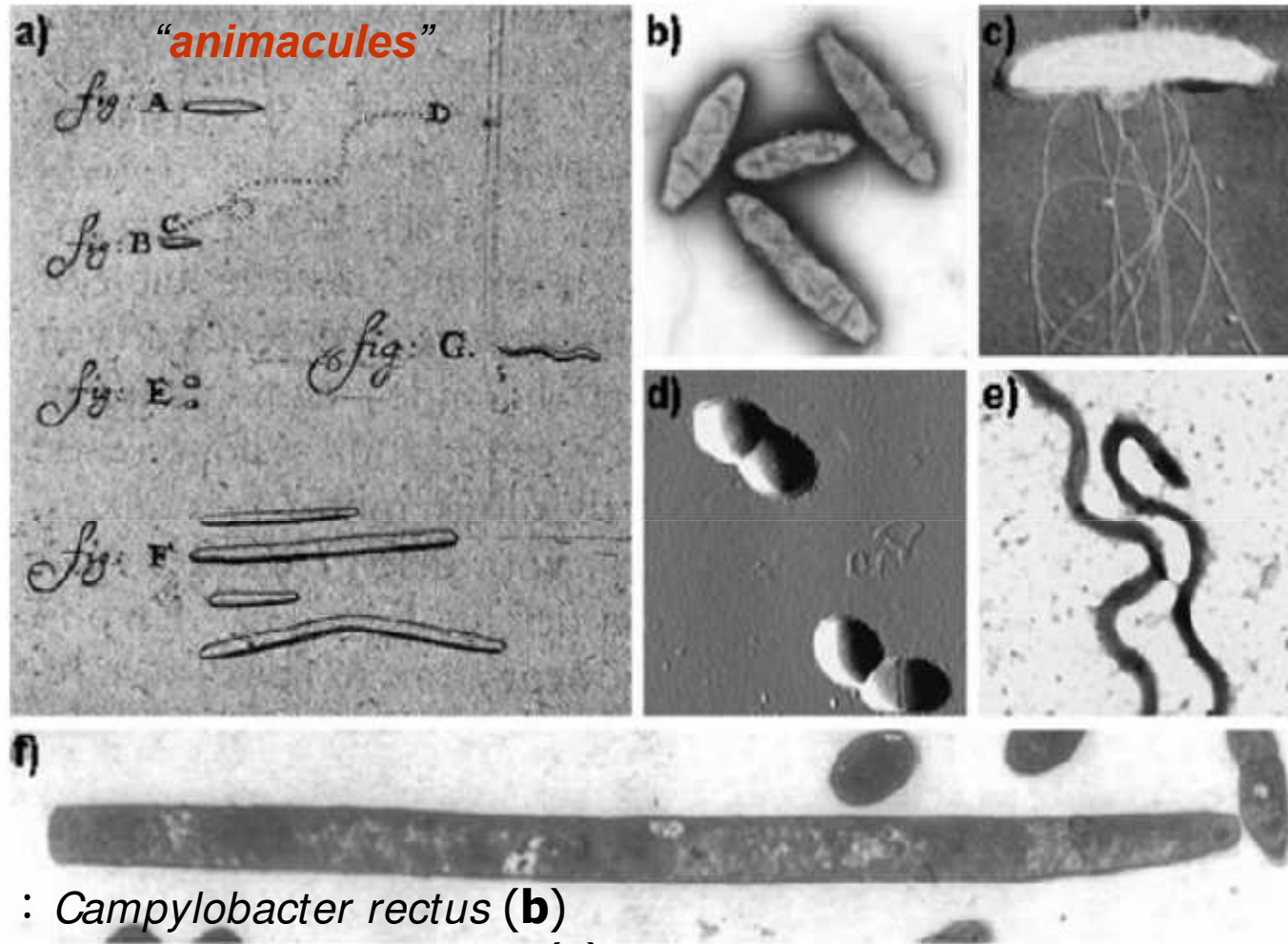


Ağız mikrobiyolojisi, mikrobiyolojinin tam başlangıcında **17 Eylül 1683**



- A : *Campylobacter rectus* (b)
B-C-D : *Selenomonas sputigena* (c)
E : Ağız kokları (d)
G : *Spirillum* sp / *Treponema denticola* (e)
F : *Leptotrichia* (*Leptotrix*) *buccalis* (f)

Kuramitsu ve ark,
Microbiol Mol Biol Rev 2007

Leeuwenhoek'un inceleme maddesi

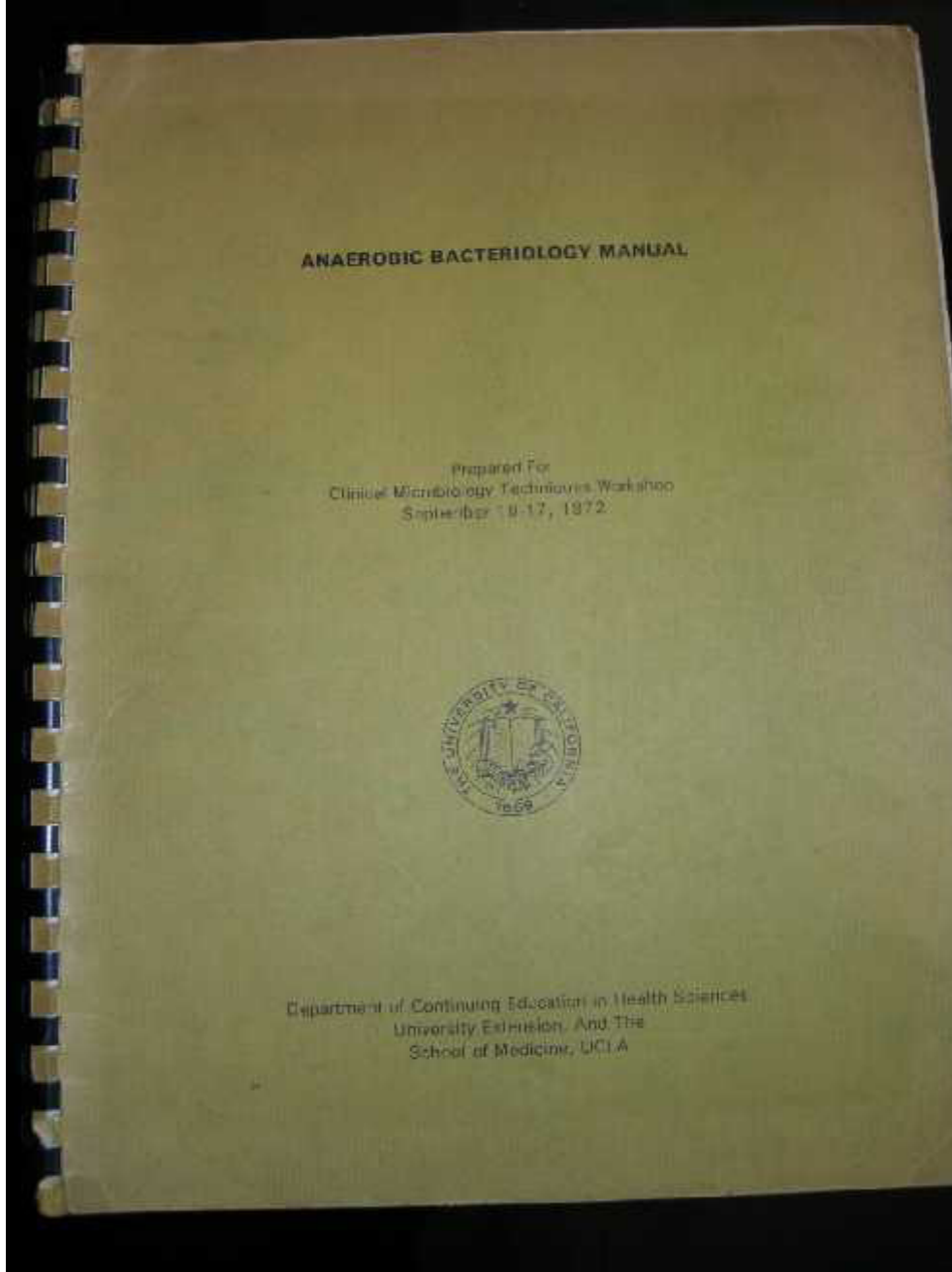
Diş Plak Biyofilmi

Çok temiz olmayan bir dişteki bakteri sayısı 100 milyon-1 milyar

>10 milyon bakteri / mg



Anaerop bakteriyoloji tekniklerindeki ilerlemeler



Etken bakterilerin saf kültürle saptanması

Koch - Modifiye Koch hipotezleri

Normal ağız mikroflorası

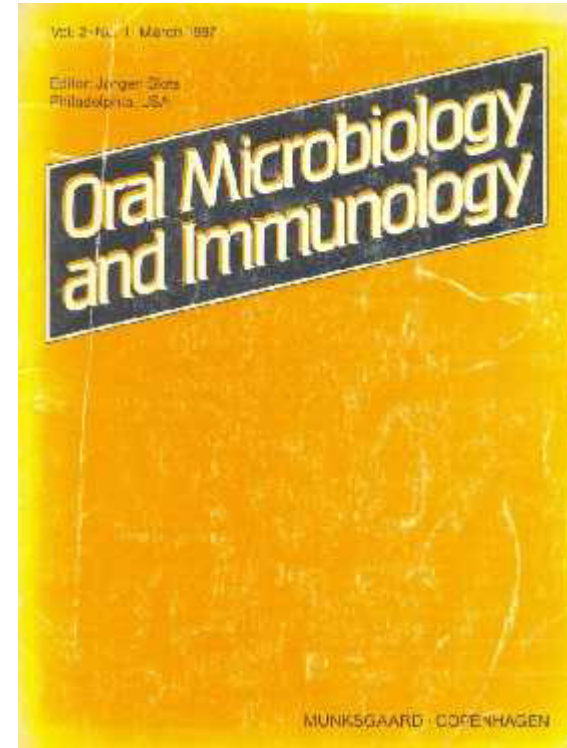
Kantitatif Anaerop Bakteriyoloji



Diş hekimliği /Ağız Mikrobiyolojisi

1980'li yıllar

- Dünyada ağız mikrobiyolojisi testleri diş hekimliği rutinine girdi.
- Diş hekimliği hizmeti “ustalık” değil “nedene” yönelik “tıbbi / çağdaş yaklaşım”



1990'lı yıllar Kültürden bağımsız yöntemler

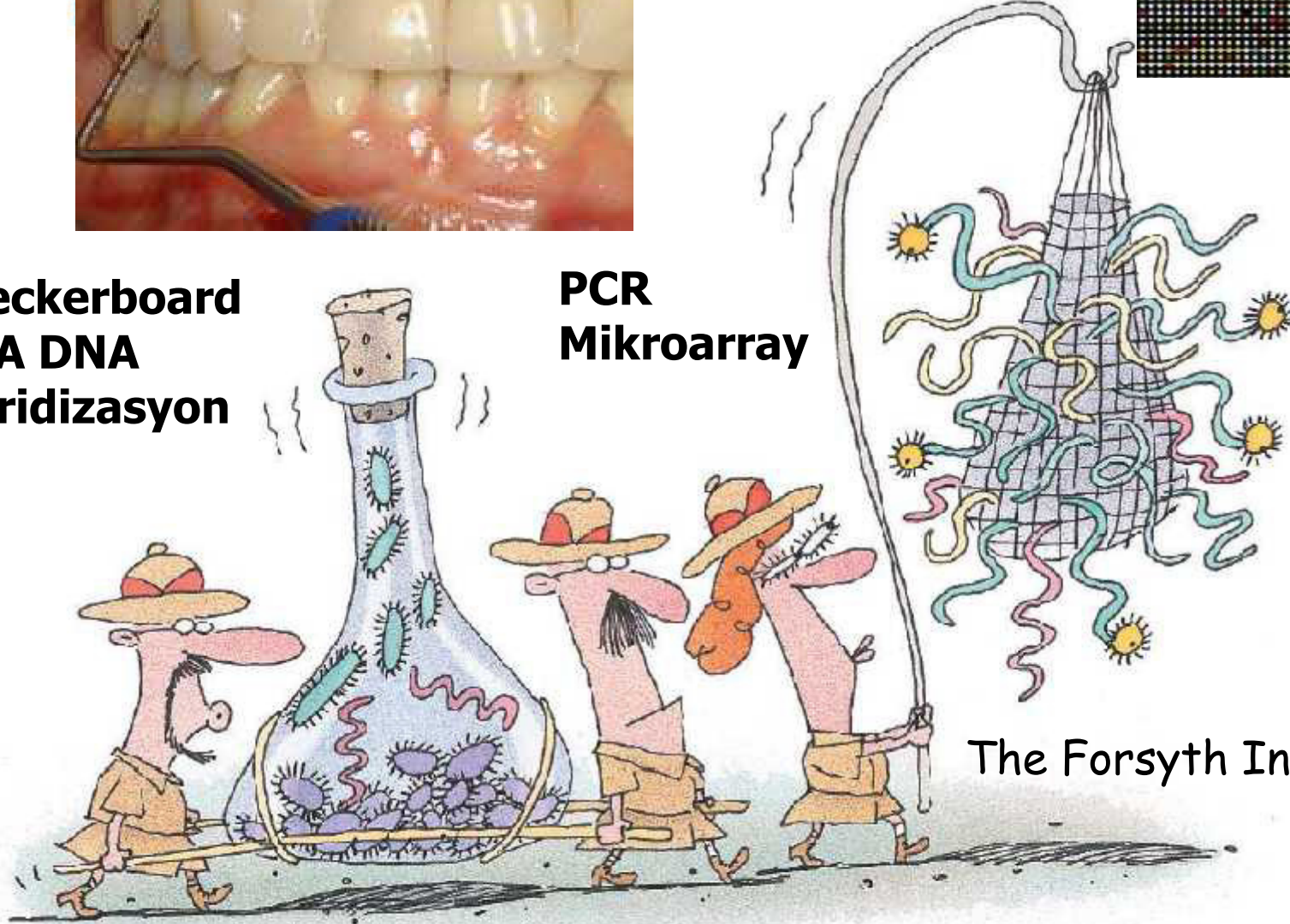


16 S rRNA geni



Checkerboard
DNA DNA
hibridizasyon

PCR
Mikroarray

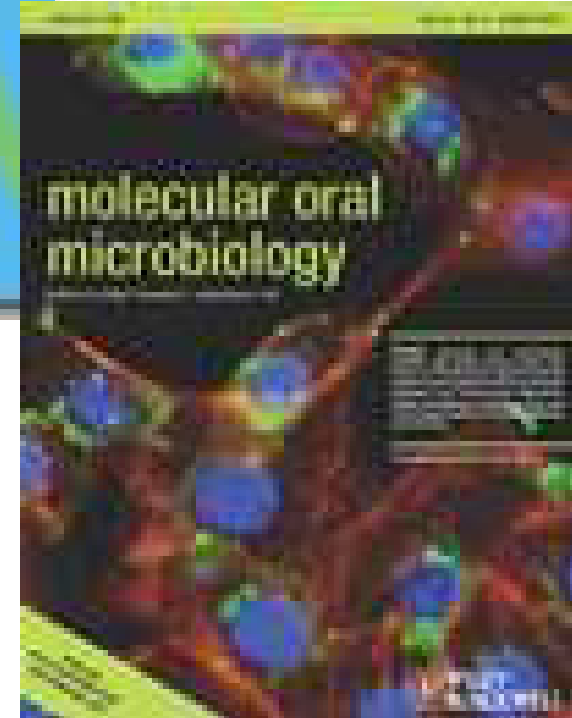
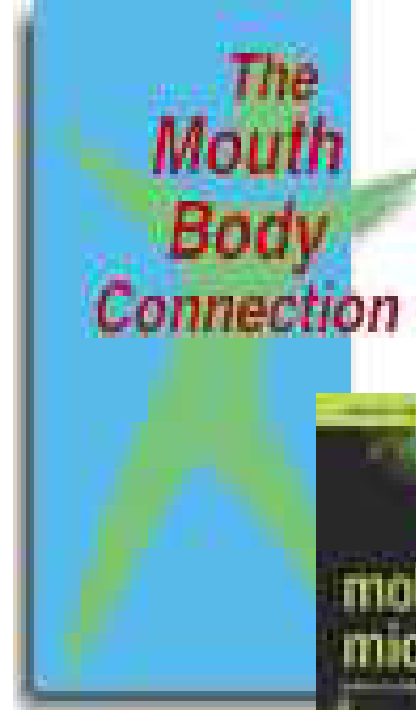


The Forsyth Institute

Diş hekimliği /Ağız Mikrobiyolojisi

2000'li yıllar

- ABD 2000 yılı Ağız Diş Sağlığı Raporu: **Ağız sağlığı, genel sağlığın bir parçası olarak değerlendirilmeli !**
- **Moleküler ağız mikrobiyolojisi** testleri rutine girdi.
- Ağız ve sistemik sağlık ilişkisi ile ilgili kanıtlar test düzeyinde artıyor.



AĞIZ DİŞ İNFEKSİYONLARI

- Çürük



- Periodontal infeksiyonlar



- Endodontal infeksiyonlar

- Ağız mukozası ile ilgili infeksiyonlar



- Orofasiyel infeksiyonlar

Ağız ve diş infeksiyonları

Endojen infeksiyonlar

Biyofilme dayalı

Çok faktörlü

Polimikrobiyal / Karışık anaerop infeksiyonlar

Etkenleri aeroplara göre
dört katı fazla sıklıkta anaerop bakteriler

Ekolojik kayma - Mikrobiyal kayma hastalığı

Disbiyoz (disbakteriyoz)

Yararlı olarak birlikte yaşayanların sayısında bir azalma ile ve/veya patojenlerin sayısında bir artış ile neden olunan hastalık

Kronik inflamatuvar hastalıklar

Sindemik hastalık



Mikroflora sağlıklıdan hastalıklı duruma geğmesine yol ağan değişiklikler :

- Farklı bakterilerin varlığı
- Gram (+) bakterilerin
Gram(-) deđişmesi,
- Özel türlerin artması,
- Bakterilerin virulans faktörlerini deđiştirmesi,
- Genetik duyarlık nedeniyle konağın immun yanıtındaki değişiklikler,
- Çevresel faktörler
- Yaş



- Bakteriler biyofilmlere neden giriyor ve çıkıyor ?
- Kommensal halden patojen hale geđmeleri ne tetikliyor?

Ağız -Sistemik Sağlık İlişkisinde Yeni Kavram SİNDEMİK Hastalık

**Bir toplumda
hastalık yükünün artmasına
katkıda bulunacak şekilde
birbiriyle sinerjist etkileşen,
iki ya da daha çok
sağlık sorunu.**



PERİODONTİTİS



Kardiyovasküler hastalık, inme,
Prematür, düşük kilolu bebek,
Pulmoner infeksiyonlar,
Diyabet,
Osteoporoz,
Şişmanlık,
Romatoid artrit,
Renal hastalıklar
Alzheimer hastalığı ile ilişkili !!

Ağız ve diş infeksiyonlarının tedavisi

- Tek başına lokal / sistemik antimikrobiyal tedavi ile iyileştirilemez.
- Hastalığa neden olan biyofilmin diş hekimi tarafından mekanik olarak uzaklaştırılması ve öğretilen ağız diş bakımı ile sürdürülmesi esastır.
- Tedavi ile bakteri tür oranları bozulsan bile ekosistemin orijinal dengeye geri dönme eğilimi vardır.
- Patojenlerin kontrolü, kalan ekosistemde zararlı değişikliklere yol açmamalıdır.





Human Microbiome Project

İnsan Mikrobiyom Projesi



- Mikrobiyom terimi, **sağlık ve hastalığın tam olarak anlaşılabilmesi bizimle yaşayan mikrorganizmalar ve insan vücudunun bir "süperorganizma" kompleks interaktif sistem olarak ele alınması görüşünden doğmuştur.**



[NIH Roadmap for Medical Research](#)

[International Human Microbiome Consortium](#)

[Canadian Institutes of Health Research](#)

[Canadian Microbiome Initiative](#)

Metagenomik yaklaşımla çalışılıyor
2008 yılında başladı beş yılda tamamlanacak !

Human Oral Microbiome (HOM)

Human Oral Microbiome Database (HOMD) (www.homd.org)

The National Institute of Dental and Craniofacial Research

The Forsyth Institute + King's College

Şimdilik ?

Dewhirst ve Paster



619 taksonun filogenetik dağılımı: 13 filum: *Actinobacteria*,
Bacteroidetes, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Euryarchaeota*,
Firmicutes, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, SR1,
Synergistetes, *Tenericutes*, TM7

Gram(+) cinslerin üstünlüğü !
Hastalık etiyolojilerinde değişiklik !

Hastalık etiyolojilerinde değişiklik !

Diş çürüğünde :

- Anaerop Gram pozitif çomak ***Scardovia wiggsiae***
- ***Bifidobacterium dentium*** Barsak kommensal bifidobakterileri ile yakından ilişkili. Diş plağında düşük pH'da yaşamak için edinilmiş genlere sahip. Dişsiz ağıza kolonize olmuyor.

İnatçı kök kanal infeksiyonlarında :

- *Enterococcus faecalis* yerine ***Dialister invisus***, ***Olsenella uli*** ve ***Synergistes*** türleri yaygın.

Periodontitiste : Bakteri topluluğu öncekinden çok fazla karışık !

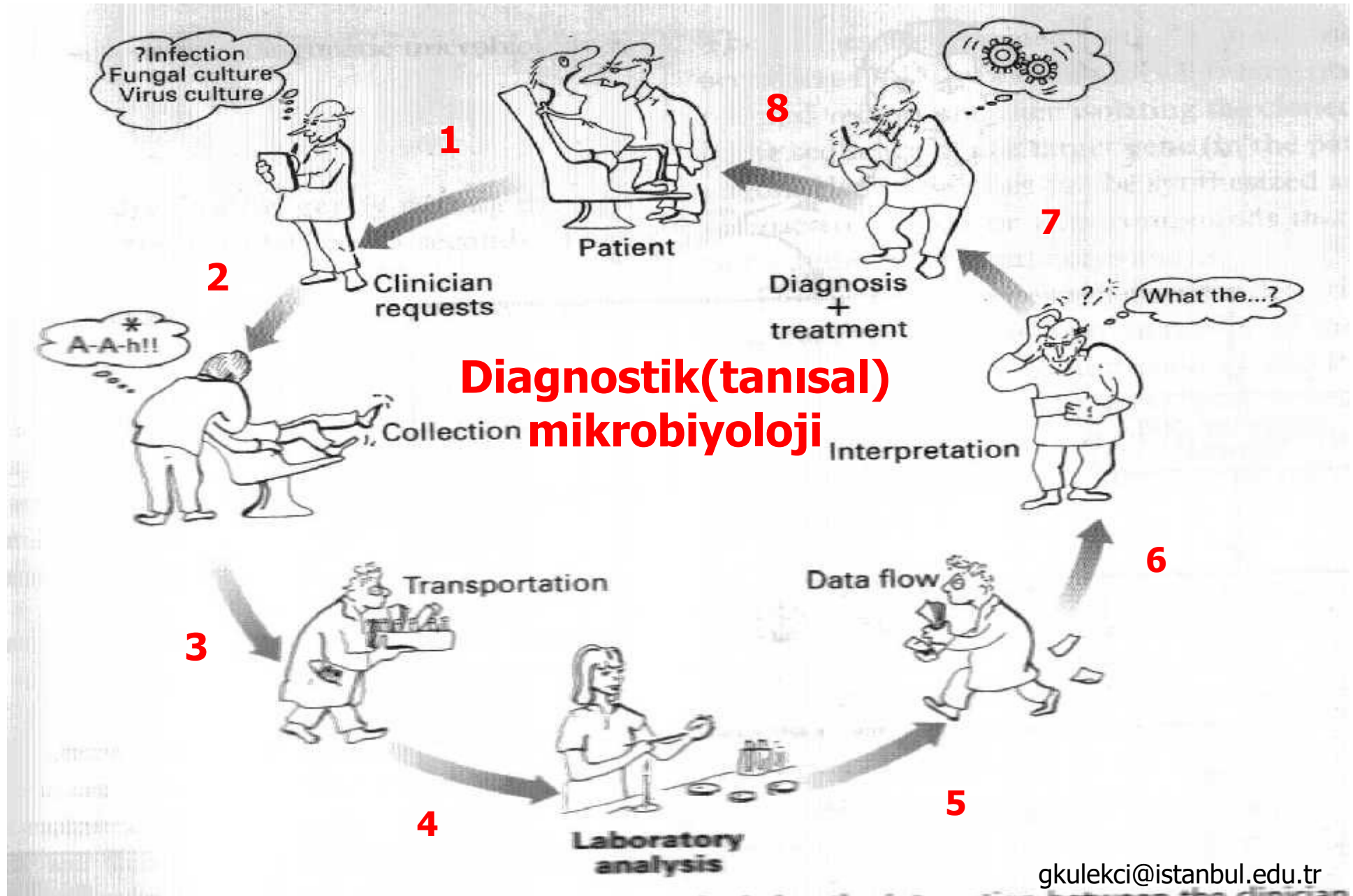
- *P. gingivalis* ve *Tannerella forsythia* + ***Eubacterium saphenum***
- Periodontal cepte ***Treponema*** çoklu filotiplerinin varlığı
- Treponemalar hemen hemen daima ağız yumuşak doku lezyonlarında

Human Oral Microbiome (HOM)

Human Oral Microbiome Database (HOMD) (www.homd.org)

- Filogenetik olarak en yakın türler hastalık / sağlık !
Tannerella forsythia / *Tannerella BU063*
- Virulans faktörleri için yeni kültür yöntemleri - biyofilm kültürü !
- **Sağlıkta çekirdek mikrobiyom ! Paylaşılan filotip seti**
- Tipik olarak hastalıklı bölgelerde bulunan mikrofloralar,
sağlıklı bölgelerdekine göre yapı olarak daha kompleks !

Diş Hekimi ve Ağız Mikrobiyolojisi Laboratuvarı



Periodontoloji ile ilgili mikrobiyolojik testler

Almanya – 5000 Diş Hekimi

%3-6 periodontolog

- Amerikan Company – OmniGene Lab Servis
DMDx/PATHOTEK

ANAWA laboratuvarları AG(Wangen, İsviçre)

Avrupa'da yılda 16.000 test-

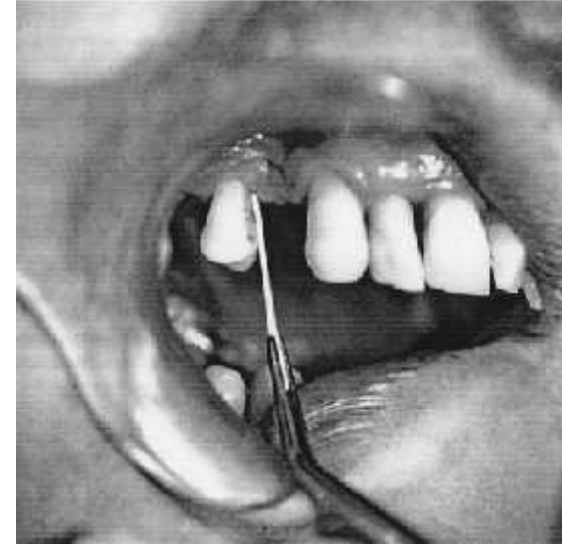
Almanya 14.000 test

İsviçre 600 test

- IAI Pado Test 4.5 –sistem(Institute for Applied Immunology, Zurih, İsviçre)
- LCL-sistem(LCL Biokey Gmb, Aachen Almanya),
Avrupa'da yılda 10.000 test
- HAIN-Diagnostik (Nehren, Almanya)
multipleks PCR testi

- Periodontal microbial identification test*
(Saigene Corporation, ABD)
Aa,Pg,Pi,Ec,Tf,Cr,Td,Fn
Hasta başı DNA prob testi

- LabOral* (Houten,Hollanda) **anaerop**
kültür yöntemiyle Aa,Tf,Fn,Pi,Pg,Pm
yılda >12.000 test



Conrads G. *Infect Dis Clin Prac*, 2001

Periodontoloji ile ilgili mikrobiyolojik testler 2004 yılı

GABA International laboratuvarları (Münschenstein, İsviçre)
bir **Real-Time Quantitative PCR testi** (Meridol® Perio Diagnostics)

6 periodontal patojen: ***A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*,
P.intermedia, *T.forsythia*, *F. nucleatum* ve *T. denticola***

Seçilen bölgelerden subgingival plak örnekleri
özel moleküler laboratuvarı (Carpegen GmbH, Münster, Almanya) gönderilir.
2 saat içinde sonuç alınır.

Symposium 'Microbiological tests in periodontal diagnosis and therapy' as
part of the conference of the **IADR** in **Istanbul on 27th August 2004**,

Prof. Lior Shapira the University of Jerusalem
Prof. Mariano Sanz the University of Madrid



2003 yılı ParoCheck® mikroarray testi

(Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen, Almanya)

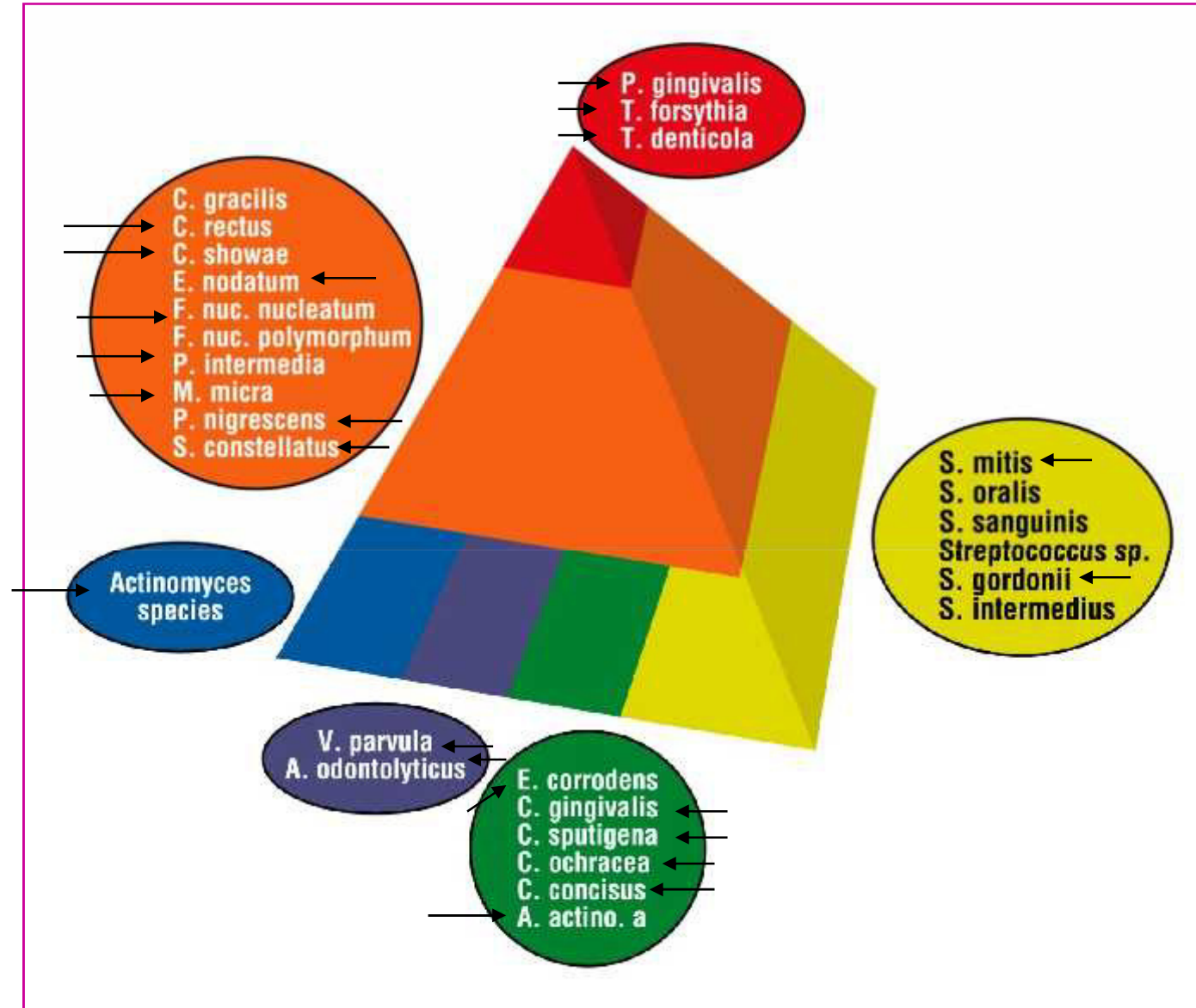
10 Patojen:

- *Porphyromonas gingivalis*,
- *Tannerella forsythia*,
- *Treponema denticola*,
- *Campylobacter rectus/ showea*,
- *Fusobacterium nucleatum*,
- *Parvimonas micra*,
- *Prevotella intermedia*,
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
a,b,c serotipleri,
- *Eikenella corrodens*,
- *Actinomyces viscosus*.

20 Patojen:

10 patojendekine ek olarak

Campylobacter gracilis,
Eubacterium nodatum,
Prevotella nigrescens,
Streptococcus constellatus,
Streptococcus gordonii,
Streptococcus mitis,
Campylobacter concisus,
Capnocytophaga türleri,
Actinomyces odontolyticus,
Veillonella parvula.



Parocheck® mikroarray testi

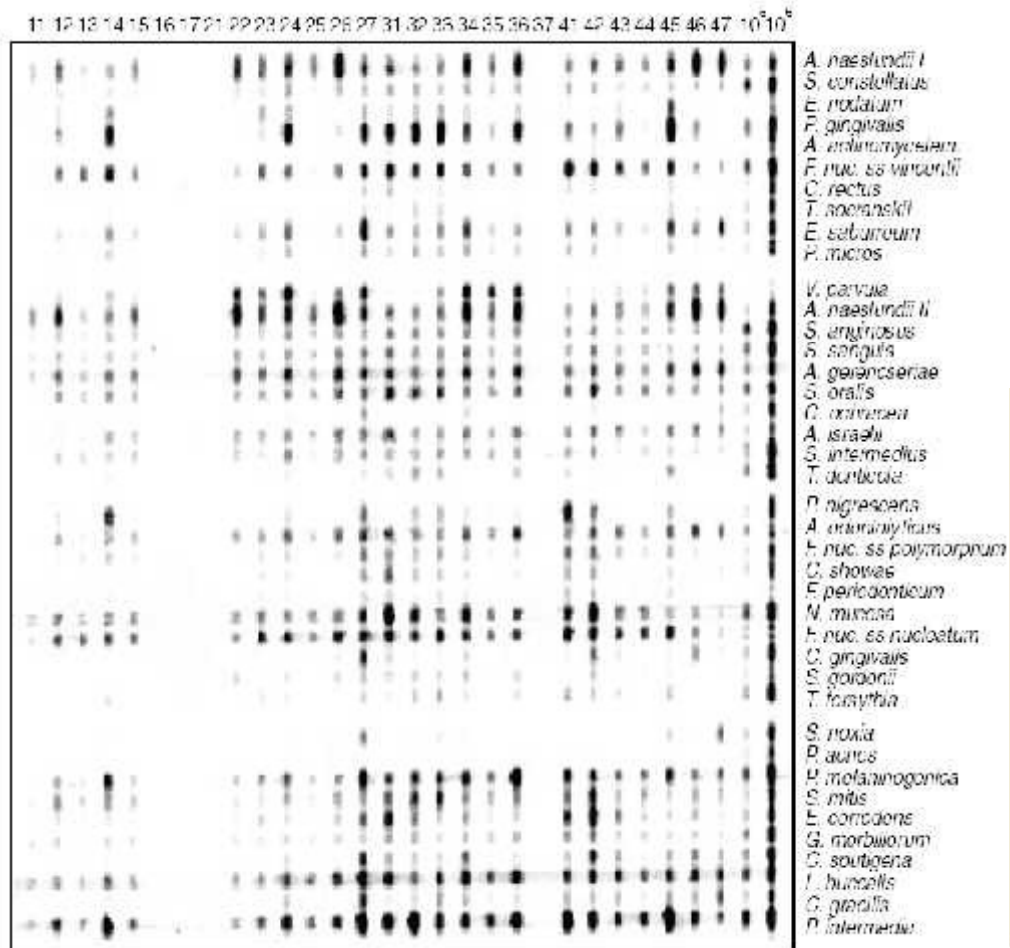
10 ya da 20
periodontal
patojenin aynı
anda hızlı ve
kesin tanısına
sağlayan
yarı kantitatif
ilk DNA çipidir.

Saptama limiti
 1×10^3
bakteridir.

Socransky SS ve ark J Clin Periodontol 1998.

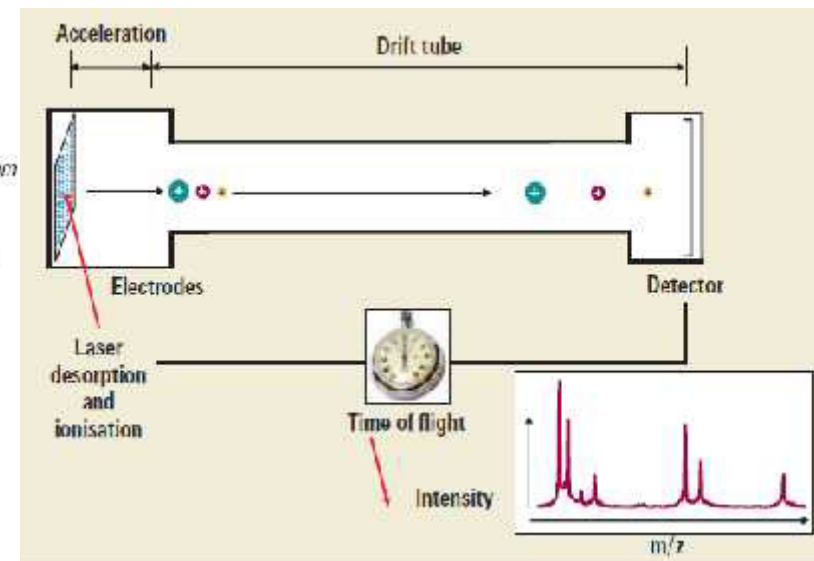
Checkerboard DNA-DNA hibridizasyonu

28 subgingival plak 40 bakteri türü



Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS

Stîngu CS ve ark 2008





İ Ü Diş Hekimliği Fakültesi



Ağız Mikrobiyolojisi Bilim Dalı Testleri

1. Çürük Aktivite Testi (ÇAT)
2. Tükürük akış hızı ve tükürük tamponlama kapasitesi tayini
3. Mutans streptokoklarının PCR ile tanısı
- 4. Subgingival plak biyofilm kültürü (antibiyogramsız)**
- 5. Periodontal patojenlerin PCR ile tanısı**
6. Periodontal hastalık genetik eğiliminde IL-1 polimorfizmi
- 7. Subgingival plak biyofilm mikroskop incelemesi**
- 8. Kök kanalı kültürü**
- 9. Kök kanalı patojenlerinin PCR ile tanısı**
- 10. Periodontal patojenlerin (10 ya da 20 tür)
ParoCheck® mikroarray (DNA çip) testi**
11. Ağızda herpes virüslerin PCR ile tanısı
12. Ağız yumuşak doku hastalıklarında mikrobiyolojik inceleme
- 13. Dentoalveolar abse cerahatinden kültür ve antibiyogram**
14. Sterilizasyon cihazlarının posta ile spor testi
15. Diş ünit su yollarının mikrobiyolojik kontrolü



İ Ü Diş Hekimliği Fakültesi

Ağız Mikrobiyoloji Laboratuvarı rutininde anaerob bakteriyoloji



Her test

- özel istek formları,
- klinik örnek alınması,
- laboratuvara gönderilmesi,
- rapor ve sonucun değerlendirilmesi gibi tüm basamakları ile tanımlıdır.

Testlerin

- ne işe yaradığı,
- nasıl istenmesi gerektiği,
- raporun nasıl yorumlanacağı
- bu yoruma göre yapılması uygun koruyucu ya da tedavi edici uygulamalar için yol gösterici olunmaktadır.

Periodontal, endodontal infeksiyonlarında mikrobiyolojik test endikasyonları

1-Antibiyotik seçimi için

- Erken, agresif, inatçı ve atipik periodontitis olgularında
- Kök kanalı tedavisine yanıt vermeyen inatçı olgularda
- Periodontal başlangıç tedavisi sonrası >5 mm derinlikli ya da cerahatli cepler sürüyorsa
- İmmun yetmezlikli hastalarda
- Medikal yetmezlikli hastalarda
- Peri-implantitiste

2-Rekürrens ve prognoz bilgisi için

- Tedavinin başarı kontrolünde
- Randevu zamanını belirlemede

3-Risk belirlemek için

- Yeni ve eski periodontitis hastalarında
- İmplant, protez ya da ortodontik tedavi öncesinde

Subgingival plak biyofilm kültürü

Periodontal hastalıklardan sorumlu olan subgingival plak biyofilm örneklerinin **anaerop kantitatif kültür yöntemiyle** değerlendirilmesidir.

Zaman alıcı , zor ve masraflı

Subgingival plak biyofilm örnekleri **hasta dişler ya da implantlardan** Bölgesel (tek,tek) ya da genel (toplama) olarak alınır.



VMGA III

Subgingival plak biyofilm kültürü

- Kültür : Total bakteri,fakültatif,zorunlu anaerop bakteri sayısı
Porphyromonas gingivalis
Prevotella intermedia / nigrescens / pallens
Fusobacterium türleri
Capnocytophaga türleri
Eikenella corrodens
- Kültür : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- Kültür : *Tannerella forsythia*
- Kültür : *Candida albicans*
- Kültür : Enterik çomaklar

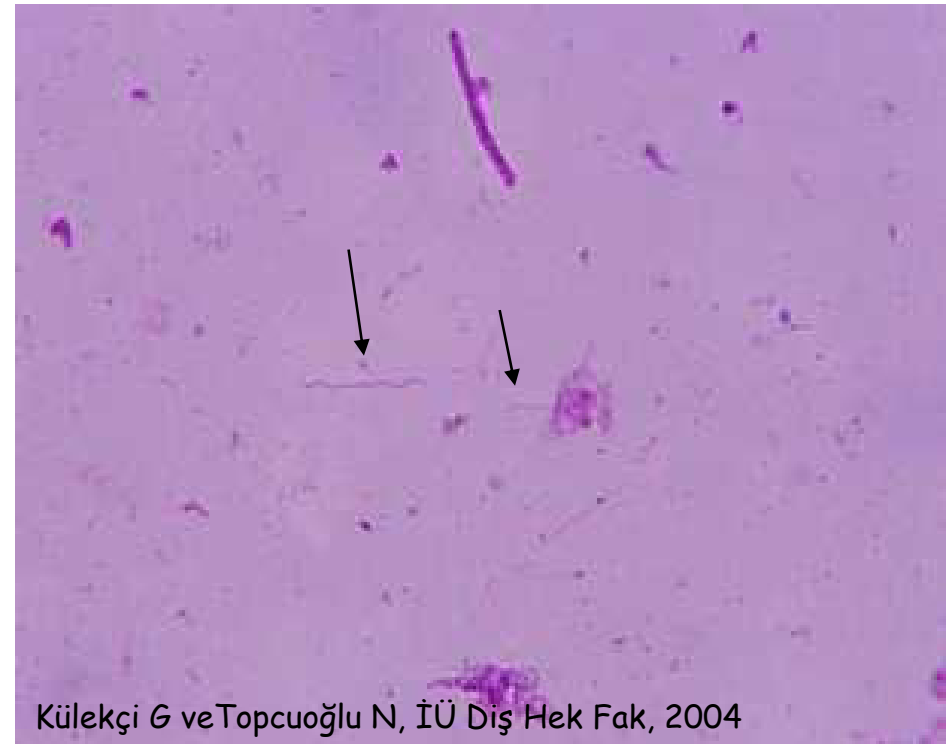


Subgingival plak biyofilm mikroskop incelemesi

□ Mikroskop incelemesi : Spiroket % si

Subgingival plak biyofilminde
spiroket varlığı,
hastalık lehine bir bulgudur.

- Periodontal hastalık değerlendirilmesi
- Tedavinin başarısını izlemek
- Diş bakımını öğretmek için kullanılır.

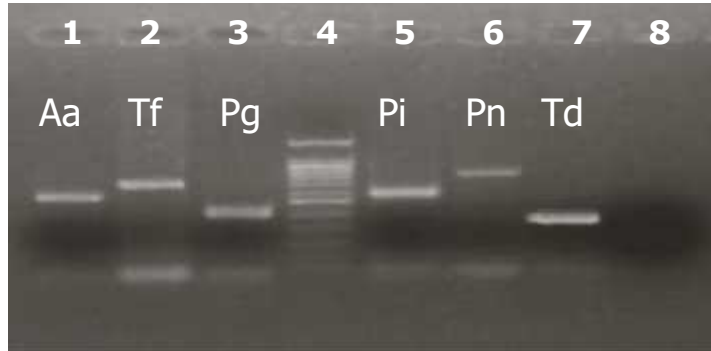


Külekçi G ve Topcuoğlu N, İÜ Diş Hek Fak, 2004

Periodontal patojenlerin PCR ile tanısı

- Subgingival plak biyofilm
- Tükürük
- Ağız içi doku örneklerinden

istek üzerine her patojen için
ayrı ayrı olmak üzere hızlı tanı



İÜ Diş Hek Fak, Anaerobe 2009

Türe özel 16SrRNA primerleriyle

- ☐ *Porphyromonas gingivalis*
- ☐ *Tannerella forsythia*
- ☐ *Treponema denticola*
- ☐ *Prevotella intermedia*
- ☐ *Prevotella nigrescens*
- ☐ *Campylobacter rectus*
- ☐ *Dialister pneumosintes*
- ☐ *Fusobacterium nucleatum*
- ☐ *Parvimonas micra*
- ☐ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Kök kanalı kültürü

Zaman alıcı, zor ve masraflı test olduğu
göz önüne alınmalı

Total bakteri sayısı /kanal

Fakültatif anaerop bakteri sayısı / kanal

Zorunlu anaerop bakteri sayısı / kanal

Anaerop siyah pigmentli bakteri sayısı / kanal

Porphyromonas endodontalis,

Porphyromonas gingivalis,

Prevotella intermedia / nigrescens / pallens,

Fusobacterium türleri,

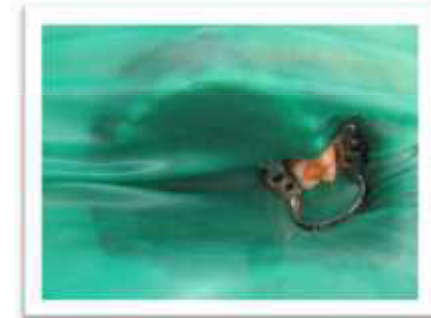
Enterococcus faecalis,

Capnocytophaga türleri,

Eikenella corrodens,

Candida albicans,

Enterik çomaklar



Özyöneş S MÜ Diş Hek Fak 2010

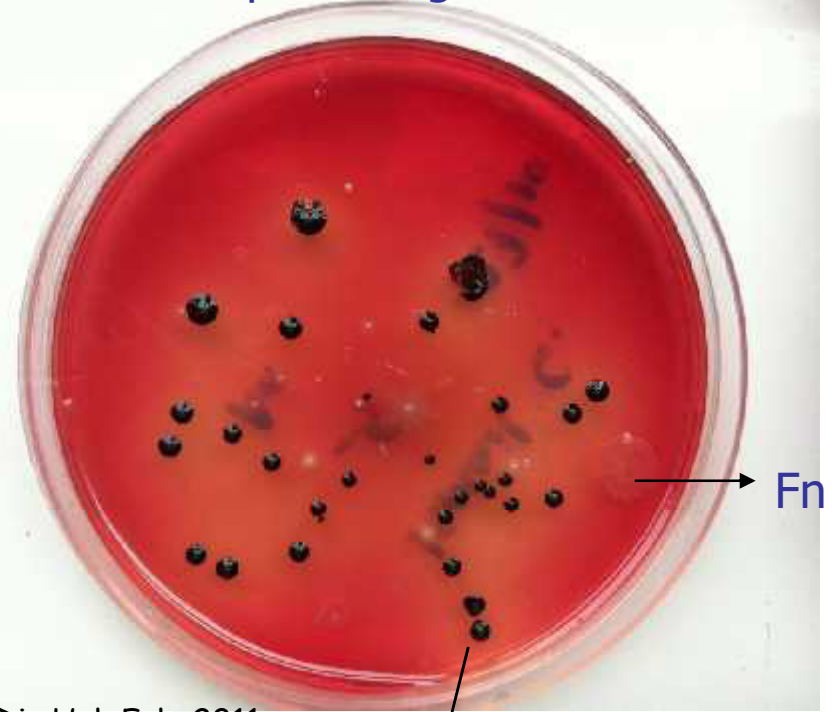


Kök kanalı kültürü

CDC anaerop kanlı agar 10^{-3}



CDC anaerop kanlı agar 10^{-5}



Topcuoğlu N, Yıldız S. İÜ Diş Hek Fak, 2011

Total bakteri sayısı $5,4 \times 10^7$ cfu/ml

Fakültatif anaerop 1×10^6 cfu/ml

Zorunlu anaerop $5,3 \times 10^7$ cfu/ml

An siyah pigmentli $2,9 \times 10^7$ cfu/ml



Pi/Pn/Pp

gkulekci@istanbul.edu.tr

Kök kanalı patojenlerinin PCR ile tanısı

Hastanın klinik durumuna göre varlığının önemli olduğu düşünülen patojenlerin hızlı tanısı.

Kök kanalı / Periapikal doku örneklerinde her patojen için ayrı ayrı olmak üzere



Türe özel 16SrRNA primerleriyle

Enterococcus faecalis ,

Fusobacterium nucleatum,

Filifactor alocis,

Pyramidobacter piscolens

(Synergistes oral clone BA121)

Campylobacter rectus,

Parvimonas micra,

Porphyromonas endodontalis,

Porphyromonas gingivalis,

Tannerella forsythia,

Treponema denticola,

Prevotella intermedia,

Prevotella nigrescens,

Dialister pneumosintes,

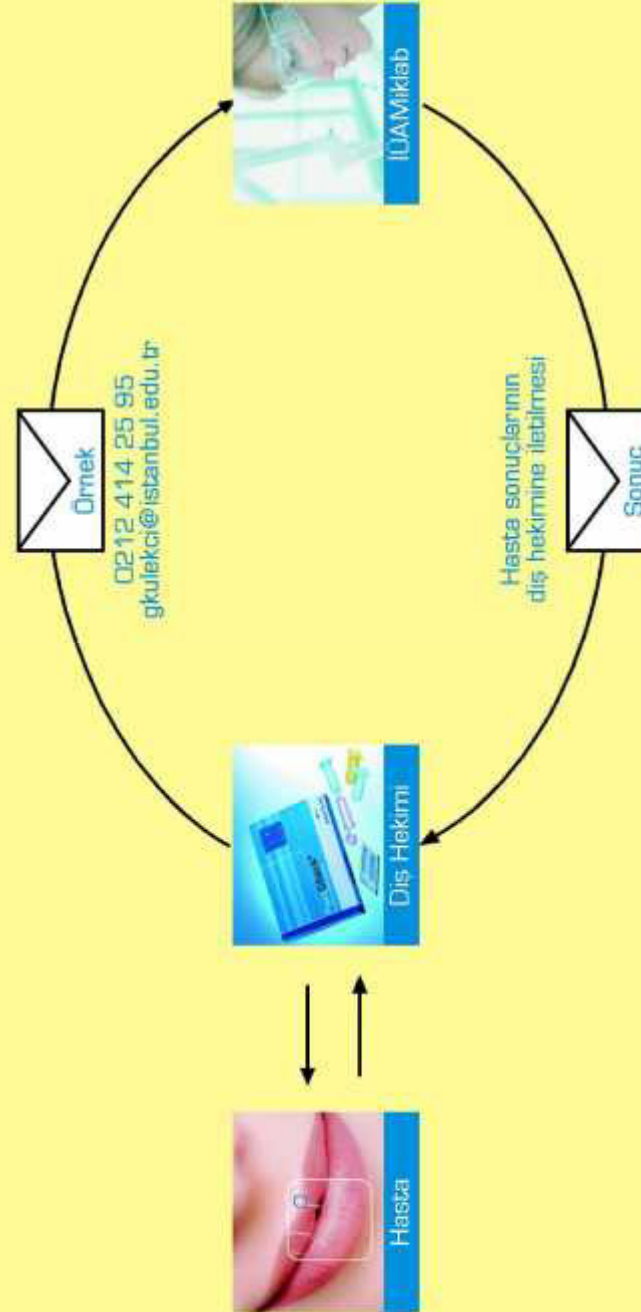
Aggregatibacter

actinomycetemcomitans

Parocheck® mikroarray testi

Tükürük/
Diş ya da implant
subgingival plak
biyofilmi/
Kök kanalı /
Doku örneklerinde

10 ya da 20
periodontal
patojen
semikantitatif
olarak
bir günde
saptanır.

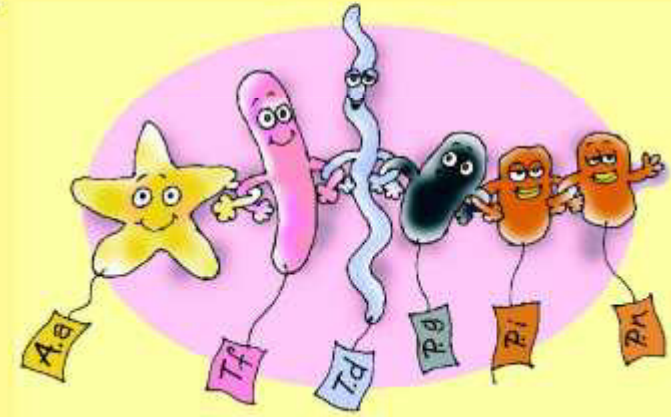


T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

Diş Hekimliği Fakültesi
Diş Hekimliği Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Ağız Mikrobiyoloji Laboratuvarı



Periodontal Patojenlerin ParoCheck® Mikroarray Sistemi ile Tanısı



diş hekimliğinde
çağdaş yaklaşım

gkulekci@istanbul.edu.tr

Parocheck® mikroarray testi

- Örnekten DNA ekstraksiyonu,
- PCR,
- Floresanla işaretlenmiş problemlerin eldesi,
- Çip üzerine sabitlenmiş türe özel tamamlayıcı sekanslara hibridizasyon işlemi,
- Özel bir mikroarray skenörde inceleme,
- ParoCheck® analiz yazılımı ile değerlendirme.
- Rapor, yorum ve tedavi önerileri de eklenerek e-posta ile gönderilir.



Bakteri düzeyleri klinik bulgular ve diğer risk faktörleri ile bağlantılı ve bir arada düşünülmelidir.

Sistemik hastalık : -
Sürekli ilaçlar : -
Sigara kullanımı : -
Antibiyotik : -

31 yaşında

PAROCHECK MİK TEST SONUÇ FORMU



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ BİLİM DALI

Tarih: 14.07.2010

Gönderen : Periodontoloji AD (Dt.Dilek GÜVENÇ)
Hastanın adı soyadı : Sinan ÇETİNKAYA

Tanısı ☐ KP ☐ GAP ☐ LAP ☒ Peri-implantitis
☐ Risk Değerlendirmesi ☐ Tedavi öncesi ☐ Tedavi Sonrası ☒ İdarne tedavi

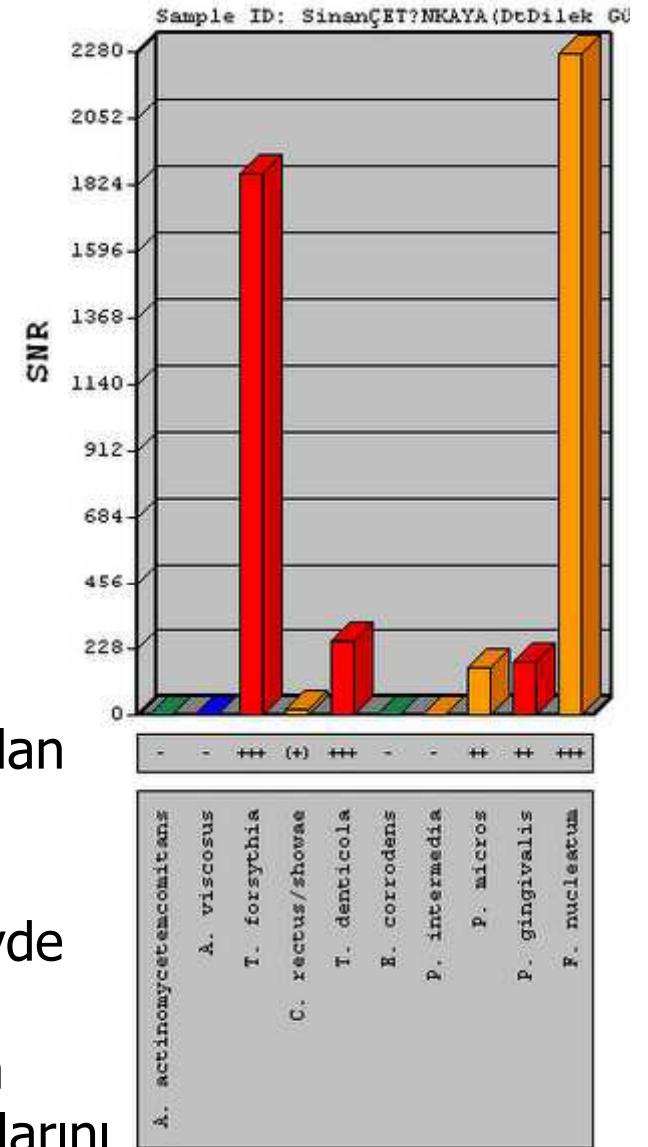
İstenen inceleme ☐ Bölgesel ☒ Genel

Dış No	İmolant çevresi
Cep derinliği (mm)	8
Kanama (+/-)	+
Cerrahat (+/-)	+

Test edilen mikroorganizmalar	SONUÇ	DÜZEY
Kırmızı Birliktelik		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	POZİTİF	++
<i>Tannerella forsythia</i>	POZİTİF	+++
<i>Treponema denticola</i>	POZİTİF	+++
Turuncu Birliktelik		
<i>Campylobacter rectus</i>	POZİTİF	(+)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	POZİTİF	+++
<i>Parvimonas micra</i>	POZİTİF	++
<i>Prevotella intermedia</i>	NEGATİF	-
Yeşil Birliktelik		
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	NEGATİF	-
<i>Eikenella corrodens</i>	NEGATİF	-
Mavi Birliktelik		
<i>Actinomyces viscosus</i>	NEGATİF	-

Yorum ve Öneriler :

Görmek daha inandırıcı olduğundan hastalar test yapılmasından çok memnun kalmakta ve diş hekiminin evde bakım ile ilgili önerilerini ya da kontrol randevularını aksatmamaktadırlar.



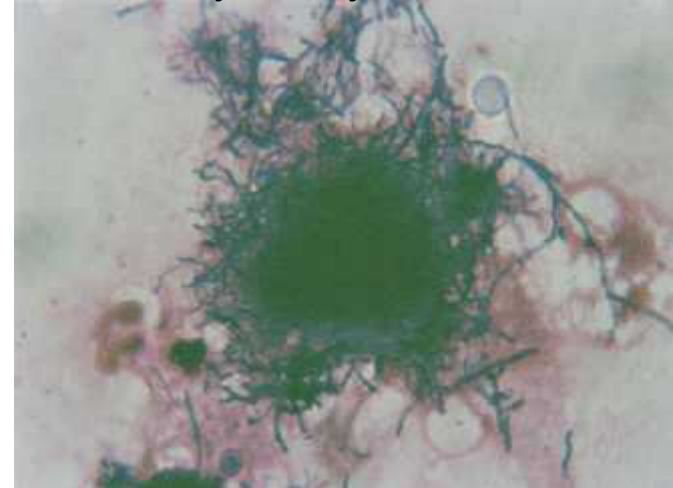
gkulekci@istanbul.edu.tr

Dentoalveolar abse cerahatinden kültür ve antibiyogram

Diş ve çene kaynaklı
abse tedavisinde
akılcı antibiyotik kullanımı için

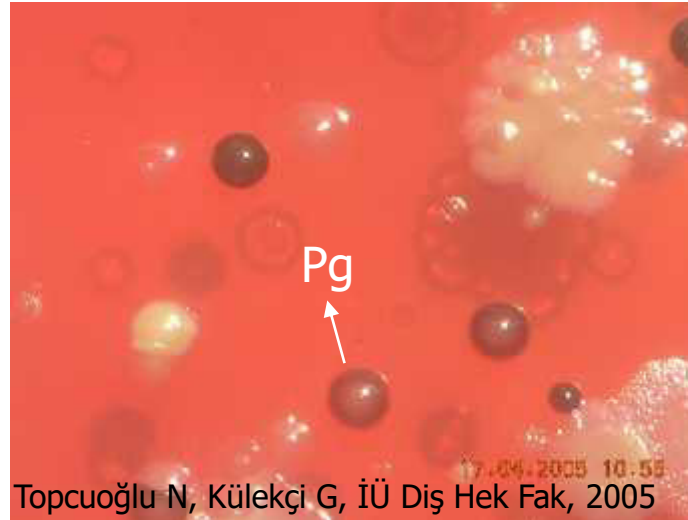
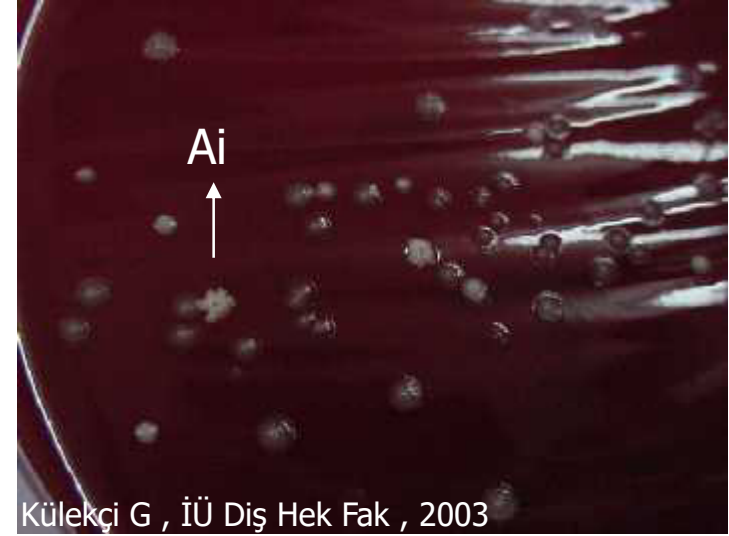
etken mikroorganizma ve
antibiyotik duyarlılığı saptanır.

- Aktinomikoz kuşkusunda
hızlı mikroskop incelemesi yapılır.



Dentoalveolar abse cerahatinden kültür ve antibiyogram

- Ağız dışından ya da ağız içinden aspirasyonla alınan en az 1 ml cerahat örneğinden
- Total bakteri sayısı,
- Fakültatif anaerop sayısı
- Anaerop bakteri sayısı,
- Tür tansı ve antibiyogram





**Ağız mikrobiyolojisi testleri
"kişiyeye özel yaklaşım"
sağlamaktadır.**

**Mikrobiyolojik testler, doğru yer ve zamanda
hekimlerin kanıta dayalı yaklaşımla hastalık riskine dayanan
koruyucu ve tedavi edici önerilerine destek olur.**

!Bu yaklaşım bir sağlık ve eğitim stratejisi gerektirir!

Ağız mikrobiyoloji tanısının anlamlı olması için

- Hastalığın tanısını /
- Tedavi planını /
- Her ikisini etkilemeli,
- Tedavi sonuçlarını olumlu etkilemeli,
- Hastaya ekonomik kazanç getirmelidir.



Ağız Mikrobiyolojisi Testleri

**Yararını destekleyen kuvvetli
bir kanıt yok.**

- Kısmen tanı laboratuvarları arasında standardizasyon olmamasından.

Aynı bölgeden aynı anda alınan
diş plak biyofilm örneklerinin
aynı laboratuvarda aynı yöntemle yapılan
kültür ve antibiyotik duyarlık
inceleme sonuçları birbirinden farklı olabiliyor.

- Mikroorganizmalar arasında geniş çaplı genetik ve klonal çeşitlilik var.

**Moleküler tekniklerle
bu sınırlamanın üstesinden
gelinebilmekte !**

