

157627

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOWN SENDROMLU ÇOCUKLARDA ÇÜRÜK RİSKİNİN  
İMMUNOLOJİK, MİKROBİYOLOJİK VE MOLEKÜLER BİYOLOJİK  
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Pedodonti Programı

DOKTORA TEZİ

Dt. Dilşah MUNANOĞLU

Danışman öğretim üyesi: Prof.Dr.Ertuğrul SABAH

İZMİR-2004

## ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan ve bu konuda her türlü desteği veren doktora tez danışmanım Prof.Dr. Ertuğrul SABAH'a teşekkürü borç bilirim. Çalışmalarına katkılarından dolayı Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Nesrin ERONAT'a, Doç.Dr.A.Rıza ALPÖZ'e, Doç.Dr. Fahinur ERTUĞRUL'a ve Pedodonti Anabilim Dalı diğer Öğretim Üyeleri ile çalışma arkadaşlarıma, Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Genetik ve Teratoloji Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Ferda ÖZKINAY'a, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı İmmunoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Necil KÜTÜKCÜLER'e, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Ataç UZEL'e, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e, Mühendislik Fakültesi Bilgisayar Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Timur KÖSE'ye, Celal Bayar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Selim UZUNOĞLU'na, çalışmamın yapılması için maddi imkan sağlayan E.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu'na ve her konuda olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da bana destek olan sevgili eşime ve anne-babama şükranlarımı sunarım.

İzmir-2004

Dt.Dilşah MUNANOĞLU

## İÇİNDEKİLER

RESİMLER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLOLAR DİZİNİ.....	VIII
GRAFİKLER DİZİNİ.....	IX

### BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1-2
GENEL BİLGİLER.....	3-37
1.1. Kromozomlar.....	3
1.2. Down Sendromu.....	4
1.3. Diş Çürüğü.....	7
1. Diş Etkenler.....	8
1.1. Diyet.....	8
1.2. Zaman.....	9
2. Bireye ait faktörler.....	9
2.1. Diş yapısı.....	9
2.2. Tükürük.....	9
2.3. İmmunglobulinler.....	12
2.4. Plak.....	14
2.5. Mikroorganizmalar.....	14

### BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM.....	37-58
2.1. Anket Formlarının Doldurulması.....	37
2.2. İntraoral Muayene.....	38

2.3. Tükürük Örneklerinin Alınması.....	39
2.4. İmmunolojik Değerlendirme.....	40
2.5. Mikrobiyolojik Değerlendirme.....	41
2.6. <i>S.mutans</i> suşlarının genotipik farklılıklarının analizi.....	50
2.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	56
<b>BÖLÜM III</b>	
BULGULAR.....	58-80
<b>BÖLÜM IV</b>	
TARTIŞMA.....	81-87
<b>BÖLÜM V</b>	
SONUÇLAR.....	88-89
<b>BÖLÜM VI</b>	
ÖZET.....	90-91
ABSTRACT.....	92-93
<b>BÖLÜM VII</b>	
KAYNAKLAR.....	94-114
EK-1.....	115-116
ÖZGEÇMİŞ.....	117



## RESİMLER DİZİNİ

- 1.1. Sağlıklı bir bireye ait karyotip
- 1.2. Down Sendromlu bir bireye ait karyotip
- 1.3. Down Sendromlu bir çocuk hastanın görünümü
- 2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleştirildiği ısıl döngü cihazı
- 3.1. TYCSB agar besiyerinde üreyen *S. mutans* izolatları
- 3.2. MRS agar besiyerinde üreyen *Lactobacillus* izolatları
- 3.3. (a) *S. mutans*'in mannitol, sorbitol, melibiyoz, rafinoz ve inülin fermentasyonu sonucu oluşan görüntü  
(b) *S. mutans*'in dekstrin ve nişasta fermentasyonu sonucu oluşan görüntü
- 3.4. (a) *S. mutans*'in arjinin hidrolizi sonucu oluşan görüntü  
(b) *S. mutans*'in eskülin hidrolizi sonucu oluşan görüntü  
(c) *S. mutans*'in glikozdan aseton üretimi sonucu oluşan görüntü
- 3.5. (a) Katalaz testi sonucu oluşan görüntü  
(b) Basitrasin dirençliliği testi sonucu oluşan görüntü
- 3.6 - 3.15. OPA-13 primeri ile elde edilen jel resimleri
- 3.16 - 3.24. OPA-05 primeri ile elde edilen jel resimleri

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- 1.1. Çürük oluşumunda etkili faktörler
- 1.2. Polimeraz zincir reaksiyonunun işleyiş mekanizması



## TABLolar DİZİNİ

- 1.1.Oral streptokokların sınıflandırılması
- 1.2.Mutans streptokok grubunun özellikleri
- 1.3.Mutans streptokokların biyokimyasal özellikleri
- 2.1.DMFT/DMFS indeksleri
- 2.2.dft / dfs indeksleri
- 2.3.Silness ve Löe'nün plak indeksi değerleri
- 2.4.*S.mutans* ve *Lactobacillus*'ların gruplandırılması
- 3.1.7 yaş grubu çocuklara ait dental bulgular
- 3.2.8-10 yaş grubu çocuklara ait dental bulgular
- 3.3.11-12 yaş grubu çocuklara ait dental bulgular
- 3.4.Çocuklarda tükürük akım hızı, pH ve tamponlama kapasitesi değerleri
- 3.5.Çocuklarda sIgA, *S.mutans* ve *Lactobacillus* değerleri

## GRAFİKLER DİZİNİ

- 3.1. Annelerin eğitim düzeyleri
- 3.2. Çocukların karyojenik gıda alım sıklığı
- 3.3. Çocukların diş fırçalama alışkanlığı
- 3.4. Çocuklarda *S. mutans* grupları
- 3.5. Çocuklarda *Lactobacillus* grupları



## GİRİŞ VE AMAÇ

Down Sendromu, fazladan bir 21. kromozomun bulunması ile karakterize, mental retardasyon ile birlikte tipik yüz görünümü ve diğer anomalilerin de eşlik ettiği otozomal bir kromozom anomalisidir.

Literatürde, Down Sendromlu bireylerde, diş çürüğü ile ilgili birçok çalışmaya rastlanmıştır. Yapılan çalışmaların büyük bir kısmında, Down Sendromlu bireylerde, çürük görülme sıklığının, sağlıklı bireylere göre daha düşük oranda olduğu bildirilirken, iki grup arasında çürük görülme sıklığı açısından fark gözlenmeyen çalışmalar da bulunmaktadır.

Diş çürüğü, diş sert dokularının, mikroorganizmalar tarafından yıkımı ile ortaya çıkan patolojik olaylar zinciridir. Mutans streptokoklar, *Lactobacillus*'lar ve *Actinomyces* türleri, çürük oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Çürük oluşumunda, mikroorganizmaların yanı sıra, kişinin beslenme ve oral hijyen alışkanlıkları ile tükürüğe bağlı faktörlerin de etkili olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızın amacı; Down Sendromlu çocuk hastalarda, çürük görülme sıklığının sağlıklı çocuklarla karşılaştırmalı olarak incelenmesi ve çürüğe neden olan faktörlerin, immunolojik, mikrobiyolojik ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak değerlendirilmesidir.

Çalışmamıza, 7-12 yaş arası cinsiyet ayrımı yapılmaksızın 73 Down Sendromlu çocuk ile aynı yaş grubundan 70 sağlıklı çocuk dahil edildi. Çalışmamızın ilk bölümünde; annenin eğitim düzeyi, çocuklarda karyojenik gıda alım sıklığı ve fırçalama alışkanlıklarının kaydedildiği anket formları dolduruldu. Hastaların ağız içi muayeneleri

yapılarak, çürük ve plak indeksi değerleri kaydedildi. Stimüle tükürük örneklerinde, tükürük akım hızı, pH'sı, tamponlama kapasitesi, sekretuar immunglobulin A (sIgA) değeri ile *Streptococcus mutans* ve *Lactobacillus* değerleri incelendi.

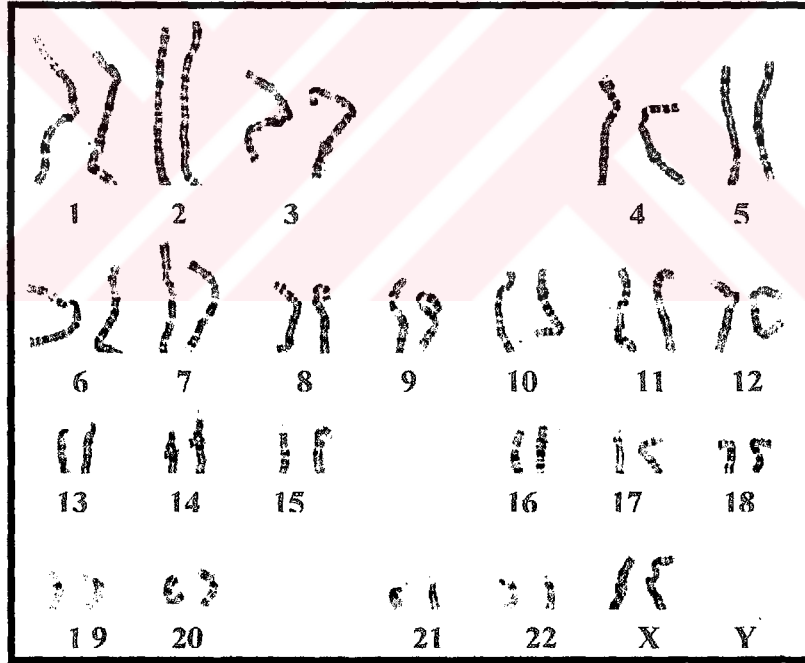
Çalışmamızın son bölümünde de, Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklardan elde edilen *S.mutans* izolatlarının, Arbitrarily-Primed Polimerase Chain Reaction (AP-PCR) ile genotipik polimorfizm profillerinin çıkartılarak, *S.mutans* suşlarının farklılık gösterip göstermedikleri araştırıldı.



# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. KROMOZOMLAR

Kromozomlar, DNA ve histon olarak adlandırılan bazik yapıdaki proteinlerin birleşiminden oluşmaktadır. Normal, sağlıklı yapıdaki bir insan hücresinde 46 kromozom bulunur. Kromozomlar, mikroskop altında hücre bölünmesinin metafaz evresinde incelenirler. Çeşitli bantlama yöntemleri ile boyandıktan ve fotoğrafları çekildikten sonra, büyüklük ve sentromerlerinin yerleşimine göre dizilmesine karyotip adı verilir (12). Resim-1.1’de sağlıklı bir bireye ait karyotip verilmiştir.

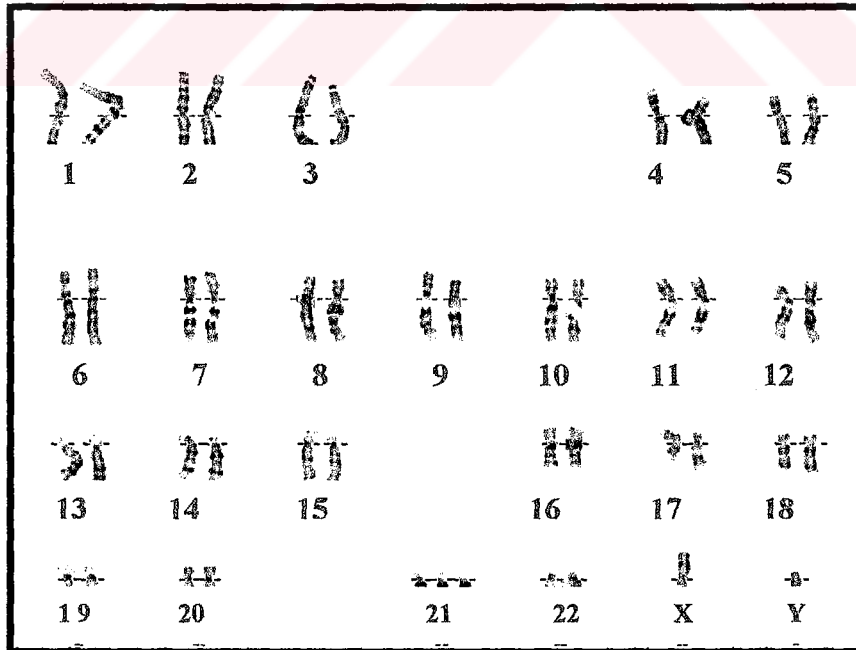


Resim-1.1. Sağlıklı bir bireye ait karyotip (46, XX)

Karyotipin yazımı sırasında önce kromozom sayısı, daha sonra cinsiyeti belirleyen kromozomlar ve son olarak, eğer varsa anomaliler belirtilir. Kromozom anomalileri, sayısal ve yapısal olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Down Sendromu, sayısal anomaliler içerisinde en sık rastlanılanıdır (12).

## 1.2. DOWN SENDROMU

Trizomi 21 olarak da tanımlanan Down Sendromu, normal sağlıklı insanların karyotiplerinde iki adet bulunan 21. kromozomun üç adet olmasıyla karakterizedir (50,134,138). Resim-1.2'de Down Sendromlu bireye ait karyotip verilmiştir. 1:600 ile 1:1000 sıklıkta canlı doğumu etkileyen, gelişme geriliği ve mental retardasyon ile karakterize konjenital bir anomalidir (138). Etiyolojisinde; annenin yaşı, hamilelik sırasında radyasyon, uyuşturucu ve alkol alımı gibi çeşitli faktörler bulunmaktadır. Anne yaşı ilerledikçe görülme sıklığı artar. 25 yaşındaki bir anne adayında, Down



Resim-1.2. Down Sendromlu bir bireye ait karyotip (47,XY,+21)



Sendromlu çocuk doğurma riski 1/1250 olarak bildirilirken, 40 yaşındaki bir anne adayında bu risk, 1/100'e çıkar (134,138,167).

Down Sendromu, ilk olarak 1838 yılında tanımlanmıştır (167). Seguin (164), 1846 yılında bu anomaliye eşlik eden bulguları ortaya koymuştur. John L.Down (64), 1866 yılında yazmış olduğu makalesinde Down Sendromlu bir olguyu bildirmiştir.

Klinik olarak benzer bulgular gösteren Down Sendromlu bireylerin %95'i serbest trizomi, %3'ü translokasyon ve %2'si de mozaik yapıdadır. Toplam kromozom sayısı, serbest trizomik olgularda 47, translokasyon tipi Down Sendromlu olgularda 46'dır. Translokasyon tipinde, fazla olan 21 numaralı kromozom, 13, 14, 15, 21 veya 22 numaralı bir başka kromozoma yapışık durumda olup, olgu, 47 kromozomluk genetik bilgi taşır. Translokasyon tipi Down Sendromlu olguların, yaklaşık %60'ında anne-baba karyotipleri normaldir ve bu olgularda, translokasyon, ilk olarak çocukta ortaya çıkar. Diğer olgularda, anne veya babadan birisinde dış görünüm normal olmasına rağmen, 45 kromozom bulunur ve bu kromozomlardan birisi 21. kromozoma yapışık durumdadır (12,167). Mozaik Down Sendromlu olgularda, postzigotik bölünme hatası sonucu gelişmekte olan embriyonun bir kısım hücreleri 46 kromozomlu, diğerleri de 47 kromozomludur. Birden fazla farklı genetik yapıdaki hücre dizilerinin aynı organizmada bulunması söz konusudur (167).

Down Sendromlu olguların başlıca klinik özellikleri; yukarı çekik palpebral aralık, irisin periferinde yuvarlak, küçük, gri-beyaz renkte noktalanmalar (Brushfield lekeleri), baş çevresinin küçük olması (mikrosefali), gözlerin birbirinden uzak olması (hipertelorizm), göz kapağının iç kısmında fazladan bir deri katlantısı (epikantus), burun kökünün basık olması, düz ve seyrek saçlar, kısa, geniş parmaklar, her iki elde de bulunabilen tek bir avuç içi çizgisi (simian çizgi), kıvrık beşinci parmak (klinodaktili)

ve hipotonidir (50,64,138,167). Resim-1.3'de Down Sendromlu bir çocuk hasta görülmektedir. Gelişim dönemindeki olgular, aşırı kilolu olma eğilimindedir. Olgularda boy kısalığı izlenir. Hastaların %40'ında konjenital kalp defektleri bulunur. %75 olguda gevşek ve hiperkeratotik cilt dokusu izlenir. Gastrointestinal anomaliler ile bazı kulak anomalileri ve işitme kayıpları da anomaliye eşlik edebilen diğer bulgular arasındadır (138,167). Tiroid bezi bozuklukları da gözlenebilir. Santral sinir sisteminde en önemli



**Resim-1.3.** Down Sendromlu bir çocuk hastanın görünümü

bulgu mental retardasyondur. Down Sendromlu bireylerde zeka katsayısı (IQ) değeri, sıklıkla 25-50 arasında değişmektedir (12,138).

Maksilla, mandibulaya oranla yetersiz gelişme gösterebilir. Buna bağlı olarak maksillada yer darlığı gözlenebilir. Çene yapısının küçük ve dil kaslarının hipotonik olması nedeniyle dil, ağız dışına sarkmış durumdadır. Dil, genellikle fissürlü yapıdadır. Akromegalinin izlendiği nadir olgularda gerçek büyük dil (makroglossi) izlenir. Damak yüksekliği, normale göre daha sığdır. Alt dudak hipotonik yapıda olabilir. Bifid uvula, dudak-damak yarığı, tonsillerin genişlemesi de bu duruma eşlik edebilir. Ağızdan solunum ve angular chelitis, diğer bulgular arasındadır. Ağızdan solunuma bağlı olarak kronik periodontitis ve solunum yolu enfeksiyonu izlenebilir (138,167). Down Sendromlu olguların %55'inde süt ve kalıcı dişlerde mikrodonti görülür. Mikrodontiye

bağlı olarak diastemalara rastlanılabilir. Klinik kuronlar, kısa ve konik yapıdadır. Gömük dişler de gözlenebilir. Olguların %50'sinde konjenital diş eksiklikleri görülür. Hastalarda, en sık, 3. molar, 2. premolar, kalıcı üst lateral kesici ve alt kesici dişlerin eksikliği ile hipodonti eğilimi bulunmaktadır (167). Olgularda taurodontizm sık görülür (6,104). Dişlerde hipoplazi ve hipokalsifikasyonlar izlenebilir. Hipoplastik defektlerin, uzun süreli ateşli hastalıklara bağlı olduğu ileri sürülmektedir (138). Kalp rahatsızlıkları nedeniyle, erken dönemde sık ve yanlış antibiyotik kullanımına bağlı olarak dişlerde tetrasiklin renklenmeleri gözlenebilir. Oklüzyonda Sınıf III'e eğilim vardır (138,167).

Down Sendromlu bireylerde diş çürüğü ve periodontal hastalık görülme sıklığı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Oral hijyenin yetersiz olmasına bağlı olarak periodontal hastalık gelişme olasılığının, Down Sendromlu bireylerde sağlıklı bireylere oranla daha fazla olduğu belirtilmiştir. Plak ve gingival indeks değerlerinin de sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (86,90,136,150,167). Diş çürüğü gelişiminin, oral hijyen yetersizliğine rağmen, sağlıklı bireylerden daha az olduğu öne sürülmektedir (50,135,173). Down Sendromlu bireylerde diş çürüğünün daha az görülme nedenleri arasında; çevresel faktörler, diyet ve oral hijyen alışkanlıkları, süt ve kalıcı dişlerde sürme gecikmesi, tükürük pH ve tamponlama kapasitesi değerlerinin yüksek olması, konjenital diş eksiklikleri, mikrodontiye bağlı olarak diastema varlığı ve dişlerde fissür yapısının sığ olması sayılabilir (56,135,167,173).

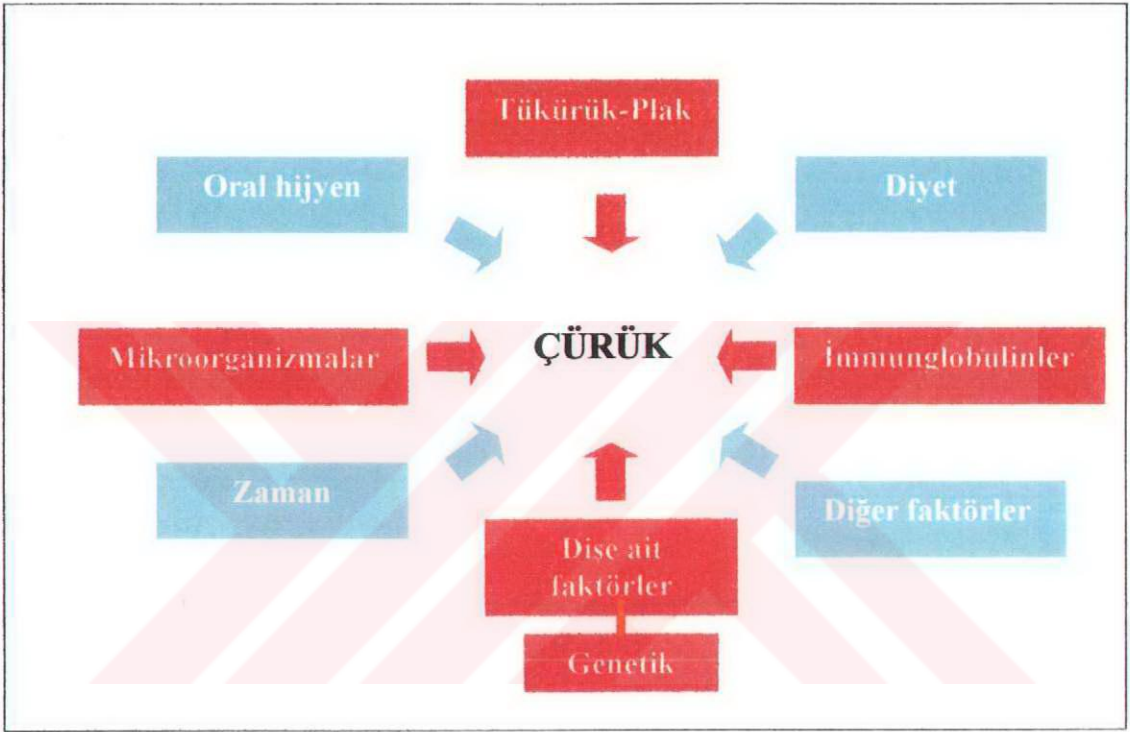
### **1.3. DİŞ ÇÜRÜĞÜ**

#### **A. Tanımı**

Diş çürüğü, diş yüzeyinde mikrobiyal aktivite ile başlayan, mine, dentin ve sement dokularının yıkımı ile karakterize olaylar zinciridir. Çürük oluşumunun, ortam

(diş, çürük), substrat (diyet) ve mikrofloradan oluşan üç ana faktörün etkisiyle belli bir zaman sürecinde meydana geldiği kabul edilmektedir (14). Çürük oluşumunda etkisi olan bu faktörler, Şekil.1-1’de şematize edilmiştir.

**Şekil.1-1:** Çürük oluşumunda etkili faktörler



## B. Etiyolojisi

### 1. Dış etkenler

#### 1.1. Diyet (Substrat)

Ağıza alınan besinler, plak florasındaki mikroorganizmalar için de besin kaynağı oluşturmaktadır. Diş çürüğü, besinlerin ağızdaki mikroorganizmalar tarafından fermente edilmesi sonucunda ortaya çıkan asitlerin etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Asit oluşturan

mikroorganizmalar, fermente edilebilir karbonhidratları ve özellikle sukrozu kullanarak karyojenik etki gösterirler (181).

## **1.2. Zaman**

Bireye ait uygun ortam, uygun substrat ve bu substratı fermente edebilen mikroorganizmaların varlığında, ortamda oluşan asidin, diş sert dokusunun yıkımına neden olduğu bilinmektedir. Diş çürüğünün oluşması için gerekli olan tüm bu faktörlerin, belli bir süre bir arada bulunması gerekmektedir (46,91,95)

## **2. Bireye ait faktörler**

### **2.1. Diş yapısı**

Çürük oluşumunda rol oynayan faktörlerden bir tanesi de dişlerdir. Dişin morfolojik yapısının, plak retansiyonuna elverişli, diş sert dokularının asitlere karşı dayanıksız olmasının ve diş dizisindeki düzensizliklerin çürük oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (46).

### **2.2. Tükürük**

Tükürük, ağız dokularını yıkayan ve ağız boşluğunun sağlıklı durumunun devamlılığı için temel olan, major ve minör tükürük bezleri tarafından salgılanan, insan vücudunun en önemli sekresyonlarından birisidir. %99-99,5'u su olan karışık tükürüğün geri kalan kısmı, proteinler, glikoproteinler, lipidler gibi büyük organik moleküllerden, glikoz ve üre gibi küçük organik moleküllerden ve fosfat, klor, kalsiyum, sodyum, potasyum, magnezyum gibi elektrolitlerden oluşmaktadır (62,96,106). Tükürüğün başlıca organik bileşenleri, tükürük enzimleri, mukoproteinler ve serum proteinleridir.



Az miktarda da karbonhidratlar, üre, amonyak, aminoasitler ve vitaminler bulunur. Tükürük içerisindeki lizozim ve laktoperoksidaz enzimleri, önemli antimikrobiyal maddelerdendir (27,96,102,162,178).

Tükürüğün normalde yoğunluğu, 1003 - 1009; vizkozitesi, 19-35; pH'sı da 6,7-7,1 arasındadır (55,62,96). Yapılan çalışmalar, ağızda normalde yaklaşık 1 ml tükürük olduğunu göstermiştir (52,96). Sağlıklı bir insanda günlük tükürük salgın miktarı 1-1,5 litredir (96).

### **2.2.1. Tükürük akım hızı**

Tükürüğün yapısına etki eden, en önemli faktörlerden birisi, tükürük akım hızıdır. Stimüle olmamış tükürüğün akım hızı, yetişkinlerde dakikada yaklaşık 0,3-0,4 ml, 5 yaş ve altındaki çocuklarda, dakikada 0,2 ml'dir. Stimüle edilmiş tükürüğün akım hızı ise yetişkinlerde 1,5-2 ml/dakikaya, çocuklarda ise 1 ml/dakikaya çıkar (72,96). Tükürük akım hızı, vücut fonksiyonlarına göre gün içerisinde değişiklik gösterir. Tükürük miktarı azaldığında, tükürüğün yıkayıcı ve koruyucu etkisi ortadan kalkacağı için, çürük oluşma hızının arttığı bildirilmiştir (25,58,106,109,120,128).

### **2.2.2. Tükürük pH'sı**

Çürüğe neden olan en önemli etkenlerden birisi de tükürük pH'sıdır. Tükürük pH'sının normal değeri 6,7-7,1 arasındadır (30,96). Glikoz veya monosakkaritler, ağızda bulunan mutans streptokoklar tarafından fermente edilerek tükürük pH'sını asidik hale getirir (60,153). Tükürük pH seviyesi ile çürük görülme sıklığı arasında negatif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (5,105).

### 2.2.3. Tükürük Tamponlama Kapasitesi

Tükürük içerdiği, bikarbonat, fosfat ve amfoterik proteinler sayesinde, tampon görevi görmektedir. Tükürükte bulunan tampon maddeler, ağız içerisindeki sert ve yumuşak dokuları, kimyasal etkilerle yaralanmalardan ve bakterilerin asit üretimi ile oluşturdukları zararlı etkilerden korumada yardımcı olur. Tükürüğün tamponlama kapasitesi, diş çürüklerinin önlenmesinde önemlidir (30,96,120,162).

Tükürükte bulunan bikarbonat, dental plağa difüze olarak mikroorganizmaların karbonhidrattan meydana getirdikleri asidi nötralize etme özelliğine sahiptir (11,65,96).

Tükürüğün, diş sert dokularının ve oral mukozanın bütünlüğünü korumak, çiğneme, yutma ve konuşmayı kolaylaştırmak, ağız boşluğundaki duyuşal, sindirimsel ve kimyasal olayların oluşmasına yardımcı olmak gibi fonksiyonları bulunmaktadır (29,96).

Tükürüğün yıkayıcı etkisi, tükürük miktarı, akım hızı ve tükürük yapısına göre farklılık gösterir. Tükürük, plaktaki mikroorganizmalar tarafından oluşturulan fermantasyon ürünü asitlerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlar. Ağız içi ve mikrobiyal plak pH'sını nötr duruma getirir (96,170).

Tükürüğün, patojen mikroorganizmalar üzerinde bakterisid etkisi olduğu kabul edilir (96).

Tükürüğün ağız-diş sağlığı açısından önemi birçok araştırma ile ortaya konmuştur (5,30,58).

Mandel ve Watman (128), tükürüğün çürük oluşumunu önlemedeki etkinliğinin;

1. Mekanik temizleme ile diş yüzeyinde bakteri birikimini önlemek,
2. Yüksek yoğunlukta kalsiyum-fosfor ve florür sağlayarak mine çözünürlülüğünü azaltmak,
3. Karbonhidrat-bikarbonat sistemi, fosfat ve amfoterik proteinler, üre ve  $\text{NH}_3$  ile plaktaki asidojen mikroorganizmaların oluşturduğu asitleri nötralize etmek,
4. İçerdiği IgA, lizozim, laktoferrin ve laktoperoksidaz ile antibakteriyel aktivite göstermek olduğunu ileri sürmüşlerdir.

### 2.3. İmmunglobulinler

Antikorlar, sıvısal immuniteden sorumlu temel moleküllerdir. Serum elektroforezinde, gamaglobulin fraksiyonunda bulunurlar ve immunglobulin (Ig) olarak isimlendirilir. İmmunglobulinler, insanlarda beş çeşit (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD) yapıdadır (34,63).

**IgM:** Genellikle primer immun cevapta sentezlenir. Pentamer yapıda olup, moleküler ağırlığı, 900.000 Dalton'dur. Bakteri ve virüslere karşı bağışıklıkta en etkili antikorudur. Kanda 5-6 günün sonunda parçalanır.

**IgG:** İnsanda dört alt tipi (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> ve IgG<sub>4</sub>) bulunur. Moleküler ağırlığı, 150.000 Dalton'dur. Plasentayı geçebilen tek antikor çeşididir. Kanda 23 gün aktif kalabilen en uzun ömürlü Ig türüdür. Parazitlere karşı sentezlenen bazı IgG'ler allerjide etkindir.

**IgA:** Mukozal antikorlar olarak bilinen IgA'lar dimerik yapıda aktiftir. Molekül ağırlığı, 400.000 Dalton'dur. Mukozalar altındaki lenfoid dokularda sentezlenir. Ağız, göz, trakea ve bağırsaklar gibi mukozal dokuların korunmasında etkili antikor çeşidini

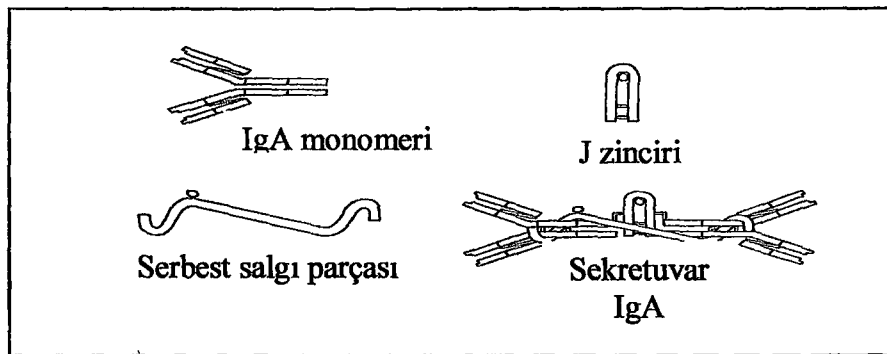


oluşturur. Tüm immunglobulinlerin 1/6'sını oluşturan IgA, insan tükürüğünde lizozimle birlikte bulunan bir polipeptiddir. Tükürükteki IgA salgısı, yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişiklik gösterir. Gençlerde, yaşlılara oranla, erkeklerde de kadınlara oranla daha düşük sekresyon görülür. Ağız boşluğunda uzun süre bozulmadan kalabilmektedir (63).

**IgE:** Anafilaktik tip allerjide etkili olan reajinik antikordur. Moleküler ağırlıkları, 190.000 Dalton'dur.

**IgD:** Antikor görevi kesin olarak bilinmemektedir. Virjin B lenfositlerinin yüzeyinde IgM'ler gibi reseptör görevi görür (68).

Tükürükteki Ig'ler, 4 mg/100ml'dir. Tükürükteki temel immunglobulin, sekretuar IgA (sIgA)'dır (119,133,154). Tükürükte bulunan sIgA, tükürük bezlerinin bağ dokusu plazma hücreleri tarafından yapılır. sIgA<sub>1</sub> ve sIgA<sub>2</sub> olmak üzere iki alt tipi bulunur. Yetişkinde dinlenme durumunda yaklaşık, 100-300 µg salgılanır. Proteolitik enzimlere direnç gösterir (68). Bakteriyel toksinlerin, enzimlerin ve virüslerin nötralizasyonunda etkilidir. sIgA ile kaplanan bakteri hücrelerinin dişler ve müköz membran yüzeylerine yapışma eğilimlerinin azaldığı düşünülmektedir (96). sIgA'nın yapısı şematik olarak Şekil-1.2'de görülmektedir.



Şekil-1.2. sIgA'nın yapısı

İmmunglobulinlerin, radyal immunodiffüzyon, radyal mmunoelektrodiffüzyon, radyoimmuno assey, ELISA (Enzim Linked Immuno Sorbent Assey), nefolometri yöntemleri gibi çeşitli yöntemlerle değerlendirmeleri yapılmaktadır. En sık kullanılan yöntem, radyal immunodiffüzyon yöntemidir (36,63,68).

Çürük oluşumu ve *S.mutans*'a ait antikorlar arasındaki ilişki araştırılmış ve çürük eğilimi düşük olan bireylerde, tükürükte immunglobulin seviyesinin yüksek olduğu belirtilmiştir (47,87,146,157). sIgA değeri ile diş çürüğü arasındaki ilişki tam olarak anlaşılammış olsa da, negatif bir ilişki olduğu düşünülmektedir (27,32,37,47,48,81,87,116). Hayvan çalışmaları, sIgA'nın çürük oluşumunu önleyici etkisi olduğunu göstermiştir (146). sIgA değerinin mutans streptokoklara karşı koruyucu etkisi tanımlanmıştır (73). DMFT değerleri yüksek olan bireylerde, sIgA değerlerinin anlamlı düzeyde düşük olduğu bildirilmiştir (47,116).

#### 2.4. Plak

Plak mikroflorası, özellikle karbonhidratlı yiyecekleri fermente ederek, ağız içerisinde asit üretimine katkıda bulunur. Plak pH'sı, kısa bir sürede çürük oluşumunu başlatacak bir seviyeye gelir. Tükürük ve plaktaki, kalsiyum, fosfat ve florun, mineyi, asitlerin çözücü etkisinden koruyamadıkları bu pH'a kritik pH adı verilir ve 5,5 olarak kabul edilir. Bu değer altında, dişin inorganik bileşenlerinde erime gözlenir (89).

#### 2.5. Mikroorganizmalar

Ağız ekolojisi, mikroorganizma, konakçı ve dişleri içine alan dengeli bir sistemdir (89). Bakteriler, ağızda, mukozal membranlara veya diş üzerindeki kazanılmış

mine pellicülüne yapışarak kolonize olurlar. Türlerin çoğu, optimal nötral pH'da ürerler. Diyet ile alınan karbonhidratların ağızdaki mikroorganizmalar ve enzimler yoluyla parçalanması sonucu açığa çıkan, ortamın pH'sını düşürür. Ağız boşluğu, çeşitli hastalıklara yol açabilen farklı mikroorganizmalar barındırır. Mikroorganizmanın bulunmadığı bir ortamda, diş çürüğünün oluşmayacağı bilinmektedir (10,14,17,46,89,129).

Çürük etiolojisinde mikroorganizmaların varlığı, aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- 1) Germfree hayvanlarda diş çürüğü oluşmaz,
- 2) Antibiyotikler, deney hayvanlarında çürük şiddeti ve insidansı üzerinde azaltıcı etkiye sahiptir,
- 3) Tamamen sürmemiş dişlerde çürük oluşumu gözlenmez,
- 4) Oral bakteriler, *in vitro* şartlarda da mine ve dentin dokularını demineralize ederek çürük benzeri lezyonlar oluşturur,
- 5) Mikroorganizmaların çürük mine ve dentin dokularına invaze oldukları histolojik olarak gösterilmiştir (46).

Mikrobiyolojik çalışmalar, çürük oluşumunda en önemli mikroorganizma gruplarının, mutans streptokoklar, *Lactobacillus*'lar ve bazı *Actinomyces* türleri olduğunu göstermiştir. Mutans streptokoklar, çürük başlangıcından, *Lactobacillus*'lar dentin çürüklerinden ve *Actinomyces*'ler de kök çürüğü lezyonlarından sorumlu tutulurlar (60,152). Mutans streptokoklar ve *Lactobacillus*'lar ile çürük prevalansı arasında pozitif bir ilişki varlığı bildirilmiştir (20,174,175).

Ağız florasındaki mikroorganizmaların özellikleri;

- 1) Yaşamlarını ve gelişimlerini diş yüzeylerinde sürdürürler,
- 2) Düşük pH'da şekerden asit üretirler,
- 3) Şekerden polisakkarit sentezi yaparlar (46).

### 2.5.1. *Lactobacillus*'lar

*Lactobacillus*'ların diş çürüğünün etiyojisinden sorumlu oldukları bilinmektedir. Gram (+), katalaz negatif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen çubuk şeklinde bakterilerdir. Ağızdaki *Lactobacillus* sayısı ile diş çürüğü arasındaki ilişki varlığı, ilk olarak 1920'li yıllarda rapor edilmiştir (41,95). Ağız ortamına açık, derin çürük lezyonlu dişlerin restorasyonundan sonra, tükürük *Lactobacillus* sayısında azalma tespit edilmiştir (95). İnsanlarda *Lactobacillus* türleri, tükürük, diş yüzeyleri, dil sırtı, vestibüler mukoza ve sert damaktan izole edilebilir. Glikozdan laktik asit ve asetik asit üretebilen türleri bulunur. Asidojenik mikroorganizmalardır. Diş yüzeylerine fazla afinite göstermezler. Çeşitli *Lactobacillus* türleri, diş çürüğünün ikinci önemli patojeni olarak düşünülür. Ağızda ve çürükte en sık rastlanan *Lactobacillus* türleri; *L. casei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. cellobiosus*, *L. buchneri* ve *L. brevis*'dir (8,95,143).

*Lactobacillus*'ların, özellikle dentin dokusunun yıkımında, çürüğün ileri evrelerinde etkili oldukları saptanmıştır (8,20,41,95).

Tükürük, plak ve diş çürüğü örneklerinden *Lactobacillus* izolasyonu için seçici besiyerleri olan Rogosa agar ve MRS agar kullanılmaktadır (2,59).

### 2.5.2. Oral *Actinomyces*'ler

Dental plak mikroflorasının önemli bir bölümünü oluştururlar. Özellikle aproksimal yüzeylerde ve dişeti oluğunda bulunurlar. Kök yüzeyi çürüğü ve gingivitis ile ilişkili oldukları belirtilmiştir. Koronal çürüklerin oluşumunda da rol oynadıkları düşünülmektedir. Gram (+), hareketsiz, filamentöz yapıdadırlar (60).

*Actinomyces*'ler, ağız içerisindeki bant ve braketlere yapışma özellikleri nedeni ile plak oluşumuna yardımcı olurlar. Buna bağlı olarak plak yapımında rol oynadıkları ve asit oluşturarak çürüğü başlattıkları bildirilmektedir. En sık rastlanan *Actinomyces* türleri; *A. israeli*, *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus* ve *A. arbovis*'dir. Çürük oluşumunda etkili olduğu bilinen türleri, *A. viscosus* ve *A. naeslundii*'dir (139).

### 2.5.3. Mutans streptokok grubu

Diş çürüğü, spesifik streptokokların neden olduğu enfeksiyöz bir hastalık olarak da tanımlanabilir. Diş çürüklerinin mikrobiyal etiyojisi, en çok mutans streptokokların metabolik aktivitesi ile ilişkilidir (20,89). Mutans streptokoklar, diş yüzeyi üzerinde sakkarozdan ürettikleri ekstrasellüler polisakkaritleri biriktirme ve yapıştırma kapasitesine sahip bakterilerdir. Asidojenik ve asidürik özelliktedir. 1986 yılında yapılan bir sınıflandırmaya göre; streptokoklar üç gruba ayrılmıştır; *Enterococcus*, *Lactococcus*, ve *Streptococcus* (92). Günümüzde geçerli olan sınıflandırmada *Enterokok*'lar, bu grubun dışında tutulmuştur. *Streptococcaceae* familyası *Streptococcus* ve *Lactococcus* cinslerini içerir (112).

Mikroorganizmaların, zorunlu aerobik ve zorunlu anaerobik olarak iki grupta toplanmasının doğru olmadığı öne sürülmektedir. Birçok organizmanın, bu iki uç arasındaki oksijen konsantrasyonlarında da yaşayabileceği bilinmektedir. Aerobik

organizmaların bir kısmı, fermentasyonla veya anaerobik solunum yolu ile hayatlarını sürdürebilir. Bu tür organizmalar, fakültatif anaerop olarak isimlendirilir. Mutans streptokoklar fakültatif anaerop bir metabolizmaya sahiptir. Oral kavite çeşitli bakterileri barındırmasına rağmen, dental çürüklerin mikrobiyal etiyojisi, öncelikle mutans streptokokların metabolik aktivitesi ile ilişkilidir (92,115).

Oral streptokokların sınıflandırılması, Tablo-1'de verilmiştir.

Viridans grup streptokoklar olarak da bilinen oral streptokoklar, özellikle oral kavite, gastro ve ürogenital yollardan izole edilen heterojen grup bakterilerdir. Bu bakterilerden, mutans grup üyeleri (*S.mutans* ve *S.sobrinus*), diş çürüğünden sorumlu tutulurken; özellikle anginosus (*S.anginosus*, *S.intermedius*, *S.constellatus*) ve mitis (*S.mitis*, *S.oralis*, *S.infantis*, *S.peroris*) grupları, karaciğer ve beyinde derine yerleşen apseler, infektif endokarditis ve septisemi gibi ekstraoral hastalıklara eşlik edebilir (38,125).

#### ***Streptococcus sanguinus:***

Diş yüzeyinde kolonize olan streptokok türlerinden en sık rastlanılanıdır. Sferik ve oval şekilli, 0,8-1,2 µm çapında, orta veya uzun zincirler oluşturur. Dişler üzerinde kolonize olabilir. Genellikle fissür çürüklerine neden olur. Sakkaroz içeren ortamda ekstrasellüler polisakkarit (EPS) oluşturan koloniler, sert, pürüzlü yüzeyli, kümeler halinde ve agara yapışık olarak bulunur (92). Kanlı agar üzerinde, genellikle α-hemoliz yaparak ürer. Hidrojen peroksit üretir, arjinin ve eskülini hidrolize eder. *S.sanguinus*, aerobik ortamda üreyebilir, çoğalabilmesi için karbonhidratlara ve aminoasitlere gereksinim duyar (91).

*S.sanguinus*, genelde dental plaktan ve daha az olarak da ağız içerisindeki diğer bölümlerden izole edilir (139).

**Tablo-1.1.** Oral streptokokların sınıflandırılması

Grup	Tür	Grup	Tür
<b>Mutans</b>		<b>Anginosus</b>	
<b>Grubu</b>	- <i>S.mutans</i>	<b>Grubu</b>	- <i>S.anginosus (S.millieri)</i>
	- <i>S.sobrinus</i>		- <i>S.contellatus</i>
	- <i>S.cricetus</i>		- <i>S.intermedius</i>
	- <i>S.rattus</i>		
	- <i>S.ferus</i>		
	- <i>S.macacae</i>		
	- <i>S.downei</i>		
<b>Salivarius</b>		<b>Sanguinus</b>	
<b>Grubu</b>	- <i>S.vestibularis</i>	<b>Grubu</b>	- <i>S.sanguinus</i>
	- <i>S.salivarius</i>		- <i>S.gordonii</i>
	- <i>S.infantarius</i>		- <i>S.parasanguinis</i>
	- <i>S.alactolyticus</i>		
	- <i>S.hyointestinalis</i>		
<b>Mitis</b>			
<b>Grubu</b>	- <i>S.oralis</i>		
	- <i>S.mitis</i>		
	- <i>S.infantis</i>		
	- <i>S.peroris</i>		
	- <i>S.cristatus</i>		

(83)

***Streptococcus salivarius:***

0,8-1,0 µm çapında, sferik ve ovoid şekilli hücrelerdir. Mitis-salivarius-basitrasin (MSB) agar besiyeri üzerinde, geniş kümeler oluşturan, mukoid koloniler



halinde grlr. Kanlı agarda hemoliz oluşturmaz. Sakkaroz içeren besiyerinde, suda çözünen bir fruktoz polimeri olan levan oluşturur. Dental plak, boēaz, nazofarinks, oral mukozada ve dil sırtında bulunur (92,130).

***Streptococcus vestibularis:***

Vestibüler mukozadan izole edilmektedir.  $\alpha$ -hemolitik streptokok grubu olarak tanımlanır. Sakkarozdan ekstrasellüler polisakkarit oluşturmaz. Laktozdan asit türetebilir. Mannitol, sorbitol, inülin ve rafinozu fermente etmez. Hidrojen peroksit ve treaz türetir (92,130).

***Streptococcus milleri:***

Çiftler veya zincirler halinde sferik ve ovoid Őekli hücrelerdir. Kanlı agar üzerinde hemoliz yapma özellikleri deēiřkendir. Saēlıklı bireylerde, diş yüzeylerinden, dişeti oluēundan, nazofarinksten, boēazdan, ayrıca vücudun deēiřik bölümlerinde oluşan apselerden izole edilir (92).

***Streptococcus mitis:***

MSB agarda yumuşak, dairesel, siyah-kahverengi koloniler oluşturabilen heterojen bir türdür. Sakkarozdan ekstrasellüler polisakkarit sentezlemez. Intrasellüler polisakkaritler oluşturabilir. Kanlı agarda  $\alpha$ -hemoliz yapar. Yapılan çalışmalarda, boēazdan, aēız bořluēundan ve kandan izole edildiēi belirtilmektedir (89,92).

Karbonhidrat antijenleri esas alındıēında, mutans streptokoklar, 8 serotipe (a-h) ayrılır. Dental plakta bulunan başlıca mutans streptokok serotipleri, c/e/f (*S. mutans*) ile d/g (*S.sobrinus*) olmak üzere iki alt grupta toplanır. Serotip a (*S. cricetus*) ve serotip b



(*S. rattus*), genellikle sıçanlardan izole edilirken; serotip h (*S.downei*), maymunların dental plağından izole edilebilir (74,83,91,123). *S.mutans* serotipleri içerisinde serotip c, en sık izole edilen tipidir (95). Mutans streptokok grubunun özellikleri Tablo-2'de verilmiştir.

**Tablo-1.2.** Mutans streptokok grubunun özellikleri

	Serotip	Nükleik asit-baz içeriği (mol %)	Hücre duvarında bulunan polisakkaritler
<i>S.mutans</i>	c,e,f	36-38	Rha,Glc
<i>S.sobrinus</i>	d,g	44-46	Rha, Glc, Gal
<i>S.cricetus</i>	a	42-44	Rha, Glc, Gal
<i>S.rattus</i>	b	41-43	Rha, Gal, Gro
<i>S.macacae</i>	c	35-36	T
<i>S.downei</i>	h	41-42	T
<i>S.ferus</i>	c	43-45	Rha, Glc

Rha: ramnoz; Glc: Glikoz; Gal: Galaktoz; Gro: Gliserol; T: Tanımlanamamış

(92)

***Streptococcus cricetus* (serotip a):** 0,5 µm çapında, zincirler veya çiftler halinde bulunur. Sakkaroz içeren agarda, 1 mm çaplı, pürüzlü yüzeyli kümeler, kanlı agarda 2-3 mm çapında, düzgün yüzeyli yuvarlak koloniler oluşturur. Fakültatif anaeroptur. İnsanlardan nadir olarak izole edilir (92,130).

***Streptococcus rattus* (serotip b):** 0,5 µm çapında, zincirler veya çiftler halinde bulunur. Gram (+) özelliktedir. Arjinin ve eskülini hidrolize eder. Hidrojen peroksit üretmezler. Sakkarozdan ekstrasellüler glukon sentezlerler (92).

***Streptococcus ferus* (serotip c):** 0,5µm çapında, çiftler ve zincirler oluşturan Gram (+) koklardır. Sakkarozdan ekstrasellüler ve intrasellüler polisakkarit üretirler. İnsandan izole edilmez (92,130).

***Streptococcus macacae* (serotip c):** İnsan orijinli değildir. Mannitol, rafinoz ve sorbitol fermentasyonu yaparlar ve eskülini hidrolize eder (92).

***Streptococcus sobrinus* (serotip d,g):** 0,5 µm çapında, çiftler ve uzun zincirler halinde bulunan, Gram (+) koklardır. Sakkaroz içeren agarda 1 mm çapında, pürüzlü yüzeyli, kümeler halinde bulunur. Bazı türleri kanlı agarda α-hemolitikdir. Çürük üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (92,94,130,168).

***Streptococcus downei* ( serotip h):** İnsandan izole edilemez (92).

***Streptococcus mutans* (serotip c,e,f):**

*S. mutans*, 1924 yılında çürük dişlerden J. Kilian Clarke (49) tarafından izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Derin dentin çürüklerinde küçük zincirler oluşturan coccobasillere rastlanmış ve bunların mutasyona uğramış streptokoklar olduğu düşünülerek *S.mutans* adı verilmiştir (49,92).

Hücreler, genel olarak, sferik veya ovoid şekilli, 2 µm çapından daha küçük (0,5-0,75µm), çiftler veya kısa ve orta uzunlukta zincirler halinde bulunur. Kapsülsüzdür. Koloniler hareketsiz, katalaz (-) ve Gram (+)'dir. Kanlı agar üzerinde anaerobik şartlarda 48 saatte beyaz veya gri renkte koloniler oluşturur (91,92,124,126,130).

Tükürük ve dental plaktan en yaygın izole edilebilen mikroorganizma olan *S.mutans*'ın, diş çürüğünün başlangıç ve ilerleme aşamasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir (21,42,132).

Oral streptokoklar üremek için, amino asitlere, peptidlere ve proteinlere, karbohidrat kaynağına, yağ asitlerine, vitaminlere, purin ve pirimidinlere, inorganik iyonlara ihtiyaç duyarlar. İnkübasyonun, % 5 CO<sub>2</sub> içeren bir ortamda yapılması uygundur (91). Mutans streptokoklar ve *S. mutans* ile ilgili çalışmalarda, anaerobik ortamı sağlamak için jarlar ve kitler, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> (% 10, % 10, % 85) karışımı gazlar veya % 95 N<sub>2</sub> + % 5 CO<sub>2</sub> kullanılmasının gerekli olduğu bildirilmiştir (38,91,92).

Kan agarında, iki günlük anaerobik inkübasyonda koloniler beyaz veya gri renkte, 0,5-1,0 mm çapında, bazen oldukça sert ve besiyeri üzerinde yapışık durumdadır. Genellikle α veya non-hemolitik, fakat β-hemolitik suşları da bulunmaktadır. Katı ortamda gözlenen morfolojileri, pürüzlü, düzgün yüzeyle ve mukoid özellikte kolonilerdir. Asidik veya katı ortamlarda 1,5-3 µm uzunluğunda çubuklar oluşturur. İdeal üreme sıcaklığı 37°C'dir (61,78,88,92,130,153).

*S. mutans* için en sık kullanılan iki seçici besiyeri de sakkaroz içerir. Bir kısım türlerin bu substratı kullanarak ekstrasellüler polisakkarit üretmeleri karakteristik koloniler oluşturur. Bu iki besiyeri, Triptikaz-Maya Özütü-Sistin Agar + % 5 sakkaroz (TYC) ve Mitis Salivarius Agar (MS)'dir (161). Bunun yanında, TYCSB agar; TYC

(Triptikaz-maya özütü-sistin) agar, sakkaroz (% 15-20) ve basitrasin (0,2 U/ml) içerir. *S.mutans*, TYCSB agarda karakteristik koloniler oluşturur. Koloniler; pürüzlü, kümelenmiş, düzensiz, buzlu cam görünümündedir. Beyaz, gri veya sarı renkte olup 0,5-2 mm çapındadır. Koloni üzerinde bir sıvı damlası (suda çözünür glukan) ve çevresinde yoğun kıvamda polisakkarit üretir (182). *S.mutans*, MSB agarda, küçük, düzensiz sınırlı, opak, buzlu cam görünümünde, kabarık, koloniler oluşturur (80). Kullanılan diğer bir besiyeri; GSTB agar; Glikoz-sakkaroz agar, potasyum tellürit ve basitrasin (177), TSY20B agar, triptikaz soy agar, maya özütü, sakkaroz ve basitrasin (163), MSKB agar ise, Mitis-salivarius agar, sorbitol, kanamisin ve basitrasin içerir (110). Eltem ve Ertuğrul (66), yaptıkları çalışmada 18 gönüllü çocuktan aldıkları tükürük örneklerindeki *S. mutans* ve *S. sobrinus* düzeylerini dört farklı seçici besiyerinde (MSB agar, TYC agar, TYCSB agar ve TS20B agar) incelemişlerdir. Araştırma sonucunda MSBA'nın seçici özelliğinin çok daha fazla olduğunu buna karşılık TYC agar, TYCSB agar ve TS20B agarda tükürük mikroflorasının diğer üyelerinin de değişen oranlarda üreyebildiğini gözlemişlerdir. Bunun yanında Alpoz ve ark. (7), TYCSB ve TSY20B agarın TYC agara göre daha seçici olduğu bildirilmiştir.

*S.mutans*'ın ağızda ilk olarak yerleşmesi, dişlerin sürmesi ile retansiyon bölgelerinin oluşmasına bağlıdır. Aktif çürüklü bireylerin tükürük ve dental plak örneklerinden çok sayıda izole edilmektedir. Tükürük, tüm mikroorganizmalarla reaksiyona girebilen glikoproteinler, immunglobulinler, laktoperoksidaz, lizozim ve laktoferrin gibi antibakteriyel sistemleri içermektedir. Bu bileşenler arasındaki etkileşim, bakteriyel yapışmada ve bakteriyel bağlanmanın inhibisyonunda etkilidir (33,149). Epidemiyolojik çalışmalar, çocuklar ve genç erişkinlerde mine çürüğünde;

yaşlılarda kök çürüklerinde; bebeklerde biberon çürüklerinde en önemli etkenin *S.mutans* olduğunu göstermektedir (44).

Mutans streptokoklar, izolasyon sonrası elde edilen kolonilerin fenotipik karakterlerinin tespit edilmesine yönelik testlerin yapılması ile tanımlanır (92).

Mutans streptokokların biyokimyasal özellikleri, Tablo-1.3'de verilmiştir.

Son yıllarda, oral mikrobiyoloji alanında yapılan çalışmalar ile *S.mutans*'ın genotipik özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Kromozom yapısındaki Guanin + Sitozin (G + C) içeriği ve DNA hibridizasyon çalışmaları, *S. mutans* türleri arasında belirgin farklılıklar olduğunu göstermiştir (26,92,118).

*S.mutans*'ın klasik yöntemlerle identifikasyonunun yanında, son yıllarda bu bakterinin bulunması ve tanımlanmasında DNA probları da kullanılmaktadır. *S.mutans* yüzey proteinleri ve hücre çeperi bileşenleri genleri olan, *SpaP* ve *wapA* veya glukoziltransferaz, fruktoziltransferaz ve dekstranaz enzimleri genleri olan *gtfB*, *fff* veya *dex* genleri, PCR çalışmalarında prob olarak kullanılarak hedef seçilmektedir (4,97,107,137).



Özellik	<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>	<i>S.cricetus</i>	<i>S.rattus</i>	<i>S.macacae</i>	<i>S.downei</i>	<i>S.ferus</i>
Asit üretimi							
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	▲	+	+	+	+	+
Melibiyoz	+	▲	+	+	-	-	-
Rafinoz	+	▲	+	+	+	-	-
İnülin	+	-	+	+	-	+	+
Dekstrin	-	-	-	-	-	S	+
Nişasta	-	-	-	-	-	-	+
Hidroлиз							
Arjinin	-	-	-	+	-	-	-
Eskülin	+	▲	▲	+	+	-	+
Voges-Proskauer Testi	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Üretimi	-	+	-	-	-	-	-
Basitrasin	+	+	-	+	-	-	-
Dirençliliği							

(+) %90 ya da üstü pozitif (-) %90 ya da üstü negatif (▲) %11-89 pozitif (S) Saptanmamış

### ***S. mutans* Tiplendirme Yöntemleri**

*S. mutans* izolatlarının tiplendirilmesi, epidemiyolojik çalışmalarda, bakterilerin geçiş yollarının saptanmasında, hastalıkların spesifik bakteri türleriyle olan ilişkilerinin belirlenmesinde ve enfeksiyonun heterojenitesinin incelenmesinde yararlanılan bir yöntemdir. Bu bakteri türlerinin identifikasyonunda, biyokimyasal, immunolojik ve genetik testlerden yararlanır (22,51,54,57,91,123).

*S.mutans*'in tiplendirilmesinde kullanılan yöntemler, tekrarlanabilirlik ve ayırt edilebilirlik kriterlerine uygun olmalıdır (91).

Mikroorganizmaların epidemiyolojik tiplendirilmesi, fenotipleme ve genotipleme olarak iki şekilde yapılır (54).

#### **a. Fenotipleme Yöntemleri**

Bakteriyosin üretiminin ve bakteriyosinlere duyarlılığın ölçülmesi, serotipleme, biyokimyasal testler, antibiyotik rezistansı ve bakteriyofaj tipinin belirlenmesi gibi yöntemlerdir (54,131).

#### **(1) Bakteriyosin tiplendirmesi**

Oral streptokoklar için geliştirilen ilk epidemiyolojik tiplendirme yöntemidir (24). Bakteriyosinler, diğer bakterilerin çoğalmasını inhibe etmek için üretilen peptid ve proteine benzer maddelerdir. Tiplendirme, bakteriyosinlere karşı duyarlılığın ve inhibitör etkilerin belirlenmesi ile yapılır (15).

### **(2) Serotiplendirme :**

Sınıflandırma, hücre çeperi karbonhidrat antijeni yapısını temel almaktadır. Mutans streptokokların tiplendirilmesinde, immunodiffüzyon, immunofloresans ve immunoelektroforez yöntemleri kullanılır (35,147).

### **(3) Biyotiplendirme:**

Mutans streptokokların fermentasyon özelliklerine, arjinin ve eskülin hidrolizine ve bakteriyosin duyarlılığına göre yapılır. Hücresel yağ asidi analizi, hücre protein analizi ve multilokus enzim elektroforezi (MEE) kullanılır (79,91,92).

### **b. Genotipleme Yöntemleri**

İki bakteri suşunun benzer veya farklı olup olmadıklarını, kantitatif olarak saptamanın en iyi yolu, genomik DNA dizilerinin direkt olarak karşılaştırılmasıdır. Genomik DNA fragmentlerinin PCR ile çoğaltılması ve floresan boya işaretli terminatörlerin kullanıldığı otomatikleştirilmiş DNA dizi sırası saptama yöntemleri ile 14 saat içerisinde 300-500 baz çiftlik (bç) DNA dizisinin saptanması mümkün olmaktadır (13).

Moleküler tiplendirme yöntemleri, mikroorganizmaların DNA'ları ile ilgili, ayırt ediciliği ve tekrarlanabilirliği yüksek yöntemlerdir (142). Plazmid analizi, restriksiyon endonükleaz analizi (REA), restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi (RFLP), pulsed field jel elektroforezi (PFGE), DNA-DNA hibridizasyonu, multilokus enzim elektroforezi ve Arbitrarily-primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR), bu yöntemler arasındadır (1,18,19,45,67,100,108,117,176).



### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

PCR yöntemi, bakterilerin genotipik identifikasyonunda kullanılan yöntemlerden birisidir. Son yıllarda, çürük incelemelerinde yaygın olarak kullanılan moleküler biyolojik yöntemler, çürük etkeni bakterilerin genetik düzeyde incelenmesinde ve karyojenitenin belirlenmesinde önemli gelişmeler sağlamıştır (3,75,103,141,156,158,184).

Polimeraz zincir reaksiyonu, kalıp DNA, primerler, dNTP karışımı, Taq polimeraz ve uygun tampon ve iyonları içeren tübün, ısısız döngü (Thermal cycler) cihazına yerleştirilmesi ve tanımlanan sıcaklık değişim döngüsü doğrultusunda, kalıp DNA'nın tek iplikli hale getirilmesi, hedef dizilerin her iki ucundan oligonükleotid primerlerin bağlanması ve iki primer arasında kalan bölgenin çoğaltımını kapsayan işlemler bütünü olarak tanımlanır (13,23,28,43,99,155)

PCR; hızlı, maliyeti düşük, çok sayıda kopyayı basitçe üreten ve moleküler biyolojide sık kullanılan tekniklerden birisidir (39,76).

PCR ve AP-PCR, birçok farklı bakteri türünün genotipik özelliklerini tanımlamak için kullanılmaktadır (84,98,101,122,140,159).

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri**

PCR'ın temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, sıcaklığa dayanıklı DNA Taq polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve  $MgCl_2$ 'dür (13).

#### **a. Kalıp DNA**

Kalıp DNA olarak, elde edilen genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler kullanılabilir (13).

### **b. Polimerazlar**

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğın karşısına tamamlayıcı bir DNA ipliği oluşturmak üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak, dört çeşit deoksiribonükleotid trifosfattan, uzun polinükleotid zincirin sentezini katalize eder. Bu enzimler, sentezi başlatmak için, kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyar. Sentezin yönü, 5' uçtan 3' uca doğru olur. Termostabil enzimlerden ilki ve en yaygın olarak kullanılanı, Taq DNA polimeraz'dır (13).

### **c. Primerler**

Sentetik olarak kolayca hazırlanabilen tek iplikçikli spesifik DNA segmentlerine, primer adı verilir. Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan veya ticari olarak elde edilebilir. Kullanılma amaçlarına göre, 10-40 oligonükleotid'den oluşabilirler. Primer dizileri, hedef DNA üzerinde tamamlayıcı olan baz sıralarını bularak onlara bağlanır ve 3'-OH ucundan DNA sentezinin ilerlemesine basamak teşkil ederler. Primerlerin yapısında, %50-60 kadar Guanin+Sitozin (G+C) bazları bulunmaktadır. Bu da hedef DNA ile daha kuvvetli H<sup>+</sup> bağları (Adenin=Timin, Guanin=Sitozin) kurulmasına yardımcı olur. Primerlerin 3'-OH ucundaki bazlar, hedef DNA'nın kopyalanmasını başlatır. Bu nedenle primerlerin 5'- ucu hedef DNA'nın 3'-OH ucu ile birleşerek polimerizasyonun 5'-3' yönünde olmasını sağlar (13).

PCR primeri hazırlanırken, göz önünde bulundurulacak kriterler;

1. Primerin uzunluğu,
2. Erime sıcaklığı,
3. Spesifite,
4. Tamamlayıcı primer sekansları,
5. G / C (Guanin/Sitozin) içeriği ve polipirimidin (T,C) (Timin, Sitozin) veya polipurin (A,G)(Adenin, Guanin) açılımlarıdır.

Başarılı bir PCR için en önemli parametre, primerlerin dizaynıdır. İyi dizayn edilmemiş primerler, non-spesifik amplifikasyon (çoğalma) ve primer-dimer formasyonu nedeniyle hiç ürün oluşmamasına veya çok az oluşmasına neden olabilir (89).

#### **d. Deoksinükleotid trifosfat (dNTP) karışımı**

Deoksinükleotid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), yüksek saflıkta tek tek veya dörtlü karışımlar halinde ticari olarak elde edilebilir. Normal koşullarda PCR, 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Optimal dNTP konsantrasyonu; MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün boyuna, PCR döngü sayısına bağlı olmaktadır (13).

#### **e. Tamponlar ve MgCl<sub>2</sub>**

PCR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında, en çok kullanılanı, 20°C'de saklanan 10-50 mM Tris-HCl'dir. Tris HCl, bir dipolar iyonik tampondur. pH'sı, ısıl döngü işlemi süresince 6,8 ile 7,8 arasındadır (13).

Magnezyum iyon konsantrasyonu; primer eşleşmesini, ürün özelliğini, primer-dimer oluşumunu etkileyebilir.  $Mg^{+2}$  iyonları, deoksitrikleotid trifosfatlar ile çözünebilir, kompleksler oluşturur, polimeraz aktivitesini stimüle eder, çift iplikli DNA'nın denatürasyon derecesini ( $T_m$ ) artırır.  $MgCl_2$ 'ün reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonu değişebilmekle birlikte, genellikle 0,5-5,0 mM'lık değerler arasında çalışılır. Bu konsantrasyon, PCR standardizasyonu ile belirlenir. Düşük  $MgCl_2$  konsantrasyonu, ürün oluşumda azalmaya, yüksek  $MgCl_2$  konsantrasyonu da spesifik olmayan ürün birikimine yol açabilir (13).

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonunu Etkileyen Faktörler**

Denatürasyon sıcaklığı, bağlanma sıcaklığı, primer uzunluğu ve  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu, polimeraz zincir reaksiyonunu etkileyen faktörlerdir (13).

#### **a. Denatürasyon Sıcaklığı**

DNA dizilerindeki bazlar, birbirlerine hidrojen bağlarıyla bağlanır. DNA, denatürasyon sıcaklığından yüksek bir sıcaklıkta ısıtılıp soğutulduğunda, diziler birbirinden ayrılabilir. Kalıp DNA'nın yetersiz denatürasyonu sonucunda, DNA iplikleri yeniden birleşerek ürünün veriminin düşmesine neden olabilir. PCR sırasında, etkin denatürasyon sıcaklığının 92-95 °C olduğu belirlenmiştir (13).

#### **b. Bağlanma Sıcaklığı**

PCR için seçilen bağlanma sıcaklığı, primerlerin boyuna ve içerdikleri baz çeşidine bağlıdır. Primerler için  $T_m = [(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4]$  °C formülü ile hesaplanır. Bağlanma sıcaklığı ( $T_a$ ), primerlerin hesaplanan sıcaklık derecesinden 5 °C daha düşük

olmalıdır. PCR sırasında bağlanma sıcaklığı çok düşük değerde tutulursa, primerlerin özgünlüğü azalıp primer kendine komplementer olmayan DNA dizilerine bağlanır. Bu durum, spesifik olmayan çoğalmalara yol açabilir (13).

### **c. Primerlerin Uzunluğu**

Primerler seçilirken veya hazırlanırken, buldukları baz sıralarının yalnızca hedef DNA üzerinde bulunmasına dikkat edilmelidir. Primer tasarımı yapılırken dört bazın eşit sayıda bulunması önemlidir. En uygun primer boyu, primerin Adenin + Timin (A + T) içeriğine ve reaksiyonda kullanılan diğer primerin denatürasyon derecesine göre belirlenir (13).

### **d. Magnezyum Konsantrasyonu**

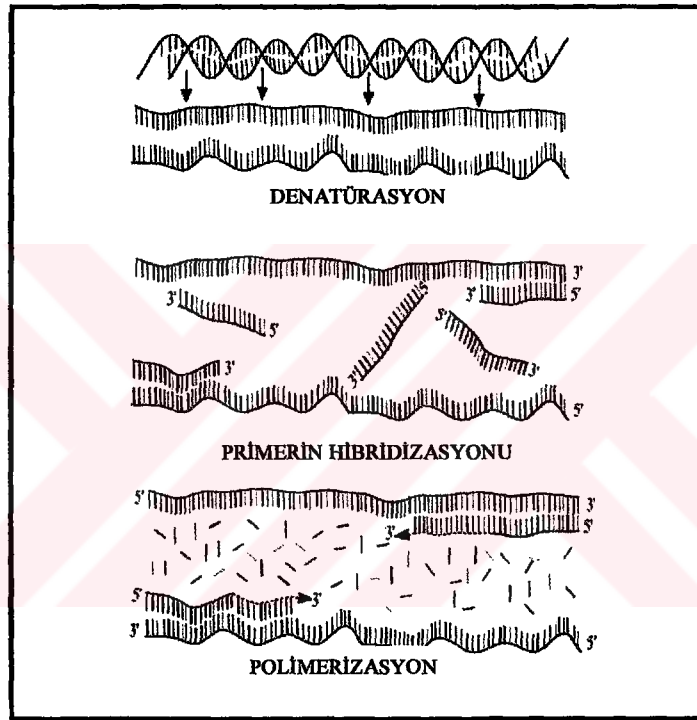
MgCl<sub>2</sub>'ün reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonu, 0,5-5,0 mM arasındadır (13).

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonunun İşleyişi**

PCR, otomatik olarak farklı ısı derecelerine ayarlanabilen ısısal döngü yardımıyla, 0,2 veya 0,5 ml'lik steril kapaklı tüplerde gerçekleştirilir. Bir PCR döngüsü, hedef DNA denatürasyonu, primerlerin hibridizasyonu ve polimerizasyonu olmak üzere üç aşamadan oluşur (13). Polimeraz zincir reaksiyonunun işleyiş mekanizması, Şekil-1.2'de verilmiştir.

### a. Hedef DNA'nın Denatürasyonu

PCR reaksiyonu için gerekli maddeler, uygun konsantrasyonlarda PCR tüplerine konulduktan sonra ısıl döngü aletine yerleştirilir. Başlangıç denatürasyonunda, kompleks DNA kalıplarının denatüre olmasını sağlamak için ısı, otomatik olarak 95°C'ye yükseltilir. Etkin denatürasyon sıcaklığı 92-95°C, süresi 3-5 dakika olarak saptanmıştır (13).



Şekil-1.2: Polimeraz zincir reaksiyonunun işleyiş mekanizması (69)

### b. Primerlerin Hibridizasyonu

Denatürasyon için ayarlanmış olan süre sona erdikten sonra, alet ısıtını 55-65°C'ye düşürür. Bu ısı, primerin özelliğine göre değişiklik gösterir. Ortamdaki primerler, hedef DNA üzerindeki komplementer dizilere bağlanır. Primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yapar. Primer eşleşmesi için

gereken ısı ve süre, primerlerin konsantrasyon ve uzunluklarına bağlı olmaktadır (13,111).

### **c. Polimerizasyon**

Kalıp DNA'ya primerlerin bağlanması gerçekleştiikten sonra, aletin ısısı 70-72°C'ye yükselerek, tüpler içerisinde bulunan ve ısıya dayanıklı olan DNA Polimeraz enzimi 5'→3' yönünde olacak şekilde yerleşir. Uzama, 3'-OH ucuna bağlanınca başlar, 72 °C'ye yaklaşıldığı anda, termal DNA polimerazlar aktif hale geçer ve baz uzaması 100 baz/saniyeye yaklaşır. Polimerizasyonda yeni bazların 5'-fosfat gruplarındaki bir fosfat ile primerin 3'-OH ucu kalıp DNA'nın komplementeri olacak şekilde ilave edilir. Uzama aşaması için iki dakika yeterli olurken, tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanması için, son PCR döngüsü, yaklaşık 10-15 dakika sürer (13,111).

### **Amplifiye Edilmiş PCR Ürünlerinin Saptanması**

Polimeraz zincir reaksiyonunda, amplifiye edilmiş ürünler, agaroz jelde yürütülerek ayrıştırılır (13).

#### **a. Elektroforez ile PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi**

Reaksiyon tüplerinde amplifiye olan PCR ürünleri, yükleme tamponu yardımıyla, agaroz jel elektroforezine aktarılır. Bu ortamda, ürünler molekül ağırlıklarına göre ayrılır (13).

### **b. Bantların Etidyum Bromür ile Boyanması**

Jel, etidyum bromür solüsyonu ile boyanarak PCR ürünleri görünür hale getirilir. Oluşan bantlar, uygun markörlerle karşılaştırılarak değerlendirme yapılır (13,169).

PCR temelli metodlar, iki gruba ayrılır;

1-*PCR-RFLP*; farklı suşlarda ortak olduğu bilinen primerlerle belirli bir DNA bölgesinin her bir suşa ait DNA örneklerinden çoğaltılması, restriksiyon endonükleaz (RE) ile kesilmesi ve agaroz jel elektroforezinde yürütülen ve görselleştirilen DNA fragmanlarının karşılaştırılmasıdır.

2-*AP-PCR (RAPD-PCR: Random Amplified Primers-Polimerase Chain Reaction)*; hedef DNA'daki çeşitli bölgelerin, birden fazla komplementeri olan primerler ile çoğaltılması ve oluşan ampliconların agaroz jel elektroforezinde yürütülerek farklı suşlardan elde edilen PCR ürünlerinin karşılaştırılmasıdır. AP-PCR yönteminde oluşan ampliconların RE ile kesilmesine gereksinim yoktur, çünkü PCR sırasında çeşitli boylarda fragmanlar oluşturulur (13,179,180).

Çalışmamızın amacı; Down Sendromlu çocuklarda, çürük görülme sıklığının sağlıklı çocuklarla karşılaştırmalı olarak incelenmesi ve çürüğe neden olan faktörlerin, immünojenik, mikrobiyolojik ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak değerlendirilmesidir.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Genetik ve Teratoloji Bilim Dalı'na, düzenli kontrollere gelen, yaşları 7-12 arasında değişen, rasgele seçilmiş 73 Down Sendromlu çocuk ve İzmir ili içerisinde Fevzi Özakatlar İlköğretim Okulu'nda okuyan aynı yaş grubundan rasgele seçilmiş 70 sağlıklı çocuk, cinsiyet ayrımı yapılmaksızın değerlendirildi. Son üç ay içerisinde antibiyotik ve klorheksidin preparatı kullanan, herhangi bir sistemik rahatsızlık nedeniyle her gün ilaç kullanmak zorunda olan ve tükürük örneği alınamayan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Çalışma öncesinde, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan etik kurul raporu alınıp, çalışmaya dahil edilen tüm çocukların ailelerine gönüllü olur formu imzalatıldı.

### 2.1. Anket formlarının doldurulması

Çalışmanın başlangıcında, annelerin eğitim düzeyi, çocukların karyojenik gıda alım sıklığı ve fırçalama alışkanlıklarının kaydedildiği anket formları dolduruldu. Uygulanan anket formu EK-1'de verilmiştir.

Anket sonuçlarının değerlendirilmesinde;

- Annenin eğitim düzeyi, üç grup altında (düşük, orta, yüksek),
- Çocuğun karyojenik gıda alım sıklığı dört grup altında (günde 3-4 kez, günde 1-2 kez, haftada 3-4 kez, haftada 1-2 kez),

- Çocuğun diş fırçalama alışkanlığı dört grup altında (günde 2 kez, günde 1 kez, düzensiz, hiç) incelendi.

## 2.2. İntraoral Muayene

İntraoral muayenede çürük dişlerin tayini, WHO (183)'nun kriterlerine göre yapıldı. Kalıcı dişler için DMFT ve DMFS, süt dişleri için de dft ve dfs indeksleri kullanıldı (Tablo 2.1 ve 2.2).

**Tablo-2.1. DMFT / DMFS indeksleri**

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

**Tablo-2.2. dft / dfs indeksleri**

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

Hastaların plak indeksi değerleri de Silness ve Løe (166)'nın plak indeksine göre yapıldı (Tablo-2.3).

**Tablo-2.3. Silness ve L e'n n plak indeksi değerleri**

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

DMFT, DMFS, dft, dfs ve plak indekslerinin değerlendirilmesi, 7, 8-10, 11-12 yaş gruplarında yapıldı.

Hastalar, ur k diş sayısına göre ur ks z, az ur kl  (1-5 ur k) ve ok ur kl  (>5 ur k) olmak üzere  c gruba ayrıldı.

### 2.3. Tükürük  rneklerinin alınması

Hastaların tükürük örnekleri, sirkadiyen ritim değişiklikleri göz önüne alınarak, sabah 9:00-12:00 saatleri arasında ve standart kahvaltıdan (peynir, ekmek, ay) en az iki saat sonra alındı. Parafin ile 5 dakika stimüle edilip, hastaların, 10 dakika süresince sakin bir odada, oturur konumda, dereceli steril tüplere tükürmeleri istendi. Tükürük örneklerinde, tükürük akım hızı, pH'sı, tamponlama kapasitesi, sIgA değeri ile *S. mutans* ve *Lactobacillus* değerleri kaydedildi.

#### 2.3.1. Tükürük akım hızı  l m 

Tükürük akım hızı  l m , dereceli tüpte aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Akım oranı = Tükürük  rneği miktarı (ml)/10 dakika

Alınan tükürük örneklerinde, tükürük akım hızları  l l p, örnekler, otomatik pipet yardımı ile herbiri en az 1'er ml olacak şekilde steril  c t be aktarıldı.

### **2.3.2. Tükürük pH'sı ölçümü**

Birinci tüpteki örnekte, tükürük pH'sı ve tamponlama kapasitesi ölçümleri yapıldı. Tüm örneklerin pH'ları, Jenco 671P marka pH metre (World Precision Instruments, USA) ve Ingold marka mikro pH elektrodu ile, 0,01 hassaslığında saptandı. Ölçümler sırasında, pH 4 ve pH 7 standartları ile kalibrasyon yapıldı.

### **2.3.3. Tükürük tamponlama kapasitesi ölçümü**

Tamponlama kapasitesi, Ericsson ve Bratthal'ın yönteminin (70) modifikasyonu ile yapıldı. 0,1 ml tükürük örneği 0,3 ml 0,005 N HCl solüsyonu ile karıştırılıp vortekslendi, 5 dakika bekletilerek pH ölçümü yapıldı.

### **2.4. İmmunolojik değerlendirme**

1 ml tükürük örneği, sIgA değerinin ölçümü için, E.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı İmmunoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'na buz kabı içerisinde iletildi. sIgA değerleri, antikor elde edilecek maddelerin araştırılması ve kantitatif tayini için kullanılan bir yöntem olan radyal immunodiffüzyon yöntemi (RID)(127) ile ölçüldü. sIgA için uygun kitler kullanıldı (The Binding Site, Birmingham, UK). Antikor, jele ilave edilip, örnek bir kaba konularak belli bir sürede yayılması beklenir. Nemli ortamda 37°C'de 24-120 saat inkübe edilir. Kabın çevresinde presipitin halkasının çapı ölçülerek standart eğri hazırlandı. Tükürük örnekleri, RID kitlerinde önerildiği şekilde, örnek alımından işlem sırasına kadar -30 °C 'de saklandı.

## 2.5. Mikrobiyolojik değerlendirme

Üçüncü tüpteki tükürük örneği, örnek alınından sonra, iki saat içerisinde mikrobiyolojik işlemler için E.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na, buz kabı içerisinde götürüldü.

Steril cam tüpler içerisindeki tükürük örnekleri, vortekste (Stuart Scientific) 20 sn karıştırılarak homojenize edildikten sonra, örneklerden  $10^{-5}$ 'e kadar dilüsyonlar hazırlandı. Dilüsyonların hazırlanmasında steril distile su kullanıldı. Seyreltmelerden *S.mutans* için, seçici besiyeri TYCSB agara (182), *Lactobacillus* için de MRS agara (59) yüzeye yayma kültür yöntemiyle steril cam bagetlerle ekim yapıldı. Petri kapları,  $37 \pm 1$  °C'de %95 N<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> gazı altında anaerobik olarak 48 saat inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra petrilerdeki büyüme bir stereomikroskop (x 10 ve x 40) altında incelendi. Morfolojik olarak *S.mutans* ve *Lactobacillus* olarak tespit edilen izolatların sayımları yapıldı. Sonuçlar, CFU/ml (colony forming units/ml) olarak değerlendirildi.

Hastalar, tükürük *S.mutans* ve *Lactobacillus* değerleri açısından, üç gruba ayrıldı (Tablo-2.8).

Tablo-2.4. *S.mutans* ve *Lactobacillus*'ların gruplandırılması

	DÜŞÜK (CFU/ml)	ORTA (CFU/ml)	YÜKSEK (CFU/ml)
<i>S.mutans</i>	$0 \geq x < 10^4$	$10^4 \geq x < 10^6$	$x \geq 10^6$
<i>Lactobacillus</i>	$0 \geq x < 10^3$	$10^3 \geq x < 10^5$	$x \geq 10^5$

(7,11,152)

### Kullanılan Besiyerleri:

#### • TYCSB (Triptikaz-maya özütü-sistin-sakkaroz-basitrasin) agar

	g/1000ml
Tripton(Oxoid)	15 g
Maya Özütü (Oxoid)	5,0 g
L-sistin (Merck)	0,2 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0,1 g
NaCl	1,0 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8 g
Sodyum asetat	12,0 g
Sakkaroz (Merck)	200,0 g
Agar (Oxoid)	15,0 g
Distile su:	1000 ml

Yukarıdaki maddelerin 25 °C'de 1 litre distile su içinde çözünmesiyle, pH'sı 7,3 ( $\pm 0,2$ ) olan bir çözelti elde edildi. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra, 45 °C'ye kadar soğutuldu. Basitrasin çözeltisi, ortamdaki konsantrasyonu 0,2 U/ml olacak şekilde filtre ile sterilize edilerek, aseptik koşullarda eklendi. Hazırlanan bu besiyeri, steril petri kaplarına dökülerek donmaya bırakıldı (77)

#### • MRS agar

	g/1000ml
Pepton	10,0 g
Et özütü	5,0 g
Maya özütü	5,0 g

D(+)-Glikoz	20,0 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	2,0 g
Diamonyum hidrojen sitrat	2,0 g
Sodyum asetat	5,0 g
Magnezyum sülfat	0,1 g
Manganous sülfat	0,05 g
Agar	12,0 g

Yukarıdaki hazır besiyeri formülü, 37 °C'de 1 litre distile su içinde çözünmesiyle, final pH'sı 6,5 ( $\pm$  0,2) olan bir çözelti elde edildi. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra, petri kaplarına dökülerek donmaya bırakıldı (77).

#### **Beyin kalp infüzyon sıvı besiyeri (Oxoid):**

37 g besiyeri tartılarak, ortamın içeriği 1 lt distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar karıştırıldı. 121 °C, 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 50-55 °C'ye kadar soğutuldu ve aseptik koşullarda, steril petri kaplarına döküldü (77).

#### **Bazal Ortam (Fenol Red sıvı besiyeri-Merck)**

15 g besiyeri tartılarak, ortamın içeriği 1 lt distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar karıştırıldı. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Otoklavdan çıkartıldıktan sonra, 50-55 °C'ye kadar soğutuldu ve %1 w/v olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş karbonhidratlar, aseptik koşullarda ilave edildi (77).



**Thornley'in Yarı katı Arjinin Besiyeri**

Pepton	1,0 g
NaCl	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
Fenol Red	0,01 g
L-Arjinin HCl	10,0 g
Agar	3,0 g
Distile su	1000 ml

Ortam içeriği, çözüldükten sonra pH, 7,2'ye ayarlandı, agar eklenip kaynatılarak çözünmesi sağlandı, tüplere paylaştırıldı. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Bu besiyeri, izolatların arjinin dehidrolaz aktivitesini test etmek için kullanıldı (77).

**Tampon ve Çözeltiler****Gram boyamada kullanılan boya çözeltileri****- Kristal viyole**

Çözelti A; kristal viyole 2,0 g + etanol (%95) 20 ml

Çözelti B; amonyum oksalat 0,8 g + distile su 80 ml

20 ml çözelti A ve 80 ml çözelti B karıştırıldı, 24 saat bekletildi ve filtre edildikten sonra kullanıldı.

**-Gram iyodür**

KI	2,0 g
İyodin	1,0 g
Distile su	300 ml

**- Safranin**

Safranin O	0,25 g
Etanol (%95)	10ml

çözündükten sonra 100 ml distile su eklenerek hazırlandı ve filtre edildikten sonra kullanıldı.

**-  $\alpha$  Naftol Çözeltisi**

alfa naftol	5 g
%95'lik etanol	100 ml karıştırılır.

**- Potasyum hidroksit çözeltisi (KOH) (%40)**

KOH	40 g
Kreatin	0,3 g
Distile su	100 ml

Potasyum hidroksit, 75 ml distile su içerisinde çözülüp, oda sıcaklığında bir süre bekletildi. Daha sonra kreatin eklenip iyice çözündükten sonra, 25 ml distile su eklendi (77).

- Hidrojen peroksit çözeltisi (%3) (Oksijenli su)

### **Kullanılan başlıca cihazlar:**

- Etüv (Sanyo)
- Mikro santrifüj (13000 rpm) (Sanyo)
- Vortex (Stuart Scientific S2)
- Isısal Döngü (Termal Cyler -Appligene Oncor, Crocodile III)
- Midi elektroforez (Consort)
- Güç kaynağı (1500 V) (Sigma)
- UV Transilüminatör (254 nm)
- Fotoğraf çekim apareyi (Polaroid- Fotodyne Cat. 5-5535)
- PH metre (Jenco 671 P)
- Mikro pH elektrodu (Ingold)

#### **2.5.1. İdentifikasyon**

*S.mutans* izolatlarının identifikasyonu için, inkübasyon sonrası üremesi sağlanan örneklerin koloni morfolojileri *S.mutans* ATCC 25175, serotip c referans suş ile karşılaştırılarak kümeler şeklinde, sınırları düzensiz, buzlu cam görünümündeki sert yapılı mikroorganizma kolonilerinden tipik bir veya iki olası *S.mutans* kolonisi, agar yüzeyinden öze ile toplanarak sıvı besi yerlerine (beyin-kalp sıvı infüzyonu) inoküle edildi. 48 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra, bu sıvı besiyerinden alınan 50 µl kültür, % 40 oranında steril gliserin ile karıştırılarak sonraki işlemlere kadar -20 °C'de saklandı.

### a. Mikroskopik inceleme:

*S. mutans* izolatlarının mikroskopik özelliklerinin saptanmasında, Gram boyama yapıldı. Beyin kalp infüzyon sıvı besiyerinde üreyen, 48 saatlik kültürler kullanıldı. İzolatların morfolojileri, boyutları ve gram reaksiyonları değerlendirildi.

### b. Biyokimyasal Testlerin Uygulanması

*S. mutans* örnekleri, biyokimyasal testler yardımı ile tanımlendi. Mannitol, sorbitol, melibiyoz, rafinoz, inülin, dekstrin ve nişastanın fermentasyonu, arjinin ve eskülin hidrolizi, Vogues-Proskauer, katalaz ve Basitrasin dirençliliği testleri uygulandı (91,92).

*S. mutans* izolatlarının tanımlanmaları için uygulanan testlerin gerçekleştirilmesinde, *S. mutans* ATCC 25175, serotip c referans suşu olarak kullanıldı. Tüm testler, 48 saatlik beyin kalp infüzyon sıvı besiyerinde aktif hale getirilen kültürler kullanılarak gerçekleştirildi.

### 1. Asit Üretimi-Karbonhidratların Hidrolizi

*S. mutans* izolatlarının, mannitol, sorbitol, melibiyoz, rafinoz, inülin, dekstrin ve nişastayı kullanarak asit oluşturup oluşturmadıkları, bir pH indikatörü ile belirlendi. Bu test için, %1 (wt/vol) oranında karbonhidratların her birini ayrı ayrı içeren, bazal sıvı besiyerleri kullanıldı. Ortamın pH'sı 7,0 olacak şekilde ayarlandı. pH indikatörü olarak fenol red kullanıldı. İzolatlardan ekimler yapılarak, 37 °C'de, % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde, 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sarı renk oluşumu, pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Mannitol, sorbitol, melibiyoz, rafinoz ve inülin). Fenol red indikatörü, pH 6,9'un üzerinde kırmızı, altında sarı renklidir (91,92).

## **2. Arjinin Hidrolizi**

Arjinin içeren Thornley'in yarı katı besiyeri ve kontrol olarak, arjinin içermeyen besiyeri kullanıldı. Dik ekimden sonra, besiyeri, steril mineral yağı ile kaplanarak, 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 7 gün süre ile inkübe edildi. Rengin, sarı-oranjdan kırmızıya değişimi, pH'sının yükselmesi ile pozitif sonuç olarak değerlendirildi (91,92).

## **3. Eskülin Hidrolizi**

Beyin kalp infüzyon sıvı besiyeri, %0,01 eskülin ve %0,05 ferrik sitrat içerecek şekilde hazırlandı. İzolatlardan ekimler yapılarak, 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24 saat inkübe edildi. 6,7-dihidroksikumarin ve Fe<sup>+3</sup>'ün arasındaki reaksiyon sonucu kahverengi-siyah renk oluşumu, pozitif olarak değerlendirildi (91,92).

## **4. Voges Proskauer Testi**

İzolatlar, besiyerlerine ekimleri yapıldıktan sonra, 37 °C'de, % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, 1 ml kültür, ayrı bir tübe alınarak üzerine 0,6 ml alfa-naftol çözeltisi eklenerek karıştırıldı. 0,2 ml % 40'lük KOH eklenip karıştırılarak, tüpler yatık konumda 15-60 dakika bekletildi. Yüzeyde koyu kırmızı veya kahverengi renk oluşumu, pozitif sonuç olarak değerlendirildi (91,92).

## **5. Katalaz Testi**

İzolatların katalaz testi, beyin kalp infüzyon sıvı besiyerinde üretilen 48 saatlik sıvı kültürlerin üzerine, bir miktar hidrojen peroksit damlatılarak belirlendi. Gaz kabarcıklarının çıkışı, pozitif sonuç olarak değerlendirildi (91,92).

## 6. Basitrasin Dirençliliği

İzolatların basitrasin dirençliliği testinde, içerisinde 2U/ml basitrasin içeren TYCSB agar besiyeri kullanıldı. Tipik *S.mutans* kolonilerinin gelişmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirildi (91,92).

### 2.6. *S.mutans* suşlarının genotipik farklılıklarının analizi

İzole edilen *S.mutans* mikroorganizmalarının AP-PCR yöntemi ile genotipik yapılarındaki çeşitlilik incelendi. Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklardan elde edilen *S.mutans* izolatlarının, genotipik polimorfizm gösterip göstermedikleri araştırıldı.

#### ***S. mutans*'ın Genotipik Ayrımalarının Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasallar:**

- **TE tamponu:** 10mM Tris baz ( Merck) (pH: 7.4)  
1 mM EDTA ( Sigma) (pH: 8)

Her iki solüsyondan 5'er ml alınıp üzerine 490 ml steril deiyonize su eklenerek 500 ml TE tamponu hazırlandı.

- **%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi (SDS):** SDS :10 g

Distile su: 90 ml

Su 68 °C'de ısıtıldı. HCl ile pH 7,2'ye ayarlandı ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

- **Tris Asetat Tampon (TAE):**

Tris baz ( Merck) 40 mM

EDTA ( Sigma) 1 mM

Asetik asit 1,1 mM

Tris baz, 250 ml suda çözüldü. EDTA ve asetik asit eklendi. Ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Karıştırıldıktan sonra pH, 8'e ayarlandı. 10xTAE solüsyonu elde edildi. Elektroforez sırasında ve agaroz jel hazırlanırken 1xTAE kullanıldı.

- **Etidyum Bromür solüsyonu:** 100 ml deiyonize su içine 1 g etidyum bromür karıştırılarak hazırlandı.

- **Yükleme Tamponu:** 45 ml 1xTAE, 55ml gliserol, 0,1g Orange G karıştırılarak hazırlandı.

- **Agaroz (Sigma)**

- **Primerlerin seçimi ve özellikleri**

AP-PCR analizlerinde kullanılan *S.mutans* için spesifik olduğu bildirilen primerler:

OPA-05 (5' AGGGGTCTTG-3')

OPA-13 (5' CAGCACCCAC-3') (Thermo BioSciences)

Primerler 110 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı ve 25µl'lik amplifikasyonda 55 ng olacak şekilde kullanıldı.



- **DNA Markör:**

Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (bç): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 markör olarak kullanıldı.

### 2.6.1. *S. mutans* izolatlarından DNA ekstraksiyonu

Fenotipik incelemeleri yapılan izolatlar ile *S. mutans* ATCC 25175 (serotip c), referans suşundan AP-PCR tiplendirmesinde kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu, Bollet ve ark.(31)'nın kullandığı yönteme göre gerçekleştirildi.

DNA ekstraksiyon yöntemi :

- 1- *S. mutans* izolatları, 5 ml beyin-kalp infüzyon sıvısı içerisinde 37 °C'de 2 gün süre ile inkübe edildi.
- 2- Ortamdaki bakteri hücrelerini toplamak için karışım, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve hücreler 1 ml TE ile yıkandı, süspansiyon edilip ependorf tüpler içerisine alındı. 6000 rpm'de 4 dakika santrifüjlendi, süpernatant atıldı.
- 3- Bakteri hücreleri, 100 µl TE tamponu ve 50 µl % 10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) içinde süspansiyon sonrası, 65 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 4- Süspansiyon tekrar santrifüjlendi, süpernatant atıldı ve hücreler, mikrodalga fırında, 2 dakika 30 saniye süre ile ısıtıldı.
- 5- Peletler, 250 µl TE içerisinde çözüldü.
- 6- Ependorf tüpleri, derin dondurucuda, -20 °C'de donduruldu.

7- AP-PCR işleminden önce süspansiyon eritildi, santrifüj sonrası süpernatant kullanıldı.

Örneklere ait süpernatant içinde DNA olup olmadığı ve örnek DNA'larının genomik DNA'ların, bütünlükleri saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometre (Varian 50) ile yapıldı. Spektrofotometrede, DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorbanları hesaplandı (OD 260 ve OD280). Bu değerler arasındaki oran kullanılarak, DNA'nın saflık kontrolü yapıldı. DNA miktarı, her reaksiyon tüpünde 20-50 ng DNA olacak şekilde ayarlandı.

## **2.6.2. AP-PCR Reaksiyon Karışımının Optimizasyonu**

### **a. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun standardizasyonu**

Referans suştan elde edilen DNA, PCR standardizasyonu için 3,6 mM, 4 mM ve 4,4 mM olmak üzere 3 farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda çoğaltıldı.

### **b. DNA Çoğaltılma Aşaması**

Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklardan alınan tükürük örneklerinden izole edilen *S. mutans* izolatlarının DNA'sı ile, referans suştan elde edilen DNA kullanıldı.

### **c. DNA İzolasyonunun Kontrolü**

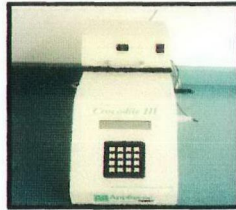
Miktarı hesaplanan DNA örnekleri, optimum kalıp DNA miktarının bulunması için 1/10 ve 1/100 oranında seyreltildi.

#### d. Çoğaltılma Karışımının Hazırlanması

Çoğaltılma karışımı, her bir örnek için toplam 25 µl olacak şekilde hazırlandı.

Stok	Alınan hacim	Final konsantrasyon
Ultra saf su :	14,4 µl	
PCR tamponu :	2.5 µl	
MgCl <sub>2</sub> :	3,6 µl	
dNTP :	2,0 µl (Fermentas)	0,2 mM
Primer :	1,0 µl	0,4 µM
Taq DNA polimeraz:	0.5 µl <i>Thermus aquaticus</i> (Fermentas)	
Kalıp DNA:	1,0 µl	Her reaksiyon tüpünde 20-50 ng DNA olacak şekilde

PCR çoğaltılması, toplam 25 µl'de gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı, buharlaşmayı engellemek için 30 µl steril mineral yağ (Sigma) ile kaplandı. Çoğaltma, programlanabilir bir ısısal döngü (Thermal Cycler-Appligene Oncor, Crocodile III ) cihazında, aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi (159). Resim-2.1'de ısısal döngü cihazı görülmektedir.



**Resim-2.1.** Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleştirildiği ısısal döngü cihazı

Her PCR denemesinde, kalıp DNA haricinde, (yerine steril distile su konularak) bütün bileşenleri içeren bir reaksiyon körü, negatif kontrol olarak kullanıldı.

#### e. Uygulanan AP-PCR Koşulları

İlk Denatürasyon	94 °C	5 dakika	
Hibridizasyon	36 °C	2 dakika	<b>1 döngü</b>
Polimerizasyon	72 °C	2 dakika	
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	
Hibridizasyon	36 °C	2 dakika	<b>30 döngü</b>
Polimerizasyon	72 °C	2 dakika	
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	
Hibridizasyon	36 °C	2 dakika	<b>1 döngü</b>
Polimerizasyon	72 °C	10 dakika	

PCR programı tamamlandıktan sonra, ependorf tüpleri +4°C' ye alındı.

#### f. Agaroz Jel Elektrofrez

##### Jellerin yürütülmesi

Agaroz jel elektrofrez, 5 µg / ml etidyum bromid'li, % 1 agaroz içeren jelde gerçekleştirildi. Jel hazırlanmasında ve elektrofrezinde TAE tamponu kullanıldı. 5µl DNA solüsyonu, 2µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak, 50 V'ta 45 dakika yürütüldü. Elektrofrezde markör olarak, Hind III ve EcoRI ile kesilmiş λ DNA'sı kullanıldı. Elektrofrez sonucunda izole edilen DNA'ların bütünlüğününün tam olduğu, başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi ile tespit edildi.

PCR ürünlerinin elektrofrezinde, Consort marka, 13 x 15 cm boyutlarında bir elektrofrez yürütme sistemi kullanıldı. Jellerdeki bant izlerinin karşılaştırılabilmesi

için, elektroforez koşulları standardize edildi. Tüm elektroforez işlemleri, aynı koşullarda gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında, amplifiye DNA'ları yürütmek için, % 1,75'lik agaroz jel hazırlandı. Jel donduktan sonra üzerine 1x TAE tampon eklendi. Bir parça parafilm üzerinde, 7µl yükleme tamponu ve 8 µl çoğaltma ürünü karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklendi.

Elektroforez, 60 V'da 4 saat sürdürüldü. Bromfenol mavisi başlangıç noktasından 11 cm uzaklığa ulaşınca sonlandırıldı. Elektroforez sonrası, jellerin etidyum bromür ile boyaması gerçekleştirildi. Fotoğrafların çekim işlemi için, Polaroid fotoğraf makinesi (Kodak), Wratten 22A filtresi (Kodak) ve siyah-beyaz polarid film (Polaroid 667-Kodak) kullanıldı. Bu amaçla, UV transilüminatörü karanlık bir odaya konuldu. Fotoğraflama işlemi, 254 nm UV ışığı altında gerçekleştirildi. Polaroid filmle jel fotoğrafları çekildikten sonra, jeller, Kodak DC 290 zoom Digital kamera ve ID Image Analysis Software, Macintosh USB Version 3,5 programında DNA bantlarının yer ve büyüklüklerinin karşılaştırılması amacıyla taramadan geçirildi.

Bantların değerlendirilmesi, hem görsel olarak, hem de Bio Doc Analyze (Biometra) programı ile yapıldı. Bantlara 1 (var) ve 0 (yok) değerleri verilerek, istatistiksel değerlendirmesi yapıldı.

## 2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızda, istatistiksel değerlendirme Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Bilgisayar Mühendisliği Bölümü'nde SPSS for Windows, 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı. DMFT, DMFS, dft, dfs ve plak indeksi değerlerinin iki grup arasında karşılaştırmalı olarak incelenmesinde; Mann-Whitney Testi kullanıldı. Gruplar arasında, annelerin eğitim düzeyinin, karyojenik gıda alm sıklığı ve fırçalama

alışkanlığının değerlendirilmesi,  $\chi^2$  testi ile yapıldı. Tükürük akım hızı, pH'sı, tamponlama kapasitesi, sIgA, *S.mutans* ve *Lactobacillus* değerlerinin iki grupta değerlendirilmesinde, t testi kullanıldı. Çürük durumu ile annenin eğitim düzeyi, çocuğun karyojenik gıda alım sıklığı, fırçalama alışkanlığı, *S.mutans* ve *Lactobacillus* gruplarının karşılaştırılması,  $\chi^2$  testi ile yapıldı. Tükürük akım hızı, pH, tamponlama kapasitesi, sIgA değeri ve plak indeksi değerlerinin karyojenik gıda alım sıklığı, fırçalama alışkanlığı, çürük durumu, *S.mutans* ve *Lactobacillus* grupları ile karşılaştırmalı olarak incelenmesinde, One-way Anova testi kullanıldı.

AP-PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde; elde edilen bantların gruplar arası benzerlik oranları,  $\chi^2$  testi kullanılarak karşılaştırıldı.

Tüm hipotez kontrollerinde  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edildi.



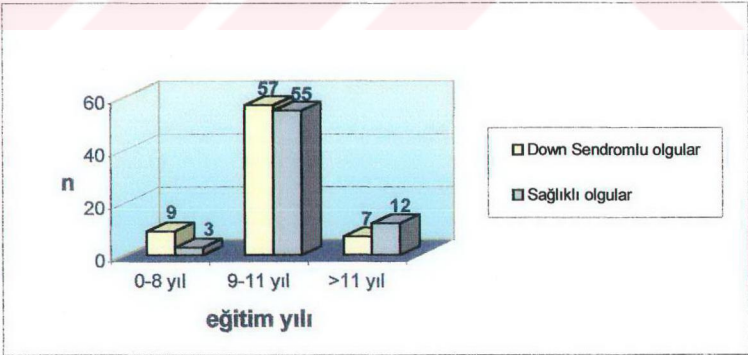
### 3. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen, 73'ü Down Sendromlu, 70'i sağlıklı toplam 143 çocuk hastanın % 49,7'sinin erkek, % 50,3'ünün ise kız olduğu saptandı. Yaş ortalaması, Down Sendromlu çocuklarda,  $9,12 \pm 1,70$ , sağlıklı çocuklarda da  $9,39 \pm 1,71$ 'di. Yaş ve cinsiyet göz önünde bulundurulduğunda Down Sendromlu çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ).

#### 3.1. Anket Formlarının Değerlendirilmesi

Annelerin eğitim düzeyleri ile çocuğun karyojenik gıda alım sıklığı ve fırçalama alışkanlıkları incelendiğinde, Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Grafik-3.1, 3.2 ve 3.3) ( $p>0,05$ ).

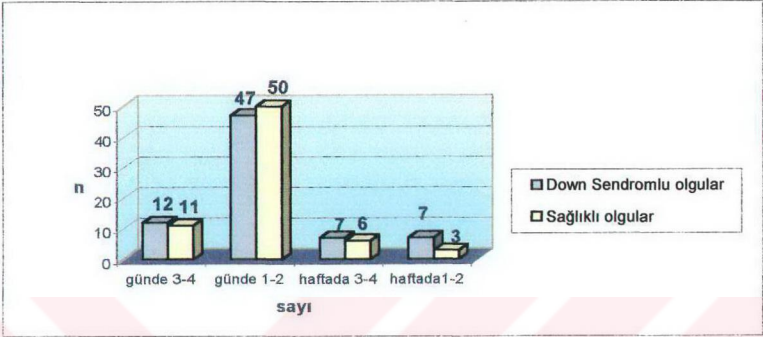
**Grafik-3.1.** Annelerin eğitim düzeyleri



( $p=0,117$ )

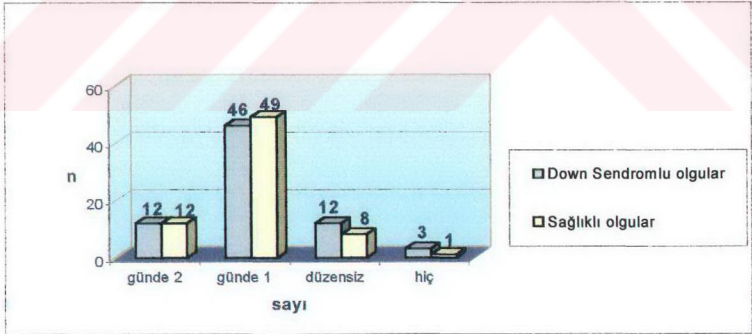


**Grafik-3.2.** Çocukların karyojenik gıda alım sıklığı



( $p=0,626$ )

**Grafik-3.3.** Çocukların diş fırçalama alışkanlığı



( $p=0,608$ )

Annelerin eğitim düzeyi, çocuklarda karyojenik gıda alım sıklığı ve fırçalama alışkanlığı ile çürük durumu (çürüksüz, az çürüklü, çok çürüklü) arasındaki ilişki incelendiğinde, her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ( $p>0,05$ ).

### 3.2. İntraoral Muayene

DMFT, DMFS, dft, dfs ve plak indeksi değerleri, 7, 8-10 ve 11-12 yaş gruplarına göre değerlendirilen Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklara ait dental bulgular Tablo-3.1, 3.2 ve 3.3'de verilmiştir.

**Tablo-3.1.** 7 yaş grubu hastalara ait dental bulgular

	Down Sendromlu olgular	Sağlıklı olgular	p
n	17	12	
<b>DMFT</b>	0,18 ± 0,39	0,50 ± 0,67	0,263
<b>DMFS</b>	0,18 ± 0,39	0,58 ± 0,79	0,227
<b>dft</b>	1,59 ± 1,33	3,17 ± 1,99	0,027
<b>dfs</b>	1,82 ± 2,10	5,00 ± 3,46	0,021
<b>Plak</b>	2,29 ± 0,69	1,58 ± 0,79	0,030

7 yaş grubunda, DMFT ve DMFS indeksi değerlerinde, Down Sendromlu çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. dft ve dfs değerlerinin, Down Sendromlu çocuklarda sağlıklı çocuklara oranla

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu, plak indeksi değerlerinin de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi.

**Tablo-3.2.** 8-10 yaş grubu hastalara ait dental bulgular

	Down Sendromlu olgular	Sağlıklı olgular	p
<b>n</b>	38	37	
<b>DMFT</b>	0,71 ± 0,65	2,51 ± 1,64	0,00
<b>DMFS</b>	0,74 ± 0,69	3,05 ± 2,34	0,00
<b>dft</b>	0,92 ± 0,85	3,32 ± 2,43	0,00
<b>dfs</b>	0,92 ± 0,85	5,03 ± 3,67	0,00
<b>Plak</b>	2,42 ± 0,68	1,62 ± 0,76	0,00

8-10 yaş grubunda, DMFT, DMFS, dft ve dfs indeksi değerlerinin Down Sendromlu çocuklarda, sağlıklı çocuklara oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu, plak indeksi değerlerinin de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı.

**Tablo-3.3.** 11-12 yaş grubu hastalara ait dental bulgular

	Down Sendromlu olgular	Sağlıklı olgular	p
<b>n</b>	18	21	
<b>DMFT</b>	1,72 ± 0,75	4,29 ± 2,05	0,00
<b>DMFS</b>	1,83 ± 0,92	5,71 ± 3,66	0,00
<b>dft</b>	0,72 ± 1,27	1,19 ± 1,21	0,183
<b>dfs</b>	0,78 ± 1,48	1,95 ± 2,42	0,140
<b>Plak</b>	2,44 ± 0,70	1,43 ± 0,68	0,00

11-12 yaş grubunda, dft ve dfs indeksi değerlerinde, Down Sendromlu çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. DMFT ve DMFS değerlerinin Down Sendromlu çocuklarda, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu, plak indeksi değerlerinin de, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi.

Tüm yaş gruplarında, çürük durumu ile plak indeksi değerleri arasında pozitif korelasyon saptandı ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Tükürük Örneklerinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen çocuklardan alınan tükürük örneklerinde, tükürük akım hızı, pH'sı, tamponlama kapasitesi ile sIgA, *S.mutans* ve *Lactobacillus* değerleri incelendi (Tablo-3.4 ve 3.5).

#### 3.3.1. Tükürük akım hızı, pH'sı, tamponlama kapasitesi

**Tablo-3.4.** Çocuklarda tükürük akım hızı, pH ve tamponlama kapasitesi değerleri

Durum	n	Akım hızı	pH	Tamponlama kapasitesi
Down Sendromlu olgular	73	1,050 ± 0,165	7,063 ± 0,132	4,458 ± 0,314
Sağlıklı olgular	70	1,037 ± 0,174	7,059 ± 0,152	4,483 ± 0,319
p		0,928	0,355	0,990



Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklar arasında, tükürük akım hızı, pH'sı ve tamponlama kapasitesi değerlerinde, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ).

Çürük durumu ile tükürük tamponlama kapasitesi arasında, negatif ilişki varlığı tespit edilirken; tükürük akım hızı ve pH'sı arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

### 3.3.2. sIgA, *S.mutans* ve *Lactobacillus* değerleri

**Tablo-3.5.** Çocuklarda sIgA, *S.mutans* ve *Lactobacillus* değerleri

Durum	n	sIgA (mg/L)	<i>S.mutans</i> (cfu/ml)	<i>Lactobacillus</i> (cfu/ml)
Down Sendromlu olgular	73	369,93±244,21	6,2x10 <sup>6</sup> ±1,5x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>6</sup> ±9,9x10 <sup>6</sup>
Sağlıklı olgular	70	127,56±61,92	7,3x10 <sup>6</sup> ±1,4x10 <sup>6</sup>	4,6x10 <sup>6</sup> ±1,2x10 <sup>6</sup>
p		0,022	0,117	0,045

Down Sendromlu çocuklarda, sIgA değerinin, sağlıklı çocuklara oranla, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu, *S.mutans* değerinin, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha düşük olduğu, *Lactobacillus* değerinin, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı.

Çürük durumu ile *S.mutans* değeri arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmezken; sIgA değeri arasında negatif, *Lactobacillus* değeri arasında da pozitif ilişki varlığı tespit edildi.

### 3.4. İdentifikasyon:

#### 3.4.1. Mikroskopik inceleme

Çalışmaya dahil edilen *S.mutans* izolatlarının ve *S.mutans* ATCC 25715, serotip c referans suşunun mikroskopik karakteristikleri ve gram reaksiyonları, gram boyama ile incelendi. İzolatların 0,5-0,75 µm çapında, gram pozitif kok, çiftler veya kısa, orta uzunlukta zincirler oluşturduğu belirlendi. Mikroskopik özellikler; referans suş ile uyumlu bulundu.

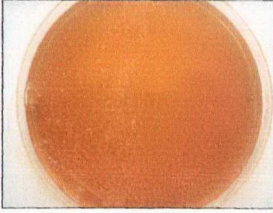
#### 3.4.2. Koloni morfolojilerinin referans suş ile karşılaştırılması

Olası *S.mutans* kolonileri, TYCSB besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonrasında, sınırları düzensiz, buzlu cam görüntüsüne sahip sert yapılı kolonilerin morfolojileri, referans suşun morfolojisi ile karşılaştırılarak belirlendi (Resim-3.1). MRS agar besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonrasında, tipik *Lactobacillus* kolonileri tespit edildi (Resim-3.2). İnkübasyon sonrası, 30-300 bakteri kolonisi (CFU, colony forming units) içeren petrilerin sayımları yapıldı. Elde edilen bakteri sayıları, seyreltme faktörleriyle çarpılarak, tükürük örneğindeki bakteri sayısı hesaplandı.



**Resim-3.1.** TYCSB agar

besiyerinde üreyen *S. mutans* izolatları

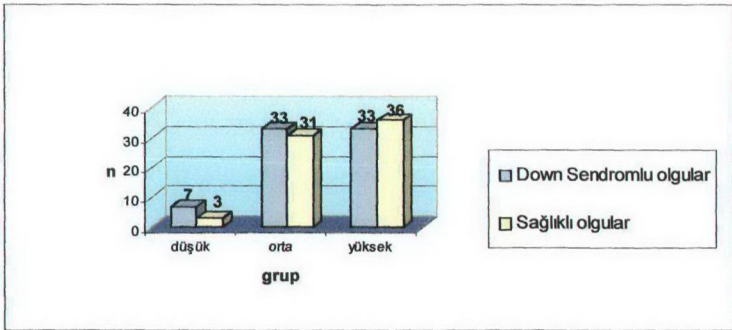


**Resim-3.2.** MRS agar besiyerinde üreyen *Lactobacillus* izolatları

Çalışmamızda, Down Sendromlu 7 çocuğa ait tükürük örneğinde, TYCSB agar besiyerinde, *S.mutans* izole edilmedi. Sağlıklı çocuklara ait tükürük örneklerinin tümünde, *S.mutans* varlığı gözlemlendi. 136 tükürük örneğinde, tipik *S.mutans* kolonileri saptandı. Elde edilen izolatların fenotipik incelemeleri yapıldı. MRS agar besiyerine ekim yapılan tükürük örneklerinin tümünde, tipik *Lactobacillus* kolonileri tespit edildi.

Down Sendromlu ve sağlıklı çocukların tükürük örneklerinden izole edilen *S.mutans* ve *Lactobacillus*'ların gruplara göre dağılımı, Grafik-3.4 ve 3.5'de görülmektedir.

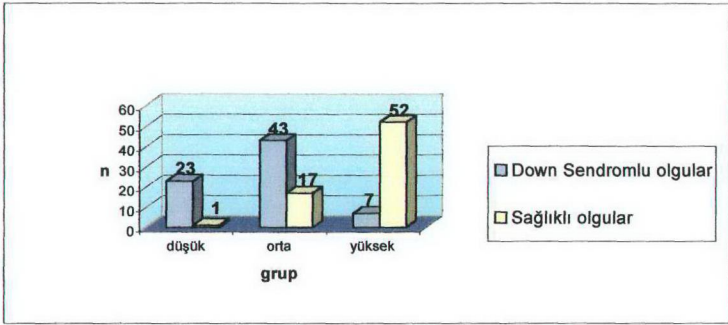
**Grafik-3.4.** Çocuklarda *S.mutans* koloni sayısına göre yapılan gruplandırma



(p=0,221)



**Grafik-3.5.** Çocuklarda *Lactobacillus* koloni sayısına göre yapılan gruplandırma



( $p=0,00$ )

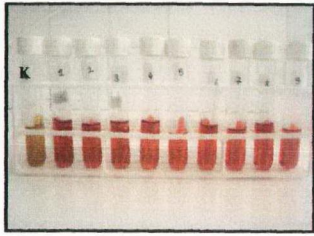
Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklar arasında *S.mutans*'ın gruplara göre dağılımında, bir farklılık gözlenmezken; *Lactobacillus* gruplarının, Down Sendromlu çocuklarda, sağlıklı çocuklara oranla, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı.

## 2.6. Biyokimyasal Test Sonuçları

136 *S.mutans* izolatında biyokimyasal testlerin gerçekleştirilmesi sırasında, *S.mutans* ATCC 25715 serotip c referans suşu kontrol olarak kullanıldı.

### 2.6.1. Asit üretimi-Karbonhidratların Fermentasyonu

İzolatların (%1w/v), mannitol, sorbitol, melibiyoz, rafinoz, nişasta, inülin ve dekstrin içeren besiyerlerinde asit üretilip üretilmediği, pH indikatör boyaları ile gösterildi. 6 izolat dışında, tüm izolatların, mannitol, sorbitol, melibiyoz, rafinoz ve inülinde asit ürettiği, nişasta ve dekstrinden üretilmediği gözlemlendi (Resim-3.3 (a)(b)).



(a)



(b)

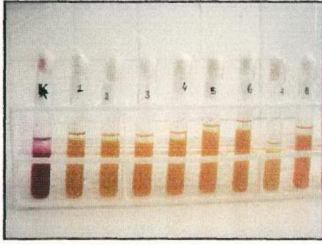
**Resim-3.3.** (a) *S.mutans*'ın, mannitol, sorbitol, melibiyoz, rafinoz ve inülin fermentasyonu sonucu oluşan görüntü (b) *S.mutans*'ın, dekstrin ve nişasta fermentasyonu sonucu oluşan görüntü (K: Kontrol, 1: referans suş, 2-5: Down Sendromlu çocuklara ait *S.mutans* örnekleri, 6-9: Sağlıklı çocuklara ait *S.mutans* örnekleri)

### 2.6.2. Arjinin Hidrolizi

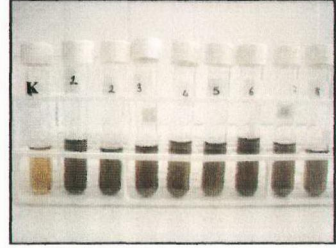
136 izolatın yedi gün sonunda, besiyerinde herhangi bir renk değişimi oluşturmadıkları gözlemlendi. İzolatların arjinin dehidrolaz aktivitesi, negatif olarak değerlendirildi (Resim-3.4 (a)).

### 2.6.2. Eskülin Hidrolizi

24-48 saatlik inkübasyon sonunda, 6 izolat dışında örneklerin tümünde, kahverengimsiyah renk oluşumu gözlemlendi ve eskülin testi pozitif olarak değerlendirildi (Resim-3.4 (b)).



(a)



(b)

**Resim-3.4. (a)** *S. mutans*'ın, arjinin hidrolizi sonucu oluşan görüntü **(b)** *S. mutans*'ın, eskülin hidrolizi sonucu oluşan görüntü (K: Kontrol, 1: referans suş, 2-5: Down Sendromlu çocuklara ait *S. mutans* örnekleri, 6-8: Sağlıklı çocuklara ait *S. mutans* örnekleri)

#### 2.6.4. Voges-Proskauer Testi (Glikozdan Aseton Üretimi):

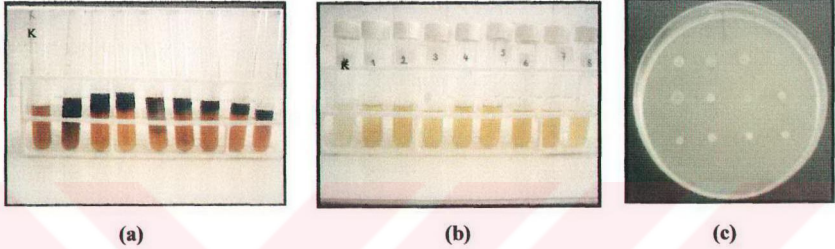
48 saatlik inkübasyon sonrası, tüp üzerine ilave edilen alfa-naftol ve potasyum hidroksit çözeltileri ile oluşan, kırmızı renge doğru pembeleşme sonucu, tüm izolatların Voges Proskauer testi pozitif olarak değerlendirildi (Resim-3.5 (a)).

#### 2.6.5. Katalaz testi:

Tüm izolatların 48 saatlik sıvı kültürleri üzerine, hidrojen peroksit damlatıldı. 12 izolat dışında izolatların tümü, katalaz negatif olarak değerlendirildi (Resim-3.5 (b)).

### 2.6.6. Basitrasin Dirençliliği:

Tüm izolatların, 2U/ml basitrasin içeren TYCSB agarda basitrasin dirençliliği ve tipik koloni oluşumları değerlendirildi. 12 izolat dışında, izolatların tümünün basitrasine dirençli olduğu belirlendi (Resim-3.5 (c)).



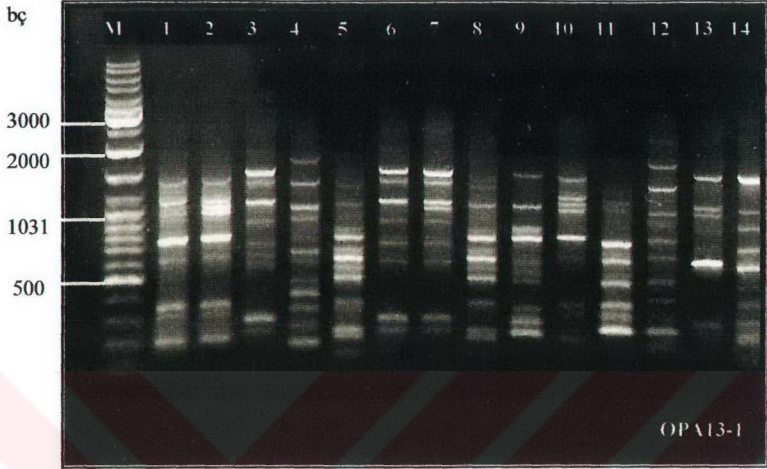
**Resim-3.5.** (a) *S. mutans*'ın, glikozdan aseton üretimi sonucu oluşan görüntü (b) Katalaz testi sonucu oluşan görüntü (K: Kontrol, 1: referans suş, 2-4: Down Sendromlu çocuklara ait *S. mutans* örnekleri, 5-8: Sağlıklı çocuklara ait *S. mutans* örnekleri) (c) Basitrasin dirençliliği testi sonucu oluşan görüntü

Biyokimyasal testler sonucunda, *S. mutans*'ın biyokimyasal özellikleri ile uyumlu bulunmayan, 12 izolat (altısı Down Sendromlu gruba, altısı da sağlıklı gruba ait) çalışma dışı bırakıldı. Fenotipik özelliklerine göre, 124 izolat olası *S. mutans* olarak değerlendirildi.

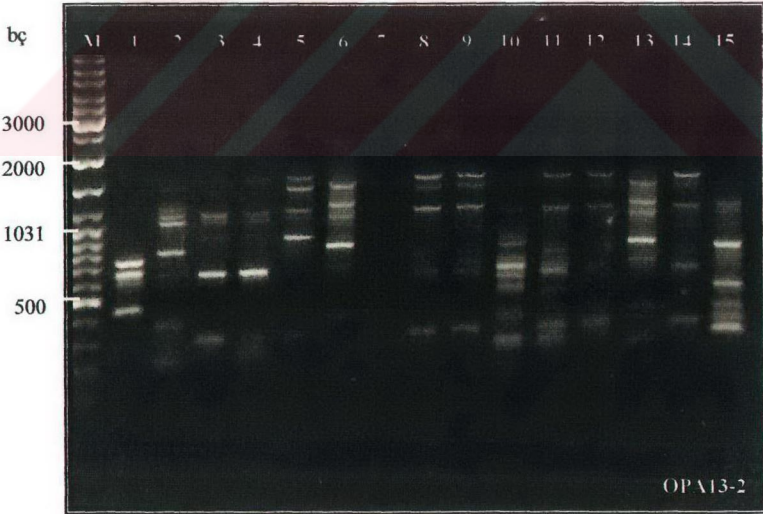
124 izolattan ve *S. mutans* ATCC 25175, serotip c referans suşundan DNA ekstraksiyonu yapıldı. AP-PCR yöntemi ile gruplar arası genotipik farklılık incelendi.

PCR ürünlerinin en iyi çoğaltılma işleminin, 3,6 mM'lık  $MgCl_2$  konsantrasyonunda olduğu gözlemlendi.

OPA-13 primeri ile elde edilen parmak izleri

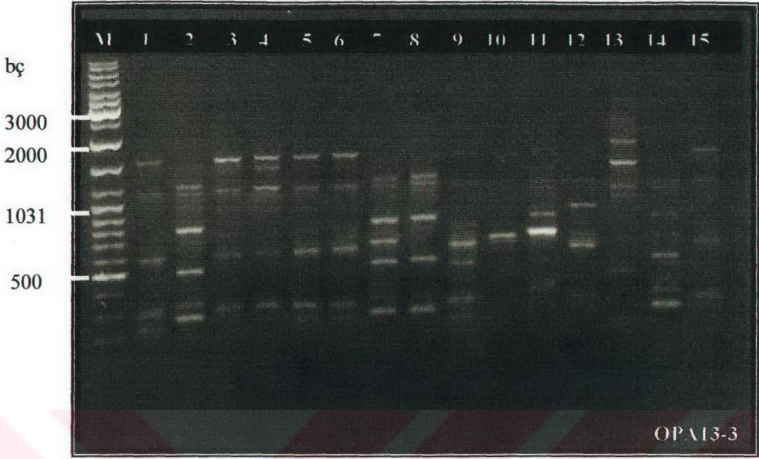


**Resim-3.10.** M: Markör (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix), 1-13: Kontrol grubuna ait suşlar, 14: *S. mutans* ATCC 25175 serotip c referans suş

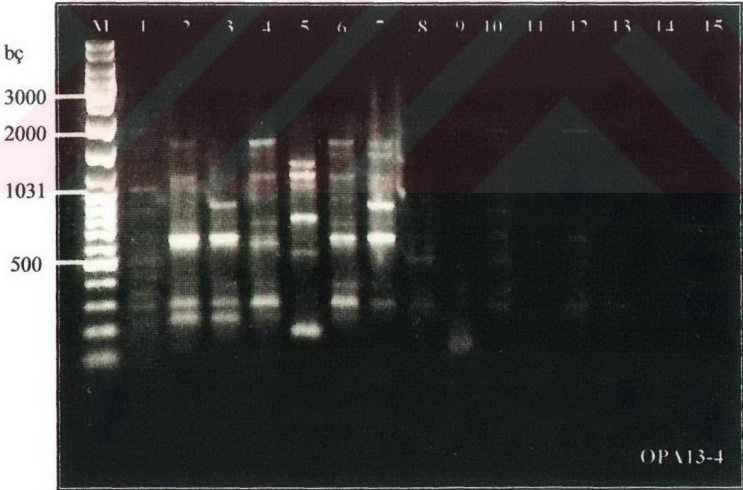


**Resim-3.11.** M: Markör, 1-15: Kontrol grubuna ait suşlar

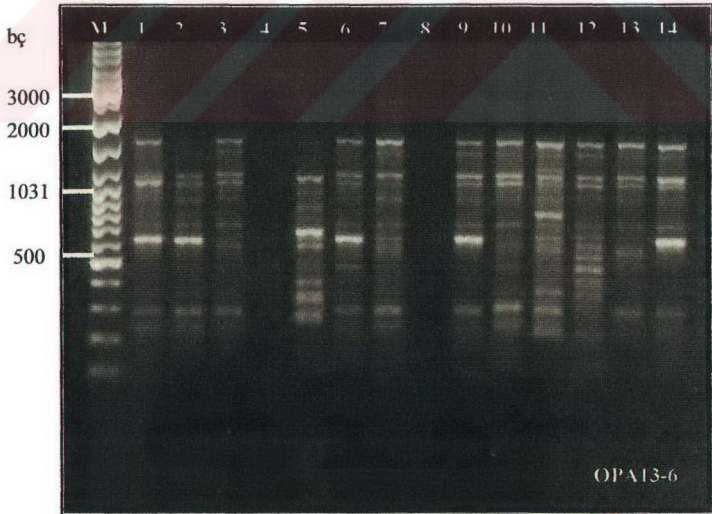
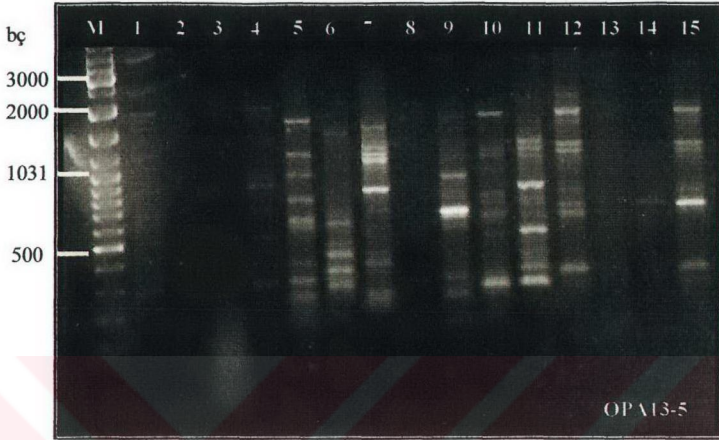


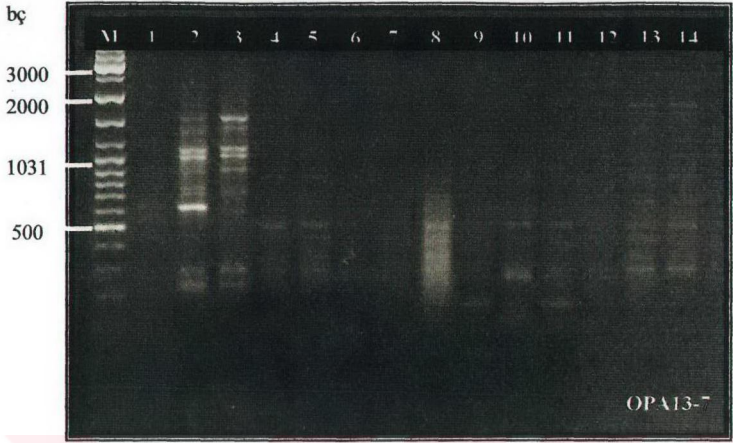


**Resim-3.12. M: Markör, 1-15: Çalışma grubuna ait suşlar**



**Resim-3.13. M: Markör, 1-14: Kontrol grubuna ait suşlar 15: Kör**



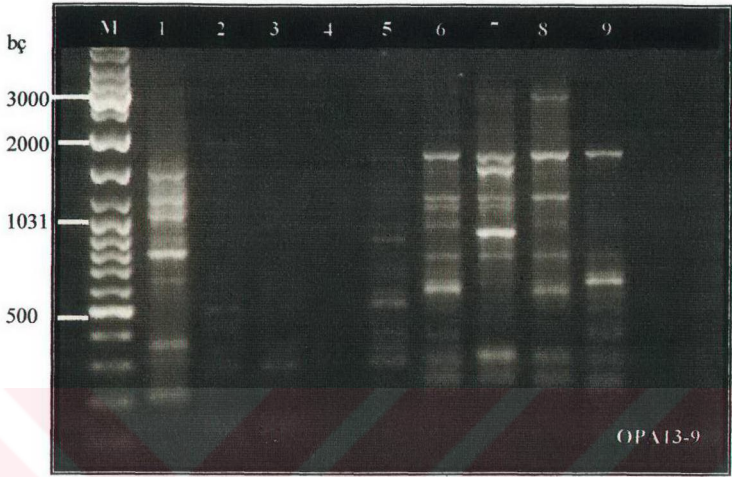


**Resim-3.16.** M: Markör, 1-14: Çalışma grubuna ait suşlar

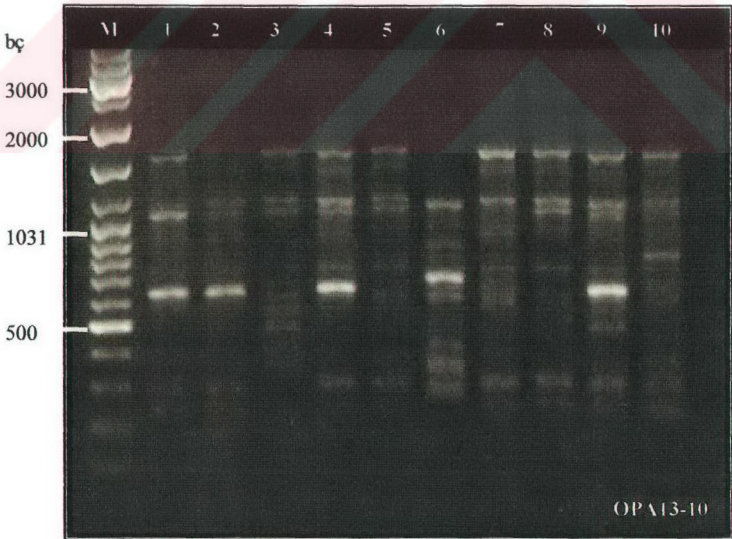


**Resim-3.17.** M: Markör, 1-15: Çalışma grubuna ait suşlar



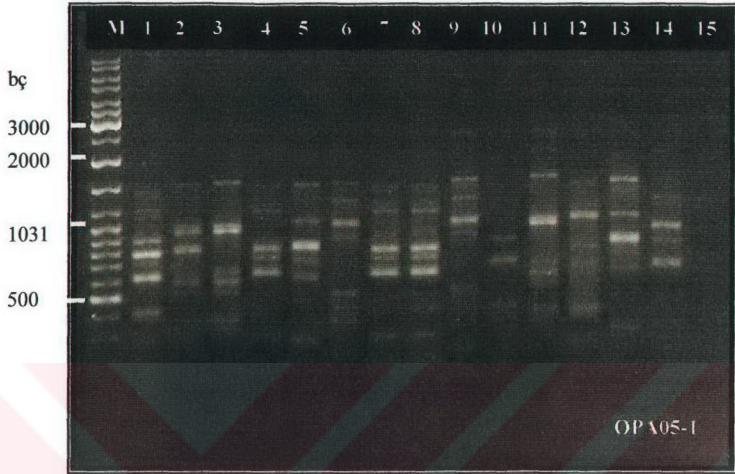


**Resim-3.18.** M: Markör, 1-3, 6-8: Kontrol grubuna ait suşlar, 4,5: Çalışma grubuna ait suşlar, 9: *S.mutans* ATCC 25175 referans suş

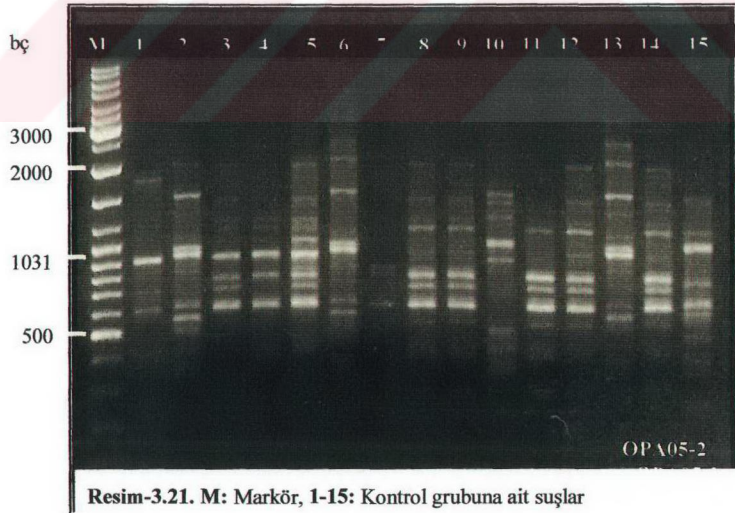


**Resim-3.19.** M: Markör, 1,7-10: Kontrol grubuna ait suşlar, 2-6: Çalışma grubuna ait suşlar

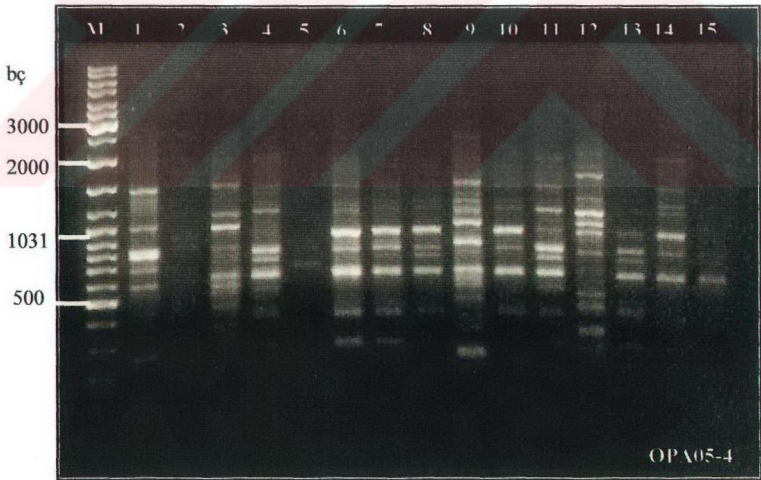
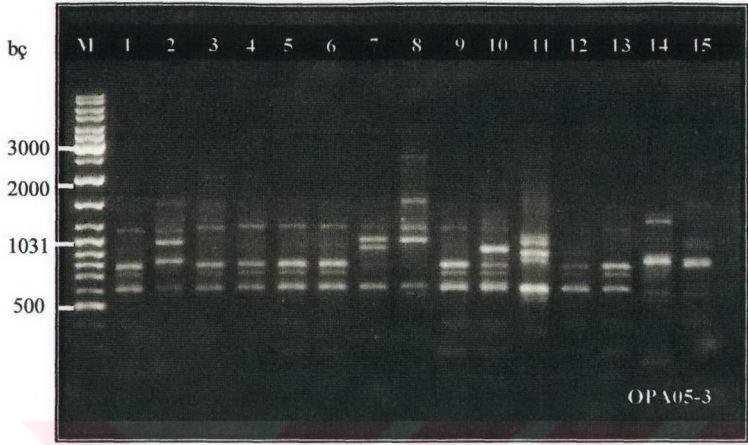
**OPA-05 primeri ile elde edilen parmak izleri**

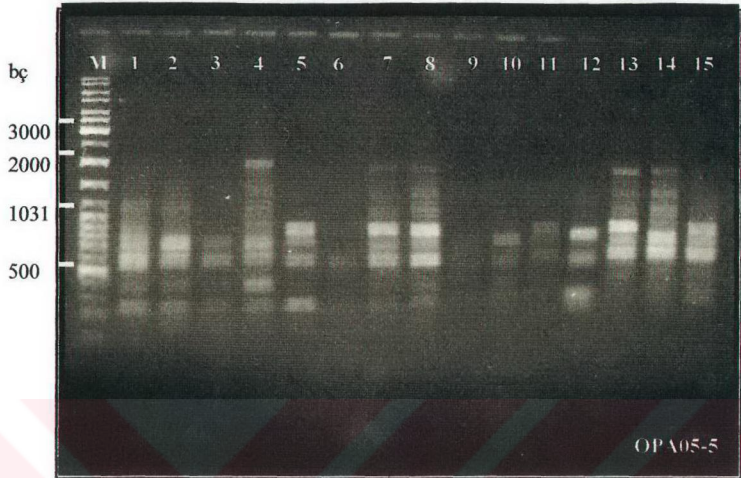


**Resim-3.20.** M: Markör (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix), 1: *S.mutans* ATCC 25175 referans suş, 2-14: Kontrol grubuna ait suşlar, 15: Kör

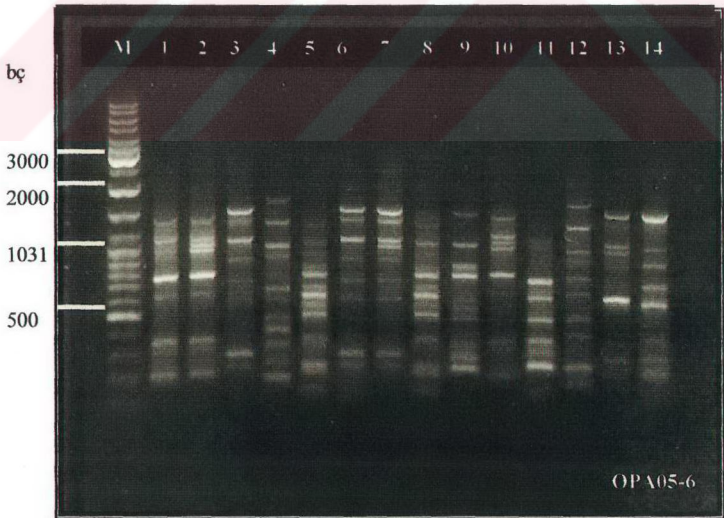


**Resim-3.21.** M: Markör, 1-15: Kontrol grubuna ait suşlar



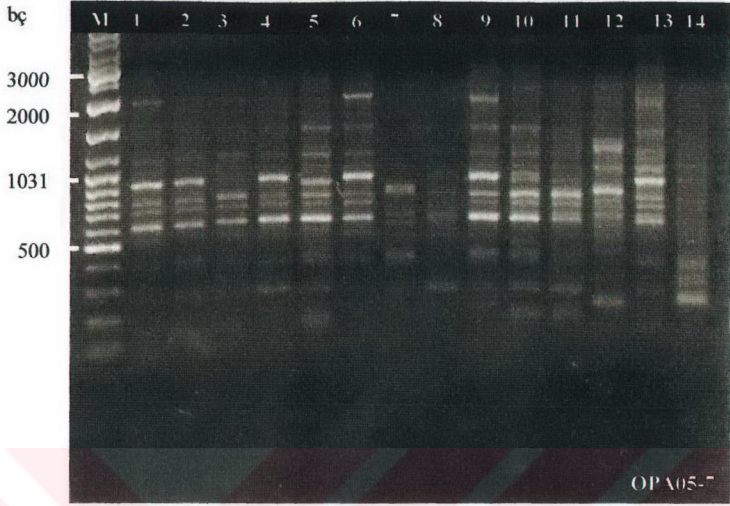


**Resim-3.24.** M: Markör, 1-3: Kontrol grubuna ait suşlar, 4-15: Çalışma grubuna ait suşlar



**Resim-3.25.** M: Markör, 1-14: Çalışma grubuna ait suşlar

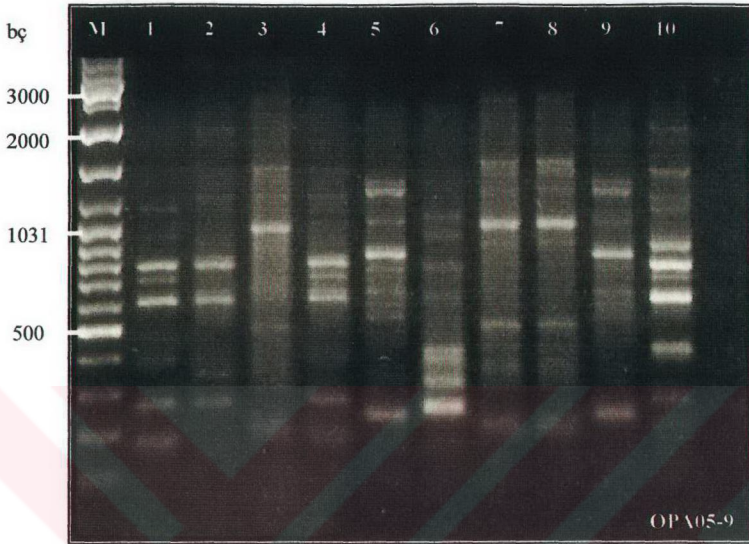




**Resim-3.26.** M: Markör, 1-14: Çalışma grubuna ait suşlar



**Resim-3.27.** M: Markör, 1-5,7,8,10,11,13,14: Kontrol grubuna ait suşlar,  
6,9,12,15: Çalışma grubuna ait suşlar



**Resim-3.28.** M: Markör, 1,4,6-9: Çalışma grubuna ait suşlar, 2,3,5: Kontrol grubuna ait suşlar, 10: *S.mutans* ATCC 25175 referans suş

Çalışmamızda, Bio Doc Analyze programına göre, OPA-13 primeri ile elde edilen bantların büyüklüğünün, Down Sendromlu çocuklarda 164 ile 2491 baz çifti arasında, sağlıklı çocuklarda 137 ile 3573 baz çifti arasında olduğu gözlemlendi. OPA-05 primeri ile elde edilen AP-PCR bantlarının büyüklüğünün Down Sendromlu çocuklara ait izolatlarda 66 ile 3046 baz çifti arasında, sağlıklı çocuklara ait izolatlarda 72 ile 3500 baz çifti arasında olduğu saptandı.

Elektroforez sonucuna göre, tüm baz çiftleri incelendiğinde, OPA-13 primeri ile Down Sendromlu çocuklardan izole edilen *S.mutans* izolatlarına ait 14, sağlıklı çocuklara ait 11 farklı alt grup elde edildi. Tüm baz çiftleri dikkate alındığında, elde

edilen alt gruplar arasında Down Sendromlu çocuklarda baskın olarak saptanan alt grubun (bç 3000, 2500, 2000, 1500, 900, 800, 700, 600, 500, 400) oranının %60 olduğu, sağlıklı çocuklarda baskın alt grubun (bç 3500, 2000, 1500, 1200, 800, 600, 500, 400, 300, 200) oranının ise %43 olduğu tesbit edildi. Gruplar arasındaki bu fark anlamlı bulunurken, her iki grupta baskın olan alt grupların birbirinden farklı olduğu gözlemlendi.

OPA-05 primeri ile Down Sendromlu çocuklardan izole edilen *S.mutans* izolatlarına ait 13, sağlıklı çocuklara ait 14 farklı alt grup elde edildi. Tüm baz çiftleri dikkate alındığında, elde edilen alt gruplardan Down Sendromlu çocuklarda baskın olan alt grubun (bç 3000, 2500, 2000, 1500, 900, 600) %53,4 oranında, sağlıklı çocuklarda baskın olan alt grubun (bç 3500, 2500, 1500, 1200, 1031, 900, 500) da %31,3 oranında olduğu saptandı. Gruplar arasındaki bu fark anlamlı bulunurken, her iki grupta baskın olan alt grupların birbirinden farklı olduğu gözlemlendi.

## TARTIŞMA

Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklarda, çürük görölme sıklığının, karşılaştırmalı olarak incelendiği çalışmamıza, yaşları 7-12 arasında olan, 73'ü Down Sendromlu, 70'i sağlıklı toplam 143 çocuk dahil edildi.

Down Sendromlu çocuklarda diş çürüğü ile ilgili çalışmaların büyük bir kısmında, Down Sendromlu bireylerde diş çürüğü oluşumunun, sağlıklı bireylere oranla daha az gözlendiği belirtilmiştir (9,134,135,165,173). Down Sendromlu ve sağlıklı bireyler arasında çürük görölme sıklığı açısından farklılık saptanmayan çalışmalar da bulunmaktadır (56,145).

DMFT, DMFS, dft ve dfs indeksi değerlerinin üç farklı yaş grubunda incelendiği çalışmamızda, 7 yaş grubunda, dft ve dfs indeksi değerlerinin, 8-10 yaş grubunda, DMFT, DMFS, dft ve dfs değerlerinin ve 11-12 yaş grubunda, DMFT ve DMFS indeksi değerlerinin, Down Sendromlu çocuklarda sağlıklı çocuklara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı. Bulgularımız, literatürdeki birçok çalışmayı destekler niteliktedir.

Çalışmamızın başlangıcında, annenin eğitim düzeyini, çocuğun karyojenik gıda alım sıklığı ve fırçalama alışkanlığı bilgilerini içeren anket formları dolduruldu. Ailelerin eğitim düzeyini araştıran çalışmalarda, eğitim düzeyi yüksek olan ailelerin çocuklarının ağız-diş sağlığı konusunda daha duyarlı oldukları saptanmıştır (85,109). Çalışmamızda, annelerin eğitim düzeyleri incelendiğinde, Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0,117$ ). Eğitim



düzeyle ile çürük durumu arasındaki ilişki incelendiğinde, önceki çalışmalardan farklı olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ( $p>0,05$ ).

Sağlıklı çocuklarda yapılmış olan çalışmalarda, yaygın diş çürüklerinin gözlemlendiği çocuklarda, diş fırçalama alışkanlığının düzensiz olduğu bildirilmiştir (71,109). Çalışmamızda, diş fırçalama alışkanlığı ile çürük durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p>0,05$ ). Bu durum, ailelerden alınan bilgilerin yanıltıcı olabileceğini düşündürmektedir. Down Sendromlu çocuklarda yapılan bir çalışmada; bu çocukların, dişlerini, sağlıklı çocuklara oranla daha az fırçaladığı, fırçalama konusunda aileden alınan yardımın daha az olduğu bildirilmiştir (150). Çalışmamızda, diş fırçalama alışkanlığı incelendiğinde, Down Sendromlu çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ). Bu durumun, iki grup arasında annelerin eğitim düzeyleri arasında farklılık gözlenmemesi ve çalışmamıza dahil edilen Down Sendromlu çocukların özel eğitim görmelerine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Yaygın diş çürükleri, yüksek oranda tatlandırılmış yiyecek tüketen çocuklarda daha sık görülmektedir (71). Down Sendromlu çocukların özel bakım altında olmaları nedeniyle, karyojenik gıda tüketimlerinin az olduğu belirtilmektedir (150,173). Çalışmamızda, Down Sendromlu çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında karyojenik gıda alım sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Çalışmamızda, elde edilen sonuçlar incelendiğinde, Down Sendromlu çocuklarda sağlıklı çocuklara oranla daha az çürük saptanmasının, annelerin eğitim düzeyi ile çocukların karyojenik gıda alım sıklığı ve fırçalama alışkanlıklarına bağlı olmadığı görülmektedir.

Down Sendromlu bireylerle ilgili yapılan çalışmalarda, mental retardasyona bağlı olarak, yetersiz oral hijyen varlığı ve bununla beraber, yüksek plak ve gingival indeks değerleri bildirilmiştir (9,136,150,151,160,171,172). Çalışmamızda da bu çalışmalarla benzer şekilde, Down Sendromlu çocuklarda, plak indeksi değerlerinin, sağlıklı çocuklara oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu saptandı ( $p<0,05$ ). Diş fırçalama alışkanlığı açısından iki grup arasında fark bulunmamasına rağmen, Down Sendromlu çocuklarda plak indeksi değerlerinin anlamlı düzeyde yüksek saptanması, bu çocuklarda mental retardasyona bağlı olarak fırçalamanın yeterli düzeyde yapılamadığını düşündürmektedir.

Sağlıklı çocuklarda yapılan çalışmalarda, tükürük akım hızı ile çürük arasında negatif bir ilişki varlığı bildirilmiştir (178). Aksine, özellikle stimüle olmuş tükürükte benzer ilişkinin saptanamadığı çalışmalar da bulunmaktadır (93,106,148). Çalışmamızda, tükürük akım hızı ile çürük durumu arasında da anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p>0,05$ ). Literatürde, Down Sendromlu bireylerde, tükürük akım hızının fazla olmasının, daha az çürük gözlenmesinin bir nedeni olduğu öne sürülmektedir (167). Bunun yanında Yarat ve ark. (185) Down Sendromlu bireylerde, tükürük akım hızı değerlerinin, sağlıklı bireylere göre daha düşük olduğunu bildirirken; Cutress (56) ile Shapira ve ark. (165), Down Sendromlu ve sağlıklı bireyler arasında tükürük akım hızı değerlerinde farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklar arasında tükürük akım hızında farklılık gözlenmedi ( $p>0,05$ ). Tükürük akım hızı değerlerinin, çalışmalarda farklılık göstermesinin çalışmalara dahil edilen Down Sendromlu çocukların zeka düzeyine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalarda, Down Sendromlu bireylerde daha az çürük görülmesinin bir diğer nedeni olarak, tükürük pH'sının yüksek olması bildirilmiştir

(9,165). Bunun tersine, Yarat ve ark. (185)'ları, çalışmalarında, Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklar arasında tükürük pH değerlerinde farklılık gözlenmediğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda da bu sonuçlarla uyumlu olarak, Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklar arasında tükürük pH değerlerinde bir farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ). Tükürük pH'sı ile çürük durumu arasında da anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ( $p>0,05$ ).

Sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda, tükürük tamponlama kapasitesi ile DMFT indeksi değerleri arasında, negatif bir ilişki bildirilmiştir (106,144). Çalışmamızda da, önceki çalışmalarla uyumlu olarak, tükürük tamponlama kapasitesi ile çürük durumu arasında negatif bir ilişki saptandı ( $p>0,05$ ). Yarat ve ark. (185)'larının yapmış oldukları çalışmada, Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklar arasında tükürük tamponlama kapasitesinin farklı olmadığı belirtilmektedir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, bu çalışma ile uyum içerisindedir.

Yapılan çalışmalarda, plak ve tükürükteki *S.mutans* ve *Lactobacillus* seviyesi ile çürük arasında pozitif ilişki olduğu belirtilmektedir (113,114). Bunun yanında, Alpöz ve ark. (7)'lerinin yapmış oldukları çalışmada, dmfs değerleri ile tükürük mutans streptokok ve *Lactobacillus* değerleri arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir. Çalışmamızda, çürük durumu ile *S.mutans* değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmezken; *Lactobacillus* değeri arasında pozitif bir korelasyon tespit edildi. Bu durum, *S.mutans*'ın çürük oluşumunda tek başına etkisinin olmadığını, çürüğün multifaktoriyel bir olay olduğunu göstermektedir.

Down Sendromlu bireylerle yapılan çalışmalarda, *S.mutans* koloni sayılarının daha düşük olduğu bildirilmektedir (165,172). Çalışmamızda, Down Sendromlu çocuklarda, *S.mutans* koloni sayılarının, sağlıklı çocuklara göre istatistiksel olarak

anlamli olmasa da daha düşük olduğu, *Lactobacillus* değerlerinin de, Down Sendromlu çocuklarda anlamli düzeyde düşük olduğu saptandı.

Çürük diş saptanmayan, sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda, tükürük IgA değerinin yüksek olduğu ortaya konmuştur (27). DMFS skorları ile total tükürük IgA konsantrasyonu arasında, negatif bir ilişki olduğunu bildirilmiştir (40,82,121). Çalışmamızda da, önceki çalışmalarla uyumlu olarak, sIgA değeri ile çürük durumu arasında negatif bir korelasyon saptandı ( $p<0,05$ ). Cornejo ve ark. (53)'ları, Down Sendromlu bireylerde sIgA değerinin, sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanında, Barr-Agholme ve ark.(16)'larının yapmış olduğu çalışmada, iki grup arasında sIgA değerinde farklılık bulunamamıştır. Çalışmamızda, sIgA değerinin Down Sendromlu çocuklarda anlamli düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ( $p<0,05$ ). Bu durumun, Down Sendromlu çocuklarda, çürüğe karşı savunma mekanizmasında etkisinin olabileceği düşünölmektedir.

Bolton ve Hlava (32), tükürük IgA değerinin *S. mutans*'a karşı savunmada, önemli bir rolü olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, sIgA değeri ile *S.mutans* değerini arasında istatistiksel olarak anlamli bir ilişki gözlenmezken, sIgA değerini ile *Lactobacillus* değerini arasında negatif bir korelasyon saptandı. Çalışmamızda, Down Sendromlu çocuklarda, sIgA değerinin yüksek olmasının çürüğe karşı savunma mekanizmasında etkili olabileceği düşünölmektedir. Çalışmamızda, çürük görülme sıklığının, Down Sendromlu çocuklarda sağlıklı çocuklara oranla daha düşük oranda olması ve *S.mutans* değerlerinde, iki grup arasında farklılık gözlenmemesi; Down Sendromlu çocuklarda çürük oluşumunda daha az etkisi olan *S.mutans* suşlarının kolonize olabileceğini düşöndürmektedir.

Çalışmamızın son bölümünde, Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklarda kolonize olan *S.mutans* suşları arasında klonal bir ilişkinin varlığını araştırmak için, AP-PCR yöntemi ile genotiplendirme yapıldı.

Bio Doc Analyze programı ile OPA-13 primeri ile elde edilen bantların, Down Sendromlu çocuklarda, 164 ile 2491 baz çifti arasında, sağlıklı çocuklarda, 137 ile 3573 baz çifti arasında değişen büyüklüklerde olduğu izlendi. OPA-05 primeri ile elde edilen AP-PCR bantlarının büyüklüğünün Down Sendromlu çocuklara ait izolatlarda, 66 ile 3046 baz çifti arasında, sağlıklı çocuklara ait izolatlarda da, 72 ile 3500 baz çifti arasında olduğu gözlemlendi.

OPA-13 primeri ile Down Sendromlu çocuklardan izole edilen *S.mutans* izolatlarına ait 14, sağlıklı çocuklara ait 11 farklı alt grup elde edildi. Elde edilen alt gruplar arasında Down Sendromlu çocuklarda baskın olarak saptanan alt grubun oranının %60 olduğu, sağlıklı çocuklarda baskın alt grubun oranının ise %43 olduğu tesbit edildi. Gruplar arasındaki bu farklılık anlamlı bulunurken, her iki grupta baskın olan alt grupların birbirinden farklı olduğu gözlemlendi.

OPA-05 primeri ile Down Sendromlu çocuklardan izole edilen *S.mutans* izolatlarına ait 13, sağlıklı çocuklara ait 14 farklı alt grup elde edildi. Elde edilen alt gruplardan Down Sendromlu çocuklarda baskın olan alt grubun %53,4 oranında, sağlıklı çocuklarda baskın olan alt grubun da %31,3 oranında olduğu saptandı. Gruplar arasındaki bu farklılık anlamlı bulunurken, her iki grupta baskın olan alt grupların birbirinden farklı olduğu gözlemlendi.

Bu sonuç, Down Sendromlu çocuklarda kolonize olan *S.mutans* suşlarının, sağlıklı çocuklarda kolonize olanlardan farklı olduğunu göstermektedir.

Literatürde, Down Sendromlu bireylerde çürük oluşumu ile ilgili moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak yapılan bir başka çalışmaya rastlanmamıştır. İleri düzeyde yapılacak olan moleküler genetik çalışmalar, Down Sendromlu bireylerde saptanan yüksek sIgA düzeylerinin nedenine ışık tutabilir. Down Sendromlu olgularımızda, farklı *S.mutans* suşlarının kolonize olmasının ve diş çürüklerinin bu bireylerde daha az görülmesinin, ileri düzeyde yapılacak bu çalışmalarla açıklanabileceği düşünülmektedir.



## SONUÇLAR

Çalışmamızda;

1. Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklarda annenin eğitim düzeyi, çocukların karyojenik gıda alım sıklığı ve fırçalama alışkanlıkları incelendiğinde, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ).
1. 7 yaş grubu çocuklarda dft ve dfs, 8-10 yaş grubunda DMFT, DMFS, dft ve dfs, 11-12 yaş grubunda da DMFT ve DMFS indeksi değerlerinin Down Sendromlu çocuklarda sağlıklı çocuklara oranla anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır ( $p<0,05$ ).
2. Plak indeksi değerlerinin, Down Sendromlu çocuklarda, sağlıklı çocuklara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tesbit edilmiştir ( $p<0,05$ ).
3. Tükürük akım hızı, pH ve tamponlama kapasitesi değerlerinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ).
4. sIgA değerinin Down Sendromlu çocuklarda sağlıklı çocuklara oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır ( $p<0,05$ ).
5. Tükürük *S.mutans* değerlerinin Down Sendromlu çocuklarda, sağlıklı çocuklara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha düşük olduğu, *Lactobacillus* değerlerinin de, Down Sendromlu çocuklarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu tesbit edilmiştir.
7. OPA-13 primeri ile Down Sendromlu çocuklardan elde edilen *S.mutans* izolatlarına ait 14 farklı alt grup, sağlıklı çocuklara ait 11 farklı alt grup elde edildi. Elde edilen alt gruplardan baskın olan alt grubun iki grup arasında farklılık gösterdiği tespit



edildi. OPA-05 primeri ile Down Sendromlu çocuklardan elde edilen *S.mutans* izolatlarına ait 13 farklı alt grup, sağlıklı çocuklara ait 14 farklı alt grup elde edildi. Elde edilen alt gruplardan baskın olan alt grubun iki grup arasında farklılık gösterdiği gözlemlendi.





## ÖZET

Çalışmamızın amacı; Down Sendromlu çocuk hastalarda, çürük görülme sıklığının sağlıklı çocuklarla karşılaştırmalı olarak incelenmesi ve çürüğe neden olan faktörlerin, immunolojik, mikrobiyolojik ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak değerlendirilmesidir.

Yaşları 7-12 olan, 73'ü Down Sendromlu toplam 143 çocuk hastada yapmış olduğumuz çalışmada, annenin eğitim düzeyi, çocuğun karyojenik gıda alım sıklığı ve fırçalama alışkanlıklarının değerlendirildiği anket formları dolduruldu.

Dental bulgular, WHO kriterlerine göre DMFT, DMFS, dft, dfs indeksleri ile, plak indeksi değerleri de Silness ve Løe'nün plak indeksine göre değerlendirildi. DMFT, DMFS, dft, dfs ve plak indeksi değerleri, 7, 8-10 ve 11-12 yaş gruplarına göre incelendi. Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklarda alınan tükürük örneklerinde, tükürük akım hızı, pH'sı, tamponlama kapasitesi ile sIgA, *S. mutans* ve *Lactobacillus* değerleri incelendi. Son olarak, Down Sendromlu ve sağlıklı çocuklarda kolonize olan *S.mutans* suşları arasında klonal bir ilişkinin varlığını araştırmak için, AP-PCR yöntemi ile OPA-05 ve OPA-13 primerleri kullanılarak genotiplendirme yapıldı.

Annenin eğitim düzeyi, çocuğun karyojenik gıda alım sıklığı ve fırçalama alışkanlığı arasında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ).

Down Sendromlu çocuklarda çürük indeksi değerlerinin, sağlıklı çocuklara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu, plak indeksi değerlerinin de anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı ( $p<0,05$ ).

Tükürük akım hızı, pH'sı ve tamponlama kapasitesi değerleri incelendiğinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ). sIgA değeri, Down Sendromlu çocuklarda, sağlıklı çocuklara oranla anlamlı düzeyde yüksek bulunurken, *S. mutans* değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha düşük olduğu ve *Lactobacillus* değerlerinin, anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı.

AP-PCR yöntemi ile yapılan inceleme sonucuna göre; Down Sendromlu çocuklarda kolonize olan *S.mutans* suşlarının, sağlıklı çocuklarda kolonize olan suşlardan farklı olduğu gözlemlendi.

## ABSTRACT

The aim of this study was to compare the caries prevalence between subjects with Down Syndrome and healthy controls and to determine the etiologic factors by using immunological, microbiological and molecular biological methods.

Seventy-three children with Down Syndrome and seventy healthy, a total of 143 children aged between 7-12 years old were enrolled in this study. Education levels of the mothers, consumption of cariogenic foods and tooth brushing habits of children were recorded.

DMFT, DMFS, dft and dfs scores were assessed according to WHO criteria, plaque indices were determined by using Silness & L oe plaque index. DMFT, DMFS, dft and dfs scores were evaluated in three age groups (7, 8-10 and 11-12 years). From saliva samples taken from all Down Syndrome and healthy group, salivary flow rate, pH, buffering capacity and sIgA, *S.mutans* and *Lactobacillus* levels were evaluated. At the end of the study, to determine the clonal relation of *S.mutans* between Down Syndrome and healthy group, AP-PCR method was used with OPA-05 and OPA-13 primers.

Education levels of the mothers, consumption of cariogenic foods and tooth brushing habits of children were not found different between two groups ( $p>0.05$ ).

Caries scores were found significantly lower in Down Syndrome group while plaque scores were significantly higher ( $p<0.05$ ).

Salivary flow rate, pH and buffering capacity were not significantly different in both groups ( $p>0.05$ ). sIgA levels were found significantly higher in Down Syndrome group ( $p<0.05$ ). *S.mutans* levels were lower in Down Syndrome group, but this difference was not statistically significant. On the other hand, *Lactobacillus* levels were significantly lower in Down Syndrome group.

It was found that the genetic structure of *S.mutans* was different in the Down Syndrome group than healthy group.



## KAYNAKLAR

1. Alaluusua, S., Alaluusua, S.J., Karjalainen, J. et al. (1994). The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children, *Arch Oral Biol*, 39: 467-471
2. Alaluusua, S., Kleemola-Kujala, E., Nyström, M. et al. (1987). Caries in the primary teeth and salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* levels as indicators of caries in permanent teeth, *Pediatr Dent*, 9: 126-130
3. Alam, S., Brailsford, S. R., Whiley, R. A. and Beighton, D. (1999). PCR-Based Methods for Genotyping Viridans Group Streptococci, *J Clin Microbiol*, 37: 2772-2776
4. Allaker, R. P., Seddon, S. V., Tredwin, C., and Lynch, E. (1998). Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of the *SpaP* gene in teeth rendered caries free, *J Dent*, 26: 443-445
5. Alpagot, T., Doğangün, R., Çağlayan, F. ve ark. (1987). 35-45 yaş arasındaki periodontal hastalıklı bireylerde diş çürüğü oranı ve parotis salyası akış hızı, pH ve Ca değerlerinin çürükle ilişkisinin incelenmesi, *AÜ. Diş Hek Derg*, 1: 27-34
6. Alpoz, A. R., Eronat, C. (1997). Taurodontism in children associated with trisomy 21 syndrome, *J Clin Pediatr Dent*, 22: 37-39
7. Alpöz, A. R., Schaeken, M. J. M., Eronat, C. (1996). Hollanda'da yaşayan 3-6 Yaş Grubu Türk Çocuklarında Tükürükte Mutans Streptokokları ve Laktobasiller ile diş plağında mutans streptokok türlerinin dağılımı, *İÜ Dişhek Fak Derg*, 30: 99-104

8. Alpöz, R. (1994). Klorheksidin Verniklerinin Çocuklarda Dental Plak Florasına Etkileri, Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Doktora Tezi
9. Amano, A., Kishima, T., Kimura, S., and Takiguchi, M. (2000). Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome, *J Periodontol*, 71: 249-255
10. Anđ, Ö. (1981). Ağız Mikrobiyolojisi, İkinci baskı, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, 332-355
11. 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
12. Apak, M.Y. (2002). Tıbbi Genetik ve Genetik Hastalıklar, Ed. Neyzi, O., Ertugrul, T.Y., Pediatri, 3. Baskı, Cilt I, 135-162, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul
13. Arı, Ş. (1999). DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması, Bölüm 5, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Ed. Temizkan, G., Arda, N, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 57-67
14. Ata, P. (1982). Konservatif Diş Tedavisi, İstanbul, Yenilik Basımevi, 109-121
15. Balakrishnon, M., Simmonds, R. S., Tagg, J. R. (2001). Diverse Activity Spectra of Bacteriocin-Like Inhibitory Substances Having Activity against Mutans Streptococci, *Caries Res*, 35: 75-80
16. Barr-Agholme, M., Dahllöf, G., Modeer, T. et al. (1998). Periodontal conditions and Salivary Immunoglobulins in Individuals with Down Syndrome, *J Periodontol*, 69:1119-1123
17. Bayırlı, G., Şirin, Ş. (1983). Konservatif Diş Tedavisi, İstanbul, Dünya Tıp Kitabevi, 269-318

18. Becker, M. R., Paster, B. J., Leys, E. J., and Moeschberger, M. L. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries, *J Clin Microbiol*, 40: 1001-1009
19. Beighton, D., Hardie, J. M., Whiley, R. A. (1991). A Scheme For The Identification of Viridans Streptococci, *J Med Microbiol*, 35: 367-372
20. Beighton, D., Hellyer, P. H., Lynch, E. J. R., and Heath, M. R. (1991). Salivary levels of mutans streptococci, *Lactobacilli*, yeasts, and root caries prevalence in non-institutionalized elderly dental patients, *Community Dent Oral Epidemiol*, 19: 302-307
21. Beighton, D., Rippon, H.E., Thomas, H.E. (1987). The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of 5-to-8 year old Hampshire school children, *Br Dent J*, 162: 103-106
22. Beighton, D., Russell, R. R. B., Whiley, R. A. (1991). A Simple Biochemical Scheme For The Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, *Caries Res*, 25:174-178
23. Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Atlas, R.M. (1991). Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction and other methods and their application, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 26: 301-334
24. Belkum, A. V. (1994). DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR, *Clin Microbiol Rev*, 7: 174-184
25. Ben-Aryeh, H., Roll, N., Lahav, M., et al. (1989). Effect of exercise on salivary composition and cortisol in serum and saliva in man, *J Dent Res*, 11: 1495-1497



26. Bender, G.H., Sutton, S.V., Marquis, R.E. (1986). Acid tolerance, proton permeabilities and membrane ATPases of oral streptococci, *Infect Immun*, 53:331-338
27. Benderli, Y., Erdilek, D., Koray, F., et al. (2000). The relation between salivary IgA and caries in renal transplant patients, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 89: 588-593
28. Bentley, R.W., Leigh, J.A. (1995). Development of PCR-based hybridization protocol for identification of streptococcal species, *J Clin Microbiol*, 33:1296-1301
29. Bergdahl, M. (2000). Salivary flow and oral complaints in adult dental patients, *Community Dent Oral Epidemiol*, 28: 59-66
30. Birkhed, D., Heintze, U. (2000). Salivary Secretion Rate, Buffer Capacity, and pH. Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology Vol I, Ed. Tenovuo, J.O. Chapter 2, CRC Press, Inc., N.W., Boca Raton, Florida, 25-73
31. Bollet, C., Gevaudan, M.J., de Lamballerie, X. et al. (1991). A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram positive or acid-fast bacteria, *Nucleic Acids Res*, 19: 1955
32. Bolton, R.W., Hlava, G.L. (1982). Evaluation of salivary IgA antibodies to cariogenic microorganisms in children, Correlation with dental caries activity. *J Dent Res*, 61: 1225-1228
33. Botoni, G., Pardini, M., Giannotti, A., et al. (2001). Effect of removable orthodontic appliances on oral colonisation by mutans streptococci in children, *Eur J Oral Sci*, 109: 388-392
34. Bratic, M.B. (2000). Clinical significance of analysis of immunoglobulin A levels in saliva, *Med Pregl*, 53: 164-168

35. Bratthall, D. (1970). Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*, *Odontol Revy*, 21: 143-152
36. Bratthall, D., Ellen, R. P. (1982). Determination of immunoglobulin A in saliva by immunobead enzyme-linked immunosorbent assay: comparison with single radial immunodiffusion, *J Clin Microbiol*, 16: 766-779
37. Bratthall, D., Serinirach, R., Hamberg, K., and Widerstiom, L. (1997). Immunoglobulin A reaction to oral streptococci in saliva of subjects with different combinations of caries and levels of mutans streptococci, *Oral Microbiol Immunol*, 12: 212-218
38. Burne, R.A. (1998) Oral streptococci...Products of their environment, *J Dent Res*, 77: 445-452
39. Burr, M. D., Pepper, I. L. (1997). Variability in Presence-Absence Scoring of AP-PCR Fingerprints Affects Computer Matching of Bacterial Isolates, *J Microbiol Methods*, 29: 63-68
40. Camling, E., Gahnberg, L., Krasse, B. (1987). The relationship between IgA antibodies to *Streptococcus mutans* antigens in human saliva and breast milk and the numbers of indigenous oral *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 32: 21-25
41. Campus, G., Lumbau, A., Bachisio, S. L. (2000). Caries experience and streptococci and lactobacilli salivary levels in 6-8 year-old Sardinians, *Int J of Paediatric Dentistry*, 10: 306-312
42. Carlsson, P., Olsson, B., Bratthall, D. (1985). The relationship between the bacterium *streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique, *Arch Oral Biol*, 30: 265-268

43. Caufield, P. W., Walker, T. M. (1989). Genetic Diversity Within *Streptococcus Mutans* Evident From Chromosomal DNA Restriction Fragment Polymorphisms, *J Clin Microbiol*, 27: 274-278
44. Caufield, P.W., Cutter, G.R., Dasanayake, A.P. (1993). Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity, *J Dent Res*, 72: 37-45
45. Caufield, P.W., Warnemuehler, Y., Hansen, J.B. (1982). Familial clustering of the *Streptococcus mutans* cryptic plasmid strain in a dental clinic population, *Infect Immun*, 38: 785-787
46. Cengiz, T. (1990). Endodonti 3. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 110-114
47. Challacombe, S. J. (1980). Serum and Salivary Antibodies to *Streptococcus Mutans* in Relation to the development and treatment of human dental caries, *Arch Oral Biol*, 25: 495-502
48. Challacombe, S. J., Lesley, A., Bergmeler, et al. (1984). Natural Antibodies in man to a protein antigen from the bacterium *Streptococcus mutans* related to dental caries experience, *Arch Oral Biol*, 29: 179-184
49. Clarke, J.K. (1924). On the bacterial factor in the aetiology of dental caries, *Br J Exp Pathol*, 5: 141-147
50. Cohen, M.M., Winer, R.A. (1965). Dental and Facial Characteristics in Down's Syndrome (Mongolism), *J Dent Res*, 44: 197-208
51. Colby, S. M., Harrington, D. J., Russell, R. R. B. (1995). Identification and genetic characterisation of Melibiose-Negative isolates of *Streptococcus mutans*, *Caries Res*, 29: 407-412

52. Cole, A.S., Eastoe, J.E. (1988). *Biochemistry and oral biology*, Butterworth Co. Ltd. Second Edition, Toronto, 475-489
53. Cornejo, L. S., Zak, G. A., de Cattoni, D. S. T., et al. (1996). Buccodental health condition in patients with Down Syndrome on Cordoba City, Argentina, *Acta Odontol Latinoam*, 9:265-279
54. Coykendall, A. L., Lizotte, P. A. (1978). *Streptococcus mutans* isolates identified by biochemical tests and DNA base contents, *Arch Oral Biol*, 23:427-428
55. Cummings, C.W., Fredrichson, J.M., Harker, L.A., et al. (1983). *Anatomy: Otolaryngology Head and Neck Surgery*, Mosby year book inc., second edition, 977-996
56. Cutress, T.W. (1971). Dental caries in trisomy 21. *Arch Oral Biol*, 16: 1329-1344
57. Dasanayake, A. P., Caufield, P. W., Cutter, G. R., et al. (1995). Differences in the Detection and Enumeration of Mutans Streptococci Due to Differences in Methods, *Arch Oral Biol*, 40:345-351
58. Dawes, C. (1984). Inorganic constituents of saliva in relation to caries, *Cariology Today*, 70-74
59. de Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, E. (1960). Cultivation and isolation of all species of *Lactobacillus*. *Appl Bact*, 23:130-135
60. de Soet, J. J., de Graaff, J.(1998). Microbiology of Carious Lesions, *Dent Update*, 25:319-324
61. de Soet, J.J., Nyvad, B., Killian, M. (2000). Strain related acid production by oral streptococci. *Caries Res*, 34:486-490
62. Derman, H. (1966). *Fizyoloji Ders Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kurtulmuş Matbaası, İstanbul, 16-26

63. Dölen, J.G. (1992). İmmünoloji, Sandoz Ürünleri A.Ş.
64. Down, J.L.H. (1866). Observation on an Ethnic Classification of Idiots. In: London Hospital Reports, 3: 259-262
65. Edgar, W.M. O'Mullane, A. (1990). Saliva and Dental Health, *British Dental Journal*, 25:96-98
66. Eltem, R., Ertuğrul F. (2001). Mutans Streptokokların İzolasyonunda Kullanılan Çeşitli Seçici Besiyerlerinin Karşılaştırılması, *İnfeksiyon Dergisi-Turkish Journal of Infection*, 15:199-203
67. Emanuelsson, I. R., Thornqvist, E. (2000). Genotypes of Mutans Streptococci Tend to Persist in Their Host for Several Years, *Caries Res*, 34:133-139
68. Erganiş, O., Öztürk, A. (2003). Oral Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, Nobel Tıp Kitapevleri, Nobel Matbaacılık
69. Ergücü, Z. (2002). Çürüklü ve çürüksüz dişlerden izole edilen *Streptococcus mutans*'ın genotipik ayrımlarının AP-PCR (Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction) yöntemiyle incelenmesi, Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Doktora Tezi
70. Ericsson, Y. (1959). Clinical investigations of the salivary buffering action. *Acta Odontol Scand*, 17: 131-165
71. Eronat, N., Eden, E. (1992). A comparative study of some influencing factors of rampant of nursing caries in preschool children attending the university dental clinic, *J Clin Pediatr Dent*, 4: 275-279

72. Ferguson, D.B., Botchway, C.A. (1979). Circadian variations in flow rate and composition of human unstimulated submandibular saliva, *Arch Oral Biol*, 24: 433-437
73. Franco, E., Saunders, C. P., Roberts, G. J., and Suwanpravit, A. (1996). Dental disease, caries related microflora and salivary IgA of children with severe congenital cardiac disease: an epidemiological and oral microbial survey, *Pediatr Dent*, 18: 228-235
74. Fujiwara, T., Nakano, K., Kawaguchi, M., et al. (2001). Biochemical and Genetic Characterization of Serologically Untypable Streptococcus Mutans Strains Isolated From Patients with Bacteremia, *Eur J Oral Sci*, 109: 330-334
75. Galaviz, L. A. A., Medina, M. D. C. A., Garcia, I. C. E. (2002). Detection of potentially cariogenic strains of Streptococcus mutans using the polymerase chain reaction, *J Clin Ped Dent*, 27: 47-52
76. Garnier, F., Gerbaud, G., Courvalin, P., and Galimand, M. (1997). Identification of Clinically relevant Viridans Group Streptococci To The Species Level by PCR, *J Clin Microbiol*, 35: 2337-2341
77. Gerhardt, P., Ed in Chief, Murray, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R., Eds. (1994). Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society of Microbiology, Washington D.C.
78. Gibbons, R.J., van Houte, J. (1973). On the formation of dental plaques, *J Periodontol*, 44: 347-360
79. Gilmour, M.N., Whittom, T.S., Kilian M., Selander, R.K. (1987). Genetic relationship among the oral streptococci, *J Bacteriol*, 169: 5247-5257

80. Gold, O.G., Jordan, H.V., van Houte, J. (1973). A selective medium for *Streptococcus mutans*, *Arch Oral Biol*, 18: 1357-1364
81. Gregory, R. L., El-Rahman, A. M. A., Avery, D. R. (1998). Effect of restorative treatment on mutans streptococci and IgA antibodies, *Pediatr Dent*, 20: 273-277
82. Gregory, R.L., Michalek, S.M., Filler, S.J., et al. (1985). Prevention of *Streptococcus mutans* colonization by salivary IgA antibodies. *J Clin Immunol*, 5:55-62
83. Grönroos, L. (2000). Quantitative and Qualitative Characterization of Mutans Streptococci in Saliva and in the Dentition, University of Helsinki, Dept. of Pedodontics and Orthodontics, Helsinki. Academic Dissertation
84. Grönroos, L., Alaluusua, S. (2000). Site Specific Oral Colonization of Mutans Streptococci Detected By Arbitrarily Primed PCR Fingerprinting, *Caries Res*, 34: 474-480
85. Gülhan, A., Sandallı, N., Akıncı, T. ve ark. (1986). Ailenin çocuğun diş-ağız sağlığı üzerindeki etkilerinin araştırılması, *IÜ Diş Hek Fak Derg*, 20: 54-63
86. Halinen, S., Sorsa, T., Ding, Y. et al. (1996). Characterization of Matrix Metalloproteinase (MMP-8 and-9) Activities in the Saliva and in Gingival Crevicular Fluid of Children With Down's Syndrome, *J Periodontol*, 67: 748-754
87. Hamada, S., Slade, H.D. (1980). Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbiol Rev*, 44: 331-384
88. Hamilton, I.R., Buckley, N.D. (1991). Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance, *Oral Microbiol. Immunol*, 6: 65-71
89. Hanada, N. (2000). Current Understanding of the Cause of Dental Caries, *Jpn J Infect Dis*, 53: 1-5



90. Hanookai, D., Nowzari, H., Contreras, A., et al. (2000). Herpesviruses and Periodontopathic Bacteria in Trisomy 21 Periodontitis, *J Periodontol*, 71: 376-384
91. Hardie, J. M., Whiley, R. A. (2002). The Genus Streptococci-Oral, The Prokaryotes Chapter 64, Dworkin, M. et al. eds., 3<sup>rd</sup> edition, Newyork, pp:1421-1449
92. Hardie, J.M. (1986). Oral streptococci, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2.Ed., Sneath, P.H:A., Mair,N.S., Sharpe, M.E., Williams & Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Sydney, pp 1054-1063
93. Heintze, U., Birkhed, D., Björn, H. (1983). Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated parotis saliva as a function of age and sex, *Swed Dent J*, 7: 227-238
94. Hirasawa, M., Takada, K. (2003). A new Selective Medium for Streptococcus mutans and the Distribution of S.mutans and S.sobrinus and Their Serotypes in Dental Plaque, *Caries Res*, 37: 212-217
95. Houte, J. V. (1994). Role of microorganisms in caries etiology, *J Dent Res*, 73:672-681
96. Humphrey, S. P., Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow and function, *J Prosthet Dent*, 85: 162-169
97. Ida, H., Igarashi, T., Yamamoto, A., et al. (1999). A DNA Probe Specific to *Streptococcus sobrinus*, *Oral Microbiol Immunol*, 14: 233-237
98. Igarashi, T., Ichikawa, K., Yamamoto, A., and Goto, N. (2001). Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the dex genes, *J Microbiol Methods*, 46:99-105

99. Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N. (1996). Direct Detection of *Streptococcus mutans* in Human Dental Plaque By Polymerase Chain Reaction, *Oral Microbiol Immunol*, 5: 294-298
100. Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N. (1996). Rapid identification of mutans streptococcal species, *Microbiol Immunol*, 40: 867-871
101. Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N. (2000). PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*, *J Med Microbiol*, 49: 1069-1074
102. Inanaga, A., Habu, T., Tanaka, E., et al. (1988). Age changes in secretory function of male and female rat parotid glands in response to methoxamine and pilocarpine, *J Dent Res*, 3: 565-573
103. Jacques, N. (1998). Molecular biological techniques and their use to study streptococci in dental caries, *Aust Dent J*, 43: 287-98
104. Jaspers, M. T. (1981). Taurodontism in the Down Syndrome, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 51: 632-636
105. Jenkins, G.N., Hargreaves, J.A. (1989). Effect of eating cheese on Ca and P concentrations of whole saliva and plaque, *Caries Res*, 23: 159-164
106. Kargul B, Yarat A, Tanboga I, Emekli N. (1994). Salivary protein and some inorganic element levels in healthy children and their relationship to caries. *J Marmara Univ Dent Fac*, 2: 434-40.
107. Keyes, P.H. (1960). The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications, *Arch Oral Biol*, 1: 304-320
108. Kikuchi, K., Enari, T., Totsuka, K., and Shimizu, K. (1995). Comparison of Phenotypic Characteristics, DNA-DNA Hybridization results and Results With A

- Commercial Rapid Biochmeical and Enzymatic Reaction System For Identification Of Viridans Group Streptococci, *J Clin Microbiol*, 33: 1215-1222
- 109.Kılınç, G. (1995). Çocuklarda tükürük akım oranı, pH'ı, inorganik elementleri (sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum, inorganik fosfat) ile çürük arasındaki ilişkinin karşılaştırmalı incelenmesi, Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Doktora Tezi
- 110.Kimmel, L., Tinanoff, N. (1991). A modified mitis salivarius medium for a caries diagnostic test. *Oral Microbiol Immunol*, 6: 275-279
- 111.Klug, W.S., Cummings, M.R. (2002). Genetik Kavramlar, Çev.Ed. Prof. Dr. Cihan Öner, Palme Yayıncılık, Ankara, 474-480
- 112.Kocabaş, E.E.H. (2003). *S.mutans*'ın aile içi bireylerden izolasyonu, identifikasyonu ve aile içi geçişinin moleküler biyolojik yöntemlerle saptanması, Ege Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM) Doktora Tezi
- 113.Kohler, B., Bjarnason, S., Finnbogason, S. Y., and Holbrook, W. P. (1995). Mutans Streptococci, lactobacilli and caries experience in 12-year-old Icelandic Urban Children, 1984 and 1991, *Community Dent Oral Epidemiol*, 23: 65-68,
- 114.Koroluk, L. D., Hoover, J. N., Komiyama, K. (1995). The effect of caries scoring systems on the association between dental caries and *Streptococcus mutans*, *ASDC*, 62: 187-191
- 115.Kozai, K., Wang, D.S., Sandham, H.J., Philips, H.I. (1991). Changes in strains of mutans streptococci induced by treatment with chlorhexidine varnish, *J Dent Res*, 70: 252-1257

116. Kugler, J., Breitfeld, I., Tewes, U., and Schedlowski, M. (1996). Excavation of caries lesions induces transient decrease of total salivary immunoglobulin A concentration, *Eur J Oral Sci*, 104:17-20
117. Kulkarni, G.V., Chan, K.H., Sandham, H.J. (1991). An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci, *J Dent Res*, 70:1155-1166
118. Kuramitsu, H.K. (1993). Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics, *Crit Rev Oral Biol and Med*, 4:159-176
119. Kutukculer, N., Aydogdu, S., Caglayan, S., and Yagci, R. V. (1998). Salivary and Gastric Fluid Secretory Immunoglobulin A and Free Secretory Component Concentrations in Children with Helicobacter pylori-positive Gastritis, *Journal of Tropical Pediatr*, 44:178-179
120. Lazzari, E.P. (1976). Dental Biochemistry, Second Edition, Lea & Febiger Philadelphia, 211-240
121. Lehtonen, O.P.J., Grahn, E.M., Stahlberg, T.H., et al. (1984). Amount and avidity of salivary and seru antibodies against Streptococcus mutans in two groups of human subjects with different caries susceptibility. *Infect Immun*, 43: 308-313
122. Li, Y., Caufield, P. W. (1998). Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction Fingerprinting for the Genotyping Identification of Mutans Streptococci from Humans, *Oral Microbiol Immunol*, 13:17-22
123. Li, Y., Caufield, P. W., Emanuelsson, I. R., and 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

- 124.Lindquist, B., Emilson, C.G. (1990). Distribution and prevalence of mutans streptococci in human dentition, *J Dent Res*, 69: 1160-1166
- 125.Lucas, V. S., Beighton, D., Roberts, G. J. (2000). Composition of the oral Streptococcal flora in healthy children, *J Dent*, 28: 45-50
- 126.Maiden, M.F.J., Lai, C.H., Taner, A. (1992) Characteristics of oral Gram-positive bacteria. In: Contemporary oral Microbiology and Immunology. Slots, J., Taubman, M.A., eds. Mosby: St Louis MI, pp. 342-372
- 127.Mancini, G., Carbonara, A., Heremans, J. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2: 235-254
- 128.Mandel, I.D. and Watman, S. (1976). The salivary secretions in health and disease. *Oral Surg*, 8: 25-45
- 129.Marsh, P. D. (1999). Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries, *Dent Clin of North America*, 43: 599-615
- 130.Marsh, P.D., Martin, M.V. (2001). Oral Microbiology- 4.Ed., Bodmin, Cornwall: MPG Books Ltd.,.
- 131.Maslow, J., Mulligan, M.E. (1996). Epidemiological typing systems, *Infect Control Hosp Epid*, 17: 595-604
- 132.Mattos-Graner, R. O., Jin, S., King, W. F., and Chen, T. (2001). Cloning of the Streptococcus mutans gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates, *Infec Immun*, 69: 6931-6941
- 133.Mellanen, L., Sorsa, T., Lahdevirta, J, et al. (2001). Salivary albumin, total protein, IgA, IgG and IgM concentrations and occurrence of some periodontopathogens in HIV-infected patients: a 2-year follow-up study, *J Oral Pathol Med*, 30: 553-559

134. Moellinger, C.E. (1966). Down's Syndrome-A Review of the Recent Literature, *J Missouri Dent Assoc*, 46: 8-13
135. Morinushi, T., Lopatin, D. E., Tanaka, H. (1995). The relationship between dental caries in the primary dentition and anti S.mutans serum antibodies in children with Down's Syndrome, *J Clin Pediatr Dent*, 19: 279-284
136. Morinushi, T., Lopatin, D.E., Poperin, N. V. (1997). The relationship between gingivitis and the serum antibodies to the microbiota associated with Periodontal Disease in Children With Down's Syndrome, *J Periodontol*, 68: 626-631
137. Morisaki, H., Igarashi, T., Yamamoto, A., and Goto, N. (2002). Analysis of a dextran-binding domain of the dextranase of Streptococcus mutans, *Letters in Appl Microbiol*, 35: 223-227
138. Nazif, M. M., Ronalli, D. N. (1988) *Dentistry for Special Patients, Pediatrics Dentistry total patient care*, Chapter 31 Stephen H. Y. Wei ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 569
139. Newbrun, E. (2000). *Cariology-3. Ed.*, Chicago: Quintessence Publishing Co., Inc, 30-47
140. Oho, T., Yamashita, Y., Shimazaki, Y. et al. (2000). Simple and rapid detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in human saliva by polymerase chain reaction, *Oral Microbiol Immunol*, 15: 258-262
141. Okada, M., Soda, Y., Hayashi, F., et al. (2002). PCR detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in dental plaque samples from Japanese pre-school children, *J Med Microbiol*, 51: 443-447
142. Olive, D.M., Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms, *J Clin Microbiol*, 37: 1661-1669

143. Ollila, P., Niemela, M., Uhari, M., and Larmas, M. (1997). Risk factors for colonization of salivary lactobacilli and candida in children, *Acta Odontol Scand*, 55: 9-13
144. Oncag, O., Alpoz, A. R., Eronat, C. (2000). Salivary *Streptococcus mutans*, Lactobacilli levels and buffer capacity in children with esophageal burns, *J Clin Ped Dent*, 24: 149-154
145. Orner, G. (1975). Dental Caries Experience among children with Down's syndrome and their sibs, *Arch Oral Biol*, 20: 627-634
146. Pekovic, D. D., Adamkiewicz, V. W., Gornitsky, M. (1988). Immunoglobulins in Human Dental Caries, *Arch Oral Biol*, 33: 135-141
147. Perch, B., Kjerns E., Ravan T. (1974). Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources, *Acta Pathol Microbiol Scand*, 82: 357-370
148. Percival, R.S., Challacombe, S.J., Marsh, P.D. (1994). Flow rates of resting whole and stimulated parotis saliva in relation to age and gender, *J Dent Res*, 73:1416-1420
149. Petti, S., Pezzit, R., Cattaruzza, M. S., et al. (1997). Restoration-related salivary *Streptococcus mutans* level: a dental caries risk factor? *J Dent*, 25: 257-262
150. Randell, D. M., Harth, S., Seow, W. K. (1992). Preventive dental health practices of non-institutionalized Down Syndrome children: A controlled study, *J Clin Ped Dent*, 16: 225-229
151. Reuland-Bosma, W., van Dijk, L. J. (1986). Periodontal disease in Down's Syndrome: a review, *J Clin Periodontol*, 13: 64-73



152. Roeters, F. J. M., van der Hoeven, J. S., Burgersdijk, R. C. W., and Schaeken, M. J. M. (1995). *Lactobacilli, Mutans Streptococci and Dental Caries: A Longitudinal Study in 2-year old children up to the Age of 5 years*, *Caries Res*, 29: 272-279
153. Rosan, B., Lamont, R.J. (2000). Dental plaque formation, *Microbes and Infection*, 2: 1599-1607
154. Rose, P. T., Gregory, R. L., Gfell, L. E., and Hughes, C. V. (1994). IgA antibodies to *Streptococcus mutans* in caries-resistant and susceptible children, *Pediatr Dent*, 16:272-275
155. Rupf, S., Kneist, S., Merte, K., Eschrich, K. (1999). Quantitative Determination of *Streptococcus mutans* by Using Competitive Polymerase Chain Reaction, *Eur J Oral Sci*, 107: 75-81
156. Rupf, S., Merte, K., Eschrich, K. (1999). Quantification of bacteria in oral sample by competitive polymerase chain reaction, *J Dent Res*, 78: 850-856
157. Russell, M. W., Hajishengallis, G. Childers, N. K., and Michalek, S. M. (1999). Secretory Immunity in Defence against Cariogenic Mutans Streptococci, *Caries Res*, 33: 4-15
158. Saarela, M., Alaluusua, S., Takei, T., and Asikainen, S. (1993). Genetic Diversity Within Isolates of Mutans Streptococci Recognized by rRNA Gene Probe, *J Clin Microbiol*, 31: 584-587
159. Saarela, M., Hannula, J., Mattö, J., et al. (1996). Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction, *Arch Oral Biol*, 41: 821-826
160. Sakellari, D., Belibasakis, G., Chadjipadelis, T. Et al. (2001) Supragingival and subgingival microbiota of adult patients with Down's Syndrome. Changes after periodontal treatment, *Oral Microbiol Immunol*, 16: 376-382

161. Sanchez-Perez, L., Acosta-Gio, A. E. (2001). Caries risk assessment from dental plaque and salivary *Streptococcus mutans* counts on two culture media, *Arch Oral Biol*, 46: 49-55 .
162. Saraçoğlu, F. (1989). Temel ve Klinik Bilimler, Cilt I. Genel Dağılım Güneş Kitabevi, Ankara, 233-235
163. Schaeken, M.J.M., van der Hoeven, J.S., Franken, H.C.M. (1986). Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium, *J Dent Res*, 65: 906-908
164. Seguin, E. (1846). Le Traitment moral, l'hygiene et l'education des idiots. J.B. Bailliere, Paris
165. Shapira, J., Stabholz, A., Schurr, D., et al. (1991). Caries levels, *Streptococcus mutans* counts, salivary pH, and periodontal treatment needs of adult Down Syndrome patients, *Spec Care Dentist*, 11: 248-251
166. Silness, J., Løe, H. (1964). Periodontal Disease in Pregnancy.II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition, *Acta Odontol Scand*, 22:121-135
167. Sindoor, S. D., Fayetteville, N. Y. (1997). Down Syndrome A review of the literature, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 84: 279-85
168. Smith, D.J., King, W.F., Wu, C.D., Shen, B.I., Tauban, M.A. (1998). Structural and antigenic characteristics of *Streptococcus sobrinus* glucan binding proteins, *Infect Immun*, 66: 5565-5569
169. Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol*, 98: 503-517

170. Sreebny, L.M., Banoczy, J., Baum, B.J. et al. (1992). Saliva: Its role in health and disease, *Int Dent J*, 42: 291-304
171. Sreedevi, H., Munshi, A. K. (1998). Neutrophil Chemotaxis in Down Syndrome and normal children to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *J Clin Pediatr Dent*, 22: 141-146
172. Stabholz, A., Mann, J., Sela, M., et al. (1991). Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down Syndrome population, *Spec Care Dentist*, 11: 203-208
173. Steinberg, A.D., Zimmerman, S. (1978). The Lincoln dental caries study: a three-year evaluation of dental caries in persons with various mental disorders, *JADA*, 97: 981-984
174. Straetemans, M. M. E., van Loveren, C., de Soet, J. J. (1998). Colonization with *Mutans Streptococci* and *Lactobacilli* and the Caries Experience of Children after the age of five, *J Dent Res*, 77: 1851-1855
175. Sullivan, A., Borgström, M. K., Granath, L., and Nilsson, G. (1996). Number of *mutans streptococci* or *lactobacilli* in a total dental plaque sample does not explain the variation in caries better than the numbers in stimulated whole saliva, *Community Dent Oral Epidemiol*, 24: 159-163
176. Swaminathan, B., Matar, B. (1993). Molecular Typing Methods, In: persing, D.H., White, T.J., Tenover, F.J. and Smith, T.F. eds. *Diagnostic Molecular Microbiology*, ASM Press, p. 641.
177. Tanzer, J.M., Börjesson, A.C., Laskowski, L. et al. (1984). Glucose-sucrose-potassium-tellurite-bacitracin agar, an alternative to mitis salivarius-bacitracin agar for enumeration of *Streptococcus mutans*, *J Clin Microbiol*, 20: 653-659

178. Toygar, N. (1983). Uyarının süresi ve akım oranıyla parotis proteinleri, immunoglobulinleri ve diğer sekretuar protein yoğunlukları arasındaki ilişki, *EDFD*, 6: 107-113
179. Truong, T. L., Menard, C., Mouton, C., and Trahan, L. (2000). Identification of Mutans and Other Oral Streptococci by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, *J Med Microbiol*, 49: 63-71
180. Uzel, A. (2002). İzmir ilindeki çeşitli turistik tesislerden *Legionella pneumophila* Serogrup 1'in konvansiyonel ve moleküler biyolojik yöntemlerle izolasyonu ve identifikasyonu, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi
181. van Palenstein-Helderman, W.H., Matee, M.I., van der Hoeven, J. S., and Mikx, F. H. (1996). Cariogenicity Depends More on Diet than the Prevailing Mutans Streptococcal Species, *J Dent Res*, 75: 535-543
182. van Palenstein-Heldermann, W.H., Ijsseldijk, M., Huis in 't Veld, J.H.J. (1983). "A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva", *Arch Oral Biol*, 28: 599-603
183. World Health Organization. (1997). Oral Health surveys basic methods. 4<sup>th</sup> ed. Geneva: World Health Organization
184. Wu, H., Fan, M., Zhou, X., et al. (2003). Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* on the Permanent First Molars of the Mosuo People in China, *Caries Res*, 37:374-380
185. Yarat, A., Akyüz, S., Koç, L., et al. (1999). Salivary sialic acid, protein, salivary flow rate, pH, buffering capacity and caries indices in subjects with Down's Syndrome, *J Dent*, 27: 115-118

## EK-1

### Down Sendromlu Çocuklarda Dental Durumun Değerlendirilmesi

E.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı

E.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D. Genetik ve Teratoloji Bilim Dalı

#### HASTA BİLGİ FORMU

Hastanın adı-soyadı:

Tarih:

Doğum tarihi:

Cinsiyeti:

Adres:

Telefon numarası:

Anne eğitim düzeyi: a) Düşük (0-8 yıl) b) Orta (9-11 yıl) c)Yüksek (>11 yıl)

---

1. Çocuğun diş fırçalama sıklığı nedir?

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

2. Çocuğun karyojenik gıda alım sıklığı nedir?

- a) Günde 3-4 kez
- b) Günde 2 kez
- c) Haftada 3-4 kez
- d) Haftada 2 kez

	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
	○	○	○	×	×	×	×	×	×	○	○

- DMFT:
- DMFS:
- dft:
- dfs:

	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
	○	○	○	×	×	×	×	×	×	○	○

- Plak indeksi değeri:

Tükürük akım hızı:.....

Tükürük pH'sı:.....

Tamponlama kapasitesi:.....

sIgA değeri:.....

*S.mutans* değeri:.....

*Lactobacillus* değeri:.....

## ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında İzmir’de doğdum. İlköğrenimimi Ankara Demirlibahçe İlkokulu’nda tamamladım. Ankara Gazi Anadolu Lisesi’nde ortaokul ve Denizli Anadolu Lisesi’nde lise öğrenimimi tamamladıktan sonra 1994 yılında Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi’ni kazandım. 1999 yılında aynı fakülteden mezun oldum ve aynı yıl Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı’nda doktora programına başladım. 2000 yılında Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı’na yatay geçiş yaptım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım. Yabancı dilim İngilizcedir.