T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AGRESİF PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASI PERİODONTAL PATOJEN PROFİLİ

Niyazi DÜNDAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Konya, 2008

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AGRESİF PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASI PERİODONTAL PATOJEN PROFİLİ

Niyazi DÜNDAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Bu tez 26/02/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf DURAK	Prof. Dr. Ali ATEŞ	Yrd.Doç Dr. Erdoğan Eşref HAKKI
(Danışman)	(Üye)	(Üye)

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

AGRESİF PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASI PERİODONTAL PATOJEN PROFİLİ

Niyazi DÜNDAR

Selçuk Ünüversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

I.Danışman: Prof.Dr. Yusuf DURAK
II. Danışman: Doç. Dr. Sema S. HAKKI
2008, 54 sayfa

Jüri : Prof.Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Ali ATEŞ
Yrd.Doç Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

Bu çalışmada; Agresif periodontitisli (AP) hastalarda, periodontal tedavi öncesi patojen bakteri profili çıkarılmış, tedavi sonrası 1. ve 3. aylarda profildeki değişiklikler izlenmiş ve bakteriyell rekolonizasyon değerlendirilmiştir.

Bu çalışma Agresif periodontitisli (AP=10), Gingivitisli (G=10) ve Sağlıklı (S=10) toplam 30 kişi üzerinde yapılmıştır. Periodontopatojenler *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yöntemi ile araştırılmış ve elde edilen sonuçlar Real-time PCR ile doğrulanmaya çalışılmıştır.

Başlangıçta alınan subgingival plak örneklerinde; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia ve*

Treponema denticola bakteri suşları sıra ile %70, %70, %100 ve %40 oranında tespit edilmiştir. *P. gingivalis* pozitif yedi hastanın, üçünde tip I *fimA* ve dördünde tip II *fimA* belirlenmiştir.

Faz I periodontal tedavi sonrası 1. ayda periodontopatojenlerde yüksek oranda azalma gözlenirken, 3. ayda periodontopatojenlerin rekolonizasyon gösterdiği izlenmiştir. AP hastaların idame fazında düzenli takip edilmeleri ve ilave kemoterapinin de düşünülmesi sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Agresif periodontitis, *P. gingivalis, T. forsythia, A. actinomycetemcomitans, T. denticola,* PCR.

ABSTRACT
Master Thesis

PERIODONTAL PATHOGENE PROFILE OF PATIENTS

WITH AGGRESSIVE PERIODONTITIS

BEFORE AND AFTER THE TREATMENT

Niyazi DÜNDAR

Selcuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Yusuf DURAK
Co-supervisor: Assoc.Prof.Dr. Sema S. HAKKI
2008, 54 Page

Juriy : Prof.Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Ali ATEŞ
Assist. Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

In this study; pathogen profile of aggressive periodontitis patients were investigated before the treatment, and the alterations of this profile between 1th and 3th months were monitored and bacterial recolonisation was evaluated.

This study, was performed on totally 30 patients including Aggressive periodontitis (AP=10), Gingivitis (G=10) and periodontally healthy (S=10) individuals. Periodontopathogens were investigated by *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method and the results were verified by Real-time PCR.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* bacterial species were determined in

the pre-treatment subgingival plaque samples in the portions of 70%, 70%, 100% and 40%, respectively. Among the seven patients having *P. gingivalis* positive; it was determined that three had type I *fimA* and four type II *fimA*.

A reduction of periodontopathogens was observed at the 1th month after phase I treatment. However, comparing the 1th month, an increase of bacteria were observed at the 3th month after the phase I treatment. A regular follow-up is necessary for AP patients and additional chemotherapy may be considered in AP patients.

Key Words: Aggressive periodontitis, *P. gingivalis, T. forsythia, A. actinomycetemcomitans, T. denticola,* PCR.

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2006-2008 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmada Agresif Peridontitisli hastalarda tedavi öncesi ve sonrası Peridondal patojen profilinin çıkarılması ve tedavinin ne kadar başarılı olduğu araştırılmıştır. Laboratuar çalışmaları S.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışma konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren danışmanlarım sayın Prof. Dr. Yusuf DURAK (S.Ü. Fen-Edb. Fak.) ve Doç. Dr. Sema S. HAKKI'ya (S.Ü. Diş Hek. Fak.), hastaların tedavilerini ve plak örneklemelerini gerçekleştiren Arş. Gör. Emre YAPRAK'a (S.Ü. Diş Hek. Fak.), PCR Amplifikasyon koşullarını ayarlamada yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Uğur ARSLAN'a (S.Ü. Meram Tıp Fak.), çalışmalarım boyunca bana sürekli destek olan sevgili eşim ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı 06201072 nolu proje ile destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Niyazi DÜNDAR
2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET ---------- iii

ABSRACT ---------- v

ÖNSÖZ ---------- vii

İÇİNDEKİLER ---------- viii

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ ---------- x

SİMGELER VE KISALTMALAR ---------- xi

1. GİRİŞ ---------- 1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI ---------- 4

3. MATERYAL ve METOT ---------- 16

3.1. MATERYAL ---------- 16

3.1.1. Tamponlar, Çözeltiler ve Enzim ---------- 16

3.2. METOT ---------- 18

3.2.1. Çalışma Grubu ---------- 18

3.2.2. Örnek Alınacak Dişlerin Tespiti ve Örneklerin Alınması --------- 18

3.2.3. Kontrol Gurubu ---------- 19

3.2.4. Örnek Alım Periyodu ---------- 19

3.3. PCR İçin DNA İzolasyonu ---------- 20

3.3.1. PCR İşlemi İçin 50µl Hacimde Bulunan Maddeler---------- 21

3.4. Çalışmada Araştırılan Bakteriler ---------- 22

3.5. Kullanılan Primer Dizilimleri ve PCR Amplifikasyon koşulları ------- 22

3.5.1. *Porphyromonas gingivalis* ---------- 22

3.5.2. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ---------- 23

3.5.3. *Tanneralla forsythia (Bacteroides forsythus)* ---------- 23

3.5.4**.** *Treponema denticola* ---------- 24

3.6. PCR Ürününün Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi ---------- 24

3.7. Reel-time PCR Çalışması ---------- 29

3.7.1. Real-time PCR için DNA İzolasyonu ---------- 29

3.7.2. Real-time PCR işlemi için 20µl hacimde bulunan maddeler ----- 30

3.8. Real-time PCR Yöntemi İle İncelenen Bakteri Suşları ---------- 31

3.9. Primer, Prob Dizilimi (P) ve RT-PCR Amplifikasyon Koşulları -------- 30

3.9.1. *Porphyromonas gingivalis* ---------- 31

3.9.2. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ---------- 31

3.9.3. Real-time PCR Amplifikasyon Koşulları ve Sonuç Görüntüleri -- 32

4. ARAŞTIRMA (veya DENEY) SONUÇLARI ---------- 33

5. TARTIŞMA ---------- 37

6. SONUÇ VE ÖNERİLER ---------- 45

7. KAYNAKLAR ---------- 47

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.2.4. Örnekleme zaman periyodu ---------- 19

Şekil 3.1.3. Thermal Cycler PCR ---------- 21

Şekil 3.6.1. Jel dökülmesi ve tarakların konulması ---------- 25

Şekil 3.6.2. Parafin üzerinde karıştırma ve jele yükleme ---------- 25

Şekil 3.6.3. UVP Bio lmaging Systems ---------- 26

Şekil 3.6.4. PCR ile incelenen örneklerde belirlenen *A. actinomycetemcomitans*'ın jel görüntüsü ---------- 26

Şekil 3.6.5. PCR ile incelenen örneklerde belirlenen *T. forsythia*'nın jel görüntüsü 27

Şekil 3.6.6. PCR ile incelenen örneklerde belirlenen *P. gingivalis*'in jel görüntüsü 27

Şekil 3.6.7. PCR ile incelenen örneklerde belirlenen *P. gingivalis* tipI *fimA*'nın jel görüntüsü ---------- 28

Şekil 3.6.8. PCR ile incelenen örneklerde belirlenen *P. gingivalis* tipII *fimA*'nın jel görüntüsü ---------- 28

Şekil 3.7.1. Nano Drop® Spectrophotometer ---------- 30

Şekil 3.9.1. Ligt Cycler 2.0 Roche ---------- 31

Şekil 3.9.2. *A. actinomycetemcomitans* sonuç ekran görüntüsü ---------- 32

Şekil 3.9.3. *Porphyromonas gingivalis* sonuç ekran görüntüsü ---------- 32

Çizelge 4.1. AP hasta örneklerinde PCR ile belirlenen bakteri suş sayıları ve % oranları ---------- 33

Çizelge 4.2. Gingivitis ve Sağlıklı bireylerden örneklerde PCR ile belirlenen bakteri suş sayıları ve % oranları ---------- 34

Çizelge 4.3. İncelen hasta örneklerinde Real-time PCR yöntemi ile *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis* bakterisuş sayıları ve % aranları -------- 35

Çizelge 4.4. Real-time PCR yöntemi ile Gingivitis'li ve Sağlıklı bireylerde bakteri suş sayıları ve % oranları ---------- 35

SİMGELER VE KISALTMALAR

^{o}C ……. santigrad derece

dH_2O ……. distile su

g ……... gram

kDa …….. kilodalton

l …… litre

mg ……..... miligram

ml ……. mililitre

mM ……... milimolar

µg ……...……. mikrogram

µl ……. mikrolitre

M …….. molar

pmol …….. pikomol

rpm ……... dakikadaki devir sayısı

V…….Volt

GİRİŞ

Periodontitis; dişeti, periodontal ligament, alveoler kemik ve sementten oluşan periodonsiyumun kaybıyla karakterize enfeksiyöz bir hastalıktır. Şiddetli periodontal hastalıklar, periodontal ataçmanın ve dişlerin kaybedilmesinin en önemli nedenleri arasındadır (Flemmig 1999).

Gingivitis, diş etinde enflamasyon ve/veya kanama ile birlikte izlenen ve sadece diş eti ile sınırlı olan bir periodontal hastalıktır. Periodontitis, diş etinin enflamatuar hastalığı olan gingivitisin devamı olarak meydana gelir. Periodontitisi gingivitisten ayıran en önemli özellik, periodontal ataçman kaybı ve alveoler kemik yıkımıdır. Etiyolojisinde primer ajan olarak; diş ve protez gibi sert yapılar üzerine yerleşmiş, bir ekstrasellüler matriks yapı içerisinde yer alan bakteri kümesi olan dental plak kabul edilmiştir. Özel olarak steril ortamlarda üretilen hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda periodontitisin gelişmediği saptanmıştır. Bununla birlikte, klinik gözlemler ve yapılan çalışmalar her bireyin plak birikimine karşı aynı cevabı vermediğini göstermiştir. Ağız hijyeninin sağlanmadığı bazı bireylerde periodontal hastalığın çok yavaş ilerlemesine karşın, plak yoğunluğunun daha az olduğu pek çok bireyde şiddetli periodontal hastalıkların görüldüğü rapor edilmiştir (Flemmig 1999, Haake 1996).

Oluşan yıkımın tipine ve hızına göre periodontitis değişik şekillerde sınıflandırılmıştır. Kronik periodontitis, genelde yavaş ilerleyen ve daha az şiddette yıkımın oluştuğu bir periodontitis tipidir. Kronik periodontitisteki yıkımın şiddeti mevcut plak ve eklenti miktarı ile doğru orantılıdır. Agresif periodontitis (AP) ise hızlı ilerleyen ve daha şiddetli kemik kayıplarının gözlendiği bir periodontal hastalıktır. Kronik periodontitisin aksine agresif periodontitisteki yıkım derecesi plak

ve eklenti miktarı ile ilişkili değildir. Etiyolojisinde çeşitli periodontal patojen bakterilerin baskın rol oynadığı bilinmektedir. Bakterilerce oluşturulan ürünler ve özellikle bu bakterilere ve ürünlerine karşı oluşan konak cevabı, AP'de oluşan yıkımın ana sebebidir (Löe ve ark 1986).

Diş eti hastalığının erken dönemde tedavisi, dişler üzerindeki eklentilerin (plak ve diş taşı) uzaklaştırılmasını kapsayan diş yüzeyi temizliği, bireysel oral hijyenin geliştirilmesi ve kök yüzeyi düzleştirilmesi işlemlerinden ibarettir. Bu işlem diş etinde iltihaba neden olan bakteri ve irritanların uzaklaştırılmasını sağlar. Genellikle bu tedavi, diş etinin tekrar dişe adaptasyonu veya diş etinin büzülerek cebin elimine olması için yeterlidir. Diş eti hastalığının erken döneminde vakaların çoğunluğunda, diş taşı temizliği, plağın uzaklaştırılması ve kök yüzeyinin düzleştirilmesini takiben günlük etkin ağız bakımı başarılı bir tedavi için yeterlidir. Çok ilerlemiş vakalar cerrahi tedaviyi gerektirebilir. Bu tedavinin amacı, dişleri çevreleyen derin periodontal ceplerdeki diş taşlarını temizlemek, cebin büzülerek eliminasyonunu ve kök yüzeyinin düzleştirilmesini sağlamak ve daha kolay temizlenebilir bir diş eti formu oluşturmaktır. AP hastalarında tek başına diş ve kök yüzey temizliği tedavileri (cerrahi olmayan tedavi) yeterli olmamaktadır. Bu nedenle AP'li hastaların periodontal ceplerinden elde edilen mikro organizmalara yönelik kemoterapi uygulaması, tedavinin etkinliğini artırmaktadır. Çünkü plaktan izole edilen mikroorganizmalar sadece plakta degil dişte ve kemikte de izlenebilmektedir. (Kornman 2003, Nunn 2003).

Periodontal tedavi sonrası hastaların düzenli olarak diş hekimi tarafından muayene edilmesi, plak kontrolü ve yeni diş taşı birikimlerinin ortamdan uzaklaştırılması gereklidir. Fakat unutmamak gerekir ki; periodontal tedavi ile elde

edilenlerin sürdürülmesi için hiçbir işlem kişinin günlük ağız bakımı işlemlerini etkin bir şekilde uygulamasından daha yararlı olamaz.

Bu çalışmada; periodontopatojenlerin profili ve tedavi sonrası rekolonizasyon durumunu PCR ve Real-time PCR yöntemleri ile araştırmak ve elde edilen bulgular ışığında tedavi ile ilgili öneriler sunmaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Periodontopatojenleri tanımlamada, çok çeşitli moleküler metotlar kullanılmaktadır. Moleküler metotların çoğu, mikroorganizmaları tanımlamak için kültüre alınmalarına gerek duymadan, ribozomal RNA genleri başta olmak üzere, varlığı gösterilmek istenen bakteriyel patojenin özgül DNA dizilerinin saptanmasına dayanır. 16S rRNA geni tüm bakterilerde bulunmaktadır. 16S rDNA'nın tüm bakteriler için aynı olan bazı bölgeleri bulunurken, bir türden diğerine değişim gösteren dizileri de bulunmaktadır. Bunlar mikroorganizma türlerinin tanımlanmasında ve ayrılmasında rol oynar (Baumgartner ve ark, 2006).

Mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla kullanılan genotip tabanlı moleküler mikrobiyolojik yöntemlerden günümüzde en popüler olanı, 16S ribozomal RNA genlerindeki özel bölgelerinin çoğaltıldığı 'Polimeraz Zincir Reaksiyonu' (PCR) dur. 1983 yılında Kary Mullis tarafından ilk kez bilim dünyasına sunulan Polimeraz Zincir Reaksiyonu, modern bilimi tamamen değiştirmiştir. Kary Mullis bu buluşundan dolayı 1993 yılında Nobel Kimya Ödülünü kazanmıştır (Siqueira ve Roças 2003).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (*Polymerase Chain Reaction*-PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün milyonlarca kopyasını kısa zamanda elde eden bir tekniktir. Bu teknikte tek bir gen bölgesi çoğaltılabileceği gibi, genin sadece bir parçası da çoğaltılabilir. PCR ile genellikle 10 kilobaz (kb) uzunluğa kadar DNA bölgeleri çoğaltılabilmektedir, ancak bazı metotlarla bu uzunluk 40 kb'a kadar ulaşabilmektedir. Metot basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun kosullarda çoğaltılması esasına dayanır (Tompkins 1992). PCR yaygın olarak tıbbi ve biyolojik

araştırma laboratuvarlarında kalıtsal hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, babalık testi ve DNA hesaplaması gibi değişik konularda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Schluger ve Rom 1995).

PCR yöntemine dayalı birçok primer olarak adlandırılan başlatıcı DNA teknikleri geliştirilmiştir. Bu başlatıcı DNA'lar belli dizilere sahip ve sentetik olarak üretilebilen moleküllerdir. PCR'a dayalı *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPDs), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Microsatellites* veya *Simple Sequence Repeats* (SSRs) ve *Analysis of Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) gibi markör teknikleri geliştirilmiştir. Bu teknikler birçok bitki ve hayvanda genetik akrabalığın teşhisinde türiçi ve türler arasında kullanılmaktadır (Stuber 1992, Reiter ve ark, 1993).

Klasik PCR hedef DNA dizisinin her iki ucuna özgü spesifik primerler kullanılarak termostabil DNA polimeraz yardımıyla uygulanan PCR çeşididir. Tipik bir PCR üç temel basamakta gerçekleşir. Denatürasyon (ayrılma), ilk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır. Çoğunlukla 94°C-97°C arasında 15-60 saniye süresince uygulanır. Annealing (bağlanma), denatürasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 47°C-60°C arasında 30-60 saniyede gerçekleşir (G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısısı 68°C'ye kadar arttırılabilir). Elongasyon (uzama), son aşamada ısı 72 °C'ye kadar arttırılarak, DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre, 30 saniye ile 3 dakika

arasında değişir. Termal siklusun bu üç basamağı her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar. Oluşan ürün; ilk koyulan DNA miktarı ve döngü sayısına bağlıdır, 25-40 döngü uygulanır. Bu basamaklar her tekrarlandığında deney tüpündeki kalıp DNA miktarı hedeflenen DNA bölgesinde 2^n miktarınca artar. Örneğin PCR işlemine 35 kez tekrar edildiğinde deney tüpündeki bir adet kalıp DNA işlem sonunda 2^{35} adet olacaktır (Griffiths ve ark, 2002).

Real-time Reverse Transcription (RT)-PCR

Başlangıç miktarına göre oluşan, son PCR ürününün kuantifikasyonunun özgün, hassas ve diğer metotlara göre daha kolay tespit edilebildiği bir yöntemdir (Freeman 1999**,** Raeymaekers 2000). Bu yöntemde; her bir PCR döngüsünde oluşan flouresan ışınımı aracılığı ile son ürün miktarı tespit edilebilir (eş zamanlı olarak) (Higuchi 1992**,** Higuchi 1993). Reaksiyon bazı sistemlerde real time=eş zamanlı olarak izlenebilir. Real-time PCR de oluşan fragmentin (amplicon) uzunluğu araştırılamaz, böylelikle DNA ve cDNA ayrımı yapılamaz. Real-time PCR bizi klasik PCR sonrası yapılması zorunlu diğer değerlendirme çalışmalarından da kurtarır (jel elektroforez gibi). Bu, doğruluğu arttırdığı gibi kontaminasyon riskini de azaltır. Klasik PCR yöntemleriyle karşılaştırıldığında 10^7 kat daha güvenilirdir. Geniş bir uygulama alanı, özgünlük ve doğru kuantifikasyon imkanı sunar. Real-time PCR sisteminin temelini flouresan reporter moleküllerinin ışınımlarının tespiti ve miktarının belirlenmesi (kuantifikasyon) oluşturur (Lee 1993**,** Livak 1995). Sinyal artışı PCR ürün artışıyla direkt orantılıdır. Her bir PCR döngüsündeki flouresan ışınımının kaydedilmesi ile, başlangıçtan itibaren üstel fazda ürün artışına hangi noktada ulaşıldığı, eş zamanlı (real time) izlenebilir. Nükleik asit hedef molekülünün çok sayıdaki kopyasının oluşturulabildiği sırada, artan miktarda flouresan ışınım

gözlenir. Ölçülebilir ışınım 3-15 döngüde oluşur. Önemli artışı işaret eden eşik değer kullanıcı tarafından ayarlanabilir. C T (Threshold Cycle) parametresi; tespit edilen flouresan ışınım, eşik değerinin aşıldığı döngü sayısını belirtir. DNA amplifikasyonunu belirlemek için üç değişik flouresan gözlem sistemi kullanılır (Wittwer 1997).

Bu PCR çeşidinde öcelikle bir reverse transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır. DNA primeri genellikle dT oligonükleotidi içerir (sadece hexamer yapıda thymidine nükleotidi) veya bir spesifik primerdir. Oligod T messenger RNA' nın 3' ucundaki poli A kuyruğuna bağlanır. Oligo primeri tüm RNA çeşitlerinde bulunmakla birlikte dezavantajı 25°C'de hibridize olması ve ortamda RNase inhibitörü bulunmaz ise çabuk bozulmasıdır. Reverse transcription ve PCR amplifikasyonu bir veya iki aşamada uygulanabilir. Ayrı ayrı iki aşama halinde uygulanan RT-PCR daha hassas; tek aşamalı ise daha az kontaminasyon riski taşır (çünkü tüp transkripsiyondan sonra açılmamaktadır). Hangi yöntemin kullanılacağının belirlenmesi bizim hassasiyet mi yoksa kontaminasyondan kaçınmak mı istediğimize bağlıdır. Bir veya iki aşamalı reaksiyon seçimi ve daha sonraki amplikasyonlara göre enzim seçilir. Tem transkriptaz enzimi, RNA'dan komplementer DNA sentezinde kullanılır. Tek zincirli DNA molekülünden karşı zinciri sentezlenir ve daha sonra PCR döngüsü başlar (Espy ve ark, 2006).

TaqMan® real-time PCR kuantifikasyonu, PCR aşamasında üç çift primer kullanılır. 1. ve 2. primerler her bir DNA iplikciği üzerinden replikasyonu başlatır. 3. (prob) ise aralarından bir zincire bağlanır. Prob, iki modifiye edilmiş baz içerir; 5' ucunda bulunan floresan reporter (R) ve 3'ucundaki floresan quencer (Q). Replikasyon esnasında 1. primer yönünde uzayan DNA iplikciği, probun 5'ucunu

zincirden ayırır ve polimerazın eksonükleaz aktivitesi floresan reporter molekülünü prob'dan ayırır. Qencerden ayrılan reporter molekülü floresan ışıma yapar. Oluşan floresan ışınımın başlangıç miktarına göre oranı, her bir PCR döngüsünde ölçülür (Heid ve ark, 1996).

Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifiye edilen PCR ürünleri değişik yöntemlerle belirlenebilir. En yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezidir. PCR ile elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektrik alanında büyüklüğüne göre ayrılır. Agaroz jelde DNA bantlarının görülebilmesi için PCR ürünlerinin flouresan bir boyayla (Ethidium bromid) muamele edilmesi gerekir. Ethidium bromid'le boyanan DNA bantları ultraviyole (UV) transilliminatör veya epilliminatör ışığı altında görünür hale gelir. Beklenen PCR ürünlerinin varlığı DNA molekül ağırlık standartları (DNA markörü) veya pozitif kontroldeki bant büyüklüğü ile karşılaştırılarak belirlenir (Voytas 2001).

Periodontitis

Periodontitis; Amerikan Periodontoloji Akademisi (AAP) tarafından 1999 yılında yapılan sınıflandırmada, kronik periodontitis (KP), agresif periodontitis (AP) ve sistemik hastalığa bağlı olarak gelişen periodontitis olarak sınıflara ayrılmıştır (Armitage 1999).

Miller tarafından ortaya atılan "non-spesifik plak hipotezi" ne göre dental plak içerisinde bulunan tüm mikroorganizmaların eşit şekilde periodontal hastalığa sebep olabildiği ve periodontitisin dental plak ve eklenti miktarının artışı ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Gold 1985). Bu hipoteze göre vücut az miktardaki plaktan salınan zararlı ürünlere karşı koyabilmekte, plak miktarı ve buna bağlı olarak ortaya çıkan zararlı ürünler arttıkça vücut savunması yetersiz kalmakta ve periodontal hastalık

gelişmektedir. Ancak, yapılan klinik gözlemler, bu sonuçları doğrulamamıştır. Öncelikle ağzında diştaşı ve mikrobiyal dental plak yoğunluğu fazla olan bazı bireylerde gingivitisin periodontitise dönüşmediği gözlenmiştir. Ayrıca, periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde periodontal hastalığın şiddeti ağzın her yerinde aynı değildir; bazı bölgelerde şiddetli ataçman kaybı gözlenirken, bazı bölgeler hastalıktan etkilenmeyebilir. Bu bulgular, mikrobiyal dental plağın değişik patojenik potansiyelleri olabileceğini düşündürmüştür. Walter Loesche 1976 yılında "spesifik plak hipotezi"ni ortaya atmıştır. Bu hipotez plağın patojenitesinin içinde bulunan birtakım spesifik mikroorganizmaların varlığına ve bunların virülans faktörlerine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Socransky ve Haffajee 2003).

Periodontal hastalıkların başlaması ve ilerlemesinde primer etiyolojik ajan olarak kabul edilen, mikrobiyal dental plakta 700'den fazla farklı türde mikroorganizma bulunduğu bildirilmiştir (Howard ve ark, 2007).

Dental plağın gelişimi üç safhada incelenmektedir; dental pelikılın oluşması plak oluşumunun ilk safhasını oluşturmaktadır. Temizlendikten hemen sonra ağız içindeki tüm yapılar, tükrük kökenli glikoprotein içerikli pelikıl ile kaplanmaya başlar. Yumuşak dokular sürekli alttan gelen yeni dokularla yenilendikleri ve yüzey kısımları döküldüğü için, bakteriler yoğun bir kolonizasyon gösteremezler. Fakat diş yüzeylerinde böyle bir yenilenme söz konusu olmadığı için pelikıl bakterilerin tutunacağı ve mikrobiyal dental plağı oluşturmak üzere çoğalacakları bir yapı görevi görmektedir. İkinci aşama bakterilerin diş yüzeyinde kolonize olmaya başladıkları "başlangıç kolonizasyonu" sürecidir. Birkaç saat içinde bakteriler dental pelikıl içinde belirir. Bunlar genellikle *Actinomyces viscosus, Streptococcus sangius* gibi gram-pozitif, fakültatif bakterilerdir. Zamanla bakterilerin sayı ve çeşitleri artar ve

bir biyofilm haline gelirler. Biyofilm diş yüzeyinde polisakkarit bir matriks içerisinde, pek çok bakterinin birlikte bulunduğu ve yaşadığı yapı olarak tarif edilebilir. Bu biyofilmde başlangıçta gram-pozitif aerob bir flora baskınken zamanla gram-negatif anaerob bir flora üstünlük kazanır. Plak gelişiminin son safhasını ise "sekonder kolonizasyon" ve plak olgunlaşması oluşturur. İkincil yığılımı oluşturan türler pelikıl yüzeyine tutunamayan ancak pelikılda bulunan diğer bakterilere tutunabilen *P. gingivalis, F. nucleatum, P. intermedia* gibi türlerdir. Bakterilerin bu şekilde birbirine tutunmasına "koagregasyon" ismi verilmiştir (Carranza ve ark, 2002).

Bir bakterinin hastalığa neden olmasına imkan sağlayan özelliklerine "virulans faktörleri" denilmektedir. Bu özellikler bakterinin yığılımını, konağa girişini, yayılmasını, konaktan kaçışını ve bakterinin konak dokularında direkt ve indirekt olarak hasar oluşturabilmesini sağlar (Haake 1996).

Sağlıklı bir periodonsiyumda denge halinde bulunan mikrobiyolojik ve konağa ait faktörler, bakterilerin sayı veya çeşitliliğindeki değişimler veya konağın savunmasında ortaya çıkan birtakım sorunlar nedeni ile bakteriler lehine bozulmakta ve periodontal doku yıkımı ile sonuçlanmaktadır (Listgarten 1985).

Periodontal hastalığın gelişimi ile birlikte, periodontal dokularda patolojik değişimler başlar. Öncelikle dişeti kenarında mikrobiyolojik birikim ile enflamasyon gelişir. Ortalama, 4-7 gün içerisinde bağdokusundaki kollajenin yaklaşık olarak %70'i yıkılır (Carranza ve ark, 2002).

Plak birikiminden sonra her zaman gingivitis gelişmektedir, periodontitis gelişimininde birinci aşama gingivitis oluşumudur; fakat her gingivitis periodontitise dönüşmez ve yıllarca ataçman kaybı gözlenmeden gingivitis aşamasında kalabilir.

Gingivitis periodontal hastalığın erken dönemidir. Bu dönemde dişetleri kanamalı, kırmızı ve hacim olarak büyümüştür. Erken dönemde çok fazla rahatsızlık vermeyebilir. Tedavi edilmezse hastalık periodontitise ilerleyerek dişleri destekleyen alveol kemiğinde geriye dönüşsüz hasar oluşturabilir. Klinik gözlemler benzer düzeydeki plak miktarına tüm bireylerin benzer cevaplar vermediğini ortaya koymuştur. Plak birikiminin çok az olmasına karşın şiddetli periodontitis teşhisi konulan bireyler olduğu gibi, yoğun plak ve eklenti olmasına rağmen çok az ataçman kaybı gözlenen bireyler de mevcuttur (Löe ve ark, 1986).

Löe ve ark. (1986), ağız hijyeni alışkanlığı bulunmayan ve benzer miktarda plak ve diş taşı bulunduran 14-46 yaşları arası Sri Lankalı erkekleri 15 yıl boyunca takip etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda hastalığın sabit bir hızda ilerlemediği, %8'lik bir grupta yılda 0.1-1 mm ataçman kaybı olduğu gözlenmiş ve hastalığın hızlı ilerlediği grup olarak tanımlanmış, %81'inin yılda yaklaşık olarak 0.05-0.5 mm ataşman kaybı gösterdiği görülmüş ve bu grup da hastalığın orta hızda ilerlediği grup olarak tanımlanmıştır. Kalan %11'lik bir kısmın ise yılda sadece ortalama 0.05-0.09 mm ataçman kaybı gösterdiği saptanmış ve hastalığın ilerlemediği grup olarak belirlenmiştir. Bu farklılıklarda genetik yatkınlıkların önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Tatakis ve ark, 2004).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

A. actinomycetemcomitans gram(-), hareketsiz, sporsuz, sakkarolitik (şekeri parçalayan), kapnofilik (CO_2'ye ihtiyaç duyması), 0.5-1.0 μm. çapında, kenarları hafif düzensiz, dışbükey, parlak şekilde görülen kanlı agar besiyerinde yüzeye sıkı şekilde tutunmuş merkezde yıldız şeklinde kolonize olan mikroorganizmadır (Zambon 1985).

A. actinomycetemcomitans'ın virülans faktörleri endotoksin (lipopolisakkarit), lökotoksin, fimbria (pili), kollejenaz, fibroblast inhibe eden faktör, tripsin bezeri proteolitik enzimlerdir. *A. actinomycetemcomitans*'ın dış membrandaki lipopolisakkaritin "O" yan zincirindeki yüzey polisakkaritlerinin lokalizasyonuna göre 6 farklı serotipi (serotip a-f) bulunmaktadır (Mekalanos 1992).

A. actinomycetemcomitans'ın tüm serotiplerinde hücre yüzeylerinden salınan 64 kDa ağırlığında antijenik GroEL proteini (heat shock protein) üretilir. GroEL proteininin osteoklastları aktive ederek kemik rezorpsiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Kirby ve ark, 1995). Düşük seviyedeki GroEL proteini (0.4-1.0 Jg/mL) epitel hücre proliferasyonunu indüklerken, yüksek seviyelerde sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Goulhen ve ark, 1998).

Porphyromonas gingivalis

Önceden *Bacteroides gingivalis* olarak adlandırılan *P. gingivalis* gram (-), sporsuz, hareketsiz, asakkarolitik, zorunlu anaerob, kanlı agar besiyerinde kahverengiden siyaha kadar giden renkte koloni oluşturan, kokobasil şeklinde mikroorganizmadır (Richard ve ark 1998)

P. gingivalis'in virülans faktörleri; kapsül, endotoksin (lipopolisakkarit), fimbria (pili), tripsin benzeri enzim, sistein-benzeri proteinaz (gingipain) ve diger enzimlerdir (kollajenaz, fibrinolizin, fosfolipaz A ve fosfataz) (Kesavalu ve ark, 1992).

P. gingivalis'in fimbriası kronik ve agresif periodontitisli hastalarda gözlenen yüksek serum IgA ve IgG (baskın olarak IgG3) antikor cevabı ile yüksek antijeniteye sahiptir. Antijenik özelliklerine göre 5 *P. gingivalis* fimbrial tipi (tip I-V) tanımlanmıştır (Yoshimura ve ark, 1987).

P. gingivalis'in gingipain adı verilen sistein-benzeri proteinaza sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu proteinaz konak proteinlerini denatüre ederek immün cevabı değiştirebildiği bildirilmiştir (Potempa ve ark, 2000).

Tannerella forsythia

Önceleri *Bacteroides forsythus* günümüzde ise *T. forsythia* olarak adlandırılan gram (-), anaerobik, fusiform şekilli mikroorganizmalardır (Tanner ve ark, 1986, Sakamoto ve ark, 2002).

T. forsythia'nın virülans faktörleri; kapsül, endotoksin (lipopolisakkarit), tripsin-benzeri proteinaz, apoptotizisi indükleyen faktör, BspA proteini ve betalaktam enzimidir (Sharma ve ark, 2005).

Treponema denticola

T. denticola gram (-), hareketli, asakkarolitik, spiral şekilli anaerob bir spirokettir (Chan ve ark, 1993).

T. denticola'nın virülans faktörleri; flagellum (kamçı), endotoksin (lipopolisakkarit), proteinaz enzimleri, major kılıf proteini (Msp)'dir. *T. denticola*'nın sahip olduğu kamçı (flagellum) onun yüksek viskoziteye sahip diş eti oluğu sıvısında hareket etmesine ve diş eti epiteli ve bağ dokusuna penetrasyonuna yardım etmektedir (Klitorinos ark, 1993).

PCR Çalışmaları

PCR ile yaşları 2-12 arasında değişen 24 sağlıklı, 83 gingivitis ve 12 periodontitisli olmak üzere 119 çocuktan dental plak örnekleri alınmış ve bu örneklerde *Prevotella intermedia*, *P.nigrescens*, *B. forsythus*, *T. denticola* ve *Campylobacter rectus* bakteri suşları araştırlmıştır. Sağlıklı, gingivitis ve periodontitis için sonuçlar sırasıyla; *P. intermedia* %0.0, %6.0 ve %25.0, *P.*

nigrescens %45.8, %79.5 ve %50.0, *B. forsythus* %33.3, %63.9 ve %58.3, *T. denticola* %.0, %18.1 ve %16.7, ve *C. rectus* için %100 olarak tespit edilmiştir. *P. intermedia* ve *T. denticola*'nın periodontal hastalıklarla daha fazla ilgili olduğu, *B. forsythus* ve *P. nigrescens*'in, klinik gruplarda orta bir yaygınlıkta ve *C. rectus*'un en çok bulunan tür olduğu gösterilmiştir (Okada ve ark, 2001).

PCR ile 20 kök kanalından alınan örneklerde kök kanalı hastalıklarına neden olduğu kabul edilen patojen bakteriler arasında gösterilen 11 bakterinin saptanması üzerine yapılan çalışmada; *T. denticola* %50, *B. Forsythus* %40, *P. endodontalis* %40, *P. gingivalis* %30, *C. rectus* %20, *Micromonas micros* %20, *Prevotella nigrescens* %10 ve *Streptokok anginosus* %10 oranında tespit edilmiştir. *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* ve *Fusobacterium nucleatum* tespit edilememiş. *T. denticola*'nın yoğun olduğu, *B. forsythus, P. endodontalis,* ve *P. gingivalis* bakterilerinin kök kanalına bulaşabileceği gösterilmiştir. (Rôças ve ark, 2002).

Tran ve Rudney (1996), yaptıkları çalışmada subgingival plak örneklerinde *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis*'in eş zamanlı tespit edilmesi için, türe özgü 16S rRNA gen primerleri kullanılarak Multiplex PCR yöntemiyle araştırmışlardır. Bu test yöntemi ile bakteri suşlarının aynı anda tespit edilmesi ve periodontal patojenlerin izlenmesi hedeflenmiştir.

Jervøe ve ark. (2005), 22 kronik periodontitis hastadan 78 subgingival plak örneği alarak periodontal patojen olarak kabul edilen *A. actinomycetemcomitans , F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* ve *T. forsythensis* olmak üzere beş bakterinin test edilmesi için kültür ve Real-time PCR tekniklerini karşılaştırmışlardır. Her iki test metodunun sonuçlarında uyuşma yönünden, *A. actinomycetemcomitans* ve *P.*

gingivalis için iyi, *T. forsythensis*, *F. nucleatum* ve *P. intermedia* için kültür metodunun yetersizliği belirtilmiştir.

Kronik periodontitis hastalarda Real-time PCR tarafından periodontopatojen bakterilerden *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Dialister pneumosintes* ve *M. micros*'un araştırılması üzerine yapılan çalışmada, Real-time PCR'ın güvenilir ve önemli bir metot olduğu ve subgingival plaklarda periodontopatojenlerin tespit edilebildiği gösterilmiştir (Nonnenmacher ve ark, 2004)

P. gingivalis'in *fimA* geninin yeni bir değişkeninin teşhisi ve erişkinlerde *fimA* dağılımı üzerine yapılan araştırmada; *P. gingivalis fimA* genotipin tip I %2.6, tip Ib %13.5, tip II %47.4, tip III %3.6, tip IV %12.5 ve tip V % 2.6 oranında tespit edilmiştir. Tip Ib *fimA*, tip I *fimA'ın*, bir değişkeni olduğu ve tip I *fimA*, ve Ib *fimA* genlerinin, yüksek ölçüde onların nükleotid sıraları ve immunoreaktivitenin esasında homolog olduğu gösterilmiş. *P. gingivalis*'in periodontal hastalık geliştirmesinde *fimA*'nın etkisi açısından faydalı olmuşlardır (Nakagawa ve ark, 2002)

Tükrük ve subgingival plak örneklerinde *A. actinomycetemcomitans, B. forsythus, P. gingivalis, T. denticola* ve *Treponema socranskii* bakteri suşları araştırılmasında PCR ve Real-time PCR karşılaştırması yapmışlardır. İki metot arasında uyum olduğu ve Real-time PCR'ın laboratuvar çalışmalarını hızlandırdığı gösterilmiştir (Sakamoto 2001).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. MATERYAL

AP hastalarından subgingival plak örnekleri alınarak içerisinde tampon çözelti bulunan ependorf tüplere konuldu ve DNA izolasyonu yapılrak PCR ve Real-time PCR'da çalışıldı.

3.1.1. Tamponlar, Çözelitler ve Enzim

Phosphate Buffer Saline (PBS), pH 7.2

8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na_2HPO_4, 0.2 g KH_2PO_4, olacak şekilde hazırlanmış paketler halinde bulunmaktadır. dH_2O 1000 ml içerisinde çözülerek kullanılmıştır.

Stok 10x Tris Borik Asit EDTA (TBE) Tamponu

108 g Tris base, 55 g Boric acid, 40 ml 0.5 M EDTA pH 8.0, 1000 ml dH_2O içinde çözülerek hazırlanmıştır.

dNTP Karışımı

Amplifikasyon sırasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanmasında kullanılan deoksi nükleotit trifosfatlar (dNTP'ler: eşit oranda dATP, dGTP, dCTP, dTTP)'lardan oluşmuş ve –20 ^oC'de saklanmıştır.

Primer'ler

Çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan sınırlayan, çoğaltılması istenen bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgün olarak tanıyıp bağlanacak olan bir çift sentetik DNA parçalarıdır. Primerler 15-30 nükleotid uzunluğunda olup, mikroorganizma genomunun spesifik bölgesine yapışmaya uygun olarak hazırlanırlar. Ürün spesifikliği büyük ölçüde uygun seçilen primerlere bağlıdır. Primerler liyofilize halde

geldi ise, DNAz ve RNAz içermeyen distile suda 100 veya 50 pmol/µl olacak şekilde sulandırılır. Daha sonra küçük hacimlere (10-20 örneklik) bölünerek –20 ^{o}C'de saklanır.

DNA Ekstraktı

İzole edilmiş, amplifikasyona hazır hale getirilmiş DNA örneğidir. Kullanılıncaya kadar –20 ^{o}C'de saklanır.

DNA Polimeraz

PCR çalışmalarının büyük çoğunluğunda *Thermus aquaticus* (Taq) bakterilerinden elde edilen termostabil Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır.

Taq DNA polimeraz optimal sıcaklıkta (70-80 ^{o}C) saniyede 35-100 nükleotidin polimerizasyonu ve 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini gerçekleştirme yeteneğine sahiptir. Taq DNA polimeraz genellikle 5 ünite/µl konsantrasyonda gelir ve –20 ^{o}C'de saklanır.

PCR tamponu ve $MgCl_2$

10x PCR tamponunda genellikle 100 mM Tris ve 500 mM KCl bulunur. Taq DNA polimeraz $MgCl_2$ varlığında etkindir. $MgCl_2$'ün PCR'ın özgünlüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum $MgCl_2$ konsantrasyonu olarak 1.5 mM tercih edilir. Düşük Mg^{+2} iyon konsantrasyonu zayıf ürün oluşumuna, yüksek Mg^{+2} iyon konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün oluşumuna neden olmaktadır. Bununla birlikte her çalışma için en uygun Mg konsantrasyonunun belirlenmesi önemlidir. 10x PCR tamponu ve $MgCl_2$ (25 mM) genellikle Taq enzimi ile birlikte gelir ve çalışmaya göre optimize edilir, –20 ^{o}C'de saklanır.

3.2. METOT

3.2.1. Çalışma Grubu

Araştırma; Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'na Aralık 2006 ile Eylül 2007 tarihleri arasında başvuran, Agresif periodontitis teşhisi konmuş, yaşları 18-35 arasında değişen hastalardan oluşan 10 hasta üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hastalara periodontitis tanısı konulması için hastanın ağzında her yarım çenede en az dört dişte ve bir bölgede 5 mm ve üzeri periodontal cep olması, radyografik olarak açısal kemik yıkımının belirlenmesi ve hastaların altı ay öncesine kadar sistemik antibiyotik veya antienflamatuar ilaç kullanmamış olması, sistemik bir hastalığının bulunmaması ve son 1 yıllık dönemde hastalara herhangi bir periodontal işlem yapılmamış olması, kabul kriterleri olarak değerlendirilmiştir. Araştırma grubuna dahil edilen hastalar, ağız hijyen motivasyonu, diş taşı temizliği ve polisaj ile kök yüzeyi düzleştirmesini içeren başlangıç faz periodontal tedavi (Faz I) yapıldı. Çalışmaya dahil edilen hastalara araştırmanın amacı ve içeriği anlatıldı ve gönüllü olarak çalışmaya katıldıklarına dair bilgilendirilmiş onay formu imzalatıldı. Araştırma için Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Etik Kurulu'ndan (2007/2-4) onay alındı.

3.2.2. Örnek Alınacak Dişlerin Tespiti ve Örneklerin Alınması

Hastaların seçimi yapıldıktan sonra, her hastada cep derinliği ölçümleri dişlerin dört yüzeyinden (Mezio-bukkal, mezio-lingual, disto-bukkal, disto-lingual) yapıldı. Hastaların plak ve gingival indeksleri ile dişlerin mobilite değerleri kaydedildi. Hastaların ağzında, 5 mm ve üzerinde cep derinliğine sahip 4 farklı kuadrandaki 4 dişten plak örnekleri, her biri içerisinde 500 µl *Phosphate Buffer*

Saline (PBS) bulunan ependorf tüplere ayrı ayrı alındı ve bu örnekler 2 ml'lik ependorf tüp içerisinde birleştirilip havuz oluşturuldu ve tekrar 500 µl lik ependorflara bölünerek -80 ^{o}C'de saklandı. Test çalışmaları her hasta için alınan bu örneklerle yapıldı.

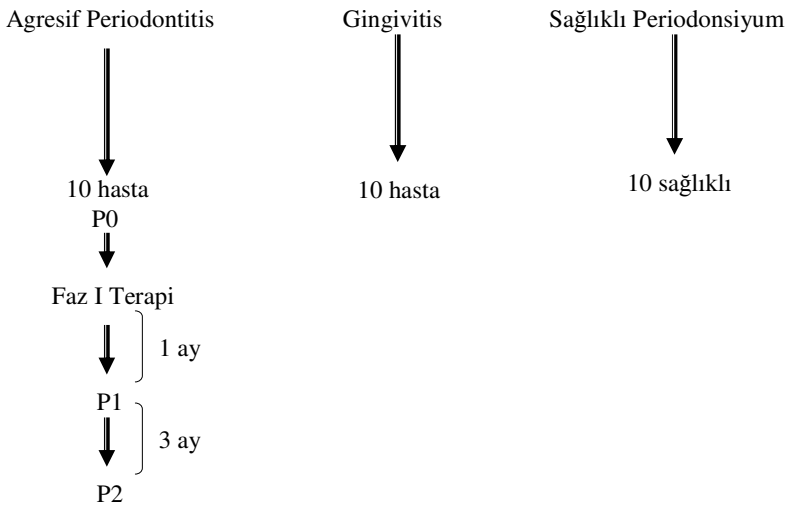
3.2.3. Kontrol Gurubu

Kontrol grubu olarak Gingivitis (G) teşhisi konmuş 10 hasta ve Sağlıklı Periodonsiyuma sahip (S) 10 kişi belirlendi ve bunların dişlerinin 4 tanesinden plak örnekleri alındı.

3.2.4. Örnek Alım Periyodu

Örnekleme zamanı aşağıdaki çizelgeye göre yapıldı.

Çizelge 3.2.4. Örnekleme zaman periyodu



- PO: Faz I tedavi öncesi
- P1: Faz I tedaviden 1 ay sonrası
- P2: Faz I tedaviden 3 ay sonrası

P1 ve P2'de örnekler P0'daki örnekleme bölgelerinden alındı.

3.3. PCR İçin DNA İzolasyonu

DNA izolasyon işlemi Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Araştırma laboratuvarında yapıldı.

DNA izolasyonu için DNA İzolasyon Kiti* (Mikroorganizma için) kullanıldı.

DNA izolasyonu kitin protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. 1,5 ml'lik ependorf tüp içine 25 µl Sol A, üzerine 250 µl plak örneklerinin bulunduğu PBS solusyonundan ve 500 µl Sol B ilave edildi.

2. Tüp, solüsyonların karışması için alt üst edildi ve enzimin aktif ısısı olan 42 ^{o}C de 1 saat inkübe edildi.

3. İnkübasyondan sonra tüpe 500 µl Sol C (İki fazlıdır, alt fazdan alınmalıdır) aktarıldı.

4. İyice vortekslendi (Süt kıvamında bir sıvı oluştu) ve 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

5. Santrifüj'den sonra tüpte iki faz oluştuğu görüldü. Berrak olan üst kısım temiz bir ependorfa alınarak, üzerine 500 µl Sol D konuldu ve hafifçe vortekslendi.

6. Sonra 10.000 rpm'de 10 dk sanrifüj edildi.

7. Süpernatant atıldı ve üzerine 500 µl Sol E ilave edildi.

8. 10.000 rpm' 5 dk santrifüj edildi.

9. Süpernatant atıldı. Tüpler 37 ^{o}C'lik etüve koyularak alkol uçuruldu.

10. 50 µl distile su ile sulandırıldı ve bakteri DNA'sı elde edildi.

* DZ (Doktor Zeydanlı) DNA İzolasyon kiti, Ankara, Türkiye

3.3.1. PCR İşlemi İçin 50µl Hacimde Bulunan Maddeler.

1- 6 µl DNA (örneklerden izole edilen bakteri DNA'sı)

2- 29.3 µl distile suyu

3- 5 µl 10X PCR tampon çözeltisi[1]

4- 3 µl $MgCl_2$ (25mM)[1]

5- 5 µl dNTP (25mM)[2]

6- 0.5 µl forward primer (100 pmol/ µl)[3]

7- 0.5 µl reverse primer (100 pmol/ µl)[3]

8- 0.7 µl Taq DNA polimeraz (5 ünite/µl)[1]

250 µl'lik PCR tüpüne yukarıda miktarları belirtilen maddeler kondu ve vortekslenerek PCR'a yerleştirildi.



Şekil 3.1.3. Thermal Cycler PCR[4]

[1] Bioron, Ludwigshafen, Almanya
[2] Larova, Ludwigshafen, Almanya
[3] MWG, Ebersberg, Almanya
[4] Eppendorf mastercycler (gradient model), Hamburg, Almanya

3.4. Çalışmada Araştırılacak Bakteriler

Agresif Periodontitis (AP) hastalarında periodontopatojenler olduğu düşünülen *A. actinomycetemcomitans, T. denticola, T. forsythia*, *P. gingivalis* ve *P. gingivalis*'in subtiplerinden olan tip I *fimA*, tip II *fimA* bakteri suşlarının subgingival plak örneklerinde PCR ile tespit edilmesine çalışılmıştır.

3.5. Kullanılan Primer Dizilimleri ve PCR Amplifikasyon Koşulları

3.5.1. *Porphyromonas gingivalis*

a. Tip I *fimA*,

b. Tip II *fimA*

P. gingivalis pozitif çıkan örnekler, Real-time PCR ile doğrulandıktan sonra *P. gingivalis*'in subtipleri çalışıldı.

P. gingivalis 16S rDNA (Tran ve Rudney 1996)

F 5' TGT AGA TGA CTG ATG TGT AAA ACC3'
R 5'ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC 3'

Tip I *fimA*16S rDNA (Amona ve ark, 1999)

F 5'CTG TGT GTT TAT GGC AAA CTT C 3'
R 5'AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A 3'

Tip II *fimA* 16S rDNA (Amona ve ark, 1999)

F 5'ACA ACT ATA CTT ATG ACA ATG G 3'
R 5'AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A 3'

PCR işlemi "Termal siklus" cihazı ile yapıldı*.

PCR Amplifikasyon koşulları:

95 ºC'de 5 dakika ilk denatürasyon

94 ºC'de 30 saniye denatürasyon
58 ºC'de 30 saniye primer bağlanması
72 ºC'de 30 saniye uzama reaksiyonu
} 35 Döngü

72 ºC'de 7 dakika son sentez

%2'lik agaroz jelde 70 V gerilimde 60 dakika yürütülerek görüntülenmiştir.

3.5.2. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans 16S rDNA (Conrads ve ark, 1996)

F 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'
R 5' CAC TTA AAG GTC CGC CTA CGT GCC3'

PCR Amplifikasyon koşulları:

95 ºC'de 5 dakika ilk denatürasyon

95 ºC'de 30 saniye denatürasyon
60 ºC'de 30 saniye primer bağlanması
72 ºC'de 1 dakika uzama reaksiyonu
} 35 Döngü

72 ºC'de 7 dakika son sentez

%2'lik agaroz jelde 70 V gerilimde 80 dakika yürütülerek görüntülenmiştir.

3.5.3. *Tanneralla forsythia* (*Bacteroides forsythus*)

T. forsythia 16S rDNA (Ashimoto ve ark, 1996)

F 5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3'
R 5' TCG TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'

* Eppendorf mastercycler (gradient model), Hamburg, Almanya

PCR Amplifikasyon koşulları:

95 ºC'de 5 dakika ilk denatürasyon

95 ºC'de 30 saniye denatürasyon
60 ºC'de 1 dakika primer bağlanması
72 ºC'de 1 dakika uzama reaksiyonu
} 36 Döngü

72 ºC'de 2 dakika son sentez

%2'lik agaroz jelde 70 V gerilimde 90 dakika yürütülerek görüntülenmiştir.

3.5.4. *Treponema denticola*

T. denticola 16S rDNA (Watanabe ve ark, 1996)

F 5' AAG GCG GTA GAG CCG CCG CTC A 3'
R 5'AGC CGC TGT CGA AAA GCC CA 3'

PCR Amplifikasyon koşulları:

95 ºC'de 5 dakika ilk denatürasyon

95 ºC'de 30 saniye denatürasyon
55 ºC'de 30 saniye primer bağlanması
72 ºC'de 1 dakika uzama reaksiyonu
} 35 Döngü

72 ºC'de 7 dakika son sentez

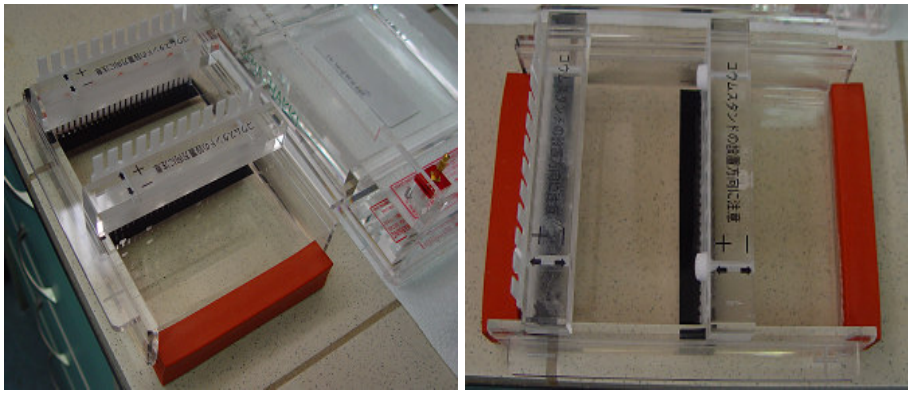
%2'lik agaroz jelde 70 V gerilimde 60 dakika yürütülerek görüntülenmiştir.

3.6. PCR Ürününün Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

1. Elektroforez tankının büyüklüğüne göre dökülecek jel miktarı belirlenir. Örnek: 100 ml'lik tank için; 2 gram agaroz tartılıp 100 ml 0.5x TBE tamponuna ilave edildi.

2. Stok 10x TBE 20 kez distile suyla sulandırılarak 0.5x TBE kullanma solüsyonu hazırlandı. 100 ml 0.5x TBE behere konuldu ve üzerine tartılan agaroz eklenerek karıştırıldı. Mikro dalga fırında 1 dakika 400 Watta tutuldu.

3. Karıştırıldıktan sonra soğuması için beklenirken, agaroz jelin dökületeği kaset hazırlandı. Örnek sayısına göre 13'lü veya 26'lı tarak yerleştirildi (Şekil 3.6.1).

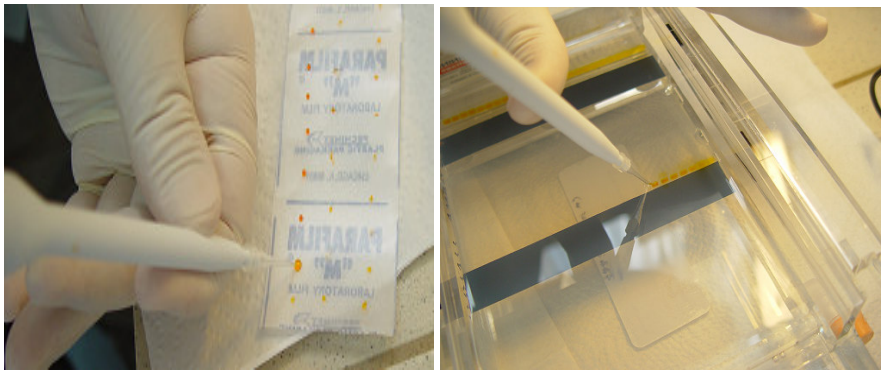


Şekil 3.6.1. Jel dökülmesi ve tarakların yerleştirilmesi

4. 50 ^{o}C civarına kadar soğuyan 100 ml'lik agaroza 10 µl ethidium bromide (5 mg/ml) eklendi, karıştırıldıktan sonra jel döküldü (Şekil 3.6.1).

5. Jel donduktan sonra (yaklaşık 30 dakika oda ısısında) jel kutusunun iki tarafındaki lastikler ve tarak çıkarıldı.

6. Her örnek için parafilm üzerine 2 µl yükleme solüsyonu (6x Loding dyn) konuldu (Şekil 3.6.2).



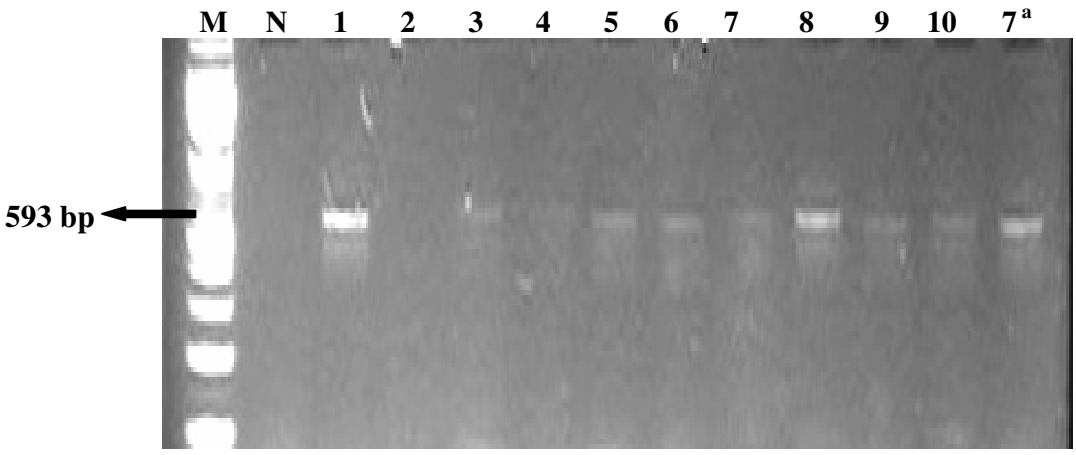
Şekil 3.6.2. Parafilm üzerinde karıştırma ve jele yükleme

7. PCR ürününden 5 µl alınarak 2 µl yükleme solüsyonu ile karıştırılıp, (ilk sıraya DNA markörü* olmak üzere) daha sonra sırayla agaroz jele yüklendi (Şekil 3.6.2). 70 V gerilimde DNA molekülünün büyüklüğüne göre 60–90 dakika jelde yürütüldü.

DNA Bant Görüntülerinin Elde Edilmesi ve Jel Görüntüleri



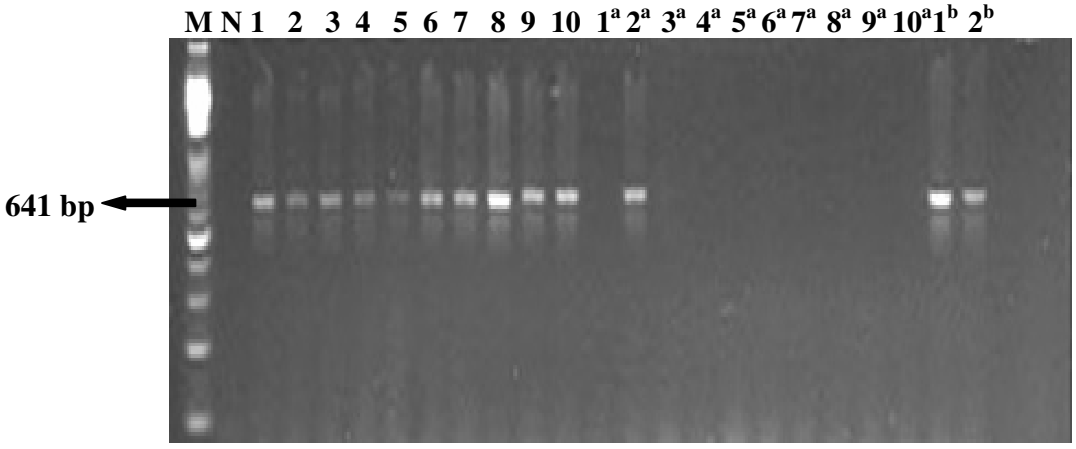
Şekil 3.6.3. UVP Bio Imaging Systemsω



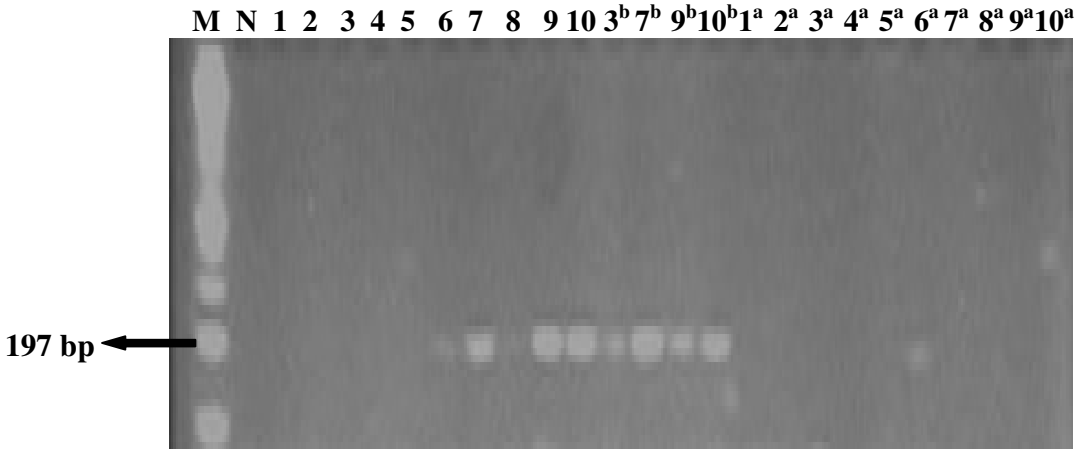
Şekil 3.6.4. PCR ile incelenen örneklerde belirlenen *A. actinomycetemcomitans*'ın jel görüntüsü
- M (Marker)
- N (Negatif kontrol)
- 1-10 arası faz I tedavi öncesi alınan hasta örnek numaraları
- 1^a-10^a arası faz I tedaviden 1 ay sonrası alınan hasta örnek numaraları

---

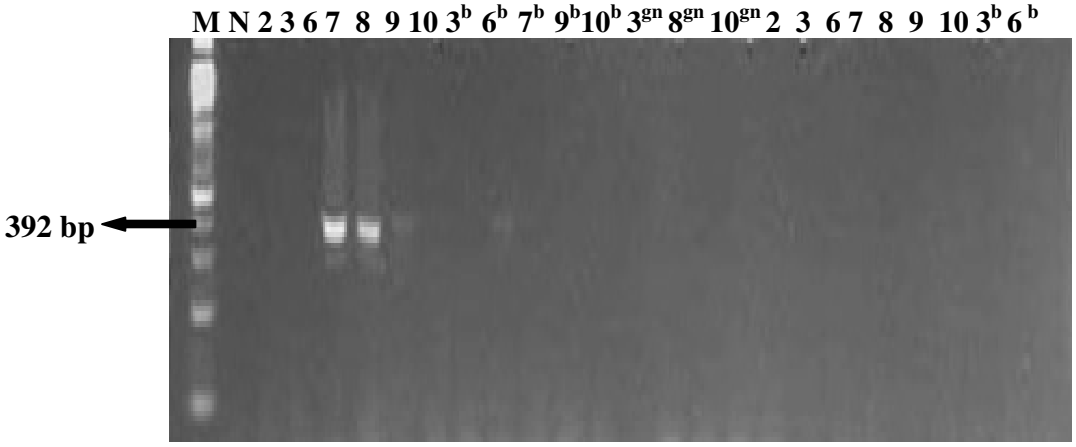
* AMRESCO (K180 Molecular Weight Marker DNA 100 bp.), Solon, OH
ω EpiChemi^3 Darkroom Upland, CA 91786 U.S.A.



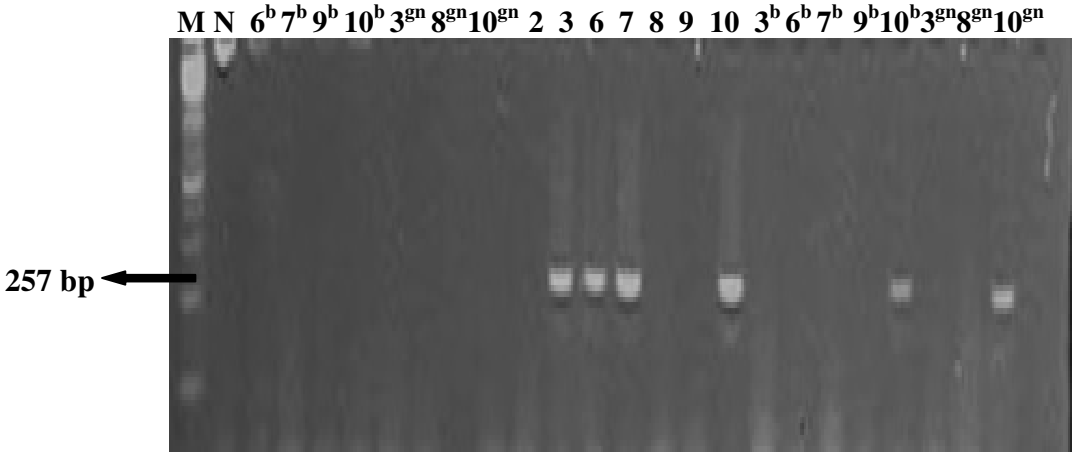
Şekil 3.6.5. PCR ile incelenen örneklerde belirlenen *T. forsythia*'nın jel görüntüsü
- M (Marker)
- N (Negatif kontrol)
- 1-10 arası faz I tedavi öncesi alınan hasta örnek numaraları
- 1^a-10^a arası faz I tedaviden 1 ay sonrası alınan hasta örnek numaraları
- 1^b-10^b arası faz I tedaviden 3 ay sonrası alınan hasta örnek numaraları



Şekil 3.6.6. PCR ile incelenen örneklerde belirlenen *P. gingivalis*'in jel görüntüsü
- M (Marker)
- N (Negatif kontrol)
- 1-10 arası faz I tedavi öncesi alınan hasta örnek numaraları
- 1^a-10^a arası faz I tedaviden 1 ay sonrası alınan hasta örnek numaraları
- 1^b-10^b arası faz I tedaviden 3 ay sonrası alınan hasta örnek numaraları



Şekil 3.6.7. PCR ile incelenen örneklerde belirlenen *P. gingivalis* tipI *fimA*'nın jel görüntüsü
- M (Marker)
- N (Negatif kontrol)
- 1-10 arası faz I tedavi öncesi alınan hasta örnek numaraları
- 1^{a}-10^{a} arası faz I tedaviden 1 ay sonrası alınan hasta örnek numaraları
- 1^{b}-10^{b} arası faz I tedaviden 3 ay sonrası alınan hasta örnek numaraları
- 1^{gn}-10^{gn} arası Gingivitis hasta örnek numarraları



Şekil 3.6.8. PCR ile incelenen örneklerde belirlenen *P. gingivalis* tipII *fimA*'nın jel görüntüsü
- M (Marker)
- N (Negatif kontrol)
- 1-10 arası faz I tedavi öncesi alınan hasta örnek numaraları
- 1^{a}-10^{a} arası faz I tedaviden 1 ay sonrası alınan hasta örnek numaraları
- 1^{b}-10^{b} arası faz I tedaviden 3 ay sonrası alınan hasta örnek numaraları
- 1^{gn}-10^{gn} arası Gingivitis hasta örnek numarraları

3.7. Real-time PCR Çalışması

DNA izolasyon işlemi ve Real-time PCR çalışması ODTÜ Teknokent Ref-Gen laboratuvarında yapıldı.

3.7.1. Real-time PCR İçin DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için DNA İzolasyon Kiti* kullanıldı.

DNA izolasyonu kitin protokolüne göre aşağıdaki gibi yapıldı (Rainer ve ark. 1999).

1. 1,5 ml'lik ependorf tüp içine 250 µl plak örneklerinin buluduğu PBS solusyonundan kondu ve üzerine 400 µl Resuspension Buffer R ilave edildi. Kısa süre vortexlendi ve 65 ^{o}C'de 10 dakika inkübe edildi.

2. 95 ^{o}C de 5 dakika inkübe edildi.

3. Üzerine 400 µl Binding (bağlayıcı) Buffer B6 ilave edildi ve kısa süre vortexlendi.

4. Filtreli döndürme tüpüne örnek alındı ve 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi, alttaki ependorf tüp değiştirildi.

5. Yıkama I; üzerine 500 µl yıkama solüsyonu konuldu ve 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi, alttaki ependorf tüp değiştirildi.

6. Yıkama II; Üzerine 700 µl yıkama solusyonu konuldu ve 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi, alttaki ependorf tüp değiştirildi.

7. Üzerine 200 µl. Elution Buffer konuldu ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edildi.

---

* Invitec, Berlin, Almanya

DNA miktarı spektrofotometre[Ω] ile ölçüldü (Şekil 3.7.1.).



Şekil 3.7.1. Nano Drop® Spectrophotometer

3.7.2. Real-time PCR İşlemi İçin 20µl Hacimde Bulunan Maddeler

1- 4 µl Master mix[*]

2- 1µl forward primer (0.5 pmol)

3- 1µl reverse primer (0.5 pmol)

4- 1µl prop (0.5 pmol)

5- 2.4 µl $MgCl_2$ (25mM)

6- Bakteri DNA'ları 50 ng / µl konsantrasyonunda hazırlandı.

7- Toplam hacim distile su ile 20 µl'ye tamamlandı ve Real-time PCR cihazına yerleştirildi.

[Ω] Nano Drop® Spectrophotometer, USA
[*] LC TaqMan® master kit, Roche, Almanya

3.8. Real-time PCR Yöntemi İle İncelenen Bakteri Suşları

Agresif Periodontitis (AP) hastalarında periodontopatojenler olduğu düşünülen *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis* bakteri suşları subgingival plak örneklerinde Real-time PCR yöntemi ile araştırıldı.

3.9. Primer, Prob Dizilimi (P) ve RT-PCR Amplifikasyon Koşulları

3.9.1. *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis

F 5'TGG AAC TTG CCT TAC AGA GGG 3'

R 5'ACT CGT ATC GCC CGT TAT TC 3'

P 5'AGC TGT AAG ATA GGC ATG CGT CCC ATT AGC TA 3'

3.9.2. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

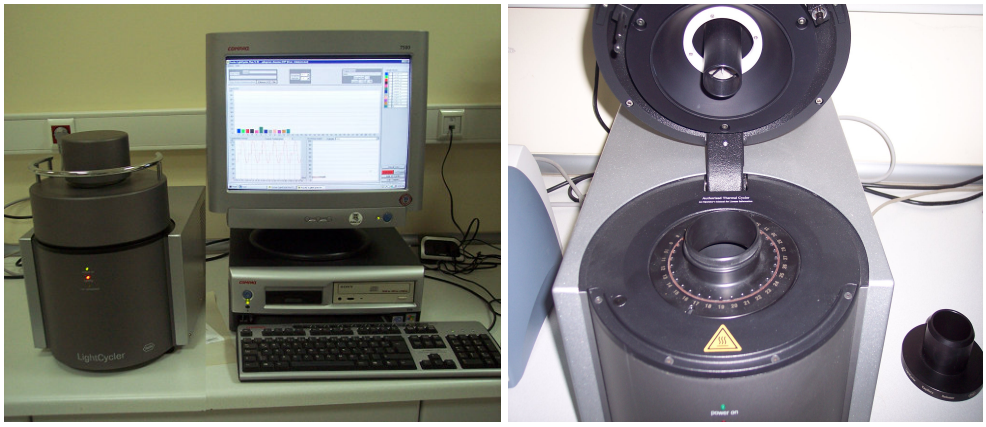
A. actinomycetemcomitans

F 5'CCA GTG TGA TTA GGT AGT TGG TGG G 3'

R 5'CCT TCC TCA TCA CCG AAA GAA 3'

P 5'ATC GCT AGC TGG TCT GAG AGG ATG GCC 3'

PCR işlemi "Real-time PCR" cihazı* ile yapıldı (Şekil 3.9.1).



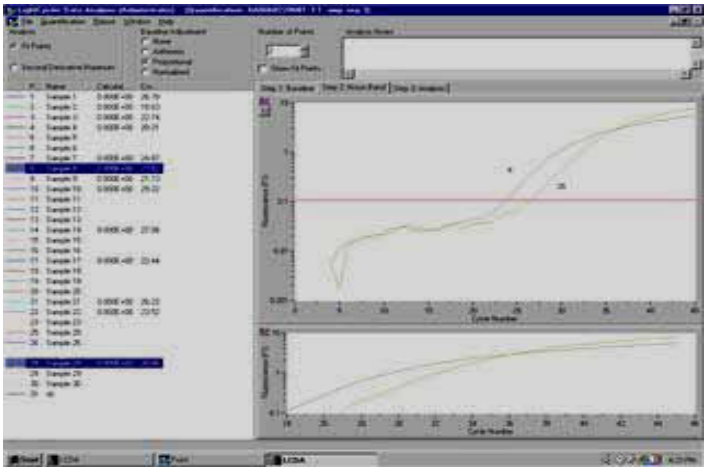
Şekil 3.9.1. Light Cycler 2.0 Roche

* Ligt Cycler 2.0 Roche Almanya

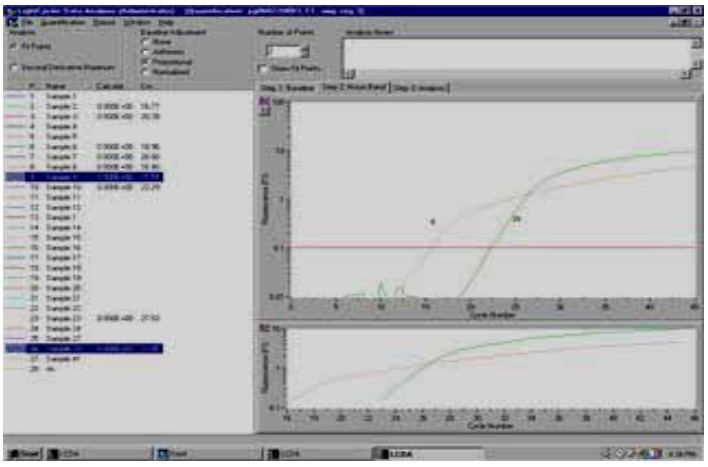
3.9.3. Real-time PCR Amplifikasyon Koşulları ve Sonuç Görüntüleri

95 30 sn
55 10 sn
72 13 sn
} 45 Döngü

A. actinomycetemcomitans ve *P. gingivalis* için aynı amplifikasyon koşulları uygulandı.



Şekil 3.9.2. *A. actinomycetemcomitans* sonuç ekran görüntüsü



Şekil 3.9.3. *P. gingivalis* sonuç ekran görüntüsü

4. ARAŞTIR MA (veya DENEY) SONUÇLARI

Elde edilen sonuçlara göre faz I tedavi sonrası 1. ayda periodontal mikroorganizmalarda azalma ve 3. ayda yeniden bir artış olduğu görüldü (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. AP hasta örneklerinde PCR ile belirlenen bakteri suş sayıları ve % oranları

Agresif periodontitis	*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*			*Tannerella forsythia*			*Treponema denticola*			*Porphyromonas Gingivalis*			*P. Gingivalis* Tip I *fim A*			*P. Gingivalis* Tip II *fim A*		
Hasta No	PO	P1	P2	PO	P1	P2	PO	P1	P2	PO	P1	P2	PO	P1	P2	PO	P1	P2
1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
4	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
7	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
8	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
9	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
% +	% 70	% 10	% 30	%100	% 10	% 70	% 40	% 10	% 0	% 70	% 0	% 40	%30	% 0	% 10	%40	% 0	%30

- PO: Faz I tedavi öncesi, P1: tedaviden 1 ay sonrası, P2: tedaviden 3 ay sonrası

Belirlenen verilere göre G'li hastalarda perodontal mikroorganizmalar görüldü ve S'li bireylerde periodontal mikroorganizmalar tespit edilemedi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Gingivitis ve Sağlıklı bireylerden alınan örneklerde PCR ile belirlenen bakteri suş sayıları ve % oranları

Kontrol Grubu	*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*		*Tannerella forsythia*		*Treponema denticola*		*Porphyromonas gingivalis*		*P. gingivalis* Tip I *fim A*		*P. gingivalis* Tip II *fim A*	
No	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
9	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
% +	% 20	% 0	% 20	% 0	% 0	% 0	% 30	% 0	% 0	% 0	% 10	% 0

- G: gingivitis teşhisi konmuş hasta, S: sağlıklı peridonsiyumlu bireyler

Görüldüğü gibi, Real-time PCR yönteminin, bakterilerin DNA'larını belirlemede, klasik PCR yöntemine göre daha duyarlı olduğu belirlendi (Çizelge 4.1 ve 4.3).

Çizelge 4.3. İncelen hasta örneklerinde Real-time PCR yöntemi ile *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis* bakteri suş sayıları ve % aranları

Agresif periodontitis	***Aggregatibacter actinomycetemcomitans***			***Porphyromonas gingivalis***		
Hasta No	P0	P1	P2	P0	P1	P2
1	+	-	+	-	-	-
2	+	-	+	+	-	-
3	+	-	-	+	-	+
4	+	+	+	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	+	-	+
7	+	+	+	+	-	+
8	+	-	+	+	-	-
9	+	-	-	+	-	+
10	+	-	-	+	-	+
% +	% 80	% 20	% 50	% 70	% 0	% 50

- PO: Faz I tedavi öncesi, P1: tedaviden 1 ay sonrası, P2: tedaviden 3 ay sonrası

Real-time yönteminde Gingivitis'li hasta örneklerinden klasik PCR'da her iki bakteri de (-) olan 1. hasta, her iki bakteri de (+) olan 3. hasta ve *P. gingivalis* (+) olan 10. hasta örnekleri seçildi. Sağlıklı peridonsiyum bireylerin örneklerinden ilk 3 tanesi kontrol için alındı. Seçilen G'li ve S'li bireylerde Real-time PCR sonuçlarına göre belirlenen bakterilerin dağılımları gösterilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Real-time PCR yöntemi ile Gingivitis'li ve Sağlıklı bireylerde bakteri suş sayıları ve % oranları

Kontrol Grubu	***Actinobacilius actinomycetemcomitans***	***Porphyromonas gingivalis***	**Kontrol Grubu**	***Actinobacilius actinomycetemcomitans***	***Porphyromonas gingivalis***
No	G	G	**No**	S	S
1	-	-	**1**	-	-
3	+	+	**2**	-	-
10	-	+	**3**	-	-
% +	%33	%66	**% +**	%0	%0

- G: gingivitis teşhisi konmuş hasta, S: sağlıklı peridonsiyumlu bireyler

P. gingivalis tip I *fimA* ve tip II *fimA*; tablo 4.1'de verilen *P. gingivalis* pozitif olan yedi hasta örneği çalışıldı. Bunlardan üçü tip I *fimA* ve dördü tip II *fimA* olarak belirlendi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Agresif Periodontitisli hastaların subgingival plak örneklerinde periodontopatojen mikroorganizmalar olan *A. actinomycetemcomitans T. denticola T. forsythia*, ve *P. gingivalis*, ayrıca *P. gingivalis* pozitif örneklerde ise P. *gingivalis*'in subtiplerinden tip I *fimA* ve tip II *fimA* PCR tekniği ile tespit edildi. Hastalarda başlangıç mikroorganizma profili ve uygulanan faz I periodontal tedavinin bu profil üzerine etkileri/etkinliği tedavi sonrası 1. ay ve 3. ayda değerlendirildi. Klasik PCR ile elde edilen sonuçların, güvenilirliği ve doğrulanması için *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis* için Real-time PCR deneyleri gerçekleştirildi.

Literatürde, farklı periodontal hastalıklarda, dental plakta PCR yöntemi ile *P. gingivalis, A. actinomycetemcomitans* ve *T. denticola* gibi bakteri türleri araştırılmıştır ve PCR tekniği ile periodontal patojenlerin kesin bulunabileceği gösterilmiştir (Watanabe ve ark, 1996). Mikrobiyolojik kültür yöntemi ile moleküler teknikler arasında karşılaştırmalar yapılmıştır ve PCR teknolojisinin teşhise yönelik kullanımının yakın gelecekte büyük bir role sahip olabileceği, klinik periodontolojide mikroorganizmaların hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği vurgulanmıştır (Sanz ve ark, 2004). Mikrobiyolojide altın standart olarak bilinen kültür yöntemi ile Real-time PCR'dan elde edilen sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu gösterilmiştir (Morillo ve ark, 2004). Çalışmamızda klasik PCR ve Real-time PCR kullanılarak elde edilen sonuçlar, subgingival plak örneklerinde periodontopatojenlerin tespit edilebileceğini ve DNA-temelli tekniklerin klinik periodontolojide teşhis

konulmasında ve tedavi planının yönlendirilmesinde faydalı yöntemler olarak kullanılabileceğini gösterdi.

Verner ve ark.'nın 18 AP'li hastada periodontal patojenlerden *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* , *F. nucleatum* ve *T. Denticola* olmak üzere altı bakteriyi Real-time PCR ve mikrobiyolojik kültür yöntemi ile incelemişler ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Mikrobiyolojik kültür sonuçlarında *A. actinomycetemcomitans* %0, *P. gingivalis* %8.33, *P. intermedia* %30.55, *T. forsythia* %33.33, *F. nucleatum* %45.83, *T. denticola* %.0 olduğunu, Real-time PCR sonuçlarında ise *A. actinomycetemcomitans* %33.33, *P. gingivalis* %84.72, *P. intermedia* %36.11, *T. forsythia* %75, *F. nucleatum* %77.78, *T. denticola* %80.55 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Real-time PCR'ın kültüre göre özellikle oksijene çok duyarlı *T. denticola* ve diğer bakterilerin tespitinde daha hassas ve daha çabuk sonuç alınabilen bir yöntem olduğunu ancak mikrobiyolojik kültürde antibiyogram testinin yapılabileceğini bu nedenle hastanın klinik özelliğine göre bu metotlardan seçim yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (Verner ve ark, 2006). Bizim çalışmamızda kültür yöntemi kullanılmamakla birlikte, PCR tekniği ile plak örneklerinde *A. actinomycetemcomitans* %70, *P. gingivalis* %70, *T. forsythia* %100 ve *T. denticola* %40 oranında tespit edildi. Sonuçlardaki oransal farklılıkların, çalışmaya dahil edilen hastalardaki bireysel farklılıklara, çalışma grubunun (n) sayısının yüksek olmamasına bağlanabileceği düşünülmektedir.

Hasta sayısı yüksek olan bir başka çalışmada, 111 Periodontal sağlıklı ve 259 periodontitisli bireyin subgingival plak örneklerinde periodontal patojen olan *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *Micromonas micros* ve *Fusobacterium spp*. olmak üzere altı bakteri Real-time PCR ve

mikrobiyolojik kültür yöntemi ile incelenmiştir ve iki metod karşılaştırılmıştır. Sağlıklı bireylerin kültür sonuçlarında *A. actinomycetemcomitans* %6.3, *P. gingivalis* %7.2, *P. intermedia* %58.5, *T. forsythia* %31.4, *M. micros* %72.6, *F. spp.* %96.5 iken Real-time PCR deneylerinde *A. actinomycetemcomitans* %21.6, *P. gingivalis* %9.9, P. *intermedia* %23.2, *T. forsythia* %33.2, *M. micros* %87, *F. spp.* %97.3 oranında tespit edilmiştir. Periodontitis teşhisi konmuş hastalarda kültür sonuçları *A. actinomycetemcomitans* %18, *P. gingivalis* %42.9, *P. intermedia* %63.7, T. *forsythia* %83, *M. micros* %91.9, *F. spp.* %98.2 iken Real-time PCR sonuçları *A. actinomycetemcomitans* %27.4, *P. gingivalis* %45.5, *P. intermedia* %83, *T. forsythia* %89.2, *M. micros* %97.3, *F. spp.* %98.2 oranında tespit edilmiştir. Real-time PCR'ın teşhise yönelik hızlı ve hassas olduğu ve kültürde bulma sınırının altında olan klinik örneklerde birçok patojenin bulunabileceği gösterilmiştir (Boutaga ve ark, 2006). Bizim çalışmamızda sağlıklı bireylerde *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *T. forsythia* tespit edilmedi. AP hastalarında ise *A. actinomycetemcomitans* %70, *P. gingivalis* %70 ve *T. forsythia* %100 oranında tespit edildi. Bunun nedeninin periodontal olarak sağlıklı grubun, ağız sağlığı konusunda eğitim almış bireylerden seçilmiş 10 kişi oluşundan ve çalışma için seçtiğimiz grubunun periodontitis içerisinde özel bir hasta grubu olan AP olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Lau ve ark., 32 periodontitis, 30 gingivitis ve 30 sağlıklı bireyin subgingival plak numunelerinde periodontal patojen olan, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *T. forsythia* olmak üzere üç bakterinin tespitini mikrobiyolojik kültür ve Real-time PCR yöntemi ile incelemişler ve iki metodu karşılaştırmışlardır. Sağlıklı bireylerde kültür sonuçları *A. actinomycetemcomitans* %0, *P. gingivalis* %20, *T. forsythia* % 3.3 iken Real-time PCR sonuçları *A. actinomycetemcomitans* %6.7, *P.*

gingivalis %13.3, *T. forsythia* % 73.3 oranında tespit edilmiştir. Gingivitis teşhisi konmuş hastalarda kültür sonuçları *A. actinomycetemcomitans* %6.7, *P. gingivalis* %40, *T. forsythia* %10 iken Real-time PCR sonuçları *A. actinomycetemcomitans* %3.3, *P. gingivalis* %30, *T. forsythia* % 93.3 oranında tespit edilmiştir. Periodontitis teşhisi konmuş hastalarda kültür sonuçları *A. actinomycetemcomitans* %6.3, *P. gingivalis* %84.4, *T. forsythia* %25 iken Real-time PCR sonuçları *A. actinomycetemcomitans* %18.8, P. *gingivalis* %81.3, *T. forsythia* %100 oranında tespit edilmiştir. PCR teknolojisi ve kültür prosedürünün arasında uyum olduğunu, PCR'ın yüksek hassasiyet ve özellik yönünden, epidemiyolojik çalışmalarda kullanımını açıklamış ve periodontal hastalarının klinik teşhisinde ilave olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (Lau ve ark, 2004). Çalışmamızda anaerob kültür yapmak için laboratuvar imkanlarının yeterli olmaması nedeni ile PCR deneyleri yapılmıştır. Çalışmamıza katılan sağlıklı bireylerde *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *T. forsythia* tespit edilmezken, G'li hastalarda *A. actinomycetemcomitans* %20, *P. gingivalis* %30 ve *T. forsythia* %20 oranında tespit edildi. Agresif Periodontitis hastalarında ise *A. actinomycetemcomitans* %70, *P. gingivalis* %70, *T. forsythia* %100 oranında tespit edildi. Bizim çalışmamız ile ilgili çalışma arasında farklılıkların, çalışmaya dahil edilen birey sayısının sınırlı olması nedeniyle olabileceği, ayrıca coğrafik ve lokal etkenlerle ilişkili farklılıklardan da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Periodontal olarak patojen olan *T. forsythia*, *P. gingivalis*, ve *A. actinomycetemcomitans* bakterilerinin, 21 erişkin periodontitisli (kronik periodontitis) hasta ve 35 sağlıklı bireyde PCR ve Real-time PCR yöntemi ile incelendiği diğer bir çalışmada, iki metodu karşılaştırmışlardır. Periodontitisli

hastalarda *T. forsythia*'yı hastaların tamamında (%100), *P. gingivalis*'i 12 (%57.1) hastada ve *A. actinomycetemcomitans*'ı 2(%9.5) hastada tespit etmişlerdir. Sağlıklı bireylerin 20'sinde (%57) *T. forsythia*'nın bulunduğu, *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis*'in bulunmadığı gösterilmiştir. Real-time PCR'ın pahalı fakat yüksek işlem hacimli çalışmalarda avantajlı olabileceği belirtilmiştir (Rudney ve ark, 2003). Çalışmamızda *T. forsythia* hastaların tamamında tespit edildi. *P. gingivalis*'i %70 *A. actinomycetemcomitans*'ı %70 oranında bulmuş olmamız seçtiğimiz AP hastalık grubunun periodontitis içerisinde özel bir grup olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Sağlıklı bireylerde *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis* yönünden uyuşma olduğu, *T. forsythia*'nın uyuşmazlığı ise bizim örnek aldığımız sağlıklı grubumuzun ağız hijyenine dikkat etmesinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Real-time PCR yönteminin pahalı fakat PCR'a göre daha duyarlı olduğu ve daha kısa sürede sonuç alındığı görüldü.

A. actinomycetemcomitans bakterisinin DNA numunelerini izole edip, AP-PCR (Arbitrarily primed PCR) kullanarak *A. actinomycetemcomitans*'ın PCR teşhisi için kullanılan özel primerlerini (AA1416) tespit etmişler ve *F. nucleatum*, *P. macacae*, *E. corrodens* ve *Haemophilus aphrophilusa*'ya benzetilen *A. actinomycetem-comitans*'ın diğer periodontal bakterilerden ayrıldığını göstermişler. Bu çalışmanın, laboratuar teşhisini ve periodontopatojen olarak kabul edilen *A. actinomycetemcomitans*'ın taksonomisini kolaylaştırmada faydalı olabileceği belirtilmiştir (Avila ve ark, 1999). Çalışmamızda ilgili çalışmada tespit edilen primerlerden farklı bir primer kullanarak *A. actinomycetemcomitans* PCR ile tespit edildi. Laboratuvar çalışmalarında PCR'ın işlemleri kolaylaştırdığı görüldü.

P. gingivalis'in *fimA* genotip dağılımlarının incelenmesi için, 73 periodontitisli hastada yapılan araştırmada, *P. gingivalis* bakterisinin mevcut *fimA* genotip çeşidine göre tip I, tip II, tip III ve tip IV olmak üzere 4 sınıfa ayrıldığı ve periodontal cep derinlikleri 4 mm ve 8 mm olan bölgelerden örnek alındığında, daha çok 8 mm olan ceplerde *P. gingivalis* bulunduğu gösterilmiştir. Periodontitisli hastalarda *P. gingivalis* % 78.5 oranında tespit edilmiştir. *P. gingivalis* pozitif hastalarda *P. gingivalis fimA* dağılımı tip I %5.4, tip II %58.9, tip III %6.8, tip IV %12.3 oranında gösterilmiştir. Tip II *fimA*'nın en yüksek yaygınlıkta bulunduğu belirtilmiştir (Amano ve ark, 1999). Bizim çalışmamızda AP hastalarında *P. gingivalis* yaygınlığını %70 ve *P. gingivalis* pozitif hastalarda tip I *fimA* %42.8, tip II *fimA* %57.7 oranında tespit edildi. Tip I *fimA*'nın bizim çalışmamızda yüksek olmasının sebebi, hasta grubumuzun kronik periodontitise göre popülasyonda daha az rastlanan ve hızlı bir yıkım seyri ile karakterize özel bir periodontitis tipi olan AP'li hastalar olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Periodontal sağlık durumuna göre hastalıklı (139) ve sağlıklı (380) bireylerde *P. gingivalis* tip I *fimA*, tip II *fimA*, tip III *fimA*, tip IV *fimA* ve tip V *fimA* olmak üzere 5 özel genotip dağılımı araştırılmıştır. *P. gingivalis*'in, sağlıklı bireylerdede %36.8 ve periodontitisli hastalarda %87.1 oranında bulunduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı bireylerin *P. gingivalis* pozitif örneklerinde tip I *fimA*'nın (%76.1) yaygın olduğu izlenirken, periodontitisli hastalarda tip II *fimA* (%66.1) yaygın olduğu gözlenmiştir. Periodontitiste *P. gingivalis* pozitif örneklerde tip II *fimA* ve tip IV *fimA* (tip I *fimA* %16, tip II *fimA* %44.44, tip III *fimA* %1.96, tip IV*fimA* %13.87 ve tip V *fimA* %1.4) genotipinin hastalık etiyopatogenezinde daha önemli rol oynayabileceği belirtilmiştir (Amano ve ark, 2000). Çalışmamızda sağlıklı bireylerde

P. gingivalis tespit edilmedi. AP'li bireylerde ise tip II *fimA*'nın 3. ayda %75 oranında yeniden kolonizasyon göstermesi tehlike yönünden Amono ve ark.'nın öngörüsü ile uyum göstermektedir.

P. gingivalis'in *fimA* genotipinin Brezilya halkında (25 sağlıklı, 20 gingivitis, 42 kronik ve 15 agresif periodontitis) dağılımları araştırılmıştır. *P. gingivalis*, sağlıklı bireylerde %8, G'li hastalarda %30, KP'li hastalarda %90.5, AP'li hastalarda %86.7 oranında pozitif bulunmuştur. Farklı *fimA* tiplerine ait olan tehlike faktörlerini ve nüfus üzerine dağılımı gösterilmiştir. Periodontitisli hastalarda *P. gingivalis fimA* dağılımı tip I %4.4, tip Ib %24.4, tip II %39.3, tip III %6.7, tip IV %5.2 ve tip V %0 oranında tespit edilmiştir. Tip II *fimA* yaygınlığı gösterilmiş ve *P. gingivalis*'in yapısı tanımlanmıştır (Missailidis ve ark, 2004). Yine *P. gingivalis ve fimA* genotipinin (tip I–V ve Ib) Çin popülasyonundaki (115 kronik peridontitis ve 136 sağlıklı birey) dağılımları araştırılmıştır. Sağlıklı bireylerde %21.7, kronik periodontitis hastaların %81.7'sinde *P. gingivalis* bulunduğu tespit edilmiştir. *P. gingivalis* pozitif sağlıklı bireylerde tip I *fimA* %66.7 oranında en yaygın şekilde izlenirken, KP'li hastalarda tip II *fimA* %43.6 genotipinin en yaygın ve daha sonra tip IV *fimA* %30.9 ile olduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark, 2007). Çalışmamızda sağlıklı peridonsiyumda *P. gingivalis* tespit edilmediğinden, subtipleri olan tip I *fimA* ve tip II *fimA* ile ilgili genotiplerinin araştırması yapılmadı. AP hastalarında ise *P. gingivalis* %70 oranında tespit edildi. *P. gingivalis* pozitif hastalarda tip I *fimA* %42.8 ve tip II *fimA* %57.7 yaygınlığında tespit edildi. Tip I *fimA* ve tip II *fimA* genotiplerinin dağılımı açısından KP ve AP hastalarında sonuçlar Zhao ve ark'nın yaptığı çalışma ile uyum göstermektedir.

Bizim yaptığımız çalışmada AP'li hastaların mikrobiyal profili incelendi. KP'li bireyler ile kıyaslandığında, daha önce tedavi edilmemiş ya da herhangi bir medikasyon (antibiyotik, antienflamatuar) almamış AP'li bireylerin toplumda rastlanma oranı çok daha azdır. Tüm bu nedenlerle, çalışmaya dahil edilme kriterlerine uyan hasta sayısı az olduğundan, çalışma 10 hasta üzerinde yürütüldü. Hasta sayısı sınırlı olmakla birlikte, cerrahi olmayan tedavi sonrası 1. ayda patojenlerin tespit edilme yüzdesi düşerken, 3. ayda mikroorganizmalarda yeniden artış olduğu saptandı. AP'li hastalarda cerrahi olmayan faz I tedavinin tek başına yetersiz olabileceği, hastalar takip edilirken, plak örnekleri alınarak, tespit edilen mikroorganizmalara uygun kemoterapinin (antibiyotik) başlanmasında yönlendirici ve klinik uygulamalarda faydalı olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonucunda, Agresif Peridontitis (AP) hastalarında diş taşı temizliği ve kök yüzey düzleştirmesi işlemlerini kapsayan faz I periodontal tedavi öncesi alınan örneklere göre, Faz I periodontal tedavi sonrası 1. ayda periodontopatojenlerde *A. actinomycetemcomitans*'da %85.71, *T. forsythia*'da %90, *T. denticola*'da %75 kadar ve *P. gingivalis*'de ise %100 kadar azalma tespit edildi. Bununla beraber, faz I tedavi sonrası 1. aya kıyasla 3. ay da alınan örneklerde ilgili baktrilerde yeniden artış olduğu gözlendi.

Agresif Peridontitis hastalarında Faz I tedavi sonrası 3. ayında periodontopatojenlerin yeniden kolonizasyon olduğu için bu grup hastaların idame fazında düzenli takibinin yapılması ve tedaviye ilave olarak kemoterapinin düşünülmesi önerilir.

Real-time PCR'da çalışılan 36 örnek sonuçlarına göre *A. actinomycetemcomitans*'da uyumsuz çıkan 2, 5, 6, 4^a, 1^b ve 2^b numaralı örnekler ile *P. gingivalis*'de uyumsuz çıkan 2, 3 ve 6^b numaralı örneklerden yeniden izolasyon yapılarak bu örnekler PCR ile tekrar çalışıldı. *A. actinomycetemcomitans*'ın daha önce pozitif çıkan 5, 6 numaralı örnekleri negatif, *P. gingivalis*'in daha önce negatif çıkan 2, 3 numaralı örneklerinin pozitif olduğu tespit edildi. Diger örneklerde sonuç değişmedi.

PCR sonuçlarına göre *A. actinomycetemcomitans*'da uyumsuz çıkan 3^b, 9^b ve *P. gingivalis*'de uyumsuz çıkan 4^b, 8^b numaralı örneklerden yeniden DNA izolasyonu yapılarak Real-time PCR'da çalışıldı. Daha önce negatif çıkan örneklerin pozitif olduğu saptandı. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere iki sistemin de hata

yapma oranının biribirine yakın olduğu tespit edildi. (1-10 arası faz I tedavi öncesi hasta örnek numaraları, 1^{a}-10^{a} arası faz I tedaviden 1 ay sonrası alınan örnek numaraları ve 1^{b}-10^{b} faz I tedaviden 3 ay sonrası alınan örnek numaraları).

Subgingival plaklarda DNA tespitinde Real-time PCR'ın klasik PCR'a göre daha güvenilir, duyarlı ve laboratuvar çalışmalarının daha kısa sürede tamamlanmasına rağmen yüksek maliyette olduğu düşünüldüğünde her iki sistemin de başlangıçta DNA'yı tespit etmede biribirine benzer sonuçlar vermesi klinik uygulamalarda daha düşük maliyette olan klasik PCR'ın kullanılması, kantitasyon ve hassasiyet gerektiren çalışmalarda ise Real-time PCR'ın tercih edilmesi önerilir.

7. KAYNAKLAR

Amano, A., Nakagawa, I., Kataoka, K., Morisakı, I., Hamada, S. 1999 Distribution of *Porphyromonas gingivalis* Strains With *fimA* Genotypes in Periodontitis Patients. Journal of Clinical Microbiology 1426-1430

Amano, A., Kuboniwa, M., Nakagawa, I., Akiyama, S., Morisaki, I., Hamada, S. 2000 Prevalence of Specific Genotypes of *Porphyromonas gingivalis fimA* and Periodontal Health Status. J Dent Res 79(9): 1664-1668

Armitage, G.C. 1999 Development of a classification system for periodontal diseases and conditions, Annals of Periodontol 4,1-6

Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I., Slots, J. 1996 Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontal lesions. Oral Microbiol Immunol 11:266-73.

Avila-Campos, M.J., Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W. 1999 Specific Primer for AP-PCR Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Periodontol 26: 699–704.

Baumgartner, J.C., Hutter, J.W., Siqueira, J.F. 2006 Endodontic Microbiology and Treatment of Infections. In: Cohen S, Hargreaves KM, editors. Pathways of the Pulp. 2nd ed. Canada: Mosby Elsevier p. 580-607

Boutaga, K., van Winkelhoff, A.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Savelkoul, P.H.M. 2006 The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. J Clin Periodontol 33: 427–433.

Carranza, F.A, Newman, M.G. 2002 Clinical Periodontology. 9th edition, W.B. Saunders Company.USA

Chan, E.C.S., Siboo, R., Touyz, L.Z.G., Qiu, Y.S., Klitorinos, A. 1993 A successful method for quantifying viable oral anaerobic spirochetes. Oral Microbiol Immunol. 8:80-83

Conrads, G., Mutters, R., Fisher, J., Brauner, A., Lutticken, R., Lampert, F. 1996 PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. J Periodontol 67:994-1003.

Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill III, F. R., Smith, T. F. 2006 Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clinical Microbiology Reviews p.165-256

Flemmig, T.F. 1999 *Periodontitis,* Annals of Periodontol, 4,32-37.

Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E. 1999 Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential Biotechniques. 26(1):112-22, 124-5.

Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Lewontin, R.C., Miller, J.H. 2002 Modern Genetic Analysis 221-223, WH Freeman and Company USA

Gold, S.I. 1985 Pæriodontics. The past. J Clin Periodontol 12,257-269.

Goulhen, F., Hafezi, A., Uitto, V.J., Hinode, D., Nakamura, R., Grenier, D., Mayrand, D. 1998 Subcellular localization and cytotoxic activity of the GroEL-like protein isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Infect Immun 66: 5307-5313.

Hake, S.K. 1996 Periodontal Microbiology in "Clinical Periodontology" Ed.by FA Carranza, MG Newman 84-103,WB Saunders Co Newyork.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. 1996 Real time quantitative PCR Genome Res. 6(10):986-94

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992 Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y). 10(4):413-7.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. 1993 Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y). 11(9):1026-30.

Howard, K.K., Xuesong, H., Renate, L., Maxwell, H.A., Wenyuan, S. 2007 Interspecies Interactions within Oral Microbial Communities. Microbiology and Molecular Biology Reviews p. 653-670, Vol. 71, No. 4

+Jervøe-Storm, P.M., Koltzscher, M., Falk, W., Dörfler, A., Jepsen, S. 2005 Comparison of Culture and Real-Time PCR For Detection and Quantification of Five Putative Periodontopathogenic Bacteria in Subgingival Plaque Samples. J Clin Periodontol 32: 778–783.

Kesavalu, L., Ebersole, J.L., Machen, R.L., Holt, S.C. 1992 Porphyromonas gingivalis virulence in mice: induction of immunity to bacterial components. Infection and Immunity 60(4): 1455–1464

Klitorinos, A., Noble, P., Siboo, R., Chan, E.C. 1993 Viscositydependent locomotion of oral spirochetes. Oral Microbiol Immunol 8: 242-244.

Kirby, A.C., Meghji, S., Nair, S.P., White, P., Reddi, K., Nishihara, T., Nakashima, K., Willis, A.C., Sim, R., Wilson, M. 1995 The potent bone-

resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL. J Clin Invest 96: 1185-1194

Kornman, K.S., Newman, M.G. 2000 Role of genetics in assessment, risk, and management of adult periodontitis In 'Periodontal Medicine' Ed by LF Rose 45-62, BC Decker Inc Hamilton

Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J.M., Martı´n, C., Silva, A. 2004 Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Versus Culture: a Comparison Between Two Methods For The Detection and Quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in Subgingival Plaque Samples. J Clin Periodontol 31: 1061–1069

Lee, L.G., Connell, C.R., Bloch, W. 1993 Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res. 11;21(16):3761-6.

Listgarten, M.A. 1985 Microbiological diagnosis of periodontitis, J Periodontol 4,367-369.

Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. 1995 Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl. 4(6):357-62.

Löe, H., Anerud, A., Boysen, H., Morrison, E. 1986 Natural history of periodonta disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age, J Clin Periodontol 13,431-445.

Mekalanos, J.J. 1992 Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. J Bacteriol 174:1-7.

Missailidis, C.G., Umeda, J.E., Ota-Tsuzuki, C., Anzai, D., Mayer, M.P.A. 2004 Distribution of fimA Genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in Subjects With Various Periodontal Conditions. Oral Microbiol Immunol 19: 224–229.

Morillo, J.M., Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Martı´n, C., Silva, A. 2004 Quantitative Real-Time PCR Based on Single Copy Gene Sequence For Detection of Periodontal Pathogens. J Clin Peridontol 31: 1054–1060

Nakagawa, I., Amano, A., Kuboniwa, M., Nakamura, T., Kawabata, S., Hamada, S. 2002 Functional differences among *FimA* variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. Infect Immun 70: 277-285.

Noonnenmachera, C., Dalpkea, A., Muttersa, R., Heegb, K. 2004 Quantitative Detection of Periodontopathogens by Real-Time PCR. Journal of Microbiological Methods 59: 117– 125

Nunn, M.E. 2003 Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. Periodontol 32,11-23

Okada, M., Hayashi, F., Nagasaka, N. 2001 PCR Detection of 5 Putative Periodontal Pathogens in Dental Plaque Samples From Children 2 to 12 Years of Age. J Clin Periodontol 28: 576–582.

Potempa, J., Banbula, A., Travis, J. 2000 Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. Periodontol 24: 153-192.

Rainer, S., Brigitta, K., Michael, B. 1999 Quantification of the Flavonoid Degrading Bacterium *Eubacterium ramulus* in Human Fecal Samples with a Species-Specific Oligonucleotide Hybridization Probe. Applied and Environmental Microbiology p. 3705–3709

Raeymaekers, L. 2000 Basic principles of quantitative PCR. Mol Biotechnol. 15(2):115-22.

Reiter, S.R., Young, M., Scolnik, P.A. 1993 Genetic linkage of the arabidopsis genome: Methods for Mapping with Recombinant Inbreds and RAPDs. Methods in Arabidopsis Research, World Scientific Publishing, Singapore

Richard, J.L., Howard, F.J. 1998 Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis.* Microbiology Molekular Biology Revievs p.1244–1263

Roças, I.N., Siqueira, J., Andrade, A.B.F., Uzeda, M. 2002 Identification of Selected Putative Oral Pathogens in Primary Root Canal Infections Associatedwith Symptoms. Anaerobe 8: 200–208

Rudney, J.D., Chen, R., Pan, Y. 2003 Endpoint Quantitative PCR Assays For *Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodont Res 38; 465–470.

Sakamoto, M., Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishikawa, I., Benno, Y. 2001 Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. Microbiol Immunol. 45(1):39-44.

Sakamoto, M., Suzuki, M., Umeda, M., Ishikawa, I., Benno, Y. 2002 Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner *et al*. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol 52, 841-849.

Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J.M., Silva, A. 2004 Methods of Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* in Periodontal Microbiology, With

Special Emphasis on Advanced Molecular Techniques. J Clin Periodontol 31: 1034–1047

Schluger N.W., Rom, W.N. 1995 The polymerase chain reaction in the diagnosis and evaluation of pulmonary infections. Am. J. Respir. Crit. Care Med., Vol 152, No. 1, 11-16

Sharma, A., Inagaki, S., Honma, K., Sfintescu, C., Baker, P.J., Evans, R.T. 2005 *Tannerella forsythia*-induced alveolar bone loss in mice involves leucine-rich-repeat BspA protein. J Dent Res. 84(5):462-7

Siqueira, J.f., Roças, I.N. 2003 PCR methodolgy as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. J Dent. 31: 333-9

Stuber, W.C. 1992 Biochemical and molecular markers in plant breeding. Plant Breeding News. 9: 36-61.

Socransky, S.S., Haffajee, A.D. 2003 Micrabiology of Periodontal Disease in "Clinical Periodontology and implant dentistry" Ed.by J Lindhe, T Karring, NP Lang, 106-139.

Tanner, A. C. R., Listgarten, M. A., Ebersole, J., Strezempko, M. N. 1986 *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow-growing, fusiform *Bacteroides* sp. from the human oral cavity. Int. J. Syst. Bacteriol. 36:213-221

Tran, S.D., Rudney, J.D. 1996 Multiplex PCR Using Conserved and Species-Specific 16SrRNA Gene Primers For Simultaneous Detection of, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis.* Journal of Clinical Microbiology 2674-2678

Tatakis, D.N., Trombelli, L. 2004 Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis 1. Background review and rationale, J Clin Periodontol 31,229-238.

Tompkins, L.S. 1992 The use of molecular methods in infectious diseases. N Engl J Med 327 (18):1290-7

Verner, C., Lemaitre, P., Daniel, A., Giumelli, B., Lakhssassi, N., Sixou, M. 2006 Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. Oral Microbiol Immunol. 21(6):341-6.

Voytas, D. 2001 Agarose gel electrophoresis. Curr Protoc Mol Biol. 2:Unit2.5A.

Yoshimura, A., Hara, Y., Kaneko, T., Kato, I. 1997 Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. J Periodontal Res 32: 279 286.

Watanabe, K., Frommel, T.O. 1996 *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobaciltus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the poiymerase chain reaction. J Clin Periodontol 23: 212-219.

Wittwer, C.T., Herrman, A.A., Rasmussen, R.P. 1997 Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques. 22, 130–138.

Zambon, J.J. 1985 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol 12:1-20.

Zhao, L., Wu, Y.F., Meng, S., Yang, H., OuYang, Y.L., Zhou, X.D. 2007 Prevalence of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status in Chinese adults. J Periodont Res; 42: 511–517.