

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

115929

ÇÜRÜKLÜ VE ÇÜRÜKSÜZ DIŞLERDEN İZOLE EDİLEN
STREPTOCOCCUS MUTANS'IN GENOTİPİK AYRIMLARININ
AP-PCR (ARBITRARILY PRIMED POLYMERASE CHAIN
REACTION) YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
Diş Hastalıkları ve Tedavisi Programı

DOKTORA TEZİ

115929

Dişhekimi: Zeynep ERGÜCÜ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Necmi GÖKAY

İZMİR-2002

ÖNSÖZ

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

Çalışmalarımın planlanmasında yardımcı olan ve bilimsel katkılarda bulunan Doç. Dr. Sayın A.Rıza ALPÖZ'e, çalışmanın moleküler biyolojik aşamalarının gerçekleştirilmesinde ve yorumlanmasında büyük destek sağlayan Yard.Doç.Dr. Sayın Sacide PEHLİVAN'a, mikrobiyolojik çalışmalarda her türlü yardımı gösteren Uzman Biyolog Sayın E. Esin KOCABAŞ'a , laboratuvar olanaklarını kullanmamızı sağlayan EBİLTEM yönetimine teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan sevgili aileme, E.Ü.Dişhekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi A.D. öğretim üyelerine ve çalışma arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Dt. Zeynep ERGÜCÜ

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ.....1-2

GENEL BİLGİLER.....3-32

1.1. Diş Çürüğü

1.2. Çürük Mikrobiyolojisi

1.3. Dental Plak

1.4. *Streptococcus mutans* İdentifikasyonunda Kullanılan Yöntemler

1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM.....33-49

2.1.Referans Mikroorganizmaların Sağlanması

2.2.Kullanılan Besiyerleri

2.3.Kullanılan Çözeltiler

2.4.*S. mutans*'ın Genotipik Ayrımalarının Belirlenmesinde Kullanılan Alet ve Kimyasallar

2.5.Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Alet ve Kimyasallar

2.6. *S. mutans*'ın İzolasyon ve İdentifikasyonu İçin Kullanılan Yöntemler

2.7.Biyokimyasal Testlerin Uygulanması

2.8.*S. mutans*'ın Genotipik Ayrımalarının Belirlenmesi

2.9.DNA Amplifikasyon Aşaması

BÖLÜM III

BULGULAR.....50-63

3.1. *Streptococcus mutans*'ın İdentifikasyonu

3.2. DNA İzolasyonunun Kontrolü

3.3. AP-PCR Sonuçları

3.3.1. *S. mutans* DNA'larının Karşılaştırılması

3.3.2. Benzerlik İndekslerinin Hesaplanması

BÖLÜM IV

TARTIŞMA.....64-74

SONUÇ.....75-76

ÖZET.....77-78

SUMMARY.....79

KAYNAKLAR.....80-91

ÖZGEÇMİŞ.....92

GİRİŞ VE AMAÇ

Diş çürüğü, çocuklarda ve erişkinlerde rastlanan dental problemlerin başında gelmektedir. Günümüzde koruyucu dişhekimliğinin önem kazanmasına paralel olarak çürük mikrobiyolojisi ile ilgili çalışmalarda da artış gözlenmektedir.

Dental literatürdeki birçok çalışma çürük proçesi hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Diş çürüğü oluşumundaki başlıca faktörler bakteri, diyet, dişin yapısı ve zamandır. Diyetteki karbonhidratları fermente ederek bazı organik asitleri oluşturabilen bakteriler dişte demineralizasyona ve kavitasyon oluşumuna neden olurlar.

Streptococcus mutans fermentasyon ve asit oluşumunda rol oynayan önemli bakterilerdendir. Birçok virulans faktörüne sahip olan *Streptococcus mutans* karyojenik etkisini hücre içinde ve dışında salgıladığı enzimler ve hücre duvarı özellikleri ile sağlar.

Oral mikrobiyoloji alanındaki moleküler biyoloji çalışmaları ile *Streptococcus mutans*'ın genotipik özellikleri belirlenmeye çalışılmaktadır. Kromozomal DNA'da bu enzimlerin salgılanmasını sağlayan genlerin saptanması bireylerin çürük riskinin belirlenmesine ve immünizasyonun elde edilmesine katkıda bulunacaktır.

Polimeraz zincir reaksiyon yöntemi bakterilerin genotipik identifikasyonunda kullanılan yöntemlerden biridir. Son yıllarda çürük incelemelerinde yaygın olarak kullanılan moleküler biyolojik yöntemler çürük etkeni bakterilerin genetik düzeyde incelenmesinde ve karyojenitelerinin belirlenmesinde önemli gelişmeler sağlamıştır.

Çalışmamızın amacı standart bir grup bireyin farklı diş bölgelerinden alınan örneklerde *Streptococcus mutans*' ın fenotipik özelliklerini konvansiyonel identifikasyon yöntemlerinden biyokimyasal testlerle, genotipik ayırımlarını ise moleküler biyolojik yöntemlerden polimeraz zincir reaksiyon yöntemiyle belirlemek ve karyojeniteye etkili genetik yapıları hakkında yoruma ulaşabilmektir.



1. GENEL BİLGİLER

1.1. DIŞ ÇÜRÜĞÜ

Diş çürüğü; bakteri plağındaki mikroorganizmaların, ağız florası, karbonhidratlar, diş yapısı ve bazı hümmoral faktörlerin etkisiyle dişin organo-inorganik yapısını bozmasıdır(72,76). Dental plaktaki mikroorganizmaların, karbonhidratları fermente etmeleri sonucunda açığa çıkan organik asitlerin diş dokularında meydana getirdiği dinamik biyokimyasal olaylar dizisidir.

Çürük etiolojisinde çeşitli faktörler vardır. Bu faktörler dental plak, mikroorganizma, karbonhidratlar ve zamandır. Bu etiolojik faktörlerin etkileşimi aşağıdaki formülle özetlenmektedir (59).

$$\text{Dental plak} \times \text{mikroorganizma} \times \text{karbonhidrat} \times \text{süre} = \text{ÇÜRÜK}$$

Dental plak bakterileri monosakkaritleri, disakkaritleri ve polisakkaritleri kullanabilir. Fruktoz ve glikozdan oluşan monosakkaritler asidojenik bakteriler tarafından fermente edilerek organik asitler oluştururlar. Disakkaritler hümmoral enzimlerle glikoz ve fruktoza çevrilerek asit oluşumuna katkıda bulunurlar. Bakteriyel enzimler disakkaritlerden sakkaroz sentez ederek polisakkaritlere dönüştürür. Polisakkaritler bakterilerin ve ürünlerinin diş yüzeyinde birikmesini, etkilerinin belirli bir düzeye ulaşmasını sağlar.

Monosakkaritler bakteriler tarafından kullanıldığında dental plak pH'ının değişimine neden olmaktadır. Plak pH ölçüm deneylerinde, pH değerinin 5-10 dakika içinde 5.5 ve daha aşağıya düştüğü gözlenmiştir. pH'da görülen azalmanın zaman içinde tekrarlaması ile çürüğe yatkınlık gösteren diş yüzeylerinde demineralizasyon başlar (76).

Çürük mikrobiyolojisi ile ilgili çalışmalar germ-free ve gnotobiotik hayvan deneyleri ile yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda çürükte etkili mikroorganizma grupları belirlenmiştir(26,79,81).

1.2. ÇÜRÜK MİKROBİYOLOJİSİ

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

1.2.1. Laktobasiller

Gram (+), fakültatif anaerob, spor oluşturmayan çubuk şeklinde bakterilerdir. Sıklıkla ağız boşluğundan izole edilirler ve oral mikrofloranın %1'inden daha az bir kısmını oluştururlar. Glikozdan laktik asit ve asetik asit üretebilen türleri mevcuttur. Ağızda ve çürükte en sık rastlanan türler *L. casei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. cellobiosus*, *L. buchneri* ve *L. brevis* olarak belirtilmiştir.

Diş yüzeyine afiniteleri yoktur ve dental plakta az miktarda bulunurlar(6,20,34,76,79). Asidofilik ve asidojeniktirler(98,99). Görülme sıklığı çürük lezyonu sayısına ve retansiyon yerine bağlı olarak artış gösterir. Derin dentin çürüklerinde %85 oranda yer aldıkları ifade edilmektedir(15). Tükürükteki laktobasil sayısı karyojenik potansiyelin değerlendirilmesinde kullanılabilen bir yöntemdir(2,76,79).

1.2.2. Aktinomiçesler

Ağız florası, dental plak, aproksimal yüzeyler, dişeti oluğu ve çürük lezyonunda rastlanabilirler. Gram(+), hareketsiz, filamentöz bakterilerdir. Aktinomiçesler plak oluşumuna katkıda bulunurlar (76,79,108). Glikozu metabolize ederek süksinik, asetik, laktik ve formik asit oluştururlar. Kök yüzeyi çürüğü ve gingivitis ile ilişkili oldukları ifade edilmektedir.

A. viscosus ve *A. naeslundii*'nin kök çürüğü, fissür çürüğü ve periodontal yıkım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. *A. viscosus*, temiz bir diş yüzeyine kolonize olan ilk bakteriler arasındadır. *A. naeslundii*'nin bazı türleri sakkarozdan ekstrasellüler fruktan üretebilir. Üreaz üreterek plak pH'ını etkileyen türleri de mevcuttur.

1.2.3. Streptokoklar

Gram (+), küresel veya oval şekilli, 0.5-2 µm çapında, çiftler veya zincirler halindedirler. Metabolizmaları fermentatiftir. Gaz üretimleri yoktur. Katalaz içermezler, α veya β-hemolitiklerdir. Çoğalmaları için en uygun sıcaklık 37°C'dir.

Streptokoklar ağız ve üst solunum yolları mikroflorasının büyük çoğunluğunu oluştururlar ve birçok alt gruba ayrılırlar. Bunlar genç plakta toplam koloni oluşturan birimlerin %50'sini oluştururlar (71,76,79).

Biyokimyasal özellikleri Tablo 1' de gösterilmektedir.

Özellik	<i>S. mutans</i>	<i>S. rattus</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. eritecus</i>	<i>S. downei</i>	<i>S. macacae</i>	<i>S. ferus</i>
◆Asit Üretimi							
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	∇	+	-	+	+
Rafinoz	+	+	∇	+	-	+	+
İnülin	+	+	∇	∇	+	-	+
Melibiyoz	∇	+	-	TE	TE	TE	TE
Nişasta	-	-	-	-	-	-	+
Dekstrin	-	-	-	-	TE	-	+
◆Hidroliz							
Arginin	-	+	-	-	-	-	-
Eskülin	+	+	∇	∇	-	+	+
◆H₂O₂ Üretimi							
	-	-	+	-	-	-	-
◆Voges-Proskauer Testi (aseton üretimi)							
	+	+	+	+	+	TE	∇
◆Basitrasin Dirençliliği							
	+	+	+	-	-	-	-
◆Hemoliz							
	α	TE	α / γ	γ	TE	α	TE
<p>+ %90 üstü pozitif - %90 üstü negatif ∇ % 11-89 pozitif TE Tayin Edilmemiş α Alfa hemoliz γ Gamma hemoliz</p>							

Tablo 1: Mutans streptokokların biyokimyasal özellikleri (45,75)

Streptokoklar, koloni morfolojilerine ve biyokimyasal özelliklerine göre farklı gruplara ayrılırlar. Tablo 2’de oral streptokokların sınıflandırılması görülmektedir.

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

Tablo 2 : Oral streptokokların sınıflandırılması (76).

1.2.3.1. *Streptococcus sanguis*:

Sferik ve oval şekilli, 0.8-1.2 µm çapında, orta veya uzun zincirler oluştururlar. Dişler üzerinde kolonize olabilirler. Genellikle fissürlerde çürüğe neden olurlar. Ağızda *S. mutans*’tan daha az yoğunluktadır. Sakkaroz içeren ortamda ekstrasellüler polisakkarit (EPS) oluşturan koloniler sert, pürüzlü yüzeyle, kümeler halinde ve agara yapışık olarak bulunurlar(45). Kanlı agarda, α- hemoliz yapar. Hidrojen peroksit üretir, arginin ve eskülünü

hidrolize eder. *S. sanguis* aerobik ortamda üreyebilir, çoğalabilmeleri için karbonhidratlar ve aminoasitlere gereksinimleri vardır (79).

S. sanguis sıklıkla dental plaktan ve daha az olarak da ağzın diğer bölümlerinden izole edilir. Yenidoğanlarda ilk süt dişleri sürdükten sonra görülür.

1.2.3.2. *Streptococcus salivarius*:

Sferik ve ovoid şekilli, 0.8-1.0 µm çapında hücrelerdir. MSB agar üzerinde geniş, kümeler oluşturan, mukoid koloniler halinde görülürler. Kanlı agarda hemoliz oluşturmazlar. Sakkaroz içeren besiyerinde, suda çözünen bir fruktoz polimeri olan levan oluştururlar. Dental plak, boğaz, nazofarinks, oral mukozada ve dilin sırt kısmında bulunurlar. Yenidoğanların ağzında dişler sürmeden yerleşebilirler. İnsanda düşük derecede karyojenik aktivite gösterir (45,76).

1.2.3.3. *Streptococcus vestibularis*:

İnsan ağzında vestibüler mukozadan izole edilir. Alfahemolitik streptokok grubu olarak tanımlanmıştır. Birçok tanımlanmamış türe ayrılır. Sakkarozdan ekstrasellüler polisakkarit oluşturamazlar. Laktozdan asit üretebilirler. Mannitol, sorbitol, inülin ve rafinozu fermente edemezler. Hidrojen peroksit ve üreaz üretirler (45,76).

1.2.3.4. *Streptococcus milleri*:

Çiftler veya zincirler halinde sferik ve ovoid şekilli hücrelerdir. Sağlıklı bireylerde diş yüzeylerinden, dişeti oluğundan, nazofarinksten, boğazdan, ayrıca vücudun değişik bölümlerinde oluşan abselerden izole edilmiştir (45).

1.2.3.5. *Streptococcus mitis*:

MSB agarda yumuşak, dairesel, siyah-kahverengi koloniler oluşturabilen heterojen bir türdür. Sakkarozdan ekstrasellüler polisakkarit sentezlemezler. İntrasellüler polisakkaritler oluşturabilirler ancak belirleyici değildir. Kanlı agarda α hemoliz yapar. Yapılan çalışmalarda boğazdan, ağız boşluğundan, kandan ve subakut bakteriyel endokarditten izole edildiği belirtilmiştir(45).

1.2.3.6. Mutans streptokok grubu:

S. mutans 1924 yılında çürük dişlerden J. Kilian Clarke tarafından izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Derin dentin çürüklerinde küçük zincirler oluşturan coccobasillere rastlamış ve bunların mutasyona uğramış streptokoklar olduğunu düşünerek *Streptococcus mutans* adını vermiştir. Clarke çürük ile *Streptococcus mutans* arasındaki ilişkiyi kanıtlamaya çalışmış ancak destek görememiştir(27).

Streptokoklar ve çürük arasındaki ilişki, 1960'lı yıllarda gnotobiyotik hayvan modelleri kullanılarak yapılan çürük mikrobiyolojisi çalışmalarıyla tekrar gündeme gelmiştir(55). Serolojik çalışmalarla hücre duvarının antijenik özelliklerine göre 8 serotipi tanımlanmıştır(9,16,29,76,79,106). Mutans streptokok grubuna ait özellikler Tablo-3'de gösterilmektedir.

	NÜKLEİK ASİT - BAZ İÇERİĞİ (MOL. %)	HÜCRE DUVARINDA BULUNAN POLİSAKKARİTLER	SEROTİP
<i>S. mutans</i>	36-38	Rha, Glc	<i>c, e, f</i>
<i>S. rattus</i>	41-43	Rha, Gal, Gro	<i>b</i>
<i>S. sobrinus</i>	44-46	Rha, Glc, Gal	<i>d, g</i>
<i>S. critecus</i>	42-44	Rha, Glc, Gal	<i>a</i>
<i>S. downei</i>	41-42	TE	<i>h</i>
<i>S. macacae</i>	35-36	TE	<i>c</i>
<i>S. ferus</i>	43-45	Rha, Glc	<i>c</i>

Rha, ramnoz; glc, glukoz; Gro, gliserol; TE: tayin edilmemiş

Tablo 3: Mutans streptokok grubunun ayırt edici özellikleri (76)

***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 bulunurlar. Bazı türleri kanlı agarda α-hemolitikdir(45). *S. sobrinus*'un çürük sürecindeki rolü hakkında çok fazla bilgi mevcut değildir; çünkü *S. mutans* ve *S. sobrinus*'un ayırılmasına yönelik çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Ancak son yıllarda moleküler biyolojik yöntemlerdeki gelişmeler ile *S. mutans* ve *S. sobrinus*'un fenotipik ve genotipik farklılıklarının belirlenmesi sağlanabilmektedir(65, 91).

***Streptococcus critecus* (serotip a):** 0.5 µm çapında, zincirler veya çiftler halinde bulunurlar. Sakkaroz içeren agarda 1 mm çaplı, pürüzlü yüzeyli, kümeler halinde, ekstrasellüler glukan içeren bir sıvı ile çevrili koloniler, kanlı agarda 2-3 mm çapında, düzgün yüzeyli yuvarlak koloniler oluştururlar. Fakültatif anaerobtur. Hamster ve ratların ağızında bulunurlar. İnsanlardan nadir olarak izole edilirler (45, 76).

***Streptococcus rattus* (serotip b):** 0.5 µm çapında, zincirler veya çiftler halinde bulunurlar. Gram(+) özelliktedir. Arginin ve eskülünü hidrolize ederler. Hidrojen peroksit üretmezler. Sakkarozdan ekstrasellüler glukon sentezlerler (45).

***Streptococcus ferus* (serotip c):** 0.5µm çapında, çiftler ve zincirler oluşturan Gram(+) koklardır. Sakkarozdan ekstrasellüler ve intrasellüler polisakkarit üretirler. Sadece vahşi ratların ağzından izole edilirler, insanda bulunmazlar (45).

***Streptococcus macacae* (serotip c):** İnsanda bulunmazlar. Mannitol, rafinoz ve sorbitol fermentasyonu yaparlar ve eskülünü hidrolize ederler (45).

***Streptococcus downei* (serotip h):** İnsandan izole edilememektedir (45).

***Streptococcus mutans* (serotip c,e,f):** 0.5-0.75 µm çapında, çiftler veya kısa ve orta uzunlukta zincirler halinde bulunurlar, kapsülsüzdürler. Koloniler hareketsiz, katalaz (-) ve Gram (+) tir. Dental plaktan izole edilen mutans streptokokların *c,e* ve *f* serotipleri mevcuttur. *S. mutans* grubu fizyolojik ve morfolojik özelliklerine göre oldukça homojen bir grup oluşturur(45,69,76). Kromozom yapısındaki Guanin+Sitozin (G+C) içeriği ve DNA hibridizasyon çalışmaları *Streptococcus mutans* türleri arasında belirgin farklılıklar olduğunu göstermiştir (30,79,90).

Mitis-salivarius-bacitracin agar'da küçük, düzensiz sınırlı, opak, buzlu cam görünümünde, kabarık, koloniler oluştururlar. Sakkaroz içeren mitis-salivarius agar veya trypticase-yeast-cystine agar üzerinde pürüzlü yüzeyli, kümeler halinde, üzerlerinde boncuk veya damlacıklar halinde suda çözünen ekstrasellüler polisakkarit içeren sıvı bulunan

koloniler oluştururlar. Kanlı agarda α , β ve γ hemoliz yaparlar. Koloni morfolojileri buldukları kùltür ortamına göre değişkenlik gösterir. Katı ortamda gözlenen morfolojileri, pürüzlü, düzgün yüzeyli ve mukoid özellikte kolonilerdir. Asit koşullarda veya katı ortamlarda 1.5-3 μm uzunluğunda çubuklar oluştururlar. Sakkaroz içeren agarda çoğu *S. mutans* türü, 1 mm çapında koloniler oluşturur ve suda eriyebilen polisakkaritler oluşturur. Kanlı agarda anaerobik olarak 2 gün inkube edildiğinde, gri-beyaz, dairesel ve düzensiz sınırlı, 0,5-1 mm çaplı koloniler oluşturur (45).

1.2.3.6.1. *Streptococcus mutans*'ın Metabolik Aktivitesi

Sakkarozdan ekstrasellüler polisakkarit oluşturma yeteneği *Streptococcus mutans*'ın çürük yapıcı belirgin özelliklerindedir. *Streptococcus mutans*'ın gluklan üretmeyen tipleri, düzgün yüzeylerde çürük oluşturamaz. Mannitolü ve sorbitolü fermente eder. Çoğalmaları için belli vitaminler dışında özel şartlara gerek yoktur. Nitrojen kaynağı olarak amonyak kullanırlar. Diğer oral streptokoklar için inhibitör olan sulfonamidler *Streptococcus mutans* için inhibitör etki göstermez. Bu özelliğinden *Streptococcus mutans* izolasyonu için seçici besiyeri hazırlanmasında faydalanılır.

Streptococcus mutans, sakkarozdan suda çözünmeyen polisakkaritler sentezleyerek diş yüzeylerine kolonize olabilir. Diğer streptokoklardan daha asidürik olup organik asitler üretir. Karyojenik ve karyojenik olmayan streptokoklar glikoz içeren sıvı ortamda çoğalıp fermentasyon yapabilirler. Glikoz fermentasyonu sonucu asit üretimi karyojeniteyi belirlemeye yönelik spesifik özelliklerden değildir. Katı ortamda *Streptococcus mutans*'ın asit yoğunlaştırması diğer oral streptokoklardan fazla olmaktadır. Asidofiliktirler ve asit ortama diğer oral bakterilerden daha yüksek tolerans gösterirler(76,79). Bu asit tolerans özelliğinin, membrana bağlı proton-translocating ATP-ase enzimi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (11).

Karyojenik *Streptococcus mutans* türleri, lizojenik bakteriyofaj yapar. Karyojenik olmayan *Streptococcus mutans*'ın mutant tipleri cama yapışma özelliği göstermez ve suda çözünmeyen polisakkarit oluşturma yetenekleri azalmıştır. Bu mutant türler, lizojenik fajlarla enfekte olurlarsa yapışma yeteneği kazanarak suda çözünmeyen polisakkarit oluşturabilirler(79).

1.2.3.6.2. *Streptococcus mutans*'ın Ekolojisi

Streptococcus mutans'ın ağızda ilk olarak yerleşmesi, dişlerin sürmesi ile retansiyon bölgelerinin oluşmasına bağlıdır. *Streptococcus mutans* uniform olarak tüm yüzeyde kolonize olmayıp belli bölgelerde toplanır. Kolonize olma sıklığı sırasıyla posterior aproksimal bölgeler, fissürler, anterior aproksimal bölgeler ve diğer düz yüzeylerdir(76,79).

Aktif çürüklü bireylerin dental plak örneklerinden çok sayıda izole edilmektedir(71,76,79).

1.2.3.6.3. *Streptococcus mutans*'ın Epidemiyolojisi

Epidemiyolojik çalışmalar sonucunda çocuklar ve genç erişkinlerde mine çürüğünde; yaşlılarda kök çürüklerinde; bebeklerde biberon çürüklerinde birincil etkenin *Streptococcus mutans* olduğu saptanmıştır. Dünya genelindeki tüm insan popülasyonlarında *Streptococcus mutans* mevcuttur (71). Yüksek, düşük ve çok düşük çürük prevalansı gözlenen bireylerin hemen tümünde *Streptococcus mutans*' a rastlanmıştır (22).

Erişkinlerde dişler çekildikten sonra yok oldukları ancak protez kullanımı ile birlikte yeniden ortaya çıktıkları ifade edilmektedir (21).

Mutans streptokoklar 19-31. aylarda, “enfektivite penceresi” olarak tanımlanan bir dönemde, bebeklerin süt dişlerinin sürmesi ile birlikte kolonize olmaya başlarlar (23). Dört

yaşındaki çocukların %33-75'inde, genç erişkinlerin %80-90'ında ve tüm yetişkinlerde bu mikroorganizma bulunmaktadır. c/e/f serotipleri (*S. mutans*) ve d/g (*S. sobrinus*) serotipleri insanda yüksek oranda gözlenir. *S. mutans* kolonizasyonu retansiyon yerlerinin artması ile birlikte artış gösterir(69,71,72,76). Hipoplazik mine lezyonlarında retansiyon yerinin fazla olması nedeniyle kolonizasyonu fazlalaşır (66,79).

Serotip c, insan tükürük ve dental plağında bulunur. *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* kadar sık bulunmaz ve genellikle *Streptococcus mutans* ile birlikte görülür(21,60,68).

1.2.3.6.4. *Streptococcus mutans*'ın Karyojenitesine Etkili Faktörler:

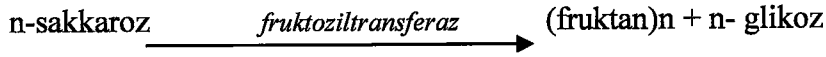
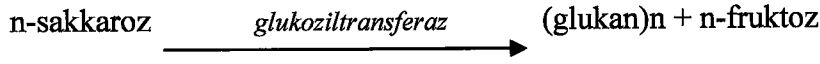
S. mutans dental plakta baskın olmasını sağlayan ve çürük oluşumuna neden olan bazı faktörlere sahiptir. Bunlar ekstrasellüler ve intrasellüler polisakkarit sentezi, asit üretimi, asidik ortamlarda yaşayabilme yeteneği ve endodekstranaz üretimi olarak sayılabilir (6,41,76).

Ekstrasellüler Polisakkarit Sentezi :

Polisakkaritler, suda çözünebilen ve suda çözünemeyen polisakkaritler olarak ikiye ayrılır. Suda çözünen polisakkaritler, labildir ve bakteriler tarafından metabolize edilirler. Suda çözünmeyenler dental plağın oluşumuna katılırlar ve bakterilerin plağa tutunmasını sağlarlar. *S. mutans* sahip olduğu glikozil transferaz enzimi oluşumunda görevli *gtf* genleri ile sakkaroz varlığında suda çözünebilen (α 1-6 bağlı) ve suda çözünmeyen (α 1-3 bağlı) gluklan (dekstran) moleküllerini sentezler(76). Glukanlar, plak matriksinin önemli bir kısmını oluşturarak *S. mutans*'ın tutunmasını ve bakteri metabolizmasının asidik yan ürünlerinin ortamda birikmesini sağlar.

S. mutans, *fff* geni tarafından üretilen fruktoziltransferaz enzimi ile sakkarozun yapısındaki fruktozdan inülin tipte bir fruktan polimeri oluşturur. β , 2-1 bağlı fruktoz ünitelerinden oluşan fruktanlar adezyona katılmaz ve dental plakta uzun süre kalmazlar. Daha çok ekstrasellüler karbonhidrat kaynağı olarak bulunurlar. Oral bakterilerin çoğu tarafından üretilen fruktanhidrolaz enzimleri aracılığı ile fruktoza parçalanırlar.

Bu polisakkaritler sakkarozun glikozid bağları ile bağlanması sonucu oluşur.



Diş Yüzeylerine Tutunması:

S. mutans'ın diş yüzeyine tutunması iki aşamada meydana gelir. Başlangıç ataşmanı reversibl bir olaydır ve yüzey komponentleri tarafından gerçekleştirilir. Bu aşamada bakteri, hücre proteinleri ve tükürük glikoproteinleri ile kazanılmış mine pelikülü arasında bir etkileşim meydana gelir. *S. mutans*'ın yüzeyinde bulunan fibrillerdeki fonksiyonel kısımlar kazanılmış mine pelikülündeki komponentlere tutunur. Daha sonra glukanlar ve hücre yüzeyinde bulunan reseptörler (adhesinler) tarafından yönlendirilen hücre akümülyasyonu gerçekleşir(38,76,84).

Şeker transportu ve intrasellüler polisakkarit sentezi:

S. mutans sahip olduğu yüksek afiniteli şeker transport sistemleri aracılığıyla hücre içine şeker transportunu gerçekleştirir(6,76). Mutans streptokoklar fosfoenolpiruvat (PEP)-bağlantılı fosfotransferaz (PTS) [PEP-PTS] sistemine sahiptir. PTS, asidojenik oral bakterilerde bulunur. Hücre sitoplazmasında Hpr ve Enzim I (EI) adlı şekere özgü olmayan ve

Enzim II (EII) adlı şekere özgü proteinlere sahiptir. PTS aktivitesi, ortamdaki glikozun sınırlı, pH'ın nötr ve bakteriyel büyümenin düşük hızda olduğu durumlarda optimaldir.

S. mutans'ta bulunan diğer bir şeker transport sistemi de çoklu şeker metabolizmasıdır (*multiple sugar metabolism, msm sistemi*). Melibiyoz, rafinoz ve izomaltosakkaritlerin hücre içine iletimini sağlar (17,76).

Ortamda fazla glikoz ve sakkaroz gibi şekerlerin varlığında *S. mutans* intrasellüler polisakkarit (IPS) sentezleyerek depo eder. IPS glikojene (α 1,4 bağlı glukon) benzeyen bir polimerdir. Glikoz bulunmadığı durumlarda depo edilmiş intrasellüler polisakkaritler metabolize edilerek fermentasyon ve asit üretiminin devamlılığı sağlanır(6,13,76,79).

Asit Toleransı:

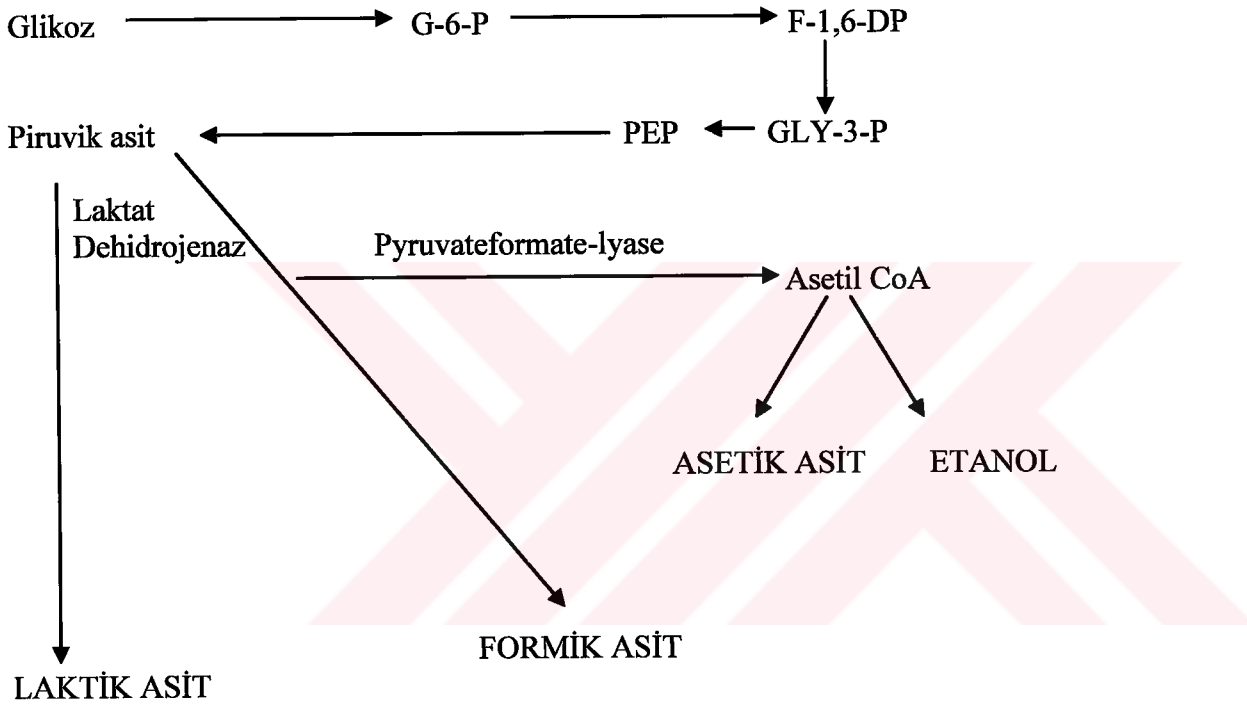
Mutans streptokoklar glikozu fermente ederek organik asitleri oluştururlar. Enzim sistemleri ile gerçekleşen bu reaksiyonlar, dental plağın asidik karakter kazanmasına yol açar. *Streptococcus mutans* asidik koşullara adapte olmasını sağlayan bir özelliğe sahiptir(12,35,44). Ürettiği membrana bağlı ATPase enzimi ile H^+ iyonlarını hücre dışına pompalar ve hücre içi asit konsantrasyonunu azaltır(11). pH 4.0'den düşük değerlerde bile metabolizmasını sürdürebilir. Asit toleransı ATPase enzim aktivitesinin yükselmesine bağlıdır. Böylelikle *Streptococcus mutans* düşük pH değerlerinde bile glikolizi sürdürür ve yaşamaya devam eder (35,76,79).

Asit Üretimi:

S. mutans birçok şekeri fermente ederek organik asitler üretir. Glikoz bakteri hücrenin içine alınıp, glikoliz yoluyla piruvik asite çevrilir. Mutans streptokoklar, ortamda şekerin fazla bulunduğu durumlarda piruvik asiti laktatdehidrojenaz (LDH) enzimi ile laktik

asite çevirirler. Laktik asit dış çürüğü oluşumunda en kuvvetli ve en etkili asittir. Glikozun sınırlı miktarda bulunduğu durumlarda piruvatformat lyase (PFL) enzimi aracılığı ile formik asit, asetik asit ve etanol üretirler. PFL'in düzenlenmesi, gliseraldehit 3-fosfat (GLY-3-P) kontrolü ile sağlanır. GLY-3-P, PFL enzimi için negatif etkilidir (76).

S. mutans'ın metabolizma son ürünleri Şekil 1'de gösterilmektedir.



G-6-P: glikoz-6-fosfat;

F-1,6-DP: fruktoz-1,6-difosfat; GLY-3-P: gliseraldehit 3-fosfat; PEP: fosfoenolpiruvat

Şekil 1: *Streptococcus mutans*'ın karbonhidrat metabolizmasının son ürünleri (76).

Endodekstranaz Üretimi

Streptococcus mutans, ekstrasellüler dekstranlar içindeki α 1-6 bağlarını parçalayan endodekstranaz enzimi üretir. *S. mutans* ürettiği endodekstranazlar aracılığı ile glukoz içeren başlangıç dental plak içine invaze olabilir (6).

1.2.3.6.5. Hücre Duvarı Özellikleri

Streptococcus mutans glukon ve levandan oluşan bir kapsül ve kompleks yapıda bir hücre duvarına sahiptir. Peptidoglikanlar, lipotekoik asit, polisakkaritler, proteinler ve lipoproteinler bu kompleks yapı içinde yer alır(76,79,86). Komponentlerin herhangi birinde oluşabilecek bir değişiklik hücre yüzeyinin özelliklerini değiştirebilir.

Hücre duvarının kalitatif ve kantitatif kompozisyonu genotipik değişikliklerin oluşmasına sebep olur. *S. mutans* karbonhidrat antijenlerine göre 8 serotipe ayrılır. Grup a antijeni D-glikoz sekansına bağlı bir polisakkarittir. Grup b antijeni polisakkarit ve glikoproteinden oluşur. Grup c antijeni ramnoz ve glikozdan; grup d antijeni D-galaktozdan; grup e D-glikoz-L-ramnoz-L-ramnoz oligosakkarit sekansından oluşan antijenlere sahiptir. Grup f antijeni ise eşit oranda ramnoz ve glikoz içerir (79).

1.2.3.6.6. Yüzey Proteinleri

Streptococcus mutans hücreleri, P1 (veya I/II, B, IF, SR, PAc) adı verilen ve pelikülle kaplı yüzeylere tutunmayı sağlayan proteinler içerir(32). *S. sobrinus*'ta benzer fonksiyon gösteren *spaA* adlı proteine sahiptir(63).

1.2.3.6.7. Bacteriocin Üretimi

Bacteriocinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen ve diğer mikroorganizmaların üremesini engelleyen proteinlerdir. Mutans streptokoklar tarafından üretilen bacteriocine mutacin adı verilir. Mutacin üreten mutans streptokokların kötü ağız hijyeni ve beslenme alışkanlıklarına sahip bireylerde daha uzun süreli kolonize oldukları ifade edilmektedir (46).

1.2.3.7. *Streptococcus mutans* İzolasyonunda Kullanılan Kültür Yöntemleri:

Streptococcus mutans izolasyonunda mitis salivarius basitrasin (MSB) agar kullanılır. Sakkaroz, basitrasin ve potasyum tellürit içerir(40). TYCSB agar; TYC agar (trypticase, yeast extract ve cystine), sakkaroz ve basitrasin içerir (101). GSTB agar; GS agar (trypticase ve yeast extract), glukoz, sakkaroz, basitrasin ve potasyum tellürit içerir (96). TSY20B agar, trypticase soy agar, yeast extract, sakkaroz ve basitrasin içerir (89).

1.3.DENTAL PLAK

1.3.1. Dental Plak ve Diş Çürüğü

Oral kaviteki bakterilerin türleri, sayısı ve biyolojik özellikleri, birçok çalışmanın konusu olmuştur (78,84,85,108). Bir polimer matriks içinde bulunan mikroorganizma topluluğuna dental plak denir. Ağız içindeki bölgelere ve dişlere göre farklılıklar gösteren uniform olmayan bir yapıdadır. Bu polimerik kompozit yapı, bakteriler ve substratlar arasındaki değişik etkileşimler sonucu oluşur. Bakteriyel ürünlerin açığa çıkması ile diş çürüğü ve periodontal hastalıklar gibi patolojik olaylar gelişir.

Plak ve oral flora birçok bakteri topluluğunun yaşadığı, denge bozulmadığında patolojik özellik göstermeyen bir ekolojik sistemdir. Patolojik özellik kazanmasında üç görüş öne sürülmüştür. **Spesifik plak hipotezine** göre birçok farklı mikroorganizmadan oluşan plak mikroflorası içinden spesifik türler hastalığa neden olur. **Nonspesifik plak hipotezi**, hastalığın tüm plak mikroflorasının birlikte aktivitesi sonucu oluştuğunu kabul etmektedir. **Ekolojik plak hipotezine** göre hastalıkla ilişkili olan bakteriler sağlıklı ağızlarda da bulunabilirler; ancak patolojik düzeyde değildir. Çevresel koşullarda ortaya çıkan değişiklik sonucu mikroflora dengesinin bozulması ile patojen bakteriler aktivite gösterebilirler.

Örneğin, uzun süreli şeker alımına bağlı olarak çevresel koşullar ve plak pH'ının düşmesi çürüğe neden olan türlerin çoğalmasına yol açabilir (76).

1.3.2. Dental Plak Oluşumu ve Yapısı

Mikroorganizmalar temiz bir diş yüzeyine tutunamaz. Tükürükteki glikoproteinlerin, fizyolojik olarak diş yüzeyine çökerek oluşturduğu tabakaya kazanılmış pelikül adı verilir. Diş temizlendikten sonraki iki saat içinde koklar pelikülle kaplı mine yüzeyine adsorbe olurlar. *S. mutans*, *S. sanguis* ve aktinomiçesler bu öncü mikroorganizmalardandır. Bakteri hücresi ve pelikülle kaplı diş arasında uzun dönemli fizikokimyasal etkileşimler başlar. Bu moleküllerin etkileşimi sonucu oluşan elektrostatik yük değişimleri ve van der Waals kuvvetleri, zayıf bir çekim alanı oluşturarak reversibl bir adezyon sağlar. Oral streptokokların birçoğunda görülen antijen I/II multifonksiyonel reseptörler adezyonda önemlidir. Bakterilerdeki bu reseptör noktalar, tükürük glikoproteinlerine, diğer bakteri hücrelerine ve kalsiyuma tutunma özelliği gösterir. Bu safhadan sonra bakteriler peliküle irreversibl olarak tutunur ve enfekte olan pelikül dental plak özelliği kazanır. Dental plak, mikroorganizmaların tükürük akışı ve dil hareketleri gibi mekanik kuvvetlerle diş yüzeyinden uzaklaşmalarına engel olur(70,76,84).

İlk tutunan bakteriler ile yeni katılan bakteriler arasındaki koagregasyon plak mikroflorasındaki bakteri sayısını ve çeşitliliğini artırır. Aerob ve fakültatif anaerob mikroorganizmalar oksijeni kullanarak karbondioksit oluştururlar. Böylece zorunlu anaerob bakterilerin çoğalması için uygun ortam sağlanır. Zorunlu anaerob bakteriler, streptokok ve *Actinomyces* gibi türlere tutunur. Buna koadezyon adı verilir. Mutans streptokokların, bazı mitis gruplarının ve *A. naeshundii*'nin sakkarozdan ürettiği ekstrasellüler glukanlar ve fruktanlar, bakteriler arası tutunmayı ve akümüasyonu kolaylaştırır (38,76,79,84,102).

1.3.3. Dental Plakın Mikrobiyolojik Yapısı

Dental plak ve ağız mikroflorasında 300'den fazla bakteri türü tanımlanmıştır (56,84).

Dental plak mikroflorası dişin farklı yüzeylerine göre değişmektedir.

Fissürlerin mikroflorası Gram (+) karakterde ve streptokoklar baskındır. Özellikle *Streptococcus mutans* çürük gözlenmeyen bölgelerde bile bulunabilir. Zorunlu anaerob bakteriler ve Gram (-) türler genellikle düşük sayıda bulunur ve nadir olarak izole edilirler. Dişeti oluşunda daha farklı türde ve çoğunlukla Gram (-), zorunlu anaerob bakterilere rastlanır. Aproksimal bölgelerdeki plakta bu iki grubun karışık olarak bulunduğu bir mikroflora mevcuttur. Supragingival plaktaki mikroorganizmalar Tablo 4'te gösterilmiştir.

Dental plakta görülen bakteriler
<i>S. sanguis</i>
<i>S. oralis</i>
Mutans streptokoklar
<i>S. salivarius</i>
<i>A. naeslundii</i>
<i>A. odontolyticus</i>
<i>Haemophilus spp.</i>
<i>Captocytophaga spp.</i>
<i>Fusobacterium spp.</i>
Siyah pigmentli anaeroblar

Tablo 4: Supragingival plakta bulunan bakteriler (76)

1.4. *Streptococcus mutans* İdentifikasyonunda Kullanılan Yöntemler

1.4.1. *S. mutans*'ın Tiplenmesi

Streptococcus mutans izolatlarının tiplenmesi, epidemiyolojik çalışmalarda, bakterilerin geçiş yollarının saptanmasında, hastalıkların spesifik bakteri türleriyle olan ilişkilerinin belirlenmesinde, enfeksiyonun heterojenitesinin incelenmesinde yararlanılan bir yöntemdir.

S. mutans'ın tiplenmesinde kullanılan yöntemler, tiplenebilirlik (her izolat için bir sonuç alınması), tekrarlanabilirlik (her tekrarda aynı sonuca ulaşabilme), ayırt edilebilirlik (ilgili olmayan türleri ayırt edebilme) kriterlerine uymalıdır (4).

Mikroorganizmaların epidemiyolojik tiplemesi , fenotipleme ve genotipleme olarak iki şekilde yapılır.

1.4.1.1. Fenotipleme Yöntemleri:

Bacteriocin üretiminin ve bacteriocinlere duyarlılığın ölçülmesi, serotipleme, biyokimyasal testler, antibiyotik rezistansı ve bakteriyofaj tipinin belirlenmesi gibi yöntemlerdir (77).

Bacteriocin tipleme:

Oral streptokoklar için geliştirilen ilk epidemiyolojik tipleme yöntemidir(54). Bacteriocinler, diğer bakterilerin çoğalmasını inhibe eden protein içerikli substanslardır. Tipleme bacteriocinlere karşı duyarlılığın ve inhibitör etkilerin belirlenmesi ile yapılır.

Serotipleme :

İmmünodifüzyon, immünofloresans ve immünelektroforez yöntemleri kullanılarak hücre duvarındaki karbonhidrat antijenler belirlenir (16,82).

Biotipleme:

Mutans streptokokların fermentasyon özelliklerine, arginin hidrolizine ve bacteriocin duyarlılığına göre yapılır. Hücresel yağ asidi analizi, hücre protein analizi ve multilocus enzim elektroforezi (MEE) kullanılır (39).

1.4.1.2. Genotipleme Yöntemleri

Moleküler tipleme yöntemleri mikroorganizmaların DNA'ları ile ilgili, ayırt ediciliği ve tekrarlanabilirliği yüksek yöntemlerdir (5,80). Plasmid analizi, restriksiyon nükleaz analizi (REA), restriction fragment length polymorphism (RFLP), pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ve arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) bu yöntemler arasındadır.

Plasmid Analizi:

Plasmidler, DNA'nın ekstrakromozomal halkalarıdır. Antimikrobiyal rezistans, virulans özellikleri ve hidrokarbon metabolizması gibi birçok özelliklere sahiptir(74). Plasmid analizi epidemiyolojik çalışmalarda uygulanan ilk DNA bazlı tekniktir(25). *S. mutans* türlerinin sadece %5'inde plazmid bulunduğundan *S. mutans* tiplemesinde sık kullanılmamaktadır(43).

Restriksiyon Endonükleaz Analizi (Restriction Endonuclease Analysis - REA):

Bakteri kromozomu DNA'sı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile belli DNA dizilerinden kesilir ve sonra jel elektroforezi ile ayrılır. Restriksiyon endonükleaz enzimleri bakterilerden elde edilir veya sentetik olarak üretilirler. Jeller etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında bant yapıları marker'lar (DNA cetveli) ile karşılaştırılarak incelenirler. Bu işlem ile birçok bant içeren bakteriye özel parmak izleri elde edilir (97).

REA, mutans streptokokların genetik ilişkilerini belirlemede kullanılmıştır (1,24,58,87).

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP):

Mikroorganizmaların DNA'sı enzimlerle kesilip elektroforezle ayrıldıktan sonra ayrılan kısımlar Southern Blot tekniğindeki DNA veya RNA problemleri ile işaretlenir (57,94). DNA ekstraksiyonu ve jel elektroforez sonrasında fragmanlar RNA problemleri ile hibridize edilir. Elde edilen bantlar karşılaştırılarak ribotipleme yapılır (1,87).

"Pulsed Field" Jel Elektroforezi (PFGE):

DNA molekülleri belirli zaman aralıklarında birbirlerine farklı açıda iki elektriksel alan etkisinde bırakılır. DNA molekülleri bir elektriksel akıma uygun hareket ederken kısa bir süre sonra diğer akıma uygun yönde ilerler. Bu yöntemle 5 megabaz boyutundaki DNA parçaları bile ayrılabilir (97). Yüksek tekrarlanabilirliği ve ayırt edici özelliğinden dolayı "altın standart" olarak kabul edilir (5,80).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

Son yıllarda *Streptococcus mutans*'ın çürük ve dental plak oluşumu ile olan ilişkisinin belirlenmesinde moleküler genetik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (53,86,87,88).

Polimeraz zincir reaksiyonu, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir. Bu yöntem ile çok az miktarda DNA kısa sürede çoğaltılabilir. Çift iplikli bir DNA molekülünün denatürasyonu hedef dizilerine iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde

kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin spesifik olduğu hedef dizilere, bağlanması ve uzaması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. Böylece hedef bölgelerin çoğaltılması (amplifikasyon) sağlanır. Bu hedef genetik materyal, çok az sayıda bile olsa çoğaltılarak identifiye edilebilir (97,104).

1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleşmesi için belli temel bileşenler ve işlem basamaklarına gerek duyulmaktadır.

1. Çoğaltılacak olan kalıp DNA

PCR için her türlü kaynaktan temin edilen genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA' ları, çeşitli genler veya herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre komplementer DNA (cDNA) , genomik DNA, genomik kitaplıklar halinde, araştırma laboratuvarları ve kliniklerden elde edilebilir.

2. Yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimleri

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğin karşısına tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak, dört çeşit deoksiribonükleotid trifosfattan, uzun polinükleotid zincirin sentezini katalize ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3'-hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmaları ile, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır.

Termostabil enzimlerden ilki ve en yaygın olarak kullanılanı *Thermus aquaticus*' tan elde edilen Taq DNA polimeraz' dır. Taq DNA Polimeraz'ın 95°C'deki yarı ömrü yaklaşık 40 dakika kadardır. Guanin+Sitozin (G+C) bazları yönünden zengin olan hedef DNA'ların

amplifikasyonunda daha etkili olduğu belirtilmiştir. Bu fragman aynı zamanda geniş bir Mg^{+2} iyon konsantrasyonunda (2-10 mM) aktivite gösterebilmektedir. Böylelikle aynı reaksiyon tüpünde, iki veya daha fazla farklı hedef DNA sekansları aynı reaksiyon ortamında amplifiye edilebilir (52,97).

3. Sentezde Kullanılan Primerler ve zellikleri

Sentetik olarak kolayca hazırlanabilen tek iplikekli spesifik DNA segmentlerine primer adı verilir. 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^+ 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 (10,97,104).

4. Sentezde kullanılacak olan deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP)

Deoksinükleotid trifosfatlar (dATP; sGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta tek tek veya dörtlü karışımlar halinde ticari olarak elde edilebilir. Her deoksinükleotid trifosfat konsantrasyonunun eşit (20-200 mM arasında) olması ürünün özgünlüğü ve doğru sonuç elde edilmesi açısından önemlidir. Stok dNTP solüsyonlarının pH'ı 7.0 olmalı ve konsantrasyonları spektrofotometrik olarak kontrol edilmelidir.

Optimal dNTP konsantrasyonu; $MgCl_2$ konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, oğaltılmış ürünün boyuna, PCR döngü sayısına bağlıdır. Düşük dNTP konsantrasyonları hedef olmayan bölgelerde yanlış primer eşleşmesini azaltır (97).

5. DNA Polimerazın çalışması için gerekli tamponlar ve $MgCl_2$

PCR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında genelde önerilen PCR tamponu 20°C'de saklanan 10-50 mM Tris-HCl'dir. Tris bir dipolar iyonik tampondur ve ısısız döngü işlemi boyunca pH'ı 6.8 ile 7.8 arasındadır.

Magnezyum iyon konsantrasyonu; primer eşleşmesini, ürün özelliğini, primer-dimer oluşumunu etkileyebilir. Mg^{+2} iyonları, deoksinükleotid trifosfatlar ile çözünebilir kompleksler oluşturur, polimeraz aktivitesini stimüle eder, çift iplikli DNA'nın denatürasyon derecesini (T_m) artırır. Toplam dNTP konsantrasyonuna göre PCR karışımı 0.5-2.5 mM magnezyum içerebilir. Bu konsantrasyon PCR standardizasyonu ile belirlenebilir. Düşük $MgCl_2$ konsantrasyonu ürün oluşumunda azalmaya, yüksek $MgCl_2$ konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açabilir (97).

6. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun İşleyişi

PCR istenilen süreler için otomatik olarak farklı ısı dereceleri ayarlayabilen PCR aletleri "Thermal Cycler" yardımıyla gerçekleştirilir. Polimeraz zincir reaksiyonu 0.2 veya 0.5 ml'lik kapaklı steril tüplerde gerçekleştirilir. Bir PCR döngüsü hedef DNA denatürasyonu, primerlerin bağlanması (*annealing*) ve uzama (*extension*) olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır.

Hedef DNA'nın Denatürasyonu:

PCR reaksiyonu için gerekli maddeler gerekli konsantrasyonlara PCR yapılacak tüplere konulduktan sonra Thermal Cycler aletine yerleştirilir. Başlangıç denatürasyonunda kompleks DNA kalıplarının denatüre olmasını sağlamak için ısı otomatik olarak 95°C'ye yükseltilir. Etkin denatürasyon sıcaklığı ve süresi 92-95°C ve 3-5 dakika olarak saptanmıştır(97).

Primerlerin Bağlanması (Annealing):

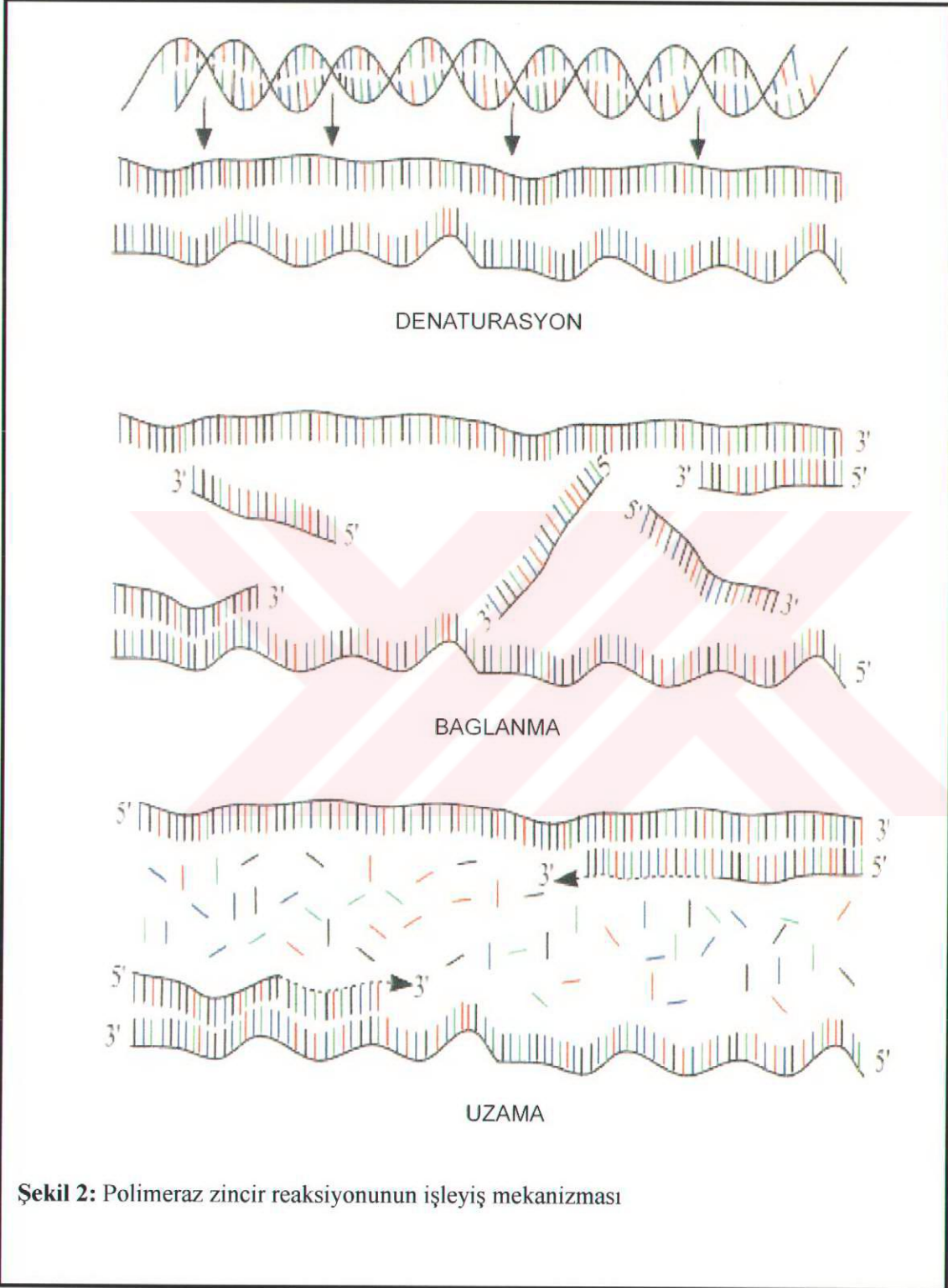
Denatürasyon için ayarlanmış olan süre sona erdikten sonra, alet ısıyı 55-65°C'ye indirir. Bu ısı primerin özelliğine göre değişir. Ortamdaki primerler hedef DNA üzerindeki komplementer dizilere bağlanır. Primerler kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar. Primer eşleşmesi için gereken ısı ve süre amplifikasyon primerlerinin konsantrasyon ve uzunluklarına bağlıdır (57,97).

Uzama (Extension):

Kalıp DNA'ya primerlerin bağlanması gerçekleştikten sonra aletin ısısı 70-72°C'ye yükselerek tüpler içinde bulunan ve ısıya dayanıklı olan DNA Polimeraz enzimi 5'-3' yönünde olacak şekilde nükleotidleri primerin 3'-OH ucuna yerleştirir ve hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir. Uzama 3'-OH ucuna bağlantı olur olmaz başlar. 72°C'ye yaklaşıldığı anda termal DNA polimerazlar en aktif hallerine geçerler 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 olurlar. Bu şekilde hedef DNA kopyaları elde edilmeye devam eder. Uzama aşaması için 2 dakika yeterli olurken tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını için son PCR döngüsü yaklaşık 10-15 dakika sürdürülür.

Bu üç aşamanın tekrarlanmasıyla DNA fragmanları üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün ardışık döngüde diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır (57,97) .

Şekil 2'de polimeraz zincir reaksiyonunun aşamaları görülmektedir.



Şekil 2: Polimeraz zincir reaksiyonunun işleyiş mekanizması

7. Polimeraz Zincir Reaksiyonunu Etkileyen Faktörler

Denatürasyon sıcaklığı, bağlanma sıcaklığı ve süresi, primer uzunluğu ve Mg^{+2} konsantrasyonu polimeraz zincir reaksiyonunu etkileyen faktörlerdendir.

Denatürasyon Sıcaklığı :

DNA dizilerindeki bazlar birbirlerine hidrojen bağlarıyla bağlıdır. DNA denatürasyon sıcaklığından fazla bir sıcaklıkta ısıtılıp soğutulduğunda diziler birbirinden ayrılabilir. Kalıp DNA' nın yetersiz denatürasyonu sonucunda DNA iplikleri yeniden birleşerek ürün veriminin düşmesine neden olabilir. PCR sırasında etkin denatürasyon sıcaklığının 92-95 °C olduğu belirlenmiştir (97).

Bağlanma Sıcaklığı ve Süresi:

PCR için seçilen bağlanma sıcaklığı primerlerin boyuna ve içerdikleri baz çeşidine bağlıdır. Primerler için $Tm=[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4]$ °C formülü ile hesaplanır. Bağlanma sıcaklığı (Ta), primerlerin hesaplanan sıcaklık derecesinden 5 °C daha az olmalıdır. PCR sırasında bağlanma sıcaklığı çok düşük değerde tutulursa primerlerin özgünlüğü azalır primer kendine komplementer olmayan DNA dizilerine bağlanarak spesifik olmayan amplifikasyonlara yol açabilir. Bağlanma süresi genellikle kısadır. Çoğu primer, çok uzun değilse 30 saniyeden az bir zaman içinde bağlanma işlemini gerçekleştirebilir (97).

Primerlerin Uzunluğu:

Primerler seçilirken veya hazırlanırken buldukları baz sıralarının sadece 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 (11,97)

Magnezyum Konsantrasyonu:

Magnezyum; kalıp, primer ve deoksinükleotid trifosfatlar ile bağlanır. Mg^{+2} konsantrasyonu deoksinükleotid trifosfatlardan 0.5-2.5 mM fazla olmalıdır. Uygun Mg^{+2} konsantrasyonu her primer için PCR standardizasyonu aşamasında denenerek belirlenir (10,97).

8. Amplifiye Edilmiş PCR Ürünlerinin Saptanması:

Polimeraz zincir reaksiyonunda amplifiye edilmiş ürünlerin saptanmasında farklı yöntemlerden yararlanılmaktadır.

Etidyum Bromür ile Bantların Boyanması:

Reaksiyon tüplerinde amplifiye olan PCR ürünleri yükleme tamponu yardımıyla agaroz jel elektroforezine aktarılır. Bu ortamda, ürünler molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. Jel, etidyum bromür solüsyonu ile boyanarak PCR ürünleri görünür hale getirilir. Oluşan bantlar, marker'larla (DNA cetvelleri) karşılaştırılarak değerlendirme yapılır (41, 64).

Southern Blot analizi:

Amplifiye olmuş ürünler, agaroz jel elektroforezine tabi tutularak molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. Agaroz jelden nitroselüloz filtre veya naylon gibi katı bir ortama aktarıldıktan sonra denatüre ve fikse edilirler. ^{32}P veya biotin gibi işaretli spesifik problemlerle

hibridizasyona tabi tutulurlar. Sonuçlar otoradyografi veya biotin kullanılmışsa renk indeksine göre değerlendirilir (57).

Solüsyon Hibridizasyon Tekniği:

Amplifiye edilmiş DNA rnleri ve işaretili problar uygun sodyum klorür (NaCl) yoğunluğuna sahip bir hibridizasyon solüsyonu içinde bir araya getirilirler. Karışım 95°C’de denatüre edilerek DNA iplikçikleri birbirinden ayrılır. Solüsyon ısısı 50-60°C ’ye kadar indirildiğinde problar spesifik DNA dizilerine bağlanır. Karışım poliakrilamid jel elektroforezine (PAGE) aktarılır. Jel içindeki DNAxDNA hibrit molekülleri büyük olduğundan ve yavaş hareket ettiklerinden başlangıçta yer alırlar. Küçük moleküller ise karşı uçta lokalize olurlar. Değerlendirme Southern Blot analizinde olduğu gibi yapılır (97).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'ne çürük nedeniyle başvuran, yaşları 13 ile 35 arasında değişen, cinsiyet ayrımı yapılmayan 20 hasta çalışmaya dahil edildi. Ağzında derin dentin çürüğü bulunan, ağız hijyeni kötü, son üç ay içinde antibiyotik ve klorheksidin preparatı kullanmamış hastaların ağız muayenesinde dolgulu, çürük ve çekilmiş dişler belirlendi. Sağlam diş yüzeylerinden 20 adet dental plak ve dentin çürüğü kavitelelerinden 20 adet dekalsifiye dentin örneği alındı.

Çalışmanın ilk bölümünde bu örneklerden *Streptococcus mutans* mikroorganizmaları izole edilerek biyokimyasal testlerle identifikasyonu yapıldı.

İkinci bölümde ise sağlam diş yüzeyinden ve çürük kavitesi içinden izole edilip identifikasyonu yapılan *Streptococcus mutans* mikroorganizmalarının genotipik farklılıkları AP-PCR yöntemi ile belirlendi.

2.1. Referans Mikroorganizmaların Sağlanması:

Çalışmamızda kontrol amacı ile, Alabama Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Oral Biyoloji (University of Alabama at Birmingham, School of Dentistry, Oral Biology) laboratuvarından temin edilen liyofilize formlardaki *Streptococcus mutans* NCTC 10449 (ATCC 25175) referans suşu ve İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÜKENS)'nden temin edilen *Streptococcus mutans* CNCTC 8/77 referans suşu kullanıldı.

2.2. Kullanılan Besiyerleri:

•Tripton- Yeast Ekstrakt- Sistin (TYC) Agar:

Tripton:	15 g
Yeast Extract:	5.0 g
L-sistin.	0.2 g
Na ₂ SO ₃ :	0.1 g
NaCl:	1.0 g
NaHCO ₃ :	2.0 g
Na ₂ HPO ₄ :	0.8 g
Sodyum asetat (anhidroz).	12.0 g
Sakkaroz:	50.0 g
Agar:	12.0 g
Distile su:	1000ml

Yukarıdaki maddelerin 25°C'de 1 litre distile su içinde çözülmesiyle pH'ı 7.3 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 ortama eklendi. Hazırlanan bu besiyeri steril petri kaplarına döküldü.

• Todd-Hewitt Broth:

37 gram Todd-Hewitt Broth (Sigma T-1438) 1 litre distile suda çözüldü. %12-14 agar eklenerek agarın çözünmesi için kaynatıldı, soğumadan standart test tüplerine paylaştırıldı. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler yatık pozisyona getirilerek donmaları sağlandı. Bu ortam çalışmamızda izolatların devamlılığının sağlanmasında ve stoklanmasında kullanıldı.

- *Kan Agarı:*

95 ml distile suda 3.8 gram kan agar (Oxoid) ve 5 ml steril defibrine koyun kanı karıştırılarak petrilere döküldü. Bu işlem sonucunda üstte oluşan serum alınarak izolatların alfa, beta ve gamma hemolizin üretimlerinin belirlenmesinde kullanıldı.

- *Moller's Broth Base:*

Bacto pepton	5.0 g
Beef ekstrakt	5.0 g
Brom krezol purple solüsyonu (% 1.6)	0.625ml
Krezol red solüsyonu (% 0.2)	2.5 ml
Glikoz	0.5 g
Pyridoxal	0.005 g
Distile su	1000 ml

Yukarıdaki maddeler 1 litre suda çözülüp pH 6-6.5'a ayarlandı. Tüplere paylaştırıldıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

- *MRVP (Methyl Red- Voges Proskauer) Broth:*

Tamponlanmış pepton:	7.0 g
Glikoz :	5.0 g
K ₂ HPO ₄ :	5.0 g
Distile su :	1000 ml

1 litre distile suda çözülen maddeler karıştırılarak tüplere paylaştırıldı. 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Bu ortam glikozdan aseton üretiminin belirlenmesinde kullanıldı.

- *Eskülin Hidroliz Besiyeri:*

Todd-Hewitt Broth içine %0.01 eskülin ve %0.05 ferrik sitrat eklendi ve sıvı besiyeri tüplere paylaştırılarak 121°C'de 5 dakika sterilize edildi.

2.3. Kullanılan Çözeltiler:

• *Serum Fizyolojik*: %0.9'luk serum fizyolojik çözeltisi otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Bu çözelti hastalardan plak ve dentin çürüğü örneklerinin alınması ve örneklerin ekim yapılmadan önce uygun seyreltmelerin hazırlanması aşamalarında kullanıldı.

• *Alfa naftol Çözeltisi*: 1 litre %95'lik etanol içinde 5 g α -naftol çözülerek hazırlandı.

• *%40'lık Potasyum Hidroksit Çözeltisi (KOH)*:

KOH	40 g
Kreatin	0.3 g
Distile su	100 ml

40 gram potasyum hidroksit 75 ml distile su içinde çözüldü. Çözelti oda sıcaklığında bir süre bekletildi. Daha sonra 0.3 gram kreatin eklenip çözüldükten sonra distile suyun 25 ml'si daha eklenerek %40'lık potasyum hidroksit çözeltisi elde edildi.

2.4. *Streptococcus mutans*'ın Genotipik Ayrımalarının Belirlenmesinde Kullanılan

Alet ve Kimyasallar:

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

Her ikisinden de 5 ml alınıp üzerine 490 ml steril deiyonize su eklenerek 500 ml TE tamponu hazırlandı.

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

H₂O : 90 ml

Su 68°C'de ısıtıldı. HCl ile pH 7.2' ye ayarlandı ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

- *Santrifüj (Sanyo)*

- *Vortex (Stuart Scientific S2)*

- Etüv (Nüve FN 200)
- Otomatik pipetler (10- 100 μ l, 100-1000 μ l , Brand)
- Steril pipet uçları (Brand)
- Ependorf tüpleri
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Derin dondurucu (Arçelik)
- Termal Cycler (Appligene Oncor, Crocodile III)
- Otomatik pipetler (1-10 μ l, 10-100 μ l, Brand)
- Steril pipet uçları (Brand)
- 0.2 ve 0.5'lik ependorflar
- Ependorf taşıyıcıları
- Otoklav (Hirayama)
- Otoklav bandı (Sussex)
- Deiyonize su
- Buz kalıbı
- PCR tamponu [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] (Fermentas)
- MgCl_2 (2 mM, 1.0 ml) (Fermentas)
- dNTP 20 mM dATP, 20mMdCTP, 20 mM dGTP, 20mMdTTP(Sigma)
- Taq Polimeraz- *Thermus aquaticus* (Fermentas)
- Mineral yağı (Sigma)

• *AP-PCR analizlerinde kullanılan Streptococcus mutans için spesifik olduğu bildirilen primerler:*

OPA-05 (5' AGGGGTCTTG-3')

OPA-13 (5' CAGCACCCAC-3')

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

2.5. Agaroz Jel Elektrofrez İçin Kullanılan Alet ve Kimyasallar:

• *Tris Asetat Tampon (TAE):*

Tris baz (Merck)	40 mM
EDTA (Sigma)	1 mM
Glasiyal asetik asit	1.1 mM

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

• *Etidyum Bromür:* 100 ml deiyonize su içinde 1 gram etidyum bromür karıştırılarak hazırlandı.

• *Yükleme Tamponu:* 45 ml 1XTAE, 55ml gliserol, 0.1g Orange G karıştırılarak hazırlandı.

• *DNA Marker:*

-(Φx174HaeIII) (bç):1353, 1078, 872, 603, 310, 281,271, 234, 194, 118, 72

-(λDNAEcoR1+HindIII)(bç):21226,5148,4973,4268,3530,2027,1904,1584,1375,947,831,564

• *Tartım aleti (Scaltex, max. 3200g d= 0.01 g)*

• *Agaroz (Sigma)*

- *pH metre (Jenway)*
- *Yatay elektroforez (Hyboid)*
- *Sarı bant (Sigma T-6781 Lot. 125H0653)*
- *Güç kaynağı (0- 250 volt Hyboid PS250, USA)*
- *Parafilm (American National con T_m Greenwich. CT. 06836)*
- *Ultra-viyole tray (Fotodyne)*
- *Polaroid 657 siyah-beyaz film*
- *Fotoğraf çekim apareyi (Polaroid- Fotodyne Cat. 5-5535)*

2.6. *Streptococcus mutans* İzolasyon ve İdentifikasyonu İçin Kullanılan Yöntemler

Sağlam Diş Yüzeylerinden Dental Plak Örneklerinin Alınması:

Streptococcus mutans'ın izole edileceği dental plak örnekleri çürüksüz keser dişlerin vestibül yüzeylerinden elde edildi. Plak örneği alınacak bölge pamuk rulolar ve tükürük emici yardımıyla tükürükten izole edildi. Dişler hava su spreyi ile yıkanıp hava ile kurutuldu. Steril tahta kürdanlar ile dişlerin vestibül yüzeylerinden plak örneği toplandı . Plak örnekleri içinde 1 ml steril fizyolojik tuzlu su bulunan kapaklı steril cam tüpler içine alındı.

Dentin Çürüklü Dişlerden Dekalsifiye Dentin Örneklerinin Alınması:

Derin dentin çürüğü saptanan vital üst veya alt birinci daimi molar dişlerin çürük kavimleri içinden elde edildi. Kaviteler 15 saniye su ile yıkanıp hava spreyi ile kurutuldu. Pamuk rulolar ve tükürük emici ile tükürükten izole edildi. Kavite içindeki gıda artıkları ve yüzeyel dekalsifiye dentin steril bir ekskavatör yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra kavite tekrar su ile yıkanıp hava ile kurutuldu. Daha sonra steril bir ekskavatörle derindeki

dekalsifiye dentin örneği 1 ml steril serum fizyolojik içeren kapaklı cam tüpler içine alındı (Resim1).

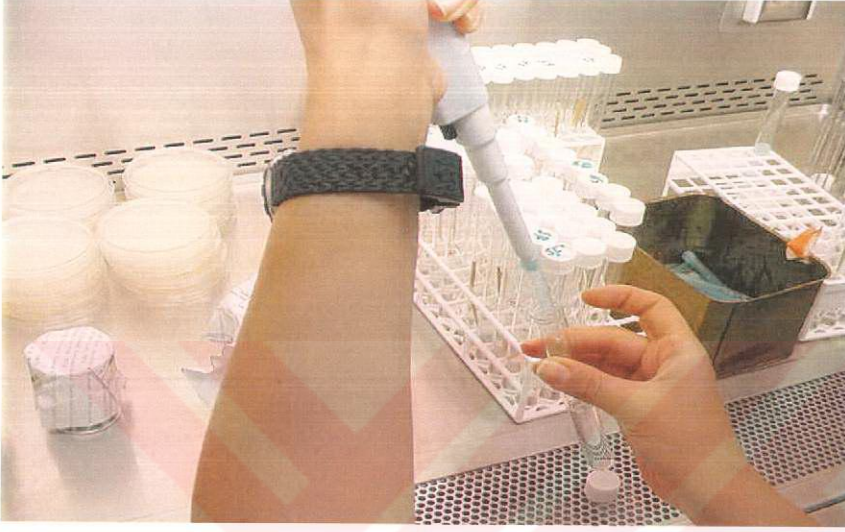


Resim 1: Plak ve dentin örneklerinin tüplerin içine alınması

Plak ve dekalsifiye dentin örnekleri bir saat içerisinde Ege Üniversitesi Bilim, Teknoloji ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM) Mikrobiyoloji laboratuvarına nakledildi. Mikrobiyolojik işlemlere 1-2 saat içinde başlandı.

Plak ve Dekalsifiye Dentin Örneklerinden Seyreltmelerin Hazırlanması:

Cam tüp içindeki örnekler, vortexde (Stuart Scientific SA2) 20 saniye karıştırılarak homojenize edildikten sonra seyreltme işlemlerine geçildi. Seyreltme steril serum fizyolojik ile 1/1000 ve 1/10000 oranında aseptik koşullarda otomatik pipetler kullanarak yapıldı.



Resim 2: Plak ve dekalsifiye dentin örneklerinden seyreltmelerin hazırlanması

Seyreltmelerden Besiyerlerine Ekimlerin Yapılması:

Seyreltilen örneklerden 100 µl alınarak petri kaplarındaki TYCSB agar üzerine aktarıldı ve cam bağıtle yayıldı. Tüm örnekler besiyerine alındıktan sonra 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde (Nüve FN 500) 48 saat süreyle inkübe edildi.

Liyofilize formda referans suşlarından ekim yapılarak üremeleri sağlandı ve koloni morfolojileri gözlemlendi. İnkübasyon sonrası üremesi sağlanan örneklerin koloni morfolojileri referans suşlarla karşılaştırılarak kümeler şeklinde, sınırları düzensiz, buzlu cam görünümündeki sert yapılı mikroorganizma kolonileri agar yüzeyinden öze ile toplanarak Todd-Hewitt yatık agarlarına aktarıldı ve inkübe edildi.



Resim 3: Seyreltmeleri yapılan örneklerin ekildiği TYCSB agar içeren petriler

2.7. Biyokimyasal Testlerin Uygulanması

Karbonhidratların Fermentasyonu:

Fermentasyon denemelerinde mannitol, sorbitol, melibiyoz, rafinoz, inülin, nişasta ve dekstrin kullanıldı. pH'ı 7.0 olan Todd-Hewitt Broth besiyeri bulunan tüplerin içine ters çevrili Durham tüpler yerleştirildi. Isıya dayanabilen şekerler besiyerine eklenerek otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Isıya duyarlı şekerlerin sterilizasyonları ise membran filtrasyonu ile yapıldı. Şekerler son konsantrasyonları %1 olacak şekilde besiyerlerine aseptik şartlarda eklendi. Ekim yapılan besiyerleri 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 24-48 saat inkube edildi. Kültür maksimum bulanıklık gösterdiğinde ortam pH'ını gözlemek amacıyla brom krezol purple çözeltisinden birkaç damla eklendi. Karbonhidratların fermente edilerek asit

oluşturması sonucu ortamda gözlenen sarı renk pozitif sonuç, mor renk oluşumu ise negatif sonuç olarak değerlendirildi.

Arginin Hidrolizi:

Hazırlanan kültürlerden %1 L-arginin içeren Moller's Broth Base ortamına ekim yapıldı. İnkübasyondan sonra tüplerdeki besiyerinin üzerine yaklaşık 10 mm kadar steril mineral yağ eklendi. 4 gün sonra oluşan viyole veya kırmızımsı viyole renk argininin hidrolize edildiğini gösterdi.

Eskülin Hidrolizi:

Hazırlanan kültürlerden % 0.01 eskülin ve %0.05 ferrik sitrat içeren Todd-Hewitt sıvı besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 48 saatlik inkübasyondan sonra kahverengi-siyah renk oluşumu eskülinin hidrolize edildiğini gösterdi.

Voges-Proskauer Testi (Glikozdan Aseton Üretimi):

Kültür örneklerinden, içerisinde Voges-Proskauer Broth bulunan tüplere ekim yapıldı. Bir tüp kontrol için ekim yapmadan ayrıldı. %5 CO₂ içeren etüvde 37°C'de 48 saat inkübasyondan sonra her kültürden steril bir tüpe 1 ml aktarıldı, üzerine α -naftol çözeltisinden 0.6 ml eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra %40'luk potasyum hidroksit çözeltisinden 0.2 ml eklenip karıştırılarak eğik pozisyonda inkübe edildi. Yüzeyde başlayan koyu kırmızıya yakın renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

Katalaz Testi :

Hazırlanan kültürlerin üzerine hidrojen peroksit damlatıldı ve gözle görülür köpürmenin meydana gelmesi pozitif olarak değerlendirildi. Katalaz enzimi içeren mikroorganizmaların aşağıdaki reaksiyonu gerçekleştirdiği gözlemlendi.



Basitrasin Dirençliliği:

Bu test için 2 U/ml basitrasin içeren Todd-Hewitt ortamı hazırlandı ve petri kaplarına dağıtıldı. 6 farklı kültürden öze ile toplanan izolatlar basitrasin içeren besiyerine çizgi ekimi yapıldı. 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Üremenin varlığı pozitif olarak değerlendirildi.

Hemolizin Üretimi.

İzolatların ekimleri kan agara yapıldı ve üreme olan bölgelerin çevrelerinde yeşilimsi zon oluşturanlar α- hemoliz, açık zon oluşturanlar β- hemoliz, herhangi bir değişiklik olmayanlar γ- hemoliz pozitif olarak değerlendirildi.

2.8. *Streptococcus mutans*'ın Genotipik Ayrımlarının Belirlenmesi

2.8.1. *Streptococcus mutans* izolatlarından DNA ekstraksiyonu

Sağlam diş yüzeylerinden ve derin dentin çürüğü içinden alınan dekalsifiye dentin örneklerinden izole edilen *Streptococcus mutans* ve referans suşlarının DNA ekstraksiyonları, Bollet ve ark (93) kullandığı yöntemle gerçekleştirildi.

DNA ekstraksiyon yöntemi :

- 1- *S. mutans* izolatları 5 ml Todd- Hewitt Broth içinde 37°C’de 2 gün süre ile inkübe edildi.
- 2- Ortamdaki bakteri hücrelerini toplamak için karışım 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi.
- 3- Bakteri hücreleri 100 µl TE tamponu ve 50 µl %10’luk sodyum dodesil sülfat (SDS) içinde süspanse edildi ve 65°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- 4- Süspansiyon tekrar santrifüjlendi ve mikrodalga fırında 2 dakika 30 saniye süre ile ısıtıldı.
- 5- Peletler 250 µl TE içerisinde çözüldü.
- 6- Eppendorf tüpleri derin dondurucuda -20°C’de donduruldu.
- 7- AP-PCR işleminden önce süspansiyon eritildi ve süpernatant AP-PCR’ da kullanıldı.

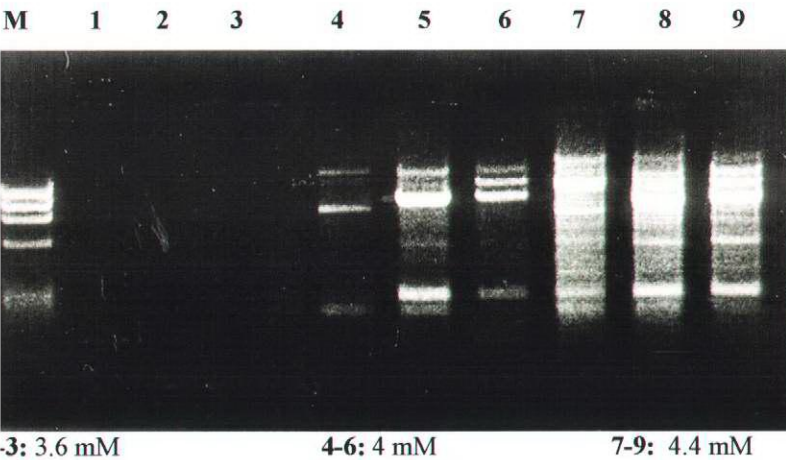
2.8.2. AP-PCR Reaksiyonunun Optimizasyonu

MgCl₂ konsantrasyonunun standardizasyonu:

Referans suştan elde edilen DNA, PCR standardizasyonu için 3.6 mM, 4 mM ve 4.4 mM olmak üzere 3 farklı MgCl₂ konsantrasyonunda amplifikasyona tabi tutuldu.

PCR ürünlerinin en iyi amplifikasyonu 4.4 mM’lık MgCl₂ konsantrasyonunda gözlemlendi.

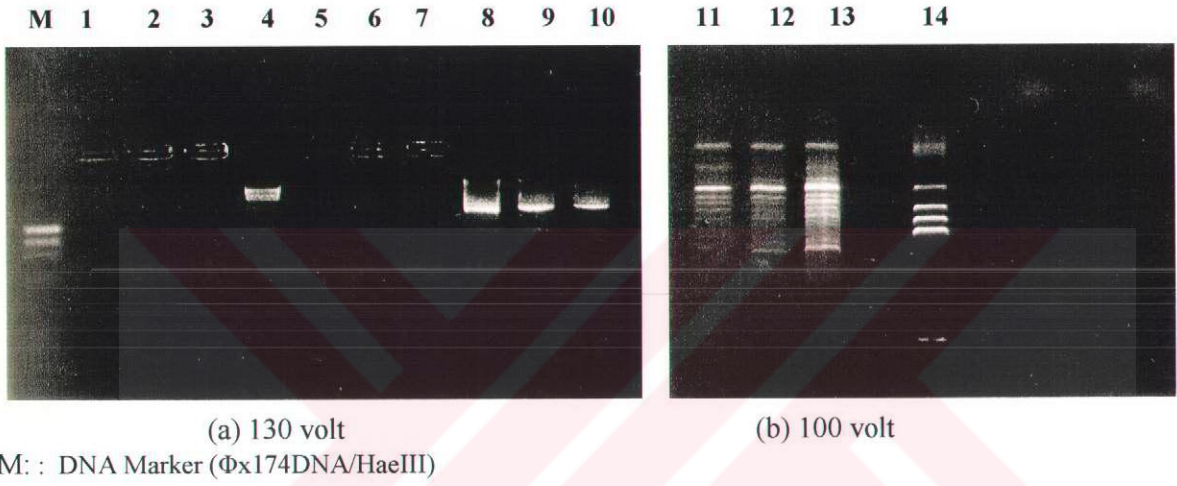
OPA-13 primeri ile PCR standardizasyonunun denemesinde farklı MgCl₂ konsantrasyonları ile elde edilen jel görüntüleri Resim 4’de verildi.



Resim 4 : Farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında elde edilen jel görüntüleri

DNA Marker (Φx174DNA/HaeIII) (1353, 1078, 872, 603, 310, 281,271, 234, 194, 118, 72 bp)

Referans suş DNA'sından elde edilen PCR ürünleri %1.75 agaroz jelde 100 volt ve 130 voltta yürütüldü. Elektroforezde 100 volt ile daha belirgin bant yapıları elde edildi (Resim 5).



Resim 5: Farklı voltajlarda yürütülen AP-PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri

2.9. DNA Amplifikasyon Aşaması:

Dental plak ve çürük dentin örneklerinden elde edilen 28 adet *Streptococcus mutans* izolatının DNA'sı ile *Streptococcus mutans* (NCTC 10449) referans suşundan elde edilen DNA kullanıldı.

Amplifikasyon Karışımının Hazırlanması:

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

H ₂ O :	7.5 µl
Buffer :	2.5 µl
MgCl ₂ :	5.5 µl
dNTP :	2 µl
Primer	2 µl
Taq DNA polimeraz:	0.5 µl
DNA:	5 µl

PCR amplifikasyonu toplam 25 µl'de gerçekleştirildi. Kontaminasyon olup olmadığını belirlemek için DNA eklenmemiş aynı karışımdan içeren bir tüp negatif kontrol olarak kullanıldı. Karışımın buharlaşmasını engellemek için 30 µl mineral yağ ilavesinden sonra eppendorf tüpleri PCR aletine yerleştirildi. PCR programı başlatıldı.

Kullanılan AP-PCR Koşulları:

Denatürasyon	94 °C	5 dakika	1 döngü
Bağlanma	36 °C	2 dakika	
Uzama	72 °C	2 dakika	
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	30 döngü
Bağlanma	36 °C	2 dakika	
Uzama	72 °C	2 dakika	
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	1 döngü
Bağlanma	36 °C	2 dakika	
Uzama	72 °C	10 dakika	

PCR programı tamamlandıktan sonra eppendorf tüpleri +4°C' ye alındı



Resim 6: Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleştirildiği thermal cycler

Agaroz Jel Elektroforezi

Reaksiyon sonrasında amplifiye DNA'ları yürütmek için % 1.75'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için önce yatay elektroferez tabağının etrafı otoklav bandı ile bantlanıp tabağına uygun tarak yerleştirildi. 100 ml'lik erlen içerisine 2.1 g agaroz ve 110 ml 1XTAE konulup erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. Folyo üzerinde birkaç küçük delik açılıp karışım berraklaşınca kadar mikrodalga fırında eritildi. Berraklaştıktan sonra 10 µl etidyum bromür eklenip karıştırıldı ve hazırlanan tabağa döküldü. Jel donduktan sonra üzerine 1XTAE tampon eklenip tarak çıkarıldı ve etrafındaki bantlar açılıp içerisinde 1XTAE tamponu bulunan elektroferez tankına yerleştirildi. Bir parça parafilm üzerinde 7µl yükleme tamponu ve 8 µl amplifikasyon ürünü karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklendi (Resim7).



Resim 7: Amplifiye DNA'ların %1.75'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

PCR ürünleri, 120 voltta 6 cm yürütüldükten sonra ultraviyole lamba altında incelendi ve 667 Polaroid film ile görüntülendi.

3. BULGULAR

3.1. *Streptococcus mutans*'ın İdentifikasyonu

Dental plak örnekleri "A", çürük dentin örnekleri "B" olarak kodlandı. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonrasında, sınırları düzensiz, buzlu cam görüntüsüne sahip sert yapılı kolonilerin morfolojileri referans suşların morfolojisi ile karşılaştırılarak olası *S. mutans* kolonileri belirlendi. Bu kolonilere biyokimyasal testler uygulandı. Seçici TYC agar üzerinde tipik *Streptococcus mutans* kolonileri Resim 8 ' de görülmektedir.

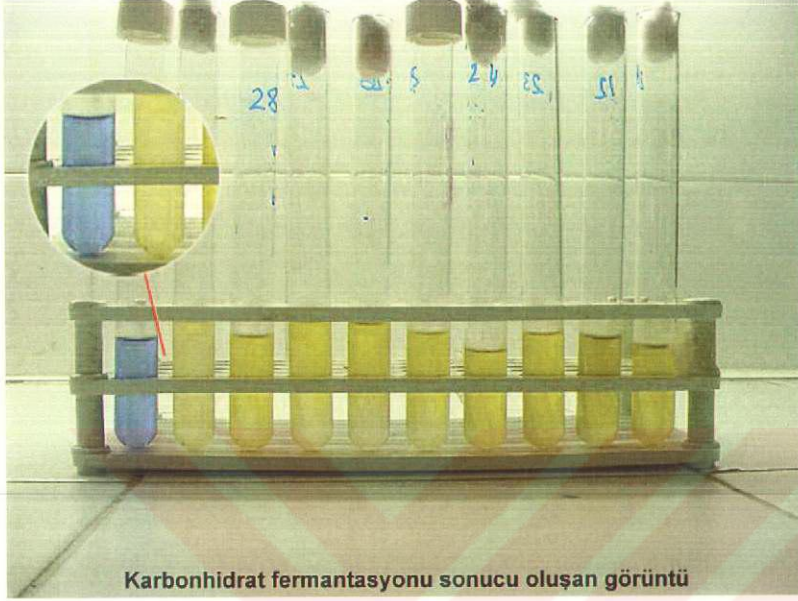


Resim 8: Seçici TYCSB agardaki *Streptococcus mutans* kolonileri

Biyokimyasal Test Sonuçları:

1) Karbonhidratların Fermentasyonu:

Karbonhidratların fermente edilerek asit oluşturması sonucu ortamda gözlenen sarı renk pozitif sonuç, mavi-mor renk oluşumu ise negatif sonuç olarak değerlendirildi (Resim 9).



Resim 9: *Streptococcus mutans*'ın karbonhidrat fermentasyonu sonucu oluşan görüntü

2) Arginin Hidrolizi:

Kültürlerin inkübasyonundan 4 gün sonra tüplerde oluşan viyole veya kırmızımsı viyole renk argininin hidrolize edildiğini gösterdi (Resim 10).

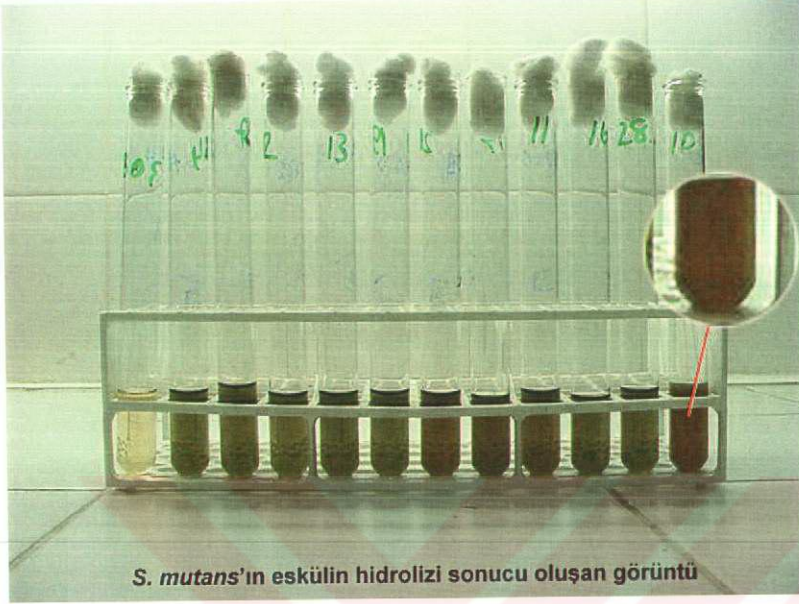


Resim 10:

S. mutans'ın arginin hidrolizi sonucu oluşan görüntü

3) Eskülin Hidrolizi:

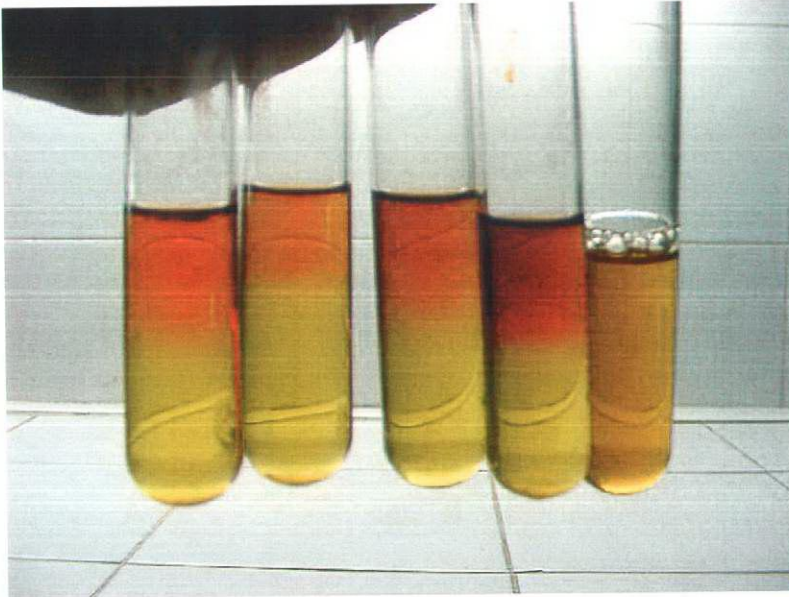
Kültürlerin inkübasyonundan sonra tüplerde oluşan kahverengi-siyah renk oluşumu eskülinin hidrolize edildiğini gösterdi (Resim 11).



Resim 11: *Streptococcus mutans*'ın eskülini hidrolizi sonucu oluşan görüntü

4) Voges-Proskauer Testi (Glikozdan Aseton Üretimi):

Kültürlerin inkübasyonundan sonra yüzeyde başlayan koyu kırmızıya yakın renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Resim 12).



Resim 12: Voges-Proskauer testi sonucu oluşan görüntü

Dental plak ve dekalsifiye dentin örneklerinden izole edilen *Streptococcus mutans* bakterilerine ve referans suşlara uygulanan biyokimyasal test sonuçları Tablo 5'de gösterilmiştir.

İzolatlarımızdan **1B**'nin sorbitolü, **4A**'nın inülini fermente etmediği, diğer tüm izolatların şekerleri fermente ettiği gözlemlendi.

Tüm izolatların arginin ve eskülini hidrolize ettiği, Voges-Proskauer testinde aseton ürettiği, nişastayı parçaladıkları ve basitrasine direnç gösterdikleri belirlendi.

Melibiyoz fermentasyonu, eskülin hidrolizi ve basitrasin dirençliliği *Streptococcus mutans* için belirleyici biyokimyasal özellikler olduğundan elde edilen tüm izolatların *Streptococcus mutans* olduğu fenotipik olarak kanıtlandı.

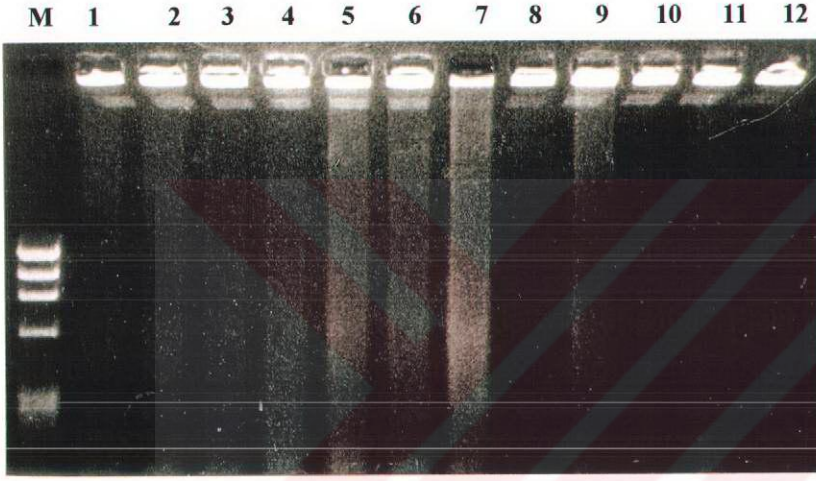


İzolat No	Mannitol	Sorbitol	Melibiyoz	Rafinoz	Nişasta	Dekstrin	İnülin	Eskülin	Arginin	Voges-Proskauer(Aseton ürcetimi)	Katalaz (H ₂ O ₂)	Basitrasin Dirençliliği
1A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
1B	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
2A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
2B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
3B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
3A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
4B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
4A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
5A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
5B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
6B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
6A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
7A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
7B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
8A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
8B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
9A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
9B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
10A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
10B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
11B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
11A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
12B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
12A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
13A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
13B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
14A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
14B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
NCTC 10449	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
CNCTC 8/77	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-

Tablo 5 : *S. mutans* izolatlarına ve referans suşlara uygulanan biyokimyasal test sonuçları.

3.2. DNA İzolasyonunun Kontrolü

Biyokimyasal testlerle fenotipik özelliklerinin *S. mutans* olduğu belirlenen izolatlardan DNA ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen genomik DNA'ların bütünlükleri, kırılıp kırılmadıkları agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. Elektroforez sonucunda 28 izolatın ve *Streptococcus mutans* NCTC 10449 referans suşundan yüksek molekül ağırlıklı tek bant elde edildi (Resim 13).



M1 → DNA Marker (Φ x174DNA/HaeIII) (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp)

Resim 13: *Streptococcus mutans* (NCTC 10449) referans suşundan izole edilen DNA örneklerinin elektroforez görüntüleri

Çalışmamızda kullandığımız referans suşlardan biri olan, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÜKENS)'nden temin edilen *Streptococcus mutans* CNCTC 8/77'den DNA izolasyonu yapılamadığı için çalışma dışı bırakıldı.

3.3. AP-PCR Sonuçları

3.3.1. *S. mutans* DNA'larının karşılaştırılması

Referans suş ile çürük dentin örneklerinin karşılaştırılması

Karşılaştırma referans suş DNA'sı ile "B" olarak kodlanan çürük dentin örneklerinden

izole edilen *Streptococcus mutans* DNA'ları arasında yapıldı.

OPA-05 primeri ile 603 baz çiftinde, referans suş ile çürük dentinden elde edilen 3B, 8B ve 11B izolatları dışındaki tüm izolatlarda ortak bant yapısı gözlemlendi. 194 baz çiftinde, 13B izolatı dışında tüm izolatlar referans suş ile ortak bant yapısı gösterdi.

OPA-13 primeri ile 603 baz çiftinde 3B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B ve 12B izolatları referans suşta gözlenen belirgin bant yapısını gösterdi. 2B, 5B, 6B, 9B, 10B, 11B, 12B ve 14B izolatlarının 872 baz çiftinde; 1B, 3B, 5B, 6B, 7B ve 13B izolatlarının ise 1353 baz çiftinde referans suştaki belirgin banta sahip olduğu gözlemlendi.

Referans suş ile dental plak örneklerinin karşılaştırılması

Karşılaştırma referans suş ile "A" olarak kodlanan dental plak örnekleri arasında yapıldı.

OPA-05 primeri ile 603 baz çiftinde 3A, 8A, 11A ve 13 A dışındaki izolatlarda referans suş ile ortak bant yapısı gözlemlendi. 194 baz çiftinde 11A dışındaki tüm izolatlar referans suş ile ortak bant yapısı gösterdi.

OPA-13 primeri kullanılarak 603 baz çiftinde 3A, 5A, 6A ve 8A izolatları; 872 baz çiftinde 3A, 5A, 9A, 10A, 11A, 12A, 13A ve 14A izolatları; 1353 baz çiftinde ise 1A, 3A, 4A, 5A ve 6A izolatları referans suştaki kuvvetli bant patternini gösterdi.

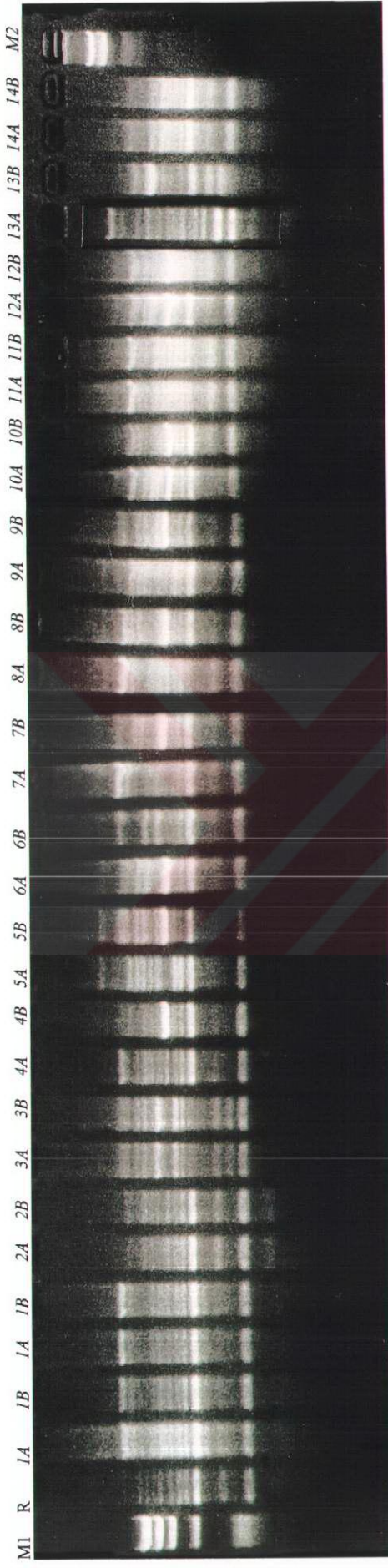
Dental plak ile çürük dentin örneklerinin karşılaştırılması

Karşılaştırma “A” olarak kodlanan dental plak örnekleri ile “B” olarak kodlanan çürük

dentin örnekleri arasında yapıldı.

OPA-05 primeri kullanılarak elde edilen AP-PCR bantlarının uzunluğu yaklaşık olarak 50 ile 1800 nükleotit baz çifti arasında değişti. **1A-1B, 2A-2B, 3A-3B, 11A-11B, 14A-14B** no’lu izolatlar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında aynı bant patternine sahip oldukları görüldü. **4A-4B, 5A-5B, 6A-6B, 7A-7B, 8A-8B, 9A-9B, 10A-10B, 12A-12B, 13A-13B** no’lu izolatların ise birbirlerinden farklı bant patternlerine sahip olduğu belirlendi. (Resim 14)

OPA-13 primeri kullanılarak elde edilen AP-PCR bantlarının uzunluğu yaklaşık 40 ile 2000 nükleotit arasında değişti. Referans suş ile tamamıyla aynı bant patternine sahip izolat belirlenmedi. **1A-1B, 2A-2B, 3A-3B, 11A-11B** no’lu izolatların aynı bant patternine sahip olduğu görüldü. **4A-4B, 5A-5B, 6A-6B, 7A-7B, 8A-8B, 9A-9B, 10A-10B, 12A-12B, 13A-13B, 14A-14B** no’lu izolatlarda ise birbirlerinden farklı bant patternleri gözlemlendi (Resim 15).



M1: DNA Marker (Φ x174DNA/HaeIII)

M2: DNA Marker (λ DNA/ EcoRI+HindIII)

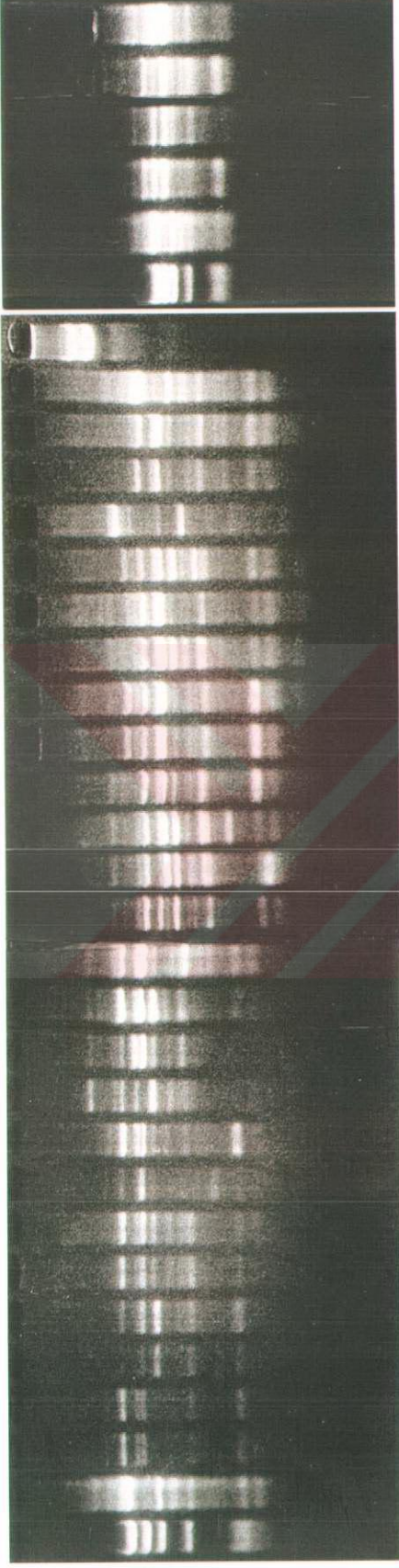
R: Referans suş (*S. mutans* NCTC 10449)

A: Sağlam diş yüzeyinden alınan dental plakattan izole edilen *S. mutans*'a ait DNA bantları

B: Çürük dentin örneğinden izole edilen *S. mutans*'a ait DNA bantları

Resim 14: OPA 05 ile elde edilen *S. mutans* izolatlarına ait AP-PCR görüntüleri

M1 R 1A 1B 2A 2B 3B 3A 4B 4A 5A 5B 6B 6A 9A 9B 10A 10B 11B 11A 12B 12A 13A 13B 14A 14B R M2 MI R R 7A 7B 8A 8B



M1: DNA Marker (Φ x174DNA/HaeIII)

M2: DNA Marker (λ DNA/ EcoRI+HindIII)

R: Referans suş (*S. mutans* NCTC 10449)

A : Sağlam diş yüzeyinden alınan dental plaktan izole edilen *S. mutans*'a ait DNA bantları

B : Çürük dentin örneğinden izole edilen *S. mutans*'a ait DNA bantları

Resim 15: OPA 13 ile elde edilen *S. mutans* izolatlarına ait AP-PCR görüntüleri

3.3.2. Benzerlik İndekslerinin Hesaplanması

Polaroid film ile görüntülenen bantların okunmasında sadece belirgin bantlar değerlendirilmeye alındı. Değerlendirmede aynı hastaya ait sağlam diş yüzeylerinden alınan dental plaktan ve çürük kavitesi içinden alınan dekalsifiye dentin örneklerinden elde edilen *Streptococcus mutans* izolatları karşılaştırıldı. Bantlar var (1) ya da yok (0) durumuna göre değerlendirildi ve benzerlik indeksleri oluşturuldu.

Benzerlik indeksinin hesaplanmasında Sokal ve Sneath (93) tarafından geliştirilen benzerlik indeksi formülü kullanılarak dental plaktan ve çürük kavitesinden izole edilen *Streptococcus mutans* bakterilerinin AP-PCR analizleri sonucunda elde edilen bantlar arasındaki benzerlik karşılaştırmaları yapıldı (36).

$$\text{Benzerlik İndeksi} = a / a+b$$

a= Dental plaktan izole edilen *S. mutans* DNA'ları arasındaki homolog bant sayısı

b= Dekalsifiye dentin örneğinden izole edilen *S. mutans* DNA'ları arasındaki homolog olmayan bant sayısı

OPA-05 Primeri kullanılarak elde edilen benzerlik indekslerinin 0.357 ile 0.750 arasında olduğu belirlendi (Tablo 6).

İZOLAT NO	BENZERLİK İNDEKSİ ($a/a+b$)	OPA-05 İLE ELDE EDİLEN BENZERLİK İNDEKSİ
1A,1B	1	1
2A,2B	1	1
3A,3B	1	1
4A,4B	8 / 8+6	0.571
5A,5B	9 / 9+5	0.642
6A,6B	6 / 6+5	0.545
7A,7B	5 / 5+5	0.500
8A,8B	9 / 9+4	0.750
9A,9B	6 / 6+5	0.545
10A,10B	8 / 8+3	0.727
11A,11B	1	1
12A,12B	9 / 9+3	0.750
13A,13B	5 / 5+9	0.357
14A,14B	1	1

Tablo 6: OPA-05 primeri ile belirlenen benzerlik indeksleri

OPA-13 primeri için AP-PCR sonuçlarına ait benzerlik indekslerinin 0.083 ile 0.666 arasında olduğu belirlendi (Tablo 7).

İZOLAT NO	BENZERLİK İNDEKSİ (a/u+b)	OPA-13 İLE ELDE EDİLEN BENZERLİK İNDEKSİ
1A,1B	1	1
2A,2B	1	1
3A,3B	1	1
4A,4B	4 / 4+4	0.500
5A,5B	5 / 5+3	0.625
6A,6B	3 / 3+6	0.333
7A,7B	3 / 3+3	0.500
8A,8B	4 / 4+4	0.500
9A,9B	4 / 4+6	0.400
10A,10B	6 / 4+6	0.600
11A,11B	1	1
12A,12B	7 / 7+5	0.583
13A,13B	11 / 1+11	0.083
14A,14B	6 / 6+3	0.666

Tablo 7: OPA-13 primeri ile belirlenen benzerlik indeksleri

Benzerlik indeksi ortalaması her hastaya ait benzerlik indeksi değerlerinin toplamı örnek sayısına bölünmesi ile belirlendi.

$$\text{Benzerlik İndeksleri Ortalaması} = \text{Benzerlik İndeksleri Toplamı} / \text{örnek sayısı}$$

OPA-05 primeri ile elde edilen AP-PCR sonuçlarına göre aynı bant patternini gösteren örneklerde (*1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 11A, 11B, 14A, 14 B*) benzerlik indeksi 1 olarak kabul edildi ve diğerleri ile karşılaştırıldı.

OPA-05 primeri ile benzerlik indeksi ortalaması 0.741 olarak saptandı.

OPA-13 primeri ile elde edilen AP-PCR sonuçlarına göre aynı bant patternini gösteren örneklerde (*1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 11A, 11B*) benzerlik indeksi 1 olarak kabul edildi ve diğerleri ile karşılaştırıldı.

OPA-13 primeri ile benzerlik indeksi ortalaması 0.628 olarak belirlendi.

OPA-05 ve OPA-13 primerleri için belirlenen benzerlik indeksleri Tablo 8'de gösterilmektedir.

Kullanılan Primerler	Benzerlik İndeksleri Ortalaması (n=14)	Standart Sapma	Standart Hata
OPA-05	0.742	0.225	0.060
OPA-13	0.628	0.283	0.076

Tablo 8: OPA-5 ve OPA-13 primerleri için hesaplanan benzerlik indeksleri

İstatistiksel Değerlendirme

OPA-05 ve OPA-13 primerleri kullanılarak elde edilen AP-PCR sonuçlarına göre hesaplanan benzerlik indeksleri arasındaki fark tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA) ile değerlendirildi.

Kareler Toplamı	F Değeri	P Değeri
0.091	1.393	0.2485

* Primerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p < 0.05$).

4. TARTIŞMA

Mutans streptokoklar, dental plak ve diş çürüğü etiyolojisinde önemli bir mikroorganizma grubudur. Biyokimyasal, immünolojik ve genetik yöntemlerle identifiye edilerek karyojenite ile ilgili çalışmalar yapılabilir(7,19,43,61,93).

Konvansiyonel fenotipik identifikasyon yöntemlerinden olan biyokimyasal testler yaygın olarak kullanılmakla beraber serotipik ve genotipik ayrımları hakkında bilgi verememektedir. Serolojik testlerde kullanılan antikorlarla ilgili bazı uygulama zorlukları genotipleme yöntemleri ile ilgili çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur.

Çalışmamızın ilk bölümünde dental plaktan ve dentin çürüğünden *Streptococcus mutans* izolatları elde edildi ve çeşitli biyokimyasal testler uygulanarak fenotipik identifikasyonları yapıldı.

Ağızdan *Streptococcus mutans* kültürü elde edilmesinde örnek alma yöntemi, kullanılan kültür ortamı, laboratuvar koşulları ve manipülasyon gibi faktörler önemlidir. *Streptococcus mutans* diş yüzeylerinde tutunarak çoğalabildiğinden epidemiyolojik çalışmalarda dental plak örneklerinin kullanılmasının daha uygun olduğu bildirilmiştir.

Plak ve uyarılmamış tükürük örneklerinde *Streptococcus mutans*'ın belirlenmesi için yapılan bir çalışmada, örnek alınan bireylerde klinik olarak çürük gözleendiği halde tükürük örneklerinin %20'sinde *Streptococcus mutans* saptanamamıştır. *Streptococcus mutans* ile

ilgili epidemiyolojik çalışmalarda, plak örneklerinden uyarılmış ve uyarılmamış tükürük örneklerine göre daha başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (33).

Wennerholm ve ark (105), değişik diş yüzeylerinden tahta kürdan, iğne, sond ve diş ipiyle topladıkları plak örneklerinde *Streptococcus mutans* prevalansını incelemiştir. Tahta kürdanla alınan örneklerde, diş ipi ve sondla alınan örneklere oranla daha fazla *Streptococcus mutans* bulunmuştur. Örnek alma sırasında bireylerin ağızında bulunan *Streptococcus mutans* düzeyi çok düşük ise, bazı tekniklerle saptanması mümkün olmamaktadır.

Çalışmamızda 20 vakadan 14'ünde hem dental plaktan hem de çürük dentinden *Streptococcus mutans* izolasyonu yapılabildi. 4 vakada sadece dentinden, 2 vakada ise sadece plaktan izole edildi. Hem plak hem çürük dentinden bakteri izolasyonu yapılamayan örnekler çalışma dışı bırakıldı. 40 adet plak ve çürük dentin örneğinden yapılan ekimler sonucu her ikisinde de üreme gösteren 28 *Streptococcus mutans* izolatu çalışmaya dahil edildi.

Streptococcus mutans referans suşlarından kültür hazırlanmasında ve izolasyonunda trypticase-yeast extract-cystine-sucrose-bacitracin (TYCSB) agar, Brucella agar, brain-heart infusion.(BHI) agar, mitis-salivarius-bacitracin (MSB) agar, TSY20B agar gibi seçici besiyerleri kullanılmaktadır (40,65,83,89,96,101,103) Çalışmamızda besiyeri olarak TYCSB agar kullanıldı.

Fenotipik identifikasyon yöntemlerinden şeker fermentasyon testleri *Streptococcus mutans*'ın şekerlerden asit üretmesi esasına dayanmaktadır. Çalışmamızda *Streptococcus mutans* koloni morfolojilerine ve biyokimyasal test sonuçlarına göre identifiye edildi.

Mannitol, inülin, melibiyoz fermentasyonu gibi testler *Streptococcus mutans*'ı diğer oral streptokoklardan ayırt edilmesi için uygulanan identifikasyon yöntemlerindedir (7,9,40). Melibiyoz fermentasyonu, *Streptococcus mutans* kolonileri için ayırt edici

özelliğindedir. *Streptococcus sobrinus*'a benzeyen izolatlar melibiyozu fermente edemezler. *Streptococcus mutans* izolatlarının ise %88'i melibiyozu fermente edebilmektedir.

Grönroos ve ark (42), aktif çürüklü bireylerden elde edilen *Streptococcus mutans* izolatlarından %39'unun melibiyozu fermente etmediğini bildirmişlerdir. Karyojenik *Streptococcus mutans* türlerinin kromozomlarında çoklu şeker metabolizması operonunu (*multiple sugar metabolism= msm*) ilgilendiren bir delesyon olduğu bildirilmiştir (28). Çalışmamızda dental plak ve dentin örneklerinden elde ettiğimiz *Streptococcus mutans* izolatlarının tamamının melibiyozu fermente ettiği gözlemlendi.

Eskülin hidrolizinin identifikasyonda daha belirleyici olduğu bildirilmiştir (67). Çalışmamızdaki izolatların tümünün melibiyoz fermentasyonunun yanında eskülini de hidrolize ettiği belirlendi. Bu izolatların tümü basitrasine direnç göstererek basitrasini içeren seçici besiyerinde çoğalabildi.

Melibiyoz fermentasyonu, eskülin hidrolizi ve basitrasini dirençliliği gibi belirli biyokimyasal özellikleri gösteren 28 izolat, *Streptococcus mutans* olarak tanımlandı ve AP-PCR yöntemiyle genotipik incelemeleri yapıldı.

Streptococcus mutans izolatları arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesinde restriksiyon endonükleaz analizi ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizm (RFLP) yöntemi kullanılmıştır (62,63,87). Bu yöntemler uygulamadaki zorluklar, uzun zaman alması ve sonuçların yorumlanmasındaki güçlüklerden dolayı sıklıkla tercih edilmemektedir.

Moleküler biyolojik bir yöntemin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilmesi için, birbirine yakın olan suşları ayırt edebilmesi, hızlı ve kolay bir şekilde uygulanabilmesi ve elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olması gereklidir (95). AP-PCR tekniğinin bu özellikleri karşıladığı ileri sürülmektedir (48).

AP-PCR bakterilerin epidemiyolojik ve taksonomik incelemeler için genetik yapılarının belirlenmesinde kullanılan güvenilir, tekrarlanabilir ve ayırt edici bir yöntemdir. Virulansa sahip olan ve olmayan tiplerin incelenmesinde, klonal tipten ortaya konmasında yararlı sonuçlar sağlamaktadır.

Bakterilerin DNA parmak izlerinin polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile belirlenmesi basit ve hızlı sonuç veren bir yöntem olmasının yanı sıra izolatlar arasındaki DNA sekans farklılıklarının ortaya çıkarılmasına yönelik hassas bir yöntem olduğu belirtilmiştir. (5,12,47,48,53,64). Çalışmamızda genotipleme yöntemi olarak AP-PCR'ı tercih ettik.

AP-PCR çalışmalarında bakterilerden DNA ekstraksiyonu için birçok farklı yöntem kullanılmıştır (42,64,65,47,48). Genomik DNA'nın ekstraksiyonu zaman gerektiren bir işlemdir. Kalıp DNA, tek bir koloniden ya da doğrudan doğruya oral plak örneklerinden saflaştırılabilirse işlemin basitleşmesi sağlanabilir.

Çalışmamızdaki *Streptococcus mutans* DNA'ları, fenol ve kloroform ekstraksiyonu yapılmadan saflaştırıldı. Bu yöntem kolay ve hızlı olmasının yanısıra fenol ekstraksiyonu ile elde edilen DNA ile aynı sonucu vermesi nedeniyle tercih edildi (14,88).

AP-PCR yönteminin doğru sonuç vermesinde optimizasyonun önemi büyüktür. Mg^{+2} , primer, DNA ve Taq polimeraz konsantrasyonları, termal döngü koşulları, primer hibridizasyon sıcaklığı gibi faktörler PCR sonuçlarını etkileyebilmektedir.

Mg^{+2} konsantrasyonu primer eşleşmesini, ürün spesifitesini, primer-dimer artefaktlarını, enzim aktivitesini etkileyebilen önemli bir faktördür. Primer-kalıp DNA kompleksinin stabilitesini sağlar (10,64,97). Mg^{+2} konsantrasyonu, deoksinükleotid trifosfatlardan 0.5-2.5 mM daha fazla olmalıdır. Farklı bakterilerden hazırlanan kalıp DNA'ların Mg^{+2} iyonları için farklı afinite gösterdiğinden farklı konsantrasyonlarda $MgCl_2$

kullanılmaktadır. Her DNA sentezi için uygun $MgCl_2$ konsantrasyonu her çalışmada deneysel olarak belirlenmelidir.

Çalışmamızda en uygun oranı belirleyebilmek için sırasıyla 3.6 mM, 4 mM ve 4.4 mM Mg^{+2} konsantrasyonları denendi. Optimum amplifikasyonun 4.4 mM Mg^{+2} konsantrasyonunda gerçekleştiği belirlendi.

PCR sonuçlarında elektroforezin voltajı önemli olduğundan çalışmamızda elde ettiğimiz PCR ürünleri, 100 volt ve 130 voltta %1'lik agaroz jellerde yürütülerek karşılaştırıldı. En belirgin bantlar 100 voltta gözlemlendi.

AP-PCR' da kısa primerler kullanıldığı için bağlanma ısısı tekrarlanabilirlik açısından önemli bir kriterdir. 10 merlik bir primer, *S. mutans* genomu içinde farklı bölgeleri çoğaltabildiği için düşük sıcaklıktaki bağlanma yanlış eşleşmelere neden olabilir. Bu durum, çalışmalarda farklı sonuçların alınmasına yol açabilmektedir.

Çalışmamızda 36°C bağlanma ısısı uygulandı. Farklı bölgeler çoğaltılarak farklı ampikonlar elde edildi ve bu koşullar ile tekrarlanabilir sonuçlar alınması sağlandı.

Yüksek primer konsantrasyonları yanlış eşleşme ve özgün olmayan ürünlerin oluşumuna neden olabildiğinden 0.1-0.5 μM 'lık primer konsantrasyonları ile optimal sonuç elde edilebilmektedir. Çalışmamızda 110 ng / μl 'lik primer konsantrasyonu kullanıldı.

Primer spesifitesi ve primerlerin uzunluğu, polimeraz zincir reaksiyonunu etkileyen önemli faktörlerdendir (64,88). Primerlerdeki baz sıraları, çapraz amplifikasyonlar oluşmaması için sadece hedef DNA üzerindeki bir bölgede bulundurulmalı, başka hedef DNA sekanslarında bulunmamasına dikkat edilmelidir. Spesifik primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki, dizisi bilinen bölümler dikkate alınarak tamamlayıcı kısımlar tasarlanır. Primerler ampikonların kalitesini ve sayısını temel olarak seçildiğinden ampikon patternlerindeki farklılıklar sekans farklılıklarının göstergesi olabilir.

Amplikon parmak izlerinin kullanılan primere bağılı olarak değişmesi bu görüşü desteklemektedir(64).

Saarela ve ark (88), OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-13, OPA-17 primerlerini *S. mutans* ve *S. sobrinus* izolatları üzerinde denemişler; OPA-05 (5' AGGGGTCTTG-3') ve OPA-13 (5' CAGCACCCAC-3') primerlerinin *S. mutans* için spesifik olduğunu belirtmişlerdir Zhan ve ark (109), yüksek çürük aktivitesi gösteren hastalardan elde ettikleri *S. mutans* izolatlarının genetik farklılıklarını bizim de çalışmamızda kullandığımız OPA-05 ve OPA-13 primerleri ve AP-PCR yöntemi ile inceleyerek önemli genetik farklılıklar saptamışlardır.

Li ve ark (64) ise insanlardan elde edilen *Streptococcus mutans*'ın genotipik ayrımı için AP-PCR yöntemi ve kromozomal DNA parmakizi yöntemini karşılaştırmışlar; OPA-02 primerinin *Streptococcus mutans* türleri arasında ayırt edici ve tekrarlanabilir amplikonlar oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Saarela ve ark (88), *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* izolatları arasındaki farklılıkları AP-PCR yöntemi ile incelemiştir. 19 bireyden elde edilen 81 izolatta, 33 AP-PCR tipi belirlenmiştir. OPA-05 ve OPA-13 primerleri ile gerçekteşirilen AP-PCR, *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* kolonileri arasındaki farklılıkları belirlemede başarılı olmuş, ancak serotipe özgü amplifikasyon ürünlerine rastlanmamıştır. Aynı çalışmada 19 bireyden 16'sında heterojenite saptanmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız OPA-05 primeri ile 14 bireyden 9 tanesinde, OPA-13 primeri ile 14 bireyden 10 tanesinde heterojenite saptandı.

Grönroos ve ark (42), 7 bireyden elde edilen tükruk ve dental plak örneklerinde *Streptococcus mutans*'ın klonal farklılıkları araştırmışlardır. Diş yüzeylerinde ve çürük lezyonlarında gözlenen *Streptococcus mutans* kolonilerindeki farklılıklar, fenotipik tipleme

yöntemi olan bacteriocin tiplenmesi ve AP-PCR yöntemi ile incelenmiş ve paralel sonuçlar alınmıştır. Ayrıca sayıca yüksek düzeyde *Streptococcus mutans* bulunduran bölgelerdeki klonal tipler ile düşük düzeyde *Streptococcus mutans* bulunan bölgelerdeki klonal tipler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

OPA-05 ve OPA-13 primerleri ile yapılan AP-PCR çalışmalarında farklı bant uzunlukları elde edilmiştir. OPA-05 primerinin kullanıldığı bir çalışmada en belirgin AP-PCR ürünlerinin 900 baz çifti ile 1800 baz çifti arasında yer aldığı ifade edilmiştir (88). Zhan ve ark (109), 83 izolat inceledikleri çalışmalarında 300 ve 650 baz çifti arasında iki belirgin DNA bantı tespit etmişlerdir. Li ve ark (64) ise farklı primerler kullanarak 6-12 ampikon elde etmişlerdir.

Bant patternleri, geniş-ölçekli prosedürlerden elde edilen DNA bantları ile karşılaştırılmış ancak 1.8 kilobaz çiftinden daha geniş ampikonlar gözlenmemiştir. Bu bantların bulunmama nedeni, ekstraksiyon sırasında geniş DNA segmentlerinin kırılmasına bağlı olabilir.

Bizim çalışmamızda OPA-05 primeri ile *Streptococcus mutans* NCTC 10449 referans suşundan ve tüm izolatlardan elde edilen AP-PCR bantlarının uzunluğu 50 ile 1800 baz çifti arasında değişti. OPA-13 primeri ile elde edilen bantlar ise 40 ile 2000 baz çifti arasında değişen uzunluklara sahipti.

Loos ve ark (73), az sayıdaki izolatla yapılan örneklemelerin gözlenen klonal tiplerin gerçek oranını belirlemek için yeterli olmadığını ifade etmiştir. Daha fazla örnekle daha çok klonal tip bulunabilir.

Çalışmamızda kullanılan izolat sayısı diğer araştırmacıların kullandığı sayıya yakın olmakla birlikte sayının artırılması ile daha farklı klonal tip belirlenebileceği düşüncesindeyiz.

PCR parmak izlerinin değerlendirilmesi izolatlara aynı termal cycler ve amplifikasyon karışımını kullanarak PCR işlemi uygulandıktan ve ürünler aynı jelde yan yana yüklendikten sonra elde edilen bantları görsel olarak karşılaştırılarak yapılabilir (18,42).

Li ve ark (64), PCR parmak izlerini bilgisayar destekli DNA PRO-RFLP yazılımı ile her DNA bantı için bilgisayar tarafından oluşturulan üç boyutlu görüntüleri karşılaştırarak değerlendirmişlerdir.

Etidyum bromür ile boyanan jellerde AP-PCR bantlarının bilgisayar tarafından yapılan değerlendirilmelerinin her zaman doğru sonuç vermeyebileceği, silik bantların yanlış sonuçlara neden olabileceği , bu nedenle bu jellerde görsel değerlendirmenin uygun olduğu bildirilmiştir (42).

Çalışmamızda DNA amplifikasyonu için aynı amplifikasyon karışımı ve termal cycler kullanılarak elde edilen PCR ürünleri etidyum bromür ile boyanan jelde yan yana yüklenip agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve bantlar görsel olarak değerlendirildi.

AP-PCR parmak izlerinin değerlendirilmesinde belirgin bantların varlığına göre hesaplanan benzerlik indekslerinden yararlanır (36,93).

Li ve ark (64), AP-PCR ile kromozomal DNA parmak izi yöntemlerinin benzerlik indekslerini karşılaştırmışlardır. 14 *Streptococcus mutans* izolatının kullanıldığı çalışmada, AP-PCR ayırt edici sonuçlar vermiştir. AP-PCR ile belirgin bir homoloji saptanan durumlarda, bu homolojinin ikinci bir primer kullanılarak ya da kromozomal DNA parmakizi yöntemi ile doğrulanması gerektiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda iki farklı primer kullanarak farklı bant yapısı gösteren izolatlar için elde ettiğimiz benzerlik indekslerinin OPA-05 için 0.357 ile 0.750 arasında , OPA-13 için 0.083 ile 0.666 arasında değiştiği belirlendi (Tablo 6 ve 7).

Benzerlik indekslerinin ortalaması OPA-05 için 0.74, OPA-13 için 0.63 olarak bulundu (Tablo 8). Ortalama benzerlik indeksi 1'den uzaklaştıkça belirleyicilik özelliği artar. OPA-13 primeri ile elde edilen 0.63 ortalama benzerlik indeksi değerini göz önüne aldığımızda OPA-13 primerinin genotipik farklılıkları belirlemede OPA-05 primerinden daha belirleyici olduğunu söyleyebiliriz.

AP-PCR sonucunda elde edilen bantların var olup olmama durumları incelenerek *Streptococcus mutans*'ın karyojenitesi veya fenotipik özellikleri ile ilgili yorum yapılabilir.

Saarela ve ark (88), 65 bireyden elde ettikleri 127 *Streptococcus mutans* izolatında OPA-13 primeri ile 1.5 kilobaz çiftinde belirgin bant yapısı gözlemişlerdir. OPA-05 primeri izolatlar arasında 2 belirgin AP-PCR patterni saptamıştır. Birinci patternde 1.8 ve 1.1 kilobaz çifti arasında, ikinci patternde ise 1.8 ve 0.9 kilobaz çiftinde belirgin AP-PCR ürünleri mevcuttur.

Çalışmamızda referans suş ile 14 çürük kavitesinden alınan örneklerdeki *Streptococcus mutans* izolatları karşılaştırıldığında OPA-05 primeri ile 194 ve 603 baz çiftlerinde; OPA-13 primeri ile 603, 872 ve 1353 baz çiftlerinde belirgin bant yapıları belirlenmiştir.

Streptococcus mutans'ın farklı klonal tipleri arasında genetik farklılıklar mevcuttur. Bu farklılıklar fizyolojik özelliklerini ve virulanslarını da etkileyebilmektedir. Karyojeniteye etkisi olan spesifik genetik özelliklerin belirlenmesi çürük riskinin belirlenmesinde önemlidir(37).

Polimeraz zincir reaksiyonunda *Streptococcus mutans*'ın virulansı ile ilgili olduğu düşünülen farklı genler için tasarlanan spesifik primerler kullanılmaktadır.

Igarashi ve ark (47,48,49,50), dekstranaz enziminin üretilmesinde görevli olan *dexA* genine özgü primerleri kullanarak yaptıkları çalışmalarda 530 baz çifti ve 1200 baz çifti

uzunluğundaki fragmanların *dex* genlerine ait olduğu belirlemiştir. *Dex* genleri ile ilgili çalışmalarda *Streptococcus mutans*'ın referans suşları kullanılmış, klinikten elde edilen örnekler incelenmemiştir.

Colby ve ark (28) ise melibiyoz fermente etmeyen *Streptococcus mutans* türlerindeki *wapA* ve glikoziltransferaz enzimlerinin salgılanması ile ilişkili olan *gtfA* genlerine özgü primerleri kullanmışlardır.

Allaker ve ark (4), derin dentin çürüğüne sahip çekilmiş dişlerden steril çelik rond frez ile aldıkları dentin örneklerinin seyreltmelerinden TYCSB agar besiyerine ekim yapmışlar, üreyen *Streptococcus mutans* kolonilerinin biyokimyasal testlerle identifikasyonunu gerçekleştirdikten sonra bu izolatlarla ve *Streptococcus mutans* NCTC 10449 referans suşuna polimeraz zincir reaksiyonu uygulamışlardır. Çalışmalarında *Streptococcus mutans*'ın diş yüzeyine adezyonunu sağlayan yüzey proteini Antijen I/II'nin yapımı ile ilgili *spaP* genine spesifik bir primer kullanarak 192 baz çiftinde *spaP* geninin bir sekansının amplifiye olduğunu gözlemişlerdir.

Çalışmamızda OPA-05 primeri ile *S. mutans* NCTC 10449 referans suşunda, dental plak ve çürük kavitelere ait 28 izolattan 26 tanesinde 194 baz çiftinde çok belirgin bir bant elde edilmiştir (Resim 14). Elde edilen bu belirgin bantın *spaP* genine ait olabileceğini, bu gene özgü bir primer kullanılarak yapılacak olan PCR incelemeleri sonucunda çalışmamızda kullandığımız izolatların karyojenitesinin belirlenmesinde ilave veriler elde edileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda *Streptococcus mutans* NCTC 10449 referans suşunda polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen AP-PCR ürünleri incelendiğinde karyojenik olduğu bilinen referans suştaki belirgin bantların çürük kavitesinden elde edilen izolatlarda da görüldüğü belirlendi. *Streptococcus mutans* izolatlarında AP-PCR ile saptanan ve karyojenite ile ilgili

olduđu dűşűnűlen bantların hangi genlerle iliřkili olduđunu DNA probları kullanarak belirlemeye yűnelik ileri çalıřmaların yapılması kanısındayız.

DNA ve RNA problarının yakın bir gelecekte, diřhekim kliniklerinde rutin olarak kullanılarak ađız içindeki kantitatif bakteri dűzeyinin saptanacađı ve űrűk riskinin belirlenebileceđi dűřűnűlmektedir. Bűylelikle űrűk riskinin azaltılmasına yűnelik teřhis ve tedavi planlamasında bűyűk kolaylıklar sađlanabilecektir (37).

Ayrıca *Streptococcus mutans*'ın dental plak oluřumunda etkili olan yűzey proteinlerinin, ekstrasellűler polisakkarit oluřturan glukoziltransferaz enzimlerinin ve çoklu řeker metabolizmasındaki spesifik genlerin űrűđe etkisinin molekűler genetik yűntemlerle incelenmesinin űrűk çalıřmalarına űnemli geliřmeler sađlayacađını dűřűnűyoruz.



SONUÇ

Çalışmamızda sağlam diş yüzeylerinden ve çürük kavitelere alınmış örneklerden izole edilen *Streptococcus mutans* bakterileri biyokimyasal yöntemlerle tanımlandıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu ile genotipik farklılıkları incelenmiştir.

İki farklı primerin kullanılarak elde edilen AP-PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde benzerlik indekslerinden yararlanılmıştır. Dental plak ve çürük dentin örneklerinden izole edilen *Streptococcus mutans* bakterileri arasında OPA-05 primeri ile 14 hastadan 9'unda, OPA-13 primeri ile 14 hastadan 10'unda farklı AP-PCR patternleri saptanmıştır.

Benzerlik indeksleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Her iki primerle de benzer sonuçlar elde edilmesi primerlerin *Streptococcus mutans*'a spesifik olduğu bulgusunu desteklemektedir.

Streptococcus mutans için spesifik olduğu bildirilen OPA-05 ve OPA-13 primerleri *Streptococcus mutans* NCTC 10449 referans suşunda ve bizim klinik örneklerimizdeki izolatlarda ortak olan belirgin bant yapıları saptanmıştır. OPA-05 primeri ile 194 ve 603 baz çiftlerinde, OPA-3 primeri ile 603, 872 ve 1353 baz çiftlerinde belirgin bant yapıları gözlemlenmiştir. Referans suştaki bant yapısına sahip izolatların DNA yapılarının daha detaylı incelenmesi ile karyojenite hakkında daha detaylı veriler elde edilebileceği düşünülmektedir.

DNA ve RNA problemlerinin yakın bir gelecekte kliniklerde de yaygın olarak kullanılacağı, dişhekimi kliniklerinde rutin olarak bu problemleri kullanarak ağız içindeki bakterileri kalitatif olarak saptayarak çürük riskini belirleyebileceği düşünülmektedir.

Böylelikle çürük riskinin azaltılmasına yönelik teşhis ve tedavi planlamasında büyük kolaylıklar sağlanabilecektir.

Çalışmamız karyoloji alanında *Streptococcus mutans*'ın DNA bazında incelendiği ilk çalışmalardan biridir. Bu konuda yapılacak ileri çalışmalarda farklı moleküler biyolojik yöntemlerin kullanılması ile çürük incelemelerinde önemli gelişmelerin sağlanacağını düşünmekteyiz.



ÖZET

Çalışmamızda kötü ağız hijyenine sahip yaşları 13 ile 35 arasında değişen 20 hastanın sağlam diş yüzeylerindeki dental plaktan steril tahta kürdanlar ve çürük kavitelelerinden ekskavatörler ile alınan dekalsifiye dentin örnekleri seyreltme işlemlerinden sonra TYCSB agar besiyerine ekimleri yapıldı. Referans olarak *Streptococcus mutans* NCTC 10449 ve *Streptococcus mutans* CNCTC 8/77 suşları kullanıldı.

37° C'de %5 CO₂ ile inkübasyondan sonra her iki bölgeden de üreme gözlenen ve koloni morfolojisi referans suşlarla benzerlik gösteren 28 *S. mutans* izolatına karbonhidrat fermentasyonu, arginin ve eskülin hidrolizi, basitrasin dirençliliği, katalaz, hemolizin üretimi ve Voges-Proskauer testleri uygulanarak fenotipik identifikasyonları gerçekleştirildi. Test sonuçlarına göre *Streptococcus mutans* olduğu saptanan izolatlara genotipik ayrımlarını belirlemek amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu uygulandı.

Streptococcus mutans için spesifik olduğu bildirilen OPA-05 ve OPA-13 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen AP-PCR sonucunda elde edilen *Streptococcus mutans*' a ait DNA bant yapıları *Streptococcus mutans* NCTC 10449 referans suşunun DNA bant yapısı ile karşılaştırıldı. OPA-05 primeri ile 194 ve 603 baz çiftlerinde; OPA-13 primeri ile 603, 872 ve 1353 baz çiftlerinde referans suş ile ortak bant yapıları belirlendi.

Sağlam diş yüzeylerinden ve çürük kavitelelerinden elde edilen *Streptococcus mutans* izolatlarına ait DNA bantlarının değerlendirilmesinde homolog olan bantların var olma ya da

olmama durumlarına göre oluşturulan benzerlik indekslerinden yararlanıldı. OPA-05 ve OPA-13 primerleri için ortalama benzerlik indeksleri arasındaki fark anlamlı bulunmadı.

Çalışmamızda *Streptococcus mutans* NCTC 10449 referans suşunda polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen AP-PCR ürünleri incelendiğinde karyojenik olduğu bilinen referans suştaki belirgin bantların çürük kavitesinden ve plak örneklerinden elde edilen izolatlarda da görüldüğü belirlendi. Karyojenik olduğu düşünülen izolatlardaki bu belirgin DNA bantlarındaki spesifik genlere özgü DNA problemleri ile *Streptococcus mutans*'ın karyojenitesini belirlemeye yönelik daha ileri çalışmalar planlanması konunun gelişimine katkıda bulunacaktır.



SUMMARY

In this study, a total of 40 tooth site samples were obtained from twenty 13 to 35 year-old patients with poor oral hygiene. Plaque samples from sound tooth surfaces were gathered using sterile wooden toothpicks and deep layers of carious dentin were removed by sterile excavators. Serially-diluted samples were cultured on TYCSB agar. *Streptococcus mutans* NCTC 10449 was used for reference strain. All plates were incubated at 37°C with 5%CO₂ for 48 h. When samples exhibited growth, colonies resembling *S. mutans* were detected. 28 isolates that exhibited growth from both tooth sites were included in the study. For identification these 28 isolates were tested for their ability to ferment sorbitol, mannitol, melibiose; to cleavage arginine and esculin and to resist to bacitracine. After biochemical tests were performed, isolates were AP-PCR typed. The AP-PCR patterns were compared to those obtained with *S. mutans* NCTC 10449. PCR amplification was performed using OPA-05 and OPA-13 primers. The AP-PCR fingerprints were analyzed by side-by-side visual comparison. OPA-05 distinguished two main PCR patterns among isolates. The isolates shared a strong AP-PCR product 194 bp and 603 bp. With OPA-13, three strong patterns 603, 872 and 1353 bp in size. The difference between the similarity indices for OPA-05 and OPA-13 was not statistically significant.

For further studies, it is planned to investigate the cariogenicity of the isolates using DNA probes specific to the genes related with the strong AP-PCR amplicons.

KAYNAKLAR

1. Alaluusua, S., Alaluusua, S.J., Karjalainen, J. et al, "The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children", Arch. Oral Biol., 39, (1994), 467-471.
2. Alaluusua, S., Kleemola-Kujala, E., Nyström, M. et al., " Caries in the primary teeth and salivary *Streptococcus mutans* and lactobacilli levels as indicators of caries in permanent teeth", Pediatric Dentistry, 9, (1987), 126-130.
3. Alaluusua, S., Mättö, J., Grönroos, L., et al., "Oral colonization by more than one clonal type of *mutans streptococcus* in children with nursing bottle dental caries", Archs. Oral Biol., 41,2, (1996), 167-173.
4. Allaker, R.P., Seddon, S.V., Tredwin, C., Lynch, E., "Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of the *SpaP* gene in teeth rendered caries free", J Dent, 26, (1998), 443-445.
5. Arbeit, R.D., Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. In: Manual of clinical microbiology. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Tenover, R.H., eds. 7. Ed. ASM Press: Washington DC. 1999, pp.116-137
6. Balakrishnan, M., Simmonds, S.R., Tagg, J.R., " Dental caries is a preventable infectious disease", Aust. Dent. J , 45, 4, (2000), 235-245.

7. Beighton, D., Hardie, J.M., Whiley R.A., "A scheme for the identification of viridans streptococci", J Med. Microbiol., 35, (1991), 367-372.
 8. Beighton, D., Russell, R.R.B., Hayday, H. "The isolation and characterisation of *Streptococcus mutans* serotype h from dental plaque of monkeys (*Macacae fascicularis*)", J Gen. Microbiol, 124, (1984), 271-279.
 9. Beighton, D., Russell, R.R.B., Whiley, R.A., "A simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*", Caries Res., 25, (1991), 174-178.
 10. Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Atlas, R.M., "Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction and other methods and their application", Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 26,3,4, (1991), 301-334.
 11. Bender, G.H., Sutton, S.V., Marquis, R.E., "Acid tolerance, proton permeabilities and membrane ATPases of oral streptococci", Infect. Immun., 53, (1986), 331-338.
 12. Bentley, R.W., Leigh, J.A., "Development of PCR-based hybridization protocol for identification of streptococcal species", J Clin Microbiol, 33, (1995), 1296-1301.
 13. Birkhed, D., Tanzer, J.M., "Glycogen synthesis pathway in *Streptococcus mutans* strain NCTC 10449S and its glycogen synthesis-defective mutant 805", Arch. Oral Biol., 24, (1994), 67-73.
 14. Bollet, C., Gevaudan, M.J., de Lamballerie, X., et.al., "A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram-positive or acid fast bacteria", Nucleic Acids Res., 19, (1991), 1955.
 15. Boyar, R.M., Bowden, G.H., "The microflora associated with the progression of incipient carious lesions in teeth of children living in a water-fluoridated area", Caries Res., 19, (1985), 298-306.
-

16. Bratthall, D., "Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*", *Odontol Revy*, 21, (1970),143-152.
17. Burne, R.A., "Oral streptococci...Products of their environment", *J Dent. Res.*, 77,3, (1998), 445-452.
18. Burr, M.D., Pepper, I.L., "Variability in presence-absence scoring of AP-PCR fingerprints affects computer matching of bacterial isolates", *J Microbiol. Methods*, 29, (1997), 63-68.
19. Cangelosi, G.A., Iversen, J.M., Zuo, Y., "Oligonucleotid probes for mutans streptococci", *Mol. Cell Probes*, 8, (1994), 73-80.
20. Carlsson, J., Grahnén, H., Jonsson, G., "Lactobacilli and streptococci in the mouth of children", *Caries Res.*, 9, (1975), 333-339.
21. Carlsson, J., Söderholm, G., Almfeldt, I., "Prevalance of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans* in the mouth of persons wearing full-dentures", *Arch. Oral Biol.*, 14, (1969), 243-249.
22. Carlsson, P. On the epidemiology of mutans streptococci. Thesis, Malmö: University of Lund, 1988.
23. Caufield, P.W., Cutter, G.R., Dasanayake, A.P., "Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity", *J. Dent. Res.*, 72, (1993), 37-45.
24. Caufield, P.W., Walker, T.M., " Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphism", *J Clin. Microbiol.*, 27, (1989), 274-278.

25. Caufield, P.W., Warnemuehler, Y., Hansen, J.B., "Familial clustering of the *Streptococcus mutans* cryptic plasmid strain in a dental clinic population", *Infect. Immun.*, 38, (1982), 785-787.
26. Cengiz, T. *Endodonti*, 3. Baskı, Barış Yayınları, İzmir: Fakülteler Kitabevi, 1990, 109-127.
27. Clarke, J.K., "On the bacterial factor in the aetiology of dental caries", *Brit. J. Exp. Pathol.*, 5, (1924), 141-147.
28. Colby, S.M., Harrington, D.J., Russell, R.R.B., "Identification and genetic characterization of melibiose-negative isolates of *Streptococcus mutans*", *Caries Res.*, 29, (1995), 407-412.
29. Coykendall, A.L., "Genetic heterogeneity in *Streptococcus mutans*", *J. Bacteriol.*, 106, (1971), 192-196.
30. Coykendall, A.L., "Base composition of deoxyribonucleic acid isolated from cariogenic streptococci", *Arch. Oral Biol.*, 15, (1970), 365-368.
31. Coykendall, A.L., Lizatte, P., "*Streptococcus mutans* isolates identified by biochemical tests and DNA base contents", *Arch. Oral Biol.*, 23, (1978), 427-428.
32. Crowley, P.J., Brody, L.J., Michalek, S.M., Bleiweis, A.S., "Virulence of a *spaP* mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model", *Infect. Immun.*, 67, (1999), 1201-1206.
33. Dasanayake, A.P., Caufield, P.W., Cutter, G.R. et al., "Differences in the detection and enumeration of mutans streptococci due to differences in methods", *Arch. Oral Biol.*, 40, (1995), 345-351.
34. de Soet, J.J., Graaf, J., "Microbiology of carious lesions", *Dental Update*, 25, (1998), 319-324.

35. de Soet, J.J., Nyvad, B., Killian, M., "Strain related acid production by oral streptococci", *Caries Res.*, 34, (2000), 486-490.
36. Ergül, A. Asmalarda genomik DNA parmak izi analizi ile moleküler karakterizasyon, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2000, 65-67.
37. Featherstone, J.D.B., "The science and practice of caries prevention", *JADA*, 131, (2000), 887-899.
38. Gibbons, R.J., van Houte, J., "On the formation of dental plaques", *J Periodontol.*, 44, 1973, 347-360.
39. Gilmour, M.N., Whittom, T.S., Kilian M., Selander, R.K., "Genetic relationship among the oral streptococci", *J Bacteriol*, 169, (1987), 5247-5257.
40. Gold, O.G., Jordan, H.V., van Houte, J., " A selective medium for *Streptococcus mutans*", *Arch. Oral Biol.*, 18, (1973), 1357-1364.
41. Grönroos, L., Quantitative and qualitative characterization of mutans streptococci in saliva and in the dentition. University of Helsinki, Dept. of pedodontics and Othodontics, Helsinki. Academic Dissertation, (2000).
42. Grönroos, L., Alaluusua, L., "Site specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting", *Caries Res.*, 34, (2000), 474-480.
43. Hamada, S., Slade, H.D., "Biology, immunology and cariology of *Streptococcus mutans*", *Microbiol. Rev.*, 44, (1980), 331-384.
44. Hamilton, I.R., Buckley, N.D., "Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance", *Oral Microbiol. Immunol.*, 6, (1991), 65-71.
45. Hardie, J.M., 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, 1986, s. 1054-1063.

46. Hillman, J.D., Dzuback, A.L., Andrews, S.W., "Colonization of the human oral cavity by a *Streptococcus mutans* mutant producing increased bacteriocin", J Dent. Res, 66,6, (1987), 1092-1094.
47. Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N., "Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction", Oral Microbiol. Immunol., 5, (1996), 294-298.
48. Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N., "Rapid identification of mutans streptococcal species", Microbiol. Immunol., 40,11, (1996), 867-871.
49. Igarashi, T., Ichikawa, K., Yamamoto, A., goto, N., "Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the dex genes", J microbiol. Methods, 46, (2001), 99-105.
50. Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N., " Detection of dextranase producing gram-negative oral bacteria", Oral Microbiol. Immunol, 13, (1998), 382-386.
51. Igarashi, T., Ayako, Y., Goto, N., "Polymerase chain reaction for identification of oral streptococci: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei* and *Streptococcus salivarius*", J Microbiol. Methods, 34, (1998), 81-88.
52. Innis, M.A., Myombo, K.B., Gelford, D.H., Brow, M.A.D., "DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA", Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 85, 9436-9440.
53. Jacques, N., "Molecular biological techniques and their use to study streptococci in dental caries", Aust. Dent. J, 43,2, (1998), 87-98.
54. Kelstrup, J., Richmond, S., West, C., Gibbons, R.J., "Fingerprinting human and oral streptococci by bacteriocin production and sensitivity", Arch. Oral Biol., 15, (1970), 1109-1116.

55. Keyes, P.H., "The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications", *Arc. Oral Biol.*, 1, (1960), 304-320.
56. Kidd, E.A.M., Joyston-Bechal, S., *Essentials of dental caries. The disease and its management*, 2. Ed., New York: Oxford University Press, 1998, s. 123-124.
57. Klug, W.S., Cummings, M.R., *Genetik Kavramlar*, Çev.Ed. Prof. Dr. Cihan Öner, Palme Yayıncılık, Ankara: 2002, 474-480.
58. Kozai, K., Wang, D.S., Sandham, H.J., Philips, H.I., "Changes in strains of mutans streptococci induced by treatment with chlorhexidine varnish", *J dent. Res.*, 70, (1991), 1252-1257.
59. Koray, F., *Diş Çürükleri*, İstanbul: Dünya Tıp Kitabevi, 1981, 7-34.
60. Köhler, B., Andreen, I., Jonsson, B., "The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4-years of age", *Oral Microbiol. Immunol.*, 3, (1988), 14-17.
61. Kral, T., Daneo-Moore, L. "Biochemical differentiation of certain oral streptococci", *J Dent. Res.*, 60, (1991), 1713-1718.
62. Kulkarni, G.V., Chan, K.H., Sandham, H.J., "An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci", *J Dent. Res.*, 70, (1991), 1155-1166.
63. Kuramitsu, H.K., "Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics", *Crit. Rev. Oral Biol. and Med.*, 4, (1993), 159-176.
64. Li, Y., Caufield, P.W., "Arbitrarily primed polymerase chain reaction reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans", *Oral Microbiol. Immunol.*, 13, (1998), 17-22.

65. Li, Y., Caufield, P.W., Emanuelsson, I.R., Thornquist, E., "Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations",
66. Li, Y., Navia, J.M., Caufield, P.W., "Colonization by mutans streptococci in the mouths of 3-and 4-year old Chinese children with or without enamel hypoplasia", *Arch. Oral Biol.*, 39, (1994), 1057-1062.
67. Liébana, J., Parejo, E., Castillo, A., Gutierrez, J., "Phenotypic characterization of oral streptococci by classical methods", *Microbios.*, 76, (1993), 7-18.
68. Lindquist, B., Emilson, C.G., "Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in humans harboring both species", *Caries Res.*, 25, (1991), 146-152.
69. Lindquist, B., Emilson, C.G., "Distribution and prevalence of mutans streptococci in human dentition", *J Dent. Res.*, 69, (1990), 1160-1166.
70. Listgarten, M.A., "The structure of dental plaque", *Periodontol.* 2000, 5, (1994), 52-65.
71. Loesche, W.J. "Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay", *Microbiol. Rev.*, 50, (1986), 353-380.
72. Loesche, W.J., *Dental caries is a treatable infection.* Illinois: Charles C Thomas Publisher, 1982.
73. Loos, B.G., van Winkelhoff, A.J., Dundorf, R.G. et. al, "A statistical approach to the ecology of *Porphyromonas gingivalis*", *J Dent. Res.*, 7, (1992), 353-358.
74. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., *Plasmids.* In: *Brock biology of microorganisms.* Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. Eds. Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ, 1997, 323-333.

75. Maiden, M.F.J., Lai, C.H., Taner, A., Characteristics of oral Gram-positive bacteria.
In: Contemporary oral Microbiology and Immunology. Slots, J., Taubman, M.A., eds.
Mosby: St Louis MI 1992, pp. 342-372.
76. Marsh, P.D., Martin, M.V., Oral Microbiology- 4.Ed., Bodmin, Cornwall: MPG Books
Ltd., 2001.
77. Maslow, J., Mulligan, M.E., "Epidemiological typing systems", Infect. Control Hosp.
Epid., 17, (1996), 595-604.
78. Miller, W.D., The microorganisms of the human mouth, S.S. White Dental Mfg. Co.
Philadelphia, PA, 1890.
79. Newbrun, E., Cariology-3. Ed., Chicago: Quintessence Publishing Co., Inc, 2000
80. Olive, D.M., Bean, P., "Principles and applications of methods for DNA-based typing
of microbial organisms", J Clin. Microbiol., 37, (1999), 1661-1669.
81. Orland, F.J., Blayney, J.R., Harrison, R.W. et al. "Experimental caries in germ-free
rats inoculated with enterococci", J Am. Dent. Assoc., 50, (1955), 259-272.
82. Perch, B., Kjærns E., Ravan T., "Biochemical and serological properties of
Streptococcus mutans from various human and animal sources", Acta Pathol.
Microbiol. Scand. B, 82, (1974), 357-370.
83. Perez, L.S., Acosta-Gio, A.E., "Caries risk assessment from dental plaque and salivary
Streptococcus mutans counts on two culture media", Arch. Oral Biol., 46, (2001),
49-55.
84. Rosan, B., Lamont, R.J., "Dental plaque formation", Microbes and Infection, 2,
(2000), 1599-1607.
85. Rudney, J.D., "Saliva and dental plaque", Adv. Dent. Res., 14, (2000), 29-39.

86. Russell, R.R.B., "The application of molecular biological genetics to the microbiology of dental caries", *Caries Res.*, 28, (1994), 68-82.
 87. Saarela, M., Alaluusua, S., Takei, T., Asikainen, S., "Genetic diversity within isolates of mutans streptococci recognized by an rRNA gene probe", *J Clin. Microbiol.*, 31, (1993), 584-587.
 88. Saarela, M., Alaluusua, S., Takei, T., Asikainen, S., "Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction", *Archs. Oral Biol.*, 41, (1996), 821-826.
 89. Schaeken, M.J.M., van der Hoeven, J.S., Franken, H.C.M., "Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium", *J Dent. Res.*, 65, (1986), 906-908.
 90. Schleifer, K.L., Kilpper-Bälz, R., Krous, J., Gehring, F., "Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and mutans-like streptococci", *J Dent. Res.*, 63, (1984), 1047-1050.
 91. Smith, D.J., King, W.F., Wu, C.D., Shen, B.I., Tauban, M.A., "Structural and antigenic characteristics of *Streptococcus sobrinus* glucan binding proteins", *Infect. Immun.*, 66, (1998), 5565-5569.
 92. Smorawinska, M., Kuramitsu, H.K., "DNA probes for detection of cariogenic *Streptococcus mutans*", *Oral Microbiol. Immunol.*, 7, (1992), 177-181.
 93. Sokal, R.R., Sneath, P.N.A, *Principles of numerical taxonomy*, San Fransisco: Freeman, 1963.
 94. Southern, E.M., "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", *J Mol. Biol.*, 98, (1975), 503-517.
-

95. Swaminathan, B., Matar, B., Molecular Typing Methods, In: persing, D.H., White, T.J., Tenover, F.J. and Smith, T.F. eds. Diagnostic Molecular Microbiology, ASM Press, 1993, p. 641.
96. Tanzer, J.M., Börjesson, A.C., Laskowski, L. et al, " Glucose-sucrose-potassium-tellurite-bacitracin agar, an alternative to mitis salivarius-bacitracin agar for enumeration of *Streptococcus mutans*", J Clin. Microbiol., 20, (1984), 653-659.
97. Temizkan, G. , Arda, N., Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi Yayınları No:1, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1999, 57-63.
98. van Houte, J., "Bacterial specificity in the etiology of dental caries", Int. Dent. J, 30, (1980), 305-326.
99. van Houte, J., "Role of microorganisms in caries etiology", J Dent. Res., 73,3, (1994), 672-681.
100. van Houte, J., Lopman, J., Kent, R., " The predominant cultivable flora of sound and carious human root surfaces", J Dent. Res., 79, (1994), 1727-1734.
101. van Palenstein-Heldermann, W.H., Ijsseldijk, M., Huis in 't Veld, J.H.J., "A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva", Arch. Oral Biol., 28, (1983), 599-603.
102. Vickermann, M.M., Jones, G.W., "Sucrose-dependent accumulation of oral streptococci and their adhesion-defective mutants on saliva-coated hydroxyapatite", Oral Microbiol. Immunol, 10,(1995), 175-182.
103. Wade, W.G., Aldred, M.J., Walker, D.M., " An improved medium for isolation of *Streptococcus mutans*", J Med. Microbiol., Dec, 22,4, (1986), 319-323.

104. Welsh, J., McClelland, M., "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers", *Nucleic Acids Res.*, 18, (1990), 7213-7218.
105. Wennerholm, K., Lindquist, B., Emilson, C.G., "The toothpick method in relation to other plaque sampling techniques for evaluating mutans streptococci", *Eur. J. Oral Sci.*, Feb, 103,1, (1995), 36-41.
106. Whiley, R.A., Beighton, D., "Current classification of the oral streptococci" *Oral Microbiol. Immunol.*, 13, (1998), 195-216.
107. Williams, J.L., "A contribution to the study of dental enamel", *Dent. Cosmos.*, 39, (1897), 169-196.
108. Yeung, M.K., "Molecular and genetic analyses of *Actinomyces spp.*", *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 10, (1999), 120-138.
109. Zhan, L., Hoover, C.I., Featherstone, J.D.B., "Genetic diversity of mutans streptococci in high caries risk people", IADR/ AADR/CADR 80th General Session, March 6-9, 2002.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Konya'da doğdum. İlk öğrenimimi Konya Devrim İlkokulunda, orta ve lise öğrenimimi Konya Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1996 yılında Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'nden mezun olup aynı yıl Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı'nda Doktora programına başladım. 1998 yılında araştırma görevlisi kadrosuna atandım. Halen Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

Dt. Zeynep ERGÜCÜ