hisleri tasvir ederiz. Örneğin, fırından yeni çıkmış kurabiye kokusu olarak algıladığımız kokunun kaynağı kurabiyeye ait uçucu koku molekülleridir.

Koku, aslında nesnelerden buharlaşan kimyasal moleküllerdir. Koku alma işlemi, havadaki kimyasal moleküllerin belirlenip algılanmasına dayanmaktadır. Şekil 2. 1 de memeli burnu ile insan burnu arasındaki benzerlikler gösterilmektedir. Memeliler bir nesneyi kokladığında burna giren koku molekülleri koku algılayıcıları tarafından tutulur ve bağlanırlar. Bu bağlanma sonucunda, algılayıcı hücreler koku moleküllerinin cinsine göre uyarılırlar. Uyarım sonucu oluşan sinyal koklama soğanına iletilir. Tanıma işlemi bir eğitim ile öğrenmeye bağlı olarak gerçekleşir. Uyarım sinyali daha önce rastlanmış ve bilinen bir uyarım sinyali ise beyinde tanıma gerçekleşir. Eğer ilk defa karşılaşılan bir uyarım ise bir 'ilk' olarak beyne kaydedilir. Uyarım sinyali sonucu bir eylem gerekiyorsa beyinde o eylem kararı verilir. EB sisteminde ise koku algılayıcılarının (receptors) yerini kimyasal sensörler, koklama soğanının yerini elektronik karar verme sistemi alır. Elektronik koku algılama sisteminde koku molekülleri sensör dizisi tarafından algılanır. Sensör dizisi çıkışında maruz kalınan kokuya bağlı bir şekilde oluşan elektriksel sinyaller değişik yöntemlerle analiz edilerek koku kimliklendirilir ve böylece sistem o kokuyu tanıma adına eğitilmiş olur. Sistem değişik kokulara maruz bırakılarak geniş bir eğitime tabii tutulabilir. Bu sayede daha sonra algılanan kokular sistem tarafından sınıflandırılabilir (123).



Şekil 2. 1. Memeli burnu ile EB arasındaki benzerlikler (123)

İnsanlar binlerce farklı kokuyu birbirinden ayırt edebilme kapasitesine sahiptirler. İnsan burnu Tablo 2. 2'ye göre elektronik buruna üstündür. Ama insan burnunun bazı zayıf yönleri de vardır. Örneğin, insan burnu, karbon monoksit ve karbondioksit gibi bazı gazların kokularını veya kokunun içinde bulunduğu durumlarda yorgunluk sebebiyle bir süre sonra ortamdaki gazı algılayamamaktadır. Bunun dışında insan burnu, kişiye bağımlılık (subjectivity) da göstermektedir (123).

EB sisteminin en önemli özelliği, koku çeşitlerini çok kısa bir süre içerisinde insan burnundaki hassasiyet derecesinde algılayıp ayrıştırabilmesi ve sonucu objektif olarak sunmasıdır. EB sistemleri yıllarca aynı işi görebilmekte ve insan burnunun algılayamadığı gazları kullandıkları sensör dizisine bağlı olarak rahatlıkla algılayabilmektedir (123).

Tablo 2. 2. EB sisteminde insan burnu yerini alan elemanlar (123)

Tanımlayıcı	İnsan Burnu	Elektronik Burun
Algılayıcı	Alıcı nöron	Sensör/transducer
Aktiflik	Koku alma genleri	Kaplama
Algılayıcı sayısı	10.000.000 reseptör	6-30 sensör (dizi)
Sinyal işleme modülü	Glomeruli	Mikrodenetleyici
Tanımlama modülü	Beyin	Bilgisayar
Duyarlılık	Ppt	Ppm
Seçicilik	10000~20000 koku	< 50 koku

2. 7. 1. EB Sisteminin Uygulama Alanları

EB cihazları, kokuların ve uçucu organik bileşiklerin analizinde kullanılmaktadır. Bu cihazlar bir dizi kimyasal sensör içermektedirler. Kimyasal sensörler, kimyasal algılama yüzeyi ve kimyasal etkileşimi elektriksel işarete dönüştürme birimi olmak üzere iki kısımdır (124).

Literatürde EB sisteminin uygulandığı alanlar, gıda, çevre sağlığı, tıp ve son yıllarda diş hekimliğidir.

Gıda alanında elektronik burun sistemi, peynirlerin ve meyvelerin kokularının incelenmesi, olgunlaşmasının tespiti ve tazeliğinin kontrolünde (125- 127), kahve ve tahılların kalite sınıflandırmasında (128- 131), bitkisel yağların ve içeceklerin sınıflandırmasında (132- 135), balık ve et gibi ürünlerin tazeliğinin tespitinde (136, 137) kullanılmıştır.

Çevre sağlığı alanında; içme sularının kalite kontrolünde (138), atık suların biyokimyasal durumunun izlenmesinde (139), çevre kirliliğini izlemede (140), iç mekanlardaki hava kalitesinin izlenmesinde (141) kullanılmıştır.

Tıp alanında; elektrik burun sistemi; boşaltım sistemi enfeksiyonlarının algılanmasında (142), nefes örneklerinden solunum enfeksiyonlarının tespitinde (143), akciğer kanserinin teşhisinde (144), böbrek hastalığı teşhisinde (145) kullanılmıştır.

Ayrıca, kulak-burun-boğaz ve göz enfeksiyonlarına sebep olan bakterilerin sınıflandırılmasında (146, 147) ve kulak-burun-boğaz enfeksiyonunun klinik olarak teşhisinde (148), hastane ortamındaki *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının tespitinde (149), mikroorganizmaların sınıflandırılmasında (150), koliform bakterilerin algılanması ve ayırt edilmesinde (151), anaerob bakterilerin ayırt edilmesinde (152) kullanılmıştır.

EB teknolojisi, diş hekimliği alanında henüz çok az sayıda kullanım alanı bulmuştur.

Tanaka ve ark. (153) 2004 yılında yaptıkları çalışmada, ağız kokusunu klinik olarak değerlendirmek için organoleptik ölçüm, EB sistemi ve gaz kromatografisi kullanarak EB sistemi ile elde edilen sonuçların ağız kokusunun klinik değerlendirilmesinde yararlı olabileceğini belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar yukarıdaki çalışmadan sonra 2005 yılında diğer bir araştırmalarında (154), EB sistemi kullanılarak elde edilen mutlak değerin, ağız kokusunun klinik olarak değerlendirmesinde uygun bir yöntem olabileceği sonucuna varmışlardır.

Yamada ve ark. (155) 2007 yılında kök kanal içeriğinin kokusunu EB sistemi kullanarak değerlendirmişler, aynı zamanda kök kanallarından izole edilen bakteriler ile kök kanal kokusu arasındaki ilişkiyi değerlendirilmişlerdir. Koku analiz verileri, klinik semptomlar ve izole edilen bakteri türleri arasında ilişki görülmüş, bunun sonucu olarak, EB sisteminin kök kanal kokusunun objektif olarak değerlendirilmesinde yararlı olabileceği fikrini ortaya atmışlardır (155).

EB sistemlerinin endodontik enfeksiyonlarda algılayabileceği kokuların kaynağı, bakterilerin, enfekte kök kanallarında proteinleri parçalamaları ve metabolizmaları neticesinde açığa çıkan uçucu sülfür bileşikleri, indol, skatol, amin, fenol, piridin ve amonyak gibi metabolitlerdir.

Tablo 2. 3. Oral kavitedeki uçucu organik bileşikler (156)

Oral kavitedeki uçucu organik bileşikler
1) Sülfür bileşikleri
a) Hidrojen sülfür
b) Metil merkaptan
c) Methanol
d) Alil merkaptan
e) Dimetil sülfüt
f) Dimetil disülfid
g) Dimetil trisülfid
2) Kısa zincirli yağ asitleri
a) Propiyonik asit
b) Butirik asit
c) Valerik asit
d) İzokaproik asit
e) Kaproik asit
f) 2-3 etil butirik asit
g) Lorik asit
h) Miristik asit
3) Poliaminler
a) Kadaverin
b) Putresin
4) Alkoller
a) 1 epoksi 2 propanol
5) Fenil bileşikleri
a) İndol
b) Skatol
c) Piridin
6) Alkaninler
a) 2 metil propan
7) Ketonlar

8) Nitrojen içeren bileşikler

a) Üre

b) Amonyak

Tablo 2. 3, oral kavitedeki çeşitli uçucu organik bileşikleri göstermektedir. Oral kavitede bulunan bazı mikroorganizmalarla, metabolizmaları sonucu açığa çıkan hidrojen sülfür ve metil merkaptan gibi kötü kokuya neden olan uçucu sülfür bileşiklerinin ilişkisi Tablo 2. 4'te gösterilmiştir (156). Hidrojen sülfür ve metil merkaptan ağızdaki uçucu sülfür bileşiklerinin %90'ını oluşturmaktadır (157).

Bu mikroorganizmalardan bazıları aynı zamanda enfekte kök kanal patojenleri arasında yer almaktadır.

Tablo 2. 4. Oral kavitede uçucu sülfür bileşikleri üreten bakteriler (156).

Oral kavitede uçucu sülfür bileşikleri üreten bakteriler			
Sisteinden sülfür	hidrojen	Metioninden merkaptan	metil
<i>P. anaerobius</i>		<i>F. nucleatum*</i>	
<i>Micros prevotti</i>		<i>Fusobacterium periodonticum</i>	
<i>Eubacterium limosum</i>		<i>Eubacterium spp.*</i>	
<i>Bacteroides spp.</i>		<i>Bacteroides spp.</i>	
<i>Centipedia periodontii</i>			
<i>Selenomonas artermidis</i>			

*Bu çalışmada kullanılan bakterilerden bazılarıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi'nin çeşitli birimlerinin işbirliği ile gerçekleştirildi. Bu birimler; Diş Hekimliği Fakültesi'nin Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi'nin Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Mühendislik Fakültesi'nin Elektrik Elektronik Mühendisliği Bölümü'dür.

Bu çalışmada iki uygulama gerçekleştirilmiştir. Bunlar aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

Birinci uygulama:

Bu uygulama, farklı konsantrasyonlardaki mikroorganizma süspansiyonlarının konsantrasyon farkı gözetilmeksizin türlerine göre sınıflandırılması amacıyla yapıldı.

3. 1. KOKU VERİLERİNİN ALINMASI VE EN SİSTEMİNİN EĞİTİMİ

Birinci uygulamanın ilk aşamasında, beş bakteri (*E. faecalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. alactolyticus*, *S. sanguinis*) ve 2 maya (*C. albicans*, *C. glabrata*) olmak üzere toplam 7 mikroorganizma suşu kullanıldı. *C. glabrata*, RSKK (Refik Saydam Kültür Koleksiyonu)'den, *C. albicans*, *E. faecalis* ve *P. gingivalis*, ATCC (American Type Culture Collection)'den ve *F. nucleatum*, *P. alactolyticus*, *S. sanguinis*, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)'den elde edilen standart suşlardır. Çalışılan mikroorganizma türleri, üreme ortamları, ekim yapılan besiyerleri, inkübasyon koşulları ve standart suş numaraları Tablo 3. 1'de verilmiştir. Kültürde üretilen mikroorganizmaların türbidometre cihazı (BD, PhoenixSpec, Nephelometer, USA) (Şekil 3. 1) kullanılarak 4 ml serum fizyolojik içeren ağzı kapaklı steril cam tüplerde, 4 McFarland (12×10^8 cfu/ml) standart bulanıklıkta süspansiyonları hazırlandı. Kültürde üretilen bazı mikroorganizmaların uygun besi yerlerindeki görüntüleri Şekil 3. 2, Şekil 3. 3 ve Şekil 3. 4'te bulunmaktadır. Hazırlanan mikroorganizma süspansiyonları standart ölçülerde steril cam tüpler içerisinde dilüe edilerek, her bir mikroorganizmanın 12×10^5 , 12×10^3 ve 12×10^1 cfu/ml konsantrasyonları elde edildi. Daha sonra hazırlanan ilk süspansiyon ile birlikte dilüe formlar da dahil olmak üzere toplam 4 farklı konsantrasyondaki süspansiyonların elektronik burun cihazı ile koku alma işlemine geçilip, EB sisteminin eğitime başlandı.

Tablo 3. 1. Çalışılan mikroorganizma türleri ve özellikleri

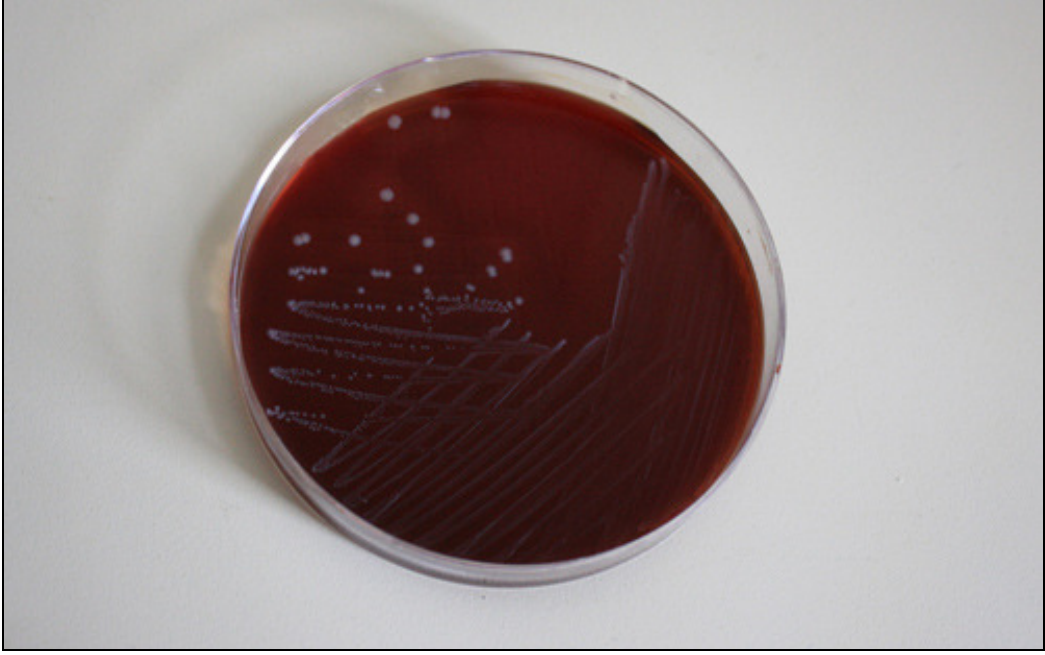
Grup no	Mikroorganizma	Türü	Üreme ortamı	Kültür besiyerleri	İnkübasyon koşulları	Standart Suş No
1	<i>C. albicans</i>	Maya	Aerop	Sabouraud dextrose agar	24-48 saat 37 °C	ATCC 90028
2	<i>E. faecalis</i>	Gr (+) Bakteri	Fakültatif anaerop	Kanlı agar	24 saat 37 °C	ATCC 29212
3	<i>C. glabrata</i> (<i>Torulopsis glabrata</i>)	Maya	Aerop	Sabouraud dextrose agar	24-48 saat 37 °C	RSKK 04019
4	<i>S. sanguinis</i>	Gr (+) Bakteri	Fakültatif anaerop	Triptik soy agar	4 gün 37 °C, %5 CO ₂ 37 °C	DSMZ 20567
5	<i>F. nucleatum</i>	Gr (-) Bakteri	Anaerop	Triptik soy agar	4-6 gün 37 °C	DSMZ 20482
6	<i>P. alactolyticus</i>	Gr (+) Bakteri	Anaerop	Triptik soy agar	4-6 gün 37 °C	DSMZ 3980
7	<i>P. gingivalis</i>	Gr (-) Bakteri	Anaerop	Non-selektif anaerop besiyeri	4-6 gün 37 °C	ATCC 33277



Şekil 3. 1. Türbidometre cihazı



Şekil 3. 2. Kültürde üretilen *C. albicans*'ın SDA'daki görüntüsü



Şekil 3. 3. Kültürde üretilen *E. faecalis*'in kanlı agardaki görüntüsü



Şekil 3. 4. Kültürde üretilen *P. gingivalis*'in non-selektif besi yerindeki görüntüsü

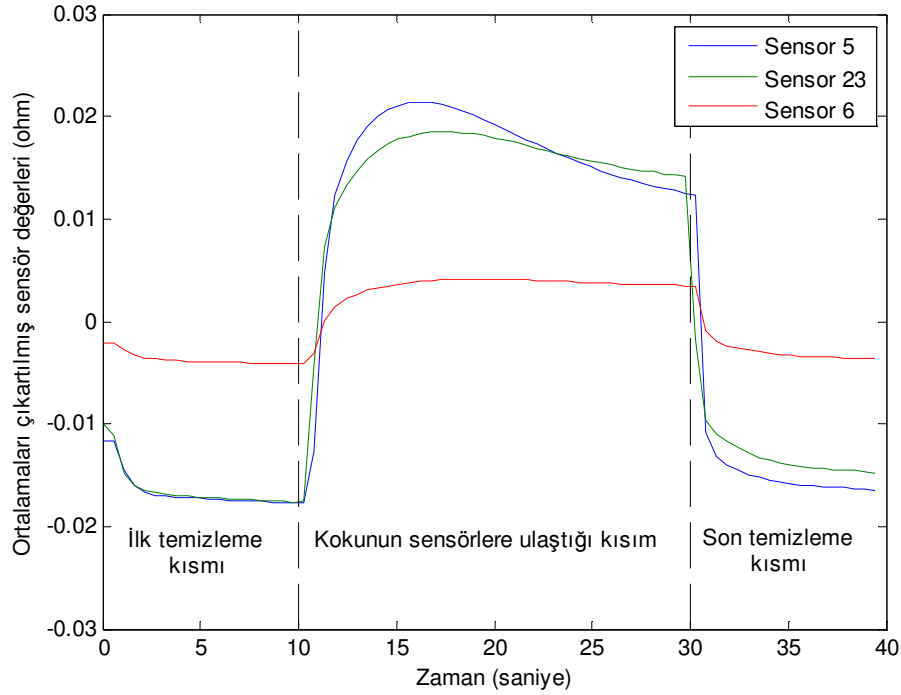
Mikroorganizma kültürlerinin kokularına göre sınıflandırılmasında Cyranose 320 (Smiths Detection, Hertfordshire, UK) adlı elektronik burun cihazı kullanıldı (Şekil 3. 5). Taşınabilir boyutlara sahip olan bu cihaz, 32 adet karbon-polimer sensör içermektedir. Bu sensörler kokuya maruz kaldıklarında direnç değerlerinde değişim meydana gelmektedir. Sensörlerin direnç değerleri, gerçek zamanlı olarak bilgisayara aktarıldı. Elektronik burun cihazı ile koku verileri alınmaya başlamadan önce, her numune (cam tüp) kapağı açılarak 5 dakika ağız kilitli bir naylon torbada bekletildi. Bu sayede numunenin kokusu torba içine dağıldı ve dış etkilere izole edildi. Mikroorganizmaların kokularının karışması olasılığına karşı her bir mikroorganizma türü farklı günlerde çalışıldı. Daha sonra elektronik burun cihazının probu torba içerisine geçirilerek verilerin alınmasına başlandı.



Şekil 3. 5. Cyranose 320 EB cihazı

Veri setinde 7 farklı mikroorganizma türünün koku verileri mevcuttu. Her bir mikroorganizma türü için 4 ayrı konsantrasyonda (12×10^8 , 12×10^5 , 12×10^3 ve 12×10^1 cfu/ml) numuneler hazırlandığından toplam 28 numune üzerinde çalışıldı. Tüm numunelerden elektronik burun cihazı ile 5'er koku verisi (sample) alındı. Birinci aşamada her bir numuneden alınmış olan 5 koku verisinden en yüksek direnç değişimlerini gösterdiği için sadece ilk koku verisi dikkate alındı. Veriler alınırken elektronik burun cihazının tüm sensörleri (32 sensör) aktif halde tutuldu. Her bir koku verisi, elektronik burun cihazındaki her sensörün direnç değişimlerini içeren 74 okuma satırından (40 saniye içerisindeki okuma sayısı) meydana geldi. Dolayısıyla

her koku verisi 74x32'lik bir R_{sample} matrisi oluşturdu. Bu verideki her bir sütun bir sensöre karşılık gelen, koku alma süresince o sensörün anlık direnç değerlerini göstermektedir. Şekil 3.6'da *C. albicans*'a ait 12×10^8 cfu/ml yoğunluktaki numuneden alınan ilk koku verisinin, en fazla değişim gösteren 3 sensöre göre grafiği görülmektedir. Bu grafik, sensörlerin başlangıç direnç değerlerinin çok farklı olmasından dolayı ortalamaları çıkartılarak elde edilmiştir.



Şekil 3. 6. *C. albicans*'a ait bir numuneden alınan ilk koku verisinin, en fazla değişim gösteren 3 sensöre göre grafiği

Bir koku verisinin alımı toplam 40 saniye sürdü. Bunun ilk 10 saniyesinde cihaz sensörlerini ortam havası ile temizledi, sonraki 20 saniye boyunca numunenin kokusunu aldı ve son 10 saniyede de tekrar sensörlerini ortam havası ile temizledi.

Her bir koku verisine 3 farklı **sensör modeli** uygulanmıştır. Aşağıdaki **sensör model** ifadelerinde, $i = 1,2,...,28$ mikroorganizma veri setini oluşturan koku verisini temsil etmektedir.

- Fark modeli: Sensörlerin maksimum ve referans direnç değerleri arasındaki fark

$$x_i = R_{sample}^{\max} - R_o = \Delta R \quad (1)$$

- Oransal fark modeli: Fark modelinin referans direnç değerine oranı

$$x_i = \Delta R / R_o \quad (2)$$

- Normalize oransal fark modeli: Oransal fark modelinin en fazla değişim gösteren sensöre göre normalizasyonu

$$x_i = (\Delta R / R_o) / (\Delta R / R_o)^{\max} \quad (3)$$

Sensörlerin referans direnç değerleri ile ilgili olarak, her koku verisinin 3 farklı bölgesi incelenmiştir:

- Referans-1: Verideki sensörlerin minimum değerleri referans kabul edilerek

$$R_o = R_{sample}^{\min} \quad (4)$$

- Referans-2: Verideki sensörlerin ilk değerleri referans kabul edilerek

$$R_o = R_{sample}^{first} \quad (5)$$

- Referans-3: Verinin, cihazın kokuyu içine almaya başlamadan önceki son sensör değerleri referans kabul edilerek

$$R_o = R_{ref}^{final} \quad (6)$$

Böylece 7 mikroorganizmaya ait koku verilerine, farklı ön işleme metotları uygulanarak 9 ayrı veri seti elde edildi. Tablo 3. 2’de uygulanan ön işleme metotlarının eşitlikleri ve isimlendirmeleri verilmektedir. Ayrıca bu veri setlerine, 2 farklı boyut azaltım yöntemi uygulandı. Bunlar;

- Standart sapmaya göre en fazla değişim gösteren 3 sensör seçilerek,
- Temel bileşenler analizi (Principal Component Analysis) uygulanarak, ilk 3 temel bileşenin göz önüne alınması ile gerçekleştirildi.

Tablo 3. 2. Koku verilerine uygulanan 9 ayrı ön işleme metodu

Sensör referans değeri	Sensör modeli	İsimlendirme
Referans-1 $R_o = R_{sample}^{\min}$	$x_i = R_{sample}^{\max} - R_{sample}^{\min}$	data1r
	$x_i = (R_{sample}^{\max} - R_{sample}^{\min}) / R_{sample}^{\min} = \Delta R$	data1
	$x_i = \Delta R / (\Delta R)^{\max}$	nordata1
Referans-2 $R_o = R_{sample}^{first}$	$x_i = R_{sample}^{\max} - R_{ref}^{first}$	data2r
	$x_i = (R_{sample}^{\max} - R_{ref}^{first}) / R_{ref}^{first} = \Delta R$	data2
	$x_i = \Delta R / (\Delta R)^{\max}$	nordata2
Referans-3	$x_i = R_{sample}^{\max} - R_{ref}^{final}$	data3r

$R_o = R_{ref}^{final}$	$x_i = (R_{sample}^{max} - R_{ref}^{final}) / R_{ref}^{final} = \Delta R$	data3
	$x_i = \Delta R / (\Delta R)^{max}$	nordata3

Sonuçta çalışmanın ilk aşamasında, yukarıda bahsedilen ön-işleme metotları ve boyut azaltım yöntemleri kullanılarak 18 ayrı veri seti oluşturuldu. Her bir veri seti, 7 mikroorganizmaya ait 28 gözlemden meydana gelmektedir.

İkinci aşamada, 7 farklı mikroorganizmanın 4 farklı konsantrasyondan beşer koku verisi alınarak, cihazın hangi konsantrasyona daha duyarlı olduğunun belirlenmesi amaçlandı. Bu aşamada her bir numuneden alınmış olan 5 koku verisinin tamamı dikkate alındı. Toplamda her konsantrasyondan 35 koku verisi üzerinde çalışıldı.

İlk aşamada uygulanan ön-işleme metotları ve boyut azaltım yöntemleri bu aşamada da kullanılarak 18 ayrı veri seti elde edilmiştir. Her bir veri seti, 7 mikroorganizmaya ait 35 gözlemden meydana gelmektedir.

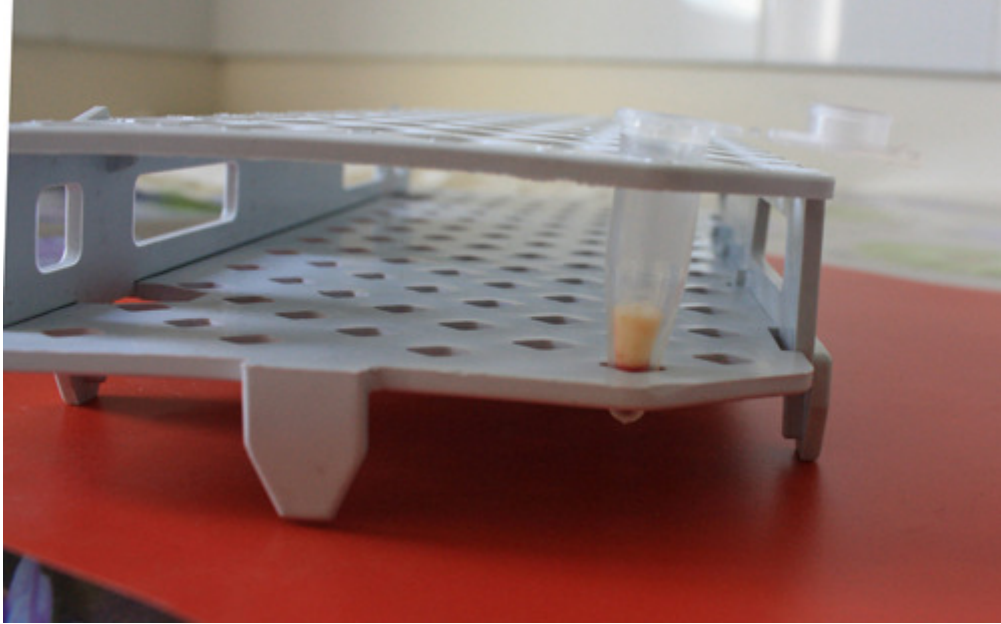
İkinci uygulama:

Bu uygulama, sabit konsantrasyondaki mikroorganizma süspansiyonlarının türlerine göre sınıflandırılması amacıyla yapıldı.

3. 2. DİŞLERİN HAZIRLANMASI VE KOKU VERİLERİNİN ALINMASI

Çalışmanın ikinci uygulamasında 105 adet üst santral kesici insan dişi kullanıldı. Dişler çekildikten sonra deney başlangıcına kadar serum fizyolojik içerisinde bekletildi. Çalışmada kullanılacak olan dişler 30 dakika %5,25'lik NaOCl içerisinde bekletildikten sonra, üzerindeki yumuşak ve sert eklentiler kretuar yardımıyla temizlendi. Dişler kök boylarının standart olması için elmas separe yardımıyla ve su soğutması kullanılarak apeksten 14 mm uzaktan kesildi. Elde edilen köklerin çalışma boyunun tespit edilmesi için 15 numaralı K tipi kanal eğesi apikal foramenden gözle görünür hale gelinceye kadar kanal içerisinde ilerletildi ve elde edilen boyuttan 1 mm çıkartılarak çalışma boyu tespit edildi. Tüm örneklerde master apikal eğe “finishing file No.5” olacak şekilde ProTaper nikel titanyum eğeler (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Swiss) kullanılarak prepare edildi. Her eğe kullanımından sonra kanallar 2 ml %5,25 lik NaOCl ile irrigate edildi. Koronal genişletme Gates-Glidden frezlerle sağlandı. Prepare edilen köklerde oluşan smear tabakasını kaldırmak için 3 ml %17'lik EDTA ve sonrasında 5 ml %5,25'lik NaOCl ile irrigasyon yapıldı. Final irrigasyon için distile su kullanıldı. Prepare edilen köklerin apikal 7 mm'lik kısmı iki kat tırnak cilası ile kaplanarak tamamen kurumaları için 24 saat bekletildi.

Hazırlanan numuneler, eppendorf sporuna yerleştirilmiş 1,5 ml'lik plastik eppendorf tüpleri içerisinde (Şekil 3. 7) otoklavda 1 atm. basınçta 121 °C'de 45 dakika süre ile steril edildi. Sterilizasyonun kontrolü kimyasal integratör (3M Comply 1243 SteriGage, US) ile yapıldı.

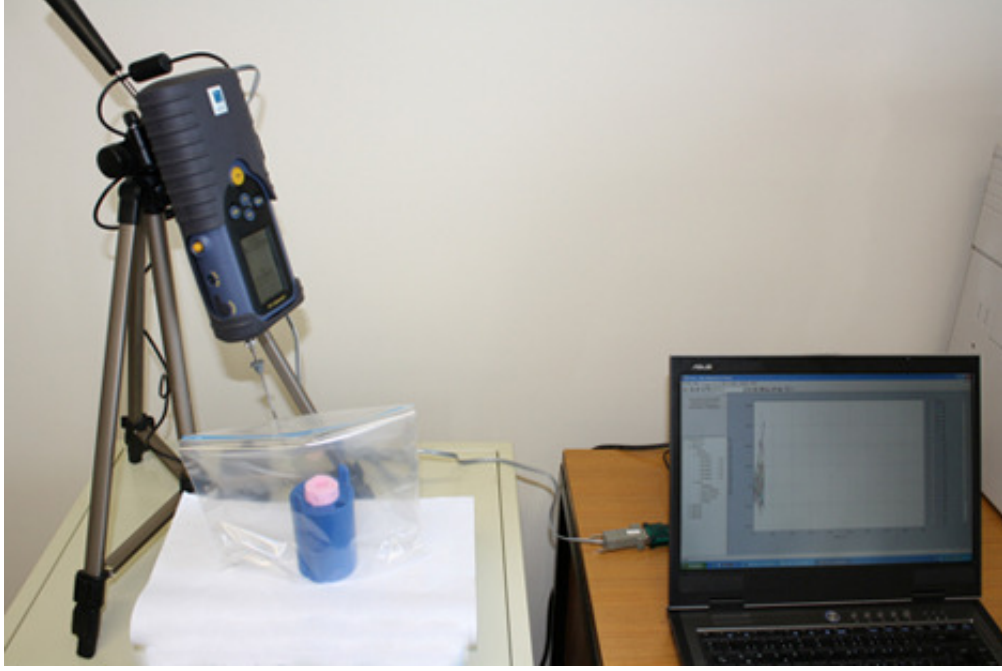


Şekil 3. 7. Hazırlanan numunelerin eppendorf tüpler içerisindeki görüntüsü

Tüm mikroorganizmalar çalışmanın birinci uygulamasında olduğu gibi belirtilen katı besi yerlerinde üretildi. Daha sonra her bir mikroorganizmanın, serum fizyolojik içeren ağzı kapaklı steril cam tüplerde, 1.5×10^8 cfu/ml (0.5 McFarland) konsantrasyondaki süspansiyonları hazırlandı. Çalışmanın her iki uygulamasında da mikroorganizmalar ile ilgili yapılan bütün işlemler steril şartlar altında biyolojik güvenlik kabini (MN 120, Nüve, Türkiye) içerisinde gerçekleştirildi.

Her mikroorganizma için 11 adet eğitim ve 4 adet test verisi alınmak üzere toplam 15 adet diş kullanıldı.

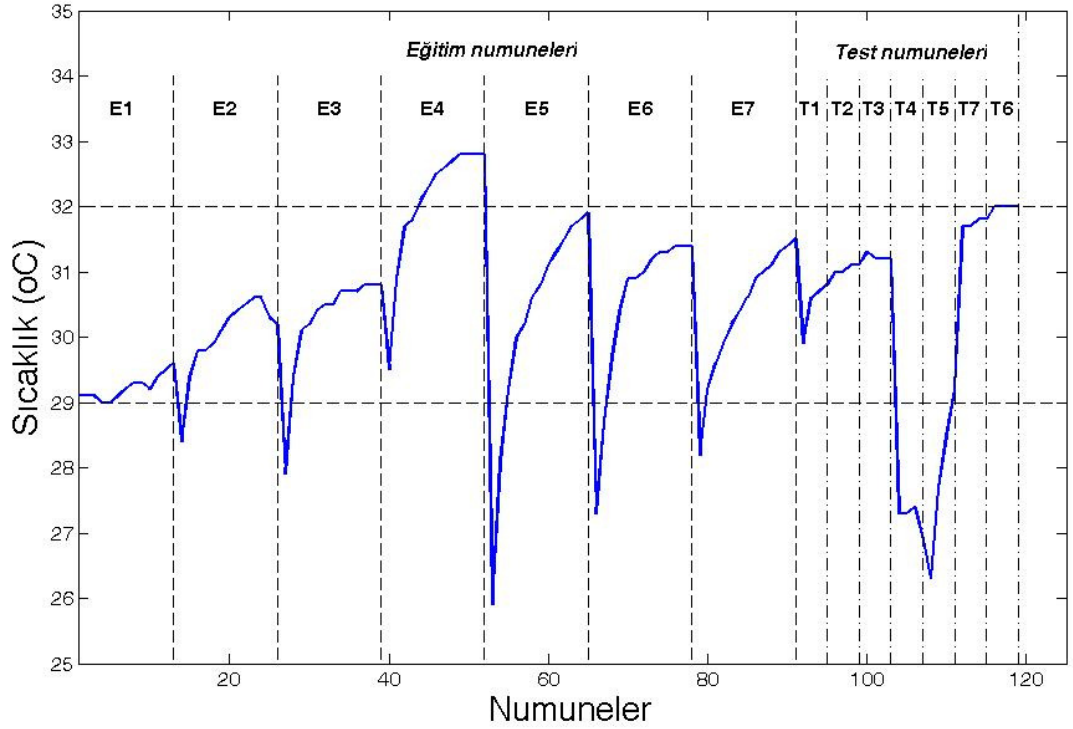
Mikroorganizma süspansiyonları steril edilen dişlerin kök kanalları içerisine, dentin tübüllerine difüze olmasına izin vermek amacıyla, her seferinde 2'şer μ l olacak şekilde toplam 20 μ l dağıtıldı. Daha sonra elektronik burun cihazıyla koku verisi alma işlemlerine geçildi (Şekil 3. 8). Veri alma işlemleri her mikroorganizmanın eğitim ve test grupları için ayrı günlerde çalışmanın birinci aşamasındaki gibi yapılarak tamamlandı.



Şekil 3. 8. EB cihazıyla koku verisi alma işlemi

Her bir numuneden elektronik burun cihazı ile 5 koku verisi (sample) alınmış olup ilk koku verileri dikkate alınmıştır.

Elektronik burun cihazı ile veri toplarken aynı zamanda ortam sıcaklığı da kaydedilmektedir. Sensörlerin değişimine sıcaklık değişimleri etki etmektedir. Numunelerin sıcaklık değişimleri Şekil 3. 9’da verilmiştir. Bu grafiğe göre 29-32 °C aralığı dışındaki verilerin çıkarılmasının daha sağlıklı sınıflandırma sonuçları vereceği düşünülmüştür. Grup-4 (*S. sanguinis*) ve Grup-5 (*F. nucleatum*) in eğitim ve test verilerinin alınması esnasındaki sıcaklık uyumsuzluğu nedeniyle bu mikroorganizmalar daha sonra veri setinden çıkarılmıştır. Sonuçta 5 mikroorganizma için toplam 55 numune eğitim için, 20 numune de test için ayrılmıştır.



Şekil 3. 9. Mikroorganizma numunelerinin sıcaklık değişimleri

Numunelerden elde edilen koku verilerine, önceki çalışmadaki ön-işleme metotlarından başarılı olanlar uygulanarak çeşitli veri setleri elde edildi. Bu veri setlerinin, Yöntemler kısmında belirtilen sınıflandırma metotları kullanılarak sınıflandırma başarıları hesaplandı.

Yöntemler: Gerçekleştirilen bu 3 ayrı çalışmada veri setlerine, Ayırma Analizi (Discriminant Analysis - AA), Destek Vektör Makineleri (Support Vector Machines - DVM) ve Radyal Tabanlı Fonksiyon Ağı (RBF - Radial Basis Function) sınıflandırma metotları uygulandı.

AA, veri setindeki değişkenlerin k sayıda gruba ayrılmasını sağlayan ve veri setini oluşturan birimlerin gerçek gruplarına, sınıflarına optimal düzeyde atanmalarını sağlayacak fonksiyonlar türeten bir yöntemdir (158).

DVM, sınıflandırma ve doğrusal olmayan fonksiyon yaklaşımı problemlerinin çözümü için geliştirilmiş eğitici bir öğrenme metodudur. Son yıllarda daha yaygın olarak kullanılmaya başlanan DVM, yazı tanıma, nesne tanıma, ses tanıma ve yüz tanıma gibi örüntü tanıma uygulamalarında kullanılmaktadır (159). Destek vektör makineleri temelde doğrusal olarak ayırt edilebilen iki sınıf problemlerin çözümünden yola çıkarak doğrusal olarak ayırt edilemeyen veya çok sınıflı problemlerin çözümü için genelleştirilebilir (160). Doğrusal olarak ayırt edilemeyen sınıflar çekirdek fonksiyonları (kernel functions) kullanılarak sınıflandırma işlemi gerçekleştirilebilir.

DVM temelde ikili sınıflandırıcı olduğundan çok sınıflı problemleri çözmek için genel olarak 2 yöntem mevcuttur:

1. Bir sınıfa karşılık diğer sınıfa ait verilerin sınıflandırıcıya verilmesi (One versus rest). Bu durumda n sınıf için n adet sınıflandırma işlemi yapılmaktadır.
2. Sınıfların ikili olarak birbirleri ile karşılaştırılması (One versus one). Bu durumda ise n sınıf için $n \times (n-1)/2$ adet sınıflandırma işlemi yapılmaktadır.

RBF, çok boyutlu uzayda eğri uydurma yaklaşımıdır (161). RBF'nin eğitimi ise, çok boyutlu uzayda eğitim verilerine en uygun bir yüzeyi bulma problemi şeklinde tanımlanabilir (162).

Çalışmanın gereç ve yönteminde yapılan uygulamaları maddeler halinde özetleyecek olursak;

Birinci uygulama:

Bu uygulama 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşama, farklı konsantrasyonlardaki mikroorganizma süspansiyonlarının konsantrasyon farkı gözlemlenmesinin türlerine göre sınıflandırılması amacıyla yapıldı.

İlk aşamanın safhalarını sırasıyla yazacak olursak;

1. Bu aşamada her mikroorganizmadan 4'er koku verisi olmak üzere toplam 28 koku verisi üzerinde çalışılmıştır.
2. Her bir koku verisi 74×32 'lik matris formundadır.
3. Koku verilerine, 3 farklı sensör modeli ve 3 farklı sensör referans değeri ile toplamda 9 ayrı ön işleme metodu (pre-processing method) uygulanmıştır. Bu ön işleme metodlarının sınıflandırma başarısına etkileri incelenmiştir. Uygulanan bu ön işleme metodları ile 7 mikroorganizmaya ait 28×32 'lik matris formunda 9 ayrı veri seti elde edilmiştir.
4. Elde edilen bu veri setlerinin her birine 2 ayrı boyut azaltım yöntemi uygulanmış ve dolayısıyla 7 mikroorganizmaya ait 18 ayrı veri seti elde edilmiştir. Böylece boyut azaltım yöntemlerinin de sınıflandırma başarısına etkileri incelenmiştir.

İkinci aşamada ise; 7 farklı mikroorganizmanın 4 farklı konsantrasyondan beşer koku verisi dikkate alınarak, cihazın hangi konsantrasyona daha duyarlı olduğunun belirlenmesi amaçlandı.

İkinci aşamanın safhalarını sırasıyla yazacak olursak;

1. Bu aşamada her konsantrasyon için, her bir mikroorganizmadan 5'er koku verisi olmak üzere toplam 35 koku verisi üzerinde çalışılmıştır.
2. Her bir koku verisi 74×32 'lik matris formundadır.
3. Koku verilerine, 3 farklı sensör modeli ve 3 farklı sensör referans değeri ile toplamda 9 ayrı ön işleme metodu uygulanmıştır. Bu sensör modellerinin sınıflandırma başarısına

etkileri incelenmiştir. Uygulanan bu ön işleme metotları ile her konsantrasyon için 7 mikroorganizmaya ait 35x32'lik matris formunda 9 ayrı veri seti elde edilmiştir.

4. Elde edilen bu veri setlerinin her birine 2 ayrı boyut azaltım yöntemi uygulanmış ve dolayısıyla her konsantrasyon için 7 mikroorganizmaya ait 18 ayrı veri seti elde edilmiştir. Böylece boyut azaltım yöntemlerinin de sınıflandırma başarısına etkileri incelenmiştir.

İkinci uygulama:

Bu uygulama, sabit konsantrasyondaki mikroorganizma süspansiyonlarının türlerine göre sınıflandırılması amacıyla yapıldı. Çekilmiş steril insan dişlerinin kök kanalları içerisine mikroorganizma süspansiyonları yerleştirildi.

Bu uygulamanın safhalarını sırasıyla yazacak olursak;

1. Bu aşamada mikroorganizmaların 1.5×10^8 cfu/ml konsantrasyondaki SF içeren 20 µL'lik süspansiyonları hazırlandı. Her mikroorganizmadan 11'ü eğitim ve 4'ü de test için olmak üzere toplam 15 koku verisi üzerinde çalışılmıştır.
2. Her bir koku verisi 74x32'lik matris formundadır.
3. Koku verilerine, ilk uygulamada başarılı olduğu gözlemlenen sensör referans değeri-1 ve 3 farklı sensör modeli ile toplamda 3 ayrı ön işleme metodu uygulanmıştır. Bu ön işleme metotlarının sınıflandırma başarısına etkileri incelenmiştir. Uygulanan bu sensör modelleri ile 5 mikroorganizmaya ait 3 ayrı veri seti elde edilmiştir.
4. Elde edilen bu veri setlerinin her birine 2 ayrı boyut azaltım yöntemi uygulanmış ve dolayısıyla 5 mikroorganizmaya ait 6 ayrı veri seti elde edilmiştir. Böylece boyut azaltım yöntemlerinin de sınıflandırma başarısına etkileri incelenmiştir.

4. BULGULAR

Birinci uygulamanın ilk aşamasında; gereç ve yöntemde bahsedilen ön-işleme metotları kullanılarak 18 ayrı veri seti oluşturuldu. Her bir veri seti, 7 mikroorganizmaya ait 28 gözlemden meydana gelmektedir. AA kullanılarak bu veri setleri 7 gruba sınıflandırılarak değişik ön işleme yöntemlerinin performansları incelendi. AA ile sınıflandırma işleminde lineer, Mahalanobis (mahal) ve ikinci dereceden fonksiyonlar (quadratic) olmak üzere 3 ayrı yöntem kullanıldı. Bu yöntemlere göre sınıflandırma işleminde, her bir veri setinin yüzde olarak eğitim hata oranları Tablo 4. 1’de verilmiştir. Bu tablodan görüldüğü üzere, ikinci dereceden fonksiyonlarla gerçekleştirilen AA sınıflandırması (quad) diğer parametrelere göre çok daha iyi sonuçlar vermiştir. Sensörlerin referans direnç değerlerinin hatayı etkilediği görülmüştür. Verilerin ilk sensör okuma değerleri referans kabul edilerek (referans- 2) oluşturulan veri setlerinin (data2r, data2, nordata2) sınıflandırma hatalarının, diğer referans değerleri ile oluşturulan veri setlerine göre yüksek olduğu anlaşılmıştır. Ön işleme metotlarında kullanılan sensör modellerinin (fark, oransal fark ve normalize fark modelleri), sınıflandırma hatasını etkilediği görülmüştür. Veri setinin küçüklüğü yüzünden test için bu aşamada veri ayrılmadı.

Tablo 4. 1. Veri setlerinin AA ile 7 gruba sınıflandırılmasındaki eğitim hata oranları (%)

Boyut azaltımı yapılmış veri setleri	Eğitim Sınıflandırma Hata Oranı (%)		
	Lineer	mahal	quad
sd_data1r	28.57	10.71	0.00
pca(data1r)	32.14	14.29	3.57
sd_data1	39.29	3.57	0.00
pca(data1)	21.43	10.71	3.57
sd_nordata1	28.57	7.14	3.57
pca(nordata1)	28.57	14.29	7.14
sd_data2r	39.29	21.43	17.86
pca(data2r)	39.29	17.86	10.71
sd_data2	32.14	10.71	7.14
pca(data2)	35.71	21.43	17.86
sd_nordata2	35.71	14.29	3.57
pca(nordata2)	42.86	14.29	14.29

sd_data3r	28.57	10.71	3.57
pca(data3r)	39.29	7.14	3.57
sd_data3	35.71	7.14	3.57
pca(data3)	21.43	7.14	3.57
sd_nordata3	25.00	10.71	3.57
pca(nordata3)	32.14	3.57	0.00

Çalışmanın ikinci aşamasında, 7 farklı mikroorganizmanın 4 farklı konsantrasyondan beşer koku verisi dikkate alınarak, cihazın hangi konsantrasyona daha duyarlı olduğunun belirlenmesi amaçlandı. Her konsantrasyon için toplam 35 koku verisi üzerinde çalışıldı. Bu koku verilerine ilk aşamadaki ön işleme metotları ve boyut azaltım yöntemleri uygulanarak 18 ayrı veri seti elde edildi. AA ve DVM kullanılarak bu veri setleri 7 mikroorganizma grubuna sınıflandırılmış ve değişik ön işleme metotlarının performansları incelendi. Veri setinin küçüklüğü yüzünden bu aşamada da test için veri ayrılmadı.

AA ile sınıflandırma işleminde; lineer, Mahalanobis ve ikinci dereceden fonksiyonlar (quadratic) olmak üzere 3 ayrı metot kullanıldı. Bu metotlara göre sınıflandırma işleminde, her bir veri setinin yüzde olarak eğitim hata oranları Tablo 4. 2’de verilmiştir. Bu tablodan aşağıdaki sonuçları çıkarmak mümkündür:

- Konsantrasyon azaldıkça sınıflandırma hata oranları artmaktadır.
- Sensörlerin referans direnç değerlerinin hatayı etkilediği görülmüştür. “Sensör referans değeri-1”, diğer referans değerlerine nazaran daha başarılı sonuçlar vermektedir.
- İkinci dereceden fonksiyonlarla yapılan sınıflandırma, diğer metotlara göre daha iyi sonuçlar vermektedir.
- Sensör modellerinin ve boyut azaltım yöntemlerinin sınıflandırma hatasını etkilediği görülmektedir.

DVM ile sınıflandırma işleminde; DVM (1-r) ve DVM (1-1) olmak üzere 2 ayrı yöntem kullanıldı. Bu yöntemlerin her biri 2 farklı metoda göre (lineer ve ikinci dereceden fonksiyonlar) incelenmiştir. Bu metotlara göre sınıflandırma işleminde, her bir veri setinin yüzde olarak eğitim hata oranları Tablo 4. 3’de verilmiştir. Bu tablodan aşağıdaki sonuçları çıkarmak mümkündür:

- Konsantrasyon azaldıkça sınıflandırma hata oranları artmaktadır.
- Sensörlerin referans direnç değerlerinin hatayı etkilediği görülmüştür. “Sensör referans değeri-1”, diğer referans değerlerine nazaran daha başarılı sonuçlar vermektedir.
- DVM (1-1) yöntemi ile yapılan sınıflandırma DVM (1-r)’e göre daha başarılıdır.
- İkinci dereceden fonksiyonlarla yapılan sınıflandırma, lineer metoda göre daha iyi sonuçlar vermektedir.
- Sensör modellerinin ve boyut azaltım yöntemlerinin sınıflandırma hatasını etkilediği görülmektedir.

Her iki sınıflandırma yöntemindeki hataların düşüklüğü, veri setinin boyutunun azlığından dolayı, ikinci uygulamada veri setindeki örnek sayısı artırıldı. Ayrıca eğitim ve test için ayrı gruplar oluşturuldu.

İkinci uygulamada, yine gereç ve yöntemde bahsedilen ön-işleme metotları ve boyut azaltım yöntemleri kullanıldı. Bu aşamada, ikinci aşamada başarılı olduğu görülen “sensör referans değeri-1” dikkate alınmıştır. Dolayısıyla 6 ayrı veri seti üzerinde çalışılmıştır. Ancak işlem sırasındaki sıcaklık farklılıkları nedeniyle mikroorganizma sayısı bu safhada 5’e düşürülerek devam edildi. Her bir veri seti, çalışmada kullanılan 5 mikroorganizmaya ait her bir mikroorganizma için 11 eğitim ve 4 test verisinden meydana gelmektedir.

AA ile sınıflandırma işleminde; birinci aşamadaki metotlar kullanıldı. Bu metotlara göre sınıflandırmada, eğitim ve test veri setlerinin hata oranları Tablo 4. 4’te verilmiştir. Bu tablodan en düşük sınıflandırma test hata oranının %55 olduğu görülmektedir.

Tablo 4. 4.Veri setlerinin AA ile 5 mikroorganizma grubuna sınıflandırılmasındaki eğitim ve test sınıflandırma hata oranları (%)

		Eğitim Hata Oranı (%)			Test Hata Oranı (%)		
Sensör referans değeri-1 $R_0 = R_{\min}^{\text{sample}}$	Veri seti	linear	mahal	quad	linear	mahal	quad
	data1r	27.27	16.36	16.36	70	70	70
	pca (data1r)	29.09	14.55	18.18	65	75	75
	data1	29.09	23.64	16.36	55	80	90
	pca (data1)	27.27	18.18	21.82	75	75	75
	nordata1	30.91	23.64	23.64	65	80	70
	pca (nordata1)	29.09	16.36	16.36	75	65	65

DVM ile sınıflandırma işleminde; DVM(1-1) yöntemi uygulanmış olup, birinci aşamadaki metotlara ek olarak Radyal tabanlı fonksiyon (Radial Basis Function - RBF) ve polinom metotları kullanıldı. Bu metotlara göre sınıflandırmada, eğitim ve test veri setlerinin hata oranları Tablo 4. 5'te verilmiştir. Bu tablodan en düşük sınıflandırma test hata oranının %50 olduğu görülmektedir.

Tablo 4. 5. Veri setlerinin DVM ile 5 mikroorganizma grubuna sınıflandırılmasındaki eğitim ve test sınıflandırma hata oranları (%)

		Eğitim Hata Oranı (%)				Test Hata Oranı (%)			
Sensör referans değeri-1 $R_0 = R_{\min}^{\text{sample}}$	Veri seti	linear	quad	RBF	poly	linear	quad	RBF	poly
	data1r	25.45	20.00	18.18	9.09	60	65	70	70
	pca (data1r)	23.64	7.27	7.27	1.82	60	55	70	55
	data1	25.45	14.55	16.36	16.36	65	60	60	60
	pca (data1)	21.82	10.91	12.73	5.45	60	60	65	70
	nordata1	27.27	12.73	7.27	5.45	55	50	55	50
	pca (nordata1)	21.82	12.73	1.82	0.00	60	60	55	55

DVM ile sınıflandırma işleminde; DVM(1-1) yöntemi uygulanmış olup, birinci uygulamadaki metotlara ek olarak RBF ve polinom metotları da incelendi. Test veri setlerinin; farklı öznitelik (feature) sayılarına göre değişik ön-işleme metotları içerisindeki minimum sınıflandırma hata oranları Tablo 4. 6'da verilmiştir. En düşük sınıflandırma test hata oranı, 11 öznitelik için RBF metodu uygulanarak %20 olarak elde edilmiştir.

Tablo 4. 6. Test verilerinin DVM(1-1) ile 5 mikroorganizma grubuna sınıflandırılmasındaki farklı öz nitelik (feature) sayılarına göre minimum sınıflandırma hata oranları (%)

Öz nitelik sayısı	DVM(1-1)			
	Linear	Quad	RBF	Poly
3	55.00	50.00	55.00	50.00
5	55.00	55.00	50.00	55.00
7	50.00	50.00	55.00	50.00
9	60.00	50.00	30.00	50.00
11	55.00	45.00	20.00	45.00
13	50.00	55.00	30.00	50.00
15	55.00	55.00	50.00	50.00
17	50.00	65.00	45.00	45.00
19	50.00	60.00	50.00	50.00
21	50.00	55.00	55.00	60.00
23	50.00	60.00	50.00	65.00
25	55.00	60.00	55.00	65.00
27	60.00	60.00	55.00	70.00
29	60.00	60.00	55.00	65.00
31	65.00	60.00	55.00	60.00

Bu bulgular ışığında, elektronik burun teknolojisi kullanılarak, uygun sınıflandırma yöntemleriyle 5 mikroorganizmanın %80 başarı ile sınıflandırılabilceği görülmektedir.

Çalışmanın bulgularını kısaca özetleyecek olursak;

Birinci uygulamanın ilk aşamasında; farklı konsantrasyonlardaki 7 mikroorganizma süspansiyonları, konsantrasyon farkı gözetilmeksizin türlerine göre AA kullanılarak sınıflandırıldı. İkinci derece fonksiyonların kullanıldığı sınıflandırma yönteminde eğitim hata oranlarında %0 gibi bir sonuç elde edildi yani tüm mikroorganizmalar başarılı bir şekilde sınıflandırıldı.

Birinci uygulamanın ikinci aşamasında; cihazın 4 farklı konsantrasyondan hangisine daha duyarlı olduğunu belirlemek amacı ile 7 mikroorganizma AA ve DVM kullanılarak sınıflandırıldı. Her iki yöntemde de konsantrasyon azaldıkça sınıflandırma hata oranının

artmakta olduğu görüldü. 12×10^8 cfu/ml konsantrasyonunda mikroorganizmaların daha başarılı sınıflandırıldığı tespit edildi.

İkinci uygulamada; 1.5×10^8 cfu/ml konsantrasyondaki 5 mikroorganizma süspansiyonu AA ve DVM kullanılarak sınıflandırıldı. AA ile sınıflandırma işleminde test grubunda %55’lik bir hata oranı elde edildi. Yani test uygulamalarında mikroorganizmalar ancak %45 oranında doğru sınıflandırılabilir. DVM ile sınıflandırma işleminde ise test grubunda %20’lik bir hata oranı elde edildi. Başka bir deyişle 5 mikroorganizma %80 başarı ile doğru sınıflandırıldı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pulpa ve periradiküler hastalıklara mikroorganizmaların neden olduğu bilinmektedir (2, 5). Bu hastalıkların tedavisi, nedenin, yani mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasıdır. Sonuç olarak mevcut olan çeşitli tedavi protokolleri (izolasyon, kanal preparasyonu, antibakteriyel irriganlar ve kanal içi medikamenler) bakteri eliminasyonuna doğru yönelmiştir. Mikroorganizma ve klinik endodonti arasındaki bu sıkı ilişki nedeniyle, mikroorganizmaların gelişimi ve varlığı ile ilgili bilgiler mikrobiyolojik kök kanal kültürü verilerine dayanır (99, 163- 167).

Hastalık sürecine dahil olan mikroorganizmaların doğru olarak belirlenmesi, yalnızca etkili bir antimikrobiyal tedavi için değil aynı zamanda hastalığın başlayış ve ilerleyişini kavramak için de gereklidir.

İki nedenle kök kanalından kültür yapılmaktadır:

1. Kök kanalının doldurulmasından önce uygulanan kanal tedavisi işlemlerinin antibakteriyel etkinliğini değerlendirmek.
2. İnatçı enfeksiyonlu vakalarda, izole edilen mikroorganizmalardan antibiyotiklere duyarlılığı ve direnci olanları saptamak (42).

Günümüzde mikroorganizmaların tanısında mikrobiyolojik kültür yöntemleri, altın standart olarak bilinmektedir. Mikroorganizmalar canlı ortamlarda (*in vivo*) ve cansız ortamlarda (*in vitro*) uygun şartlar oluşturularak üretilmektedirler. Bu üretilme işlemine “kültür yapma”, üretilen mikroorganizmaya da “kültür” adı verilmektedir. Bu sayede patojen mikroorganizmalar klinik örneklerden elde edilmekte ve tanımlanması yapılabilmektedir (168).

Kültürel yöntemlerin bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. En büyük avantajı araştırılmayan mikroorganizmalar da dahil olmak üzere çok sayıda mikroorganizmanın belirlenebilmesini sağlamasıdır. Ayrıca izole edilen ilgili patojen mikroorganizmanın antimikrobiyal duyarlılık testinin yapılması ve o mikroorganizmanın fizyolojisi ve patojenitesinin araştırılması da mümkündür (169, 170).

Bununla birlikte kültürel yöntemler çeşitli dezavantajlara sahiptir. Oldukça pahalı olan bu yöntemler ile çeşitli anaerob bakterilerin teşhis edilmesi birkaç gün ile birkaç hafta zaman alabilir. Özellikle standart kültür ortamlarında üretilmeyen anaerob bakteriler için duyarlılıkları çok düşüktür. Yöntemin özgüllüğü mikrobiyoloğun deneyimi ve farklı bakteri türlerini ayırabilme yeteneğine de bağlıdır. Ayrıca zahmetli ve zaman alıcı yöntemlerdir (170). Mikrobiyolojik kültür yöntemleri, örnekleri alma ve laboratuvar işlemleri sırasında kontaminasyona bağlı olarak yanlış sonuçlar verebilir. Kontaminasyon moleküler yöntemlerde

de rastlanabilen bir dezavantaj olmakla birlikte, laboratuvar işlemleri sırasında kültür yöntemleri ile daha çabuk fark edilebilir (9).

Patojen mikroorganizmalar ayrıca enzimatik teknikler ve immünolojik yöntemlerle de belirlenebilir. İmmünolojik yöntemlerde antijen-antikor reaksiyonu esas alınır. Hedef mikroorganizmaya karşı üretilen ve özgün işaretleyiciler ile işaretlenen antikorlar kullanılır. Maliyetinin düşük olması ve hızlı bir yöntem olması yanında, bu metodun da antikorların üretilme zorluğu ve duyarlılığının (10^4 - 10^5 bakteri) az oluşu gibi dezavantajları vardır (119).

BANA gibi enzimatik yöntemler hızlı ve maliyetsizdirler fakat bu metotla hedef bakterinin miktarı güvenilir bir şekilde tayin edilemez ve reaksiyonun bir veya daha fazla türe bağlı olup olmadığı anlaşılamaz (119).

Son yıllarda mikrobiyal patojenler ve spesifik hastalıklar arasındaki ilişki konusunda moleküler biyolojik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (121).

Diş hekimliğinde moleküler biyolojik metotlar, genellikle klinik örneklerdeki mikroorganizmaları tanımlama ve birbirine yakın türleri ayırmada kullanılmaktadır. Endodontik çalışmalarda moleküler metotlar için örnekler, genellikle sorunlu dişlerin kök kanallarından ve periapikal lezyonlarından elde edilir.

Moleküler tanı yöntemleri kültürü yapılamayan türlerin de tespit edilebilmesi, daha az zaman alan hızlı bir yöntem olması gibi avantajlara sahiptir. Mikrobiyal patojenler kültür yapma gereksinimi olmadan direkt klinik örneklerden tespit edilebilmektedir. Örneklerin alınması, taşınması ve saklanması konusundaki uygulamaların, klasik kültür yöntemlerinde kullanılan taşıma yöntemlerine göre daha toleranslı oluşu yine avantajları arasında bulunmaktadır (170). Kök kanal örnekleri toplanırken rastlanılan zorluklara bağlı olarak kök kanalından örneği alınan bakteriyel hücre sayısı düşük olabilir. Son yıllarda biyoloji ve tıp alanında oldukça ilgi gören moleküler metotlardan PZR metodunun yüksek duyarlılığı (1- 10 bakteri) bu aşamada bir avantajdır (121).

Moleküler metotların dezavantajlarından biri kullanıldıkları zaman mikroorganizmaların canlılığı hakkında bilgi vermemektedir. Metodun, endodontik florada gerçekten yaşamakta olan mikroorganizmaları ya da kök kanalına daha önceden girmiş fakat hayatta kalamamış organizmaları gösterip göstermediği belirsizdir. (9, 170, 171). Ayrıca bu yöntemler tekniğe son derece duyarlıdır, gerektiği gibi yapılmadığı takdirde çok yüksek duyarlılığından ötürü kontaminasyon, hatalı sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle laboratuvar aşamaları sırasında çok titiz bir çalışma gerektirir (172). Moleküler tanı metotları antimikrobiyal duyarlılık gibi testler için de uygun değildir.

Kök kanal enfeksiyonlarında yer alan patojen mikroorganizmalardan bazıları, yukarıda bahsedilen metotlardan farklı olarak bu çalışmada EB sistemi kullanılarak araştırıldı. EB, ne olduğu bilinmeyen gaz halindeki maddelerde bulunan kimyasalların hızla tasnif edilmesi için geliştirilmiş elektronik bir alettir. Bu alet, “koklayabilen” ve farklı kokular için farklı profiller ortaya çıkaran sensör teknolojisine dayanır (173).

Günümüzde EB sistemleri, askeri alanda, uzay araştırmalarında, gıda, çevre sağlığı ve tıp alanında kullanılmakla birlikte, son yıllarda medikal teşhis alanı bu sistem için gelecek vadeden bir uygulama alanı olarak ortaya çıkmaktadır. Halen EB sisteminin klinik uygulamaları ya da diğer bir deyişle hastalıkları teşhis etme yeteneği konusunda büyük bir merak vardır. Bazı hastalıklar karakteristik kokularla ilişkilendirilmiştir, örneğin, diyabet nefeste bir aseton kokusuna neden olur ya da mide rahatsızlıkları ağız kokusu ile ilişkilendirilir. Akciğer, karaciğer ya da bağırsak kanserleri gibi diğer hastalıklar da karakteristik kokulara neden olurlar (143).

Bakteriyoloji alanında yapılan çalışmalardan birinde göz enfeksiyonuna sebep olan bakterilerden 6 tanesi, EB sistemi kullanılarak %98 doğrulukla sınıflandırılmıştır (146).

EB sisteminin kullanıldığı diğer bir bakteriyoloji çalışmasında, Boilot ve ark. (147) göz enfeksiyonu etkeni 6 bakteri için %97.3, kulak burun boğaz enfeksiyonu etkeni 4 bakteri için ise %97.6 gibi bir sınıflandırma başarısı elde etmiştir.

Dutta ve ark. (149), yaptıkları çalışmada, EB sisteminin, %99.69 gibi bir doğruluk ile hastane enfeksiyonlarında görülen *S. aureus* enfeksiyonlarının tanımlanmasında çok kuvvetli bir çözüm olabileceğini ortaya koymuşlardır.

Gibson ve ark. (150) 1997 yılında yaptıkları çalışmada, EB sistemi kullanarak, 12 farklı bakteri ve bir mantarı tespit ederken, mikroorganizmaların eş zamanlı sınıflandırılmasında başarı oranını %93.4 olarak bulmuştur.

Enterobacter aerogenes kültürünün *Escherichia coli* suşundan kolaylıkla ayırt edildiğini gösteren bir çalışmada (151) yine EB sistemi kullanılmıştır.

EB sisteminin *Clostridium* türleri ve *Bacteriodes fragilis* gibi anaerob bakterilerin klinik izolatları ile steril kültürleri ayırmak için kullanıldığı *in vitro* bir çalışmada (152) hangi gruba ait olduğu bilinmeyen örnekler %100 başarı ile sınıflandırılmıştır.

Kulak burun boğaz enfeksiyonlarının teşhisinin klinik olarak değerlendirmesinde kullanıldığı bir çalışmada 90 hastadan alınan sürüntü örnekleri hem EB ile hem de mikrobiyolojik kültür yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak EB sistemi sonuçları kültür sonuçları ile %88.2 oranında örtüşmüş olarak tespit edilmiştir (148).

Mohamed ve ark. (174) EB sistemi ile sağlıklı ve Tip 2 diabet hastalığı olan insanların idrar örneklerini değerlendirmiş ve %96 gibi bir başarı oranı bildirmişlerdir.

EB sistemlerinin pek çok alanda kullanılmaya başlayıp yaygınlaşması, pulpa ve periradiküler hastalıklara neden olan patojenlerin tespiti için de uygun olup olmadığının çalışmalar yapılarak değerlendirilmesi gerekliliğini göstermektedir. EB sistemlerinin geliştirilmesi ve uygulanabilirliğinin bulunması durumunda, potansiyel avantajları arasında, kök kanal patojenlerinin hızlı ve objektif olarak belirleme olasılığının bulunması, bu sayede doğru teşhis ve tedavi yöntemlerinin uygulanmasının sağlanması ve klinik uygulamada kullanılan yöntemlerin etkinliğinin hızlı değerlendirilebilmesi sayılabilir.

Bu çalışmada, pulpa ve periradiküler hastalıklarda bakteriyel enfeksiyonun etkeni mikroorganizmaların koku ile ilişkilendirilmesinde EB sisteminin uygulanabilirliği değerlendirildi.

Kök kanal enfeksiyonları zorunlu ve fakültatif anaerob bakterilerin baskın olduğu karışık ve semispesifik enfeksiyonlardır (53). Enfekte kök kanalı ortalama 1-12 farklı tür bakterinin bulunduğu polimikrobiyal enfeksiyonlardır (9). Bu tez çalışmasında endodontik patojen mikroorganizmalardan 5 bakteri (*E. faecalis*, *S. sanguinis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. alactolyticus*) 2 maya (*C. albicans*, *C. glabrata*) kullanıldı. Bu mikroorganizmalardan 2 tanesi (*E. faecalis*, *S. sanguinis*) fakültatif anaerob, 3 tanesi (*F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. alactolyticus*) anaerob ve 2 tanesi (*C. albicans*, *C. glabrata*) aerob olup kök kanal enfeksiyonlarının polimikrobiyal doğası ile uyumludur.

Fakültatif bakteriler kök kanal tedavisi görmüş dişlerin başarısızlığından birinci derecede sorumludurlar (37). Bu grup bakterilerden olan enterokoklar ise bu dişlerden sıklıkla izole edilmiştir (27). Bununla birlikte *E. faecalis* normal insan florasının bir parçasıdır ve karışık enfeksiyonlarda, diğer aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmalarla birlikte bulunur (26). *E. faecalis* başarısız kök kanal tedavilerinin mikrobiyotasının araştırıldığı birçok çalışmada kök kanalında baskın olarak ya da sıklıkla izole edilen bir bakteri türü olarak gösterilmiştir (31, 35, 37, 38, 81, 82, 175, 176).

Fakültatif bir anaerob olan *S. sanguinis* kök kanalında çeşitli çalışmalarda (177- 180) moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilmiştir. Ayrıca 60 kök kanalından alınan mikrobiyolojik örneklerin kültürle değerlendirildiği bir çalışmada 41 nekrotik pulpadan 6'sında, 19 başarısız kök kanal tedavili kanalın 2'sinde *S. sanguinis* varlığı gösterilmiştir (33).

Mantarların kök kanal enfeksiyonlarında bulunma sıklıkları çeşitli araştırmalarda (23, 31, 35, 37- 40, 80- 82, 103, 181- 183) belirtilmiştir. Moleküler yöntemler ve kültür metotlarının kullanıldığı araştırmalarda bu oran %2- 21 arasında bulunmuştur. Ayrıca Şen ve ark. (184) periradiküler lezyonlu çekilmiş 10 dişin kök kanallarını SEM ile incelemiş, 4'ünde mantar

bulmuşlardır. Baumgartner ve ark. (40) periapikal radyolusensili vakaların değerlendirildiği çalışmada, birincil apikal periodontitli enfekte kök kanallı 24 dişin 5 (%21)'inde *C. albicans*'ı PZR ile bulmuştur.

C. albicans uzun süreli kök kanal enfeksiyonlarında bulunur, invaze olabilir ve virülans etkinliğe sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı periapikal bölgede yaşayabilme ve bu bölgeyi enfekte edebilme kabiliyeti önem arz etmektedir (34).

Candida türlerinin semptomsuz olarak oral kavitede yaşayabildikleri çok uzun zamandır bilinmektedir (116). Bu organizmaların zararlı patojenlere dönüşmesi yerel veya sistemik tetikleyici faktörlere bağlıdır (113). *Candida* türlerinin kök kanalında kolonize olmasında immün sistemin baskılandığı kanser gibi hastalıklar, kanal içi medikamanların kullanımı, yerel veya sistemik antibiyotik kullanımı ve çeşitli kök kanal tekniklerinin kullanımı gibi tetikleyici faktörler gösterilebilir (35, 185- 187).

Endodontik enfeksiyonlarda mantar çalışmaları çok olduğu halde, *C. glabrata*'nın kök kanal enfeksiyonlarındaki rolü ile ilgili az sayıda araştırma yapılmıştır. *C. glabrata* çeşitli çalışmalarda (23, 40) izole edilen mantarlar arasında gösterilmiştir. Bu organizma ile ilgili yapılan çalışmaların az olması, bunun yanında *C. glabrata*'nın da diğer *Candida* türleri gibi özellikle inatçı periapikal patolojilerde en az diğer bakteriler kadar rol oynayabilme ihtimali bulunması, çalışmada kullanılma sebebi olarak sayılabilir.

Önemli bir periodontopatojen olarak bilinen (107) *P. gingivalis* apseli dişleri de kapsayan semptomatik periradiküler lezyonlarla ilişkilendirilmiştir (25, 108). Gomes ve ark. (188) endodontik lezyonlu dişlerin mikrobiyolojik değerlendirmesi sonucu tedavi görmemiş nekrotik pulpalı dişlerde *P. gingivalis* oranını kültürle (1/50) %2, PZR ile (22/50) %44 olarak, tedavisi başarısız olmuş dişlerde PZR ile (16/50) %32 olarak tespit etmişlerdir. Fouad ve ark. (102) da yine nekrotik pulpalı dişlerin mikroflorasını PZR ile inceleyerek %9'luk bir görülme sıklığı rapor etmişlerdir. Endodontik orijinli periapikal apselerde Van Winkelhoff ve ark. (107) *P. gingivalis* oranını %12 olarak bulmuşlardır.

Endodontik enfeksiyonlarda kültür ya da moleküler yöntemler ile varlığı çeşitli çalışmalarda (7, 18, 25, 27, 35, 37, 83, 112) tespit edilen *P. alactolyticus*'un virülans faktörleri ve patojenite mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Apse oluşumunda önemli bir faktör olan nötrofil kemotaksisini başlatabildiği gösterilmiştir (189). Ayrıca *P. alactolyticus*'un insan serumuna inokule edildiği zaman hidrojen sülfür ve metil merkaptan meydana getirdiği bilinmektedir (50). Ortaya çıkan uçucu sülfür bileşiklerinin bakterinin patojenitesi ile ilgili olma ihtimali vardır.

Fouad ve ark. (102) 2002 yılında tedavi görmemiş periapikal radyolusensili nekrotik 24 dişin mikrobiyal örneklerini PZR kullanarak incelemiş, *F. nucleatum* oranını %82 olarak bulmuştur.

Sundqvist ve ark. enfekte kök kanallarında prevalansı en yüksek bakteri olarak %48 ile *F. nucleatum*'u göstermiştir. Kültürle yapılan bir başka çalışmada da yukarıdaki çalışmalarla benzer olarak 31 tek köklü nekrotik pulpalı dişten en sık *F. nucleatum* (%35.48) izole etmişlerdir (182). Ayrıca flare-up (akut alevlenme) oluşumunda *Fusobacterium* türlerinin de rolü gösterilmiştir (104). *F. nucleatum* sistein ve metioninin desülfürasyonu ile amonyak, hidrojen sülfür, bütirik asit ve metil merkaptan oluşturabilmektedir (50, 157, 190). Patojenik özellikleri ile ilgili olarak deneysel bir çalışmada, maymunların dişlerinin kök kanallarında *F. nucleatum*'un LPS 'inin periapikal inflamasyon ve kemik rezorpsiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (105).

Çalışmada EB teknolojisini değerlendirmek üzere seçilen 7 mikroorganizmanın kök kanal patojeni oldukları ve birçok vakada bulunma sıklıkları, yukarıda görüldüğü gibi çeşitli araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalarda değerlendirilmiştir. Kök kanal enfeksiyonlarında önemli rol oynayan bu 7 mikroorganizma bu nedenlerle tercih edilmiştir.

In vitro çalışma tercih etmemizin nedeni, bu konuda kök kanal patojenleri ile yapılmış çalışma bulunmaması ve elde edilen sonuçlara göre ileride yapılacak *in vivo* çalışmalara rehberlik etmesidir. Ayrıca ilk etapta hastaya ve ortama bağlı faktörlerin elimine edilebilmesi için kök kanal patojeni olduğu bilinen mikroorganizmalar laboratuvar ortamında test edildi.

Bu çalışmada arka grup dişlerin anatomilerinin farklılık göstermesi ve kök kanal preparasyonu işleminin standardizasyonun daha rahat sağlanması nedeniyle tek ve düz kanallı dişler kullanılmıştır.

Bazı endodontik enfeksiyonlarda karşılaşılan kötü koku, araştırmacının subjektifliği nedeni ile çok fazla araştırılmamıştır. Bu tez çalışmasında endodontik patojen mikroorganizmalardan 7 tanesinin kokuları EB sistemi ile objektif olarak test edilmiştir.

Çalışmada bütün mikroorganizmalar kendi üreme şartlarına uygun besi yerlerinde üretildikten sonra, EB sisteminde besi yerlerinin çeşitliliğinden kaynaklanabilecek koku farklarını ortadan kaldırmak ve standardizasyonu sağlamak için her bir mikroorganizma serum fizyolojik içeren tüplere inokule edildi. Çeşitli bakterilerin EB sistemi ile değerlendirildiği benzer çalışmalarda (146, 147, 191, 192) da serum fizyolojik tercih edilmiştir.

Numuneler bu çalışmada dış ortamdaki farklı kokuların sonuçları etkilememesi için ağzı kilitli naylon torbalar içerisine yerleştirilmiştir. Çeşitli çalışmalarda da aynı amaçla ağzı kapalı cam şişeler (149, 151, 191, 193- 195) kullanılmıştır.

Koku verisi alma işlemine geçilmeden önce numunelerin kokusunun ortama yayılması amacıyla bekleme süresi çeşitli araştırmalarda 5 ile 60 dakika arasında değişmektedir (147, 149, 155,

191, 193, 194). Bu çalışmada ise klinik koşullarda hızlı teşhis etme ihtiyacı göz önüne alınarak bekleme süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir.

Çalışmada referans gaz yerine ortam havası kullanılmıştır. Bu çalışmaya benzer şekilde mikroorganizmaların sınıflandırılması ile ilgili aynı EB sistemi ile yapılan çalışmalarda (146, 147, 149) da ortam havası referans gaz olarak tercih edilmiştir. Farklı EB sistemleri için sensör yapısının değişik olması sebebiyle farklı referans gazları tercih edilmektedir. Cihazın taşınabilirliğinin etkilenmemesi ve cihazın kullanım kılavuzunda karbon polimer yapıdaki sensörler için önerilen bir referans gaz bulunmaması nedeniyle ortam havası tercih edilmiştir.

Koku verisi alma işlemi 40 saniye olarak belirlenmiştir. Sensör direnç değerleri, bu süre içerisinde maksimum seviyeye ulaştığı için koku alma süresi daha uzun tutulmamıştır. Çeşitli çalışmalarda bu süre 60 saniye ile 8 dakika arasında değişmektedir (142, 195, 196).

Cyranose 320 EB sisteminin kullanım kılavuzunda, verideki hangi değerlerin sensör referans değeri olarak tercih edilmesi ile ilgili herhangi bir açıklama bulunmamaktadır. Bu nedenle farklı sensör modelleri oluşturularak sınıflandırmada hangisinin daha başarılı olduğu tespit edilmiş, çalışmanın sonraki uygulamalarında da bu sensör modelleri kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında EB cihazının hangi konsantrasyona duyarlı olduğunu tespit etmek amacıyla öncelikle farklı konsantrasyonlarda (12×10^8 , 12×10^5 , 12×10^3 ve 12×10^1 cfu/ml) süspansiyonlar kullanılmıştır. Yapılan değerlendirmede en iyi sonuçlar en yüksek konsantrasyonlu mikroorganizma süspansiyonlarında elde edilmiştir. Konsantrasyon azaldıkça sınıflandırma başarısının düştüğü gözlenmektedir. Konsantrasyonun azalmasıyla birlikte koku yoğunluğunun da azalması ve buna bağlı olarak cihazın sınıflandırma başarısının düşmesi ön görülebilir bir durumdur. Ancak, bir başka çalışmada, konsantrasyon ile sınıflandırma başarısı arasında farklı sonuçlar elde edilmiştir (147). Üç farklı konsantrasyonun değerlendirildiği çalışmada gruplar arasında sınıflandırma başarısı $10^8 < 10^4 < 10^5$ şeklinde bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmaların ve sınıflandırma yönteminin farklılığı, sonuçların benzer olmamasının nedeni olabilir.

Çalışmanın birinci uygulamasında veri setlerinin küçüklüğü yüzünden yalnızca eğitim verileri sınıflandırılmıştır. Bu çalışmanın ikinci uygulamasında veri setleri artırılarak eğitim ve test için ayrı gruplar oluşturulmuştur.

Bakteriyoloji alanındaki çalışmalarda, EB sistemi kullanılarak koku verilerinin değerlendirilmesi için çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Bu çalışmada AA, DVM ve RBF yöntemleri tercih edilmiştir. RBF yöntemi ile test mikroorganizmaları %80 başarı ile sınıflandırılmıştır. RBF yönteminin kullanıldığı çeşitli çalışmalarda da başarı yüzdeleri %65 ile %100 arasında değişmektedir (146, 149, 194, 197).

Bu çalışmanın EB sistemi kullanılarak yapılmasının en önemli nedenlerinden birisi, kök kanal patojenlerini mümkün olduğunca hızlı teşhis edilebilmektir. Geleneksel kültür yöntemlerinde anaerop bakteriler için birkaç gün ile birkaç hafta süren bu süre moleküler yöntemlerden DNA probe tekniğinde 1- 48 saat, PZR tekniğinde 2- 4 saat almaktadır (119, 170). EB sisteminin kullanıldığı çalışmalarda bu süre 5- 60 dakikaya kadar düşürülmüştür (146, 195). Bu çalışmada da test edilecek numunelerin EB sistemine önceden tanıtıldığı düşünülecek olursa, koku verileri alındıktan sonra sonuçları elde etmek için birkaç dakika yeterli olacaktır.

Enfekte kök kanalındaki ortalama bakteri sayısı (10^2 - 10^8 cfu) (9), kanal içi medikamanlar ya da irrigasyon solüsyonlarının çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmalarda (198, 199) da aynı konsantrasyonların kullanılması ve birinci aşamada elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurarak çalışmanın ikinci aşamasında bakteri konsantrasyonu 1.5×10^8 cfu/ml seçildi.

Sonuç olarak;

- Bu çalışmada kök kanalı patojeni 7 mikroorganizmanın EB sistemi ile sınıflandırılabilceği görülmektedir.
- Mikroorganizmaların belirlenmesi için kullanılan geleneksel kültür ve moleküler yöntemlerin aksine EB sistemi, mikroorganizmaları sadece birkaç dakika içerisinde objektif olarak tespit edilebilir ancak bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Veri seti büyüklüğünün yeterli olduğu, verilerin değerlendirme yöntemlerinin geliştirildiği daha fazla sayıda araştırmanın yapılması gerektiği düşünülmektedir.
- EB sistemi ile daha yüksek başarı oranlarına ulaşıldığı takdirde bir sonraki aşamada klinik kullanımda hasta başında hızlı teşhiste kullanılıp kullanılmayacağı değerlendirilebilir.
- Bu çalışmanın sınırları içerisinde kök kanal patojeni mikroorganizmaların EB teknolojisi ile %80 başarı oranı ile sınıflandırılabilceği görülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Henderson B, Wilson M. Commensal communism and the oral cavity. *J Dent Res* 1998; 77: 1674- 1683.
2. Baumgartner JC, Hutter JW. Endodontic microbiology and treatment of infections. In Cohen S, Hargreaves KM eds. *Pathways of the pulp* 9th edn, Mosby, Philadelphia, 2006; pp 580- 607.
3. Nair PN, Sjögren U, Gunthild K, Kahnberg K.E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: A long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990; 16: 580- 588.
4. Miller W. An introduction in the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dent Cosmos* 1894; 36: 505- 527.
5. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg* 1965; 20: 340- 349.
6. Möller A JR, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulpa tissue in monkeys. *Scand Dent Res* 1981; 89: 475- 484.
7. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 522- 530.
8. Le Goff A, Bunetel L, Mounton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 318- 322.
9. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. *Endod Topics* 2003; 6: 3- 28.
10. Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Dent Res* 1975; 83: 153- 158.
11. Warfvinge J, Bergenholtz G. Healing capacity of human and monkey dental pulps following experimentally-induced pulpitis. *Endod Dent Traumatol* 1986; 2: 256- 262.
12. Baumgartner JC, Bakland LF, Sugita EI. Microbiology of endodontics and asepsis in endodontic practice. In Ingle JJ, Bakland LF eds. *Endodontics* 5th edn, Elsevier Mosby, UK 2002; pp. 63- 93.
13. Cvek M, Cleaton-Jones PE, Austin JC, Andreason JO. Pulp reactions to exposure after experimental crown fractures or grinding in adult monkeys. *J Endod* 1982; 8: 391- 397.

14. Torabinejad M, Kiger RD. A histologic evaluation of dental pulp tissue of a patient with periodontal disease. *Oral Surg* 1985; 59: 198- 200.
15. Mazur B, Massler M. Influence of periodontal disease on the dental pulp. *Oral Surg* 1964; 17: 592- 603.
16. Czarnecki RT, Schilder H. A histological evaluation of the human pulp in teeth with varying degrees of periodontal disease. *J Endod* 1979; 5: 242- 253.
17. Wong R, Hirsch RS, Clarke NG. Endodontic effects of root planing in humans. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5: 193- 196.
18. Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. *Int Endod J* 1990; 23: 100- 106.
19. Cserrnyi J. Anacoric effect of chronic periapical inflammations. *J Dent Res* 1939; 18: 527- 531.
20. Delivanis PD, Snowden RB, Doyle RJ et al. Locatization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; 52: 430- 432.
21. Grossman LI. Origin of microorganisms in traumatized pulpless sound teeth. *J Dent Res* 1967; 46: 551- 553.
22. Chavez de Paz L. Gram-Pozitive organisms in endodontic infections. *Endod Topics* 2004; 9: 79- 96.
23. Waltimo TM, Siren EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30: 96- 101.
24. Theilade E. The microbiology of the necrotic pulp. In: Bergenholtz G, Horsted-Bindslev P, Reit C eds. *Textbook of endodontology* 1st ed, Blackwell Publishing, Oxford, pp. 111- 129.
25. Sundqvist G, Sohansson E, Sjögren U. Prevalance of black pigmented *bacteriodes* species in root canal infections. *J Endod* 1989; 15: 13- 19.
26. Baumgartner JC, Falker WA Jr. Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17: 380- 383.
27. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immun* 1992; 7: 257- 262.
28. Moğol S. Enfekte Kök Kanallarına Ait Anaerop Mikrofloranın İncelenmesi, Sodyum Hipoklorit ve Klorheksidin Glukonat Solüsyonlarının *İn-Vivo* Antimikrobiyal

- Etkinliklerinin Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, İ. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2002.
29. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1998; 31: 39- 47.
 30. Delboni MG, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Bacteria associated with post treatment disease and the antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from the filled root canals. *Int Endod J* 2007; 40: 979- 1007.
 31. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root- filled teeth with periapical lesions. *Int Endod Journal* 2003; 36: 1- 11.
 32. Chakraborty P, Chattopadhyay U.K. A study on the polymicrobial etiology of root canal infections in anterior non-vital teeth in a Government Hospital in Koklata. *India Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 113- 116.
 33. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 71- 76.
 34. Şen BH, Safavi KE, SpaEngberg LS. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 84: 68- 73.
 35. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 86- 93.
 36. Siqueira J, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 632- 641.
 37. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31: 1- 7.
 38. Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 579- 586.
 39. Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 332- 337.
 40. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod* 2000; 26: 695- 698.

41. Siqueira JF Jr, Roças IN, Lopes HP, Elias CN, Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. J Endod 2002; 28: 770- 773.
42. Sugita EI. Microbiology of endodontics. In: Ingle JJ, Bakland LK eds, Endodontics 4th edn, Lea&Febiger, Philadelphia 1994; pp 608- 622.
43. Tunçkanat F. Anaerob bakterilerin genel özellikleri. Kitap: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Yazarlar), Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2002; ss 2319- 2333.
44. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. J Endod 1992; 18: 427- 430.
45. Nair PN. Pathobiology of the periapex. In: Cohen S, Burns RC, eds. Pathways of the pulp 8th edn. Mosby, USA 2002; pp 412- 457.
46. Feuille F, Ebersole J, Kesavalu L, Steffen M, Holt S. Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence. Infect Immun 1996; 64: 2095- 2100.
47. Dahlen G, Fabricius L, Holm SE, Möller AJR. Interactions within a collection of eight bacterial strains isolated from a monkey dental root canal. Oral Microbiol Immunol 1987; 2: 164- 170.
48. Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Möller A JR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. Scand J Dent Res 1982; 90: 134- 144.
49. Ter Steeg PF, van der Hoeven JS. Development of periodontal microflora on human serum. Microb Ecol Health Dis 1989; 2: 1- 10.
50. Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methylmercaptan by oral bacteria. Oral Microbiol Immunol 1990; 5: 195- 201.
51. Gibbons RJ, Engle LP. Vitamin K compounds in bacteria that are obligate anaerobes. Science 1964; 146: 1307- 1309.
52. Grenier D, Mayrand D. Nutritional relationships between oral bacteria. Infect Immunol 1986; 53: 616- 620.
53. Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 94: 281- 293.
54. Fabricius L. Oral bacteria and apical periodontitis: an experimental study in monkeys, Thesis, University of Göteborg, Göteborg, Sweden 1982.

55. Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjogren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun* 1979; 25: 685-693.
56. Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller A JR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissue of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 200- 206.
57. Möller A JR, Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP. Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 207- 215.
58. Olsen I, Dahlen G. Salient virulence factors in anaerobic bacteria, with emphasis on their importance in endodontic infections. *Endod Topics* 2004; 9: 15- 26.
59. Bergenholtz G, Horsted- Bindslev P, Reit C. Textbook of endodontology. 1st edn, Blackwell, Oxford 2003; pp 111- 129.
60. Rietschel ET, Bode H. Bacterial endotoxins *Sci Am* 1992; 267: 26 -33.
61. Nair PN. Pathobiology of primary apical periodontitis. In: Cohen S, Hargreaves KM (eds), *Pathways of the pulp*. 9th edn. Elsevier Mosby, Canada 2006; pp 541- 579.
62. Dahlen G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res* 1980; 59: 1033- 1040.
63. Siquera JF Jr, Roças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J* 2007; 18: 267- 280.
64. Boneca IG. The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 46- 53.
65. Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* 1996; 60: 316- 341.
66. Heeg K, Sparwasser T, Lipford GB, Hacker H, Zimmermann S, Wagner H. Bacterial DNA as an evolutionary conserved ligand signalling danger of infection to immune cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 464- 469.
67. Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ. Biochemical and morphological characterization of killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1980; 28: 258- 268.
68. Langelan MA, Block RM, Grossman LI. A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens. *J Endodon* 1977; 3: 8- 23.

69. Szajkis S, Tagger M. Periapical healing in spite of incomplete root canal debridement and filling. *J Endodon* 1983; 9: 203- 209.
70. Goulhen F, Grenier D, Mayrand D. Oral microbial heat-shock proteins and their potential contributions to infections. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 399- 412.
71. Persson S, Claesson R, Carlsson J. The capacity of subgingival microbiotas to produce volatile sulfur compounds in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4: 169- 172.
72. Beauchamp RO Jr, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1984; 13: 25- 97.
73. Niederman R, Zhang J, Kashket S. Short-chain carboxylic acid- stimulated, PMN-mediated gingival inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8: 269- 290.
74. Maita E, Horiuchi H. Polyamine analysis of infected root canal contents related to clinical symptoms. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 213- 217.
75. Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 559- 564.
76. Van Steenberghe TJM, van der Mispel LMS, de Graaff J. Effect of ammonia and volatile fatty acids produced by oral bacteria on tissue culture cells. *J Dent Res* 1986; 65: 909- 912.
77. Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev* 1988; 52: 134- 152.
78. Durmaz G. Enterekoklar. Kitap: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Yazarlar), Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2002; ss 2057- 2065.
79. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J End* 2006; 32: 93- 98.
80. Möller A JR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr* 1966; 74: 380.
81. Peciuliene V, Reynaud A, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34: 429- 434.
82. Siqueira JF Jr, Roças IN. Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 85- 94.

83. Kantz WE, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of nonvital teeth in man. *Arc Oral Biol* 1974; 19: 91- 96.
84. Wittgow WC Jr, Sabiston CB Jr. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *J Endod* 1975; 1: 168- 171.
85. Siqueira JF Jr, Roças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces* species, *streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J Endod* 2002; 28: 168- 172.
86. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Roças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 275- 281.
87. Roças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30: 315- 320.
88. Lee W, Lim S, Son H, Bae K. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* 2004; 30: 209- 212.
89. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 234- 239.
90. Lancefield R.C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic *streptococci*. *J Exp Med* 1933; 57: 571- 595.
91. Sherman J.M. The *streptococci*. *Bacteriol Rev* 1937; 1: 3- 37.
92. Murray PR, Drew WL, Kobayashi GS, Thompson JH. Medical microbiology. International student edition. Wolfe publications ltd. 1990; 65- 68 ve 79- 82.
93. Ruoff KL, RA Wiley, D Beighton. *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC (eds), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington DC, 2003; pp 405- 421.
94. Morven SE, Carol JB. *Streptococcus agalactiae* (Group B *streptococcus*). In: Mandell/Douglas/Bennett (eds), *Principles and practise of infection diseases*, 5th ed. WILEY, Med. Pub, Newyork, 2000.
95. Kocagöz S. Viridans Streptokoklar. Kitap: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Yazarlar), Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2002; ss. 2024- 2030.

96. Siqueira JF Jr. Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections. J Endod 2003; 29: 619- 623.
97. Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. J Endodon 1992; 18: 152- 155.
98. Perez F, Rochd T, Lodter JP, Calas P, Michel G. In vitro study of the penetration of three bacterial strains into root dentine. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1993; 76: 97- 103.
99. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand J Dent Res 1981; 89: 321- 328.
100. Erandaç M. *Fusobacterium*. Kitap: Cengiz AT, Mısırlıgil A, Aydın M (yazarlar), Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 2004; ss 645- 648.
101. Herrera D, Roldan S, Sanz M. The periodontal abcess: a review. J Clin Periodontol 2000; 27: 377- 386.
102. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf JD. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. J Clin Microbiol 2002; 40: 3223- 3231.
103. Siqueira JF Jr, Roças IN, Moraes SR, Santos KR. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. Int Endod J 2002; 35: 345- 351.
104. Chavez de Paz L. *Fusobacterium nucleatum* in endodontic flare-ups. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 93: 179- 183.
105. Dahlen G, Magnusson BC, Möller A JR. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. Arch Oral Biol 1981; 26: 591- 598.
106. Aydın M. *Porphyromonas*. Kitap: Cengiz AT, Mısırlıgil A, Aydın M (yazarlar), Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 2004; ss 633- 643.
107. Van Winkelhoff AJ, Van Steenberghe TJM, De Graaff J. The role of black pigmented *Bacteroides* in human oral infections. J Clin Periodontol 1988; 15: 145- 155.
108. Roças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AFB, Uzeda M. Identification of selected putative oral pathogens in primary root canal infections associated with symptoms. Anaerobe 2002; 8: 200- 208.

109. Moore WEC, Moore LVH. Genus *Eubacterium* Prevot 1938. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2. Baltimore: Williams&Wilkins, 1986: 1353- 1373.
110. Willems A, Collins MD. Phylogenetic relationships of the genera *Acetobacterium* and *Eubacterium* sensu stricto and reclassification of *Eubacterium alactolyticum* as *Pseudoramibacter alactolyticus* gen. nov. comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1996; 46: 1083-1087.
111. Erandaç M. *Eubacterium*. Kitap: Cengiz AT, Mısırlıgil A, Aydın M (yazarlar), Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 2004; ss 609- 612.
112. Siqueira JF Jr, Roças IN. *Pseudoramibacter alactolyticus* in primary endodontic infections. J Endod 2003; 29: 735- 738.
113. George KS, Falkler WA Jr. Coaggregation studies of the *Eubacterium* species. Oral Microbiol Immunol 1992; 7: 285- 290.
114. Aydın M. *Candida* cinsi mantarlar (*C. albicans*) Kitap: Cengiz AT, Mısırlıgil A, Aydın M (yazarlar), Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 2004; ss 1109- 1117.
115. Çelikçioğlu N. *Candida* türleri. Kitap: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Yazarlar), Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2002; ss 2411- 2426.
116. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. Crit Rev Oral Biol Med 1994; 5: 125- 157.
117. 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- 329.
118. Field PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 80- 96.
119. Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. Periodontol 2000 1995; 7: 69- 82.
120. Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. J Periodont Res 2005; 40: 277- 285.
121. Siqueira JF Jr, Roças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. J Dent 2003; 31: 333- 339.

122. Röck F, Barsan N, Weimar U. Electronic nose: current status and future trends. *Chem Rev* 2008; 108: 705- 725.
123. [<http://www.gyte.edu.tr/ebulten/sayi9/makale1.htm>], Erişim tarihi 01 Şubat 2010.
124. James D, Scott SM, Zulfiquar A, O'Hare WT. Chemical sensors for electronic nose systems. *Microchimica Acta* 2005; 149: 1- 17.
125. Trihaas J, Vognsen L, Nielsen PV. Electronic nose: New tool in modelling the ripening of Danish blue cheese. *Int Dairy J* 2005; 15: 679- 691.
126. Brezmez J, Fructose MLL, Llobet E, Vilanova X, Recasens I, Orts J, Saiz G, Correig X. Evaluation of an Electronic Nose to Assess Fruit Ripeness. *IEEE Sens J* 2005; 5: 97- 108.
127. Brezmes J, Llobet E, Vilanova X, Saiz G, Correig X. Fruit ripeness monitoring using an Electronic Nose. *Sensor Actuat B-Chem* 2000; 69: 223- 229.
128. Pardo M, Niederjaufner G, Benussi G, Comini E, Faglia G, Sberveglieri G, Holmberg M, Lundstrom I, Data preprocessing enhances the classification of different brands of Espresso coffee with an electronic nose. *Sensor Actuat B-Chem* 2000; 69: 397- 403.
129. Pardo M, Sberveglieri G. Coffee analysis with an electronic nose. *IEEE T Instrum Meas* 2002; 51: 1334- 1339.
130. Pardo M, Sberveglieri G. Electronic nose for microbial quality classification of grains. *Elsevier Int J Food Microbiol* 1997; 35: 187- 193.
131. Evans P, Persaud KC, McNeish AS, Sneath RW, Hobson N, Magan N. Evaluation of a radial basis function neural network for the determination of wheat quality from electronic nose data *Sensor Actuat B-Chem* 2000; 69: 348- 358.
132. Martin YG, Pavon JL P, Cordero BM, Pinto CG. Classification of vegetable oils by linear discriminant analysis of Electronic Nose data. *Anal Chim Acta* 1999; 384: 83- 94.
133. Lozano J, Santos JP, Sayago I, Gutierrez J, Horrillo MC. Identification of typical wine aromas by means of an electronic nose. *IEEE Sens J* 2006; 6: 173- 178.
134. Dutta R, Hines EL, Gardner JW, Kashwan KR, Bhuyan M. Determination of tea quality by using a neural network based electronic nose. *IEEE Conference Proceedings* 2003; 1: 404- 409.
135. Bhattacharyya N, Tudu B, Bandyopadhyay R, Bhuyan M, Mudi R. Aroma characterization of orthodox black tea with electronic nose. *IEEE Conference Proceedings* 2004; 427- 430.

136. O'Connell M, Valdora G, Peltzer G, Negri RM. A practical approach for fish freshness determinations using a portable electronic nose. *Sensor Actuat B-Chem* 2001; 80: 49-154.
137. Blixt Y, Borch E. Using an electronic nose for determining the spoilage of vacuum packaged beef. *Int J Food Microbiol* 1999; 46: 123- 134.
138. Gardner JW, Shin HW, Hines EL, Dow CS. An electronic nose system for monitoring the quality of potable water *Sensor Actuat B-Chem* 2000; 69: 336- 341.
139. Stuetz RM, Fener RA, Engin G. Characterisation of wastewater using an electronic nose. *Water Res* 1999; 33: 442- 452.
140. Baby RE, Cabezas M, Walsöe de Reca EN. Electronic nose a useful tool for monitoring environmental contamination *Sensor Actuat B-Chem* 2000; 69: 214- 218.
141. Bender F, Barie N, Romoudis G, Voigt A, Rapp M. Development of a preconcentration unit for a SAW sensor micro array and its use for indoor air quality monitoring. *Sensor Actuat B-Chem* 2003; 7076: 1- 7.
142. Pavlou A.K, Magan N, McNulty C, Jones J.M, Sharp D, Brown J, Turner A.P.F. Use of an electronic nose system for diagnoses of urinary tract. *Biosens Bioelectron* 2002; 17: 893- 899.
143. Gardner J.W, Shin H.W, Hines E.L. An electronic nose system to diagnose illness. *Sensor Actuat B-Chem* 2000; 70: 19- 24.
144. Natale C.D, Macagnano A, Martinelli E, Paolesse R, D'Arcangelo G, Roscioni CA, Agro F, D'Amico A. Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosens Bioelectron* 2003; 18: 1209- 1218.
145. Lin Y.J, Guo H.R, Chang Y.H, Kao M.T, Wang H.H, Hong R.I. Application of the electronic nose for uremia diagnosis. *Sensor Actuat B-Chem B* 2001; 76: 177- 180.
146. Dutta R, Hines EL, Gardner JW, Boilot P. Bacteria classification using Cyranose 320 electronic nose. *BioMed Eng OnLine* 2002; 1; 1- 4.
147. Boilot P, Hines EL, Gardner JW, Pitt R, John S, Mitchell J, Morgan DW. Classification of bacteria responsible for ENT and eye infections using the Cyranose system. *IEEE Sens J* 2002; 2: 247- 253.
148. Shykhon ME, Morgan DW, Dutta R, Hines EL, Gardner JW. Clinical evaluation of the electronic nose in the diagnosis of ear, nose and throat infection: a preliminary study. *2004 J Laryngol Otol* 118; 706- 709.

149. Dutta R, Morgan D, Baker N, Gardner JW, Hines EL. Identification of *Staphylococcus aureus* infections in hospital environment: electronic nose based approach. *Sensor Actuat B-Chem* 2005; 109: 355- 362.
150. Gibson TD, Prosser O, Hulbert JN, Marshall RW, Corcoran P. Detection and simultaneous identification of microorganisms from headspace samples using an electronic nose. *Sensor Actuat B-Chem* 1997; 44: 413- 422.
151. McEntegart CM, Penrose WR, Strathmann S, Stetter JR. Detection and discrimination of coliform bacteria with gas sensor arrays. *Sensor Actuat B-Chem* 2000; 70: 170- 176.
152. Pavlou A, Turner APF, Magan N. Recognition of anaerobic bacterial isolates *in vitro* using electronic nose technology. *Lett Appl Microbiol* 2002; 35: 366- 369.
153. Tanaka M, Anguri H, Nonaka A, Kataoka K, Nagata H, Kita J, Shizukuishi S. Clinical assesment of oral malodor by the electronic nose system. *J Dent Res.* 2004; 83: 317- 21.
154. Nonaka A, Tanaka M, Anguri H, Nagata H, Kita J, Shizukuishi S. Clinical assesment of oral malodor intensity expressed as absolute value using an electronic nose. *Oral Dis* 2005; 11: 35- 36.
155. Yamada Y, Takahashi Y, Konishi K, Katsuumi I. Association of odor from from infected root canal analyzed by an electronic nose with isolated bacteria. *J Endod* 2007; 33: 1106- 1109.
156. Krepsi YP, Shrimel MG, Kacker A The relationship between oral malodor and volatile sulphur compound-producing bacteria. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 135: 671- 676.
157. Tonzetich J. Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. *J. Periodontol* 1977; 48: 13- 20.
158. Özdamar K. Paket programlar ile istatistiksel veri analizi. 5. Baskı. Kaan kitabevi, Eskişehir, 2004; ss 355- 415.
159. Burges C JC. A Tutorial on Support Vector Machines for Pattern Recognition. *Data Mining and Knowledge Discovery Kluwer Academic Publishers, Boston.* 1998; 2: 121- 167
160. Özkaya AU, Kaya ME, Gürgen F. Destek vektör makineleri kullanılarak aritmi sınıflandırması. İstanbul BİYOMUT 2005, National Symposium on Biomedical Engineering
161. Hazamçebi C, Kutay F. Yapay sinir aglar ile Türkiye elektrik enerjisi tüketiminin 2010 yılına kadar tahmini. *Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi* 2004; 19: 227- 233.

162. Haykin S. Neural Network; A Comprehensive Foundation. 2nd ed. Prentice Hall, Newyork 1999; pp 278- 340.
163. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985; 1: 170- 175.
164. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55: 307- 312.
165. Dalton BC, Orstavik D, Philips C et al. Bacterial reduction with nickel- titanium rotary instrumentation. *J Endod* 1998; 24: 763- 767.
166. Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A et al. Reduction of intracanal bacteria using nickel- titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 2000; 26: 715- 715.
167. Card SJ, Sigurdsson A, Orstavik D et al. The effectiveness of increased apical enlargement in reducing intracanal bacteria. *J Endod* 2002; 28: 779- 783.
168. Bozkurt H. Mikroorganizmaların üretilmeleri için besiyerleri ve diğer ortamlar Kitap: Cengiz AT, Mısırlıgil A, Aydın M (yazarlar), Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 2004; ss 79- 84.
169. Sixou M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy *Oral Dis* 2003; 1: 54- 62.
170. Siquera Jr JF, Roças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1- current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod* 2005; 31: 411- 423.
171. Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Rutkunas V. Microorganisms in root canal infections. *Stomatologija* 2008; 10: 4- 9.
172. Von Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 1997; 21: 213–229.
173. Neiders M, Brigitte R. Operation of bad breath clinics. *Proceedings of the Third International Conference on Breath Odor. Quintessence Int* 1999; 30: 295- 301.
174. Mohamed EI, Linder R, Perriello G et al. Predicting type 2 diabetes using an electronic nose- based artificial neural network analysis. *Diabetes Nutr Metab* 2002; 15: 215- 221.

175. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus Faecalis* in previously root filled canals in a Lithuanian population. J Endod 2000; 26: 593- 595.
176. Çoğulu D, Uzel A, Onçağ O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008; 106: 443- 449.
177. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. J Dent Res 2002; 81: 761- 766.
178. Siqueira JF Jr, Roças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 92: 451- 457.
179. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. J Clin Microbiol. 2001; 39: 3282- 3289.
180. Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO, Olsen I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. Endod Dent Traumatol 2000; 16: 191- 196.
181. Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Observation of *Saccharomyces cerevisiae* in blood of patient undergoing root canal treatment. Int Endod J 1997; 30: 313- 317.
182. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. Oral Microbiol Immunol 2001; 16: 100- 105.
183. Siqueira JF Jr, Roças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 93: 174- 178.
184. Şen BH, Pişkin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. Endod Dent Traumatol 1995; 11: 6- 9.
185. Sjögren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. J Endod 1990; 16: 498- 504.
186. Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. Int Endod J 1997; 30: 91- 95.
187. Safavi KE, Spanberg LS, Longeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. J Endod 1990; 16: 207- 210.

188. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiol Immunol 2005; 20: 211- 215.
189. Sundqvist G, Johansson E. Neutrophil chemotaxis induced by anaerobic bacteria from necrotic dental pulps. Scand J Dent 1980; 88: 113- 121.
190. Claesson R, Edlund MB, Persson S, Carlsson J. Production of volatile sulfur compounds by various *Fusobacterium* species. Oral Microbiol Immunol 1990; 5: 137- 142.
191. Lai SY, Deffenderfer OF, Hanson W, Philips MP, Thaler ER. Identification of upper respiratory bacterial pathogens with the electronic nose. The Laryngoscope 2002; 112: 975- 979.
192. Dutta R, Das A, Stocks NG, Morgan D. Stochastic resonance-based electronic nose: A novel way to classify bacteria. Sensor Actuat B-Chem 2006; 115; 17- 27.
193. Dutta R, Dutta R. "Maximum probability rule" based classification of MRSA infections in hospital environment: Using electronic nose. Sensor Actuat B-Chem 2006; 120; 156- 165.
194. Dutta R, Dutta R. Intelligent Bayes Classifier (IBC) for ENT infection classification in hospital environment. Biomed. Eng. Online. 2006; 5; 65- 81.
195. Moens M, Smet A, Naudts B et al. Fast identification of ten clinically important micro-organisms using an electronic nose. Lett Appl Microbiol 2006; 42: 121- 126.
196. Gardner JW, Craven M, Dow C, Hines EL. The prediction of bacteria type and culture growth phase by an electronic nose with a multi-layer perceptron network. Meas. Sci. Technol. 1998; 9; 120- 127.
197. Yates JWT et al. Data reduction in headspace analysis of blood and urine samples for robust bacterial identification Comput Met Prog Bio 2005; 79: 259- 271.
198. Türk BT, Şen BH, Öztürk T. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod 2009; 108: 297- 301.
199. Tirali RE, Turan Y, Akal N, Karahan ZC. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod 2009; 108: e117- e120.