

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇOCUKLARDA ORAL HELİCOBACTER PYLORİ VARLIĞININ GASTRİK
HELİCOBACTER PYLORİ ERADİKASYONUNUN BAŞARISINA VE DİŞ
ÇÜRÜĞÜNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Pedodonti Anabilim Dalı Programı

DOKTORA TEZİ

Dt. Saniye ÇİÇEK YANAR

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ERONAT

İZMİR-2006

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUKLARDA ORAL HELİCOBACTER PYLORİ VARLIĞININ GASTRİK
HELİCOBACTER PYLORİ ERADİKASYONUNUN BAŞARISINA VE DİŞ ÇÜRÜĞÜNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Pedodonti Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Saniye ÇİÇEK YANAR

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nesrin ERONAT

İZMİR
2006

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. Nesrin ERONAT

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Ulus Salih AKARCA

Üye : Prof.Dr.Özant ÖNÇAĞ

Üye : Prof.Dr. Ece EDEN

Üye Doç. Dr. Erhun Kasırga

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarım sırasında değerli fikirlerini ve desteğini esirgemeyen doktora tez danışmanım Prof. Dr. Sayın Nesrin ERONAT 'a şükranlarımı sunarım.

Çalışmamın planlanmasında ve uygulanmasında Sayın Prof. Dr. Sema AYDOĞDU'ya ve moleküler biyolojik laboratuvar aşamalarının gerçekleştirilmesinde ve yorumlanmasında büyük desteği olan Sayın Prof. Dr. Ulus AKARCA'YA, çalışma grubumun belirlenmesinde, örneklerin elde edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Gökhan TÜMGÖR ve Uzm. Dr. Hasan YÜKSEKKAYA 'ya, PCR laboratuvarındaki çalışmalarımda her türlü desteği gösteren Sayın Laborant Hilmi METE'ye ve Biyolog Hülya Yılmaz Temel'e, Mikrobiyoloji laboratuvarındaki çalışmalarımda bilgisi ve candanlığıyla yardım eden Sayın Laborant Memduh Özdemir'e, istatistik değerlendirmelerin yapılmasında ve yorumlanmasında yardımcı olan Selma Erdoğan ve Dokuz Eylül Üniversitesi İstatistik Araştırmaları Birimi çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan ve sabır gösteren sevgili annem, kardeşim ve eşime, başta Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nesrin ERONAT olmak üzere, tüm E.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalışma arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

İzmir -2006

Dt. Saniye Çiçek Yanar

İÇİNDEKİLER

RESİMLER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XII
GRAFİKLER DİZİNİ.....	XIII
KISALTMALAR.....	XIV

BÖLÜM I

GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
1.1. Ağız Florası.....	4
1.2. Ağız Mikroflorasının Oluşumu.....	6
1.3. Dental Plak.....	11
1.3.1. Dental Plak Oluşumu.....	12
1.3.2. Dental Plakın Mikrobiyal Kompozisyonu.....	13
1.4. Diş Çürüğü.....	15
1.5. Çürük Mikrobiyolojisi.....	16
1.5.1. Oral Streptokoklar.....	16
1.5.2. Laktobasiller.....	20
1.5.3. Aktinomiçesler.....	21
1.6. Ağız Florasının Sistemik Enfeksiyonlar İle İlişkisi.....	22
1.7. Gastrointestinal Flora.....	22
1.7.1. Mide Florası.....	23
1.8. <i>Helicobacter Pylori</i>	23
1.8.1. <i>Helicobacter Pylori</i> 'nin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	24

1.8.2. <i>Helicobacter Pylori</i> 'nin Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri.....	25
1.8.3. <i>Helicobacter Pylori</i> 'nin Antijenik Yapısı ve Virülansı.....	25
1.8.4. <i>Helicobacter Pylori</i> 'nin Epidemiyolojisi.....	26
1.9. <i>Helicobacter Pylori</i> 'nin Patogenezi ve Immunoloji.....	28
1.9.1. <i>Helicobacter Pylori</i> 'nin Duedonal Ülser Patogenezideki Rolü.....	29
1.9.2. <i>Helicobacter Pylori</i> ve Non-Ülser Dispepsi.....	30
1.9.3. <i>Helicobacter Pylori</i> ve Gastrit.....	31
1.9.4. <i>Helicobacter Pylori</i> ve Gastrik Ülser.....	31
1.9.5. <i>Helicobacter Pylori</i> ve Mide Karsinomu.....	31
1.10. <i>Helicobacter Pylori</i> Rezervuarı Olarak Ağız Boşluğu.....	33
1.10.1. Oral <i>Helicobacter Pylori</i> 'nin Potansiyel Önemi.....	35
1.10.2. <i>Helicobacter Pylori</i> ve Dental Plak.....	36
1.11. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	38
1.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR).....	41
BÖLÜM II	
GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
2.1. Dental plak ve Mide Örneklerinde <i>Helicobacter Pylori</i> 'nin İzolasyon ve İdentifikasyonu İçin Kullanılan Yöntemler.....	61
2.2. Dental Plak ve Mide Örneklerinde <i>Helicobacter Pylori</i> 'nin Nested PCR İle Tespiti.....	67
2.3. Tükürükte Mutans Streptokokların Kültür Yöntem ile Kantitatif Saptanması.....	74
2.4. <i>Helicobacter pylori</i> 'li Hastaların Altı Aylık Takip Periyodunda Değerlendirilmesi.....	78

2.5. Kontrol Grubu Hastalarının Dental Plak ve Tükürük Örneklerinin Değerlendirilmesi.....	81
2.6. İstatistik Değerlendirme.....	82
BÖLÜM III	
BULGULAR.....	83
3.1. <i>Helicobacter pylori</i> Saptanan Hastaların Dental Plak ve Tükürük Örneklerinin Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi.....	92
3.2. Kontrol Grubunun Dental Plak ve Tükürük Örneklerinin Mikrobiyolojik Değerlendirmesi.....	94
3.3. <i>Helicobacter pylori</i> Saptanan Hastaların Dental Bulgu ve Ağız Hijyen Alışkanlıklarının Değerlendirilmesi.....	96
3.4. Kontrol Grubunun Dental Bulgu ve Ağız Hijyen Alışkanlıklarının Değerlendirilmesi.....	100
BÖLÜM IV	
TARTIŞMA.....	105
BÖLÜM V	
SONUÇ.....	123
BÖLÜM VI	
ÖZET.....	125
SUMMARY.....	127
BÖLÜM VII	
KAYNAKLAR.....	129
ÖZGEÇMİŞ.....	149
EK I.....	150

EK II.....154

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1 a, b: Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Invitek, Germany)

Resim 2 a: Supernatant'ın uzaklaştırılması ve

2 b: Pellet Pestle motorla örneklerin homojenize edilmesi.

Resim 3 a: Lysis buffer,

b: proteinaz K,

c: proteinaz K'nın ependorf tüplerindeki örneklere ilave edilmesi ve

d: vortekslenmesi.

Resim 4 a: Örneklerin inkübatöre yerleştirilmesi ve

b: Inkübasyon için 52° C'de 15 – 20 dakika beklenmesi.

Resim 5 a: Örneklerin maksimum hızda santrifüj edilmesive

b: supernatantın yeni tüplere aktarılması.

Resim 6 a: Örnekler binding buffer T ilave edilmesi ve

b: vortekslenmesi.

Resim 7 a: Örneklerin filtreli tüplere aktarılması ve

b: santrifüj sonrası yeni filtreli tüplere örneklerin taşınması.

Resim 8 a, b: Wash buffer'ın örneklere uygulanması.

Resim 9 a,b: Elution buffer D'nin örneklere uygulanması.

Resim 10 a, b: Amplifikasyon karışımının hazırlanması.

Resim 11 a, b: Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleştirildiği thermal cycler.

Resim 12 a, b: Agaroz jelin hazırlanması ve tarağa dökülmesi.

Resim 13 a, b: Agaroz jelin elektroforez cihazına yerleştirilmesi ve örneklerin kuyucuklara yerleştirilmesi

Resim 14 a,b: Amplifiye olan DNA'ların agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra görüntülerinin bilgisayar ortamına aktarılması.

Resim 15 a: Otomatik besiyeri dökme makinasına kimyasalların konması ve
b: besiyerlerinin dökülmesi.

Resim 16 a,b: Tükürük örneğinden direk ekim yapılması.

Resim 17 a,b: 1/10' luk sulandırmada besiyerinin hazırlanması.

Resim 18 a,b: 1/100'lük sulandırmada besiyerinin hazırlanması.

Resim 19 a,b: Besiyerlerinin enkübatöre yerleştirilmesi.

Resim 20: Dilüe edilmiş besiyerleri ve mutans kolonileri

a: 1cc. tükürükten direkt ekim,

b: İlk sulandırım,

c: İkinci sulandırım,

d: Üçüncü sulandırım.

Resim 21 a,b,c: Dental plak ve tükürük örneklerinin toplanması.

Resim 22 a,b: Helicobacter Test Teşhis Kiti.

Resim 23 a,b: Üre nefes testinin ilk basamağı.

Resim 24 a,b: Üre nefes testinin ikinci basamağı.

Resim 25: Dental plak ve mide örneklerinden izole edilen *Helicobacter Pylori*'ye ait DNA örneklerinin EHC-U/EHC-L primeri ile amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.

Resim 26: Dental plak ve mide örneklerinden izole edilen *Helicobacter Pylori*'ye ait DNA örneklerinin EHC-U/EHC-L primeri ile amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.

Resim 27: Kontrol grubundaki iki bireye ait dental plak örneklerinde *Helicobacter pylori* DNA bantlarının izlenmesi.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Inverse PCR (IPCR)'nin çalışma prensibini gösteren şema.

Şekil 2: Asimetrik PCR'ın çalışma prensibi.

Şekil 3: Nested PCR'ın çalışma prensibi.

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1: Ağız boşluğu içerisinde yer alan bakteri toplulukları.

Tablo 2: Dil florasını oluşturan mikroorganizmalar.

Tablo 3: Dişeti oluşturan izole edilmiş mikroorganizma türleri ve üreme oranları.

Tablo 4: Dental plakta kültür edilebilen mikroorganizma toplulukları.

Tablo 5: Oral streptokokların sınıflandırılması.

Tablo 6: *Campylobacter* ve *Helicobacter* türlerinin sınıflandırılması.

Tablo 7: *Helicobacter pylori*'nin patogenezi ve virulans özellikleri.

Tablo 8: *Helicobacter pylori*'nin peptik ülser oluşturma mekanizması.

Tablo 9 a: DMFT / DMFS indeksleri, b: dft / dfs indeksleri

Tablo 10: Silness ve Loe'nün plak indeksi değerleri.

Tablo 11: Bireylerin *Streptococcus mutans* değerlerine göre gruplandırılması.

Tablo 12: Araştırma grubunun dental plak ve mide örneklerinde PCR ve patolojik değerlendirme sonucunda *Hp* (+) ve *Hp* (-) gözlenen bireylerin sayısı.

Tablo 13: Araştırma grubuna ait bireylerin ebeveynlerinin eğitim düzeyleri.

Tablo 14: Tedavi öncesi ve sonrasında dental plak ve mide örneklerinde *Helicobacter pylori* varlığı.

Tablo 15: *Hp* (+) saptanan çocukların ebeveynlerinin eğitim düzeyleri.

Tablo 16: Kontrol grubunu oluşturan bireylerin ebeveynlerinin eğitim düzeyi.

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Araştırmaya katılan bireylerin (n=105) ağız hijyenlerine göre dağılımları

Grafik 2: Araştırma grubundaki bireylerin yakınmalarının dağılımı.

Grafik 3: Araştırma grubundaki hastaların yakınmalarının dağılımı.

Grafik 4: Araştırma grubundaki hastaların fırçalama alışkanlıklarının dağılımı.

Grafik 5: Araştırma grubundaki hastaların karbonhidratlı gıdaları tüketme sıklıkları.

Grafik 6: Araştırma grubundaki hastaların ebeveynlerinin diş fırçalama alışkanlıkları.

Grafik 7: Araştırma grubundaki ebeveynlerin çocuklarının ağız ve diş sağlıklarını korumak için yapılması gerekenlerle ilgili bilgi düzeyleri.

Grafik 8: Hp (+) hastaların tedavi öncesi ve sonrası dental plak örneklerinde *H. pylori*'nin dağılımı.

Grafik 9: Hp (+) hastaların mide örneklerinde tedavi öncesi ve sonrası *H. pylori*'nin dağılımı.

Grafik 10: Hp (+) hastaların fırçalama alışkanlıklarının (%) dağılımı.

Grafik 11: *Hp* (+) hastaların karbonhidratlı gıdaları tüketme sıklığı.

Grafik 12: *Hp* (+) hastaların ebeveynlerinin diş fırçalama alışkanlıkları.

Grafik 13: *Hp* (+) hastaların ebeveynlerinin ağız ve diş sağlıklarını korumak için çocuklarına yapılması gerekenlerle ilgili bilgi düzeyleri.

Grafik 14: Kontrol grubunu oluşturan bireylerin diş fırçalama alışkanlıklarının dağılımı.

Grafik 15: Kontrol grubundaki bireylerin karbonhidratlı gıdaları tüketme sıklığı.

Grafik 16: Kontrol grubundaki bireylerin ebeveynlerinin diş fırçalama alışkanlıkları.

Grafik 17: Kontrol grubunda yer alan ebeveynlerin çocuklarının ağız ve diş sağlıklarını korumak için yapılması gerekenlerle ilgili bilgi düzeyleri

KISALTMALAR

1. PCR: Polymerase Chain Reaction
2. CLO: Campylobacter- like-organism
3. dNTP: Deoksinükleotid Trifosfatlar:
4. *H. pylori*: Helicobacter pylori
5. *Hp (+)*: *Helicobacter pylori* varlığı tespit edilen.
6. *Hp (-)*: *Helicobacter pylori* varlığı gözlenmeyen.
7. cfu: Colony forming unit
8. MSB: Mitis Salivarius Bacitrasin Agar
9. TYC: Triptikaz- Maya Özütü-Sistin Agar
10. TYCSB: Triptikaz-Maya Özütü-Sistin agar + Sakkaroz + Basitrasin

BÖLÜM I

GİRİŞ

İçerdiği sindirim enzimleri ve asidik yapısı nedeniyle yıllarca steril bir ortam olduğuna inanılan mide mukozasında, daha sonra yapılan çalışmalarda değişik bakterilerin bulunduğu ortaya konmuştur. Bu bakterilerden *Helicobacter pylori* insan midesinde kolonize olan, Gram (-), çubuk şeklinde, mikroaerofilik bir bakteridir. Gastrik mukozanın altında, gastrik epitelyum hücrelerine komşu konumlanır, invaziv olmamakla birlikte gastrik mukozanın enfeksiyonuna neden olur. Bu organizmanın yol açtığı enfeksiyonun, geçiş gösterebilen, duodenal ve gastrik ülser ile ilişkili olan ve gastrik kanserlere yol açabilen ciddi bir hastalık olduğu kabul edilmektedir (17, 40, 51, 60, 75, 88, 154, 160, 164).

Helicobacter pylori enfeksiyonunun insidansı, gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere oranla daha yüksektir (51,125). *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun toplumda görülme oranının, etnik köken ve ırk gibi faktörlerin yanı sıra, bunlarla ilişkili kültür, diyet, sosyal, çevresel koşullar ya da genetik yatkınlık gibi faktörlerle etkilendiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (51,127).

Helicobacter pylori'nin normal oral mikrofloranın bir elemanı olmadığı günümüzde kabul edilmektedir. Buna karşın yakın zamanda yapılan bazı çalışmalarda, dental plak ve tükürük başta olmak üzere oral florada *Helicobacter pylori* varlığı gösterilmiştir (51,127). *Helicobacter pylori*'nin dental plakta saptanması, bu bakterinin gastrik reflü veya yakın temasla oral floraaya yerleşebileceği fikrini akla getirmektedir. Yapılan çalışmalar, ülser hastalarının antrum ve dental plak örneklerinde *Helicobacter pylori* ribotiplerinin aynı bulunması nedeniyle, bakteriyel dental plağın gastrik reenfeksiyon için rezervuar olabileceğini

ve bulaştırmada önemli bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Mikroorganizmanın oral florada ve özellikle dental plakta saptanması, ortamın uygun pH'sı, ısısı ve mikroaerofilik yapısına bağlı olabilir (127).

Kronik gastrit ve peptik ülser etiolojisindeki rolü nedeniyle *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun tedavisinde antibiyotik kombinasyonlarının kullanımının(eradikasyonunun) önemi, günümüzde kesin olarak anlaşılmıştır. Ayrıca *Helicobacter pylori* eradikasyonunun, hastalığın tekrarlamasını önlediği, rekürrenslerin azalmasını sağladığı gözlenmiştir. Sistemik antibiyotik tedavisinin, *Helicobacter pylori* eradikasyonunda başarılı olmakla birlikte olguların bir kısmında ülserlerin tekrarladığı görülmüş ve bu nedenle organizmanın varlığını sürdürdüğü mide dışında başka bölgelerin olabileceği ileri sürülmüştür (112) . *Helicobacter pylori*'nin dental plaktan, yapılan sistemik tedavi ile eradike edilememesi, enfeksiyonun tekrarlamasına neden olabilir. Bu nedenle gastrit ve ülser tedavisinin başarı oranını yükseltmek ve tekrarlayan enfeksiyonları önlemek için sistemik antibiyotik tedavisine ek olarak dental plaktan *Helicobacter pylori*'nin eliminasyonun önemli olabileceği bildirilmiştir (122).

Çalışmamızın amacı, başlangıcı daha çok çocukluk döneminde rastlanan *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarında organizmanın ağız florasının önemli bakteri rezervuarlarından olan dental plakta da varlığının gösterilmesi ve söz konusu bakterinin sadece mideden eradikasyonunun yeterli olmadığını dental plaktan uzaklaştırılmasının önemini ortaya koymaktır. Çalışmamızda, gastrik mukozadan alınan biopsi örnekleri ile dental plaktaki *Helicobacter pylori*'nin aynı DNA yapısına sahip olup olmadıklarının Nested (İki aşamalı) Polymerase Chain Reaction (PCR) yöntemi kullanılarak ortaya konulması planlandı. Ayrıca *Helicobacter pylori* enfeksiyonu olan bireylerin, dental plak ve tükürüklerinde *Helicobacter pylori* ve

Streptococcus mutans varlığının incelenerek ve bulguların sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırılması, bu hastaların çürük riski yönünden değerlendirilmesi hedeflendi.

GENEL BİLGİLER

1.1. Ağız Florası

İnsan ağız florası, vücudun en karmaşık mikroorganizma ekosistemlerinden birini oluşturmaktadır. Ağız florası; bakteriler, mantarlar, mikoplazmalar, protozoalar ve virüsler gibi farklı organizma gruplarının oluşturduğu mikrobiyal bir topluluktur (139).

Geçmişten günümüze, ağız florası üzerinde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte, ağız florasını oluşturan mikroorganizmaların virülans mekanizmaları hakkında cevaplanması gereken sorular bulunmaktadır. İnsan florasındaki mikroorganizmaların izolasyonu ve türünün belirlenmesinde, üzerinde durulması gereken konular aşağıdaki gibi belirlenmiştir (34).

1. Örneklerin toplanma şekli,
2. Örneklerin toplanmasında kullanılan yöntemler,
3. Örneklerin laboratuvara nakil koşulları,
4. Örneklerin kültür edilme koşulları..

Ağız florası, farklı bireylerin ağızlarında aynı bölgelerde değişebildiği gibi, aynı bireylerin farklı dişlerinden alınan plak örneklerinde bile sayısal ve niteliksel değişiklikler göstermektedir. Ağız içerisinde bulunan bakteri kolonizasyonunun farklı anatomik bölgelerde de değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (34, 106, 119).

Ağız boşluğu içerisinde bulunan bakteri toplulukları, başlıca Gram pozitif ve Gram negatif organizmalar olarak sınıflandırılabilir (Tablo 1) .

Gram (+)	Gram (-)
Koklar	
<i>Abiotraphia</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Veillonella</i>
<i>Streptococcus</i>	
<i>Staphylococcus</i>	
<i>Stomatococcus</i>	
Çubuklar	
<i>Actinomyces</i>	<i>Actinobacillus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bacterioides</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>Cantonella</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>Centipeda</i>
<i>Rothia</i>	<i>Desulfovibrio</i>
	<i>Desulfovibrio</i>
	<i>Eikenella</i>
	<i>Fusobacterium</i>
	<i>Haemophilus</i>
	<i>Johsonii</i>
	<i>Leptotrichia</i>
	<i>Porphyromonas</i>
	<i>Prevotella</i>
	<i>Selenomonas</i>
	<i>Simonsiella</i>
	<i>Treponema</i>
	<i>Wolinella</i>

Tablo 1. Ağız boşluğu içerisinde yer alan bakteri toplulukları (106, 139).

Çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörler ağız içinde mikroorganizmaların yaşam ve üremelerini etkilemektedir. Bunlar;

1. Organik ve inorganik besin maddelerinin alınımı,
2. Bu besin maddelerinin oksijen ve karbonhidrat seviyeleri,
3. pH,
4. Tükürükte antimikrobiyal maddelerin varlığı,
5. Ağız anatomisi,
6. Oral yüzeylere etki eden aşındırıcı kuvvetler,

7. Su ve ısı, olarak sıralanabilir (34).

Kalıcı ve Geçici Flora:

Sağlıklı bireylerin ağız, mukoz membranları ve deri yüzeyinde yer alan mikroorganizma popülasyonları, normal mikrobiyal florayı oluşturmaktadır. Bu flora, kendi içerisinde kalıcı ve geçici olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Kalıcı flora, belirli bir bölgede var olan ve yaşamlarını denge içinde sürdüren mikroorganizmaları içerirken, geçici flora, ağız, mukoz mebran, cilt ve vücudun diğer bölgelerinde saatler, günler ve haftalar içinde yerleşen, patojen olmayan veya potansiyel patojen olan, *Helicobacter pylori* gibi mikroorganizmaları içermektedir (34).

1.2. Ağız mikroflorasının Oluşumu

Ağız mikroflorasını oluşturan bakteri türleri, doğum, çocukluk ve erişkinlik dönemlerinde farklılıklar göstermektedir.

Doğum

Anne karnındaki fetusta bakteri bulunmaz. Bu nedenle, embriyo ağızının primer taslağı (cavum oris proprium) doğum öncesi sterildir. Yeni doğanın ağız florasını, doğum kanalından çıkışı sırasında, annenin vajinal florasında yer alan bakteriler oluşturur. Bunlar, genellikle *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae* (*B grubu streptokok*), *Veillonella*, *Neisseria*, koagülaz negatif stafilokoklar, *Escherichia* gibi bazı bağırsak bakterileri, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* gibi vajinanın anaerop üyeleri ve deriden gelen bazı maya ve mantarlardır. Florada, doğumun şekline bağlı olarak farklılıklar olabilir (34, 106).

Yeni doğanın ağızında, henüz dişler bulunmadığı ve oksijen ağızın her köşesine ulaşabildiğinden, anaeroplara aleyhine bir ortam vardır. Ortam zorunlu

aneroblar için uygun değildir ve zorunlu anaeroplara, hava ile karşılaştıklarında 1–100 saat içerisinde floradan kaybolurlar. Ancak dil papillalarının arasında, oksijenden uzak bölgelerde bulunabilirler. Bu bölgelerde, başta *Veillonella parvula* olmak üzere diğer anaeroplara da rastlamak mümkündür. B grubu streptokokların ağız florasından kaybolmaları, yaklaşık 2–4 ay sürebilir. Dördüncü aydan sonra yerlerini C ve D grubu streptokoklara bırakırlar (34).

Yenidoğanın ağızında, sayıca en fazla bulunan bakteri *Streptococcus salivarius*'tur ve bu bakterinin sayısı doğum sonrası ikinci güne kadar artış gösterir. Daha az sayıda *Veillonella alcalescens* bulunur. Fusiform bakteriler, 4 – 8. aydan itibaren yerleşirler. Peptostreptokoklar, 5. aydan sonra, *Streptococcus sanguis* 6. ayda, *Streptococcus mutans* ise 12. ayda yerleşir (34, 106).

Doğumu takiben, süt ve süt ürünleri ağırlıklı beslenme nedeniyle, ağızda var olan laktobasil ve streptokok türleri sayıca biraz daha fazladır. Süt ve süt ürünlerinin içerisinde bulunan *caseinglycomacropetide* ve *caseinphosphopeptide* isimli iki peptidin, çürük yapıcı *Streptococcus mutans*'ın mine yüzeyine adezyonunu engellediği gösterilmiştir. Bu dönemde flora üzerinde belirleyici olan bir etken de, anne memesi ve biberondan ağıza girebilecek mikroorganizmalardır. Bunlar, genellikle cilt florasının üyeleri olup, koagülaz negatif ve pozitif stafilokoklar, difteroidler, gram negatif bağırsak bakterileri, maya ve mantarlardır (34, 106).

Çocukluk

Ağız ortamındaki en önemli değişiklik, 6. ayda ilk süt dişlerinin çıkması ile başlar. Bu dönemden itibaren ağız dokuları içerisinde, atmosferdeki O₂'nin kısmen veya hiç ulaşmadığı aproksimal diş yüzeyleri ve dişeti oluğu gibi bölgelerin belirmesi ile birlikte anaerop bakteri topluluğunda ciddi bir artış başlar ve anaerop bakteri grubunun üstünlüğü dişler ağızda buldukları sürece devam eder. Ağız

içinde sert mine yüzeylerinin meydana gelişi ile süt dişlerinin sürmelerinden önce görülmeyen, *Streptococcus sanguis* gibi bakteriler üremeye başlar. *Streptococcus mutans* gibi diğer bakteriler de diş yüzeylerinde kolonize olup, bir yaşından sonra ağzın kalıcı florasının en önemli bölümünü oluşturur (34).

Erişkinlik

Ağız içindeki mikroorganizmalarda en önemli artış kalıcı dişlerin sürmesi ile görülür. Bu dişlerin yüzeylerindeki, kolayca aşınmayan derin fissürler ve aproksimal boşluklar da süt dişlerinden fazladır. Dişeti cepleri kalıcı dişlerde süt dişlerinden daha derin olup, anaerobik mikroorganizmalar için uygun üreme alanı oluşturur. Çocukluk döneminde hiç bulunmayan veya az rastlanan *Bacteroides* türleri ile birlikte, *Leptichia*, *Fusobacterium* türleri ve *spiroketlerin* sayılarında, yaşa ve gingivitis'in meydana gelişine bağlı olarak büyük artışlar görülür. Dental plakta, streptokok türleri, özellikle *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus sanguis* bulunur. *Aktinomiçesler* ve herhangi bir sınıflandırmaya dâhil edilemeyen Gram negatif ve Gram pozitif flamanlar da izole edilen diğer bakteri türleridir (34,106).

Erişkin ağızında bulunan mikroorganizmalar yaklaşık 300 civarında türü kapsar. Dışkı florasındaki mikroorganizmaların 240–260 türü içeriyor olması, ağız dokularının ne kadar zengin bir bakteri topluluğuna konak oluşturduğunu gösterir. Her bir türün 100–200 üyesi ve bir o kadar da değişken türleri olabileceği düşünülürse, ağızdaki bakteri çeşitliliği 10.000 ile ifade edilebilir (34).

Tükürükteki mikroorganizmaların yarısı, dişeti cebindeki mikroorganizmaların ise 2/3'ü anaerobtur. Kök kanalı enfeksiyonlarında rol alan mikroorganizmaların ise %90-94'ü, anaerobtur. Tükürükte bulunan toplam mikroorganizma sayısı, özellikle dilden kaynaklanmak üzere, ml'de 43 milyon–5.5 milyar arasında değişmektedir.

Bir başka tanımla, 1 ml tükürükte ortalama 750 milyon bakteri vardır. Dil mikroflorası, Tablo 2’de belirtilen mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Dişeti oluşu ve diş plağından alınan her bir gram örnekte, 200 milyar bakteri hücresi bulunmaktadır. Dişeti oluşunda bulunan mikroorganizmalar Tablo 3’de gösterilmiştir. Bununla birlikte ağızdaki bakterilerin sayılarının bir üst sınırı vardır. Bu sınırı konak savunması ve ağızdaki diğer bakterilerin birbirleriyle etkileşmesi belirler. Sağlıklı bir erişkinin ağızının hergün, 1–2.5 litre tükürük salgısı ile yıkandığı bildirilmiştir (32, 57)

Mikroorganizma Grubu/ Cinsi	İzolasyon Oranı (%)
Fakültatif Streptokoklar	38.3
Veillonela	14.3
Fakültatif Difteroidler	13.0
Anaerob Difteroidler	7.4
Stafilokoklar-Mikrokoklar	6.5
Stafilokoklar-Mikrokoklar	5.3
Peptostreptokoklar-Peptokoklar	4.2
Neisseria	2.3
Vibrio/Campylobacter	2.1
Fusobacterium	0.8
Tanımlanamayan Gram (-) basilller	3.2
Tanımlanamayan Gram (-) koklar	2.6

Tablo 2: Dil florasını oluşturan mikroorganizmalar (34).

Grup	Cins ve/veya tür	Üreme oranı(%)
Gram (+) fakültatif koklar	<i>Stafilakoklar, Enterokoklar,</i> <i>Str. Mutans, Str. Sanguis,</i> <i>Str. Mitis, Str. Salivarius</i>	28.8
Gram (+) anaerob koklar	<i>Peptostreptococcus 'lar</i>	7.4
Gram (+) fakültatif basiller	<i>Korinebakteriler, Lactobasiller</i> <i>Nokardialer</i>	15.3
Gram (+) anaerob basiller	<i>Actinomyces bifidus, A. israelii,</i> <i>A. naeslundii, A. Odontolyticus,</i> <i>P. acnes, Lactobacillus Buccallis,</i> <i>Korinebakteriler</i>	20.2
Gram (-) fakültatif koklar	<i>Neisseria 'lar</i>	0.4
Gram (-) anaerob koklar	<i>Veilonella parvela, V. Alcalescens</i>	8.7
Gram (-) anaerob basiller	<i>Bacteroides (Porphrimonas)</i> <i>Melaninogenicus, B. Oralis,</i> <i>V. sputorum, E. Nucleatum,</i> <i>S. sputigenum</i>	17.3
Spiroketler	<i>Treponema denticola, T. Oralis,</i> <i>T. macrodentium, B. vincentii</i>	1.9

Tablo 3. Dişeti oluşundan izole edilmiş mikroorganizma türleri ve üreme oranları (34).

1.3. Dental Plak

Dental plak, ağzın sert doku yüzeyleri üzerine bağlanan, canlı ve ölü bakterileri ve bakteri ürünlerini içeren mikrobiyal bir depozittir. Diğer bir tanımlamayla, bakteri ve tükürük kaynaklı bir polimer matriks içersine gömülmüş, diş yüzeyi ve restoratif materyallerin üzerinde bulunan, karmaşık bir mikroorganizma topluluğudur. Su içeriği, %80–85 arasında değişen dental plak, hücrelerden ve plak matriksinden oluşur. Kuru ağırlığının %40-50'si protein, %13-17'si karbonhidrat, %10-14'ü lipid ve % 10'u da doku kalıntılarıdır. Kalsiyum ve fosfat konsantrasyonları değişkenlik göstermekle birlikte, kalsiyum 8 µg/mg, fosfat ise 6 µg/mg'dır. Plakın maksimum kalınlığı, düz yüzeylerde 300 µm, ara yüzlerde 5 mm ve fissürlerde 2 mm olarak bildirilmiştir (67, 139).

Dental plak, 500'den fazla bakteriyel tür içermekte ve oral mikrobiyal patojenler için rezervuar görevi görmektedir. Dental plak oluşumunun miktarı ve hızı, çürük lezyonları, kötü restorasyon marjineri ve dişin pozisyonundaki düzensizlikler gibi fiziksel etkenlerden etkilenir. Dental plak, bu koşulların yokluğunda da, ağız hijyeni kötü olan bireylerde birikmeye devam edecektir (106).

Plak ve ağız florası birçok bakteri topluluğunun yaşadığı, denge bozulmadığında patolojik özellik göstermeyen bir ekolojik sistemdir. Patolojik özellik kazanması ile ilgili üç görüş öne sürülmüştür; "*Spesifik plak hipotezi*"ne göre birçok farklı mikroorganizmadan oluşan plak mikroflorası içindeki spesifik türler hastalığa neden olur. "*Non-spesifik plak hipotezi*", hastalığı tüm plak mikroflorasının aktivitesinin bir sonucu olarak değerlendirmektedir. Bu nedenle, mikroorganizmaların heterojen bir karışımı, hastalıkta rol oynayabilir. Plak-kökenli

hastalıklar, temelde karışık kültürlerin (polimikrobiyal) neden olduğu enfeksiyonlardır ve belirli türler daha baskın olabilir (106).

Son zamanlarda bu hipotezlere alternatif olarak, "*Ekolojik plak hipotezi*" ileri sürülmüştür. Bu hipoteze göre, hastalıkla ilişkili olan bakteriler sağlıklı ağızlarda da bulunabilirler; ancak patolojik düzeyde değildir. Çevresel koşullarda ortaya çıkan değişiklik sonucu mikroflora dengesinin bozulması ile patojen bakteriler aktivite gösterebilirler. Örneğin, sık şeker alımı sonrası plak pH'nın sürekli düşük kalması, çürüğe neden olan türlerin çoğalmasına neden olmaktadır. (106,139).

1.3.1. Dental Plak Oluşumu

Mikroorganizmanın ağız içerisinde bir yüzeye bağlanması, hastalığın oluşumundaki ilk basamaktır. Dental plak oluşumu, farklı basamaklar içeren kompleks bir süreçtir ve başlangıç kolonizasyonu, hızlı bakteriyel üreme ve remodeling olarak üzere üç aşamada incelenebilir (116).

Başlangıç kolonizasyonu, diş yüzeyi temizlendikten 2 saat sonra başlar. Temiz mine yüzeyi, ağız ortamında, pelikül olarak adlandırılan, amorf bir organik film ile çevrelenir. Başlıca glikoproteinlerden oluşan pelikül, spesifik tipte bakterilerin diş yüzeyine bağlanmasına yardımcı olur (34,85). Peliküle ilk tutunan mikroorganizmalar *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* ve *Aktinomiçesler*dir. Bakteri hücresi ve pelikülle kaplı diş arasında uzun dönemli fizikokimyasal etkileşimler başlar. Bu safhadan sonra bakteriler peliküle irreversibl olarak tutunur ve enfekte olan pelikül dental plak özelliği kazanır. Dental plak, mikroorganizmaların tükürük akışı ve dil hareketleri gibi mekanik kuvvetlerle diş yüzeyinden uzaklaşmalarına engel olur (106, 131).

İlk tutunan bakteriler ile yeni katılan bakteriler arasındaki koagregasyon plak mikroflorasındaki bakteri sayısını ve çeşitliliğini artırır. Çürük oluşumu sürecinde,

Streptococcus mutans'ın başlangıç kolonizasyonu önem taşımaktadır. Sukroz, *Streptococcus mutans*'ın kolonizasyonunda büyük rol oynamakla birlikte, mikroorganizmaların şekerden bağımsız olarak da bağlandığı görülmektedir (69). *Streptococcus mutans*'ın hücre duvarı yüzeyindeki proteinler, şekerden bağımsız başlangıç kolonizasyonunda kritik bir rol oynamaktadır (34, 136).

Hızlı bakteriyel üreme süresinin profilaksi sonrası 8 saat - 2 gün, remodeling safhasının ise yaklaşık 2 gün sonrasında başladığı ve devam ettiği bildirilmiştir (106).

1.3.2. Dental Plağın Mikrobiyal Kompozisyonu

Dental plak içerisinde yer alan mikroorganizmalar, toplam plak hacminin yaklaşık %30' unu oluşturan organik bir matriks ile çevrelenmiştir. Dental plağın mikrobiyal kompozisyonu bireyler arasında ve kolonize oldukları bölgelere göre değişkenlik göstermektedir. Dental plak içerisinde, kültür edilebilen bakteri toplulukları Tablo 4' de görülmektedir.

Başlangıçta, pellikül üzerine kolonize olan mikroorganizmalar, koklardır. Kokların büyük çoğunluğu streptokoklar olmakla birlikte, %2'si mutans streptokoklardır. Birkaç gün içerisinde daha kalın yapıda bir plak içerisinde kokların yanısıra, rodlar ve filamentler de görülür (85).

Plak mikroorganizmalarının yüksek bir genetik heterojenitesi vardır. Plak içerisinde 30–300 arasında türe rastlandığı belirtilmektedir (134,137). Dental plak mikroflorası dişin farklı yüzeylerine göre değişmektedir. Fissürlerin mikroflorası Gram (+) karakterde ve streptokoklar baskındır. Zorunlu anaerob bakteriler ve Gram (-) türler genellikle düşük sayıda bulunur ve nadir olarak izole edilirler. Dişeti oluğunda daha farklı türde ve çoğunlukla Gram (-) zorunlu anaerob bakterilere

rastlanır. Aproksimal bölgelerdeki plakta bu iki grubun karışık olarak bulunduğu bir mikroflora mevcuttur.

Mikroorganizma	Ortalama (Kültür edilebilir mikroflora %)	Aralık (Görülme aralığı)	İzolasyon Sıklığı (%)
<i>Streptokoklar</i>	41	0-81	88
Mutans streptokoklar	<1	0-48	50
<i>S.sanguis</i> -grup	1	0-4	63
<i>S.oralis</i> -grup	2	0-30	75
<i>S. anginosus</i> -grup	2	0-51	63
<i>S.salivarius</i>	0	0-41	38
<i>Stafilokoklar</i>	8	1-13	100
<i>S. aureus</i>	6	0-13	88
<i>S. epidermidis</i>	0	0-7	13
Gram pozitif çubuklar	33	1-74	100
Aktinomiçesler	21	0-54	88
<i>A. israelii</i>	3	0-47	63
<i>A. naeslundii</i>	3	0-48	63
<i>A. odontolyticus</i>	0	0-48	25
<i>Propionobacterium</i>	<1	0-5	50
<i>Veillonella</i>	8	3-20	100
Gram (-) çubuklar	0	0-6	38
Mayalar	0.002	0-0.5	63

Tablo 4. Dental plakta kültür edilebilen mikroorganizma toplulukları (106).

Oral streptokokların, dental plak üzerinde ilk kolonize olan mikroorganizma topluluğu olduğu ve toplam floranın çoğunluğunu oluşturduğu bilinmekle birlikte, kolonize olan bir diğer önemli mikroorganizma, *Actynomyces naeslundii*'dir. Mutans streptokokların, bazı mitis gruplarının ve *Actynomyces naeslundii*'nin sakkarozdan ürettiği ekstrasellüler glukanlar ve fruktanlar, bakteriler arası tutunmayı ve birikimi kolaylaştırır (136).

1.4. Diş Çürüğü

Dental plaktaki karyojenik bakterilerin karbonhidratları fermente etmesiyle açığa çıkan organik asitlerin, diş sert dokularında yıkıma neden olmasıyla meydana gelen diş çürüğü, özellikle mutans streptokokların rol oynadığı, insandan insana geçiş gösterebilen, enfeksiyöz bir hastalıktır. İnsan topluluklarını en çok etkileyen kronik hastalıkların başında gelmektedir (106, 116, 119).

Çürük oluşumu dört ana etkene bağlanmaktadır. Bu etkenler, konak (asıl olarak tükürük ve diş), mikroorganizma, diyet ve zamandır. Diş çürüğünün oluşumu için bu dört faktörün aynı anda bir arada bulunması gerekir (44, 116, 157, 166).

Diş çürüğünün oluşumunda genellikle üç teoriden söz edilmektedir. Asidojenik teori, diş çürüğünün iki aşamayı içeren kemo-parazitik bir süreç olduğunu öne sürmektedir. İlk aşamada, minenin dekalsifikasyonu, ikinci aşamada, dentinin dekalsifikasyonu gelmektedir. İlk aşamadaki dekalsifikasyona etki eden asitler, nişastanın ve dişlerin retansiyon bölgelerinde kalan şekerin fermantasyonu ile açığa çıkar. Proteolitik teoriye göre, proteolitik enzimlerin oral bakterilerce üretildiği, minenin organik matriksinin enzimlerle parçalandığı ve organik matriksten yoksun kalan minenin yıkıma uğradığı öne sürülmektedir. Proteoliz-şelasyon teorisine göre ise, bakteriyel faaliyet sonucu mine, dentin, gıda ve tükürük bileşenlerinden bazıları kalsiyum ile şelatları oluşturmak üzere birleşirler. Şelatların alkalen pH'da

oluşmaları nedeniyle, bu teoriye göre nötral ve alkalen pH'da bile çürük olmaktadır (106).

1.5. Çürük Mikrobiyolojisi

Çürük oluşumunda etkili başlıca bakteri grupları, oral streptokoklar, laktobasiller, aktinomiçeslerdir.

1.5.1. Oral streptokoklar

Streptokoklar, ağız içersindeki tüm bölgelerden izole edilebilen ve oral mikrofloranın büyük bir kısmını teşkil eden mikroorganizmalardır. Hücreler, 0.5–2.0 µm. çapında küresel veya ovoid şekillidir, sulu ortamda ürerler, çiftler veya zincirler halindedir. Gram boyası ile boyanabilirler. Streptokoklar, besinden zengin bir ortamda, optimum sıcaklıkta (37 °C) ürerler. Metabolizmaları fermantatiftir ve başlıca laktat üretirler. Katalaz negatif olan streptokoklar, yaygın olarak kırmızı kan hücrelerine atakta bulunur ve yeşilimsi bir renk değişikliğine yol açarlar (α-hemoliz) veya tamamen renksiz bir ortam oluştururlar (β-hemoliz) (57, 68, 74, 139).

Oral streptokokların günümüzdeki sınıflandırmasında, bakteriler dört farklı grup altında incelenir. Sınıflandırma, kemotaksonomik ve özellikle DNA-DNA baz eşleşmesi ve 16S rRNA gen sekans analizlerini içine alan genetik verilere dayanmaktadır (169). Tablo 5'de oral streptokokların sınıflandırılması görülmektedir.

Mutans streptokoklar

Streptococcus mutans, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus macacae* ve *Streptococcus ferus*'u içine alan mutans streptokok grubu, birbirleriyle benzer özellikler gösteren ve laktik asit üreten bir grup bakteridir (44, 169).

Bu gruptaki bakteriler, organizmanın virülansında önemli bir rol oynayan, şekerden ekstrasellüler glukan sentez etme özelliğine sahiptir (13, 44, 72, 109, 121, 166).

GRUP	TÜR
<i>mutans</i> -grubu	<i>S.mutans</i> , serotip <i>c,e,f</i> <i>S.sobrinus</i> , serotip <i>d,g</i> <i>S.cricetus</i> , serotip <i>a</i> <i>S.rattus</i> , serotip <i>b</i> <i>S.ferus</i> <i>S.macacae</i> <i>S.downei</i> , serotip <i>h</i>
<i>salivarius</i> -grubu	<i>S.salivarius</i> <i>S.vestibularis</i>
<i>anginosus</i> -grubu	<i>S.consellatus</i> <i>S.intermedius</i> <i>S.anginosus</i>
<i>mitis</i> -grubu	<i>S.sanguis</i> <i>S.gordonii</i> <i>S.parasanguis</i> <i>S.oralis</i> <i>S.mitis</i> <i>S.crista</i>

Tablo 5. Oral streptokokların sınıflandırılması (106, 169).

Mutans streptokoklar tarafından gerçekleştirilen glukan sentezinin, bu organizmaların önemli bir virülans özelliği olduğunu gösteren çalışmalar vardır (44, 72, 109, 121, 166). Bunların karyojeniteye katkıları henüz kesinlik kazanmamıştır (105). Mutans streptokoklar, hücre duvarı karbonhidrat antijenlerinin serolojik çeşitliliğine göre 8 farklı serotipe ayrılır(Tablo 5) (25, 67, 79, 106, 116, 121, 138, 139).

Mutans streptokokların, diş yüzeyinde birikimleri ve kolonize olmaları konusundaki mekanizma henüz açık değildir. Çevre ve konak faktörlerine ek olarak, mutans streptokokların spesifik genotiplerinin daha fazla kolonize olabildiği belirtilmektedir (99, 109).

Streptococcus Mutans

Streptococcus mutans, kısa veya orta zincirler halinde bulunan, kapsülsüz Gram (+) bir bakteridir. Bu koklar bazı sulu ortamlarda, asidik koşullar altında 1,5–3,0 µm uzunluğunda kısa çubuklar şeklinde görülebilir (67). Kolonileri hareketsizdir. Katalaz ve oksidaz testlerine yanıtları negatiftir. Koloni morfolojileri, buldukları kültür ortamına göre değişkenlik gösterir ve Mitis Salivarius Agar'da küçük, sınırları düzensiz, kabarık görünümlü, opak renkli koloniler halinde gözlenir. Kanlı agardaki hemolizleri değişkenlik gösterir α , β veya γ hemoliz yaparlar (116).

Streptococcus mutans'ın sukrozdan suda erimeyen ekstrasellüler polisakkaritleri oluşturmasının, çürüğü başlatmasında en önemli özelliği olduğu düşünülmektedir. Mannitol ve sorbitolu fermente eden *Streptococcus mutans*'ın karyojenik olmayan suşlarının da mannitolu fermente edebildiği ve polisakkarit oluşturabildiği görülmüştür. Karyojenik ve karyojenik olmayan streptokoklar, glikoz içeren sıvı ortamda çoğalarak benzer fermentasyon sonu ürünleri ve asit üretirler. *Streptococcus mutans*'ın katı ortamda asit yoğunlaştırması, diğer oral streptokoklardan fazladır (106, 116). Mutans streptokoklar, 19-31. aylarda, "enfektive penceresi olarak" tanımlanan bir dönemde, bebeklerin süt dişlerinin sürmesiyle birlikte, kolonize olmaya başlarlar. Kolonizasyon, yaş ve hipoplastik mine lezyonları gibi sert yüzeylerin varlığının artışı ile birlikte artar (13, 31, 158). Bununla birlikte, dil yüzeyinin de, diş yüzeyi kadar mikroorganizmalar için bir rezervuar görevi gördüğü belirtilmektedir (156). Azı dişler ön dişlere göre, fissürler; aproksimal, bukkal ve lingual yüzeylere göre, restorasyon görmüş dişler; sağlam yüzeylere göre daha fazla *Streptococcus mutans* kolonizasyonuna sahiptir (4, 13, 97, 98, 116, 131). *Streptococcus mutans*'ın diş yüzeylerinde birikimi ve kolonize olması konusundaki

mekanizma henüz açık değildir (109, 116). Oral kavitede ve dental plak içersinde farklı genotipik yapıya sahip birçok *Streptococcus mutans*'ın olabileceği gösterilmiştir (31, 68, 83, 105, 113, 133, 134). Epidemiyolojik çalışmalar, *Streptococcus mutans*'ın çocuklarda ve genç yetişkinlerde mine çürüklerinin ve bebeklerde biberon çürüklerinin başlıca etkeni olduğunu göstermektedir (100, 106). Çürük insidansı yüksek toplumların, düşük insidansa sahip toplumlara oranla, daha yüksek düzeylerde mutans streptokok düzeylerine sahip oldukları bildirilmiştir. Bunun yanında, sağlam mine yüzeylerinin de mutans streptokoklar ile kolonize olabileceği ve çürüksüz populasyonlarda da mutans streptokokların plakta yüksek oranda bulunabildiği belirtilmektedir (13, 157, 166, 167). Mutans streptokoklar türleri içerisinde en sık izole edilen türün *Streptococcus mutans* olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda, *Streptococcus mutans*'ın mutans streptokokların, %74-94'ünü oluşturduğu ve farklı populasyonlarda koronal çürük gelişimine büyük ölçüde eşlik ettiği gösterilmiştir (96).

Virülans, bir mikroorganizmanın konak üzerinde hastalığa yol açacak özelliklere sahip olmasıdır. Konak ve mikroorganizma arasındaki dinamik ilişki olarak da tanımlanabilecek virülans, dış etkenlerin yanı sıra bireysel özelliklere de bağlıdır (68). *Streptococcus mutanslar* da, diş yüzeyini çevreleyen dental plağın içersinde yaşayabilmelerini ve kolonize olabilmelerini sağlayan virülans faktörlerine sahiptir. Bunlar;

- 1- Ekstrasellüler polisakkarit sentezi yapabilmeleri,
- 2- Suda erimeyen glukanların ve şekerden fruktan polimerlerinin sentezini kataliz eden glukoziltansferazlar ve fruktoziltransferazlara sahip olmaları,
- 3- Asit üretmeleri,
- 4- Aside tolerans göstermeleri,

- 5- Intraselüler polisakkarit,
- 6- Mutasin,
- 7- ve Endodekstranaz üretmeleri,
- 8- Hücre yüzeyi proteinlerinin varlığı olarak sıralanabilir (13, 68, 157).

***Streptococcus Mutans* İdentifikasyonunda Kullanılan Kültür Yöntemleri**

Streptococcus mutans izolasyonunda sıklıkla kullanılan besiyeri sakkaroz, basitrasin ve potasyum tellürit içeren mitis salivarius basitrasin (MSB) agardır. MSB agar, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* ve *Streptococcus rattus* için seçicidir (68, 76). TYCSB agar, TYC agar (Trypticase, yeast extract ve cystine) ile birlikte glukoz, sukroz ve şeker içerir (68). GSTB agar ise, GS agar (trypticase ve yeast extract) ile glukoz, sukroz, basitrasin ve potasyum tellüritten oluşur (43, 68).

Kullanılan farklı besi yerlerine göre, kültür sonuçları da farklılıklar göstermektedir. Schaken ve arkadaşları (142) *Streptococcus sobrinus* üzerinde inhibitör etkisi nedeniyle TYCSB agarın; MSB agara göre daha uygun bir besi yeri olduğunu rapor etmişlerdir. Dasanayake ve arkadaşları (43), MSB agar üzerinde GSTB agara oranla daha fazla sayıda koloni gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

1.5.2. Laktobasiller

Spesifik karyojenik ajan olarak bilinen ilk organizma olan Laktobasiller, Gram (+), fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen çubuk şeklinde bakterilerdir. Glikozdan laktik asit ve asetik asit üretebilen türleri mevcuttur. Dental plakta diş yüzeyi demineralizasyonuna sebep olan düşük pH değerlerinde de yaşamlarını sürdürebildikleri bilinmektedir. İlerlemiş lezyonlarda (kavite) görülme sıklıkları ve sayılarının daha da arttığı görülmektedir (13, 14, 45, 106, 119). Diş yüzeylerine afinitelerinin olmadığı ve daha çok oral mukozada kolonize oldukları da

bildirilmektedir (116, 166). Ağız boşluğu içerisinde retansiyon alanlarının artışı ve emzik kullanımı ile birlikte tükürükteki sayılarının arttığı gösterilmiştir (124).

Laktobasiller, genel sağlık üzerine de etkilidirler. Bu bakteriler insan ve hayvan gastrointestinal sistemini çeşitli patojenik infeksiyonlardan korumaktadır. Bu sebeple laktobasillerin bazı türlerinden, bağırsak içi mikrobiyal dengeyi arttırarak, konak canlıyı olumlu etkileyen canlı mikrobiyal gıdaların (probiotikler) yapımında yararlanılmaktadır. Bununla birlikte laktobasillerin probiotik etkisi nedeniyle oluşturdukları biyofilm inhibisyonu üzerindeki rolleri hakkındaki bilgiler sınırlıdır. *Lactobacillus fermentum*'un dental plak üzerindeki *Streptococcus mutans*'ı inhibe etmesinden yola çıkılarak, bu bakterinin oral kavitede probiotik amaçlı kullanımının yararlı sonuçlar oluşturacağı düşünülmektedir (39).

1.5.3. Aktinomiçesler

Gram (+), hareketsiz, spor oluşturmeyen rod ve filamentler şeklinde görülen, dental plak mikroflorasının büyük kısmını oluşturan, daha çok aproksimal sahalarda ve diş eti cebinde bulunan mikroorganizmalardır. Ağız boşluğunda görülen türleri, *A.naeshlundii*, *A.viscosus* (fakültatif anaerobik), *A.israelli*, *A.meyeri*, *A.odontolyticus*' tur (anaerobik) (106, 116).

Aktinomiçesler, subgingival mikroflora ve insan kök yüzeyi çürüklerinden en yaygın olarak izole edilen organizmalardır. *A.viscosus* genç ve yetişkinlerin büyük kısmında görülür. *A.naeshlundii*, genelde diş üzerinde normal floranın bir parçasıdır. Küçük çocukların dil, tükürük ve plak yapılarında bulunduğu, dişi harap eden organik asitleri ürettiği ve diş yüzeyine bağlanmayı sağlayan ekstra ve intrasellüler polisakkaritleri üretme yeteneğine sahip olduğu rapor edilmiştir (24, 116).

1.6. Ağız Florasının Sistemik Enfeksiyonlar ile İlişkisi

Ağız boşluğu birçok bakteri türünün doğal yerleşim yeridir. Vücudun genel durumu bozulduğunda, genellikle virülansları düşük olan bu bakteriler patojenite kazanabilir ve bu nedenle ağız boşluğu potansiyel bir enfeksiyon kaynağı olarak gösterilebilir (46, 111). Ağız florası içerisinde yer alan bakteriler, bakteriyel endokardit gibi kardiyovasküler sistem enfeksiyonlarının yanı sıra, solunum yolu ve sindirim sistemi enfeksiyonlarına da yol açabilmektedir (139). Özellikle solunum yolu enfeksiyonlarında, ağız florasının önemli bir rezervuar olduğu; oral patojenlerin akciğere aspirasyonu yoluyla pnömoniye yol açtığı öne sürülmüştür (66, 111). Majon ve arkadaşları (103) ağız sağlığı ve solunum yolu enfeksiyonlarının ilişkisinin önemini vurgulamış, periodontal hastalık ile obstrüktif akciğer hastalığı arasında bir ilişki bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Gastrointestinal sistem enfeksiyonlarında en sık izole edilen bakteri topluluklarından biri *Campylobacter* türleridir. Bunlardan çalışmamızın da konusu olan *Helicobacter pylori*'nin, ağız içerisinde, dental plak, dil sırtı gibi farklı bölgelerde kolonize olduğu, gastrit ve ülser gibi gastrointestinal sistem rahatsızlıklarında, ağız yoluyla, mideye geçtiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (94, 112, 118).

1.7. Gastrointestinal Flora

Gastrointestinal floradaki mikroorganizma çeşitliliği ve sayısı gastrointestinal sekresyonlar gibi iç etkenler ile diyet, stres, ilaç gibi dış etkenlere de bağlıdır. Ağız florasındaki pH dalgalanması, ince bağırsaktaki kas hareketleri ve kalın bağırsaktaki anaerob ortam gibi etkenler, gastrointestinal kanalın farklı kısımlarındaki flora içeriğini etkilemektedir (129).

1.7.1 Mide florası

Mide florasındaki bakteri sayısı genelde düşüktür ve 0–100 CFU (Colony-forming Units)/ml kadardır. *Lactobacillus*, *Candida*, *Streptococcus viridans*, *Neisseria*, *Staphylococcus* (koagülaz-negatif) ve *Peptostreptococcus* en sık görülen türlerdir. Midede bulunan birçok organizma ağız florasının mide asidine dayanıklı kısmını yansıtır (129).

Midede kolonize olan esas bakteri topluluğu, *Helicobacter* türleri'dir. İnsanlarda, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter heilmannii* ve kültürü yapılamayan veya kültür edilmesi çok zor olan bazı türleride bulunur. *Helicobacter pylori* dışındakilerin patojen etkisi tartışmalıdır. (129).

1.8. *Helicobacter Pylori*

Helicobacter pylori, mide salgılarında belirlenmiş olmasına rağmen, bu bakteri ile, kronik aktif gastrit, peptik ülser ve mide adenokarsinomu arasındaki ilişki 1983 yılında tanımlanmıştır (108, 140). *Helicobacter* türleri, ilk olarak *Campylobacter* türünün içinde tanımlanmıştır. Gelişen moleküler biyolojik çalışmalarla 16S r-RNA sekansına göre farklı bir DNA yapısına sahip oldukları ve ayrı bir tür oldukları gösterilmiştir (108, 140).

*Campylobacter*ler kıvrık veya virgül şeklinde, gram negatif, oksidaz ve katalaz pozitif, polar flagelları ile hareketli, üremek için mikroaerofilik atmosferik şartlara gereksinim duyan bakterilerdir. *Campylobacter* ve *Helicobacter* türlerinin taksonomik sınıflandırması Tablo 6'da verilmiştir.

<i>Campylobacter türleri</i>	<i>Helicobacter türleri</i>
<i>C. jejuni ssp. jejuni</i>	<i>H. pylori</i>
<i>C. jejuni ssp. doylei</i>	<i>H. cinaedi</i>
<i>C. coli</i>	<i>H. fenneliae</i>
<i>C. fetus ssp. fetus</i>	<i>H. musteale</i>
<i>C. fetus ssp. venerealis</i>	
<i>C. hyointestinalis</i>	
<i>C. lari</i>	
<i>C. coccisus</i>	
<i>C. mucosalis</i>	
<i>C. curvus</i>	
<i>C. rectus</i>	
<i>C. upsaliensis</i>	
<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	
<i>Wolinella succinogenes</i>	

Tablo 6. Campylobacter ve Helicobacter türlerinin sınıflandırması (34).

1.8.1. *Helicobacter pylori*' nin Mikrobiyolojik Özellikleri

Helicobacter pylori kısa sarmallı ve “S” harfi şeklinde (kokoid formunda), katalaz, oksidaz ve üreaz pozitif bir bakteridir. 0.5–0.9 x 3µm boyutlarında, gram negatif bir mikroorganizma olan *Helicobacter pylori*, *In vitro* üretildiğinde, spiral form yerine çoğunlukla kıvrık basiller şeklinde görülür. *Helicobacter pylori*'nin tipik özelliği, uçlarında 4–6 tane olabilen kirpik veya flagellalarının bulunmasıdır. Kültür ortamında çoğunlukla aktif hareket eder (3, 53).

Helicobacter pylori, midede, çoğunlukla antrum bölgesinde yerleşir. Mukus tabakası içinde koloniler yapar. Helicobacter türleri arasında, insanlarda kolonizasyon gösteren *Helicobacter pylori*'dir. *Helicobacter pylori*, midede antrum mukus tabakası içinde serbest olarak yer almamakla birlikte, adhezin aracılığı ile endotel hücrelerine yapışabilir ve hücre içi endositozu gerçekleştirebilir (63).

1.8.2. *Helicobacter pylori* 'nin Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

Helicobacter pylori, mikroaerofil bir bakteri olup, ideal olarak %5 O₂ ve %5–10 CO₂ içeren ortamda üreme gösterir. Kültürlerde optimal üreme, 37 °C sıcaklıkta ve 3–5 günde gözlenir. Üreme için gerekli optimum pH 6.4- 8.4' dür. Primer kültürlerinde, kanlı agarda, 37 °C'de 3–5 gün içinde, 1-2 mm büyüklüğünde, yuvarlak, yarı şeffaf koloniler oluşturur. Kanlı agarda koloniler etrafında ince gri renkli bir hemoliz zonu görülür. *Helicobacter pylori*, yaşlanmış kültürlerinde, ortamda antibiyotik varlığında veya yaşamsal besinlerin yokluğunda, basiler formdan kokoidal forma dönüşebilir. Bakteri, bu formda metabolik olarak aktiftir. *In vitro* ortamda kültürünün yapılması güçtür. *In vitro* şartlarda, *Helicobacter pylori* 'nin izolasyonunda %5–10 serum veya kan ilaveli brain-heart infüzyon agar, brucella agar ve triptacase-soy agar gibi besiyerleri kullanılmaktadır (64).

Helicobacter pylori; üreaz, katalaz, DNAase, alkalin fosfataz, lösinaminopeptidaz, gama glutamil amino peptidaz enzimleri salgılayabilir. Bunlardan, özellikle üreaz testi'nin olumlu sonuç vermesine yol açan üreaz enzimi, mide örneklerinden bakterinin doğrudan tanımlanmasında kullanılmaktadır (3, 53).

1.8.3. *Helicobacter pylori*'nin Antijenik Yapısı ve Virülansı

Fenotipik düzeyde tüm *Helicobacter pylori* türleri aynı olmakla birlikte genotiplerinde bazı farklılıklar vardır ve bu farklılığın ülser yapıcı etki ile de ilgisinin olduğu düşünülmektedir. *Helicobacter pylori* türlerinin; lipopolisakkarit yapısı, vakuol yapıcı sitotoksin (*vacA*), Citotoxin associated gen A (*cagA*) ve nötrofil aktivasyonu bakımından farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Bakteri, lipopolisakkarit antijenlerine dayanılarak tiplendirilebilir. Flagel antijenleri ise hem *Campylobacter*'lerle hem de tür içinde ortak yapıdadır. Ayrıca 'vakuol yapıcı

sitotoksin' bu bakteri türünün % 65'inde vardır ve epitel hücrelerinde vakuol oluşumu ile karakterli bir doku hasarına yol açmaktadır. Bakterinin virülansında ve patogeneğinde rol oynayan özellikler Tablo 7'de görülmektedir (3).

1.8.4. *Helicobacter pylori* 'nin Epidemiyolojisi

Helicobacter pylori, dünyanın birçok bölgesinde insan midesinden izole edilen bir bakteri türüdür. Gelişmekte olan ülkelerde popülasyonun %70-90'ının *Helicobacter pylori* ile enfekte olduğu; bakterinin gelişmiş ülkelerdeki görülme sıklığının ise %25-50 arasında olduğu bildirilmiştir. Bireyler, yaşamlarının ilk on yılında bu bakteriyle karşılaşmaktadır. Enfeksiyon görülme sıklığını, kalabalık yaşam, kötü hijyen koşulları ve düşük sosyo-ekonomik koşullar arttırmaktadır (3).

Bakterinin bulaşma yolları tam olarak bilinmemekle birlikte, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, kontamine olan su kaynakları sorumlu tutulmaktadır. Diğer olası bulaşma yolları, tükürük, gastrik sıvılar ve kontamine gıdalardır. Dışkıının bulaştığı yiyecek ve içeceklerle de bulaşım olabileceği düşünülmektedir. *Helicobacter pylori*'nin evcil hayvanlarda da saptanmış olması, enfeksiyonun bu yolla da geçişinin mümkün olabileceğini ortaya koymaktadır (3, 52).

Helicobacter pylori, eşler arasında ve aile içi yakın temasla da bulaşabilir. *Helicobacter pylori*'nin dental plakta ve tükürükte saptanması, bu görüşü desteklemektedir (52, 53).

Üst gastrointestinal endoskopik girişimleri esnasında, %1-3 oranında bulaşım görülmüştür. Mesleki risk grupları içerisinde endoskopistler ve gastroenterologlar yer almaktadır. Son yıllarda dişhekimleri de bu gruba sokulmaktadır (77). Endoskopi işlemleri ve dişhekimliği hizmetlerinde kullanılan ekipmanların, dezenfeksiyon ve sterilizasyon işlemlerinin yapılmamasının bulaşım riskini arttıran etkenler olduğu rapor edilmiştir (3).

Özellik	Etki
Spiral şekil	Mukus içinde motiliteyi sağlar.
Flagella	Hareketin etkin oluşunu sağlar.
Lipopolisakkaritler; GM3 gangliozid ve Lewis B antijenlerine özgül bağlanmayı sağlar.	Gastrik mukus salgılayan hücrelere selektif kolonizasyon
Üreaz A ve B	Gastrik ortamda yaşam sürdürme (bazı deneysel çalışmalarda amonyağın epitel hücresine toksik etkisi gösterilmiş)
Katalaz	Gastrik ortamda ve muhtemelen de fagositik vakuollerde (H ₂ O ₂ 'den korunarak) yaşama
Fosfolipaz A ve B	Mukusun epitelial hücre membranını sindirimi, mukus ıslaklığının artışı
Proteaz	Mukusun ve epitelial hücre membranını sindirimi, mukusun eriyebilirliğinin artışı.
Vakuol yapıcı sitotoksin (Vac A)	Epitel hücresi zarar görmesi
Düşük molekül ağırlıklı kemoatraktif proteinler(porinler)	Nötrofil ve mononükleer hücreleri kendine çekerek reaktif oksijen bileşikleri ve interlökinlerin salınması
Cag A (Cytotoxin Associated gen A)	Sitotoksin oluşumu ve peptik ülserle ilişkili olduğu düşünülüyor.
Isı şok proteinleri (Hsp A ve B)	Otoimmünitede rol oynar.

Tablo 7. Helicobacter pylori'nin patogenezi ve virulans özellikleri (3).

1.9. *Helicobacter pylori* ' nin Patogenezi ve İmmunoloji

Gastrik enflamasyon, *Helicobacter pylori* ile enfekte olmuş hastalarda değişmez bir bulgudur. Organizmaya karşı konağın immun yanıtıdır. Histolojik olarak, *Helicobacter pylori*'ye bağlı kronik enflamatuvar hücreler; lenfositler, plazma hücreleri, eozinofiller ve nötrofiller ile karakterizedir. *Helicobacter pylori*, insan gastrik epiteline kolonize olup, mukus tabakası içinde, epitel yüzeyine çok yakın olarak, mukozaya zarar vermeksizin yaşayabilme özelliğindedir. *Helicobacter pylori*'nin kendisi ya da ürünlerinin, gastrik enflamasyona neden olmasında iki temel oluşum söz konusudur. Birincisi, mikroorganizmanın yüzeysel epitel hücrelerinden kaynaklanan, pro-enflamatuvar mediatörlerin (kemokinler) salınımıdır. İkincisi, *Helicobacter pylori*'nin çeşitli ürünlerinin mide mukozasının altına doğru girmesidir (3).

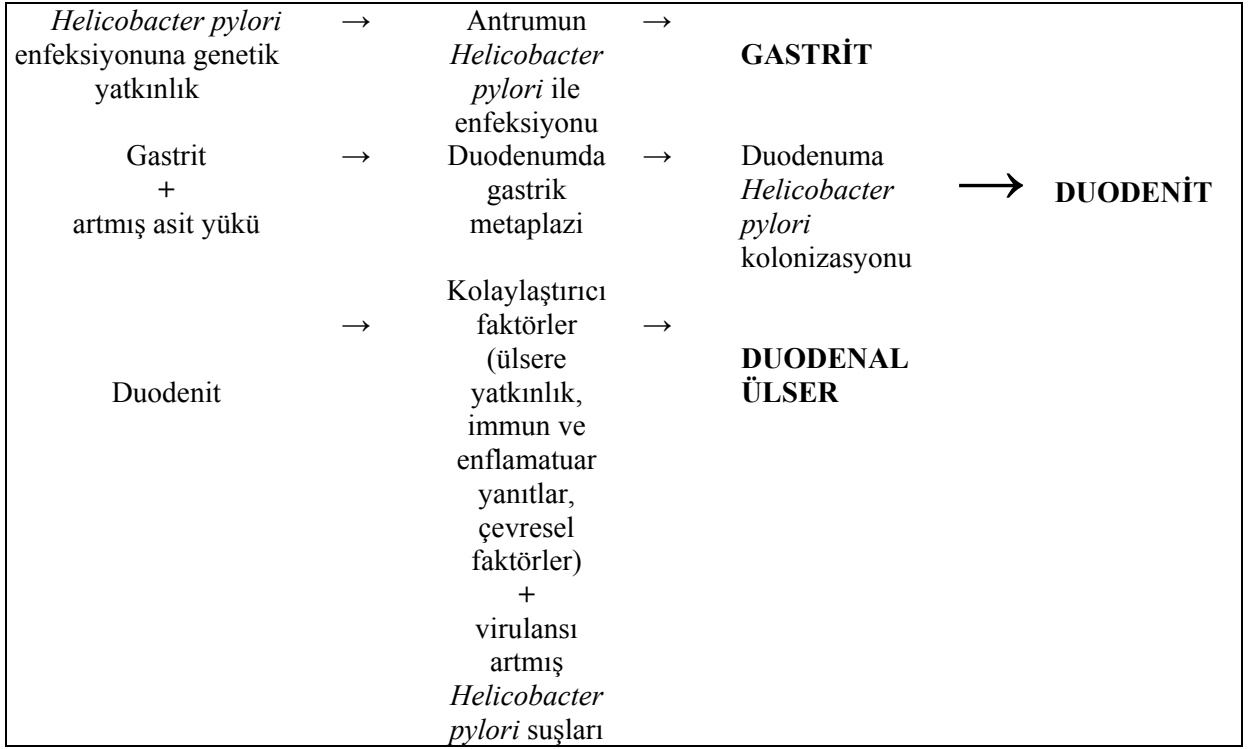
Helicobacter pylori suşlarının %50 'si, ısıya duyarlı, proteazlara hassas ve kültür edilen hücrelerde vakuolizasyon oluşturan vacuolating cytotoxin (Vac A) üretir. Sitotoksik suşlar ile enfeksiyon, peptik ülser ve daha şiddetli gastrik enflamasyonlara yol açar (3) .

Helicobacter pylori, birçok enzim üretmektedir. Bunlardan biri, mukoza hasarı ile ilgili olanı üreazdır. Bakteri, salgıladığı bu enzimle, CO₂ ve NH₄ oluşturur. Amonyak üretimi, organizmayı gastrik asitten korumakla kalmaz, aynı zamanda epitele toksik etki gösterir. Bu toksik etki, hücreler arası tutunmayı azaltır ve etkenin salgıladığı sitotoksinlerin etkisini artırır. Gastrit oluşumu ve kronikleşmesi, ülser oluşumunu tetikler. Duedonal ülserlerde, duedonumdaki antral hücrelerinin metaplazileri, bu ülserlerin oluşum yerleridir. Diğer yandan, mukus salgılayan hücreler üzerindeki sitotoksik etki, koruyucu mukus salınımını azaltır. Bunda, bakterinin ürettiği müsinaz enziminin doğrudan etkisi vardır. Bu şekilde, sindirim

enzimleri, doğrudan mukozaya etki etme olanağı bulurlar. Antrum mukozasında yerleşen mikroorganizmanın, duodenal bikarbonat salınımını engellediği, salgıladığı mediyatörler aracılığı ile de mukoza erozyonuna yol açtığı kabul edilmektedir (55, 64).

1.9.1. *Helicobacter Pylori*'nin Duodenal Ülser Patogenezindeki Rolü

Helicobacter pylori, önce mukozada akut gastrit oluşturmakta, gastrit, 20–40 yıllık yavaş bir süreç içerisinde kronik gastrit ve gastrik atrofiye dönüşmektedir. *Helicobacter pylori*'nin vücuda girmesinden sonra semptomatik veya genelde asemptomatik seyreden, 7–10 günlük bir akut nötrofilik gastrit dönemi görülür. Mikroorganizma, daha sonra visköz mukus tabakayı delerek, yüzey epitel hücrelerinin apikal membranına yerleşir. Burada hücreye yapışarak çoğalır. Hastaların büyük çoğunluğunun immun yanıtı *Helicobacter pylori*'yi ortadan kaldırmaya yeterli olmaz. Kişide ömür boyu devam eden ve antimikrobiyal tedavi ile düzelebilen aktif kronik gastrit gelişir. *Helicobacter pylori* gastriti, öncelikle mide antrumunda yerleşir, zamanla korpusa da geçerek, pangastrit yapar. İleriki dönemlerde, mukozada multifokal atrofi ve intestinal metaplaziye yol açar. *Helicobacter pylori* gastritinin temel histopatolojik özellikleri, yüzey epitelinde dejenerasyon, glandüler atrofi ve intestinal metaplazi ile birlikte, plazma hücreleri, monosit ve lenfositlerden oluşan enflamatuar hücre infiltrasyonudur. *Helicobacter pylori*'nin peptik ülser oluşturma mekanizması Tablo 8'de gösterilmiştir (64, 93, 120).



Tablo 8. *Helicobacter pylori*'nin peptik ülser oluşturma mekanizması (3) .

1. 9. 2. *Helicobacter pylori* ve Non-ülser Dispepsi (NÜD)

Non-ülser dispepsi, üç hafta veya daha uzun süre ile dispeptik semptomlar olmasına rağmen, endoskopik, radyolojik ve biyokimyasal olarak herhangi bir patolojinin bulunmamasıdır. Non-ülser dispepside, tipik olarak gündüzleri görülen ve üst karın bölgesinde sınırlı, çeşitli rahatsızlıklardan (abdominal ağrı ve rahatsızlık, post prandiyal dolgunluk, gaz, geğirti, erken doyumluk, bulantı, kusma, retrosternal yanma, regürjitasyon) bir veya birkaçı birlikte görülebilir. NÜD'in görülme sıklığı, %7–41 oranındadır. Tüm toplumun %1'i, yılda en az bir kez NÜD nedeniyle doktora başvurmakta ve bunların % 98'i reçete almaktadır (3, 78).

NÜD'li vakalarda *Helicobacter pylori* görülme sıklığı, *Helicobacter pylori*'nin etken olduğu bilinen hastalıklardan daha yüksek oranda bulunmuştur. Birçok klinikte, NÜD'li gruplara, doğrudan *Helicobacter pylori* pozitif hastalar gözüyle

bakılmaktadır. Bu tür gruplarda tedavinin etkinliğini belirlemek de oldukça zordur. Etkenin direnci kemoterapinin 6. haftasında kırılırken, 8. hafta sonunda semptomların gerilediği gözlenebilmektedir. NÜD'li hastaların %40-70'inde, katı gıdaların boşaltılmasında ciddi gecikmeler saptanırken, *Helicobacter pylori* pozitif hastalarda gastrik boşalmada gecikme sık görülmemektedir (78).

1. 9. 3. *Helicobacter pylori* ve Gastrit

Helicobacter pylori, non-eroziv, non-spesifik gastritin nedeni olarak bilinmektedir. Antrum ve korpus mukozasındaki kronik aktif gastritler *Helicobacter pylori* ile birlikte görülür. *Helicobacter pylori*'nin tip B gastritlerdeki görülme sıklığının %65–80 dolayında olduğu bildirilmiştir (3).

1. 9. 4. *Helicobacter pylori* ve Gastrik Ülser

Duedonal ülser ile karşılaştırıldığında, gastrik ülser patogeneğinde, *Helicobacter pylori* dışındaki etkenlerin daha fazla rol oynadığı kabul edilmektedir. Bununla birlikte, gastrik ülserlerin, %58-94'ünde *Helicobacter pylori* saptanmıştır (34).

1. 9. 5. *Helicobacter pylori* ve Mide Karsinomu

Helicobacter pylori ve gastrik adenokarsinoma arasındaki ilişki, epidemiyolojik, histolojik ve laboratuvar bulgularıyla kesinlik kazanmıştır. Gastrik kanser ile düşük vitamin C alımı arasındaki korelasyon, olası nedenlerden birisi olarak gösterilmektedir. *Helicobacter pylori* ile enfeksiyonu olan bireylerde, mide suyunda C vitamininde görülen belirgin azalmanın, *Helicobacter pylori*'nin tedavi ile eradike edilmesinden sonra C vitamininin normal seviyelere ulaşması nedeniyle, aralarında ilişki anlamlı bulunmuştur. Hücre proliferasyonunun artması, adenokarsinom gelişme riskini artırmaktadır. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu varlığında, mide epitel hücre proliferasyonunun belirgin olarak arttığı, *Helicobacter*

pylori eradikasyonu sonrasında ise midede hücre sayısındaki artışın normale döndüğü gözlenmiştir(3).

Helicobacter pylori enfeksiyonu ile akut gastrit arasında kesin bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Bu enfeksiyon üzerine, beslenme yetersizliği, iritanlar ve nitritlerin etkisi eklenince, gastrik mukozada histolojik değişimler oluşmaya başlar. Kronik aktif gastrit, atrofik gastrite dönüşür ve mide kanseri gelişimine yol açabilir (3, 52).

Son çalışmalar *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun, mide mukozası ile ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoması için ciddi risk etkeni olduğunu göstermiştir. MALT lenfoması, düşük dereceli B hücreli lenfoma olup, tüm mide lenfomalarının %10'unu oluşturmaktadır. Sağlıklı mide MALT içermez. Bununla birlikte, kronik *Helicobacter pylori* enfeksiyonundan sonra midede varlığı gözlenmiştir. Mide dokusundaki lenfoid infiltrasyon derecesi ile enfeksiyonun şiddeti ilişkilidir. Mide MALT lenfomalı 164 olguluk seride, hastalardan alınan biopsi örneklerinin tamamında, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu pozitif bulunmuştur. Kronik enfeksiyonun devam etmesi ve B lenfositlerin sürekli uyarılması, mide MALT lenfomasını geliştirmektedir (65).

Helicobacter pylori'nin mide kanseri ile kesin bir ilişkisi olduğu konusu tartışmalıdır. Buna karşın Gastritin, zaman içinde prekanseröz bir lezyona dönüşmesi riski nedeniyle *Helicobacter pylori* bugün Dünya Sağlık Örgütü tarafından birinci derecede kanserojen mikroorganizma olarak tanımlanmıştır. MALT lenfoma'nın %90 oranında, *Helicobacter pylori* ile ilişkili olduğu, *Helicobacter pylori* eradikasyonu sağlanan bireylerin %50'sinde hastalığın düzeldiği rapor edilmiştir (64).

1.10. *Helicobacter Pylori* Rezervuarı Olarak Ağız Boşluğu

Helicobacter pylori'nin ağız boşluğunda saptandığı bildirilmesine rağmen, çalışmalarda oral *Helicobacter pylori* prevalansının %0–100 arasında değiştiği gözlenmektedir(151). Bu sonuçlara şüphe ile yaklaşılmaktadır. Bunun nedenlerinden birisi, PCR ile yapılan çalışmalarda düşük sayıda bile olsa bakterinin tespiti mümkündür. Bunun ötesinde PCR, yaşamayan yani enfeksiyöz olmayan *Helicobacter pylori*'nin de tespitini sağlar. Bununla birlikte, ağız boşluğunda tespit edilen *Helicobacter pylori*'nin canlı ve patolojik sonuçlar doğurabilecek sayıda olduğu varsayıldığında bakterinin üremesini destekleyecek bir mikroortam da olmalıdır. *Helicobacter pylori*'nin yaşamasını sağlamak için, pH, indirgeme potansiyeli, besin varlığı gibi koşullar olmalıdır. Bu düşünce ile spesifik türlerin üremesinin, mikroortam içerisindeki diğer türlerin varlığına bağlı olduğu giderek artan bir şekilde kabul edilmektedir (51).

Helicobacter pylori'nin oral kavitede seçici olarak *Fusobacterium nucleatum* ve *Porphyromonas gingivalise* bağlandığı rapor edilmiştir (6, 80). Bununla birlikte *Helicobacter pylori*'nin tespit edildiği bölgelerle oral mikrofloranın ilişkisini gösteren çalışmalara gereksinim vardır.

Eğer *Helicobacter pylori* için spesifik bir yerleşim yeri var ise, farklı sahalar arasındaki prevalansta bir farklılık beklenmelidir. *Helicobacter pylori*, supra ve subgingival plakta, tükürükte, oral lezyonlarda ve oral mukoza üzerinde tespit edilmiştir. Fakat çalışmalarda kullanılan yöntem farklılıkları yüzünden bu sahalar arasında değişen prevalansı ölçmek güçtür (51). *Helicobacter pylori*'nin supragingival plaktaki prevalansı, molarlardan premolarlara ve kesici dişlere doğru

azalmaktadır, bu da bakterinin ağız içerisinde belli bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir (88).

Sonuçta, eğer ağız boşluğu *Helicobacter pylori* için bir rezervuarsa, bunun geçici mi yoksa daimi bir rezervuar mı olduğu kesin değildir. Eğer daimi bir rezervuar ise bu oral floranın, gastrik enfeksiyondaki rolünün anlaşılmasının yanı sıra, yapılan tedavilerden sonra nükslerin gözlenmesini de açıklayabilecektir.

Bakterinin bulaşmasında oral-oral, fekal-oral geçişin olduğu düşünülmektedir. Oral-oral geçişte *Helicobacter pylori*'nin bireyler arasında, enfekte olmuş tükrük ile geçtiği varsayılmaktadır. Megraud ve arkadaşlarının (112) bebeklerinin yiyeceklerini önceden çiğneyen annelerin çocuklarında yüksek prevalansta *Helicobacter pylori* bulmaları oral-oral geçişi destekleyen bir bulgudur. Avustralya'da Çinli göçmenlerin kullandıkları yemek çubuklarının yüksek prevalanstaki *Helicobacter pylori* ile ilişkili olduğu serolojik çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu, aynı yemek çubuğunun farklı kişilerce kullanılması ve bu şekilde *Helicobacter pylori*'nin tükürkle geçişi sonucunda olabilir (51).

Helicobacter pylori'nin kültürünün yapılmasında, oral örneklerde olduğu gibi çok sayıda mikroorganizma içermesi nedeniyle fekal örneklerde de sınırlı bir başarı elde edilmektedir. *Helicobacter pylori* feçes örneklerinden PCR yöntemi ile de tespit edilmiştir. Saptanma oranları, ağızda bulunma oranlarından genellikle daha düşüktür. Bu, fekal kontaminantların ile PCR reaksiyonunu inhibisyonuna da bağlanmakta fekal-oral geçişin potansiyel öneminin saptanmasını zorlaştırmaktadır (50). Fekal-oral geçiş, su kaynaklarının *Helicobacter pylori*'yi barındırabileceğini bildiren Güney Amerika'da yapılan çalışmaların sonuçları ile indirek olarak da desteklenmiştir (87).

1.10.1. Oral *Helicobacter Pylori*'nin Potansiyel Önemi

Ağız boşluğu, midede gözlenen *Helicobacter pylori* enfeksiyonu için potansiyel bir rezervuardır. Bunun yanında yapılacak tedaviden sonra enfeksiyonun yeniden oluşmasında da potansiyel bir rezervuar olabilir. Oral *Helicobacter pylori*, gastro-oral yol ile mideden kazanılsa da, oral kavitede bulunmasının gastrik sağlık açısından zararlı olabileceği düşünülmektedir. Nitekim gastrik enfeksiyonun tedavisi sonrasında nöksler yaygın olarak görülmektedir. Bunun nedeninin, sistemik antibiyotiklerin etkili olamayacağı bir ortam olan dental plaktaki *Helicobacter pylori* ile gastrik mukozada tekrar kolonize olabileceği düşünülmektedir. Bu görüşe destek olarak gastrik enfeksiyonun tedavisinin, ağız boşluğundan *Helicobacter pylori*'nin ortadan kaldırılmasını sağlamadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır ve ayrıca gastrik eradikasyonun başarısının, oral kavitede *Helicobacter pylori* pozitif olan bireylerde, negatif olan bireylere göre belirgin derecede daha düşük olduğu bildirilmiştir (48, 102).

Ağız boşluğunun ve dental plağın *Helicobacter pylori*'nin geçişindeki rolü ile ilgili birçok kanıt mevcuttur. Yeni geliştirilen yöntemler bu görüşü desteklemektedir. Bununla birlikte, bu konu kesinlik kazanmamış ve daha çok sayıda araştırma gerektirmektedir. Daha spesifik olarak midede ve ağızda birbiriyle aynı ya da ilişkili suşların varlığının kanıtlanması gereklidir. Aynı zamanda ağız boşluğunda *Helicobacter pylori*'nin yerleştiği spesifik alanlar tanımlanmalı ve bu bakterinin diğer oral mikroflora üyeleri ile ilişkisi belirlenmelidir. Bakterinin canlılığını sürdürerek dolayısıyla enfeksiyona neden olduğunu ispatlamak için kültür tekniklerinin de geliştirilmesine gereksinim olduğu bildirilmiştir (51).

1. 10. 2. *Helicobacter pylori* ve Dental Plak

Günümüzde midelerinde *Helicobacter pylori* enfeksiyonu bulunan bireylerde olduğu kadar bulunmayan bireylerin dental plak örneklerinde de moleküler biyolojik yöntemlerle yapılan çalışmalarda *Helicobacter pylori* bakterisinin varlığı gösterilmiştir (1, 15, 32, 51, 75, 80, 81, 86, 88, 102, 112, 122, 131, 143, 149, 154). Bu bulgu, bakterinin ağız boşluğunun normal florasının bir üyesi olup olmadığı ve bu organizmanın, yapılan tedavi sonrası midenin tekrar enfekte olmasına (re-enfeksiyon) neden olup olmadığı sorularına yol açmıştır. Çalışma gruplarındaki farklılıklar ve kullanılan yöntemlerin farklı olması nedeniyle yapılan çalışmalarda *Helicobacter pylori*'nin görülme sıklığı ile ilgili değişik sonuçlar bildirilmiştir (51, 62, 101) .

Streptococcus mutans ve *Prevotella intermedia* gibi oral bakterilerin in vitro çalışmalarda *Helicobacter pylori*'ye karşı antagonist etki gösterdikleri, bu bakterinin ağız boşluğundaki kolonizasyonunu inhibe ettikleri gösterilmiştir (80, 122). Hastaların oral dokularında düşük oranda *Helicobacter pylori* tespit eden bazı araştırmacılar, ağız boşluğunun bu bakteri için çok önemli bir alan olmadığını belirtmişlerdir (86, 117, 118). Buna karşın, çalışma popülasyonunun tümünde *Helicobacter pylori* tespit eden diğer bazı araştırmacılar, bu bakterinin ağız boşluğunun bir üyesi olduğunu ve ağız boşluğunda *Helicobacter pylori*'nin varlığının, tekrarlayan gastrik enfeksiyon için risk oluşturduğunu bildirmişlerdir (51, 88, 101, 114).

Bazı araştırmacılar, *Helicobacter pylori*'nin konakçı ile kommensal bir ilişki içinde, normal ağız florasında bulunduğunu ancak çok az sayıda var olmaları nedeni ile identifikasyonunun zor olduğunu öne sürmektedir (144). *Helicobacter pylori*'nin

ağız boşluğundaki varlığının geçici olduğunu, bakterinin belli dönemlerdeki varlığının, gastroözofagal reflü nedeniyle olabileceğini savunan araştırmacılar da vardır (37, 135)

Miyabayashi ve arkadaşları (112), *Helicobacter pylori* gastriti olan 47 hastanın dâhil olduğu ve bakterinin identifikasyonu için nested PCR metodunun kullandıkları çalışmalarında, ağız boşluğundaki *Helicobacter pylori* varlığının, tekrarlayan gastrik *Helicobacter pylori* enfeksiyonu için önemli bir belirleyici faktör olduğu sonucuna varmışlardır. Oshowo ve arkadaşları (126), üst gastrointestinal endoskopi yapılacak 208 dispeptik hastadan elde edilen dental plak ve tükürük örneklerini PCR ile inceledikleri çalışmalarında, bakterinin ağızdaki kolonizasyonunun, midedeki kolonizasyonu ile bağlantılı olduğu sonucuna varmışlardır.

Song ve arkadaşları (150) az sayıda plak örneğinin yer aldığı çalışmalarında *Helicobacter pylori* tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, *Helicobacter pylori*'nin kommensal bir mikroorganizma olabileceğini, fakat varlığının midede enfeksiyon oluşturacağı anlamına gelmeyeceğini belirtmişlerdir. Song ve arkadaşları (149) bir başka çalışmalarında örnek alınan bölgelere göre dental plakta *Helicobacter pylori* görülme sıklığını değerlendirmişlerdir. Molar bölgede bu bakterinin görülme sıklığının premolarlar ve kesici dişler bölgesine göre anlamlı derecede yüksek bulunmasını, bakterinin mikroareofilik özelliği ile açıklamışlardır.

Farklı identifikasyon tekniklerinin kullanılarak yapılan çalışmalarda, *Helicobacter pylori*'nin dental plaktaki prevalansı ile ilgili farklı sonuçlar (%0–100) ortaya konmuştur (51, 88, 100, 114, 161). Değişik sonuçların nedeni olarak kullanılan yöntemlerin farklılığı, pimerlerin duyarlılığı, çalışılan örnek gruplarındaki farklılıklar gösterilmektedir (148). Kültür yöntemleri kullanıldığında *Helicobacter pylori*'nin fiziksel veya kimyasal etkene maruz kalarak tespit edilememesi, bu

mikroorganizmanın gözden kaçmasına sebep olabilir (161). *Helicobacter pylori*'nin ağızdaki dağılımının uniform olmaması nedeni ile doğru bir sonuç elde edilebilmesi için farklı bölgelerden örnek alınması önerilmektedir (144, 161).

1. 11. *Helicobacter pylori*'nin Tanısında Kullanılan Yöntemler

Helicobacter pylori tanısında histoloji, kültür, hızlı üreaz testi gibi invaziv ve üre nefes testi, serolojik testler, *Helicobacter pylori* gaita antijen testi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi non-invaziv testler kullanılmaktadır. Serolojik testler, daha çok kitle taramalarında ve geçmişteki *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ile temasın varlığının araştırılmasında kullanılır. Dispeptik hastalarda önce serolojik araştırma yapılır. *Helicobacter pylori* enfeksiyonun tedavi öncesinde histolojik inceleme ve kültür yöntemi, tedavi takibinde ise üre solunum testinin daha yararlı olduğu belirtilmiştir (3).

Kültür ve Histolojik İnceleme

Helicobacter pylori enfeksiyonlarının tanısında, etkene yönelik bakteriyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Endoskopi sırasında alınan örneklerin kültürü mikroaerobik koşullarda (%90 azot, %5 oksijen, %5 karbondioksit) yapılabilir. Üreyen bakterilerde, üreaz, katalaz ve oksidaz enzimlerinin varlığı tanı koydurucudur. Ayrıca bakteri kolonilerinden Gram, Giemsa boyaları ya da Warthin–Stuart yöntemi kullanılarak boyanmış preparatlar hazırlanır. Mikroskopik incelemelerde bakteriler tipik olarak görülmekle birlikte, biyopsi örneklerinde bakterinin saptanamaması her zaman negatif olarak değerlendirilmemelidir. Bu nedenle tanı konurken üre nefes testi, serolojik testler ve gaita antijen testleri gibi yardımcı testler ile desteklenmelidir (27, 140).

Standart mide biyopsisi, histolojik tanıda kullanılacak bir diğer invaziv yöntemdir. *Helicobacter pylori* araştırılması için rutin histolojik incelemelerde

biyopsi materyali ve epitelyal tabakalar *Hematoksilen-Eosin* boyası ile boyanır. Ancak bu boyama ile *Helicobacter pylori*'nin tanımlanması güçtür. Bununla birlikte, bakterinin etrafında Polimorf Nüveli lökosit sayısındaki artış, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu lehine bir göstergedir. *Helicobacter pylori* *Giemsa* boyası ile daha kolayca tanımlanır. Histolojik incelemeye alternatif olarak, duyarlılığı ve özgünlüğü daha yüksek olan hızlı üreaz testleri kullanılmaktadır (3).

Hızlı Üreaz Testi (CLO test)

CLO (Campylobacter benzeri organizma) testi, geliştirilen ilk ticari üreaz testidir. Bu test, fenol kırmızı ve üre içeren bir agar jelden oluşmaktadır (59). CLO testi, %90'dan fazla duyarlılığı ve spesifitesi olan, yaygın kullanılan bir testtir. Bu testte, mide biyopsi örneklerinde saptanan *Helicobacter pylori*'nin çıkardığı üreaz enziminin aktivitesi araştırılmaktadır. Biyopsi örneklerindeki üreaz enzimleri, üre ve pH değişikliğine duyarlı boya içeren bir ortamda üreyi parçalar. Açığa çıkan OH⁻ iyonları, ortamda renk değişikliğine neden olur. Ortamda *Yersinia enterocolitica* ve *Proteus vulgaris* gibi üreaz pozitif olan bakterilerin varlığında karışıklık doğabilir. *Helicobacter pylori* varlığında, üreaz testi 1 saat içerisinde olumlu sonuç verirken, diğer bakteriler için 12 saat gerekmektedir. Bu test, invaziv (endoskopi ve mide biyopsisi ile) bir yöntem olmakla birlikte, sensitivite ve spesifitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (163).

Üre solunum testi

Üre solunum testi, ürenin hidrolize olması prensibine dayanan non-invaziv bir yöntemdir. Midede *Helicobacter pylori*'nin varlığında, üre hidrolize olur ve solunumla açığa çıkar. Testin işleyiş mekanizması, radyoaktif karbon (C₁₄ veya C₁₃) ile işaretlenmiş ürenin ağızdan alımı, bunun bakteri tarafından parçalanması ve sonuçta ekspirasyon havasında ortaya çıkan işaretli CO₂'nin saptanması esasına

dayanmaktadır. Bu test duyarlı olmakla birlikte (%95), çok spesifik değildir. Tedaviden hemen sonraki dönemlerde yanıtıcı olabilen negatif sonuçlar gözlenir. Daha çok eradikasyonun doğrulanmasında kullanıldığı bildirilmiştir (3).

Serolojik testler

Helicobacter pylori ile gastrik mukozanın enfeksiyonu, lokal immün yanıt ile birlikte sistemik yanıtı da yol açar. Serumdaki spesifik IgG ve IgA, midedeki salgısal IgM ve IgA düzeyinin artışına neden olur. Antikorlar, enfeksiyona karşı koruyucu olmaktan çok tanı değeri taşımaktadır. Bireyin, geçmişte *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ile ilişkisinin araştırılmasında, kanda anti *Helicobacter pylori* IgG, M ya da IgA antikorlarının aranması, yararlı, ucuz ve hızlı testlerdendir. İmmünoblot, kompleman birleşmesi, pasif hemaglutinasyon ve benzeri yöntemler de başarı oranları yüksek olmamakla birlikte, anti *Helicobacter pylori* antikorlarının varlığını saptamaya yönelik, ikincil testler olarak kullanılmaktadır. Serolojik yöntemler, özellikle epidemiyolojik çalışmalarda ve tedavinin izlenmesinde yararlıdır. Başarı ile tedavi edilen olgularda IgG yanıtı azalırken, nükslerde tekrar yükselir. Piyasada son dönemde geliştirilen ELISA testlerinin çoğunun sensitivitesi %100'e, spesifitesi ise %95'e ulaşmaktadır (59, 163).

Helicobacter pylori Gaita Antijen Testi

Bu yöntem, dışkı örneğindeki *Helicobacter pylori* antijeninin, bu antijene spesifik monoklonal bir antikorla kaplı kolloidal lateks partikülleri ile reaksiyona girmesi ve oluşan kompleksin reaksiyon bölgesine kromatografik göçüne dayanır. Örneğin; Simple *Helicobacter pylori* Rapid Test'inde reaksiyon bölgesine gelen bu kompleks, reaksiyon bölgesinde bulunan *Helicobacter pylori* antijenine spesifik bir antikorla reaksiyona girerek, pembe renkli bir bant oluşturur. *Helicobacter pylori*

olmayan örneklerde yalnızca mavi renkli kontrol bantı gözlenirken, pozitif örneklerde pembe ve mavi (kontrol) bantlar oluşur (3).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR, *Helicobacter pylori* tanısında kullanılan, yüksek duyarlılığı ve spesifitesi olan bir tekniktir. Bu yöntemle, ortamda birkaç tek kopya DNA varlığında bile organizma tanımlanabilir. PCR'ın diğer bir avantajı, tükürük gibi non-gastrik sıvılarda ve dental plakta *Helicobacter pylori* DNA'sını tespit edebilmesidir (34).

1. 12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ; spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir (79, 89) . Hücre içinde gerçekleşen doğal DNA replikasyonu, PCR ile bir tüp içersinde taklit edilir. Bir PCR döngüsü sırasıyla, DNA zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (Denatürasyon); sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (Annealing) ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması (Extension) aşamalarından meydana gelir (35).

PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. Reaksiyon başlatılmadan önce istenen sayıda döngünün tekrarlanması sağlanabilir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerini tamamlayıcı olan, 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR'ın en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleşmesinde, belirli bazı temel bileşenler ve işlem basamakları gerekmektedir (35);

- 1) oğaltılacak olan kalıp DNA,
- 2) DNA'da çoğaltılması planlanan , bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak DNA primerleri,
- 3) Primerlere bağlanıp 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz,
- 4) Sentezde kullanılacak olan deoksinükleotid-trifosfatlar (dNTP),
- 5) Polimerazın alışması için gerekli, tampon görevi yapacak maddeler, tuzlar ve enzim çalışması için önemli bir yardımcı faktör olan Mg⁺⁺ iyonları (90).

1. Çoğaltılacak olan kalıp DNA

PCR'da, genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve herhangi bir DNA parçası da kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri, amaca göre, cDNA, genomik DNA, genomik kitaplıklar halinde, araştırma laboratuvarları ve kliniklerden veya ticari olarak elde edilir (159).

2. Sentezde Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Primer, sentetik olarak hazırlanan tek iplikiğe sahip, spesifik DNA segmentidir. Başarılı bir PCR'da, en önemli parametre, primerlerin dizaynıdır. İyi dizayn edilmemiş primer, non-spesifik amplifikasyon (oğalma) ve/veya primer-dimer formasyonu nedeniyle ürün oluşmamasına veya çok az oluşmasına neden olur. Kalıp DNA ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20–30 nükleotid uzunluğunda düzenlenmiştir. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizinin bilinen kısımları dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır. Primerlerin tasarımı yapılırken mümkün olduğunca dört nükleotid bazın eşit sayıda kullanımına dikkat edilir. Doğru sonuç alınabilmesi için önem verilmesi gereken bazı noktalar; primerlerin poliürin,

poliprimidin ya da tekrarlı bölgeler içermemesi, primer çiftlerinin 3' uçlarının birbirine ya da primer içindeki bir bölgeye tamamlayıcı olmamasıdır (35, 159).

3. Yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimleri

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orjinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak, dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için, kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yönü, 5' uçtan 3' uca doğrudur. Primerlerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmaları ile birlikte fosfodiester bağlarının katalizi sonucu yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır (159).

İlk olarak saflaştırılan ve bugün de en yaygın olarak kullanılmakta olan, *Thermus aquaticus* adlı, sıcak sularda yaşayan bir bakterinin DNA polimerazı, *Taq* DNA polimeraz olmuştur. *Taq* DNA polimerazın kullanılması ile her döngüden sonra tepkime karışımına yeniden polimeraz eklenmesine gerek kalmamaktadır. DNA *Taq* polimerazın, primerlerin özgül bölgelerine bağlanmasından sonra, 37 ° C gibi düşük bir sıcaklığa inilmediği için, istenmeyen yerlere bağlanması engellenir (54).

4. Sentezde kullanılacak olan deoksinükleozid trifosfatlar (dNTP)

Deoksiribonükleozid trifosfatlar, (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta, tek tek veya dördü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Normal koşullarda PCR, 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Optimal dNTP konsantrasyonu; MgCl₂ konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, çoğaltılmış ürünün boyuna ve PCR döngü sayısına bağlıdır (90, 159).

5. DNA polimerazın çalışması için gerekli tamponlar ve MgCl₂

PCR'da çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı, Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tampondur. MgCl₂'ün reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonu değişebilmekle birlikte, genellikle 0.5–5.0 mM'lık değerler arasında çalışılır. Mg⁺² iyonları, dNTP'ler ile çözülebilir kompleksler oluşturur, polimeraz aktivitesini stimüle eder ve çift iplikli DNA'nın Tm değerini (çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına neden olan sıcaklık) arttırır. Primer-kalıp etkileşimlerini de sağlamaları nedeniyle, MgCl₂'ün, PCR'ın spesifitesini ve ürün verimi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Genellikle, optimum MgCl₂ konsantrasyonu olarak 1.0–1.5 mM'lık değerler arasındadır. Düşük Mg⁺² konsantrasyonu da spesifik olmayan ürün birikimine neden olur (159).

1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) İşleyişi

PCR işlemi, termostabil DNA polimerazları ve farklı sıcaklık derecelerini, istenilen sürelerle göre otomatik olarak ayarlayabilen PCR aletleri yardımı ile gerçekleştirilir. Polimeraz zincir reaksiyonu, amaca göre değişebilen mikrotüplerde ve değişik sıcaklık derecelerinde oluşturulur. PCR döngüsünde yer alan ve hedef DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması (annealing) ve primerlerin uzaması (extension) aşamalarındaki işlemler kısaca şöyledir;

Hedef DNA'nın Denatürasyonu

Çift iplikli DNA'nın, bir kaç saniye 94–96 ° C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır. Bazı çalışmalarda, amplifikasyon siklusları başlamadan önce 3–5 dakikalık ön denatürasyon uygulanmasının, elde edilmesinde güçlük yaşanan kalıp DNA'lar için yararlı olduğu belirtilmiştir (54, 89) . PCR sırasında etkin denatürasyon sıcaklığının genellikle 92–95 ° C olduğu saptanmıştır.

Primerlerin bağlanması(Annealing)

Örnek, birkaç dakika 30–60 °C’de tutularak, primerlerin DNA’daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Bu işlem, hidrojen bağlarının yardımı ile olur. Bağlanma ısısı, DNA/DNA eşleşmesine olanak sağlayacak kadar yüksek olmalıdır. Primerlerden biri, kendine ait 5'- ucu ile hedef DNA ’lardan birinin 3'-ucu ile ve diğer primerler de, ikinci tek iplikçik DNA’nın antiparalel olan diğer ucunda bulunan 3'-ucuna bağlanarak, DNA polimerazın çalışma yönüne uygun bir şekilde (5' →3') bağlanırlar. Bu işlemlerin tamamlanması da yaklaşık yine 3-5 dakika kadar devam eder (159).

Uzama(Extension)

Bu bağlanma süresi bitince aletin ısısı hemen 70- 72°C’ye çıkararak, tüpler içinde bulunan ve ısıya dayanıklı olan Taq polimeraz enzimi, 5'→3' yönünde olmak üzere, ortamdaki nukleotidleri kullanarak primerlerin 3'-terminusuna nukleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir. Polimerizasyon reaksiyonunda, hedef DNA’nın tek iplikçik sekansları kalıp ödevi görür. Bu süre de yaklaşık 3–5 dakika sürmektedir (9).

Böylece, PCR’ in üç aşamadan oluşan ve yaklaşık olarak 10–15 dakika kadar devam eden birinci amplifikasyon aşaması, tekrar ısının 95°C’ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25–30 kez tekrarlanmasıyla tek bir hedef DNA segmenti 2n formülüne göre yaklaşık 33.6 milyon çoğaltılmış olur. Denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamalarının tekrarlayan döngüleri sonucunda, DNA sekansı üssel olarak artar ve yaklaşık 20 döngü sonrasında bir milyondan fazla ürün elde edilmiş olur. Her döngü sonrasında elde edilen ürün, bir sonraki döngüde kullanılacak primer için kalıp DNA’yı oluşturur (9, 41, 89).

7. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PCR) Oluşan Hatalar

PCR çok yaygın kullanılmasına karşın, reaksiyon sırasında oluşan bazı hatalar, negatif veya pozitif yanlış değerlendirmelere neden olabilmektedir. Bunların bir kısmının temiz çalışmaktan kaynaklandığı, diğer bir kısmının ise çalışanların bilgisi dışında oluştuğu bildirilmiştir. Buna karşın hataların neler olabileceğini bilen teknik ekip ile bu olumsuz durumlar en az düzeye indirilebilir (9).

Laboratuvarda kullanılan birçok bileşikler PCR'da amplifikasyonu önlemekte veya olumsuz yönde gelişmesine yol açmaktadır; Deterjanlar, şelasyon ajanları (EDTA), proteinazlar, kemoterapötik ajanlar, RNA ve EDTA düzeyinin yüksek olması, Heparin, Urasil, fenol kalıntılarının bulunması, PCR'nin duyarlılığını olumsuz etkileyen faktörlerin başında gelmektedir. Bunlar, reaksiyon sırasında DNA veya RNA ile bağlanabilir veya bazlar arasına girerek sonucu olumsuz yönde etkileyebilirler (9).

PCR'da en fazla görülen hataların başında non spesifik DNA'ların (oluşması istenmeyen) amplifiye olması ve bunun sonucu etkilemesidir. Böyle amplifiye olmuş moleküllerin laboratuvarlarda birikmesi, materyallere, pipetlere, solüsyonlara, kimyasallara, pipet uçlarına vs. bulaşması; yanlış sonuçların alınmasına neden olur. Kontaminasyon problemini minimal düzeye indirebilmek fiziksel, kimyasal ve enzimatik kontrollere ve özel önlemlere gereksinim vardır. Örneğin, reagentler tek sefer kullanılmalı, teknisyenler kontamine olmamış eldivenler takmalı, PCR ve diğer işlemler için (amplifikasyon, örneklerin hazırlanması, amplifiye ürünlerin saptanması, elektroforezis, vs.) ayrı ayrı odaların bulunması, odalar arası çeşitli materyallerin ve solüsyon nakillerinin çok sınırlandırılması veya hiç yapılmaması gibi önlemler, nonspesifik amplifikasyonları çok azaltır (9).

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) Sınırları

PCR çok gelişmiş bir teknik olmasına rağmen, bazı sınırları vardır. Hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgilerin önceden mevcut olması ve nispeten kısa bir ürün elde edilmesi, bunlardan bazılarıdır. PCR çalışması çok kontrollü ve dikkatli yapılmalıdır (89).

8. Amplifiye Edilmiş PCR Ürünlerinin Saptanması

Amplifiye edilen DNA'nın tesbitinde kullanılan yöntemler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

Jel Elektroforezi:

Çoğaltılan nükleik asitlerin gösterilmesinde kullanılan geleneksel yöntem agaoroz veya poliakrilamid jel elektroforezini takiben etidyum bromür ile boyanan jeldeki bantların gözlenmesidir. Etidyum bromür, elektroforezden sonra DNA profillerinin tanımlanmasını sağlar. Jel elektroforezi, araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, zahmetli, zaman alıcı ve duyarlılığı sınırlıdır. Bu nedenle, rutin tanı laboratuvarlarında, amplifikasyon sonuçlarının gözlenmesinde, işaretli probalar ile hibridizasyon yöntemi kullanılmaktadır (54).

Hibridizasyon Teknikleri:

Nükleik asit hibridizasyon (melezleme) yöntemleri; tek iplikli nükleik asit moleküllerinin tamamlayıcı dizilerinin, uygun koşullar altında kendiliğinden eşleşerek çift iplikli melez moleküller (hibritler) oluşturması özelliğine dayanır (159).

Laboratuvarda kullanılan en temel hibridizasyon tipleri; filtre hibridizasyonu, solüsyon hibridizasyonu ve *in situ* hibridizasyondur. Üçünde de bir nükleik asit fragmanı (prob), komplementer DNA dizisini belirlemek ve tesbit etmek için işaretlenir. Klasik işaretleme yöntemi, probun ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S ve ^3H gibi radyoaktif

izotoplardan biri ile işaretlenmesidir. Son yıllarda geliştirilmiş bir diğer hibridizasyon tekniği, dama tahtası olarak adlandırılan; "Checkboard hibridizasyon tekniği"dir. Bu yöntemin en büyük avantajı, tek ve sert bir membran kullanılarak, çok sayıda bakteri ve klinik örneğin, çok sayıda prob ile aynı anda hibridize edilmesidir. Maliyeti diğer tekniklere göre düşüktür (130).

Southern Blot Analizi:

Agaroz jel elektroforezinden sonra istenilen DNA parçası, nitroselüloz veya naylon membran gibi solid bir faza aktarılır. Radyoaktif olan veya olmayan belirleyicilerle işaretlenmiş proplar kullanılarak hibridizasyona tabi tutulur. Hibridizasyonun ardından, belirleyicinin özelliğine göre, radyoaktif, immünolojik, kimyasal ya da floresan yöntemlerle görünür hale getirilir (54, 159).

Klonlanan DNA'ların karakterizasyonunun yanı sıra bu teknik, bir genin içindeki ya da etrafındaki restriksiyon haritalarının ortaya çıkarılması, birçok DNA parçaları içerisinde ilgililenen geni taşıyan tek bir parçanın belirlenmesi ve ilgili genin farklı türlerdeki karşılığının bulunması gibi değişik amaçlar için kullanılır (89).

9. PCR'in Başlıca Kullanım Alanları

PCR'in bir çok kullanım alanı bulunmakta ve kontrollü çalışmalarda güvenilir, çabuk, spesifik ve sensitif olması nedeniyle de tercih edilmektedir.

Mikrobiyolojik çalışmalarda PCR:

Rutin klinik muayenelerde hastalık ajanlarının izolasyon ve identifikasyonları oldukça zaman almakta ve bazen de herhangi bir etken bulunamamaktadır. Serolojik incelemelerde, şüpheli veya negatif sonuçlar verdiği gibi yanlış olarak negatif ve pozitif reaksiyonlar da elde edilebilmektedir. Bunun gibi olgularda PCR büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Her ne kadar PCR direk teşhis yöntemi olmamakla beraber, amplifikasyondan sonra işaretli propların kullanılması veya

elektroforezden sonra oluşan kanıtların boyanarak (ethidium bromidle) görüntülenmesi, tanıyı kolay hale getirmektedir. PCR'ın başlıca kullanıldığı durumlar aşağıda belirtilmiştir.

- a) Kültürünün yapılması, izolasyonu ve identifikasyonu çok zor veya yapılamayan mikroorganizmaların teşhisinde,
- b) Toksin oluşturan ajanların, saptanması güç olan toksinlerin ortaya konulmasında,
- c) Antimikrobiale ilaçlara karşı dirençli olan bakterilerin belirlenmesinde,
- d) Mikroorganizmalar içinde alt tiplerin saptanmasında,
- e) Gıdalarda, sularda ve yiyeceklerde bulunan mikroorganizmaların tanısında,
- f) Diğer mikrobiyolojik araştırmalarda (moleküler immunoloji ve epidemiyoloji, parazitoloji, bakteriyoloji, viroloji vs.) (9).

Adli tıp:

DNA fingerprintleri cinayetlerin aydınlatılmasında büyük yararlar sağlamaktadır. Babalık tayini ve HLA (histokompatibilite antijenleri) testleri, PCR ile çok kolaylaşmış bulunmaktadır. Cinayet olgularında çok az bir kan, çok az saç veya sperm, test için yeterli olabilmektedir. Böyle olgularda PCR güvenilir ve çabuk sonuçlar vermektedir (9).

Genetik bozuklukların belirlenmesinde:

Canlılarda genetik karakter gösteren bozuklukların belirlenmesinde de aynı etkinlikte kullanılmaktadır (9).

10. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) Modifikasyonları

Konvansiyonel PCR yöntemlerine ilaveten değişik PCR teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar;

İnvers (tersine dönmüş) polimeraz zincir reaksiyonu

Asimetrik polimeraz zincir reaksiyonu

Homopolimerli polimeraz zincir reaksiyonu

İn situ polimeraz zincir reaksiyonu

Hot start polimeraz zincir reaksiyonu

Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

Nested polimeraz zincir reaksiyonu'dur (9).

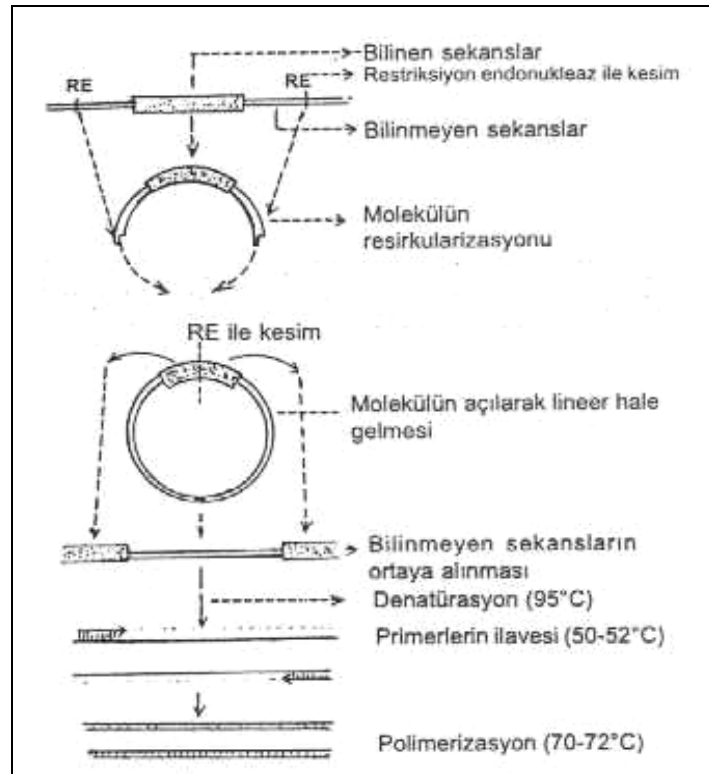
İnvers (tersine dönmüş) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (IPCR):

Bu teknik bilinen bir DNA dizisinden yararlanılarak bu DNA'nın her iki ucundaki bilinmeyen bölgelerin çoğaltılması için kullanılır. Bilinmeyen sekanslar tersine çevrilerek içe alındığı için bu adla tanımlanmaktadır. Bu PCR tekniği şu aşamalardan oluşmaktadır;

- a) Bilinen sekansın iki ucunda bulunan ve baz sıraları bilinmeyen segmentler belli bir uzaklıktan restriksiyon endonukleaz ile kesilir ve iki tarafta yapışkan uçlar meydana getirilir.
- b) Bu kesim sonucunda molekül lineer bir forma gelir.
- c) İki yapışkan uç birleştirilerek molekül sirküler şekle dönüştürülür.
- d) Ortada bulunan ve bilinen sekanslara sahip olan DNA segmenti, ortasından başka bir restriksiyon endonukleaz ile bölünerek molekül tekrar lineer bir forma getirilir. Bu molekülün iki ucunda bilinen sekanslar bulunmaktadır.
- e) Bu iki uçta bulunan bilinen sekanslara komplementer olan iki ayrı primer hazırlanarak reaksiyon ortamına katılır. Ayrıca, Taq polimeraz ve

polimerizasyon için gerekli olan 4 tür dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) de ilave edilir.

- f) Daha sonraki işlemler konvansiyonel PCR'daki prosedüre uygun olarak devam ettirilir (Şekil 1).



Şekil 1. Inverse PCR(IPCR)'nin çalışma prensibini gösteren şema (9).

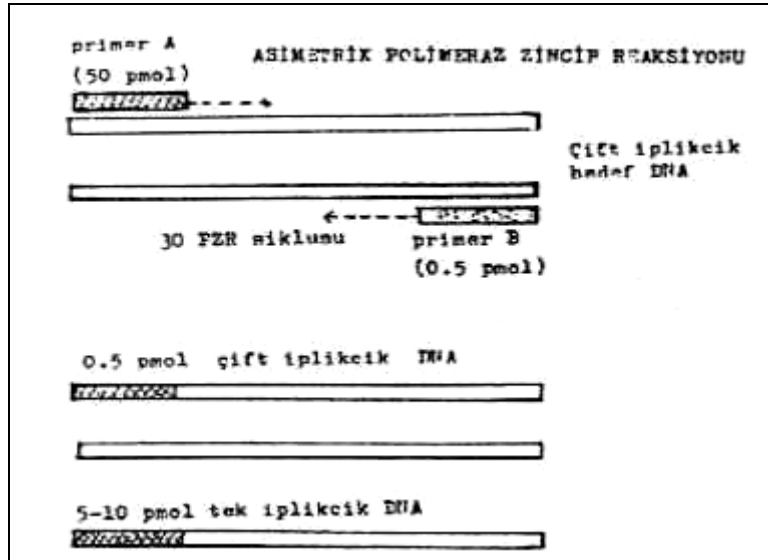
Böylece, bilinmeyen sekanslara uygun cDNA sentezlenmiş ve bunların baz sıraları da belirlenmiş olur (9).

Asimetrik polimeraz zincir reaksiyonu

Bu PCR çeşidinde, kullanılan iki çeşit primerden biri miktarca diğerinden çok daha fazla kullanılır. Bu nedenle asimetrik PCR sonucu ipliklerinden biri diğerinden

çok daha fazla miktarda çoğaltılır. Asimetrik PCR yöntemi fazla miktarda çoğaltılan tek iplikli ürünün dizilenmesi için kullanılır (159).

Asimetrik PCR herhangi bir kalıp ipliğe uygulanabilir, ancak tek iplikli ürünün fazla miktarda elde edilememesi gibi bir sorunla karşılaşmak da olasıdır. Bu nedenle çoğunlukla klasik PCR (simetrik PCR) ile önce çift iplikli hedef DNA çoğaltılır, ardından asimetrik PCR uygulamasıyla kalıp yeniden çoğaltılarak tek iplikli ürün yeterli miktarda üretilir (9, 159). Şekil 2 'de bu PCR yönteminin çalışma prensibi gösterilmektedir.



Şekil 2. Asimetrik PCR'in çalışma prensibi (9).

Homopolimerli polimeraz zincir reaksiyonu

Bu reaksiyon, primer bağlanma bölgesi olarak yalnız bir sekansın bilindiği durumlarda uygulanmaktadır. Bu bilinen bölgeye primerler bağlanırlar. Bu yöntemde, mRNA molekülü revers transkriptaz enzimi ile komplementer DNA (cDNA) haline dönüştürülür. Elde edilen tek iplik DNA molekülünün 3'-terminusuna poli G'ler bağlanır. Bu uçlara bağlanabilmesi için 5'-terminusunda poli C'ler bulunan

primerler hazırlanır ve reaksiyona iştirak ettirilerek tek iplikçik (cDNA'ya) ikinci bir DNA sentezlenir. Sonra bu iki DNA ayrılarak her birine spesifik primerler kullanılmak suretiyle amplifiye edilir (9).

In situ polimeraz zincir reaksiyonu

Bu tekniğin esasını, morfolojik olarak sağlam hücre ve dokuların DNA'sının amplifikasyonu oluşturur. Bu yöntem daha çok parafinlenmiş veya arşiv dokuları için geliştirilmiştir. Bir lâm üzerinde tespit edilmiş ve morfolojik olarak sağlam hücre veya doku örnekleri, hedef DNA (veya mRNA) kaynağı olarak kullanılır. Lâm üzerine, proteaz solüsyonu ilave edilerek dokulardaki proteinler giderilir ve %0,5 Nonidet P40'la da permeabilitesi artırılır. Sonra üzerine amplifikasyonda gerekli olan komponentler (primerler, 4 tür dNTP, MgCl ve diğer solüsyonlar) konur ve üzerine bir lâmel kapatıldıktan sonra kenarları yapışkan bir madde (veya tırnak cilası) ile sabitleştirilir. Bu aşamadan sonra, lâm alüminyum bir kaba konarak ısı döngü (Thermal cycle) cihazına yerleştirilir. Ortama 60°C'de Taq polimeraz ve mineral yağı ilave edilerek lâmel hemen kaldırılır. Sonraki işlemler konvansiyonel PCR da olduğu gibidir (9, 159).

Hot start polimeraz zincir reaksiyonu

Konvansiyonel PCR yöntemlerinde kullanılan komponentler (hedef DNA, primerler, Taq polimeraz, MgCl₂, dNTP, bufferler vs.) oda ısısında ve birlikte tüplere konarak aynı anda reaksiyona sokulurlar. Ancak, bu tarzdaki uygulamada primerler reaksiyon başlamadan önce oda sıcaklığında Taq polimerazın etkisi altında, hedef DNA dışındaki bazı nonspesifik sekansları da amplifiye etmekte ve böylece yanlış pozitif reaksiyonlara yol açmaktadır. Bazı durumlarda da primer oligomerizasyonu, primer kaybı, nonspesifik amplifikasyonlar vs. meydana gelebilmektedir. Bu olumsuz durumları engellemek için geliştirilen Hot Start PCR'da reaksiyona giren

maddelerin bir kısmı (primerler, dNTP, MgCl₂, buffer) oda sıcaklığında tüplere konulmakta, sonra bunların üzerine buharlaşma ile madde kaybını önlemek için mineral yağ (manuel sistemde) veya balmumu tableti (otomatik sistemde) eklenmektedir. Geri kalan komponentler (Taq polimeraz, hedef DNA, buffer) de optimal ısı olan 60–80°C arasında reaksiyon tüpüne katılırlar. Bundan sonraki aşamalar konvansiyonel PCR da olduğu gibidir (9).

Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu teknik, aynı amplifikasyon reaksiyonunda, farklı hedef DNA sekanslarına yönelik hazırlanan spesifik multiple primer çiftlerinin kullanılması ile gerçekleştirilir. Bu teknikle,

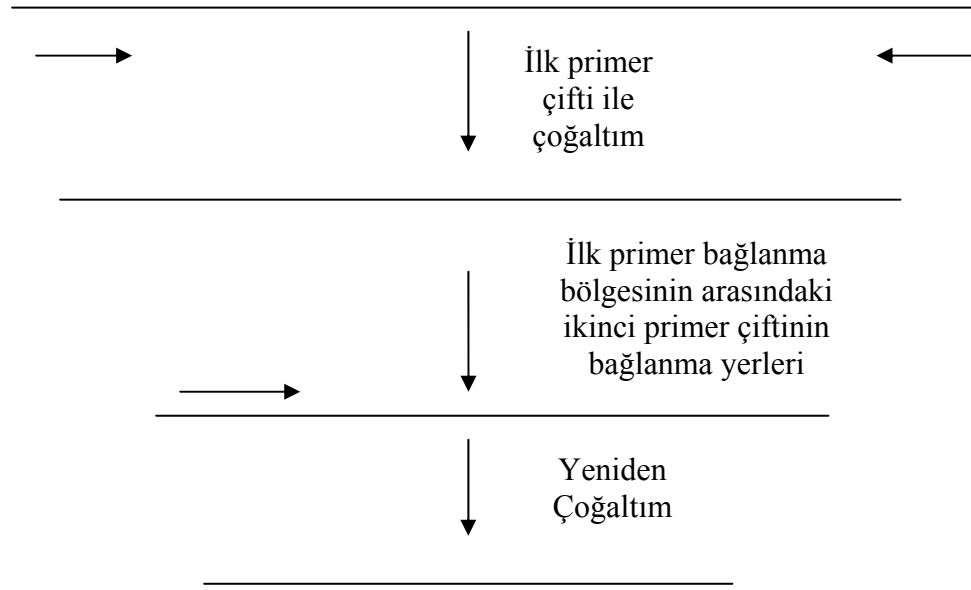
- a) DNA sekanslarının büyük bir bölümü, bunlarda bulunması muhtemel alterasyonlar yönünden incelenebilirler.
- b) Hedef DNA'nın farklı segmentleri araştırılabilir,
- c) Sekansların amplifiye olabilirliğinin internal kontrolleri yapılabilir
- d) Bir numunede bulunan değişik ajanlara ait DNA'lar aynı tüpte aynı anda amplifiye edilebilirler (9, 159).

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

Konvansiyonel PCR, genellikle kalitatif bir karakter taşır. Diğer bir deyiş ile amplifikasyon var veya yok sorusuna cevap verebilmektedir. Buna karşın son yıllarda geliştirilen yeni PCR teknikleri ile amplifiye olan hedef DNA'nın miktarı hakkında da bir bilgi verilebilecek düzeye ulaşılmıştır. Bu yöntem, reaksiyona başlangıçta konulan hedef DNA miktarı ile, PCR sonunda saptanan ürünün düzeyi arasındaki lineer korelasyonun bulunup bulunmadığını ortaya koymaktadır (9).

Nested PCR

Özgün olmayan ürünlerin oluşumunu engelleyen, yüksek spesifiteye sahip bir yöntemdir. İlk PCR ürünü, ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır ve istenilen hedef bölge çoğaltılarak özgün ürünler elde edilir (159). Şekil 3’de Nested PCR’in çalışma prensibi gösterilmiştir.



Şekil 3. Nested PCR’in çalışma prensibi (159).

İki aşamalı olan bu testte, ilk aşamada amplifikasyon, tek primer çifti ile 15-30 kez tekrarlanır. Oluşan ve sayısal olarak artan ürünler, yeni bir reaksiyon tüpüne transfer edilerek burada internal sekanslara spesifik olan sekonder primer çiftleri kullanılarak ikinci bir amplifikasyona tabi tutulur. Bu ikinci amplifikasyon da 15–30 kez tekrarlanır ve oluşan ürünler jel elektroforezle ortaya konulurlar (9).

Bu yöntemin avantajları yanı sıra dezavantajları da (özellikle transfer sırasında meydana gelen kontaminasyonlar vs.) bulunmaktadır. Bu nedenle iki tüp yerine, tek

tüp kullanmak suretiyle kontaminasyon riski minimal düzeye indirilmiştir. Bu tek tüp sisteminde iki tür reaksiyon ısısı kullanılmaktadır (düşük ve yüksek ısı) (9).

PCR yöntemiyle tükürük, dental plak, feçes gibi non-gastrik sıvı ve dokularda *Helicobacter pylori* DNA'sı saptanabilmektedir. Son yıllarda Moleküler Biyoloji Teknikleri ve PCR'daki gelişmeler nedeniyle *Helicobacter pylori*'nin gerek mide mukozasında gerekse dental plakta saptanmasıyla ilgili çalışmaların sayısı artmıştır. Fakat yapılan bu çalışmalarda PCR yöntemi uygulamalarındaki farklılıklar nedeniyle değişik sonuçlar elde edilmesine rağmen bakterinin dental plakta bulunduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada dental plağın *Helicobacter pylori*'nin patojenitesinde önemli bir rol oynadığı hipotezinden yola çıkarak gastrointestinal şikâyetlerle başvuran çocuk hastalarda bu bakterinin, hem dental plak hemde mide mukozasındaki varlığının ileri moleküler biyoloji tekniklerle araştırılması ve yapılan antibiyotik eradikasyonu sonrasında dental plakta *Helicobacter pylori*'nin varlığını sürdürüp sürdürmediğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Buna ek olarak *Helicobacter pylori* enfeksiyonu olan bireylerin tükürüklerinde *Streptococcus mutans* varlığının incelenmesiyle bu bireylerin çürük riski yönünden araştırılması hedeflenmiştir.

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Bilim Dalına mide yakınmaları nedeniyle başvuran yaşları 5–15 yaş arasında değişen, cinsiyet ayrımı yapılmayan 54 erkek, 51 kız toplam 105 çocuk ve genç erişkin çalışmaya dâhil edildi. Çalışmaya yakınmaları nedeniyle endoskopik değerlendirme yapılmasına karar verilmiş, son üç ay içinde antibiyotik ve klorheksidin preparatı kullanmamış olanlar katıldı. Hastaların aynı bilim dalında gerçekleştirilecek endoskopik girişimi öncesi dental anamnezleri ayrıntılı olarak alınarak, ağız muayeneleri gerçekleştirildi ve diş taramaları yapıldı. Hastaların ağız hijyen, beslenme alışkanlıkları ile ebeveynlerin ağız-diş sağlığı konusundaki bilgi, alışkanlık ve eğitim düzeylerini kapsayan, önceden hazırlanmış anket sorularından oluşan olgu rapor formları endoskopi işlemi öncesi kaydedildi (Ek I).

Intraoral muayenede çürük dişlerin tayini, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre yapıldı (165). Kalıcı dişler için DMFT ve DMFS, süt dişleri için de dft ve dfs indeksleri kullanıldı (Tablo 9.a ve 9.b).

D (Decay)	M (Missing)	F (Filling)	T (Tooth)	S (Surface)
Çürük	Kayıp , eksik	Dolgulu	Diş	Yüzey

Tablo 9.a. DMFT / DMFS indeksleri

d (decay)	f (filling)	t (tooth)	s (surface)
çürük	dolgulu	diş	yüzey

Tablo 9.b. dft / dfs indeksleri

Hastaların plak indeksi değerleri de Silness ve Løe (145) plak indeksine göre yapıldı (Tablo 10).

0	Plak yok
1	Dişeti kenarında, sond gezdirildiğinde tespit edilen ince bir plak varlığı.
2	Dişeti kenarında, interdental bölgeyi içine almayan orta dereceli plak varlığı.
3	Dişeti kenarında ve interdental bölgeyi de dolduran yoğun plak varlığı

Tablo 10. Silness ve Løe'nün plak indeksi değerleri (145).

Daha sonra hastaların molar dişlerinin bukkal, lingual, meziyal, distal olmak üzere dört ayrı bölgesinden steril periodontal küretlerle dental plak örnekleri alındı. Bu işlemi takiben hastalardan steril kaplara stimüle edilmemiş tükürük örnekleri toplandı. Çocuk gastroenteroloji uzmanlarınca yapılan endoskopik girişim esnasında midenin antral mukozasından doku örneği alınarak 1.5 ml. lik steril endorf tüplere kondu. Laboratuvar işlemleri yapılana kadar örnekler -20°C 'de saklandı. Hastaların aileleri çalışma öncesi bilgilendirildi, onayları alındı (Ek II).

Araştırma grubunu oluşturan bireylerin yaş ortalamasının 11.1 ± 3.5 , *Helicobacter pylori* varlığı saptanan bireylerden oluşan test grubunun yaş ortalamasının 10.8 ± 3.3 , kontrol grubunun yaş ortalamasının ise 10.4 ± 7.6

olduğu belirlendi. Çalışmaya katılan ve 105 hastadan oluşan **araştırma grubunun** endoskopi sonrası E.Ü. Tıp Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılan patolojik değerlendirmeleri (CLO testi) sonucu 31'inin *Helicobacter pylori* açısından pozitif olduğu belirlendi. Bu hastalardan iki tanesi kontrollere gelmedikleri için çalışmaya dâhil edilmedi. Patolojik açıdan *Helicobacter pylori* varlığı saptanmış 29 hasta **test grubunu** oluşturuldu. PCR sonuçlarına göre mide rneklelerinde *H. pylori* pozitif çıkan hastalar test grubuna dahil edilmemiştir. Günümüzde *H. pylori* tanısı için gold standart yöntemin mide rneklelerinin patolojik değerlendirmelerle CLO testi ve kültür ile değerlendirilmesi kabul edilmekte olduğu için test grubu patolojik değerlendirme sonuçları göz önüne alınarak oluşturulmuştur (3, 27, 92, 140).

Bu şekilde alışma;

1) Araştırma grubu (n:105)

2) Bu araştırma grubu içersinde yer alan patolojik değerlendirmeler sonucu *H. pylori* pozitif çıkan **Test grubu** (n:29) ve

3) Ayrıca yaşları 5-15 olan, 30 sağlıklı çocuktan oluşan **Kontrol grubu** zerinde gerçekleştirildi.

Gerek *Helicobacter pylori* saptanan (n=29) bireylerin gerekse mide yakınmaları bulunan *Helicobacter pylori* saptanmayan (n=75) dental plak rneklelerinin PCR ile incelenmeleri Ege Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı Araştırma laboratuvarında yapıldı. Ayrıca araştırma grubu ve kontrol grubunun olgu rapor formları doldurularak veriler değerlendirildi.

Çalışmanın ilk bölümünde yapılacak endoskopi öncesi; her iki gruptan (Hp +, Hp -) alınan dental plak rneklelerinde, *Helicobacter pylori*'nin Genomik DNA izolasyon kitleri ile DNA izolasyonu yapıldı. İki grubun (Hp+, Hp-)

tükürük örneklerinde ise Mitis Salivarius Bacitracin (MSB) besiyerinde *Mutans streptokok* kültür kolonizasyonları incelenerek sayıları cfu/ml olarak saptandı. Bireyler, tükürük *Streptococcus mutans* değerleri açısından üç gruba ayrıldı (Tablo 11).

YÜKSEK	$x > 10^6$
ORTA	$> 10^5 \ x < 10^6$
DÜŞÜK	$x < 10^5$

Tablo 11. Bireylerin *Streptococcus mutans* değerlerine göre gruplandırılması (5, 8, 146).

Daha sonra endoskopik girişimle alınan mide örneklerinde PCR ile yapılan inceleme ve patolojik değerlendirmeler sonucu *Helicobacter pylori* enfeksiyonu saptanan hastalara bakterinin mideden eradikasyonu amacıyla standart, kombine antibiyotik tedavi protokolü çocuk gastroenteroloji uzmanlarınca uygulandı. Bu tedavi protokolü üçlü ilaç tedavisinden (proton pompa inhibitörü ve ikili antibiyotik) oluştu. İkili antibiyotik kullanımında Metronidazol + Amoksisilin veya Amoksisilin + Klindamisin tercih edildi ve bireylerden bir ay boyunca düzenli olarak ilaçlarını kullanmalarını istendi.

Çalışmanın ikinci bölümünde; antibiyotik verilerek uygulanan eradikasyon tedavisinden altı ay sonra kontrol randevularına çağrılan hastalardan başlangıçta olduğu gibi molar dişlerin dört ayrı bölgesinden, steril periodontal küretlerle dental plak ve stimüle edilmemiş tükürük örnekleri alındı. Bu işlem öncesi hastaların onayları tekrar alındı. Ayrıca altı aylık kontrol randevularında hastalardan *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun

değerlendirilmesi için üre-nefes testi istendi. Sağlıklı 30 bireyden oluşan, gastrik yakınmaları olmayan kontrol grubunun ebeveynlerinden yazılı ve sözlü onayları alınarak dental plak ve tükürük örnekleri yukarıda belirtildiği şekilde alındı.

2.1. Dental Plak ve Mide Örneklerinde *Helicobacter Pylori*'nin İzolasyon ve İdentifikasyonu:

Dental Plak ve Mide Biyopsi Örneklerinden DNA İzolasyonu:

Tüm hastaların molar dişler bölgesinden steril periodontal küretlerle toplanan dental plak örnekleri içinde steril serum fizyolojik bulunan ependorff tüplerine aktarıldı. Bu örnekler çalışma zamanına dek -70 ° C'de saklandı. Dental plak ve mide örneklerinin, genomik DNA izolasyonu için, *Invisorb*® *Spin Tissue Mini Kit* (Invitex, Germany) kullanıldı (Resim 1 a, b).



(a)



(b)

Resim 1 a, b: Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan *Invisorb*® *Spin Tissue Mini Kit* (Invitex, Germany)

Kullanılan Genomik DNA İzolasyon Kit İçeriği;

Kit içeriği:

	<u>3 örnek için</u>
Lysis Buffer G	2 ml
Binding Buffer T	1 ml

Elution Buffer D	2 ml
Proteinaz K	1x250 µl
Wash Buffer	15 ml
2 ml. lik receiver tüpler	3
1,5 ml. lik receiver tüpler	3
Spin Filter	3

DNA ekstraksiyon işlem basamakları aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir;

1. Dental plak ve antral mukoza örnekleri 1.5 ml'lik steril ependorf tüplerine aktarıldı. 1.5 ml'lik ependorf tüplerde steril serum fizyolojik solüsyonu içerisindeki dental plak ve mide dokusu örnekleri 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek çökelmeleri sağlandı. Çöken plak ve doku örneği üzerinde kalan su (supernatant), steril pipet ucu ile uzaklaştırıldı (Resim 2a). Pellet Pestle Motor (Kontest) ile çökelen örnekler küçük parçalara ayrılarak homojenize edildi (Resim 2b).



(a)



(b)

Resim 2 a) Supernatant'ın uzaklaştırılması ve **b)** Pellet Pestle motorla örneklerin homojenize edilmesi.

2. 1.5 ml'lik steril ependorf tüpler içersindeki homojenize mide dokusu ve plak örnekleri üzerine, 400 µl lizis buffer (Resim 3a) ve 40 µl proteinaz K (Resim 3b) eklenerek vortekslendi (Resim 3c ve 3d). Örnekler, lizis işleminin tamamlanması için inkübatöre yerleştirildi (Resim 4a) ve 52 ° C'de 15–20 dakika inkübasyona tabi tutuldu (Resim 4b).



(a)



(b)



(c)



(d)

Resim 3: a) Lysis buffer, b) proteinaz K, c) proteinaz K'nın ependorf tüplerindeki örneklere ilave edilmesi ve d) vortekslenmesi.



(a)



(b)

Resim 4: a) Örneklerin inkübatöre yerleştirilmesi ve b) inkübasyon için 52° C’de 15 – 20 dakika beklenmesi.

3. Inkübasyon sonrası, örnekler maksimum hızda santrifüj edildi (Resim 5a). Üstte kalan supernatant yeni 1.5 ml’lik tüplere aktarıldı (Resim 5b). 200 µl binding buffer T (Resim 6a) ilave edilerek 10 saniye süresince vortekslendi (Resim 6b).



(a)



(b)

Resim 5: a) Örneklerin maksimum hızda santrifüj edilmesi ve b) supernatantın yeni tüplere aktarılması.



(a)



(b)

Resim 6: a) Örneklere binding buffer T ilave edilmesi ve **b)** vortekslenmesi .

4. Süspansiyon, 2 ml'lik tüplerin içersine yerleştirilen filtrelü tüplere aktarıldı ve 1 dakika inkübe edildi (Resim 7a). Örnekler 2 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtreler tekrar 2 ml'lik tüpler içersine yerleştirildi (Resim 7b) .



(a)



(b)

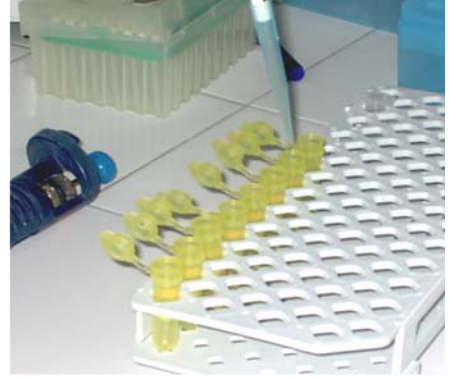
Resim 7: a) Örneklerin filtrelü tüplere aktarılması ve **b)** santrifüj sonrası yeni filtrelü tüplere örneklerin taşınması.

5. Örnekler, %100 ethanol ilave edilmiş 550 µl Wash Buffer eklenerek 12.000 rpm'de 1 dakika süresince santrifüj edildi (Resim 8a) . Santrifüj sonrası Wash Buffer

ile yıkama işlemi tekrar edildi (Resim 8b). Ethanolun uzaklaştırılması için 12.000 rpm’de 2 dakika süresince tekrar santrifüj işlemi yapıldı.



(a)



(b)

Resim 8 a, b: Wash buffer’ın örneklere uygulanması.

6. 1.5 ml’lik receiver tüplerin içerisine, filtreler yerleştirildi ve önceden ısıtılmış 200 µl Elution buffer D ilave edilerek 3 dakika süresince inkübe edildi (Resim 9 a, b). 10.000 rpm’de 2 dakika süreyle santrifüj yapıldıktan sonra DNA elde edildi.



(a)



(b)

Resim 9 a,b: Elution buffer D’nin örneklere uygulanması.

2.2.1. Dental Plak ve Mide Örneklerinde *Helicobacter Pylori*'nin Nested PCR İle Saptanması

Helicobacter Pylori'nin Nested PCR ile tespitinde aşağıda belirtilen alet ve kimyasallar kullanıldı:

PCR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas)

MgCl₂ (2 mM, 1.0 ml) (Fermentas)

dNTP 20mM dATP, 20 mM dGTP, 20 mM dTTP (Sigma)

Tag Polimeraz- Thermus Aquaticus (Fermentas)

Deiyonize su

Buz kalıp

0.2 ve 0.5 lik ependorflar tüpler

Vortex (Heidolph Reaxtop)

Otomatik pipetler (1–10 µl, 10–100 µl,RAININ)

Thermal Cycler (Gene Amp PCR System 9700)

Derin Dondurucu (BEKO)

Mikrodalga fırın (VESTEL)

Su ısıtıcısı (Nüve BM 302)

Primerler

Çalışmamızda, primer seti olarak ürün büyüklüğü yaklaşık 417 baz çifti uzunluğunda olan *Helicobacter pylori* genomik DNA'sının 860 baz çifti uzunluğundaki bölgesine homolog EHC-U ve EHC-L primerleri kullanıldı. *Helicobacter pylori* genomik DNA'sının fragman sekansına dayanılarak EHC-U ve EHC-L'nin internal fragmanlarına denk gelen, ürün büyüklüğü yaklaşık 230 baz çifti olan ek bir çift primer; ET-5U ve ET-5L kullanıldı (26).

Primer dizileri:

EHC-U: 5'- CCCTCACGCCATCAGTCCCAAA-3'

EHC-L: 5'- AAGAAGTCAAAAAACGCCCAAAAC- 3'

Nested-PCR için:

ET-5U: 5'- GCCAAATCATAAGTCCGCAGAA- 3'(26)

ET-5L: 5'- TGAGACTTTCCTAGAAGCGGTGT- 3 (26)

Çalışmamızda kullanılan primerlerin sentezi MWG-Biotech (Almanya) da önceden gerçekleştirilerek hazırlanmıştı.

Bu primerler 5 ng/μl olacak şekilde sulandırılarak ve PCR çalışması için 25 μl'lik amplifikasyonda 2 μl'ye tamamlanarak hazırlandı. DNA ekstraksiyonu tamamlandıktan sonra aşağıda belirtilen ilk amplifikasyon karışımı hazırlandı.

İlk Amplifikasyon karışımının hazırlanması (1 örnek için):

Buffer: 2.5 μl

dNTP: 2.5 μl

MgCl₂: 0.75 μl

Primer 1(EHC-U): 0.5 μl

Primer 2(EHC-L): 0.5 μl

Tag: 0.25 μl

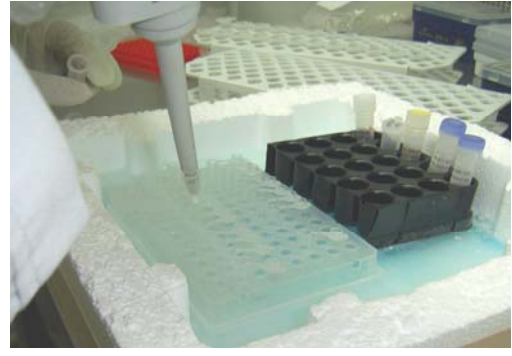
H₂O: 8 μl

DNA: 5 μl

Amplifikasyon karışımı, her bir örnek için toplam 25 μl olacak şekilde gerçekleştirildi (Resim 10a, b).



(a)



(b)

Resim 10 a, b: Amplifikasyon karışımının hazırlanması.

PCR işlemi öncesinde PCR cihazına yüklenen program aşağıda belirtilen basamakları içerecek şekilde hazırlandı:

Kullanılan Nested PCR Koşulları:

Denatürasyon	95 ° C	5 dakika	(Taq ilavesiz)
Denatürasyon	94 ° C	45 dakika	
Bağlanma	59 ° C	45 dakika	(Taq ilaveli) 40 döngü
Uzama	72 ° C	30 dakika	
Uzama	72 ° C	10 dakika	1 döngü

Tüpler PCR aletine yerleştirilerek program başlatıldı (Resim 11a, b). PCR'ın ilk aşamasında örnekler 95 ° C'de 5 dakika Taq ilave edilmeden program başlatıldı. Bu sürenin sonunda örnek başına 2.5 µl Taq ilavesi yapılarak PCR işleminin ilk basamağına devam edildi.



(a)



(b)

Resim 11 a, b: Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleştirildiği thermal cyclers.

PCR döngüsü tamamlandıktan sonra işlemin ikinci kısmına geçildi ve ikinci amplifikasyon karışımı hazırlandı.

İkinci Amplifikasyon karışımının hazırlanması (1 örnek için):

Buffer: 2.5 µl

dNTP: 2.5 µl

MgCl₂: 0.75 µl

Primer 1(ET-5U): 0.5 µl

Primer 2 (ET-5L): 0.5 µl

Taq: 0.25 µl

H₂O: 17.5 µl

İlk PCR ürünü: 0.5 µl

Amplifikasyon karışımı toplam 25 µl olacak şekilde hazırlandıktan sonra kontaminasyon olup olmadığını belirlemek üzere DNA eklenmemiş, aynı karışımı içeren bir tüp negatif kontrol olarak kullanıldı. Hazırlanan tüpler tekrar PCR cihazına alınarak döngü sayıları ve süreleri önceden kayıtlanmış program başlatıldı. PCR işlemi sonrası tüpler agaroz jel hazırlanıncaya kadar +4 ° C de saklandı.

Örneklere DNA bantlarının izlenmesi için agaroz jel hazırlanarak elektroforez basamakları sırasıyla uygulanmıştır:

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz Jel Elektroforezi için kullanılan alet ve kimyasallar aşağıda belirtilmiştir:

1. *Tris Baz Tamponu (TBE):*

Tris Baz (Sigma) 108 g (0.89 M)

Borik asit reagent (Carlo Erba) 55 g (0.88 M)

EDTA (Sigma) 8.3 (0.02 M)

Tris baz, borik asit ve EDTA karıştırılıp ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve karışımın pH'ı 8.3'e ayarlandı. Bu şekilde 10X – TBE (Tris baz-Borik asit-EDTA) solüsyonu elde edildi. Elektroforez ve agaroz jel hazırlama işlemleri için bu solüsyon dilüe edilerek 1X-TBE solüsyonu elde edildi.

2. *Etidyum Bromür:* 1 gram etidyum bromür 100 ml deiyonize su içinde çözdürülerek hazırlandı.

3. *Yükleme tamponu:* 45 ml 1XTBE, 55 ml gliserol, 0.1 g Orange G karıştırılarak hazırlandı.

4. *DNA Marker: Sigma, 1000bp DNA Ladder*

5. *Tartım aleti (Scaltex, max. 3200 g d:0.01 g)*

6. *Agaroz (Sigma)*

7. *pH metre (Jenway)*

8. *Yatay elektroforez (Bio-rad Sub-cell GT)*

9. *Güç kaynağı (0–250 volt Biorad Power Pac 300)*

10. *Görüntüleyici (Visible & Ultraviolet Transilluminator)*

11. *Bilgisayar (HP 7500)*

PCR işlemi sonrası, amplifiye olmuş DNA'lar % 2.5' luk agaroz jelde görüntülendi. Yatay elektroforez tabağının etrafı plastik bloklarla kapatılarak, tabağa uygun tarak yerleştirildi. 100 ml'lik erlen içerisinde, 100 ml 1XTBE ve 2.5 g agaroz konuldu. Erlenin ağzı aliminyum folyo ile kapatıldı. Folyo üzerinde bir kaç delik açıldıktan sonra, karışım berraklaşınca kadar mikrodalga fırın içerisinde eritildi. Berraklaştıktan sonra, el ile dokunulacak ısıya geldiğinde 15 µl etidyum bromür eklendi ve homojen şekilde karıştırılarak tabağa döküldü (Resim 12 a, b).



(a)



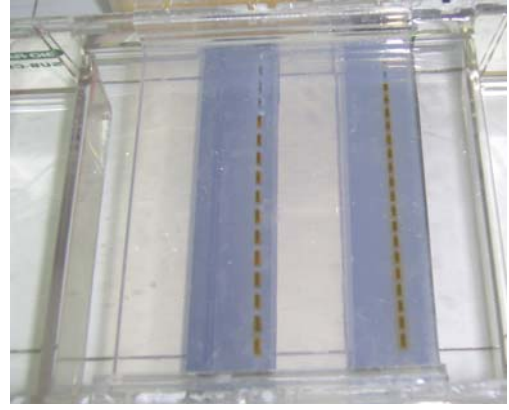
(b)

Resim 12 a,b: Agaroz jelin hazırlanması ve tarağa dökülmesi.

Agaroz jel donduktan sonra tarak çıkarıldı ve içerisinde, 1X-TBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Parafilm üzerinde, 2 µl yükleme tamponu ve 8 µl amplifikasyon ürünü karıştırılarak, jeldeki boşluklara yüklendi. PCR ürünleri, 110 voltta 6 cm yürütüldü (Resim13 a, b).



(a)



(b)

Resim 13 a, b: Agaroz jelin elektroforez cihazına yerleştirilmesi ve örneklerin kuyucuklara yerleştirilmesi

Jelde PCR ürünleri yürütüldükten sonra jel görüntüleyiciye konuldu. Görüntü bilgisayar ortamına aktarıldı (Resim 14 a, b). Bilgisayar ekranında örneklere ait DNA bantları gözlenerek yorumlandı.



Resim 14 a, b: Amplifiye olan DNA'ların agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra görüntülerinin bilgisayar ortamına aktarılması.

Çalışmamızda *Helicobacter pylori* (+) ve (-) bulunan 105 hastadan alınan dental plak ve mide örnekleri, 30 sağlıklı bireyin dental plak örnekleri ve PCR-patoloji sonuçlarına göre *Helicobacter pylori* pozitif bulunan 30 hastanın altı aylık

kontrol periyodu sonunda alınan dental plak örnekleri olmak üzere toplam 270 adet DNA analiz edildi.

2.3. Tükürükte Mutans Streptokokların Kültür Yöntemiyle Kantitatif Saptanması

Araştırma grubumuzu oluşturan 105 birey ve 30 kişiden oluşan kontrol grubuna ait bireylerin tükürük örnekleri stimüle edilmeden alındı. Steril plastik idrar kaplarında 2 ml olacak şekilde toplandı. Bir buz çantası eşliğinde Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'na taşındı ve çalışılincaya kadar -70 ° C'de saklandı. Tükürükte mutans streptokokların tespit edilmesi için *Mitis Saccorase Bacitracin Agar* besiyeri kullanıldı. Bu besiyerinin hazırlanması ve uygulanması için aşağıdaki alet ve kimyasallar kullanıldı:

Bacitracin (*Sigma*): 200 U/l

Sakkaroz (*PRS Panreac Saccharose*): 90 gr/l

Mitis Salivarius Agar (*Difco TM*): 150 gr/l

Tartım aleti (*Precisa*)

Otomatik BesiYeri Dökme Makinası

Distile su

10 µl standart öze

Beg

Sulandırma için steril plastik tüpler

Steril 1 cc'lik pipetler

CO₂ enkübatörü (*Sanyo*)

Mutans streptokoklar için besiyerlerinin oluşturulması ve ekim işlemlerine ait basamaklar belirtilmiştir;

1. Besiyelerini oluşturan kimyasallar hassas terazi ile tartularak uygun karışım elde edildikten sonra otomatik besiyeri dökme makinasına yerleştirildi (Resim15a) ve 90 mm çaplı petri kutuları içinde Mitis Saccorase Bacitracin Agar besiyeri hazırlandı (Resim 15b).



(a)



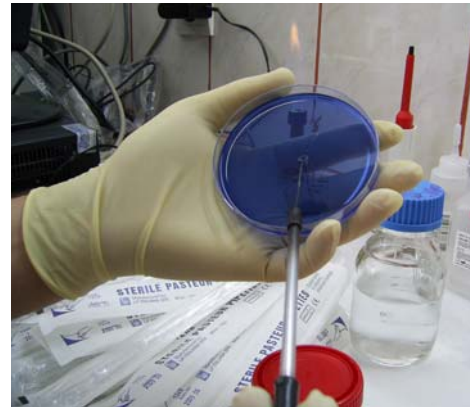
(b)

Resim 15: a) Otomatik besiyeri dökme makinasına kimyasalların konması ve b) besiyerlerinin dökülmesi.

2. 1 ml. tükürük örneğinden 10 μ l'lik standart özeyle besiyerlerine direkt ekim yapıldı (Resim 16 a, b).



(a)



(b)

Resim 16 a,b: Tükürük örneğinden direk ekim yapılması.

3. İlk besiyeri ekimi yapıldıktan sonra ilk sulandırma için 1cc. tükürük örneğine 9 cc. distile su ilave edildi. Standart öze bek ateşinde yakılarak bu karışımdan 10 μ l hacimde yeni bir besiyerine ekim yapıldı (1/10'luk sulandırım) (Resim 17 a, b).



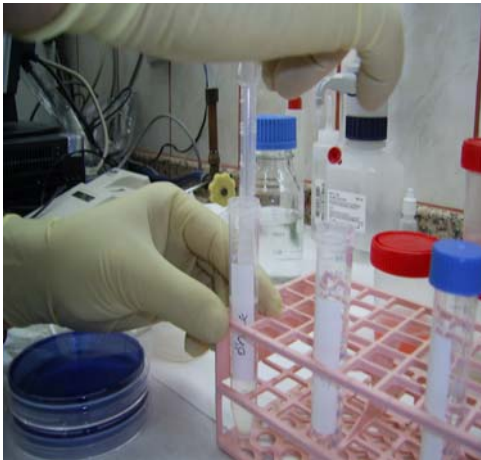
(a)



(b)

Resim 17 a, b: 1/10' luk sulandırmada besiyerinin hazırlanması.

4. 1/10 oranında sulandırılmış örnekten 1 cc. alınarak 9 cc. distile su ilave edildi. Bu karışımdan standart öze ile ekim yapıldı (1/100'lük sulandırım) (Resim 18 a, b).



(a)



(b)

Resim 18 a,b: 1/100'lük sulandırmada besiyerinin hazırlanması.

5. 1/100 oranında dilüye edilmiş 1 cc. örnek alındı ve 9 cc. distile su ilave edilerek üçüncü sulandırım hazırlandı. Bu karışımdan standart özeyele besiyerine ekim yapıldı (1/1000'lik sulandırım).

6. Ekim yapılan besiyerleri 37 ° C'de , % 5' lik CO₂ içeren enkübatöre yerleştirildi. Besiyerleri 24 saat sonunda kontrol edilerek, koloni formlarının oluşma özelliğine bağlı olarak enkübatörden çıkartılıp çıkartılmayacağına karar verildi. Ekim yapılan plaklarda yeterli koloni formu oluşmadıysa 12 saat daha enkübatörde bırakıldı (Resim 19 a, b).



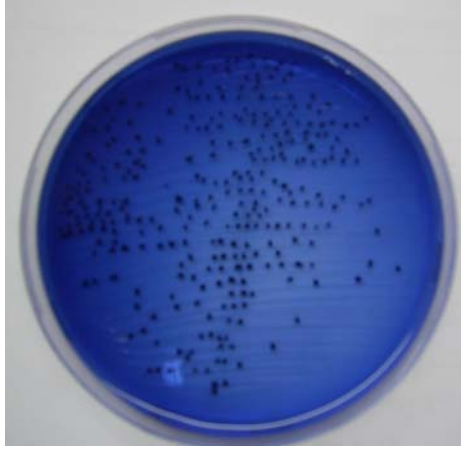
(a)



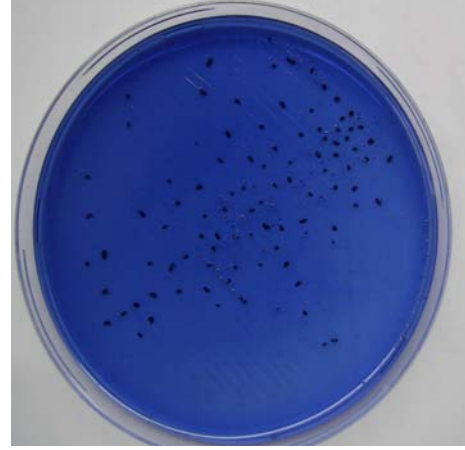
(b)

Resim 19 a,b: Besiyerlerinin enkübatöre yerleştirilmesi.

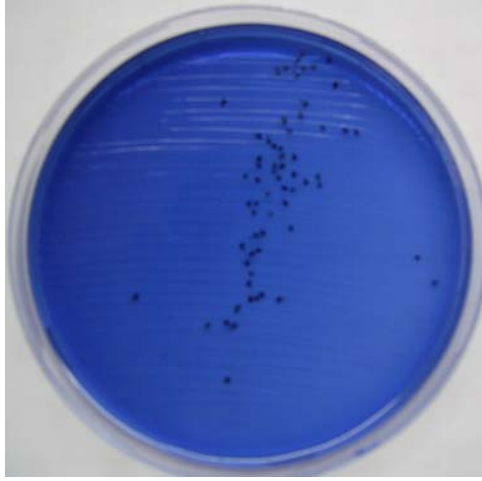
7. Besiyerlerindeki 1–2 mm. çaplı siyah pigmentasyonlu S tipi koloniler saptandı. Direkt ve sulandırılmış ekim yapılan plaklarda mutans streptoko kolonileri sayıldı. Ekim sırasındaki sulandırmalara uygun hesaplamalar yapılarak tükürük örneğinin mililitresindeki canlı bakteri sayıları cfu/ml (colony forming unit) olarak saptandı. (Resim 20 a, b, c, d) .



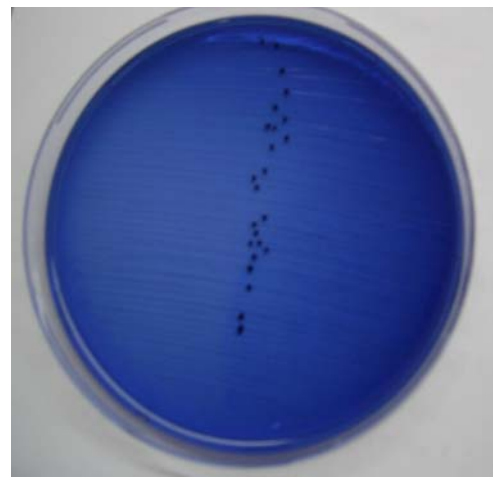
(a)



(b)



(c)



(d)

Resim 20. Dilüe edilmiş besiyerleri ve mutans kolonileri

- a) 1cc. tükürükten direkt ekim, b) İlk sulandırım, c) İkinci sulandırım,
d) Üçüncü sulandırım.

2.4. *Helicobacter pylori*'li Hastaların Altı Aylık Takip Periyodunda Değerlendirilmesi

Eradikasyon tedavi uygulamasından altı ay sonra hastaların *Helicobacter pylori* enfeksiyonları değerlendirme için kontrol randevularına çağrıldılar. Bu amaçla yapılan Üre nefes testi ile değerlendirme öncesinde hastaların molar dişler

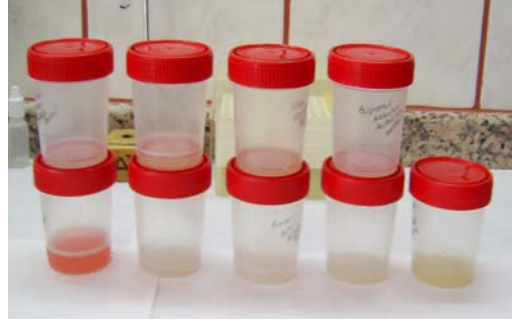
bölgesinden dental plak örnekleri alındı (Resim 21 a, b). Bu işlemi takiben tükürük örnekleri steril idrar kaplarında toplandı (Resim 21c).



(a)



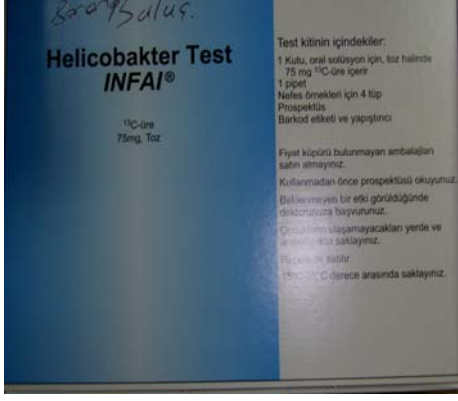
(b)



(c)

Resim 21 a,b,c: Dental plak ve tükürük örneklerinin toplanması.

Helicobacter pylori (+) saptanmış ve antibiyotik terapisi uygulanan hastalara enfeksiyon kontrolü için üre nefes testi uygulandı. Bu amaçla Helicobacter Test Teşhis Kiti (*Infai*®) kullanıldı (Resim 22 a, b).



(a)



(b)

Resim 22 a,b: Helicobacter Test Teşhis Kiti.

Bu test kullanılarak yapılan üre nefes testi basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

1. Hastalardan aç gelmeleri istenerek pipet yardımıyla ilk test tüplerine üflemleri istendi (Resim 23 a, b).



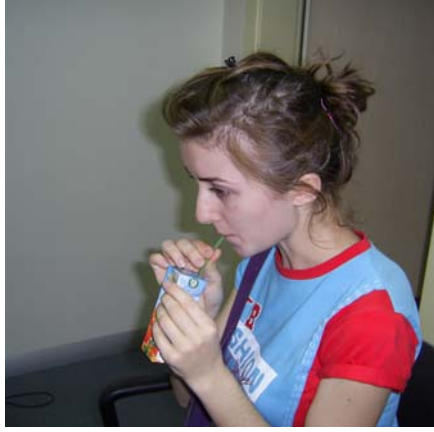
(a)



(b)

Resim 23 a,b: Üre nefes testinin ilk basamağı.

2. Hastalara portakal suyu içirilerek 30 dakika beklemeleri istendi (Resim 24 a). Daha sonra kitin içerisinde bulunan üre sulandırılarak içirildi ve hastaların ikinci test tüplerine üflemleri sağlandı (Resim 24 b).



(a)



(b)

Resim 24 a,b: Üre nefes testinin ikinci basamağı.

3. Üre nefes testi kiti değerlendirilmeleri İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı Üre Nefes Testi laboratuvarında yapıldı. Laboratuvar analizlerinde test tüplerindeki örnekler işaretli karbon moleküllerine göre *H. Pylori* (+) ve *H. pylori* (-) olarak değerlendirildi.

Eradikasyon tedavisinden altı ay sonra kontrollere gelen *Helicobacter pylori* (+) olan hastaların yapılan üre nefes testi yanında dental plak örnekleri alınarak örnekler *Helicobacter pylori* varlığının kontrolü için bölüm 2.1 ve 2.2 de belirtildiği gibi PCR analiziyle değerlendirildi.

2.5. Kontrol Grubu Bireylerinin Dental Plak ve Tükürük Örneklerinin PCR ve Mikrobiyolojik İncelenmesi:

Çalışmamızda ayrıca Ege Üniversitesi Sağlıklı Çocuk Polikliniğine başvuran herhangi bir sistemik rahatsızlığı olmayan, son altı ay içerisinde antibiyotik veya klorheksidin preparatı kullanmamış rastgele seçilen 5-15 yaş arası 30 çocuğun dental plak örnekleri PCR da değerlendirildi. Bu amaçla Bölüm II. de anlatıldığı gibi steril

periodontal küretlerle molar dişler bölgesinden dental plak örnekleri alındı. Kontrol grubunu oluşturan bu bireylerden ayrıca araştırma ve test grubumuzda olduğu gibi, aç karnına ve sitümüle edilmeden tükürük örnekleri toplandı. Soğutma sağlayan bir taşıyıcı ile dental plak örnekleri ise PCR laboratuvarına, tükürük örnekleri ise incelenmek üzere Mikrobiyoloji laboratuvarına taşındı. PCR ve mikrobiyolojik inceleme amacıyla uygulanan işlem basamakları Bölüm 2.1, 2.2 ve 2.3'de belirtilmiştir.

2.6. İstatistik Değerlendirme:

Çalışmamızda *Helicobacter pylori* enfeksiyonuna sahip bireylerin tedavi öncesi ve sonrası dental plak ve mide örneklerindeki bakteri varlığının karşılaştırılması sonuçları McNemar Testi ile mutans sayıları ise Wilcoxon Signed Ranks testi ile değerlendirildi.

Hasta grubu ile kontrol grubunun DMFT, DMFS, dft ve dfs, *Streptococcus mutans* sayılarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi ile, ağız hijyen, beslenme alışkanlıkları, ebeveynlerin ağız-diş sağlığı konusundaki bilgi, alışkanlık ve eğitim düzeylerini kapsayan veriler Chi-Square Testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

BÖLÜM III

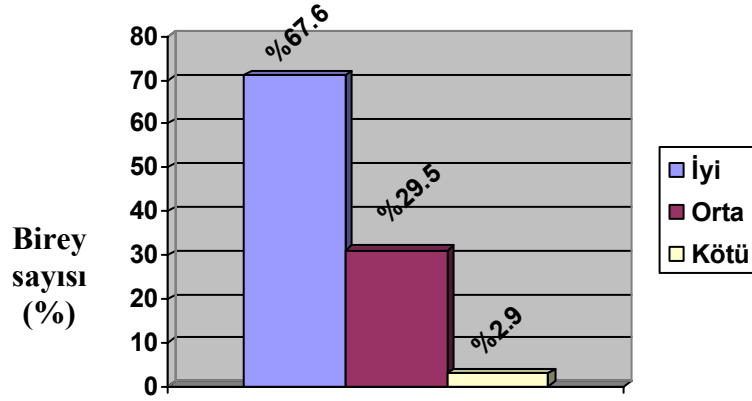
BULGULAR

Çalışmamızda mide yakınmaları ile E. Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Gastroenteroloji Kliniğine başvuran (n=105), 5-15 yaş çocukların mide ve dental plak örneklerinde *Helicobacter pylori*, tükürükte *mutans streptokok* incelemeleri ile bu bireylere ait dental bulguları, ağız hijyen durumları, beslenme alışkanlıkları ile ailelerinin sosyodemografik bulguları, fırçalama ve beslenme alışkanlıklarına ait veriler değerlendirildi. Araştırma grubunu oluşturan 105 bireyden *H. pylori* (+) bulunan bireylerin oluşturduğu test grubuna (n=29) eradikasyon tedavisi uygulandı. Bu tedaviden altı ay sonra dental plak örnekleri PCR, tükürük örnekleri ise mikrobiyolojik olarak tekrar incelendi ve bireylere üre nefes testi uygulandı.

Ortalama yaşları 11.1 ± 3.5 ve % 51.4 ü erkek (54), % 48.6 sı (51) kız olan araştırma grubundaki 105 bireyin ortalama DMFT, DMFS, dft ve dfs skorları sırasıyla 2 ± 1.6 , 2.3 ± 1.8 , 1.3 ± 2.2 , 2.6 ± 6.6 olarak saptandı. İncelenen bu hasta grubunun tükürük örneklerinde *streptococcus mutans* en düşük 1.1×10^5 , en yüksek 3.4×10^6 olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre hastaların aktif çürüklü olmamalarına karşın orta ve yüksek çürük risk grubunda oldukları gözlemlendi.

Endoskopi girişimi yapılan araştırma grubundaki bireylerinin ağız hijyenleri değerlendirildiğinde, %67. 6 sının (71) iyi , % 29.5 inin (31) orta, % 2, 9 unun (3) kötü ağız hijyenine sahip oldukları saptandı (Grafik 1).

Araştırma grubunu oluşturan hastalardan (n:105) alınan dental plak örneklerinde, EHC-U/ EHC-L kitleri ile *Helicobacter pylori* DNA'sı saptanan hastaların oranı %21 (22) olarak belirlendi.



Grafik 1. Araştırmaya katılan bireylerin (n=105) ağız hijyenlerine göre dağılımları

PCR ile ve aynı kitler kullanılarak mide antral mukozalarında *Helicobacter pylori* saptanan hastaların oranı ise %33.3 (35) olarak gözlemlendi. Endoskopi sırasında alınan biyopsi materyallerinin patolojik değerlendirmelerinde mide mukozasında *Helicobacter pylori* saptanan hastaların oranı %29.5 (31) iken, saptanmayan hastaların oranı %70.5 (74) olarak saptandı (Tablo 12).

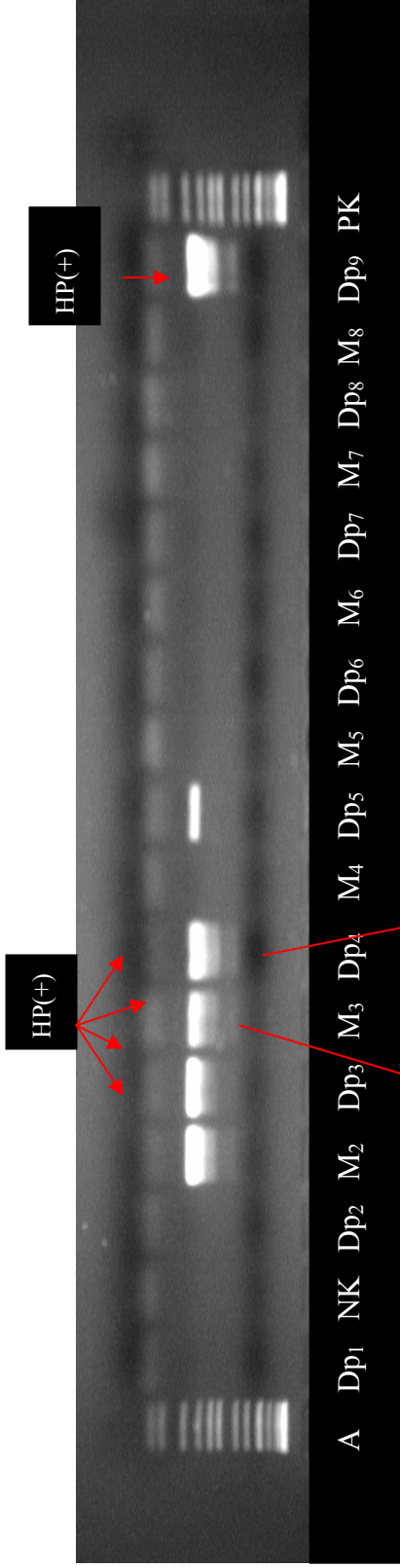
	Hp (+) (%)	Hp(-) (%)	n (%)
Dental Plak (PCR)	22 (%21)	83 (%79)	105
Antral mide mukozası (PCR)	35 (%33.5)	70 (%66.5)	105
Mide biyopsi örnekleri (Patolojik inceleme)	31 (%29.5)	74 (%70.5)	105

Tablo 12: Araştırma grubunun dental plak ve mide örneklerinde PCR ve patolojik değerlendirme sonucunda Hp (+) ve Hp (-) gözlenen bireylerin sayısı.

Patolojik değerlendirmeler sonucunda mide örneklerinde *Helicobacter pylori* enfeksiyonu saptanan (HP+) hastaların % 44.8 sinde (13/29); enfeksiyon gözlenmeyen bireylerin (HP-) ise % 12.8 inde (9/74) dental plakta *Helicobacter pylori* (+) saptandı (Tablo 13). *Helicobacter pylori* enfeksiyonu saptanan bireylerin 13 tanesinde Nested PCR metoduyla dental plak ve mide mukozası örneklerinde DNA bantları gözlendi, fakat suşların aynılığını ispatlamak için daha ileri moleküler biyolojik tekniklere (sekans analizi, southern hybridizasyon v.b) ihtiyaç vardır. (Resim 25, 26).

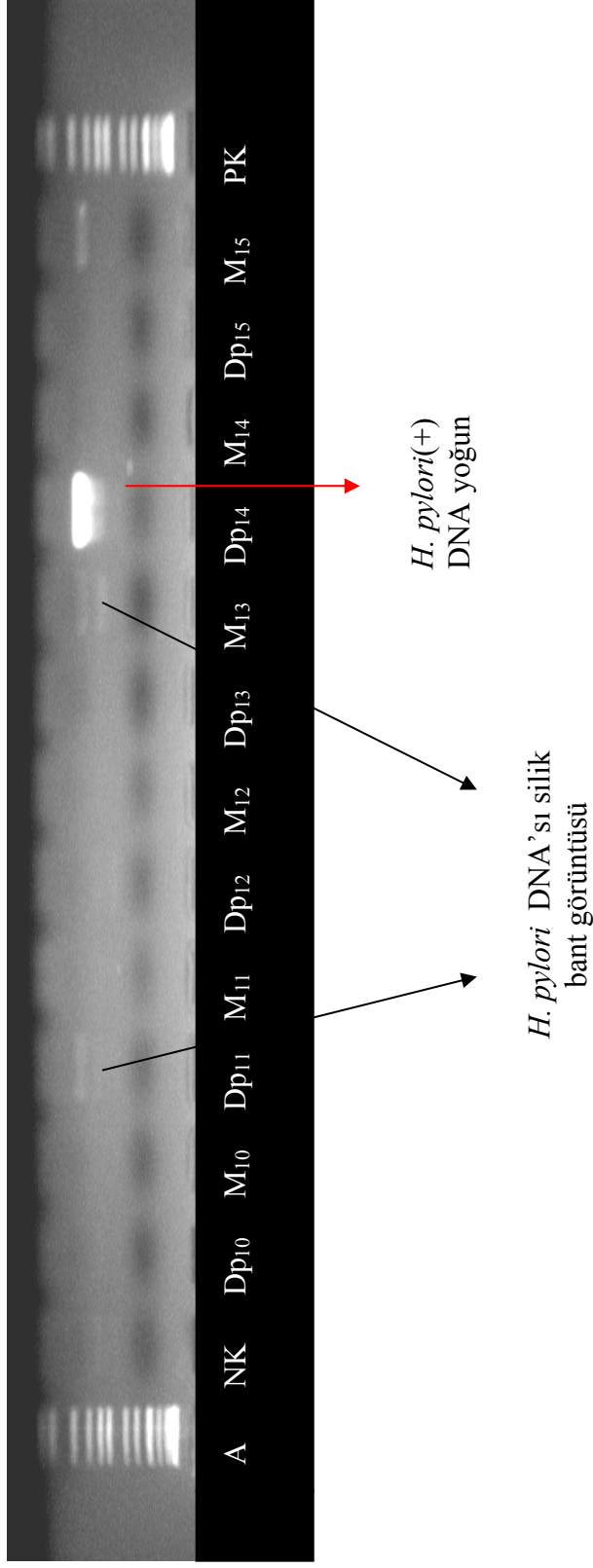
	Mide Hp (+) Patolojik inceleme (n= 29)	Mide Hp (-) Patolojik inceleme (n=74)
Dental Plak (PCR)	13	9
Hp (+)	(% 44.8)	(% 12.8)
Dental Plak (PCR)	16	66
Hp(-)	(% 55.2)	(%87.2)

Tablo 13: Midede patolojik değerlendirme ve dental plakta PCR ile yapılan inceleme sonucunda H.pylori (+) ve (-) olguların varlığının dağılımı



A: DNA marker, PK: Positif kontrol, NK: Negatif Kontrol Dp: Dental plak, M: Mide

Resim 25. Dental plak ve mide örneklerinden izole edilen *Helicobacter Pylori*'ye ait DNA örneklerinin EHC-U/EHC-L primeri ile amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

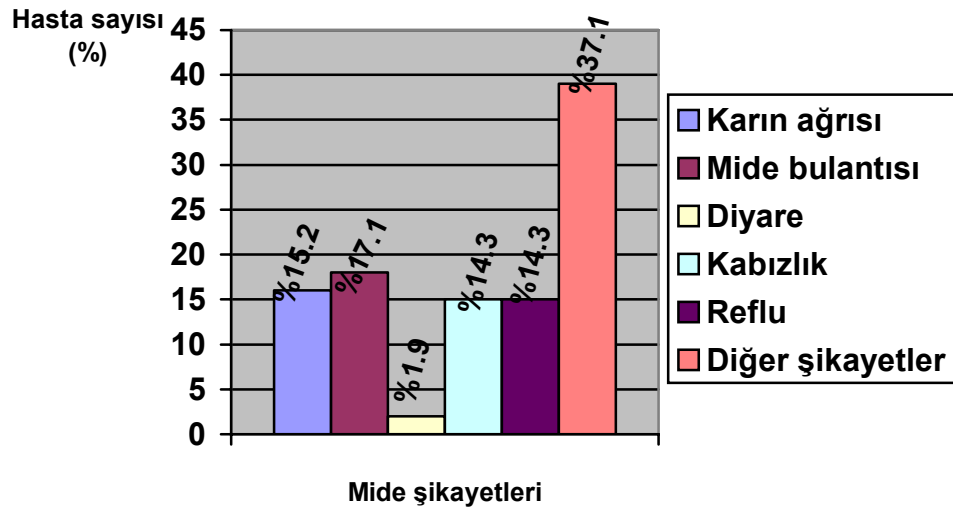


A: DNA marker, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif Kontrol, Dp: dental plak, M: Mide

Resim 26. Dental plak ve mide örneklerinden izole edilen *Helicobacter Pylori*'ye ait DNA örneklerinin EHC-U/EHC-L primeri ile amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

Araştırma Grubunun Başvuru Nedenlerinin Değerlendirilmesi;

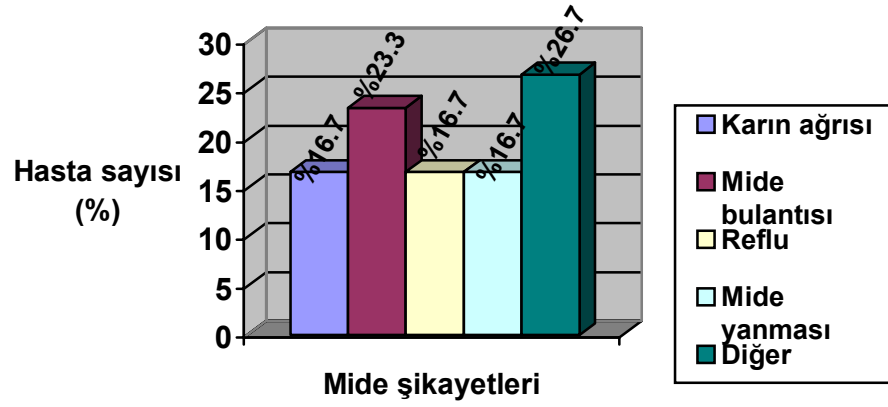
Araştırma grubunda yer alan 105 bireyin % 37.1'inin (39) mide yakınmaları dışındaki belirtilerle (kusma, beslenme bozuklukları vb.) ve % 17.1'inin (18) mide bulantısı, % 15.2'sinin (15) karın ağrısı, % 14.3'ünün (15) reflü, % 14.3'ünün kabızlık ve % 1.9'unun (2) diyare yakınmasıyla başvurduğu belirlendi (Grafik 2). Hastalardan alınan anamnezde % 81'inin herhangi bir tıbbi rahatsızlıklarının olmadığı, ayrıca hastaların % 68.6'sının daha önce tıbbi bir müdahale geçirmediği belirlendi.



Grafik 2. Araştırma grubundaki bireylerin yakınmalarının dağılımı

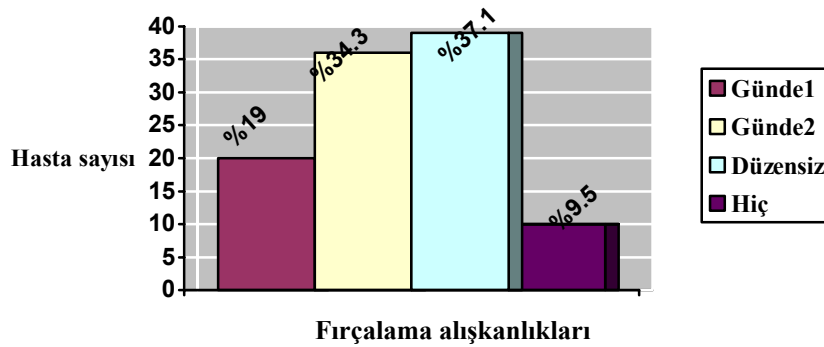
Helicobacter pylori enfeksiyonu saptanan hastaların başvuru nedenlerinin değerlendirilmesi:

Hastalardan (n=30) % 26.7'sinin (8) mide yakınmaları dışındaki yakınmalar (kusma, beslenme bozuklukları vb.), % 23.3'ünün (7) mide bulantısı ve % 16.7'sinin (5) reflü, % 16.7'sinin (5) mide yanması ve aynı oranda karın ağrısı yakınması nedeniyle başvurduğu gözlemlendi (Grafik 3).



Grafik 3. Patolojik değerlendirmeler sonucu H. Pylori (+) saptanan hastaların yakınmalarının dağılımı.

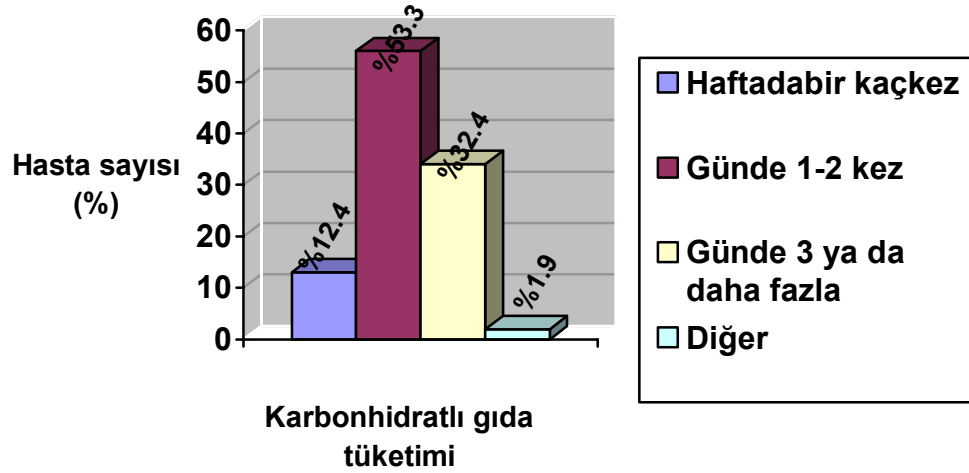
Araştırma grubundaki hastaların ağız-diş sağlığı, beslenme ve diş fırçalama ile ilgili bulguları değerlendirildiğinde; 105 hastanın % 37.1'inin (39) düzensiz diş fırçalama alışkanlığına sahip olduğu, % 34.3'ünün (36) günde bir, % 19'unun (20) günde iki kez diş fırçaladıkları, % 9.5'inin (10) ise hiç diş fırçalamadıkları saptandı (Grafik 4).



Grafik 4. Araştırma grubundaki hastaların fırçalama alışkanlıklarının dağılımı.

Hastalardan % 66.7 sinin daha önce dişhekimi ziyareti gerçekleştirdikleri ve % 94.3 ünün çocukluk çağında ortalama 9.4 ± 6.5 ay anne sütü ile beslendiği saptandı.

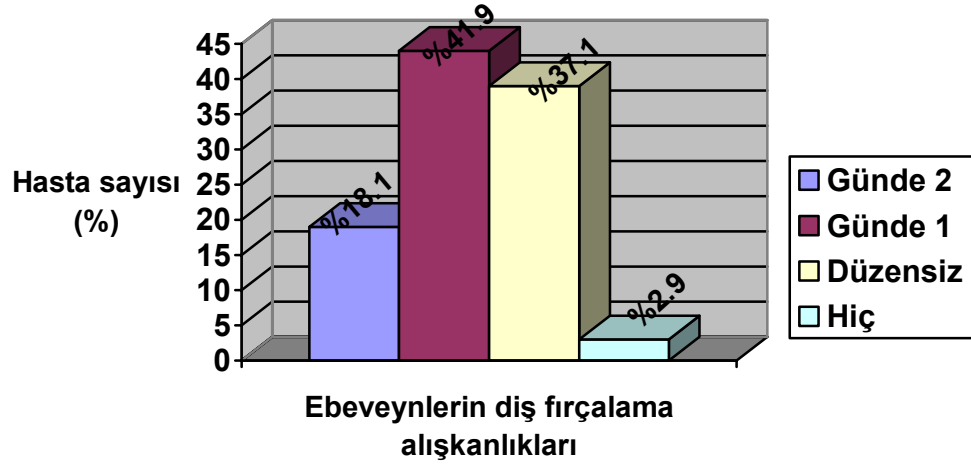
Hastaların % 53.3 ünün (56) günde bir veya iki kez karbonhidratlı gıda tüketimi yaptıkları olgu rapor formlarında gözlemlendi (Grafik 5).



Grafik 5. Araştırma grubundaki hastaların karbonhidratlı gıdaları tüketme sıklıkları.

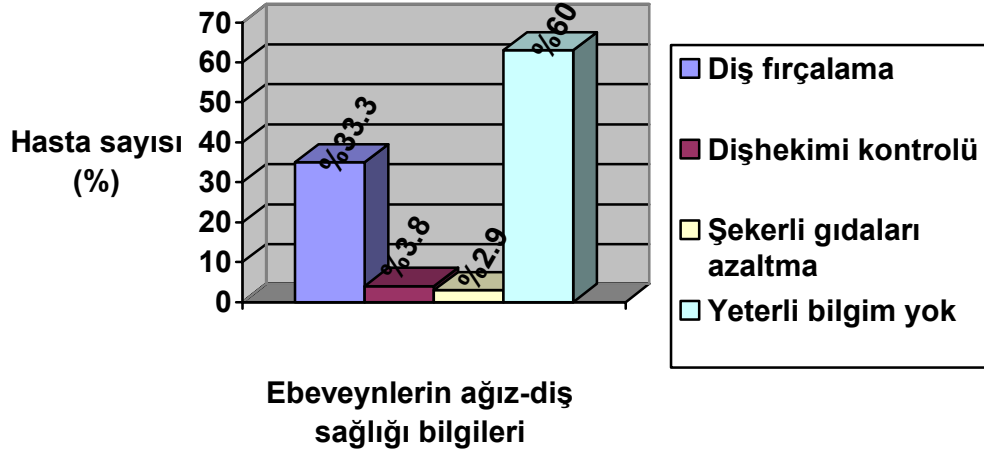
Hastalardan % 41 inin (43) karbonhidratlı gıdalardan çikolata, % 24.8 inin (26) bisküvi, % 21 inin (22) bal-reçel gibi, % 6.7 sinin (7) kuru üzüm, incir v.b. gibi, % 5.7 sinin (6) diğer gıda türlerini, %1 inin (1) emilen şeker gibi yiyecekleri tercih ettikleri saptandı. İçecek olarak ise % 35.2 sinin (37) kola, % 23.8 inin (25) meyve suyunu tercih ettikleri belirlendi.

Ebeveynlerin diş fırçalama alışkanlıkları değerlendirildiğinde; % 41.9 unun (44) günde bir, % 18.1 inin (19) günde iki kez, % 37.1 inin (39) düzensiz, % 2.9 unun (3) hiç fırçalamadıkları gözlemlendi (Grafik 6).



Grafik 6. Araştırma grubundaki hastaların ebeveynlerinin diş fırçalama alışkanlıkları.

Ebeveynlerin çocuklarının ağız ve diş sağlıklarını korumak için yapılması gerekenlerle ilgili bilgi düzeyleri incelendiğinde; ebeveynlerin % 33.3'ünün (35) çocuklarının diş fırçalamalarına yardım ve teşvik ettikleri, % 60'ının (63) ise bu konuda yeterli bilgiye sahip olmadıkları, % 3.8'inin (4) çocuklarını düzenli dişhekimi kontrollerine götürdüğü, % 2.9'unun ise karbonhidratlı gıdaların azaltılması yönünde çocuklarını bilgilendirdikleri gözlemlendi (Grafik 7).



Grafik 7. Araştırma grubundaki ebeveynlerin çocuklarının ağız ve diş sağlıklarını korumak için yapılması gerekenlerle ilgili bilgi düzeyleri.

Araştırma grubunu oluşturan ebeveynlerin eğitim düzeyleri incelendiğinde ise; annelerin % 55.2 sinin, babaların % 27. 6 sının ilkokul veya ortaokul mezunu; annelerin % 42.9 unun, babaların % 71.5 inin lise veya üniversite mezunu olduğu gözlemlendi (Tablo 14).

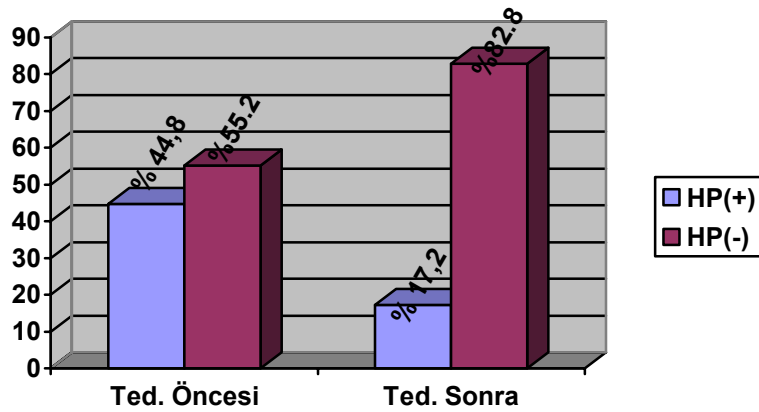
	<i>Anne eğitim düzeyi</i>	<i>Baba eğitim düzeyi</i>
<i>İlkokul</i>	41 (% 39. 0)	16 (%15. 2)
<i>Ortaokul</i>	17 (%16. 2)	13 (%12. 4)
<i>Lise</i>	34 (%32. 4)	53 (% 50. 5)
<i>Üniversite</i>	11 (% 10. 5)	22 (% 21. 0)
<i>Eğitimsiz</i>	2 (% 1. 9)	1 (% 1. 0)

Tablo 14: Araştırma grubuna ait bireylerin ebeveynlerinin eğitim düzeyleri.

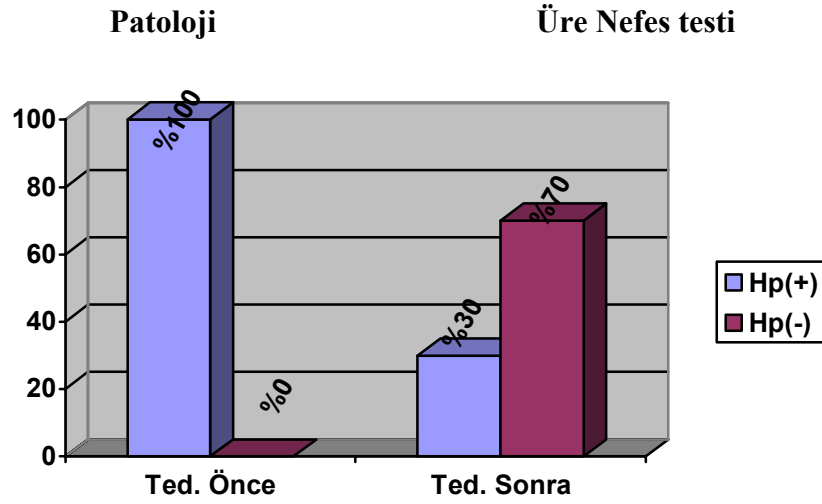
3.1. *Helicobacter pylori* Saptanan Hastaların Eradikasyondan sonra Dental Plak ve Tükürük Örneklerinin Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi

Mide mukozasında patolojik değerlendirme sonucu *Helicobacter pylori* saptanan 29 bireyin eradikasyon tedavisinden altı ay sonra alınan dental plak ve tükürük örnekleri incelendi. Mide mukozasında tedavi öncesinde *Helicobacter pylori* saptanan hastaların dental plak örneklerinin % 44.8 sinde (13) *H. pylori* saptanırken, eradikasyon uygulandıktan sonra dental plakta *Helicobacter pylori* oranının % 17.2 ye (5) düştüğü belirlendi (Grafik 8). Tedavi sonrasında *Helicobacter pylori* oranında saptanan bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.005$).

Test grubunda ($n=29$) *Helicobacter pylori*, tedavi öncesi patoloji ile yapılan değerlendirme sonucu mide örneklerinin tümünde Hp (+) saptanırken tedavi sonrası üre nefes testi ile yapılan değerlendirmede %30 oranında bakterinin pozitifliğinin devam ettiği saptandı (Grafik 9). Tedavi sonrasında saptanan bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.005$). Ancak eradikasyonun olguların tümünde etkili olmadığı gözlemlendi.



Grafik 8. Hp (+) hastaların tedavi öncesi ve sonrası dental plak örneklerinde *H. pylori*'nin dağılımı.



Grafik 9. Hp (+) hastaların mide örneklerinde tedavi öncesi ve sonrası *H. pylori*'nin dağılımı

Tedavi öncesinde dental plakta Hp (+) çıkan hastalarda tedavi sonrasında % 27.6 oranında iyileşme gözlenirken, mide örneklerinde tedavi öncesine göre % 69 oranında bir iyileşme saptandı. Tedavi öncesinde ve sonrasında dental plak ve mide örneklerinde *Helicobacter pylori* varlığına ilişkin veriler Tablo 15'de belirtilmiştir.

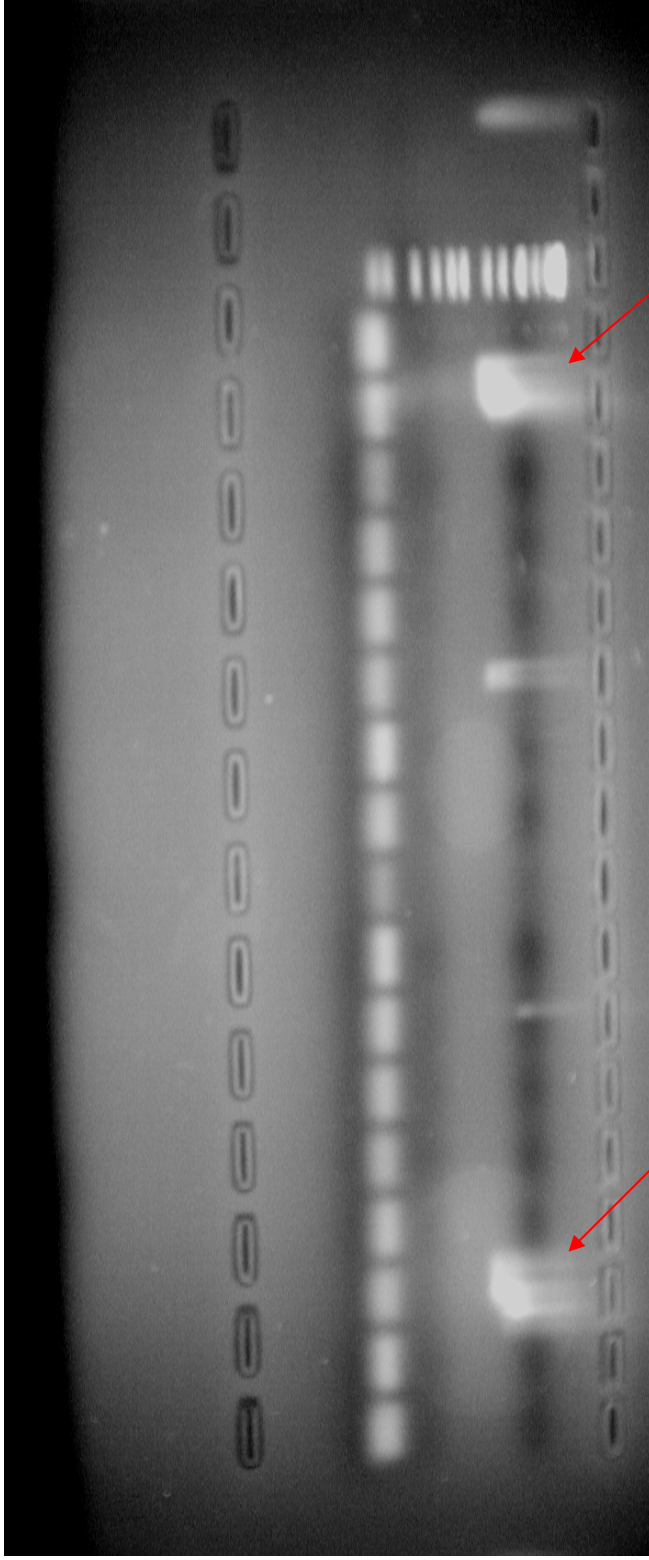
	Tedavi öncesi n (%)	Tedavi sonrası n (%)	İyileşme oranı n (%)
Dental plak Hp(+) (PCR)	13 (% 44.8)	5* (% 38.4)	9 (% 69.2)
Mide Hp(+) Patoloji	29 (% 100)	9* (%31)	20 (% 69)

Tablo 15: Tedavi öncesi ve sonrasında dental plak ve mide örneklerinde *Helicobacter pylori* varlığı (* istatistiksel olarak anlamlı).

Eradikasyon tedavisi öncesi hastaların tükürük örneklerinde *Streptococcus mutans* sayısı ortalama $2.4 \times 10^6 \pm 9.5 \times 10^6$ cfu/ml iken, eradikasyon tedavisi sonrasında altı aylık kontrolda ortalama $4.3 \times 10^5 \pm 5.2 \times 10^5$ cfu/ml olarak gözlemlendi. Yapılan tedavi sonrasında *Streptococcus mutans* sayısında tedavi öncesine göre gözlenen azalma anlamlı bulundu ($p < 0.005$).

3.2. Kontrol Grubunun Dental Plak ve Tükürük Örneklerinin Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi

Herhangi bir sistemik rahatsızlığı bulunmayan sağlıklı çocuklardan ($n=30$) alınan dental plak örneklerinde *Helicobacter pylori* varlığı % 6.6 (2/30) olarak saptandı (Resim 28). Bireylerden alınan tükürük örneklerinde mutans streptokokların sayısı en düşük 1×10^5 cfu/ml, en yüksek ise 9×10^5 cfu/ml olarak saptanırken bireylerin orta çürük risk grubunda oldukları gözlemlendi.



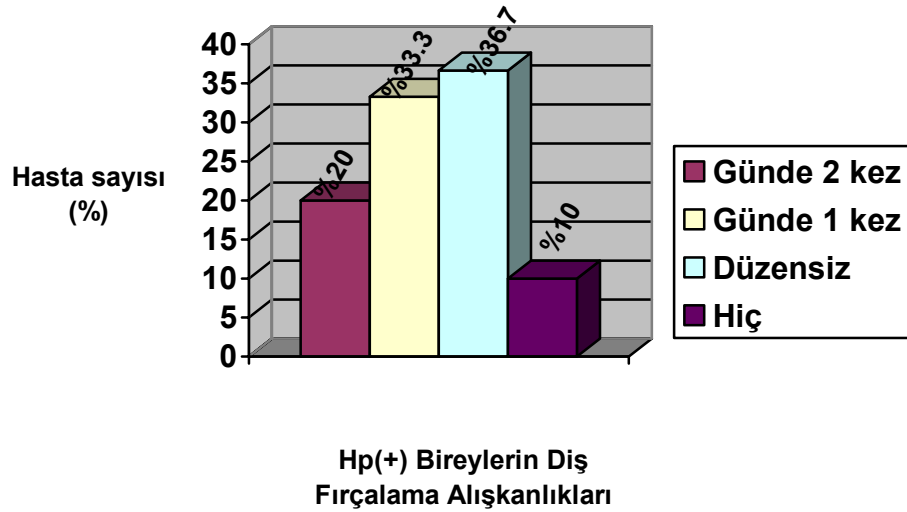
Resim 27. Kontrol grubundaki iki bireye ait dental plak örneklerinde *Helicobacter pylori* DNA bantlarının izlenmesi

3.3. *Helicobacter pylori* Saptanan Hastaların Dental Bulgu ve Ağız Hijyen Alışkanlıklarının Değerlendirilmesi

Mide örneklerinin patolojik değerlendirilmesine göre *Helicobacter pylori* varlığı saptanan, ortalama yaşları 10.8 ± 3.3 olan bireylerden oluşan test grubunun Silness& Loe' ye göre plak indeksleri değerlerinin ortalama 1.5 ± 0.5 olduğu gözlemlendi. Bu hastaların ortalama DMFT, DMFS, dft ve dfs skorları sırasıyla 1.7 ± 1.6 , 1.9 ± 1.7 , 1.8 ± 2.8 , 3.4 ± 9.5 olarak saptandı.

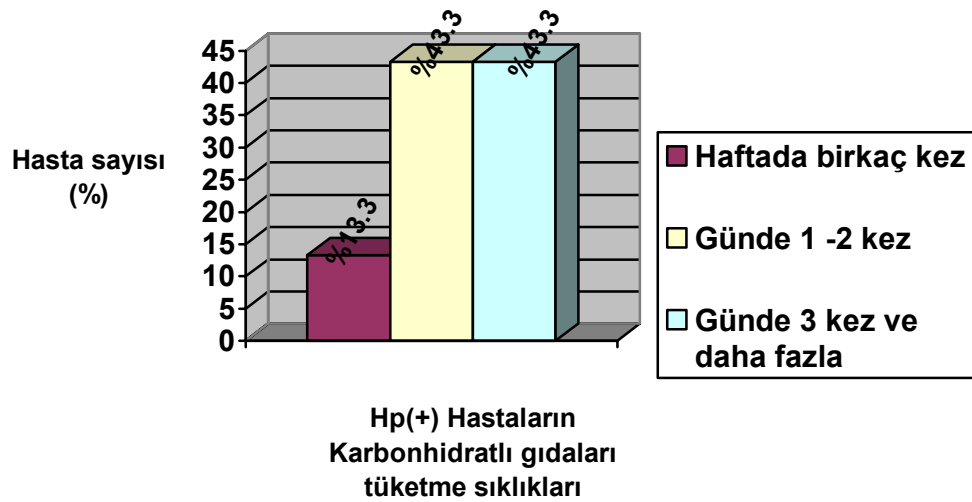
Hastalardan alınan tıbbi anamnez sonucu % 80'inde herhangi bir sistemik rahatsızlıklarının olmadığı, diğer bireylerde ise astım, alerjik problemler vb. ek tıbbi sorunlar bulunduğu saptandı. Ayrıca hastaların % 60'nın daha önce geçirdiği tıbbi bir müdahale bulunmadığı saptanırken, diğer hastaların ise bademcik, geniz eti vb. gibi tıbbi müdahaleler geçirdiği belirlendi.

Bu gruptaki hastaların diş fırçalama ve beslenme alışkanlıkları, dişhekimi ziyareti, dental bulguları, ailelerinin sosyo-demografik bulguları, ağız hijyeni konusundaki bilgi ve fırçalama alışkanlıkları saptanarak bunlara ait veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Buna göre; hastaların % 20 sinin(6) günde iki kez, % 33.3 ünün(10) günde bir kez diş fırçaladıkları, %36.7 sinin (11) düzensiz diş fırçalama alışkanlığına sahip olduğu % 10 nun (3) ise hiç fırçalama yapmadıkları saptandı (Grafik 10).



Grafik 10. Hp (+) hastaların fırçalama alışkanlıklarının (%) dağılımı

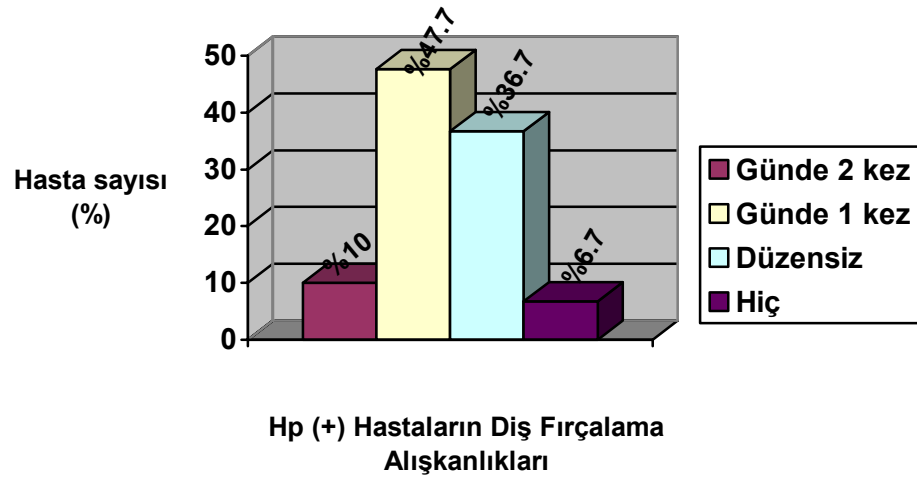
Hastalardan % 66.7 sinin daha önce diş hekimine gittikleri ve tümünün çocukluk çağında ortalama 9.8 ± 6.6 ay anne sütü ile beslendiği saptandı. Hastaların % 43.3 ünün (13) bir veya iki kez, % 43.3 ünün (13) en az üç kez karbonhidratlı gıda tüketimi yaptıkları, % 13.3 ünün (4) ise haftada birkaç kez ya da hiç tüketmedikleri olgu formlarının değerlendirilmesiyle belirlendi (Grafik11).



Grafik 11. Hp (+) hastaların karbonhidratlı gıdaları tüketme sıklığı.

Bu grupta yer alan bireylerin çürük oluşumu açısından önemli olan karbonhidratlı gıdaları tüketme sıklıkları değerlendirildiğinde; % 40'ın çikolata, % 13.3'ünün bal, reçel vb. , % 26.7'sinin bisküvi, % 3.3'ünün emilen şeker vb. gıdaları, % 16.7'sinin diğer besinleri tercih ettikleri gözlemlendi. İçecek olarak ise % 33.3'ünün kola, % 33.3'ünün meyve suyu, % 6.7'sinin şekerli çay ve % 23.3'ünün ise sütü tercih ettikleri saptandı.

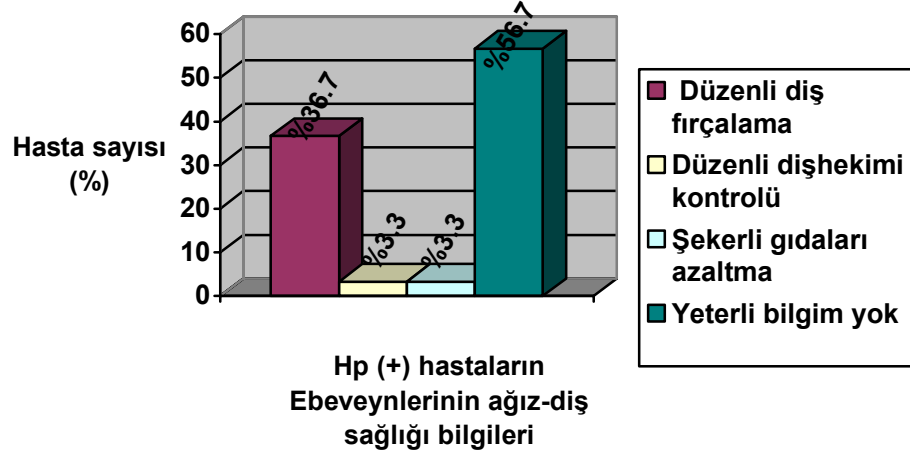
Ebeveynlerin diş fırçalama alışkanlıkları değerlendirildiğinde; % 10'unun (3) günde iki, % 46.7'sinin (14) günde bir kez diş fırçaladıkları, % 36.7'sinin (11) düzensiz ve % 6.7'sinin (2) ise hiç diş fırçalamadığı saptandı (Grafik 12).



Grafik 12. Hp (+) hastaların ebeveynlerinin diş fırçalama alışkanlıkları

Ebeveynlerin doldurdukları olgu rapor formlarından çocuklarının ağız ve diş sağlıklarını korumak için yapılması gerekenlerle ilgili bilgi düzeyleri değerlendirildi. Buna göre, ebeveynlerin % 36.7'sinin (11) çocuklarının ağız diş sağlığını korumak için diş fırçalamalarına yardım ve teşvik ettikleri, % 3.3'ünün (1) düzenli diş hekimi

kontrollerine götördükleri, % 56.7'sinin (17) ise bu konuda yeterli bilgiye sahip olmadıkları, % 3.3'ünün (1) karbonhidratlı gıdaların azaltılması yönünde çocuklarını bilgilendirdikleri gözlemlendi (Grafik 13).



Grafik 13. Hp (+) hastaların ebeveynlerinin ağız ve diş sağlıklarını korumak için çocuklarına yapılması gerekenlerle ilgili bilgi düzeyleri

Helicobacter pylori enfeksiyonu saptanan gruptaki bireylerin ebeveynlerinin eğitim düzeyleri incelendiğinde annelerin % 60'ının, babaların % 30'unun ilkököl veya ortaokul mezunu olduğu; annelerin % 40'ının, babaların ise % 70'inin lise veya üniversite mezunu olduğu saptandı (Tablo 17).

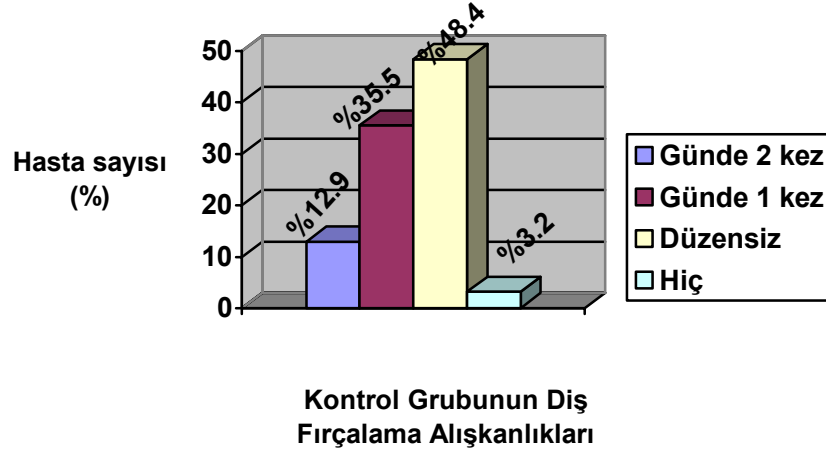
	<i>Anne eğitim düzeyi</i>	<i>Baba eğitim düzeyi</i>
<i>İlkokul</i>	14 (% 46.7)	4 (%13.3)
<i>Ortaokul</i>	4(%13.3)	5(%16.7)
<i>Lise</i>	10 (% 33.3)	14 (% 46.7)
<i>Üniversite</i>	2 (% 6.7)	7 (% 23.3)

Tablo 17: Hp (+) saptanan çocukların ebeveynlerinin eğitim düzeyleri

3.4. Kontrol Grubunun Dental Bulgu ve Ağız Hijyen Alışkanlıklarının Değerlendirilmesi

Kontrol grubunu oluşturan ve yaşları ortalama 10.4 ± 7.6 olan bireylerin (n=30) ortalama DMFT, DMFS, dft ve dfs skorları sırasıyla 2.2 ± 2.3 , 2.6 ± 3.1 , 1.8 ± 2.2 ve 2.6 ± 3.1 olarak bulundu. Bu gruptaki bireylerin Silness& Loe' ye göre plak değerleri ortalama 1.4 ± 0.5 olarak saptandı.

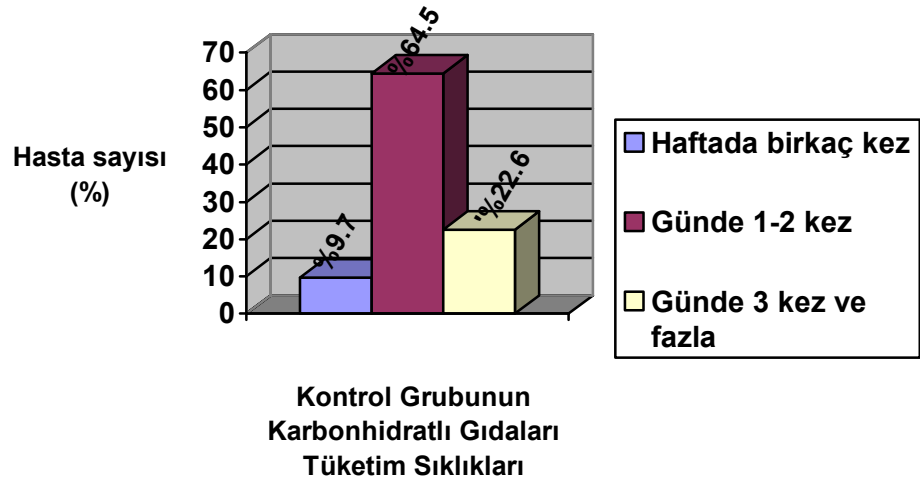
Bu gruptaki bireylerin fırçalama ve beslenme alışkanlıkları, ebeveynlerinin sosyo-demografik bulguları ve ağız hijyen alışkanlıkları saptanarak bunlara ait veriler değerlendirildiğinde; % 12.9'unun (4) günde iki, % 35.5'inin (11) günde bir kez diş fırçaladıkları, % 48.4'ünün (15) düzensiz diş fırçalama alışkanlığına sahip olduğu, % 3.2'sinin (1) ise hiç diş fırçalamadığı saptandı (Grafik 14).



Grafik 14. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin diş fırçalama alışkanlıklarının dağılımı.

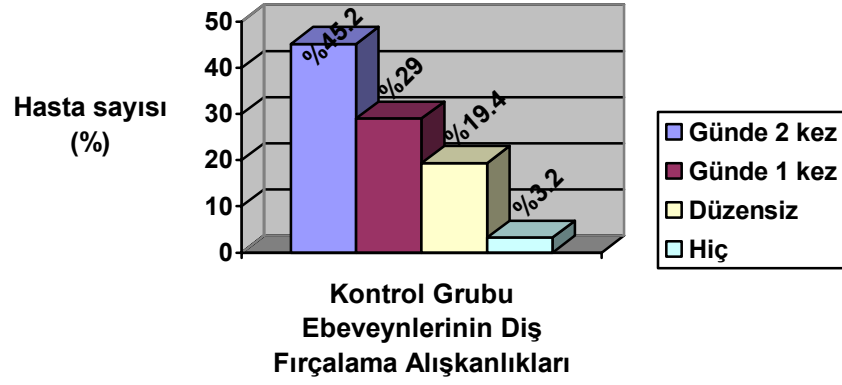
Kontrol grubundaki bireylerden (n=30) % 64.5'inin daha önce diş hekimini ziyaret ettikleri olgu rapor formlarından saptandı. Ayrıca beslenme alışkanlıkları

incelendiğinde % 93.5 inin çocukluk çağında ortalama 10.4 ± 7.6 ay süre ile anne sütüyle beslendiği gözlemlendi. Bu gruptaki bireylerin % 64.5 inin (20) günde bir veya iki kez, % 22.6 sının (7) günde üç veya daha fazla karbonhidratlı gıda tüketimi yaptıkları, % 9.7 sinin (3) haftada birkaç kez ya da daha az sıklıkla bu gıdaları tükettikleri saptandı (Grafik 15). Hastalardan % 74.2 sinin (23) karbonhidratlı gıdalardan çikolatayı tercih ettikleri saptanırken, içecek olarak % 48.4 ünün (15) meyve suyunu, % 19.4 ünün (6) ise kolayı, % 16.1 inin sütü, % 3.2 sinin suyu tercih ettikleri saptandı.



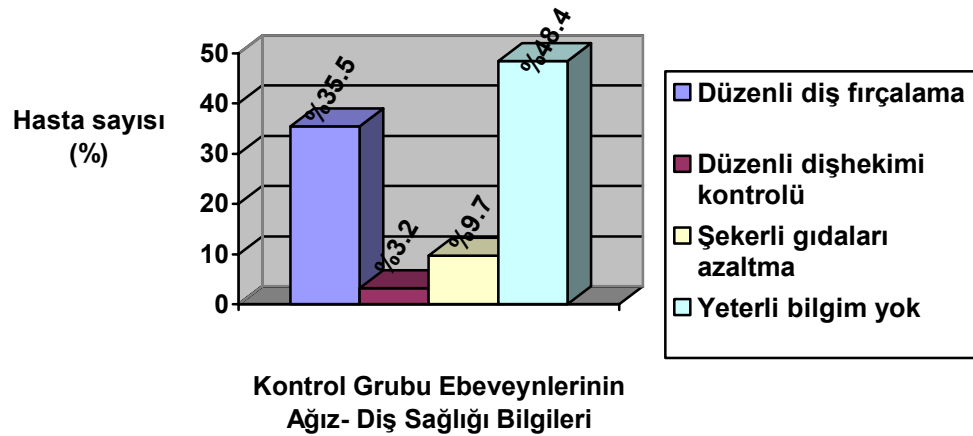
Grafik 15. Kontrol grubundaki bireylerin karbonhidratlı gıdaları tüketme sıklığı.

Kontrol grubundaki bireylerin ebeveynlerinin ağız hijyen alışkanlıkları değerlendirildiğinde; % 45.2 sinin (14) günde iki kez ve % 29 nun (9) günde bir kez, % 19.4 ünün (6) düzensiz diş fırçaladığı, % 3.2 sinin (1) ise hiç diş fırçalama yapmadıkları belirlendi (Grafik 16).



Grafik 16. Kontrol grubundaki bireylerin ebeveynlerinin diş fırçalama alışkanlıkları

Kontrol grubunda yer alan ebeveynlerin çocuklarının ağız ve diş sağlıklarını korumak için yapılması gerekenlerle ilgili bilgi düzeyleri incelendiğinde; ebeveynlerin % 35.5'inin (11) çocuklarının ağız diş sağlığını korumak için diş fırçalamalarına yardım ve teşvik ettikleri, % 3.2'sinin (1) çocuklarını düzenli diş hekimi kontrolüne götürdükleri saptandı. Ayrıca % 9.7'sinin (3) çocuklarının şekerli gıda tüketiminin azaltılmasına yardımcı oldukları, % 48.4'ünün (15) ise bu konuda yeterli bilgiye sahip olmadıkları olgu rapor formlarında belirlendi (Grafik 17).



Grafik 17. Kontrol grubunda yer alan ebeveynlerin çocuklarının ağız ve diş sağlıklarını korumak için yapılması gerekenlerle ilgili bilgi düzeyleri

Bu gruptaki bireylerin ebeveynlerinin eğitim düzeyleri incelendiğinde ise annelerin % 51.7 sinin, babaların ise % 32.3 ünün ortaokul veya lise mezunu oldukları; annelerin % 44. 2 sinin, babaların ise % 64. 5 inin lise veya üniversite mezunu olduğu saptandı (Tablo 18).

	<i>Anne eğitim düzeyi</i>	<i>Baba eğitim düzeyi</i>
<i>İlkokul</i>	10 (% 32. 3)	3 (%9. 7)
<i>Ortaokul</i>	6 (%19. 4)	7 (% 22. 6)
<i>Lise</i>	8 (% 25. 8)	8 (% 25. 8)
<i>Üniversite</i>	6 (% 19. 4)	12 (% 38. 7)

Tablo 18: Kontrol grubunu oluşturan bireylerin ebeveynlerinin eğitim düzeyi

Yaptığımız çalışmada *Helicobacter pylori* varlığı tespit edilen test grubundaki olguların, tedavi sonrasında dental plaklarında saptanan bakteri varlığı ile sağlıklı ve herhangi bir medikal yakınması olmayan kontrol grubundaki bireylerin dental plağında bakterinin bulunma oranı arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Helicobacter pylori varlığı tespit edilen olgularla; sağlıklı ve herhangi bir medikal yakınması olmayan kontrol grubundaki bireyler arasında çürük görülme sıklığı (dft, dfs, DMFT ve DMFS) açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Ayrıca bu iki grubun mutans sayıları ve plak indeksleri arasında aynı şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Helicobacter pylori varlığı tespit edilen olgularla; sağlıklı ve herhangi bir medikal yakınması olmayan kontrol grubundaki bireylerin fırçalama alışkanlıkları,

dişhekimi ziyaretleri, anne sütü ile beslenme süreleri, karyojenik gıdaları tüketme sıklıkları açısından yapılan değerlendirmelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Ebeveynlerinin eğitim düzeyleri, fırçalama alışkanlıkları, ağız diş sağlığı bilgileri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

Çalışmamızda gastrik endoskopi yapılan 105 hastanın patolojik inceleme ile % 29.5 (31/105) *H. pylori* saptanırken PCR yöntemi ile % 33.5 (35/105) saptanması nedeniyle bakterinin saptanma oranlarının bu iki yöntemde benzer olduğu gözlemlendi. Bu nedenle bu bulgumuz PCR yönteminin *H. pylori* tanısında patolojik incelemeye alternatif bir yöntem olabileceğini gösterdi.

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

Çocuklarda antral gastrit ve duodenal ülserlerin başlıca etkeni olduğu yapılan araştırmalarda ortaya konan *Helicobacter pylori*'nin, gastrointestinal sistemin başlangıcı olan ağızda oral floranın üyesi olup olmadığı tartışmalıdır (1, 10). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar *Helicobacter pylori*'nin ağız florasında ve dental plakta bulunduğunu, ancak bu alanlarda yerleşen bakterinin patojenliğinin kesin olmadığını bildirmektedir (37, 51, 88, 101, 117,125). Buna karşın antibiyotik ile yapılan eradikasyon tedavisi sonrası bu bakterinin neden olduğunu enfeksiyonun sıklıkla tekrarladığı da bildirilmektedir. Bu bulgu bakterinin, mide dışında özellikle ağız florasında dental plak gibi bölgelerde varlığını sürdürebildiğini göstermektedir.

Yetişkinlerde *Helicobacter pylori*'nin hem gastrik dokularda, hem de gastrik dokular dışındaki bölgelerde varlığına ilişkin çok sayıda çalışma bulunurken çocuklarda yapılan çalışma sayısı çok azdır(1).

Helicobacter pylori enfeksiyonunun geçiş yolu tam olarak bilinmemekle birlikte büyük olasılıkla bulaşma, çocukluk döneminde olmaktadır. Spontan eradikasyonlar ve sonraki tekrarlayan enfeksiyonlar (re-enfeksiyonlar) nedeniyle geçişin ne zaman ve hangi şekilde olduğu halen anlaşılamamıştır (1, 88, 144).

Helicobacter pylori enfeksiyonunun tedavisi sonrasında mideden eradikasyonunun, bakterinin muhtemel rezervuarlarından olan oral floradan uzaklaştırılmasında yeterli olup olmadığını araştırdığımız çalışmamızda gastrointestinal şikayetlerle başvuran 105 hastanın mide örneklerinin patolojik değerlendirmeler sonucu *H. pylori* görülme oranının % 29.5 (31) olduğu belirlendi.

Ülkemizde çocukluk çağında *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun prevalansı ile ilgili yapılan serolojik çalışmalarda enfeksiyonun görülme sıklığının % 42 - 52.5 arasında olduğu bildirilmiştir (70, 152, 153, 162). Buna göre çalışmamızda *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun görülme oranının, yukarıda bildirilen serolojik çalışmalara göre oranla daha düşük olduğu gözlemlendi. Bunun nedeni, bakterinin tanısında kullanılan yöntemlerin farklı olması ve/veya ailelerin eğitim düzeyinin daha iyi olmasından kaynaklanabilir. Nitekim 105 kişilik araştırma grubunun ebeveynlerinin eğitim durumu incelendiğinde annelerin % 42.9'unun, babalarının % 71.5'inin ortaöğretim veya üniversite mezunu oldukları gözlemlendi. Sosyoekonomik düzeyin düşük olduğu bölgelerde *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun görülme sıklığının daha yüksek olduğunu bildiren çalışmalarla bulgularımız uyum göstermiştir (23, 49, 84) .

Gastrik sıvının, özellikle gastritin akut safhasında, enfeksiyonun geçişinde önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir (10). Bakterinin mide mukozasında yerleştiği düşünüldüğünde mide içeriğinin reflü, kusma vb. şekilde ağız boşluğuna gelmesi, bulaşım yolunun gastro-oral yolla olduğunu düşündürmektedir. Bu safhada reflünün sıklığının artması, bakterinin ağız boşluğuna ve buradan başka bireylere geçişini kolaylaştırabilecektir (1). Çoğu *Helicobacter pylori* enfeksiyonu çocuklukta kazanıldığı için gastro-oral yayılımın, kusma yoluyla gastrik içerik ile daha sık karşılaşan çocuklarda önemli olduğu ileri sürülmüştür(1, 30). Çalışmamızda 105 kişilik araştırma grubunda mide şikayetleri (karın ağrısı, mide bulantısı, reflü v.b) ile başvuran bireyler % 46.6 oranında gözlenirken *Helicobacter pylori* teşhisi konan 30 hastada ise % 73.4 olarak saptandı. Bu bulgumuz bakterinin mideden gastro-oral yolla yayılımının söz konusu olabileceğini düşündürmektedir.

H. pylorisi'nin gastrik mukoza dışında dental plak ve feçeste de varlığının gösterilmesi nedeniyle, enfeksiyonun geçiş yolunun oral-oral ya da fekal-oral

olabileceğini ileri süren çalışmalar vardır (17, 40, 58, 75, 88, 144, 160, 168). Bu çalışmalarda dental plakta veya tükürükte *Helicobacter pylori*'nin saptanması ile, oral floranın *Helicobacter pylori*'nin geçişinde önemli rolü olabileceği rapor edilmiştir (1, 104).

Yetişkin bireylerde oral kavitede yapılan çalışmalarda yöntemlerdeki farklılıklar nedeniyle bakterinin görülme sıklığı ile ilgili farklı sonuçlar bildirilmiştir (15, 17, 40, 48, 71, 92, 101, 104, 117, 125, 128, 135, 150, 155, 161, 164). *Helicobacter pylori*'nin çok miktarda üreaz üretmesi esasına dayalı hızlı üreaz ve CLO(Campylobacter-like organisms) testleri bakterinin tespitinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Dental plakta *Helicobacter pylori*'nin saptanmasında üreaz testlerinin kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (6, 11, 29, 71, 128). *Helicobacter pylori*, midedeki tek üreaz (+) bakteri olduğu için, gastrik örneklerden bakterinin tespitinde uygun bir yöntem olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte ağız boşluğu bazı Streptococcus türleri (*S.salivarius*, *S. oralis*, *S. sanguis*), Haemofilus türleri (*H. haemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. parainfluenza*), Actinomyces türleri (*A. meyeri*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*), bazı Micrococcus türleri ve *Bacteriodes ureolyticus* gibi çok sayıda üreaz (+) bakteriyi barındırmaktadır. Bu nedenle dental plakta *Helicobacter pylori* tespitinde üreaz testlerinin kullanılması, diğer üreaz pozitif bakteriler nedeniyle yanlış pozitif sonuçların elde edilmesine neden olabilir. Bu testlerin oral *Helicobacter pylori* tespitinde tek başına kullanılması bu sebeple önerilmemektedir (51, 94, 114, 125).

Butt ve arkadaşları (28), gastrik örneklerde *Helicobacter pylori*'nin mikroskopik incelemeyle tespit edilebileceğini, ancak dental plakta bu yöntemin, aynı görüntüyü veren Treponema türünü barındıran spiroketlerle karışması nedeniyle

belirleyici özelliğinin düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla çalışmamızda moleküler biyolojik teknikler kullanılmıştır.

Gastrik *Helicobacter pylori*'nin tanısında kültür yöntemi "altın standart" kabul edilmektedir. Bu nedenle Krajden ve arkadaşları (92); dental plak örneklerinde *Helicobacter pylori*'yi kültür yöntemiyle saptamaya çalışmışlar ancak gastrik olarak *Helicobacter pylori* saptanan 29 hastanın sadece birinde dental plakta bu bakteriyi tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmayla *Helicobacter pylori* ilk kez oral örneklerden kültür edilebilmiştir.

Dental plak ve tükürük örneklerinde *Helicobacter pylori*'nin kültür yöntemiyle izole edilebilmesine rağmen, bakterinin kültürünün yapılmasındaki zorluklar nedeniyle oldukça az sayıda örnekte saptanabildiği bildirilmiştir (1, 17, 19, 32, 37, 42, 58, 75, 80, 84, 92, 100, 102, 126, 168). Ishiara ve arkadaşları (80) *Helicobacter pylori*'nin dental plak ve tükürükte kültür yöntemiyle düşük oranda saptanmasının nedeninin, mikroaerofilik ortamın varlığına, besiyerlerinin özelliklerine, bakterinin üremesi için yedi günlük takip süresinin gerekmesine ve oral floranın karmaşık yapısına bağlamaktadırlar. Aynı araştırmacılar bu problemleri gidermek için daha seçici besiyerlerinin oluşturulması gerektiğini savunmuşlardır.

Bode ve arkadaşları (22) oral flora örneklerinden *Helicobacter pylori*'nin kültür yöntemiyle üretilmesinde karşılaşılan zorlukların, bakterinin kültür edilebilir formlarının bulunmamasına bağlamışlar ve bakterinin canlı kokoid formlarının konvansiyonel teknikler ile kültür edilemediğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte Ishiara ve arkadaşları (80), bakterinin kokoid formunun ancak uygun olmayan koşullarda baskın olduğunu ve ağızdaki diğer bakterilerin *Helicobacter pylori* üzerinde inhibe edici etki gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Cellini ve arkadaşları ise (32) bakterinin kokoid formunun hastalıkla ilişkili olmadığını, uygun koşullar altında kokoid formların enfeksiyöz çubuk şekline dönüştüğünü iddia etmişlerdir. Ishiara ve arkadaşları (80), Song ve arkadaşları (148) da bakterinin dental plakta kokoid formda bulunmasının klinik açıdan önemli olduğunu ve gelecekte midenin enfeksiyonuna neden olabileceğinden dikkate alınması gerektiğini savunmuşlardır.

Kültür yönteminde karşılaşılan problemler nedeniyle son yıllarda yapılan çalışmalarda gelişmekte olan moleküler biyoloji teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu tekniklerden biri olan ve DNA'nın türe özgü bölgesinin spesifik amplifikasyonuna dayalı Polimeraz Chain Reaction (PCR) yöntemi; örnekte spesifik bakterilerin küçük miktarlarda da olsa hızlı tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Bunun yanında mikroorganizmanın canlı olarak elde edilmesini gerektirmemesi gibi avantajları nedeniyle bu yöntem yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (51).

Bu yöntemin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte *Helicobacter pylori* oral kaviteden alınan örneklerde daha sık olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte çalışmalarda elde edilen sonuçların çok fazla değişkenlik gösterdiği de (%0–90) gözlenmiştir (1, 15, 30, 48, 58, 80, 81, 94, 95, 104, 122, 123, 144, 149, 155, 168). PCR'la yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların farklı olmasının nedenleri üç şekilde değerlendirilebilir; Çalışılan örnek grubu, örnek seçimi ve laboratuvarında kullanılan teknikler. Çalışılan populasyon ve örnek seçimi *Helicobacter pylori* görülme sıklığında farklılıklara neden olmasına karşın, ağız boşluğunun, bu bakteri için potansiyel bir rezervuar olabileceğini ortaya koymaktadır (51).

Çalışmamızda endoskopi sonrası PCR ile mide mukozasında gözlenen *H. pylori* oranı ile patolojik değerlendirmeler ile ortaya konan bulguların benzer olduğu

saptandı. Bu bulgumuz PCR'la yapılan incelemenin; örnek grubunun iyi seçilmesi, incelenecek örneklerde amaca uygun kimyasalların ve yöntemlerin kullanılması, kontaminasyon olmaması için dikkatli çalışması halinde patolojik incelemeye alternatif bir yöntem olabileceğini gösterdi. Bravos ve Gilman (26) PCR yönteminin dental plak, tükürük vb. gibi non-gastrik dokularda *Helicobacter pylori* varlığının saptanmasında, bakterinin tanımlanmasında kullanılan diğer yöntemlerinden (Üreaz testi, kültür vb) daha duyarlı ve spesifik olduğunu savunmuşlardır. Ayrıca aynı araştırmacılar moleküler biyolojik tekniklerde kullanılan alet ve kimyasalların geliştirilmesi ve bu yöntemde maliyetlerin azalmasıyla, patolojik incelemelere alternatif bir yöntem olabileceğini vurgulamışlardır. Gebera ve arkadaşları ise (61) PCR'ın *H. pylori*'nin tespitinde diğer yöntemlere göre daha duyarlı olduğunu ve en az 10 bakteri hücrelerine kadar tespit edebildiğini buna rağmen yöntemin duyarlılığının değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda farklı sonuçların rapor edilmesinin bir diğer nedeninin PCR işlemlerinde kullanılan primerler olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmalarda Üreaz geni, 16S-rRNA genine dayalı, spesifik 26K protein genini kodlayan veya bakterinin rastgele seçilmiş bir DNA bölgesini hedef alan primerler kullanılmıştır (51, 94, 149). Fakat bu primerler arasında duyarlılık ve spesifite farklılıkları gözlenmektedir. Bu nedenle primerlerin duyarlılık ve spesifitesinin, uygulamasının internal bölgeye özgü bir çift primerle gerçekleştirildiği *Nested PCR* yöntemi kullanılarak artırılmasına çalışılmıştır.

Song ve arkadaşları (151); 40 yetişkin hastada, oral kavitenin farklı alanlarından toplanmış dental plak örneklerinde üç farklı primer setiyle *Helicobacter pylori* varlığını araştırmışlardır. HPU1/HPU2 (Üreaz A geni), HP1/HP2 (16S rRNA) ve EHC-U/EHC-L (860 baz çifti) primer setleriyle yaptıkları çalışmalarında EHC-

U/EHC-L primerlerinin, diğler setlere oranla daha duyarlı ve spesifik olduğunu göstermişlerdir.

Li ve arkadaşları (95) ile Song ve arkadaşları (141, 142) yaptıkları çalışmalarda dental plak ve tükürükte *Helicobacter pylori*'nin saptanması amacıyla EHC-U/ EHC-L primerlerini kullanmışlardır. Li ve arkadaşları (95) bu primerleri kullanarak yaptıkları çalışmalarında, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu saptanan yetişkin hastalara ait tükürük örneklerinde % 59 oranında bakteri varlığını göstermişlerdir. Song ve arkadaşları ise (148) dispeptik şikâyetleri bulunan yetişkin hastaların tükürük örneklerinde % 55, dental plaklarında ise % 97 oranında *Helicobacter pylori* varlığını saptamışlardır. Song ve arkadaşlarının (150) EHC-U/ EHC-L primerlerini kullanarak yaptıkları bir başka çalışmada, abdominal yakınmaları bulunan ve endoskopi yapılan 20 yetişkin bireye ait oral örneklerin (dental plak ve tükürük) tümünde bakteri varlığını gözlediklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmalar ışığında sensitivite ve spesifisitesinin yüksek olması nedeniyle çalışmamızda EHC-U/ EHC-L primerleri kullanılmıştır.

Helicobacter pylori'nin ağız boşluğunda PCR yöntemi ile saptanmasının olumlu yönlerinin yanında, iki açıdan dezavantajı olduğu düşünülmektedir. Bunlardan ilki; bakteri ağız boşluğunda az sayıda ve enfeksiyona neden olacak miktarda bulunmamasına rağmen PCR yöntemi ile saptanabilir. Diğler bir dezavantajı ise; PCR, yaşamayan yani enfeksiyöz olmayan *Helicobacter pylori*'nin de varlığını gösterir. Buna karşın ağız boşluğunda tespit edilen *Helicobacter pylori*'nin canlı olduğu ve patojenite yarattığı düşünülürse, üremesini destekleyecek bir mikroortam da gereklidir. Bu sebeple, örneğin oral florada bakterinin yerleşebileceği spesifik alanların belirlenmesi, bu alanlarda ne kadar sıklıkla bulunduğunun araştırılması gereklidir.

Helicobacter pylori'nin oral kavitenin değişik bölgelerinde; supragingival ve subgingival plakta, tükürükte, oral lezyonlarda ve oral mukoza üzerinde tespit edildiği bildirilen çalışmalar bulunmaktadır (1, 20, 48, 135, 148, 149). Fakat çalışmalarda kullanılan yöntemlerin farklı olması nedeniyle bakterinin oral kavitedeki bu değişik alanlarda görölme sıklığının karşılaştırılması zor olmaktadır (51).

Allaker ve arkadaşları (1), ortalama yaşları 8 olan 100 çocukla gerçekleştirdikleri çalışmalarında, gastrik biyopsi örneklerinden % 22'sinin *Hp* (+) olduğunu ve bu bakterinin, hem gastrik biyopsisi *Hp* (+) hemde aynı alandan alınan örneklerde *Hp* (-) saptanan bireylerin supragingival dental plak örnekleri ve ağız sürüntülerinde var olduğunu PCR yöntemi ile göstermişlerdir. Araştırcılar gastrik *Hp* (+) hastaların % 68 inin ve biyopsi alınan tüm çocukların % 36 sının dental plak örneklerinde bakteri varlığını gözlemişlerdir. Song ve arkadaşları (149) ise; 42 dispeptik yakınması olan yetişkin hastayla yaptıkları çalışmalarında hastaların % 97 sinde supragingival plakta *Helicobacter pylori* saptamışlardır. Riggio ve Lennon(135) ise mide örneklerinde *Hp* (+) olan 29 yetişkin hastadan aldıkları subgingival plak örneklerinin % 33 ünde bakteri varlığını ortaya koymuşlardır.

Song ve arkadaşları (149), supragingival plak örneklerinin ağızda dişler üzerinde alındığı bölgelere bağlı olarak, *Helicobacter pylori* prevelansının değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. 39 birey üzerinde yaptıkları çalışmalarında *Helicobacter pylori*'nin molar, premolar ve keser dişlerden alınan örneklerde saptandığı, bunun yanında molarlarda %82 (32), premolarlarda %64 (25), keser dişlerde ise %59 (23) oranında bulunduğu bildirmişlerdir. Bu dağılım, *Helicobacter pylori*'nin mikroareofilik özelliği ile açıklanabilir. Keser dişlerden molar dişlere doğru oksijene maruz kalma kademeli bir şekilde azalır ve bu da *Helicobacter*

pylori' nin molar bölgede daha sıklıkla üremesine yardımcı olur (88). Bu sebeple çalışmamızda bireylerin molar dişler bölgesinden dental plak örnekleri toplanmıştır. Çalışmaya katılan bireylerin yaşının küçük olması ve cep derinliklerinin fizyolojik sınırlarda olmasından dolayı çalışmamızda supragingival plak örneklerinin toplanması tercih edilmiştir.

Banatvala ve arkadaşları(14), gastrik şikayetleri nedeniyle endoskopik değerlendirme yapılan 54 olguda, üreaz A genini saptayan primerleri kullanarak yaptıkları PCR çalışmalarında, dental plakta *Helicobacter pylori* varlığını % 72.2 oranında saptamışlardır. Hammar ve arkadaşlarının (73) aynı yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada ise gastrik şikayeti bulunan 27 hastanın tükürük örneklerinde % 33.3 oranında *Hp* (+) olarak bulunmuştur.

Mapstone ve arkadaşları (104), Nguyen ve arkadaşları (118) ise 16S rRNA primerlerini kullanarak yaptıkları çalışmalarında sırasıyla dental plak örneklerinde % 23.8 (n=21), % 28 (n=25) bakteri DNA'sını elde etmişlerdir. Umeda ve arkadaşları (161) gastrik yakınma ile başvuran hastalarda Nested PCR ve 16S rRNA saptayan primerle yaptıkları çalışmalarında, hastaların oral mukoza örneklerinin % 40'ında, herhangi bir gastrik yakınması olmayan 12 bireyin 2'sinde (% 16.6) *Helicobacter pylori* bakterisinin varlığını saptamışlardır. Çalışmamızda midede *Helicobacter pylori* varlığı endoskopik olarak tespit edilen 29 hastanın 13'ünde (% 44.8) dental plakta bakteri gözlenirken, 30 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunun (herhangi bir gastrik yakınması olmayan) sadece 2'sinde (% 6.6) dental plakta *H. pylori* saptanmıştır. Kontrol grubuna ait dental plak örneklerinde *Helicobacter pylori* varlığı ile ilgili bulgularımız yukarıda bildirilen çalışmayla uyum göstermezken, *Hp* (+) olan gruba ait sonuçlar uyum göstermiştir.

Song ve arkadaşlarının (149) ortalama 40 yaşında olan *Hp* (+) olan 42 hasta üzerinde EHC-U/EHC-L primerleri kullanarak Nested PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmalarında dental plak ve mide örneklerini değerlendirmişler ve *Hp* (+) olan hastaların dental plak örneklerinin % 97'sinde, tükürük örneklerinin ise % 55'inde *Helicobacter pylori* varlığını saptamışlardır. Bu çalışmanın bulguları, *Helicobacter pylori*'nin dental plakta daha yüksek oranda bulunması nedeniyle çalışmamızla uyum göstermemiştir.

Allaker ve arkadaşları (1) yaşları 5-16 olan 100 çocuk üzerinde yaptıkları çalışmalarında, endoskopi girişimi öncesi ağız (dental plak) ve feçes örneklerini, ayrıca endoskopi esnasında alınan mide biyopsi örneklerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, *Helicobacter pylori* çocukların % 22'sinin mide örneklerinde saptanırken, gastrik *Hp* (+) pozitif olan hastaların dental plağında ise %68 oranında bakterinin bulunduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada midesinde bakteri negatif olarak belirlenen bireylerin %24'ünde dental plakta *Helicobacter pylori* bakterisinin varlığı saptanmıştır. Bu çalışma, gastrik ve non-gastrik *Helicobacter pylori* prevalansının invaziv yöntemlerle değerlendirilmesi açısından çocuklarda yapılan diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir.

Çalışmamızda, araştırma grubunu oluşturan 105 bireyin 31 inde (% 29.5) patolojik değerlendirme sonucu midede *Helicobacter pylori* enfeksiyonu saptanmasına karşın, midesinde bakteri negatif saptanan 74 bireyden 9'unda (% 12.8) dental plakta *Hp* (+) olarak gözlemlendi (Tablo 13). Buna göre araştırma grubunda patolojik değerlendirme sonucunda midede *Hp* (+) çıkan bireylerin yüzdesi yukarıdaki çalışma ile uyum gösterirken (% 29.5), *Hp* (-) çıkan bireylerin dental plağında bakteri görülme oranı (%12.8) farklı bulunmuştur. Bunun nedeninin söz

edilen çalışmada kullanılan primerlerin farklılığından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada 105 bireyde yapılan inceleme sonunda; PCR ile bireylerin mide mukozası örneklerinde % 33.5 (35) oranında *Hp* (+) saptanırken patolojik incelemede bu oran % 29.5 (31) olarak belirlendi. Böylelikle Gastrik *Hp* (-) bulunan 4 bireyde PCR yöntemiyle mide mukozasında *Hp* (+) saptandı. Bu farklılık, PCR yönteminin DNA tespitine dayanmasına ve bu yöntemde canlı olmayan bakterilerin de saptanması nedeniyle olabilir. Ayrıca bu 4 bireyde *Helicobacter pylori* DNA'sının saptanması, ya önceden bu enfeksiyonun geçirildiğini ya da büyük olasılıkla bireylerin gelecekte enfeksiyonla karşılaşabileceğini gösteren bir bulgu olarak yorumlanabilir.

Bu çalışmada mideden yapılan endoskopik incelemede *Helicobacter pylori* varlığı saptanan hastaların dental plak örneklerinde % 44.8'inde (13/29) *Helicobacter pylori* pozitif saptanırken, yapılan eradikasyon tedavisi sonrasında dental plakta *Helicobacter pylori* oranının % 17.2'ye (5/29) düştüğü saptandı. Tedavi sonrasında dental plakta *H.pylori* ile ilgili saptanan bu azalma (% 27.6) anlamlı bulundu ($p < 0.05$). *Helicobacter pylori*, tedavi öncesi patolojik değerlendirme ile olguların tümünde saptanırken, tedavi sonrası üre nefes testi ile yapılan değerlendirme sonucunda %31 (9/29) oranında saptanmıştır. Tedavi sonrasında mide mukozasında (%69) *Helicobacter pylori* ile ilgili saptanan bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Yapılan tedavi sonucunda *Helicobacter pylori*'nin gerek mideden gerekse dental plaktan uzaklaştırılması sağlanırken, tümüyle ortadan kaldırılamadığı belirlendi. Eradikasyon terapisinden sonra bakterinin midede varlığını sürdürebildiğinin saptanması ve ayrıca dental plaktaki

azalmanın mideye oranla daha düşük bulunması nedeniyle dental plağın bir rezervuar olabileceği düşünülmektedir(Tablo 15).

Miyabayashi ve arkadaşlarının (112) Nested PCR yöntemi ve üreaz genine ait primerler kullanarak 47 yetişkin hastada yaptıkları bir çalışmada, oral flora, dental plak ve tükürükten alınan örneklerde % 48.9 oranında (23 hasta) *Helicobacter pylori* saptandığı bildirilmiştir. Bu hastalardan 18'inde dental plak ve 16 tükürük örneğinde *H. pylori* pozitif saptanırken, 11 hastanın hem dental plak hem de tükürük örnekleri üreaz geni için pozitif olarak belirlenmiştir. Uygulanan antibiyotik eradikasyon tedavisinin bitiminden 4 hafta sonra bakteri hastaların 11 inde dental plakta pozitif, 10'unda tükürükte pozitif, 5 inde ise her iki örnekte de pozitif saptanmıştır. Eradikasyon tedavisinden sonra 47 hastanın 34'ünün gastrik örneklerinde *Hp* (-) bulunurken, oral *Hp* (+) olan 23 hastanın sadece 12'sinde *H. pylori* (-) bulunmuştur.

Gebera ve arkadaşları (60) *H. pylori* enfeksiyonu saptanan 30 hastaya ait dental plak ve tükürük örneklerini sistemik antibiyotik tedavisinden üç ay sonra değerlendirdikleri çalışmalarında, *Helicobacter pylori*'nin mideden %90 oranında temizlendiğini buna karşın dental plakta bakterinin %60 oranında varlığını sürdürdüğünü tespit etmişlerdir.

Avcu ve arkadaşları (11) da sistemik eradikasyon tedavisinden bir ay sonra orta ve kötü ağız hijyenine sahip bireylere ait dental plak örneklerini CLO testi ile değerlendirdikleri çalışmalarında, bakterinin dental plakta sırasıyla % 90.2 ve % 100 oranında bulunduğunu saptamışlardır. Bu hastalara ait gastrik rekürrensi; orta ağız hijyenine sahip bireylerde %41.2, kötü ağız hijyenine sahip bireylerde ise % 58.3 olarak bildirmişlerdir.

Gürbüz ve arkadaşları (71) ise CLO testi kullanarak *Hp(+)* tanısı konan 75 dispeptik hastanın dental plak örneklerinde % 86.7 oranında *Helicobacter pylori*'nin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Eradikasyon tedavisinden sonra aynı test kullanılarak dental plak örnekleri değerlendirildiğinde bakterinin aynı oranda pozitifliğinin devam ettiğini saptamışlardır.

Suk ve arkadaşları (154) 65 yetişkin hastada PCR yöntemi ile *Helicobacter pylori*'nin üreaz genini tespit etmeye çalışmışlar ve bu hastaların % 58'inde (38/65) midede, % 43'ünde (28/65) ise dental plak örneklerinde *Hp (+)* olarak saptamışlardır. Eradikasyon tedavisinden bir ay sonra dental plak ve mide örneklerini değerlendirdiklerinde, hastaların % 84'ünün mide mukozasında, dental plak örneklerinde ise sadece % 7'sinde bakterinin *Hp (-)* olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar dental plağın, başarılı bir sistemik eradikasyon tedavisi sonrasında *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun rekürrensinden sorumlu olabileceğini savunmuşlardır.

Çalışmamızda *Helicobacter pylori* enfeksiyonuna sahip bireylerle, kontrol grubundaki sağlıklı bireylerin Silness&Løe plak indeksine göre yapılan değerlendirilmesinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Yapılan bazı çalışmalarda midede *Helicobacter pylori* varlığı ile oral hijyen arasında ilişki bulunduğu gösterilirken, diğer bazı çalışmalarda bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir; Avcu ve arkadaşları (11), gastrik problemi bulunan 108 yetişkin hastanın Oral Hijyen İndeksi(OHI) ne göre ağız hijyen durumlarını inceledikleri çalışmalarında, ağız hijyeni iyi olan bireylerde *Helicobacter pylori* rekürrensini azaldığını bildirmişlerdir. Bu nedenle oral hijyen ile *Helicobacter pylori* varlığı arasında ilişki bulunabileceğini rapor etmişlerdir. Gürbüz ve arkadaşları (71) ise düşük periodontal

ve plak indeksine sahip bireylerde *Helicobacter pylori* görülme oranının azaldığını saptamışlardır.

Çalışmamızda *H. pylori* bakterisinin araştırma grubunda gerek mide mukozası gerekse dental plakta görülme oranının, diğer bazı çalışmalar dan düşük bulunması araştırma grubundaki bireylerin oral hijyeninin çoğunlukla orta veya iyi olması ile (% 97.1) açıklanabilir.

Hardo ve arkadaşları (75) ise hem kültür hem de PCR yöntemiyle 62 yetişkin hastaya ait mide ve dental plak örneklerini inceledikleri çalışmalarında, mide örneklerinde histolojik olarak 34 hastada *Helicobacter pylori* varlığını saptadıklarını, dental plak örneklerinde ise *Helicobacter pylori*'nin kültür yöntemiyle hiç gösterilemediğini, PCR ile sadece bir hastada bakterinin varlığını saptadıklarını bildirmişlerdir. Sonuç olarak *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ile oral hijyen ya da periodontal hastalık açısından anlamlı bir ilişki bulamadıklarını rapor etmişlerdir.

Anand ve arkadaşları (6) patolojik değerlendirme, serolojik testler ya da hızlı üreaz testi sonucu *H. pylori* enfeksiyonu saptadıkları 65 hasta ile bu testler neticesinde bakteri varlığı saptanmayan 69 hastadan oluşturdukları kontrol grubunun oral hijyen durumlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, her iki grup arasında oral hijyen durumu açısından anlamlı bir farklılık saptanmadığını rapor etmişlerdir.

Özdemir ve arkadaşları (128) ise gastriti olan hastaların oral hijyen durumunu Ougley- Heine plak indeksine göre değerlendirdikleri çalışmalarında, plak indeksleri ve *H. pylori* enfeksiyonu arasında bir ilişki saptayamamışlardır. Aynı şekilde Berroteran ve arkadaşlarının (18) Silness& Loe plak indeksine göre oral hijyenleri değerlendirilen, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu bulunan hastalarda yaptıkları çalışmalarında bakteri varlığı ile plak skorları arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Çalışmamızda *Helicobacter pylori* varlığı tespit edilen olgularla; sağlıklı ve herhangi bir medikal yakınması olmayan bireylerden oluşan kontrol grubu arasında çürük indeksleri (dft, dfs, DMFT ve DMFS) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. Benzer şekilde Kolho ve arkadaşlarının (91) 21 *H. pylori* pozitif ve 27 *H.pylori* negatif olan 5-7 ve 8-12 yaşlardaki çocukların dental durumlarını (DMFT, DMFs, dft ve dfs) karşılaştırdıkları çalışmalarında, *Helicobacter pylori* ve diş çürüğü arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Çeşitli çalışmalarda tükürük örneklerinde *Streptococcus mutans*'la ilgili yapılan incelemelerde değişik besiyerlerinin kullanıldığı gözlenmektedir; Schaken ve arkadaşları (142) *Streptococcus sobrinus* üzerinde inhibitör etkisi nedeniyle TYCSB agarın; *Streptococcus mutans*'la ilgili incelemelerde MSB agara göre daha uygun bir besi yeri olduğunu rapor etmişlerdir. Buna karşın Dasanayake ve arkadaşları (43), MSB agar üzerinde GSTB agara oranla daha fazla sayıda koloni gözlendiğini bildirmişlerdir. Eltem ve Ertuğrul (56) ise 18 çocuktan aldıkları tükürük örneklerinden mutans streptokokların izolasyonunu Mitis Salivarius Sucrose Bacitracin Agar(MSBA), Triptase Yeast Extract-Cystine Agar(TYCA), Tripticase Yeast Extract-Cystine-Sucrose-Bacitracin Agar (TYCSBA) ve Tripticase Yeast Extract-Sucrose Agar (TSY20BA) seçici besi yerlerini kullanarak incelemişlerdir. Sonuç olarak MSBA'nın seçici özelliğinin çok yüksek olduğu; buna karşılık TYCA, TYCSA ve TSY20BA'da tükürük mikroflorasının diğer üyelerinin de değişen oranlarda büyüebildiğini saptamışlardır. Yukarıdaki çalışmaların ışığında tükürükte mutans streptokokların saptanması amacıyla çalışmamızda MSBA besiyeri tercih edildi.

Bu çalışmada mide örneklerinde *Hp* (+) veya (-)olan araştırma grubundaki (n=105) bireyler, tükürük örneklerindeki mutans sayılarına göre (cfu/ml)

değerlendirildiğinde, yüksek ya da orta çürük riskine sahip oldukları gözlemlendi. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu saptanan bireylerle, kontrol grubundaki sağlıklı bireyler mutans streptokok sayımları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamazken *H. pylori* enfeksiyonu saptanan bireylerin mutans sayılarının ortalamaları değerlendirildiğinde yüksek çürük riskine sahip olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda yer alan bireylerin mutans sayıları ortalamaları değerlendirildiğinde ise orta çürük riskine sahip oldukları belirlendi.

Buna göre *Helicobacter pylori* ile diş çürüğü veya çürük riski açısından kesin bir ilişki saptanamazken, enfeksiyona sahip çocukların mutans sayılarının yüksek olması ve medikal problemleri nedeniyle çürük görülme potansiyellerinin yüksek olması beklenebilir. *Helicobacter pylori* ile mutans streptokoklarla arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmaların bulunmaması nedeniyle bu konuda yeni çalışmalara gerek vardır.

Çalışmamızda mide yakınmaları ile başvuran bireylerin (n: 105) % 43.3' ünün günde bir veya iki kez diş fırçaladıkları ve % 66.7' sinin son bir yıl içinde dişhekimi ziyareti gerçekleştirdikleri gözlemlendi. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu saptanan gruptaki bireyler, sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu ile; diş fırçalama alışkanlıkları, dişhekimi ziyaretleri, anne sütü ile beslenme süreleri, karyojenik gıdaları tüketme sıklıkları açısından karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Ayrıca ebeveynlerinin eğitim düzeyleri, fırçalama alışkanlıkları, ağız diş sağlığı bilgileri arasında yine iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Nasrolahaei ve arkadaşları (114), benzer şekilde *H. pylori* enfeksiyonu saptadıkları 126 bireyle, herhangi bir gastrik şikâyeti olmayan 54 sağlıklı bireyi karşılaştırdıkları çalışmalarında, iki grup arasında diş fırçalama ve dişhekimi ziyareti açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık

saptayamamışlardır. Dore ve arkadaşları (49) *H. pylori*'nin serolojik testlere yaptıkları çalışmalarında, gerek kırsal kesimde yaşayan gerekse şehirde yaşayan çocukların anne sütü ile beslenmelerinin bakterinin seropozitifliğine etkisi olmadığı sonucuna varmışlardır. Bu araştırmacıların bulguları çalışmamızla uyum göstermiştir.

H.Pylori enfeksiyonlarında kronik karın ağrısının başlıca belirtisi olduğu bildirilmekle birlikte, bu veya başka semptomların bulunduğu hastalarda yapılan araştırmalarda, *Helicobacter pylori* bakterisi ile enfekte olmuş veya olmamış çocuklar arasında belirgin bir farklılık saptanamamıştır (1, 18). Benzer şekilde çalışmamızda, araştırma grubunda gastrointestinal semptomlarla *Helicobacter pylori* arasında bir ilişki bulunamadı. *HP* (+) hastaların % 37.1 inin mide yakınmaları dışındaki semptomlarla (beslenme bozuklukları, sindirim güçlükleri vb.), % 17.1 inin mide bulantısı, % 15.2 sinin karın ağrısı, % 14.3 ünün reflü, % 1.9 unun diyare, % 14.3 ünün kabızlık yakınmaları nedeniyle başvurduğu gözlemlendi (Grafik 1).

Allaker ve arkadaşları (1) 5-16 yaş arasındaki 100 çocuğun % 50'sinde tekrarlayan karın ağrıları saptamışlardır. Fakat abdominal semptomlarla *Helicobacter pylori* arasında kesin bir ilişki bulunamadığını bildirmişlerdir. Bode ve arkadaşları da (22), bakteriyel enfekte olan çocukların sağlıklı çocuklara oranla %13.4 daha az gastrointestinal semptomlara sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu saptanan bireylerin (n=30) 13 ünde Nested PCR yöntemiyle dental plak ve mide mukozası örneklerinde DNA bantlarının aynı olduğu tespit edilmiştir. Günümüzde, mide ve ağız boşluğundan elde edilen suşların aynı olduğunu kanıtlanması moleküler biyolojik tekniklerin geliştirilmesi nedeniyle mümkün olmaktadır. Ancak bulgularımızın sekans analizleri gibi ileri moleküler biyolojik tekniklerle desteklenmesinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Helicobacter pylori enfeksiyonu saptanan hastaların dental plak örneklerinde bakterinin gerek eradikasyon tedavisi öncesinde oldukça yüksek oranda (%44.8) gerekse eradikasyon tedavisinden sonra varlığının gözlenmesi (% 17.2) nedeniyle dental plağın bu bakteri için önemli bir rezervuar olabileceği görüşüne varıldı. Çalışmamızda *Streptococcus mutans* ile *H. pylori* arasında bir ilişki saptanamamasına rağmen, mide örneklerinde *Hp(+)* olan hastalarda tükürükteki *Streptococcus mutans* sayısının daha yüksek çıkması nedeniyle, bu hastaların çürük riski taşıyabilecekleri sonucuna varıldı.

Gastrik *H. pylori* enfeksiyonuna sahip bireylerde önemli bir rezervuar olabileceği düşünülen dental plağın diş fırçalama gibi mekanik ve gargara veya topikal vernik uygulamalar gibi ayrıca çeşitli kimyasal yöntemlerle uzaklaştırılmasının, diş çürüğünün önlenmesindeki olumlu etkileri yanında, *H. pylori* bakterisinin gerek geçişinin, gerekse tedavi sonrası re-enfeksiyonlarının önlenmesinde gerekli olduğu düşünülmektedir.

BÖLÜM V

SONUÇ

Çalışmamızda çocuklarda antral gastrit ve duodenal ülserlerin başlıca etkeni olan *Helicobacter pylori*'nin dental plakta varlığını saptayarak, oral kavitenin bakteri için rezervuar olup olmadığı ve sistemik eradikasyon sonrasında dental plakta görülme oranını incelemeyi amaçladığımız bu çalışmada aşağıdaki sonuçlara varıldı;

1. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu saptanan hastaların gerek eradikasyon öncesinde gerekse eradikasyon sonrasında dental plakta bakteri varlığının gözlenmesi nedeniyle dental plağın bu bakteri için önemli bir rezervuar olabileceği,
2. Eradikasyon tedavisi öncesinde dental plak ve mide mukozası örneklerinde saptanan *H. pylori* DNA bantlarının olguların % 44.8 inde aynı bulunması nedeni ile *H. pylori*'nin oral-oral geçişinin yanında gastrik- oral geçişin söz konusu olabileceği olabileceği ancak bu konuda yeni çalışmalara gerek olduğu,
3. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu saptanan hastalar ile kontrol grubunun karşılaştırılması sonucunda bireylerin plak indeksleri, oral hijyen alışkanlıkları, dental bulgular ve beslenme alışkanlıkları açısından anlamlı farklılıklarının olmadığı, buna rağmen eradikasyon tedavisinden sonra, re-enfeksiyonların engellenmesi için sistemik antibiyotik tedavisine ek olarak, dental plağın mekanik ve kimyasal eliminasyonunun gerekli olduğu,
4. *S. mutans* ile *Helicobacter pylori* varlığı arasında bir ilişki saptanmamasına karşın, *Helicobacter pylori* (+) hastalarda *S. mutans* sayımının daha yüksek çıkması nedeniyle çürük riski taşıyabilecekleri, bununla birlikte

Streptococcus mutans'la ilişkisini gösteren yeni çalışmaların gerekli olduğu düşünülmektedir.

BÖLÜM VI

ÖZET

Çalışmamızın amacı gastrik enfeksiyonların başlıca etkeni olduğu düşünülen *Helicobacter pylori*'nin (Hp) ağız florasının bakteri rezervuarlarından olan dental plakta da varlığının gösterilmesi, bakterinin sadece mideden eradikasyonunun yeterli olmadığını ve dental plaktan uzaklaştırılmasının önemini araştırarak ortaya koymaktır. Ayrıca Hp enfeksiyonu olan bireylerin, dental plak ve tükürüklerinde *Streptococcus mutans* varlığının incelenerek olası ilişkisi ve dental ve ağız hijyen bulgularının, kontrol grubuyla karşılaştırılarak bu hastaların çürük riski yönünden değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışmamıza yaşları 5-15 arasında değişen gastrik yakınmaları nedeniyle endoskopik değerlendirmeye alınan 105 hasta dahil edildi ve bireylerin dental plak, mide ve tükürük örnekleri toplanarak analizleri yapıldı. Ayrıca aynı yaş grubunda gastrik yakınmaları olmayan, sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda (n: 30) dental plakta Hp bakıldı ve tükürükte *Streptococcus mutans* sayımları yapıldı. Hp dental plak ve mide örneklerinde genomik DNA izolasyon kitleri ve Nested PCR yöntemiyle analiz edildi. Bireylerin 31'inde patolojik olarak midede *H.pylori* saptanırken, 74 hastada bakterinin varlığı gözlenmedi. Hp (+) bulunan bireylerin oluşturduğu test grubuna antibiyotik verilerek uygulanan eradikasyon tedavisinden altı ay sonra midede Hp varlığının kontrolü için üre-nefes testi uygulandı. Altı aylık kontrollerde dental plak ve tükürük örnekleri tekrar alınarak Hp ve *S. mutans* incelemeleri tekrarlandı.

Test grubunun dental plak örneklerinde, eradikasyon tedavisi öncesinde bakteri DNA'sı % 44.8 pozitif bulunurken, eradikasyon tedavisi sonrasında % 12.8 oranında gözlemlendi. Ayrıca dental plak ve mide mukozası örneklerinde saptanan *H.*

pylori DNA bantlarının, olguların % 44.8 inde aynı bulunması nedeni ile **dental plağın** bu bakteri için önemli bir rezervuar olabileceği sonucuna varıldı. Bunun yanında *Helicobacter pylori* enfeksiyonu saptanan hastalar ile kontrol grubunun karşılaştırılması sonucunda, bireylerin plak indeksleri, oral hijyen alışkanlıklarının anlamlı farklılıkları olmadığı saptandı.

Çalışmamızda *S. mutans* ile *Hp* varlığı arasında bir ilişki saptanmamasına karşın, *Helicobacter pylori* (+) hastalarda *Streptococcus mutans* sayımının daha yüksek çıkması nedeniyle çürük riski taşıyabilecekleri sonucuna varıldı. Bu bulgular ışığında *Hp* enfeksiyonuna sahip bireylerde önemli bir rezervuar olabileceği düşünülen dental plağın diş fırçalama gibi mekanik ve ayrıca kimyasal yöntemlerle uzaklaştırılmasının gastrik enfeksiyonların yayılımının ve re-enfeksiyonların önlenmesi için gerekli olduğu düşüncesine varıldı. Ayrıca *H. pylori*'nin oral kavitede diğer bakteriler ve özellikle *S. mutans* ile ilişkisini gösteren yeni çalışmaların gerekli olduğu sonucuna varıldı.

SUMMARY

The aim of this study was to demonstrate the presence of *H. pylori* (Hp) in dental plaque which has been proposed as a reservoir for gastric *H. pylori* and to show the inadequacy of the eradication of this bacteria only from gastric tissues. Moreover the presence of *H. pylori* and *Streptococcus mutans* found in dental plaque and saliva, the oral and dental hygiene findings were compared in the individuals with *H. pylori* with a control group of a healthy subjects.

105 subjects aged between 5-15 years with gastric complaints who had undergone endoscopic examination were included in the study and the saliva, dental plaque and gastric mucosa samples were obtained and analysed. The presence of *H. pylori* in the dental plaque and the salivary *Streptococcus mutans* counts were investigated in healthy subjects as well. *H. pylori* in dental plaque and gastric samples were analysed by genomic DNA isolation and Nested-PCR method. While *Helicobacter pylori* was determined pathologically in 31 gastric mucosa of individuals', bacteria was not observed was seen in 74 of subjects. In the test group who had given antibiotics for eradication of *H. pylori*, the presence of the bacteria was determined by urea-breath-test after six months. After six months follow-up period, the dental plaque and saliva samples were obtained again to evaluate the presence of *H. pylori* and *Streptococcus mutans*. After the eradication treatment, 44.8 % of the test group who were the DNA of the bacteria positive was reduced to 12.8 %. The determination of the same DNA lines both for the dental plaque and stomach in 44.8 % of the test subjects suggested that dental plaque could be an important reservoir for the *H. pylori*. No significant relationship was found between the control and test groups regarding their caries prevalence, plaque indices and oral hygiene habits.

In the present study, it could be concluded that, *H. pylori* (+) subjects with high counts *S. mutans* could be considered as a high caries risk group although no correlation was determined between the presence of *Streptococcus mutans* and *H. pylori*. In the light of these findings, it could be suggested that dental plaque which could be an important reservoir for *H. pylori* bacteria should be eliminated mechanically by tooth-brushing and chemical agents to prevent the transmission and re-infection of gastric infections. Further investigations are needed to demonstrate the relationship between *H. pylori* and oral flora especially *Streptococcus mutans*.

BÖLÜM VII

KAYNAKLAR

1. Allaker, R.P., Young, K. A., Hardie, J. M., Domizo, P., Meadows, J. (2002). Prevalance of *Helicobacter pylori* at Oral and Gastrointestinal Sites in Children: Evidence for Possible Oral-to- Oral Transmission, *J Med Microbiol*,51: 312-331.
2. Al- Hawarjiri, A. N., Keret, D., Sımhon, A., Zlotkın, A., Fishman, Y., Bercovier, H. et.al. (2004). *Helicobacter pylori* DNA in Dental Plaques, Gastroscopy and Dental Devices, *Dig Dis Sci*; 49: 7/8: 1091-1094.
3. Altınyıldız, M., Özdemir, M. *Helicobacter pylori* ve Tanısı.(2003). *Kocatepe Tıp Dergisi*; 2: 1-12.
4. Ahmady, K., Marsh, P.D., Newman, H.N., Bulman, J. S. (1993). Distribution Of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* at Subsites in Human Approximal Dental Plaque, *Caries Res*; 27: 135-139.
5. Alpöz, A. R., Schaeken, M. J., Eronat, C.(1996). Hollanda’da yaşayan 3-6 Yaş Grubu Çocuklarda Tükürükte Mutans Streptokokları ve Laktobasiller ile diş plağında mutans streptokok türlerinin dağılımı. *İÜ Dişhek Fak Derg*; 30: 99-104.
6. Anand, P.S., Nandakumar, K., Shenoy, K.T.(2006). Are Dental Plaque Poor Oral hygiene and Periodontal Disease Associated With *Helicobacter Pylori* Infection? *J Periodontol*; 77: 692-698.
7. Andersen, R.N., Ganeshkumar, N., Kolenbrander, P.E. (1998). *Helicobacter pylori* adheres selectively to *Fusobacterium* spp. *Oral Microbiol Immunol* 13: 51-54.

8. Ansai, T., Tahara, A., Ikedo, M., et al. (2000). Influence of colonization with mutans streptococci on caries risk in Japanese preschool children: 24 month survival analysis. *Pediatr Dent*; 22: 377-380.
9. Arda, M. (2000). Temel Mikrobiyoloji. *Medisan Yayın Serisi*; No:4, Ankara.
10. Ashorn, M. (1995). What are the specific features of *Helicobacter Pylori* gastritis in children? *Ann Med*; 27: 617-620.
11. Avcu, N., Avcu, F., Beyan, C., et al. (2001). The relationship between gastric-oral *Helicobacter pylori* and oral hygiene in patients with vitamin-B₁₂ deficiency anemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 92: 166-169.
12. Axon, A.T.R.(1995). Review article: Is *Helicobacter pylori* Transmitted by The Gastrooral Route? *Aliment Pharmacol Ther*; 9: 585-588.
13. Balakrishnann, M., Simmonds, R.S., Tagg, J.R. (2000). Dental caries is a Preventable Infectious Disease. *Aust Dent*; 45: 235-245.
14. Banatvala, N., Lopez, C.R., Owen, R.,et al. (1994). Use of the Polymerase Chain Reaction to Detect *Helicobacter pylori* in Dental plaque of Healthy and Symptomatic individuals. *Microb Ecol Health Dis*: 7: 1-8.
15. Banatvala, N., Lopez, C.R., Owen, R.,et al.(1993). *Helicobacter pylori* in Dental plaque. *Lancet*; 341: 380.
16. Becker, M.R., Paster, B.J., Leys, E. J. et al.(2002). Molecular Analysis Bacterial Species Associated with Childhood Caries. *J Clin Microbiol*; 40: 1001-1009.

17. Bernander, S., Dalen, J., Gastrin, B. et al. (1993). Absence of *Helicobacter pylori* positive in Dental plaques in *Helicobacter pylori* Dyspeptic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 12: 282-285.
18. Berroteran, A., Perrone M., Correnti, M., Cavazza, M.E. (2002). Dtection of *Helicobacter pylori* DNA in the Oral Cavity and Gastroduedonal System of a Venezuelan population. *J Med Microbiol*; 51: 764-770.
19. Bickley, J., Owen, R.J., Fraser, A.G., Pounder, R. E.(1993). Evaluation of the Polymerase Chain Reaction for Detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in Gastric Biopsy samples and Dental plaque. *J Med Microbiol*; 39: 338-334.
20. Birek, C., Grandhi, R., Mc Neill, K., Singer, D., Ficarra, G., Bowden, G. (1999). Detection of *Helicobacter pylori* in Oral Aphthous ulcers. *J Oral Pathol Med*; 28: 197-203.
21. Bode, G., Rottenbacher, D., Brenner, H., Adler, G.(1998). *Helicobacter pylori* and Abdominal symptoms: a population- based study among preschool children in sothern Germany. *Paediatrics*; 101: 634-637.
22. Bode, G., Mauch, F., Malfertheiner, P. (1993). The coccoid forms of *Helicobacter pylori* Criteria for their viability. *Epidemiol Infect*; 111: 483-490.
23. Bonamico, M., Mariani, P., Maglocca, F. M. et. al. (1997). *Helicobacter pylori* Duedonal Colonization in Children. *Acta Paediatr*; 86: 356-360.
24. Bowden, G. H. W. (1990). Microbiology of Root Surface Caries in Humans. *J Dent Res*; 69: 1205-1210.
25. Brathall, D.(1997). A *Streptococcus mutans* Safari! *J Dent Res*; 76: 332-336.

26. Bravos, E.D., Gilman, R. H.(2000). Accurate Diagnosis of *Helicobacter pylori*-Other Test. *Gastroenterology Clinics Of North America*; 29(4): 925-929.
27. Brooks, G.F., Janet, S.B., Stephen, A.M., Jawetz, M. (1995). Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 21. Baskin, Appleton & Lange, Connecticut; s: 242-243.
28. Butt, A.K., Khan, A.A, Suleman, B.A., Bedi, R. (2001). Randomized Clinical Trial of *Helicobacter pylori* from Dental Plaque. *Br J Surg*; 88: 206.
29. Butt, A.K., Khan, A.A., Bedi, R.(1999). *Helicobacter pylori* in dental plaque of Pakistanis. *J Int Acad Periodontol*; 78: 78-82.
30. Cammarota, G., Tursi, A., Montalto, M., Papa, A., Venato, G., Bernardi, S. et al. (1996). Role of Dental Plaque in The Transmission of *Helicobacter pylori* Infection. *J Clin Gastroenterol*; 22: 174-177.
31. Caufield, P. W., Walker, T. M.(1989). Genetic Diversity Within *Streptococcus mutans* Evident from Chromosomal DNA Restriction fragment Length Polymorphisms. *J Clin Microbiol*; 27: 274-278.
32. Celini, L., Allocati, N., Piatelli, A., Petrelli, I., Fanci, P., Dainelli, B. Microbiological Evidence Of *Helicobacter Pylori* from Dental Plaque in Dyspeptic Patients (1995). *New Microbiol*; 18: 187-192.
33. Celini, L., Allocati, N., Angelucci, D., Lezzi, T., Di Campli, E., Marzio, L. et.al.(1994). Coccoid *Helicobacter pylori* not Culturable in vitro reverts in mice. *Microbiol Immunol*; 38: 843-850.

34. Cengiz, A.T. Tıp ve Dişhekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (2004). *Güneş Kitapevi ltd, Ankara.*
35. Ceyhan, C. O. (2005). İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Klübü. *İstanbul Teknik Üniversitesi Dergisi; s: 4.*
36. Checci, L., Felice, P., Acciardi, C., Ricci, C., Gatta, L., Polacci, R., Holton, J. and other. (2000). Absence of *Helicobacter pylori* in Dental plaque assessed by Stool Test. *Am J Gastroenterol; 95(10): 3005-3006.*
37. Cheng, L.H., Webberly, M., Evans, M., Hanson, N., Brown, R. (1996). *Helicobacter pylori* in Dental Plaque and Gastric Mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; 81: 421-423.*
38. Chow, T. K., Lambert, J. R., Wahlqvist, M. L., Hsu- Hage, B. H.(1995). *Helicobacter pylori* in Melbourne Chinese Immigrants: Evidence for Oral-Oral Transmission Via Chopsticks. *J Gastroenterol Hepatol; 10: 562-569.*
39. Chung, J., Ha, E. S., Park, H. R., Kim, S. (2004). Isolation and Characterization of *Lactobacillus* Species Inhibiting The Formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Oral Microbiol Immunol; 19: 2164-2169*
40. Czesnikiewicz-Guzik M., Karczewska, E., Bielanski, W., et al. (2004). Association of the Presence the *Helicobacter pylori* in the oral cavity and in the Stomach (2004). *J Physiol and Pharmacol; 55(2): 105-111.*
41. Dale, J. W., Von Schantz, M. (2002). From Genes to Genomes, John Wiley& Sons ltd.
42. D'Alessandro A, Seri S. (1992). Comparison of Three Different Methods for Evaluation Of *Helicobacter pylori* in Human Dental Plaque. *Boll Soc Ital Biol Sper; 68: 769-773.*

43. Dasanayake, A.P., Caufield, P.W, Cutter, G. R. (1995): Differences in Detection and Enumeration of *Mutans Streptococci* Due to Differences in Methods. *Arch Oral Biol*; 40: 345-351.
44. de Soet, J.J., de Graaff, J. (1998). Microbiology of Carious Lesions. *Dent Update*; 25: 319-324.
45. de Soet, J. J., Toors, F. A., de Graaff, J. (1989). Acidogenesis by Oral Streptococci at Different pH values. *Caries Res*; 23: 14-17.
46. Debelian, G.J., Olsen, I., Tronstad, L. (1994). Systemic diseases caused by Oral Microorganisms. *Endod Dent Traumatol*; 10(2): 57-65.
47. Desai, H.G., Gill H. H., shankaran, K., Mehta, P.R., Praubnu, S. R. (1991). Dental Plaque: A Permanent Reservoir of *Helicobacter Pylori*? *Scand J Gastroenterol*; 26: 1205-1208.
48. Dore- Davin, C., heitz, M., Yang, H., Herranz, M., Blum, A.L., Corthesy-Theulaz, I. (1999). *Helicobacter pylori* in the Oral Cavity Reflects Handling of Contaminants But Not Gastric Infection. *Digestion*; 60: 196-202.
49. Dore, M.P., Malaty, H. M., Graham, D. Y., Fancillulli, G., Delitala, G et al. (2002). Risk Factors Associated With *Helicobacter pylori* Infection Among Children in a Defined Geographic Area. *Clin Infect Dis*; 35: 240-245.
50. Dowsett, S. A., Archilla, L., Segreto, V. A., Gonzalez, C.R., Silva, A. et al.(1999). *Helicobacter pylori* Infection in Indigenous Families of Central America: Serostatus and Oral Fingernail Carriage. *J Clin Microbiol*; 37: 2456- 2460.
51. Dowsett, S.A., Kowolik, M. J. (2003). Oral *Helicobacter pylori*: Can We Stomach It? *Crit Rev Oral Biol Med*; 14(3): 226-233.

52. Dunn, B. E., Cohen, H., Blaser, M. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*; 10(4): 720- 741.
53. Drumm, B., Perez- Perez, G. I., Blaser, M.J., Sherman, P. M. (1990). Intrafamilial Clustering of *Helicobacter Pylori* Infection. *The New England Journal of Medicine*; 322(6): 359-363.
54. Durmaz, R. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji; İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi.
55. El- Omar, E. M., Oien, K., El- Nujumi, A. (1997). *Helicobacter pylori* Infection and Chronic Gastric acid Hyposecretion. *Gastroenterolgy*, 113: 15-19.
56. Eltem,R., Ertuğrul, F. (2001). Mutans Streptokokların İzolasyonunda Kullanılan Çeşitli Seçici Besiyerlerinin Karşılaştırılması. *Turkish Journal of Infection*; 15(2): 199-203.
57. Erganiş, O., Öztürk, A. (2003). Oral Mikrobiyoloji& Immünoloji, Nobel Tıp Kitapevleri.
58. Ferguson, D. A., Li, C., Patel, N.R., Mayberry, W. R., Chi, D. S., Thomas, E. (1993). Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Microbiol*; 31: 2802-2804.
59. Fidan, I., Türet, S. (1999). *Helicobacter Pylori* Enfeksiyonunda Patogenez ve Tanı. *Enfeksiyon Dergisi*; 13: 455-460.
60. Gebera, E. C.E., Faria, C. M., Panutti, C., Chehter, L., Mayer, M. P. A., Lima, L. A. P. A. (2006). Persistence of *Helicobacter pylori* in the Oral Cavity After Systemic Eradication Therapy. *J Clin Periodontol*; 33: 329-333.

61. Gebera, E. C. E., Panutti, C., Faria, C. M., Checter, L., Mayer, M. P. A., Lima, L. A. P. A. (2004). Prevalance of *Helicobacter pylori* Detected by Polymerase Chain Reaction in the Oral Cavity of Periodontitis Patients. *Oral Microbiol Immunol*; 19: 277-280.
62. Gill, H.H., Shankaran, K., Desai, H. G.(1994). *Helicobacter pylori* in Dental Plaque of Children and Their Family Members. *J Assoc Physicians India*; 42: 719-721.
63. Graham, D. Y. (2000). Therapy of *Helicobacter pylori*: Current Status and Issues. *Gastroenterology*; 118: 2-5.
64. Graham, D. Y. (1997). Helicobacter Pylori Infection in the Pathogenesis of düodenal Ulcer and Gastric Cancer: A model. *Gastroenterology*; 113: 1983-1986.
65. Graham, D. Y. (1994). Benefits From Elimination Of *Helicobacter Pylori* Infection Include Major Reduction in the Incidence Of Peptic Ulcer Disease, Gastric cancer and Primary Gastric Lymphoma. *Prev Med*; 23: 712-716.
66. Gren, A.W., Flower, E. A., New, N. E.(1999). Mortality Associated with Odontogenic Infections. *Endod Dent Traumatol*; 15(3): 95-101.
67. Grönroos, L. (2000). Quantitave and Qualitative Characterization of Mutans *Streptococci* in Saliva and in Dentition, Universty of Helsinki, Dept. Of Pedodontics and Orthodontics, Helsinki. Academic Dissertation.
68. Grönroos, L., Allalussa, S. (2000). Site Spesific Oral Colonization of *Mutans Streptococci* Detected by Arbitrarily Primed PCR Fingerprinting. *Caries Res*; 34: 474-480.
69. Guo, J. H., Jia R., Fan, M. W., Bian, Z., Chen, Z., Peng, B. (2004). Construction and Immunogenic Characterization of a Fusion Anti-caries

- Vaccine Against Pac and Glucosyltransferase I of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*; 83: 266-270.
70. Gürakan, F., Kocak, N., Yüce, A. (1996). *Helicobacter pylori* serology in childhood. *Turk J Pediatr*; 38: 329-334.
 71. Gürbüz, A. K., Özel, A. M., Yazgan, Y., Çelik, M., Yıldırım, Ş. (2003). Oral Colonization of *Helicobacter pylori*: Risk Factors and Response to Eradication Therapy (2003). *Southern Medical Journal*; 96(3):244-247.
 72. Hamada, S., Slade, H. D. (1980). Biology, Immunology and Cariogenicity of *Streptococcus Mutans*. *Microbiol Rew*; 44: 331-384.
 73. Hammar, M., Tyszkiewicz, T., Wadstrom, T., O' Toole, P. W. (1992). Rapid Detection of *Helicobacter Pylori* in gastric Biopsy Material by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*; 30: 54-58.
 74. Hardie, J. M., Whiley, R. A. (1997). Classification and Overview Of the Genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Appl Microbiol Symposium Supplement*; 83: 1-11.
 75. Hardo, P. G., Tugnait, A., Hassan, F., Lynch, D. A. F., West, A. P. et al. (1995). *Helicobacter Pylori* infection and dental care. *Gut*; 37: 44-46.
 76. Hirasawa, M. and Takada, K. (2003). A New Selective Medium for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* and Their Serotypes in Dental Plaque. *Caries Res*; 37: 212-217.
 77. Honda, K., Ohkusa, T., Takashimizu, I., Watanabe, M., Amagasa, M. (2001). High Risk Of *Helicobacter Pylori* Infection in Young Japanese Dentists. *J Gastroenterol and Hepato*; 16: 862-865.
 78. Houben, M. H. G., Koops, H. W. S., Rauws, E.A.J. (1999). Efficacy of PPI-triple Therapy in *Helicobacter pylori* (HP) Positive Patients with Peptic

- Ulcer Versus Patients with Functional Dyspepsia [abstract].
Gastroenterology; 116: 190-195.
79. Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N. (1996). Direct Detection of *Streptococcus mutans* in Human Dental Plaque by Polymerase Chain Reaction. *Oral Microbiol Immunol*; 13: 382-386.
 80. Ishiara, K., Miura, T., Kimizuka, R., Ebihara, Y., Mizuno, Y., Okuda, K. (1997). Oral bacteria inhibit. *Helicobacter pylori* growth. *FEMS Microbiol Lett*; 152: 355-361.
 81. Jiang, C., Li, C., Ha, T., Ferguson, D. A., Chi, D.S., Laffan, J. J. et al. (1998). Identification of *Helicobacter pylori* in saliva by a Nested PCR assay derived from a newly cloned DNA probe. *Dig Dis Sci*; 43: 1211-1218.
 82. Jutras, E. M., Miller, R. M., Pepper, I. L. (1995). Optimization of Arbitrarily Primed PCR for the Identification of Bacterial Isolates. *J Microbiol Method*; 24: 55-63.
 83. Kato, K., Sato, T., Takahashi, N. Fukui, K., Yamamoto, K., Nakagaki, H. (2004). A method for Mapping the Disstrubution Pattern of Cariogenic Streptococci Within Dental Plaque *in vivo*. *Caries Res*; 38: 448-453.
 84. Khandaker, K., Palmer, K. R., Eastwood, M. A., Scott, A.C., Desai, M., Owen, R. J. (1993). DNA Fingerprints of *Helicobacter Pylori* From Mouth and Antrum of Patients with Chronic Ulcer Dyspepcia. *Lancet*; 342: 751.
 85. Kidd, E. A. M., Joyston- Bechal, S. (1998). Essentials of Dental Caries: The Disease and Its Management, 2. Ed., New York: Oxford University Press; s: 123-124.

86. Kignel, S., F de Almeida, P., Andre, E. A., Alves Mayer, M. P., Birman, E.G. Occurrence of *Helicobacter pylori* in Dental Plaque and Saliva of Dyspeptic Patients (2005). *Oral Diseases*; 11: 17-21.
87. Klein P.D. , Graham D.Y. , Gaillour A., Opekun A.R. , O’Brain Smith E.(1991).Water source as risk factor for Helicobacter pylori infection in Peruvian children. *Lancet*; 337: 1503–1506
88. Klimartin, C. M. (2002). Dental Implications of Helicobacter pylori. *J Can Dent Assoc*; 68(8): 489-493.
89. Klug, W.S., Cummings, M.R. (2002). Genetik kavramlar, Çev. Ed. Prof. Dr. Cihan Öner, Palme Yayıncılık, Ankara, s: 474–480.
90. Kocagöz, T. (1996). Polimeraz Zincirleme Tepkimesi, *Biyoteknoloji ve Moleküler Tıp Dergisi*
91. Kolho KL, Holtta P, Alaluusua S, Lindahl H, Savilahti E, Rautelin H.(2001).Dental Caries Is Common in Finnish Children Infected with *Helicobacter Pylori*. *Scand J Infect Dis*; 33(11): 815-817.
92. Krajden S, Fuksa M, Anderson J. J et. al (1989). Examination of Human Stomach Biopsies, Saliva and Dental Plaque for *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 27: 1397–1398.
93. Labenz, J., Malfertheiner, P. (1997). *Helicobacter pylori* in gastro-oesophageal reflux disease: causal agent, independent or protective factor? *Gut*; 41: 277-300.
94. Li C. , Ha T. , Ferguson D.A, Chi D.S, Zhao R., Patel N. R., et. al. (1996). A Newly developed PCR assay of *Helicobacter pylori* in Gastric Biopsy, Saliva and Feces. Evidence of High Prevalence of *Helicobacter Pylori* in Saliva Supports Oral Transmission. *Dig Dis Sci*; 41: 2142–2149.

95. Li C, Musich P.R. , Ha T. , Ferguson D. A, Patel N.R. , Chi D. S, et. al.(1995). High prevalence Of *Helicobacter pylori* in Saliva Demonstrated by A Novel PCR assay. *J Clin Pathol*; 48: 662–666.
96. Li,Y. , Caufield, P.W., Emanuelsson, E I.R, Thornqvist, E. (2001). Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* Via Genotypic and Phenotypic Profiles from Three Different Populations. *Oral Microbiol Immunol* 16: 16–23.
97. Lindquist, B., Emilson, C.G. (1991). Dental Location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Human Harboring Both Speices. *Caries Res*; 25: 146–152.
98. Lindquist, B., Emilson, C. G. (1990) Distrubution and Prevalance of Mutans Streptococci in the Human Dentition. *J Dent Res*; 69: 1160–1166.
99. Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiol Rev*; 50: 353–380.
100. Luman W. , Alkout A. M., Blackwell C.C. , Weir D.M. , Palmer K.R. (1996). Helicobacter pylori in the mouth- negative isolation from dental plaque and saliva. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 8: 11–14
101. Madinier I. M, Fosse T. M, Monteil R.A(1997). Oral Carriage of *Helicobacter Pylori*: A Review. *J Periodontol*; 68(1): 2–6.
102. Majmudar, P., Shah, S. M., Dhunjibhoy, K.R., Desai, H. G. (1990). Isolation of *Helicobacter Pylori* from dental plaques in healthy volunteers. *Indian J Gastroenterol*; 9: 271-272.
103. Majon, P. Oral Health and Respiratory Infection. (2002). *J Canadian Dent Assoc*; 68(6): 340-345

104. Mapstone, N. P., Lynch, D. A. F., Lewis, F. A. et al. (1993). Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomach of patients with gastritis using PCR. *J Clin Pathol*; 46: 540- 543.
105. Marchant, S., Brailsford, S. R., Tworney, A. C., Roberts, G. J., Beighton, D. (2001). The Predominant Microflora of Nursing Caries Lesions. *Caries Res*; 35: 397-406.
106. Marsh, P.D., Martin, M. V. Oral Microbiol-4. Ed., Bodmin, Cornwall: MPG Books Ltd. Rosan, B., Lamont, R.J. (2000). Dental Plaque Formation, *Microbes and Infection*, 2: 1599–1607.
107. Marsh, P.D. (1999). Microbiologic Aspects of Dental Plaque and Dental Caries, *Dental Clinics of North America* 43: 599–614.
108. Marshall B. J. *Helicobacter pylori* (1994). *Am J Gastroenterol*, 89 suppl, 116– 119.
109. Mattos-Graner, R.O., Li, Y., Caufield, P.W., et al. (2001). Genotypic Diversity Of Mutans Streptococci in Brazilian Nurse Children Suggests Horizontal Transmission. *J Clin Microbiol* 39: 2313–2316.
110. Megraud F(1995). Transmission of *Helicobacter pylori*: Faecal-oral versus Oral Route. *Aliment Pharmacol Ther* 9(Suppl): 85–91.
111. Meurman, J. K. Dental Infections and General Health (1997). *Quintessence Int*: 28 (12): 807-811.
112. Miyabayashi H, Furihata K, Shimizu T, Ueno I, Akamatsu T. (2000). Influence Of Oral *Helicobacter pylori* On The Success Of Eradication Therapy Against Gastric *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*; 5(1):30–37.

113. Nascimento, M.M. , Höfling, J.F., Gonçalves, R.B. (2004). *Streptococcus Mutans* Genotypes Isolated from Root and Coronal Caries. *Caries Res*; 38: 454–463.
114. Nasrolahei, M., Maleki, I., Emadiazad, O. (2003). *Helicobacter Pylori* Colonization in Dental plaque and Gastric Infection. *Romanian J Gastroenterol*; 12(4): 293-296.
115. Nakono, K., Matsumura, M., Kawaguchi, M. et al. (2002). Attenuation of Glucan- Binding Protein C Reduces the Cariogenicity of *Streptococcus mutans*: Analysis of strains isolated from Human Blood. *J Dent Res*; 81: 376-379.
116. Newburn, E. (1989). *Cariology* 3rd Edition, Quintessence Publishing Chicago.
117. Nguyen, A. H., Fouad, A. K. E, Graham, D. Y. (1995). *Helicobacter pylori* In The Oral Cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 76: 705-709.
118. Nguyen AH, Engstrand L, Genta RM, Graham DY, El-Zaatari FAK. (1993). Detection of *Helicobacter Pylori* in Dental Plaque by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 31: 783-787 .
119. Nolte, W. A. (1973). *Oral Microbiology*, The C. V. Mosby Company Saint Luis, Second edition, Çev. Prof. Dr. Özlem Anđ.
120. O'Connor HJ. Review article: *Helicobacter pylori* and gastro-oesophageal reflux disease-clinical implications and management.(1999). *Aliment Pharmacol Ther*; 13(2):117-127.

121. Oho, T., Yamashita, Y., Shimazaki, Y. (2000). Simple and Rapid Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Human Saliva by Polymerase Chain Reaction. *Oral Microbiol Immunol*; 15: 258-261
122. Okuda, K., Kimizuka, R., Katakura, A., Nakagawa, T., Ishiara, K. (2003). Ecological and immunopathological implications of oral bacteria in *Helicobacter pylori*-infected disease. *J Periodontol*; 74: 123-128.
123. Okuda, K., Ishiara, K., Miura, T., Katakura, A., Noma, H., Ebihiara, Y. (2000). *Helicobacter pylori* may have only a transient presence in the oral cavity and on the surface of oral cancer. *Microbiol Immunol*; 44: 385-388.
124. Ollila, P., Niemala, M., Uhari, M., Larmas, M. (1997). Risk Factors For Colonization of Salivary *Lactobacilli* and *Candida* in Children. *Acta Odontol Scand*; 55: 9-13.
125. Olsson, K., Wadstrom, T., Tyszkiewicz, T. (1993). *Helicobacter pylori* in Dental Plaque. *Lancet*; 341: 956-957.
126. Oshowo, A., Tunio, M., Gillam, D., Botha, A.J., Holton, J., Boulos, P. et al. (1998). Oral colonization is unlikely to play an important role in *Helicobacter pylori* infection. *Br J Surg*; 85(6): 850-852.
127. Özcan, G., Özmeriç, N., Teoman, İ., Akyön, Y., Dumlu, Ş. ve ark. (1997). Kontrollü Salınım Sağlayan Antimikrobiyal İlaç Veren Taşıyıcı Sistemle Bakteriyal Dental Plaktan *Helicobacter Pylori*'nin Eradikasyonu. Procter & Gamble Proje Ödüllü Araştırma.
128. Özdemir, A., Mas, M.R., Sahin, S., Sağlamkaya, U., Ateşkan, U. (2001). Detection of *Helicobacter pylori* colonization in dental plaques and tongue scrapings of patient with chronic gastritis. *Quintessence Int*; 32: 131-134.

129. Özütemiz, Ö., Turan, İ. (2005). Intestinal Flora. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*; 9(2): 127-144.
130. Pasters, B.J., Bartoszyzk, I.M., Dewhirst, F.E. (1998). Identification of Oral Streptococci Using PCR- Based, Reverse- Capture, Checkerboard Hybridization. *Methods In Cell Science*; 20: 223-231.
131. Petti, S., Pezzit, R., Cattaruzza, M.S., Osborn, J. F., D'Arca, A.S. (1997). Restoration-Related Salivary Streptococcus mutans Level: A Dental Caries Risk Factor?, *J Dent Res*, 25:257-262.
132. Pytko- Polonczyk, J., Konturek, S. J., Karczewska, E., Bielanski, W. et.al (1996). Oral A cavity is a Permanent Reservoir of Helicobacter Pylori and potential source of reinfection. *J Physiol Pharmacol* 47: 121–129.
133. Redmo Emanuelsson, I-M., Carlsson, P., Hamberg, K., and Bratthall, D. (2003). Tracing Genotypes of Mutans Streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol*; 18: 24-29.
134. Redmo Emanuelson, I-M., Thornqvist, E. (2000). Genotypes of Mutans Streptococci Tend to persist in their host several years. *Caries Res*; 34: 133-139.
135. Riggio MP, Lennon A.(1999). Identification by PCR of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of adult periodontitis patients. *J Med Microbiol*; 48: 317-322.
136. Rosan, B., Lamont, R.J. (2000). Dental Plaque Formation. *Adv Dent Res*; 14: 29-39.
137. Rudney, J.D.(2000). Dental Plaque Formation. *Adv Dent Res*; 14: 29–39.

138. Saarela, M., Hannula, J., Mattö, J., Asikainen, S., Allaluusua ,S. (1996). Typing of Mutans Streptococci by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. *Arch Oral Biol*; 41: 821-826.
139. Samaranayake, LP. (2002). Essential microbiology for Dentistry, 2nd Edition, Elseiver Ltd.
140. Sandıkçı M. Ü, Köksal F. (1996). *Helicobacter Pylori* Enfeksiyonları. Nobel Tıp Kitapevleri; İstanbul, s: 1005-1009.
141. Savoldi, E., Marionne, M.G., Negrini, R., Facchinetti, D., Lanzini, A., Sapelli, P.L. Absence of *Helicobacter pylori* In Dental Plaque Determined by Immunoperoxidase. *Helicobacter* 1998; 3(4): 283-287.
142. Schaeken, M. J. M. , van der Hoeven, J.S., Franken, H.C.M. (1986). Comparative Recovery of *Streptococcus mutans* on Five İsolation media, Including A new Simple Selective Medium, *J Dent Res*, 65:906-908.
143. Shimida T, Ogura K, Ota S, Terano A, Takahashi M, Hamada E, et. al. (1994). Identification of *Helicobacter pylori* in Gastric Specimens, Gastric Juice, Saliva, and Faeces of Japanese patients. *Lancet* 343: 1636–1637.
144. Shimida, T., Ogura, K., Ota, S., et al(1994). Detection of *Helicobacter pylori* in Gastric biopsies, Gastric juice, Saliva, and Feces by polymerase chain reaction (1994). *Gastroenterology*; 106: 178.
145. Silness, J., Löe, H. (1964). Periodontal Disease in Pregnancy .II. Correlaration between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand*; 22: 121-135.
146. Sisso, E.Ş., Hürmüzlü, F. (2005). Çürük Aktivite Testleri. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*; 8(2): 113-117.

147. Sissons, C.H. (1997). Artificial Dental Plaque Biofilm Model Systems. *Adv Dent Res; 11: 110-126.*
148. Song , Q., Haller, B., Ulrich, D., Wichelhaus, A., Adler, G., Bode, G. (2000). Quantitation of *Helicobacter pylori* in dental plaque samples by competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol; 53(3): 218-222.*
149. Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G. (2000). Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and detected with nested PCR. *J Med Microbiol; 49(4):349-353.*
150. Song Q., Spahr A, Roland M, Schmid M, Adler G, Bode G (2000). *Helicobacter pylori* in the Oral Cavity: High Prevalence and Great DNA Diversity. *Dig Dis Sci; 45 (11): 2162- 2167.*
151. Song Q, Haller B. Schmid RM, Adler G, Bode G. (1999). *Helicobacter pylori* in dental plaque ; a comparison of different PCR primer sets. *Dig Dis sci; 44(3): 479-484.*
152. Söğüt, A., Acun, C., Cavuldak, Ş., Komşu, Z (2004). Zonguldak İlinde 6ay-15 yaş grubu çocuklarda *Helicobacter pylori* seropozitifliği ve risk etmenlerinin incelenmesi. *Türk Pediatri Arşivi; 39: 152- 157.*
153. Sökücü, S., Suoğlu, A. D., Türkan, E., Elkabes, B., Özden, T. et al. (2002). *Helicobacter pylori* infection in Turkish children with gastrointestinal symptoms and evaluation of serology. *Turk J Pediatr ; 44: 102-108.*
154. Suk F.M., Chen Ş.H., Ho, Y.S, Pan, S., Lou, H.Y, Chang, C.C. et al. (2002). It is Difficult To Eradicate *Helicobacter pylori* from Dental Plaque by Triple Therapy. *Chinese Medical Journal; 65: 468-473.*
155. Şahin, F.I, Tınaz, A.C, Şimşek, I.S, Menevse, S., Görgül, A.(2001). Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric biopsy

- samples of Turkish patients by PCR-RFLP. *Acta Gastroenterol Belg*; 64: 150-152.
156. Tanner, A.C.R., Milgrom, P.M., Kent, R.Jr. et al. (2002). The Microbiota of Young Children Tooth and Tongue Samples, *J Dent Res*; 53-57.
157. Tanzer, J. M. (1989). On Changing the Cariogenic Chemistry of coronal Plaque. *J Dent Res*; 68: 1576-1578.
158. Tedjosasongko, U., Kozai, K. (2002). Initial Acquisition and Transmission of *Mutans Streptococci* in Children at Day Nursey . *J Dent Child*; 69: 284-288.
159. Temizkan, G., Arda, N.(1999). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitapevi.
160. Thomas, E., Jiang, C., Chi, D.S., Ferguson, D.A. Jr. (1997). The role of the oral cavity in *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*, 92(12): 2148-2154.
161. Umeda, M., Kobayashi, H., Takeuchi, Y. et al. (2003). High prevalance of *Helicobacter Pylori* detected by PCR in the oral cavities of Periodontitis patients. *J Periodontol*; 129-134.
162. Us, D., Haşçelik, G. (1998). Seroprevalance of *Helicobacter pylori* infection in an asymptomatic Turkish population. *J Infect*; 37: 148-150.
163. Ustaçelebi, Ş. (ed.): (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi/Ankara.
164. Ünsal B., Alaaddinoğlu E., Özcan G., Doğan B, Tuncer C.(2002). Supragingival Dental Plak ve Gastrik Mukozada *Helicobacter Pylori*'nin Tespiti, *GÜ Dişhek Fak Derg*; 19(3): 15-18.

165. Ünsal, B., Özcan, G., Türet, S., Çopur, E., Baloş, K.,(1995). Çocuklarda Supragingival Dental Plakta *Helicobacter pylori* Kolonizasyonu ile Serumdaki Özgül Antikor Oluşumu Arasındaki İlişki (1995). *A.Ü. Diş. Hek. Fak. Derg;* 22(3): 243-248.
166. Van Houte, J. (1994). Role of Microorganisms in Caries Etiology. *J Dent Res ;* 73: 672-681.
167. Van Houte, J., Sansore, C., Joshipura, K., Kent, R. (1991). Mutans Streptococci and Non-Mutans Streptococci acidogenic at Low pH and in vitro Acidogenic Potential of Dental plaque in Two Different Areas of the Human Dentition. *J Dent Res;* 70: 1503-1507.
168. Wahlfors, J., Meurman, J.H., Toskala, J., Korhonen, A., Alakuijala, P., Janatuinen, E. et al. (1995). Development of a rapid PCR method for identification of *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric biopsy specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis;* 14: 780-786.
169. Whiley, R. A., Beighton, D. (1998). Current Classification of the Oral Streptococci. *Oral Microbiol Immunol;*13: 195-216.
170. World Health Organization. (1997). Oral Healthy surveys basic methods. 4th ed. Geneva: World Health Organization

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılı Kütahya doğumluyum. İlköğrenimimi İzmir Yavuz Selim İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimimi Bornova Suphi Koyuncuoğlu Lisesi'nde tamamladım. 1992 yılında Ege Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesini kazanarak 1997 yılında aynı fakülteden mezun oldum. 2000 yılında Ege Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim dalının açmış olduğu doktora sınavını kazandım. 2002 yılında Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım. 10-14 Nisan 2004 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Adli Tıp Anabilim Dalı tarafından ilk kez düzenlenmiş olan Adli Diş hekimliği Kursu'na katıldım. 2004 yılında eşimle tanışarak evlendim.

Dt. Saniye Çiçek Yanar

EK I: OLGU RAPOR FORMU

Tarih:

Hasta Kodu:

Hasta Yaşı:

Protokol No:

1. Hangi nedenle E.Ü Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuruldu?

2. Şikayetler ne zamandan beri devam etmekte?

3. Çocuğun bilinen başka bir tıbbi rahatsızlığı var mı?

a) Evet b) Hayır

4. Çocuğun hergün kullanması gereken bir ilaç var mı?

a) Evet(.....) b) Hayır

5. Çocuğa daha önce herhangi bir medikal girişimde bulunuldu mu?

a) Evet b) Hayır

6. Çocuk dişlerini ne kadar sıklıkla fırçalıyor?

a) Günde 2 kez
b) Günde 1 kez
c) Düzensiz
d) Hiç

7. Çocuk daha önceden herhangi bir nedenle dişhekimine gitti mi?

a) Evet b) Hayır

Nedeni:

Uygulanan tedavi:

8. Çocuğun şekerli gıdaları tüketme sıklığı nedir?

a)Haftada birkaç kez
b)Günde 1-2 kez
c)Günde 3 kez ve daha fazla
d)Diğer

9. İçecek olarak daha sıklıkla tercihi:

- a) Su
- b) Meyve suyu
- c) Şekerli ay
- d) Kola
- e) Süt
- f) Diğer

10. Ebeveynlerin eğitim durumu:

Anne:

Baba:

11. Ebeveynlerin diş firalama alışkanlıkları:

- a) Günde 2 kez
- b) Günde 1 kez
- c) Düzensiz
- d) Hiç

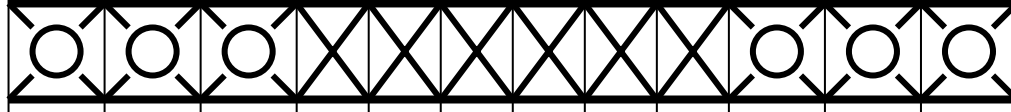
12. Çocuğunuzun diş firalamasına yardımcı oluyormusunuz?

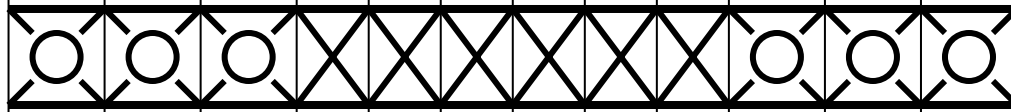
- a) Evet
- b) Hayır

13. Çocuğunuzun ağız-diş sağlığını korumak için neler yapıyorsunuz?

- a) Diş firalamasına yardım etme yada teşvik etme
- b) Düz enli dişhekimi kontrolü
- c) Şekerli gıdaları tüketme sıklığını azaltma
- d) Bu konuda yeterli bilgim yok.

DMFT/DMFS-dmft/dmfs indeks değerleri:

	55	54	53	52	51	61	62	63	64	65	
16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26
											

	85	84	83	82	81	71	72	73	74	75	
46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36
											

	Daimi	Süt
Çürük	D	d
Çekim	M	m
Dolgu	F	

Plak değeri:

H.pylori varlığı:

Başlangıç:

Kontrol:

Verilen Tedavi Şekli:

Tıbbi:

Dental Tedavi

St.Mutans varlığı:

Başlangıç:

Kontrol:

EK II

Araştırmanın adı: Çocuklarda Oral Helicobacter Pylori Varlığının Gastrik Helicobacter Pylori Eradikasyonunun Başarısına ve Diş Çürüğüne Etkisinin Araştırılması

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın Gönüllü/Veli

Helicobacter pylori mide rahatsızlıklarına neden olan bir bakteridir. Tedavi edilmediği takdirde ülserden mide kanserlerine kadar değişen çeşitli rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Bakteri mide mukozasına yerleştiği gibi ağızda diş yüzeyinde bulunan ve dental plak adı verilen kir tabakasına da yerleşebilir. Tedavi edilmezse ciddi sorunlara neden olan bu bakterinin dental plakta ve tükürükte belirlenmesi çocuğunuzun genel sağlığı için önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, E.Ü Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Gastroenteroloji A.D. da rahatsızlığı nedeniyle endoskopi kararı alınmış çocuğunuzdan bu işlem öncesinde dental plak ve tükürük örnekleri alınacaktır. Endoskopi esnasında teşhis amacıyla alınan materyalin bir kısmı da bu çalışmada kullanılacak ayrıca biyopsi alınmayacaktır. Alınan tükürük örneklerinde ağızda diş çürüklerine neden olduğu bilinen mutans streptokok bakterisi incelenecektir. Girişim sonrasında patoloji sonuçlarına göre midesinde bakteri tesbit edilmiş hastalar aldıkları tedaviden altı ay sonra kontrol için geldiklerinde çocuğunuzdan dental plak ve tükürük örnekleri tekrar alınacaktır. Bu incelemeler size yada sağlık güvencenizin karşılandığı kurumunuza herhangi bir mali yük getirmeyecektir.

Bu çalışmaya yaşları 5-15 arasında değişen ve toplam 100 hasta katılacak ve çocukların adları gizli tutulacaktır. Son iki ay içerisinde antibiyotik kullanmamış çocuklar çalışmada yer alacaktır. Çocuğunuz ve siz çalışmayı reddetme hakkına sahipsiniz. Çalışmayı reddetseniz bile çocuğunuzun muayene ve tedavi planlamaları tarafımızca yapılacaktır. Alınan dental plak ve doku örnekleri yalnızca bu çalışma dahilinde kullanılacak olup, hiçbir şekilde genetik amaçlı olarak bir başka çalışma için kullanılmayacak ve çalışma bitiminde tarafımızca imha edilecektir. Bu formun bir örneği sizde kalacaktır. İstedığınız takdirde bu araştırmadan ayrılma/vazgeçme hakkına sahip olup, reddetme/vazgeçme durumunda bile tıbbi ve dental bakımların gerçekleştirilmesi tarafımızdan garanti edilmektedir.

Çocuğunuz iki sene boyunca diş ve tıbbi muayeneleri için her altı ayda bir tarafımızca kontrol edilecektir. Bunun size ve çocuğunuza ve bağlı bulunduğunuz kuruma herhangi maddi veya manevi külfeti olmayacaktır. İnceleme ve tedaviyi yapacak olan araştırmacılar ve başvurabileceğiniz kişiler;

Dişhekimi Saniye Cicek Yanar, Dişhekimi Nesrin Eronat, Dr.Sema Aydoğdu

Tel: 388 64 31-2804, 343 43 43-4299

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren tek sayfadan oluşan metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün adı, imzası, adresi (Varsa telefon no, faks no)

Tarih:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin adı, imzası, adresi (Varsa telefon no, faks no)

Açıklamaları yapan araştırmacının adı, imzası

Tarih:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin adı, imzası, görevi: