

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ÇOCUK DİŞHEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI

**ERKEN ÇOCUKLUK ÇÜRÜĞÜ OLAN ÇOCUKLARDA
BAKTERİ FLORASININ İNCELENMESİ VE FLOR VERNİK
UYGULAMASININ BAKTERİ FLORASINA OLAN ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Ezgi MERİÇ

Danışman
Prof. Dr. Behiye BOLGÜL

HATAY-2017

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ÇOCUK DİŞHEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI

**ERKEN ÇOCUKLUK ÇÜRÜĞÜ OLAN ÇOCUKLARDA BAKTERİ
FLORASININ İNCELENMESİ VE FLOR VERNİK
UYGULAMASININ BAKTERİ FLORASINA OLAN ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ
EZGİ MERİÇ

Danışman

Prof. Dr. BEHİYE BOLGÜL

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 16463
nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2017

KABUL VE ONAY

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ÇOCUK DİŞHEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI

Erken Çocukluk Çürüğü Olan Çocuklarda Bakteri Florasının İncelenmesi ve Flor Vernik
Uygulamasının Bakteri Florasına olan Etkisinin Değerlendirilmesi

Uzmanlık Tezi

EZGİ MERİÇ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 08/12/2017 günü sözlü olarak yapılan tez
savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof. Dr. Behiye BOLGÜL(imza)

Üye: Prof. Dr. Sema ÇELENK.....(imza)

Üye: Doç. Dr. Buket AYNA(imza)

Bu tez, Dekanlığımız Çocuk Dişhekimliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Tarih: 08/12/2017

İmza

Prof. Dr. Nizami DURAN
Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca danışmanlığımı yapmış olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bakış açısıyla bana yön veren Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Dişhekimliği Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Behiye BOLGÜL'e,

Tezimin mikrobiyolojik çalışmalarının gerçekleştirilmesinde bilgilerini ve desteğini esirgemeyen Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Nizami DURAN'a,

Tezimin laboratuvar çalışmalarında değerli katkıları olan Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine,

Tez çalışmam sırasında önemli yardımları olan Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yar. Doç. Dr. Çiğdem EL'e,

Uzmanlık tezimin istatistiksel analizlerinin yapılmasında ve tezimin yazımı sırasında bana manevi olarak destek olan Ankara Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı araştırma görevlisi, sevgili kardeşim Çağdaş Salih MERİÇ'e,

Tez çalışmam sırasında verdikleri desteklerden dolayı Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi idari personellerine,

Çalışmamı 16463 nolu bilimsel araştırma projesi ile destekleyen Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Beni büyütüp yetiştiren, eğitimimin her aşamasında bana sonsuz destek veren, hayatım boyunca hep yanımda olan, teşekkürlerin yetersiz olacağı kıymetli anneme, babama ve kız kardeşime

Teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET	XIV
ABSTRACT	XVI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Diş Çürükleri	3
2.1.1 Çürüğün Tanımı ve Etiyolojisi	3
2.1.2 Çürüklerin Sınıflandırılması	6
2.1.3 Erken Çocukluk Çağı Çürüğü (EÇÇ)	7
2.1.3.1 EÇÇ Tanımı ve Etiyolojisi	7
2.1.3.1.1 Mikrobiyolojik Faktörler	8
2.1.3.1.2 Plak Varlığı	9
2.1.3.1.3 Diyet Faktörleri	9
2.1.3.1.4 Konak Yapısı	10
2.1.3.1.5 Sosyoekonomik düzey	10
2.1.3.1.6 Psikososyal Risk Faktörleri	11
2.1.3.1.7 Sosyokültürel Risk Faktörleri	11
2.1.3.1.8 Yetersiz Flor Alımı	12
2.1.3.2 EÇÇ'nin Genel Sağlığa Olan Etkileri	13
2.2 Diş Çürüklerinin Teşhis Yöntemleri	14
2.3 Diş Çürüklerinin Değerlendirilmesi	15
2.4 Tükürük	17
2.4.1 Tükürük Akış Hızı Ölçümü	18
2.4.1.1 Uyarılmamış Tükürük Akış Hızı Ölçümü	18
2.4.1.2 Uyarılmış Tükürük Akış Hızı Ölçümü	19
2.4.2 Tükürük pH Ölçümü	19
2.4.2.1 İndikatör İle pH Tayini	20
2.4.2.2 Elektriksel Yol İle Tayini	20
2.4.3 Tükürük Tamponlama Kapasitesi Ölçümü	20

2.5 Streptokoklar	21
2.5.1 Karyojenik MS'lerin Patojenik Özellikleri	22
2.5.2 Oral Streptokoklar	24
2.5.2.1 Streptococcus salivarius	24
2.5.2.2 Streptococcus sanguinis	24
2.5.2.3 Streptococcus mitis	25
2.5.2.4 Streptococcus anginosus	25
2.5.2.5 Mutans Streptokoklar- MS	25
2.5.2.5.1 Mutans Streptokoklarının Virulansı	27
2.5.2.5.1.1 Ekstrasellüler Polisakkarit (EPS) Sentezi	27
2.5.2.5.1.2 Diş Yüzeyine Yapışma (Adezyon)	28
2.5.2.5.1.3 İntrasellüler Glikojen-Benzeri Polisakkarit (IPS) Sentezi	28
2.5.2.5.1.4 Asit Toleransı (Asidürite) Ve Asit Üretimi (Asidojenite)	28
2.5.2.5.2 Mutans Streptokoklarının Sakkaroz Metabolizması	29
2.5.2.5.3 Mutans Streptokokları Subtipleri	31
2.5.2.5.3.1 Streptococcus sobrinus	31
2.5.2.5.3.2 Streptococcus mutans	32
2.5.2.5.3.3 Streptococcus ferus	33
2.5.2.5.3.4 Streptococcus cricetus	33
2.5.2.5.3.5 Streptococcus rattus	33
2.5.2.5.3.6 Streptococcus macacae	34
2.5.2.5.3.7 Streptococcus downei	34
2.5.3 EÇÇ Oluşumunda Etkili Olan MS'lerin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	34
2.5.3.1 MS'lerin İzolasyonunda Kullanılan Kültür Yöntemleri	35
2.5.3.2 Tükürük Örneklerinden S. mutans Sayımı	36
2.5.3.2.1 Laboratuvar Metodları	36
2.5.3.2.2 Diş Kliniğinde Uygulanan Yöntem (Chairside Metodu)	36
2.5.3.3 Plakta Mutans Streptokokların Sayımı	37
2.5.3.4 MS'lerin İzolasyonunda Kullanılan Moleküler Yöntemler	37
2.5.3.4.1 MS'lerin Tiplendirilmesi	37
2.5.3.4.1.1 Fenotipleme Yöntemleri	38
2.5.3.4.1.1.1 Bakteriyosin Tipleme	38
2.5.3.4.1.1.2 Biyotipleme	38
2.5.3.4.1.1.3 Serotipleme	38
2.5.3.4.1.2 Genotipleme Yöntemleri	39

2.5.3.4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	39
2.5.3.4.2.1 PCR'in Temel Bileşenleri	39
2.5.3.4.2.1.1 Kalıp DNA	39
2.5.3.4.2.1.2 Primerler	40
2.5.3.4.2.1.3 Polimerazlar	40
2.5.3.4.2.1.4 Tamponlar Ve MgCl ₂	40
2.5.3.4.2.1.5 dNTP Karışımı	41
2.5.3.4.2.2 PCR Tipleri	41
2.5.3.4.2.2.1 Arbitrarily Primed Polimeraz Zincir Reaksiyonu (AP-PCR)	41
2.5.3.4.2.2.2 Nested PCR	42
2.5.3.4.2.2.3 Multipleks PCR	42
2.5.3.4.2.2.4 Real Time (RT) PCR (Gerçek Zamanlı PCR)	43
2.5.3.4.2.2.5 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi: RFLP	43
2.5.3.4.2.3 PCR'in Oluşum Mekanizması	43
2.5.3.4.2.3.1 Denatürasyon	44
2.5.3.4.2.3.2 Bağlanma (Annealing)	44
2.5.3.4.2.3.3 Uzama (Elongasyon)	44
2.6 Laktobasiller	47
2.6.1 Laktobasil Sayım Testleri	48
2.6.1.1 Laboratuvar Testleri	48
2.6.1.1.1 Tükürükte Laktobasil Sayımı	48
2.6.1.1.2 Plakta Laktobasil Sayımı	49
2.6.1.2 Diş Kliniğinde Uygulanan Yöntem (Chairside Metodu)	49
2.7 Diş Çürüğünden Korunma Yöntemleri	51
2.8 Flor Uygulamaları	54
2.8.1 Uzun Süreli Salınım Yapan Ajanlar (Dental Vernikler)	55
2.8.2 Uzun Süreli Salınım Yapan Ajanların Etki Mekanizması	56
2.8.2.1 Mikrobiyal Kolonizasyonun Engellenmesi	56
2.8.2.2 Bakteri Üremesinin Ve Metabolizmasının Engellenmesi	57
2.8.2.3 Olgun Biyofilmin Parçalanması	57
2.8.2.4 Plak Biyokimyasının Ve Ekolojisinin Modifikasyonu	57
2.8.3 Oral Bakteriler Tarafından Flor Alımı	58
2.8.4 Florun Metabolik Etkileri	60
2.8.4.1 Florun Ağız Mikroorganizmaları Üzerine Etkisi	63
2.8.4.2 Florun Biyofilm Üzerine Etkileri	64

2.8.4.2.1 Florun Biyofilm Oluşumunun İlk Aşaması Üzerine Etkileri	64
2.8.4.2.2 Florun Biyofilm Oluşumunun İkinci Aşaması Üzerine Etkileri	64
2.8.4.2.3 Florun Biyofilm Oluşumunun Üçüncü Aşaması Üzerine Etkileri	65
3. GEREÇ VE YÖNTEM	66
3.1 Araç ve Gereçler	66
3.1.1 Araçlar	66
3.1.2 Besiyeri ve Kimyasal Maddeler	67
3.1.3 Kullanılan Sarf Malzemeler	68
3.1.4 Kullanılan Standart Suşlar	68
3.2 Yöntem	68
3.2.1 Hasta Seçimi	69
3.2.2 Ağız İçi Muayene	70
3.2.3 Çürük İndeksi ve Hasta Değerlendirmesi	70
3.2.4 Mikrobiyolojik Örneklerin Alınması ve Bakteriyel Kültür	71
3.2.5 Örneklerin Mikrobiyolojik Analizi	72
3.2.5.1 PCR İncelemesi	75
3.2.5.1.1 Genomik DNA Ekstraksiyonu	76
3.2.5.1.2 PCR Amplifikasyonu	78
3.2.5.1.3 50X TAE Elektroforez Tamponu	81
3.2.5.1.4 Yükleme (Loading) Tamponu (6X)	81
3.2.5.1.5 PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi Tekniği ile Görüntülenmesi	82
3.3 Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi	84
4. BULGULAR	85
5. TARTIŞMA	94
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	104
7. KAYNAKLAR	106
EKLER	
Ek- 1	146
Ek- 2	147
Ek- 3	148
Ek- 4	150
ÖZGEÇMİŞ	151

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Diş çürüğünün başlaması için gerekli faktörlerin şematik gösterilmesi	5
Şekil 2.2. Sakkarozun S. mutans tarafından metabolize edilmesi	31
Şekil 2.3. PCR aşamaları.....	45
Şekil 2.4. PCR reaksiyonunun işleyişi	46
Şekil 2.5. CRT ® bacteria (Ivoclar Vivadent, Amherst, N.Y).....	50
Şekil 2.6. Bakteri hücreesindeki flor birikimi, dağılımı ve salımı	59
Şekil 2.7. Oral bakterilerin karbonhidrat metabolizmalarında yer alan reaksiyonlar.....	61
Şekil 3.1. EÇÇ grubundan örnek hasta	69
Şekil 3.2. Çürüksüz gruptan örnek hasta.....	70
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan flor verniği preparatı	71
Şekil 3.4. Uyarılmamış tükürük örneklerinin toplanması	72
Şekil 3.5. Plak örneklerinin toplanması ve transport besiyerine aktarılması.....	72
Şekil 3.6. Çalışmada kullanılan vorteks cihazı (Boeco, Almanya).....	73
Şekil 3.7. Kanlı agara ekilen mutans kolonilerinin görüntüsü	73
Şekil 3.8. Bakteri tiplendirmesinde kullanılan otomatize kültür sistemi	74
Şekil 3.9. DNA ekstraksiyonu sırasında kullanılan ticari kit	75
Şekil 3.10. Müller Hinton Broth besiyeri.....	76
Şekil 3.11. İnkübasyonda kullanılan soğutmalı santrifüj cihazı.....	77
Şekil 3.12. PCR amplifikasyonunda kullanılan ısı döngü cihazı	78
Şekil 3.13. Elektroforez sırasında kullanılan mikrodalga fırın	82
Şekil 3.14. Elektroforez ünitesi.....	83
Şekil 3.15. UV görüntüleme cihazı.....	84
Şekil 4.1. Bakteri sayılarının çalışma ve kontrol gruplarında değişimi-1	88
Şekil 4.2. Bakteri sayılarının çalışma ve kontrol gruplarında değişimi-2.....	88
Şekil 4.3. PCR incelemesi sonucu çürüklü çocuklarda izole edilen streptokok türlerinin dağılımı.....	90
Şekil 4.4. PCR incelemesi sonucu çürüksüz çocuklardan izole edilen streptokok türlerinin dağılımı.....	90
Şekil 4.5. PCR incelemesi sonucu çürüklü ve çürüksüz çocuklarda streptokok türlerinin karşılaştırılması.....	91
Şekil 4.6. S. sobrinus'un diğer bakterilerle birlikte pozitif görülme oranları.....	93

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Uyarılmış ve uyarılmamış tükürük için eşik değerleri (ml/dk)	19
Çizelge 2.2. Oral streptokokların sınıflandırılması.....	22
Çizelge 2.3. İnsanda diş çürüğü ile ilgili bulunan bakteri türleri.....	23
Çizelge 2.4. Tükürükteki S. mutans düzeyleri.....	37
Çizelge 2.5. Tükürükte saptanan laktobasil düzeyleri	49
Çizelge 2.6. Yaş gruplarına göre diş macunlarındaki flor konsantrasyonları ve günlük kullanım miktarları.....	53
Çizelge 2.7. Florun ağız bakterileri üzerine biyolojik etkileri.....	62
Çizelge 3.1. Streptokoklar için multiplex PCR’da kullanılan primer dizileri	79
Çizelge 3.2. gtfB geni amplifikasyonu için PCR karışımı.....	80
Çizelge 3.3. gtfB geni ısı döngüleri	81
Çizelge 4.1. Yaş ve cinsiyete göre grupların dağılımı	85
Çizelge 4.2. Çalışma grubunda saptanan dmft/dmfs değerleri	86
Çizelge 4.3. Bakteriyel kültür bulgularına göre gruplarda MS ve LB düzeylerinin dağılımı.....	86
Çizelge 4.4. Bakteri sayılarındaki değişimin gruplara göre flor öncesi ve flor sonrası istatistiksel analizleri.....	87
Çizelge 4.5. Oral streptokokların çürüklü ve çürüksüz hasta gruplarında PCR yöntemiyle alt tiplerinin dağılımı	89
Çizelge 4.6. S. sobrinus ‘un diğer bakterilerle birlikte pozitif olma oranlarının değerlendirilmesi	92

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	:Adenin
AAPD	:American Academy of Pediatric Dentistry
α	:Alfa
APF	:Asidüle fosfat florür
AP-PCR	:Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction
ATPaz	:Adenozintrifosfataz
bp	:base pair (baz çifti)
β	:Beta
>	:Büyük
C	:Sitozin
Ca^{+2}	:Kalsiyum iyonu
$CaPO_4$:Kalsiyum fosfat
cDNA	:Komplementer DNA
CFU-cfu	:Colony Forming Unit (Koloni Oluşturan Birim Sayısı)
CO_2	:Karbondioksit
CPI Sondu	:Community Periodontal Index sondu (Top Uçlu Periodontal Sond)
CPP-ACP	:Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate Complex (Kazein Fosfopeptit ve Amorf Kalsiyum Fosfat)
dATP	:deoksiadenintrifosfat
dCTP	:deoksisitozin trifosfat
dGTP	:deoksiguanin trifosfat
Δ pH	:pH gradyanı
DIFOTI	:Digital Fiber Optic Transillumination (Dijital Fiber Optik Transilüminasyon)
dk	:Dakika
dmfs	:Number of Decayed, Missing due to Caries and Filled Surface in the Primary Dentition (Süt dişlenme döneminde çürüklü, dolgulu ve çürük sebebi ile kaybedilmiş diş yüzeyi)
DMFS	:Number of Decayed, Missing due to Caries and Filled Surface in the Permanent Dentition (Daimi dişlenme döneminde çürüklü, dolgulu ve çürük sebebi ile kaybedilmiş diş yüzeyi)

dmft	:Number of Decayed, Missing due to Caries and Filled Teeth in the Primary Dentition (Süt dişlenme döneminde çürüklü, dolgulu ve çürük sebebi ile kaybedilmiş diş sayısı)
DMFT	:Number of Decayed, Missing due to Caries and Filled Teeth in the Permanent Dentition (Daimi dişlenme döneminde çürüklü, dolgulu ve çürük sebebi ile kaybedilmiş diş sayısı)
DNA	:Deoksiribo nükleik asit
dNTP	:dinükleotidtrifosfat
ds	:decayed surface (Süt dişinde çürüklü olan diş yüzey sayısı)
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
dt	:decayed teeth (Süt dişinde çürüklü olan diş sayısı)
dTTP	:deoksitimin trifosfat
ECC	:Early Childhood Caries
ECM	:Electronic Caries Monitor-Elektronik çürük monitörü
EÇÇ	:Erken Çocukluk Çağı Çürüğü
EDTA	:Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EPS	:Ekstrasellüler polisakkarid
F ⁻	:Flor iyonu
FOTI	:Fiber Optic Transillumination (Fiber Optik Transilüminasyon)
fs	:filled surface (Süt dişinde dolgulu olan diş yüzey sayısı)
ft	:filled teeth (Süt dişinde dolgulu olan diş sayısı)
FTF	:Fruktoziltransferaz
g	:Gram
G	:Guanin
G6P	:Glukoz-6-fosfat
GIcNAc	:N-asetilglukozamin
GSTB	:Glukoz-Sakkaroz-Tellürit Basitrasin agar
GTF	:Glukoziltransferaz
H ⁺	:Hidrojen iyonu
H ⁺ /ATPaz	:Proton çıkarıcı ATPaz
HCl	:Hidroklorik asit
HF	:Hidroflorik asit

IPS	:Intrasellüler polisakkaridler
<	:Küçük
LB	:Laktobasiller
LDH	:Laktatdehidrogenaz
M	:Molaritre
Max	:Maximum
mg	:Miligram
Mg ⁺²	:Magnezyum iyonu
MgCl ₂	:Magnezyum klorür
Min	:Minimum
ml- mL	:Mililitre
mm	:Milimetre
mM	:Milimolar
µg	:Mikrogram
µm	:Mikrometre
ms	:missed surface (Süt dişinde çürük nedeniyle kaybedilmiş olan diş yüzey sayısı)
MS	:Mutans streptokokları
MSB	:Mitis Salivarius Basitrasin agar
MSKB	:Mitis Salivarius Basitrasin Kanamisin agar
mt	:missed teeth (Süt dişinde çürük nedeniyle kaybedilmiş olan diş sayısı)
NaF	:Sodyum florür
OH ⁻	:Hidroksil
Ort	:Ortalama
PCR	:Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PEP	:P-enol piruvat (fosfoenolpirüvat)
PEP-PTS	:Fosfoenolpiruvat fosfotransferaz sistemi
PGA	:P-gliserat (fosfogliserat)
PMF	:The Proton Motive Force (Proton Motive Edici Güç)
ppm	:parts per million
PYR	:Pyrolidonly-beta naphilamide test
pH	:Power of Hydrogen

QLF	:Quantitative light-induced fluorescence (Kantitatif Işıklı İndüklenmiş Florasan Tekniğı)
RFLP	:Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon parça uzunluk Polimorfizmi)
RNA	:Ribonükleik asit
Rpm	:Revolution per minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
RT-PCR	:Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
°C	:Celsius (derece selsiyus)
∞	:Sonsuz
SS	:Standart Sapma
Ş-EÇÇ	:Şiddetli erken çocukluk çağı çürüğü
T	:Timin
TAE	:Tris-acetate-EDTA (Tris-asetat-EDTA)
Taq DNA	:Thermus aquaticus bakterisinden elde edilen DNA
TYCSB	:Tryptone Yeast Extract Cystine Sucrose Bacitracin agar
TYS20B	:Basitrasin ve Sakkarozlu Triptoz Soy Broth
UV	:Ultraviyole
WHO	:World Health Organization
%	:Yüzde

ÖZET

Erken Çocukluk Çürüğü Olan Çocuklarda Bakteri Florasının İncelenmesi ve Flor Vernik Uygulamasının Bakteri Florasına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi

Giriş ve Amaç: Erken çocukluk çürüğü, çocukların yaşamlarını ve ailenin farklı yönlerini etkileyebilen en yaygın kronik hastalıklarından biridir. Farklı flor preparatları kullanmak, hastalığı önlemenin en etkili yollarından biridir. Flor verniği, profesyonel olmayan kişiler tarafından bile uygulanabilen topikal bir ajandır. Bu çalışmada; erken çocukluk çürüğü olan çocuklarda oral flora bakterilerinin PCR metodu ile araştırılması, flor vernik uygulamasından önceki ve sonraki oral bakterileri sayılarının karşılaştırılarak flor verniğin antibakteriyel etkinliğinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı ile Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Çalışmaya MKÜ Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Dişhekimliği Anabilim Dalı polikliniklerine başvuran yaşları 2-6 arasında değişen, erken çocukluk çağı çürüğü tanısını almış 30 hasta çalışma grubu ve çürüksüz 30 hasta kontrol grubu olmak üzere toplam 60 hasta dahil edildi. Hastalar bir pedodontist tarafından dmft/dmfs indexi kullanılarak muayene edildi. Plak ve tükürük örnekleri alınarak flor verniği uygulandı. 6 hafta sonra tekrar çağrılarak hastalardan yine plak ve tükürük örnekleri toplandı. Hastalardan alınan tükürük ve plak sürüntü örnekleri konvansiyonel kültür yöntemleri kullanılarak ve gerektiğinde Vitek-2 (bioMeuriux, France) otomatize sistemleri yardımıyla tiplendirmeleri yapıldı. Ayrıca hastalardan alınan örneklerden mikroorganizma tür tayinleri ve mikroorganizma kantitasyonları da gerçekleştirildi. Çalışmada hastalardan izole edilen *S.mutans* kökenlerinde *gtfD*, *gtfT*, *gtfK*, *gtfP*, *gtfR* ve *gtfG* kullanılarak PCR yöntemi ile *S.mutans* izolatların subtiplemeleri yapıldı. Ayrıca, çalışmada aşağıdaki *gtfB* geni amplifikasyonunu takiben *S.mutans* kökenlerinde *S.mutans* izolatları subtiplerinin RFLP yöntemi ile belirlenmesi için HaeIII restriksiyon enzimi ile kesimi yapılarak RFLP

yöntemi ile subtiplerinin tanımlamaları yapıldı. Veriler, SPSS yazılımı kullanılarak analiz edildi.

Bulgular: *S. mutans*, çürüklü (çalışma grubu) ve çürüksüz (kontrol grubu) tüm bireylerde bulundu. Flor uygulamasından sonra *S. mutans* ve laktobasil sayılarında anlamlı düşüş gözlemlendi.

Sonuç: Flor vernik uygulamasının EÇÇ'nin önlenmesi açısından etkili bir ajan olduğu sonucuna varıldı. Çürüklü (çalışma grubu) hastalarda çürüksüz (kontrol grubu) hastalara kıyasla *S. sobrinus* görülme oranı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Ancak *S. sobrinus*'un diğer bakterilerle birlikte bulunması ile çürük oluşumu ve gelişimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Anahtar kelimeler: EÇÇ, *S. mutans*, flor, PCR

ABSTRACT

Investigation of Bacterial Flora in Early Childhood Caries and Evaluation of the Effect of Fluoride Varnish Application on Bacterial Flora

Background and Aim: Early childhood caries is one of the most prevalent chronic diseases in children that affect their life and their family in different aspects. Using different types of fluoride is one of the most effective ways of preventing the disease. Fluoride varnish is a topical fluoride product which could use in the community even by non-professionals. This study is aimed to investigate the antibacterial activity of fluoride by comparing oral bacterial counts before and after fluoride varnish application by investigating oral flora bacteria in early childhood caries by PCR method.

Materials and Methods: This study was carried out at Mustafa Kemal University Faculty of Dentistry Department of Pediatric Dentistry and Mustafa Kemal University Faculty of Medicine Department of Medical Microbiology. A total of 60 preschool children aged 2-6 participated in the study; 30 patient with ECC as the study group and 30 caries-free as the control group. Subjects were examined by a pediatric dentist using dmft/dmfs index. Plaque and saliva samples were collected from patients and then fluoride varnish was applied. After 6 weeks, the patients were recalled and samples of plaque and saliva were collected again. Specimens of saliva and plaque samples from patients were typed using conventional culture methods and if necessary with the aid of Vitek-2 (bioMérieux, France) automated systems. In addition, microorganism species determinations and microorganism quantifications were also performed from the samples taken from the patients. Subtyping of *S. mutans* isolates was made by PCR using the gtfD, gtfT, gtfK, gtfP, gtfR and gtfG in *S. mutans* isolates isolated from patients in the study. In addition, in the study, subtypes identification was performed by RFLP method by cutting with HaeIII restriction enzyme to determine the subtypes of *S. mutans* isolates in *S. mutans* strains by the RFLP method following the amplification of the gTFB gene. The data were analyzed using SPSS software.

Results: *S. mutans* were found in all individuals of study and control groups. Statistically significant reduction in *S. mutans* and lactobacillus counts in plaque and saliva samples was seen 6 weeks after fluoride varnish application.

Conclusion: It was observed that fluoride varnish was an effective agent in terms of prevention of ECC. The incidence of *S. sobrinus* was found to be significantly higher in the study group compared to the control group. However, the presence of *S. sobrinus* with other bacteria was not statistically significant between caries formation and development

Keywords: ECC, *S. mutans*, *S. sobrinus*, fluoride, PCR



1. GİRİŞ

Diş çürüğü, bakterilerin, ağız ortamındaki karbonhidratların fermentasyonu sonucunda ortaya çıkan organik asitlerin diş sert dokularında oluşturduğu dinamik biyokimyasal olaylar dizisi olarak tanımlanmaktadır. Ağız ortamında yer alan bakteriler diyetdeki karbonhidratları, minerin yapısındaki kalsiyum fosfatları (CaPO₄) çözebilen asitlere dönüştürmekte ve sonuçta dişlerde çürük meydana getirmektedir.⁷⁷

Okul öncesi çocukların dişlerinde görülen diş çürükleri, hızlı ilerlemesi ve etkilenen hasta grubunun küçük yaşta olması nedeniyle pediatrik diş hekimliğinde önemli bir sorun teşkil etmektedir. Küçük çocukları etkileyen bu çürük formunun etiyojisi ve epidemiyolojisini tanımlamak için 'Erken Çocukluk Çağı Çürüğü' (EÇÇ) olarak genel bir tanım kabul görmüştür.¹⁹

Erken çocukluk çağı çürüğü; 71 aylık veya daha küçük çocuklarda bir veya daha fazla çürüklü diş (kaviteli veya kavitesiz lezyonlar), kayıp diş (çürüğe bağlı) veya dolgulu süt dişi bulunması olarak tanımlanır. Birçok ülkede sıklıkla görülen hastalıklardan biri olan EÇÇ'nin oluşumunda rol oynayan etmenler çok çeşitli ve karmaşıktır. Diş çürüklerine neden olan mutans streptokoklar, laktobasil türleri, aktinomiçes türleri, nonmutans streptokoklar ve mantarlar gibi endojen oral mikroorganizmaların büyük çoğunluğu dental plak içerisinde yer almaktadır. Erken çocukluk çağı çürüğünden sorumlu mikroorganizmalar olarak genellikle Streptokoklar gösterilmektedir.^{341, 313, 120, 470, 515, 214, 19,80}

Streptococcus mutans (*S. mutans*) ve *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) insanlarda en sık izole edilen ve diş çürüğü ile yakın ilişkisi olan mikroorganizmalar olarak bilinmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, dünyadaki tüm insan topluluklarının *S. mutans* taşıdığını bildirmektedir.^{93, 37, 405, 147,259, 392, 448}

S. mutans'ın çürük oluşumunda en önemli role sahip bakteri olduğu belirtilse de, son yıllarda yapılan çalışmalarda, erken çocukluk çürüğü tablosunun şiddetlenmesinde *S. Sobrinus* ile beraber etki gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur.^{117, 79, 352, 346, 440, 104, 47, 344}

S. mutans ve *S. sobrinus*'un identifikasyonunda seçici ortamlar olarak Mitis salivarius veya Mitis-salivarius-bacitracin agar gibi koloni morfolojileri kullanılmıştır. Bununla birlikte, *S. mutans* ve *S. sobrinus*'un ayırt edilmesi kolay değildir ve ayrıca zaman alıcı bir

işlemdir. Bu nedenle, taranmış bakteri kolonileri üzerinde immünolojik ve biyokimyasal testler yapılmıştır. Bununla birlikte, son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin Mutans streptokokları (MS) türlerinin tanımlanmasında basit, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmektedir.¹¹⁷

S. mutans'ın erken dönemde kazanılmasının, sürekli dentisyonda görülen yüksek çürük sıklığı ile yakından ilişkili olabileceği bildirilmektedir. Bu nedenle, diş çürüğü oluşumunun önlenmesi amacıyla gerçekleştirilecek olan koruyucu yaklaşımlar içerisinde *S. mutans* ve *S. sobrinus*'un çocuklara bulaşmasının engellenmesi yer almaktadır. Böylece, bireyde hem süt hem de sürekli dişlenme döneminde çürük gelişiminin önemli derecede azaltılacağı düşünülmekte ve temel hedefin çocukları erken MS kolonizasyonundan korumak olması gerektiği belirtilmektedir.³²⁴

Diş çürüğünden korunma yöntemleri arasında, fissür örtücüler, flor uygulamaları, antimikrobiyal ajanların kullanımı ve diyetin kontrol altına alınması gibi birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında, antibakteriyel ajanlardan; plak oluşumunu inhibe etme, plak biyokimyası ve ekolojisini değişikliğe uğratabilme özelliklerinden dolayı sıklıkla yararlanılmaktadır.^{401, 402}

Flor vernikleri, uzun süreli salım yapan antibakteriyel ajanlar olup uzun süreli profilaksi sağlamaktadır. Ajanın etkinliği dozuna ve uygulama sıklığına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Günümüzde, florlu ve klorheksidinli vernikler çürük oluşumunu önlemek amacıyla kullanılan etkin materyallerdir.^{401,190}

Tükürük ve plakta konsantre olmuş florun; minenin demineralizasyonunu önlediği, bakteri metabolizmasını inhibe ederek asit üretimini ve bakteriyel polisakkarid yapımını engellediği birçok çalışmada gösterilmiştir.^{377, 310, 151, 144, 280, 311, 39}

Bu çalışmada; erken çocukluk çürüğü olan çocuklarda oral bakteri florasının PCR metodu ile araştırılması, flor vernik uygulamasından önce ve 6 hafta sonraki oral bakterilerin karşılaştırılarak flor verniğin antibakteriyel etkinliğinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Diş Çürükleri

2.1.1 Çürüğün Tanımı Ve Etiyolojisi

Diş çürüğü, diş yüzeyinde lokalize olan karyojenik mikroorganizmaların, diyetle alınan karbonhidratların fermentasyonu sonucu ürettikleri asidik yan ürünlerin diş ve çevre dokular arasındaki demineralizasyon-reminalizasyon dengesinin demineralizasyon lehine bozulması sonucu gelişen patolojidir. ^{77, 132, 135, 303}

Çürük, diş yüzeyinde etkilenmiş olan bölgedeki biyofilm tabakasında meydana gelen lokalize kimyasal çözülme durumunu ifade etmektedir. ^{154, 272}

Biyofilm yapıları yüzeylere protein, Deoksiribo nükleik asit (DNA) ve polisakkarit içeren bir ekzopolisakkarit tabaka içinde tutunan mikroorganizma kümeleri olarak tanımlanmaktadır. Dental plak diğer bir deyişle biyofilm, diş yüzeylerinde pek çok sebeple oluşabilmektedir. Daha çok streptokok türlerinin sebep olduğu bu yapılarda farklı pek çok mikroorganizmanın varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. ^{361, 61, 294}

Dişlerin fırçalanmasından itibaren dişlerin üzerinde önce pelikül sonrasında dental plak tabakası oluşmaktadır. Diş yüzeyindeki biyofilm tabakasında bulunan asidojenik ve asidürik bakterilerin diyet ile alınan bazı besinleri fermente etmesi ile ortaya çıkan asit diş yüzeyinde demineralizasyon sürecini başlatır. Açığa çıkan asit, plak pH'sını 1-3 dakika içerisinde kritik pH olan 5.2-5.5'in altına düşürür; bu durum demineralizasyona neden olur. ^{69, 20, 223, 507, 343, 289, 301}

Uzun süreli asidik ortamın oluşumundaki önemli sebepler; tükürük akış hızı veya tamponlama kapasitesinde azalma, yüksek sıklıkta şeker tüketimi, yetersiz ağız hijyeni, sabit ortodontik tedaviye bağlı olarak oluşan plak birikimi ve karyojenik bakteri popülasyonunun artmasıdır. ⁵⁰

Temel mekanizma olan asit ile yıkımın yanı sıra anatomik, sosyo-kültürel, sosyo-ekonomik ve davranışsal faktörler, genetik ve terapötik uygulamaların varlığı-yokluğu gibi birçok etmen çürük oluşumu ile ilişkilidir. Fermentasyon sonucu açığa çıkan asit tükürük sayesinde ile tamponlanabilir ve reminalizasyon gerçekleşebilir. ^{300, 5, 128, 183}

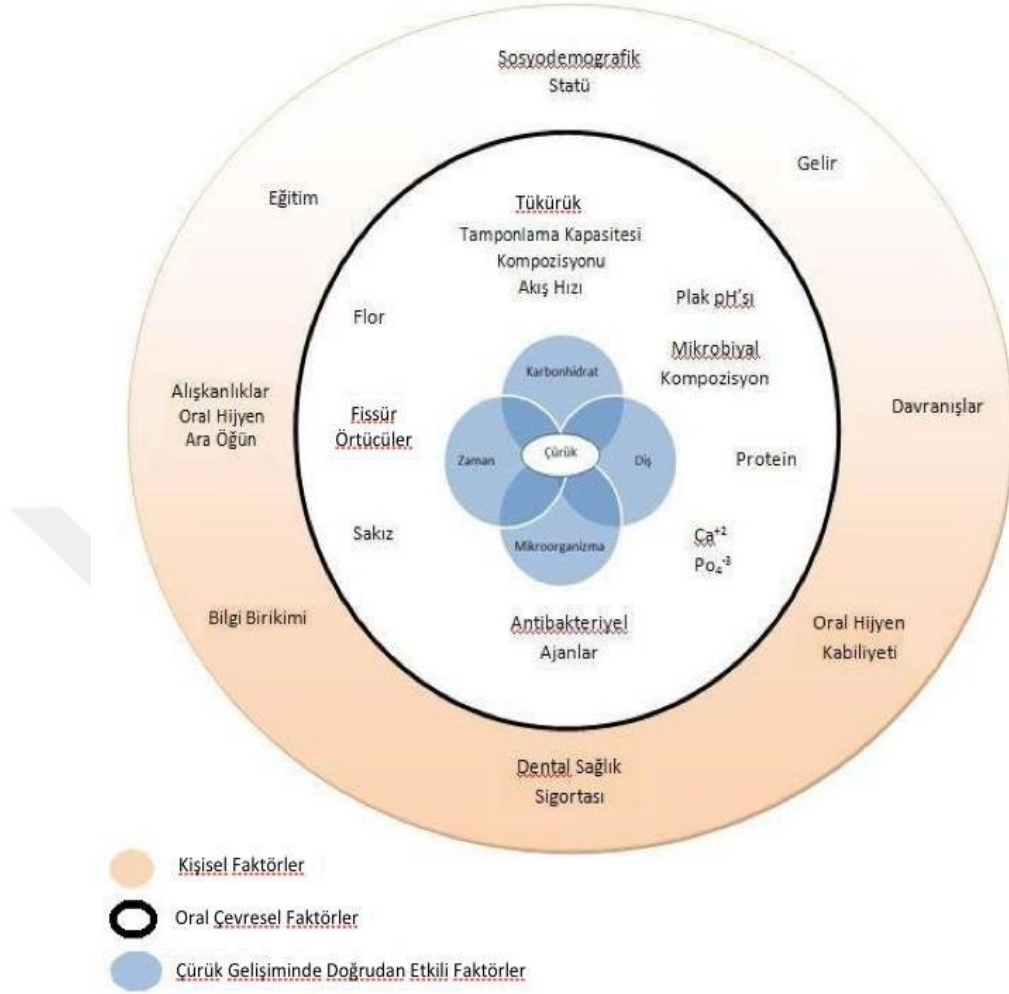
Biyofilm bulunan her diş yüzeyinde çürük gelişebilmektedir. Ancak özellikle arayüzlerin kontakt noktasının alt kısımlarında, pit ve fissürlerde çürük oluşması riski yüksektir.¹³⁷

Çürük gelişiminde; bireyin beslenme özelliklerinin, ağız bakım alışkanlıklarının, bireyin tükürüğünün yapısının, tükürük akış hızının, dişlerin anatomik yapılarının, sosyo-ekonomik durumunun, çapraşıklık ve dişlerdeki düzensizliklerin varlığının, yeni sürmekte veya sürmüş olan dişlerde tamamlanmamış olan mine formasyonunun, yer tutucuların veya ortodontik apareylerin varlığının ve genetik etkilerin rolü olduğu bildirilmektedir (Şekil 2.1).³⁰⁰

Çürük, minede başlayarak dentine doğru ilerleyen önlenebilir bir hastalıktır. Çürük oluşmadan önce, uygun ağız ortamı sağlanıp, karyojenik mikroflora elimine edildiğinde, demineralizasyon başlayan dişin yüzeyi gerekli koruyucu uygulamalara maruz bırakılabildiğinde çürüğün ilerlemesi durdurulabilir ve/veya geri döndürülebilir.³⁰⁰

Birçok çalışmada çürüğün, minenin demineralizasyonuna neden olan *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* ve Laktobasil gibi asidojenik bakterilerin oranındaki artışla ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bu bakteriler diyetle alınan şekeri aside dönüştürerek ağız içi pH'yı düşürürler. Mikroorganizmalar bu ortamda üremelerini en üst düzeyde devam ettirirler.^{300, 289}

Çürük oluşumunda baskın ve en virulan mikroorganizmanın *Streptococcus mutans* olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Çürüğün başlamasından sorumlu mikroorganizmaların *Streptococcus mutans*; çürüğün ilerlemesinden sorumlu mikroorganizmaların ise laktobasiller olduğu belirtilmiştir.⁶⁹



Şekil 2.1. Diş çürüğünün başlaması için gerekli faktörlerin şematik gösterilmesi ⁶⁹

Yenidoğan bir bebeğin ağızında Mutans streptokoklar bulunmamaktadır. Çünkü bu bakterilerin kolonize olması için diş yüzeyi gibi retantif alanların bulunması gerekmektedir. Ağızda artan süt dişi sayısı ile *S. mutans* kolonizasyonu da artmaktadır. ^{69, 34, 56}

Bebeklere *S. mutans* bakterisi dış faktörlerle bulaşmaktadır. Bu bakteriyel bulaş, vertikal veya horizontal geçiş biçiminde olabilmektedir. Yapılan çalışmalar bu bakteri grubunun aile bireyleri arasında (vertikal / intra-familiar) bir geçiş sergilediğini göstermiştir. Vertikal geçiş aile içi MS'lerin transferini ifade ederken, horizontal geçiş (extra-familiar) diğer insanlardan, yeni doğana MS geçişini ifade etmek için kullanılmaktadır. ^{69, 299}

Mutans streptokoklar'ın kolonizasyonu, özellikle çocuğun 19 ve 31. aylar arasında devam eden ve 'enfektivite penceresi' olarak adlandırılan özel bir dönemde gerçekleşmektedir. Mutans streptokok'ların geçişinde temel etmen tükürük transferidir. Çocukların mutans streptokoklar'ı kazanımında ana kaynağın yakın temas nedeniyle anne olduğu düşünülmektedir. ^{102,433, 96, 314, 408}

Anne ve çocuğun ortak kaşık kullanımı, annenin; çocuğun emziğini, biberonunu ya da kaşığını çocuğa vermeden önce sıcaklık veya tat kontrolü amacıyla kendi ağızına götürmesi en önemli geçiş yollarıdır. Çocuğa ne kadar erken *S. mutans* bulaşırsa, çocuğun o kadar yüksek çürük riski taşıdığı söylenebilir. Mutans streptokokların erken kolonizasyonunun, erken çocukluk çağı çürüğü oluşumu ve çocuğun gelecekteki çürük tecrübesi açısından büyük bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir. Ayrıca birçok çalışmada süt dişlerinde çürük varlığının daimi dişlenme döneminde çürük görülebilme ihtimali ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. ^{96, 408, 55, 12, 458, 417, 66}

2.1.2 Çürüklerin Sınıflandırılması

Çürük için çürüğün bulunduğu yere, çürüğün ilerleme hızına, görünümüne, gelişim durumuna ve aktivitesine göre farklı sınıflamalar yapılmıştır. Çürük, bulunduğu yere göre; düz yüzey çürüğü, pit ve fissür çürüğü, kök çürüğü; gelişimine göre; primer, sekonder, rekürrent çürük veya residüel çürük; aktivitesine göre durgun çürük, aktif, inaktif çürük, çürüğün oluşum nedenine veya zamanına (radyasyon çürüğü ya da erken çocukluk çağı çürüğü) göre sınıflandırılabilir. Sekonder ya da rekürrent çürük; kavite preparasyonundan sonra kalan diş dokusu ve restorasyon arasındaki mikroboşluklardan hidrojen iyonlarının difüzyonu ile başlayan ve mevcut restorasyonun marjinde oluşan yeni çürük olarak ifade edilmektedir. Aktif çürük lezyonları klinik olarak yumuşak ve pürüzlü bir yüzeye sahip olup, genellikle açık kahverengi renkte görüntü vermektedir. İnaktif veya durgun çürük lezyonları daha düzgün, sert, koyu kahverengi ya da siyah renkte veya parlak olmaktadır. ^{223, 13, 103}

Residüel çürük; çürük temizlenirken hekim tarafından kavitede bırakılmış olan çürük, rampant çürük ise aniden ortaya çıkan ve hızla yayılan çürük tipi olarak tanımlanmaktadır. Rampant çürükler genelde klinik görünüm olarak, dişin birçok yüzeyinde eşzamanlı olarak izlenen ve hızlı gelişen çürük şeklindedir. Ağız hijyeni zayıf,

sık aralıklarla karyojenik besin tüketimi olan bireylerde ve tükürük akış hızını azaltan radyoterapi gibi durumlarda ortaya çıkmaktadır. Rampant çürük için direkt bir sebep gösterilmemekle beraber ev ya da okul ortamında yaşanan travmatik olaylar, yaşanan başarısızlıklar, aşağılık duygusu gibi bazı psikolojik faktörlerin ya da stres dönemlerinde tükürük akışında meydana gelen azalma ve bu durumun uygunsuz şekerli besin tüketimini tetiklemesi ile de oluşabileceği üzerinde durulmaktadır. ^{300, 223}

2.1.3 Erken Çocukluk Çağı Çürüğü (EÇÇ)

2.1.3.1 EÇÇ Tanımı Ve Etiyolojisi

Rampant çürük çeşitlerinden biri de EÇÇ'dir. American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD) 1978 yılında biberon çürüğü tanımlamasını "Nursing Bottle Caries" olarak yapmış ve bu çürüğün etkeni olarak biberon kullanımını göstermiştir; daha sonraki 20 yıl içerisinde uzun süre anne sütü kullanımının da etken sayılabileceği ve aslında bu çürük tablosunun çok faktörlü bir enfeksiyöz hastalık olduğu belirtilerek bu tanımlamanın yerine "Early Childhood Caries" (ECC) kullanılması önerilmiştir. ^{371, 275, 369, 95, 76, 366, 73, 370, 18}

Kronik, geri dönüşümsüz, çok faktörlü, enfeksiyöz bir hastalık olan EÇÇ, çocuklarda görülen en yaygın hastalıklardan biridir. ^{460, 364}

Erken çocukluk çağı çürüğü; 71 aylık veya daha küçük çocuklarda herhangi bir veya daha fazla süt dişinde çürük (kavitasyonlu veya kavitasjonsuz) yüzey, diş çürüğüne bağlı süt dişi kaybı veya çürüğe bağlı dolgu yapılmış yüzey varlığı şeklinde tanımlanmaktadır. Buna ek olarak; şiddetli erken çocukluk çağı çürüğü (Ş-EÇÇ) terimi ise bu hastalığın akut veya yaygın, atipik, aşamalı olan şekline verilen isimdir. Şiddetli erken çocukluk çağı çürüğü; 3 yaşından daha küçük çocuklarda dişlerin düz yüzeylerinde herhangi bir çürük varlığı olarak tanımlanırken, 3 ile 5 yaş arasındaki çocuklarda keser dişlerde 1 veya daha fazla kavitasyonlu, çürük nedeniyle kaybedilmiş diş veya dolgulu yüzey olarak tanımlanır. Erken çocukluk çağı çürüğü skor olarak ise çürük, kayıp veya dolgulu dişlerin sayısının; 3 yaşında; 4 veya daha fazla 4 yaşında; 5 veya daha fazla, 5 yaşında ise 6 veya daha fazla olması olarak tanımlanmaktadır. ^{334, 22}

Erken çocukluk çağı çürüğü ve şiddetli erken çocukluk çağı çürüğü vakalarında, çoğunlukla üst ön kesiciler etkilenmekle beraber, alt ve üst birinci azı dişlerinde oluşmuş çürükler de karşımıza çıkabilmektedir. Kanin dişlerin daha az etkilenmesinin sebebi olarak daha geç sürmeleri, alt kesici dişler içinse dilin temizleme etkisinden daha yüksek oranda faydalanmaları ve tükürük bezlerinin açılış bölgesi olmaları gösterilmektedir. Üst süt kesiciler ilk süren dişler olmaları sebebiyle dental plak birikimi ve asit atakları ile öncelikle karşılaşmaktadır. Daha sonra süt azı dişlerin bukkal ve okluzal yüzeyleri ile süt kanin dişlerin labial yüzeyleri etkilenmektedir.^{275, 405, 102, 359, 498}

Erken çocukluk çağı çürüğü oluşumunda etkili birçok etiyolojik faktör bulunmaktadır. Çürük gelişimi için bir arada olması gereken temel faktörler; karbonhidrattan zengin diyet, dental plak varlığı, zaman, duyarlı bir konak ve karyojenik mikroorganizmalar gibi faktörler dışında özellikle annenin eğitim durumu, sosyo-demografik özellikler, ebeveynlerin tutumu, çocuğun beslenme alışkanlığı, çocuğun ve ailenin özellikle annenin oral hijyen alışkanlıkları, çocuğun flor maruziyeti, çocuğun biberon veya bala/ reçele batırılmış emzik kullanımı, çocuğun kronik hastalığı, çocuğun ağızdan soluma durumu ve özel ilgi gerektiren durumların varlığı, çocuğun ilaç kullanıp kullanmadığı, psikososyal faktörler ve etnik yapı EÇÇ ile ilişkilidir.^{364, 362, 383}

2.1.3.1.1 Mikrobiyolojik Faktörler

Birçok çalışma, çeşitli populasyonlarda diş çürüğünün mikrobiyolojisini nitel ve nicel olarak tanımlamıştır. Çocuklarda EÇÇ'nin ilerlemesinde ilk basamak karyojenik mikroorganizmaların ağız ortamında görülmesidir. Temel karyojenik mikroorganizmalar streptokoklar (*S. mutans* ve *S. sobrinus*) ve laktobasillerdir.^{217, 291, 173, 454, 1, 447, 336, 18,}

S. mutans'ın çürük lezyon gelişiminin ilk evresinde aktif rol oynadığı bilinmektedir. Mutans streptokoklar diş yüzeyine yüksek tutunma özellikleri, yüksek miktarda asit üretmeleri, asidik ortama dayanıklı olmaları ve düşük pH varlığında metabolik faaliyetlerine devam etmeleri gibi özellikleri ile çürük oluşumunda önemli rol oynarlar.^{364, 203, 33, 388}

S. mutans dişler sürmeden önce iki farklı yolla bulaşabilmektedir. *S. mutans* anne veya bakıcı yoluyla vertikal olarak ve/veya aile içindeki ve çevredeki diğer bireyler (arkadaş ya da kardeş) aracılığıyla horizontal olarak bebeğe taşınabilmektedir.⁹⁶

2.1.3.1.2 Plak Varlığı

Süt dişi yüzeyindeki görünebilir plak ile çürük riski arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Diş çürükleri mikrobiyal dental plak zemininde başlamakta ve gelişmektedir. Plak içerisinde bulunan asidojenik ve asidürik bakteriler (*S. mutans*, *S. sobrinus* ve Laktobasiller) minenin demineralizasyonundan sorumlu tutulmaktadır. Görünür plak varlığının; çürük riski ve MS kolonizasyonu ile ilgili tahminlerde güvenilir, kullanılabilir ve basit bir yöntem olduğu bildirilmiştir. ^{11, 45, 465}

Alınan şekerin bakteriler tarafından metabolize edilmesi sonucu oluşan organik asit plak pH'ını hızlıca düşürmekte ve dişi çürüğe karşı duyarlı hale getirmektedir. Dental plak içerisinde üretilen bu asitler tükürüğün yıkama ve tamponlama kapasitesini azaltmaktadır. ⁵⁰⁴

Yapılan bir araştırmaya göre 12 ile 36 aylık olan 39 çocukta başlangıç MS seviyeleri ile plak büyümesi arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Bu çalışma erken çocukluk çağındaki çocukların ön grup dişlerindeki plak varlığını MS erken kolonizasyonuna bağlamaktadır. ²⁴⁶

2.1.3.1.3 Diyet Faktörleri

Beslenme konusunda şeker, özellikle de sukroz varlığı ile çürük prevalansı ve gelişimi arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda epidemiyolojik çalışma bulunmaktadır. Sukroz metabolizması sonrası asit oluşumu plaktaki mikrobiyal dengelyi etkilemektedir. Plakta mevcut olan denge MS'ler ve laktobasiller lehine bozulmaktadır. Sukroz asit üretiminde kullanılmayan yanı sıra ekstraselüler polisakkarit olan glukon sentezi için de substrat görevi görmektedir. Glukon polimerleri MS'lerin diş yüzeyine tutunmalarını sağlamakta ve plağın geçirgenliğini inhibe etmekte veya plak pörözitesini arttırarak diş yüzeyinin daha fazla asite maruz kalmasına sebep olmaktadır. ^{467, 293, 177, 207, 159, 287, 86, 505}

Anne sütünün sağlık üzerine olan pozitif etkilerine rağmen gün boyu ya da gece boyunca uzun süreli anne sütüne maruz kalmanın ve anne sütü ile beraber bebek maması verilmesinin EÇÇ için ciddi bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir. ¹⁸

Okul öncesi dönemde çocuklardaki çürük yoğunluğu sık şeker tüketimine de bağlanabilir. Şeker içeren içeceklerin özellikle gece boyunca ve gündüzleri sık tüketimi

EÇÇ için bağımsız risk faktörleri olarak nitelendirilmiştir. Yüksek sıklıkta şeker tüketimi karyojenik bakteriler tarafından asit üretimine ve diş yüzeyinin de buna maruz kalmasına sebep olmaktadır. ^{489, 156, 372, 216}

Uygun olmayan biberon kullanımının EÇÇ'nin etiyolojisi ve ciddiyeti üzerinde önemli rolü bulunmaktadır. Biberonla beslenmenin, özellikle, gece boyunca çocukların ağızlarında biberonla uyumasına izin verilmesinin karyojenik olduğu sonucuna varılmıştır. ^{472, 36}

2.1.3.1.4 Konak Yapısı

Çürük gelişimi ile ilgili konağa ait olan risk faktörleri; azalmış tükürük, immünolojik faktörler, mine defektlerinin varlığı, hipoplazi, immatür mine, diş morfolojisi, dişle ilişkili genetik faktörler (boyut, yüzey, fissür ve fossa derinliği) çapraşık dişlerdir. Minenin olgunlaşmasındaki eksiklikler veya yapısal defektler okul öncesi dönemdeki çocuklarda çürük riskini arttırmaktadır. Dişin yeni sürmüştüğü dönemde immatür mine varlığı, posterior dişlerde pit ve fissürlerin plak birikimine elverişliliğinin yanı sıra süt dişi minesinde hipoplazi ve/veya hipomineralizasyon varlığı ve diş çevresinin temizliğinin yapılmaması EÇÇ için önemli risk faktörleri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca yapılan bir çalışmada mine hipoplazilerinin bulunması ile MS kolonizasyon miktarı arasında kuvvetli bir ilişki bulunmuştur. ^{22, 329, 452, 255, 257}

Tükürük çürüklere karşı bireyin en büyük savunma mekanizmasıdır. Besinleri ve bakterileri dişlerden uzaklaştırmasının yanında asit üretimine karşı tamponlama görevini yapmaktadır. Ayrıca, mine remineralizasyonu için gerekli olan kalsiyum ve fosfat iyonları için depo görevi yapmaktadır. Uyku boyunca azalmış tükürük akış oranı tamponlama kapasitesinin azalmasına neden olarak, bu dönemde dişleri çürüklere karşı daha duyarlı hale getirmektedir. ⁴⁰⁰

2.1.3.1.5 Sosyoekonomik Düzey

Çürük gelişimi ile çocuğun ailesinin toplam geliri arasında bir ilişki mevcuttur. Yüksek gelirli ailelerin çocuklarında çürük prevalansı daha düşük gözlenmektedir, fakat bu

çocuklarda çürük gelişimi gözleendiği zaman hastalığın şiddeti düşük gelirlili ailelerin çocuklarına benzemektedir.⁴⁶²

Düşük gelir seviyesine sahip olan ailelerin çocuklarında düşük doğum ağırlığına sahip olma ve EÇÇ görülme riskinin daha fazla olduğu rapor edilmiştir.^{142, 464}

Ailedeki çocuk sayısı, bebeğin doğum ağırlığı, kardeşler arasındaki yaş farkı ve annenin doğum sırasındaki yaşının okul öncesi çocuklardaki çürük tecrübesi ile anlamlı derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir.⁴⁸⁶

Birçok çalışmada ailenin sosyo-ekonomik seviyesi düştükçe çürük prevelansının daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Ayrıca annenin ve/ veya babanın eğitim seviyesi düştükçe diş çürüğü prevelansında artış görülmüştür. Alaki ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarında, yaşamın ilk yılında yani süt dişlerinin kron formasyonları ve kök gelişimleri devam ederken çocuğun sıklıkla antibiyotik kullanmasının EÇÇ gelişiminde etkili olduğunu bildirmişlerdir.^{364, 383, 71, 90, 91, 189, 248, 256, 6}

2.1.3.1.6 Psikososyal Risk Faktörleri

Sosyoekonomik durum ile EÇÇ arasında anlamlı bir ilişkinin bulunmasına rağmen bu mekanizmanın etkisini nasıl gösterdiği ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Benzer şekilde psikososyal ve çevresel faktörlerin dental hastalıkların gelişimindeki etkileri tamamen anlaşılmiş değildir.⁴⁶³

Literatürde küçük çocuklardaki çürük oluşum riski ile çocukların bakımından sorumlu kişilerin stres durumu arasındaki ilişkiye yönelik çalışmalar da mevcuttur. Finlayson ve arkadaşları, ailenin düşük ilgi düzeyinin yüksek EÇÇ riski ile ilişkili olduğunu belirtmektedir. Ailenin ilgi düzeyi ile EÇÇ arasındaki ilişkinin daha iyi tespit edilebilmesi için daha uzun süreli çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.^{365, 446, 141, 463}

2.1.3.1.7 Sosyokültürel Risk Faktörleri

Toplum içerisindeki küçük etnik gruplar ve göçmenler ağız sağlığı ile ilgili tedaviler için ücret ödemenin yanı sıra bazı farklılıklar göstermektedir. Sağlık eşitsizliğinin altında yatan problemler; sağlık çalışanları ile küçük etnik gruplar arasındaki iletişim yetersizliği,

hastanın güven seviyesi, hastanın hastalığın etiyolojisi hakkındaki düşünceleri, hastalığın getirdiği etkiler ve sosyal kaynaklara erişimidir.³⁸⁷

Amerika Birleşik Devletleri'nde Afroamerikanlar, Çinliler, Latinler, Filipinlilerin dahil edildiği ve kültürel inançlar ile çocukların ağız sağlıkları arasındaki ilişkinin incelendiği bir araştırmaya göre sağlık inançları ile hastalıklar arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Toplumun dental bakım hakkındaki düşünceleri, korkuları ve ağız sağlığı hakkındaki bilgileri dental hizmetlerden faydalanma miktarlarında etkili olmaktadır.¹⁷⁶

Ebeveynlerin eğitim seviyesinin çocuklarda EÇÇ'nin varlığı ve ciddiyeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İyi düzeyde eğitim almış ailelerin çocuklarında düşük çürük prevalansı ve dmft skorları saptanmıştır.^{432, 305}

Yapılan bazı çalışmalarda, çocuğun fırçalama alışkanlığı, fırçalama sıklığı, florlu diş macunu kullanıp kullanmamasının diş çürüğü oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir.^{160, 16, 17}

2.1.3.1.8 Yetersiz Flor Alımı

Diş çürüğünden korunmada en başarılı ve yaygın yöntem, yerel flor uygulamalarıdır. Oral kavitenin içerisinde florun devamlı bulunması demineralizasyon boyunca mineral kaybını azaltıp remineralizasyonu hızlandırarak minenin direncini arttırmaktadır.^{371, 481, 455, 98, 350}

Yapılan bir araştırmada, florlanmış içme sularının çocuklarda diş çürüğü gelişimini azaltmada etkili olduğunu belirtmiştir. Aynı çalışmada florlanmış suyun okul öncesi çocuklarda dmft skorunu %35 oranında azalttığı bildirilmiştir.¹⁹⁸

Sistemik derlemeler, florlu diş macununun okul öncesi çocuklarda diş çürüklerini azaltmada etkili olduğunu; fakat macunun diş fırçası üzerine sınırlı miktarda yerleştirilmesi ile yutulan flor miktarı kontrol edilmesi gerektiğini bildirmektedir. Ayrıca, sistemik derlemelerden edinilen bir diğer bilgi de, %2.26'lık flor verniği, 3-6 ay aralıklarla uygulandığında, okul öncesi çocuklarda diş çürüklerini azaltmada etkili bulunduğu yönündedir.^{481, 113, 495, 211, 468, 283, 490}

2.1.3.2 EÇÇ'nin Genel Sağlığa Olan Etkileri

Erken çocukluk çağı çürüğü tablosu erken dönemde tespit edilip, durdurucu ve koruyucu önlemler alınmazsa; çürükler ilerleyerek diş ağrısına ve buna bağlı beslenme bozukluklarına, yeme isteksizliğine, uyku bozukluklarına, gastrointestinal rahatsızlıklara, kilo kayıpları sonucu çocuğun gelişim geriliğine, okul devamsızlıklarına ve sosyal aktivitelerde kayıplara sebep olabilir. ^{304, 313, 3, 463, 95}

Çürüğün tedavi edilmeden bırakılması dişlerde enfeksiyon ve apse oluşumuna; daha ileri aşamalarda ise baş boyun bölgesi enfeksiyonlarına da neden olabilmektedir. Süt dışında uzun süre tedavi edilmeden bırakılmış diş çürüğü altta gelişmekte olan daimi diş tomurcuğunda 'turner hipoplazisi' olarak adlandırılan bir gelişim defektine neden olabilir. Ayrıca okul konsantrasyonunda ve başarısında azalma olması ve okul saatlerinden geri kalınması da bu durumda karşılaşılan sonuçlardandır. Bunun yanı sıra, dişlerin fonasyondaki rolleri düşünüldüğünde özellikle ön dişlerin eksikliğinde bazı sesler tam olarak söylenememektedir. Ayrıca ön grup süt dişlerinin erken kayıpları da çocuğun güveninin gelişmekte olduğu, iletişim kurmayı öğrendiği erken çocukluk döneminde estetik kaygı oluşturabileceği için dolaylı olarak psikolojik gelişimini de olumsuz etkilemektedir. Çürüğün ilerlemesi sonucu süt dişlerinde değişme zamanı gelmeden, erken çekimler yapılması zorunlu olabilmektedir. ^{250, 139, 212, 470, 304, 111, 221, 210, 410, 185, 43, 63, 3, 95}

Tedavi edilmemiş çürük dişler maliyeti yüksek tedavi gereksinimlerini de doğurmaktadır. Süt dişlerinin erken dönemde travma, çürük gibi değişik nedenlerle kaybedilmesi; dental ark uzunluğunda azalmalara, çekim boşluğuna komşu olan dişlerde devrilme hareketine, anormal dil pozisyonlarının gelişmesine, çekim boşluğunun karşısındaki dişlerin uzamasına, orta hatta sapmaya, yer darlığına bağlı olarak daimi dişin sürememesine, daimi dişlerin sürme yönünde bozukluklara ve malokluzyonlara yol açabilir. Erken yaşta yapılan diş çekimleri çocuklarda korku ve anksiyete yaratarak çocuğun tedaviden kaçınmasına neden olmaktadır. Birçok çalışma EÇÇ'si mevcut, davranış problemleri olan, erken çocukluk çağındaki bireylerde genel anestezi altında tedavi ihtiyacı doğduğunu; bu durumun hem hasta açısından risk hem de maliyet yönünden sorun oluşturduğunu belirtmektedir. ^{420, 210, 275, 407, 237, 21, 247, 395}

2.2 Diş Çürüklerinin Teşhis Yöntemleri

Teşhis, bir hastalığın, oluşturduğu belirtilerden tespit edilmesi demektir. Çürük sürecinde de çürüğün olup olmadığının, çürük varsa aktif veya inaktif çürük olduğunun, çürük tipinin ne olduğunun değerlendirilmesi anlamına gelmektedir. Çürük teşhisindeki esas amaç, hastaların girişimsel ya da girişimsel olmayan tedavi yaklaşımlarına gereksinimlerinin belirlenmesi ve çürük gelişim açısından risk grubunda olan bireylerin tayin edilmesidir.^{222, 44}

Çürüğün teşhisi için kullanılan yöntemler hem anlamlı hem de güvenilir olmalıdır. Bir hastalığın teşhisi uygulanacak tedavinin eksiksiz ve doğru bir şekilde planlanması; hekimlere, hastalar ve talepleri konusunda bilgi sağlama ve hastaların doğru bir şekilde bilgilendirilip yönlendirilmesi; toplumlara halk sağlığı ve sağlık hizmetleri planlanması konusunda bilgilendirilmeleri yönünden önemli kolaylıklar sağlamaktadır.⁴⁴

Çürük teşhisinde; hastadan alınan detaylı bir anamnez ile birlikte, ilgili dişin klinik olarak değerlendirilmesi ve bu amaçla teşhise yardımcı araç ve yöntemlerin kullanılması önemli uygulamalardır. Diş çürüklerinin teşhis edilebilmesi için iyi bir ışık cihazı ve temiz, kurutulmuş dişlerin olması gerekir. Muayene için, dişlerden dental plağın uzaklaştırılmış olması ve dişlerin izole edilmiş olması gerekir. Özellikle white spot lezyonların teşhisinde bu prensipler oldukça önem arz etmektedir. Mine çürüklerinin gözle görülebilir ilk bulgusu white spot lezyonlar olup; minede remineralizasyonun olabildiği evredir.^{136, 222}

Diş hekimleri genellikle dokusal, görsel ve radyografik değerlendirmelerle diş çürüğünün varlığı ya da yokluğuna karar vermektedirler. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) [World Health Organization (WHO)] tarafından muayene sırasında düz yüzeylerin bütünlüğünün değerlendirilmesinde ve muayene öncesi fissürlerden plak ve debrisin uzaklaştırılmasında sivri uçlu sond kullanımı yerine Periodontal Index (CPI) top uçlu sond (WHO 973/80-Martin, Solingen; Almanya) önerilmektedir. Muayene sırasında keskin uçlu bir sond kullanımının bakterilerin yayılımına neden olarak lezyonun ilerlemesine yol açılabileceği, bu sebeple kullanılan sondun küt uçlu olmasına ve uygulanan basıncın kullanılan el aletinden daha ağır olmamasına dikkat edilmesi gereklidir.^{300, 69, 222, 44}

Diş çürüğü tespitinde sıklıkla tercih edilen “visual-tactile” olarak adlandırılan görsel muayene yöntemidir. Bu görsel muayenenin dışında, radyografiler kullanılarak çürük teşhisi, ışık kaynaklarından yararlanılarak çürük teşhisi veya elektrik akımı ile çürük teşhis yöntemleri de bulunmaktadır. Radyolojik olarak direk radyografiler, dijital radyografi,

mikro bilgisayarlı tomografiler kullanılabilir. Elektrik akımı kullanılan yöntemler elektrik iletkenlik ölçümü (ECM), çürükle oluşan demineralizasyon sebebiyle dokularda meydana gelen geçirgenlik değişiminin ölçülmesi esasıyla çalışan bir teşhis yöntemidir. Işık kaynağının kullanıldığı yöntemler ise; kantitatif ışıkla indüklenmiş florasan teknikler (QLF), Lazer-florasan ölçümleri (DIAGNOdent) ve dijital görüntüleme ile birlikte veya yalnız fiber optik transilüminasyon yöntemleri (FOTI- DIFOTI) olarak sayılabilmektedir. 274, 137

2.3 Diş Çürüklerinin Değerlendirilmesi

Dünyada ağız-diş sağlığı araştırmaları daha çok, DSÖ'nün yönlendirmesiyle ve önerdiği yöntemlerin uygulanmasıyla yapılmaktadır. Bu araştırmaların temel amacı, ülkelerin ağız ve diş sağlığının iyileştirilmesinde belirlenecek hedef ve stratejilerin ülke şartlarına uygun olması, gerekli bilgilerin doğru toplanarak uygulayıcıların kullanımına sunulmasıdır. Dünya Sağlık Örgütü, ağız sağlığını ve hastalığını göz önünde bulunduran epidemiyolojik verilerin toplanmasının birincil ölçüde önemli olduğunu belirtmiştir. Bu verilerin toplanmasında sıklıkla kullanılan indeksler yetişkinlerde (DMFT) ve (DMFS)'dir. Süt dişlenme döneminde (dmft) ve (dmfs) indeksleri yani çürüklü, çürük nedeni ile dolgulu ya da çekilmiş süt dişi veya yüzeyini ifade eder. Bu indeksler DSÖ tarafından toplumdaki diş çürüğü ölçümü ve karşılaştırılması için önerilmektedir. ^{155, 58}

Epidemiyoloji; sağlık ve hastalık durumlarını toplum bazında değerlendiren ve sağlıkla ilgili konuların sıklığı ve ciddiyeti ile cinsiyet, yaş, ırk, coğrafya, beslenme durumu ve ekonomik durumlar arasındaki ilişkileri inceleyen bilim dalıdır. İnsidans bir hastalığın ilerleyiş oranını ifade eder. Belli bir zaman diliminde yeni oluşumların sayısında azalma veya artış gösteren durumları belirtmektedir. Prevalans ise; belli bir zaman diliminde popülasyonda bir hastalık veya bir durumdan etkilenenlerin yüzdesidir. Bir toplumda ağızda çürük ve çürüğe bağlı sonuçları (çürük, çürük nedeniyle dolgulu veya çekilmiş diş) gözlenen kişilerin sıklığını ifade eder. Ağızda çürük veya sonuçlarını taşıyan kişi sayısı, muayene edilen toplam kişi sayısına bölünüp çıkan sonuç 100 ile çarpılarak bu kişilerin toplumda ‘%’ miktarı saptanır. Oral epidemiyolojide diş çürükleri değerlendirilirken ayrı indeksler, diş eti sağlığı değerlendirilirken ayrı indeksler kullanılmaktadır. ^{223, 229}

Diş hekimliğinde DMFT/DMFS ve dmft/dmfs indeks sistemleri; bireyde dolgu, çürük veya çürük sebebi ile çekilmiş toplam diş ya da yüzey sayısını ifade eden ve bireydeki çürük deneyimini göstermekte sıklıkla kullanılan önemli indekslerdir. Dean ve arkadaşları, ağız içindeki tüm belirgin kavite gösteren dişleri, dolgulu dişleri çürük nedeniyle kaybedilmiş diş sayısını toplamış, buldukları değer çürükten etkilenmiş olan diş sayısına karşılık geldiğini belirtmişlerdir. Dünya Sağlık Örgütü, 1997 yılında yayınladığı kılavuzda, çürük muayenesinin görünür ışık altında DSÖ'nün düz ağız aynası ve top uçlu periodontal sond (CPI)(WHO 973/80 - Martin, Solingen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmesini ve sadece Frank kavitesi olan dişlerin çürüklü diş olarak kabul edilmesini tavsiye etmiştir. ^{105, 222, 416, 340, 493}

Diş hekimliğinde DMFT daimi dişlerde bireyin; çürüklü, kayıp olan veya dolgulu diş sayısını; DMFS; daimi dişlerde çürüklü, kayıp olan veya dolgulu diş yüzeyi sayısını gösterir. Diş hekimliğinde DMFT değeri, 3. azı dişlerin dahil edilip edilmemesine göre; 0-28/32 arasında değişebilir. Diğer bir değerlendirme yöntemi olan DMFS hesaplamasında anterior dişlerde 4 yüzey, posterior dişlerde 5 yüzey ele alındığı için skorun değeri 0-128/148 arasında farklılık göstermektedir. Süt dişlenme döneminde deft (dmft) veya defs (dmfs) indeksleri yani çürüklü, çürük nedeni ile dolgulu ya da çekilmiş süt dişi veya yüzeyini ifade eder. Süt dentisyonda, etkilenen diş durumuna göre dmft indeksi 0-20 arasında bir değer olarak gösterilirken; dmfs indeksi 0-88 arasında değişebilmektedir. Bu indeks sisteminde dişin kendiliğinden ekfoliyeye olmuş olması veya çürük sebebi ile çekilmiş olması durumu karışıklık yaratabileceği için df indeksi olarak hesaplanması görüşü de ortaya atılmaktadır. ^{46, 66, 223, 494, 403}

Diş hekimliğinde DMFT hesaplamasında, konjenital eksik dişler, sürmemiş dişler veya süpernumere dişler, çürük dışında bir sebeple kaybedilmiş dişler, daimi dentisyonda bulunan persiste süt dişleri değerlendirilmez. Üçüncü azı dişlerin değerlendirilip değerlendirilmemesi isteğe bağlıdır. Dişte çürük veya çürük ile birlikte dolgu varsa veya geçici dolgu var ise o diş çürük kodu (D) verilmektedir. Çürük nedeniyle çekilmiş olan diş M kodu; dişte sağlam ya da bütünlüğü bozulmuş daimi dolgu var ve dişte çürük yoksa varsa diş F kodu almaktadır. Fakat çürükten farklı bir nedenle dolgu yapılmış ise dişteki dolgu değerlendirilmeye alınmaz. Örnek olarak 5-2-8=15 DMFT; 5 dişin çürük olduğunu, 2 dişin kaybedildiğini ve 8 dişin dolgulu olduğu anlamına gelir. Ayrıca 13 dişin sağlıklı olduğu da bu değerden anlaşılmaktadır. Bir dişte hem dolgu hem de çürük lezyonu varsa o

dişte sadece D komponenti sayılır. Bu değerin 28 olduğu durum bütün dişlerin etkilenmiş olduğunu gösterir. ^{416, 46}

Dişteki her yüzeye uygulandığı için DMFS, DMFT' den daha ayrıntılı bir indekstir ve 'S' bileşeni dişin yüzeyini ifade eder. Diş hekimliğinde DMFS hesaplamasında; anterior dişler için labial, lingual/palatinal, distal, mezial yüzeyler; posterior dişler içinse bukkal, lingual/palatinal, distal, mezial, okluzal yüzeyler değerlendirilir. Kalıcı dişler için hesaplanan DMFS gibi, dmfs hesaplamasında da; anterior dişler için labial, lingual/palatinal, distal, mezial yüzeyler; süt posterior dişler içinse bukkal, lingual/palatinal, distal, mezial, okluzal yüzeyler değerlendirilir. Kurallar DMFT hesaplarındaki gibidir. Eğer dişte çürük veya çürük ile birlikte dolgu varsa o dişe çürük kodu (d) verilmektedir. Çürük nedeniyle çekilmiş dişe m kodu verilmekte ve dişte kalıcı veya geçici hasarlı ya da sağlam ancak çürüksüz dolgu varsa dişe f kodu verilmektedir. Çürükten farklı bir nedenle dolgu yapılmış olan diş değerlendirilmemektedir. ^{416, 46}

2.4 Tükürük

Tükürüğün çürük ile etkileşimi; antibakteriyel etkisi, remineralizasyona katkısı, plak mikroorganizmaları tarafından oluşturulan asidin tamponlanması, dişler üzerindeki besin kalıntılarının yıkanmasında ve şekerin dilüe edilmesinde çok önemlidir. Remineralizasyon etkisi özellikle kalsiyum, flor, fosfat gibi tükürükteki iyonlar ile; antibakteriyel etkisi ise bakterilerin büyümelerini ve kolonizasyonlarını, adezyon yeteneklerini önlemesi ile gerçekleşir. ^{108, 194, 100}

Tükürük ağız içindeki farklı salgı bezlerinin salgıları, yiyecek ve içecek artıkları, mikroorganizmalar ve oral epitelin deskuamasyonundan kaynaklanan hücrelerin oluşturduğu karışık bir vücut sıvısıdır. Tükürüğün çürük gelişimindeki temel rolü, ilerlemekte olan çürük lezyonu varlığında, ağız ortamında oluşan asidik ürünleri tamponlamaktır. Tükürüğün çürük önleyici etkisi akış hızına, tükürük tamponlama kapasitesine, tükürük pH'ına, antimikrobiyal özelliğine ve tükürüğün immün sistem ajanlarına bağlıdır. Uyarılmamış tükürük akışı 0,1 ml/dk, uyarılmış tükürük akışı 0,7 ml/dk değerinin altına indiğinde tükürük miktarının azaldığı kabul edilir. Medikal, fiziksel, patolojik ve psikolojik nedenlerle tükürük akışının azaldığı, tükürük akışının olmadığı bireylerde rampant çürük gelişimi olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle tükürükte meydana

gelebilecek değişiklikler dolaylı olarak diş çürüğü oluşumunu olumlu ya da olumsuz etkileyecektir. ^{300, 52, 475, 153, 119, 5, 128, 183}

2.4.1 Tükürük Akış Hızı Ölçümü

Tükürüğün kompozisyonunu etkileyen önemli etmenlerden biri tükürüğün akış hızıdır. Tükürük akış hızının artması protein, bikarbonat, sodyum ve klorit düzeyini artırırken, fosfat ve magnezyum düzeyinin düşmesine neden olmaktadır. Yemek yeme ve çiğneme sırasında tükürük akışı uyarılırken, uyku sırasında sıfıra yakındır. Yetersiz tükürük akışı, uzamış demineralizasyona ve sonuç olarak diş çürüğüne neden olmaktadır. ^{119, 426, 243}

Tükürük akış oranı uyarılmış veya uyarılmamış tükürük örneği ile ölçülebilir (Çizelge 2.1.). Sağlıklı bireylerde uyarılmamış tükürük akış hızını etkileyen birçok faktör (uyaranın tipi, yoğunluğu ve süresi, günün hangi saatinde bulunduğu, cinsiyet, yaş, beslenme, bazı hastalıklar, ilaçlar, ışık, sigara, hidrasyon, vücut pozisyonu, koku alma) bulunmaktadır. Tükürük toplanmadan en az bir saat öncesine kadar hasta su dışında bir şey yiyip içmemelidir. Hasta sigara kullanmamalı, yoğun fiziksel stres yaşamamalıdır. Yaz aylarında dehidrasyonun fazla olmasına bağlı tükürük akış hızı düşerken, kış aylarında ise artmaktadır. Azalmış tükürük akışı ile çürük oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren en güçlü delil; kserostomi, radyasyon terapisi, Sjögren sendromu vakalarında gözlenen yaygın çürüklerdir. ^{243, 99, 32, 375, 479}

2.4.1.1 Uyarılmamış Tükürük Akış Hızı Ölçümü

Uyarılmamış tükürük örneği alınırken, hasta erişkinse dik oturtularak ve başı öne eğdirilir. Steril bir kaba 5-10 dakika tükürtülür. Elde edilen tükürük miktarı ml/dk olarak hesaplanır. Bebek veya küçük çocuklarda ya ağız tabanından steril plastik bir pipetle çekilerek ya da steril pamuk topakçıklara tükürük emdirilerek steril bir kaba emdirilen tükürüğün boşaltılması ile alınabilmektedir. ²¹⁸

2.4.1.2 Uyarılmış Tükürük Akış Hızı Ölçümü

Uyarılmış tükürük örneği alınırken, 1.5 gr şekersiz sakız veya parafin birkaç saniye hastaya çiğnetilir. Oluşan ilk tükürük hasta tarafından yutulur. Hasta tarafından 5 dakika boyunca çenenin her iki tarafı kullanılarak çiğneme hareketi sürdürülür. Oluşan tükürük aralıklarla steril kaba tükürtülür. Birçok dişi eksik olan hastalarda ise dil, yanak ve dudak hareketleriyle uyarılmış tükürük toplanabilir. Elde edilen tükürük miktarı uyarılmamış tükürük miktarında olduğu gibi ml/dk olarak hesaplanır. Tükürük akış hızı yetersiz olursa, hasta çürük açısından yüksek riskli duruma düşmektedir. ^{99, 459, 218}

	Normal		Düşük	
	Ortalama	Aralık	Aralık	Hiposalivasyon
Uyarılmamış tüm tükürük (ml/dk)	0.3	0.25-0.35	0.1-0.25	<0.1
Parafinle uyarılmış tüm tükürük (ml/dk)	2	1-3	0.7-1	<0.7

Çizelge 2.1. Uyarılmış ve uyarılmamış tükürük için eşik değerleri (ml/dk)

2.4.2 Tükürük pH Ölçümü

Her ne kadar uyarılmamış ve uyarılmış tükürük pH'ı, pH'a duyarlı stripler kullanılarak hasta başında doğru ve hızlı olarak ölçülebilse de, tükürük pH'ı ve çürüğe duyarlılık arasında direk korelasyon saptanamamıştır. Tükürük pH'ı her zaman sekresyon oranını takip etmektedir; bu sebeple pH, sabah ve gece saatlerinde en düşük olmaktadır. Tükürük ilk salgılandığında pH'ı hafif asidiktir. Ancak tükürük akış hızı ile birlikte pH yükselir. Tükürük pH'ı için normal değerler 6.5-7.5'tir. Kritik pH değeri olan 5.5'in altında diş minesinden demineralizasyon başlamaktadır. Asitlik derecesi tespiti indikatör ve elektriksel yol ile yapılabilir. ^{479, 145}

2.4.2.1 İndikatör İle pH Tayini

Bu yol pH belirlemek için yapılan en kolay yöntemdir. (İndikatörler iyonize halde zayıf asit yada baz yapıdadır.) Asitlik derecesine bağlı olarak renk de değişmektedir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı %10'dan daha az değer alındığında renk değişiminin gözle görülememesidir.¹⁴⁵

2.4.2.2 Elektriksel Yol İle Tayini

Bu yöntemde pH-metre olarak adlandırılan alet kullanılır (içinde 1 M Hidroklorik asit [(HCl)] emdirilmiş platin elektrot bulunan cam elektrot vardır.) İnce duvarlı cam ile kaplı ucunda elektriği ileten özel bir camdan yapılmıştır. Standart kalomel ile birlikte cam elektrot bir hücre oluşturur. Sabit ısıda bu hücrenin elektromotiv kuvveti tamamen cam elektrotun içinde bulunduğu solüsyonun H⁺ iyonu konsantrasyonuna bağlıdır.¹⁴⁵

2.4.3 Tükürük Tamponlama Kapasitesi Ölçümü

Tükürük tamponlama kapasitesi, tükürüğün pH değişimlerine karşı gösterdiği direncin sayısal olarak ifadesi olarak tanımlanmaktadır. Tükürük tamponlama kapasitesi, çürük duyarlılığı belirteçlerinin en önemlilerinden biridir çünkü oral kavite içinde asit ataklarına karşı kişinin direncini ifade eder. Ağıza alınan fermente edilebilen karbonhidratlar karyojenik mikroorganizmalar tarafından asitlere dönüştürülerek dental plak pH'ı 4.5-5 hatta daha da aşağıya düşürmektedir. Diğer yandan tampon komponentleri tarafından asitler nötralize edilmeye çalışılmaktadır. Tükürüğün pH'sı 6.5-7.5 arasında değişmektedir.^{479, 492, 130}

Tükürük tamponlaması karbonik asit-bikarbonat, protein ve fosfat tamponlama sistemine dayanmaktadır. Uyarılmış tükürükte en önemli tampon komponenti inorganik fosfatlar iken, uyarılmamış tükürükte ise karbonik asit-bikarbonat tampon sistemidir. Tükürük stimüle edildiğinde tamponlama kapasitesi artmaktadır.^{426, 57, 442}

Klinikte tükürük tamponlama kapasitesi kit şeklinde ürünlerle de ölçülebilir. Test şeritlerine, toplanan tükürükten istenilen miktarda damlatılır. Yeterli bekleme süresinden sonra oluşan renk değişimine göre kite özel hazırlanmış renk skalasından elde edilen

puanlar toplanır.

2.5 Streptokoklar

Oral Streptokoklar; gram (+), küresel ya da oval sekilli, 0.5-2 µm çapındaki bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Streptokoklar ağız mikroflorasının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Ağızda her bölgeden izole edilmişlerdir. Supragingival dental plakta kültür edilebilen mikrofloranın %28'ini, dişeti oluğunda %29'unu, dilde %45 ve tükürükte % 46'sında bulunmaktadır. Bu streptokokların çoğunluğu kanlı agarda hemoliz yaparlar ve araştırmacılar tarafından viridans streptokoklar olarak da adlandırılmışlardır. Ancak hemolizin streptokokları ayırt etmede güvenilir bir özellik olmadığı belirtilmektedir. Birçok suş, alfa, beta ve gamma olmak üzere üç tip hemolizi de gösterirler.

Taksonomik çalışmalarda viridans streptokoklar iyi tanımlanmış türlere ayrılmıştır. Bu yüzden birbirinden farklı özelliklere sahip birçok türün temsilcisi olarak viridans streptokok terimi ya da (*Streptococcus viridans*) ismi kullanılmaktadır. Ağız mikroflorasının başlıca komponentlerinden olan oral streptokokların, diş çürüğü dışında bakteriyemi ve infektif endokarditin etiyolojisinde rol oynadıkları da bildirilmektedir.
286,178,321,323

Viridans streptokoklarının insanda görülen türleri 5 grup içerisinde sınıflandırılmıştır (Çizelge 2.2.).¹³¹

Grup Adı	Tür Adı
Streptococcus mutans grubu (Mutans Streptokokları)	S. mutans (serotip c, e, f, k) S. sobrinus (serotip d,g) S. cricetus (serotip a) S. rattus (serotip b) S. ferus (serotip c) S. macacae (serotip c) S. downei (serotip h)
Streptococcus salivarius grubu	S. salivarius S. vestibularis S. infantarius
Streptococcus anginosus (Streptococcus milleri) grubu	S. anginosus S. intermedius S. constellatus
Streptococcus mitis grubu	S. mitis S. oralis S. cristatus S. infantis S. perois S. crista
Streptococcus sanguinis grubu	S. sanguinis S. gordonii S. parasanguinis

Çizelge 2.2. Oral streptokokların sınıflandırılması

2.5.1 Karyojenik MS'lerin Patojenik Özellikleri

Karyojenik bakterileri diğer bakterilerden ayıran farklı karakteristik özellikleri vardır. Karyojenik bakterilerin diş çürüğüne neden olabilmesi için üç farklı özelliğe sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler; asidojenik ve asidürik olmaları ile ekstrasellüler ve intrasellüler polisakkarit üretme yetenekleridir. Yapılan çalışmalarda, *S. mutans* ve *S. sobrinus*'un deney hayvanlarında diş çürüğüne neden olan en güçlü karyojenik etkiye sahip bakteriler olduğu saptanmıştır. ^{268, 290, 115, 429}

1. Fermente edilebilen karbonhidratları diğer plak bakterilerine göre daha hızlı bir şekilde kullanarak asit üretebilme yetenekleri: Mutans streptokoklar, fosfoenolpiruvat fosfotransferaz (PEP-PTS) sistemi dahil olmak üzere birkaç farklı şeker transport sistemine

sahiptirler. Bu sistemler sayesinde düşük konsantrasyonlu şekerleri bile kullanarak asit üretebilirler.²⁶

2. Ekstrasellüler ve intrasellüler polisakkarid sentezleyebilme yetenekleri: Glukan ve fruktan gibi ekstrasellüler polisakkaridlerden glukan plak matriksinin oluşumunda kullanılırken, fruktan ise karbonhidrat bulunmayan ortamlarda metabolize edilmektedir. Levan ve dekstran, bakteri enzimleri (glukoziltransferaz) ile hücre dışında sentez edilir. Şeker transportu fosfotransferaz enzimi ile yapılır. Intrasellüler polisakkaridler (IPS) ise glikojene benzer depolanmış polimerlerdir. Bakteriler intrasellüler polisakkarid sentezini enerji üretimi için kullanırlar. Ortamda şeker olmadığı veya azaldığı durumlarda bakteriler IPS'yi kullanarak fermentasyonu ve asit üretiminin devamlılığını sağlarlar.²⁶

3. Uygun olmayan çevresel koşullarda bile şeker metabolizmasını sürdürebilme yeteneği: Sadece birkaç bakteri uzun süre asidik ortam koşullarına tolerans gösterebilmektedir. Mutans streptokoklar ve laktobasiller hem bu koşullarda canlı kalabilme yeteneğine hem de üreme ve şeker metabolize etme özelliklerine devam ederler. Bu durum, hem asidojenik hem de asidürik bakteriler olduğunu göstermektedir.²⁶

Diş çürüğü, farklı ve kompleks yapıdaki mikroorganizmaların oluşturduğu dental biyofilmin bulunduğu alanlarda meydana gelmektedir. Etiyolojisinin anlaşılması zordur çünkü, diş çürüğüne direkt olarak neden olan mikroorganizma türünü saptamak oldukça güçtür.^{289, 172} İnsanlarda diş çürüğü ile ilgili bulunan bakteri türleri Çizelge 2.3' te gösterilmektedir.

Kuvvetle ilişki	Olası ilişki
Mutans streptokokları <i>S. mutans</i> <i>S. sobrinus</i> Laktobasiller <i>L. casei</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. palantarum</i> <i>L. acidophilus</i>	Diğer streptokoklar <i>S. mitis</i> Aktinomiçesler <i>A. viscosus</i> Non-mutans streptokoklar

Çizelge 2.3. İnsanda diş çürüğü ile ilgili bulunan bakteri türleri

2.5.2 Oral Streptokoklar

Oral streptokoklar beş ana grup altında toplanmışlardır: ¹³¹

1. Streptococcus salivarius (*S. salivarius*)
2. Streptococcus sanguinis (*S. sanguinis*)
3. Streptococcus mitis (*S. mitis*)
4. Streptococcus anginosus (*S. anginosus*)
5. Streptococcus mutans (*S. mutans*)

2.5.2.1 Streptococcus salivarius

Gram (+) mikroorganizmalardan olan *S. salivarius* 'un özellikle dilde kolonize olduğu belirtilmektedir. Vücut direnci düşük olan bireylerde enfeksiyona neden olan fırsatçı mikroorganizmalar olarak tanımlanmakta ve nötrofenili bireylerde çok kısa sürede kana geçerek septisemiye neden oldukları bildirilmektedir. *S. salivarius*, sakkarozdan fruktan üretmekte ve mitis salivarius basitrasini (MSB) agarda tek, geniş ve kubbe şeklinde koloni oluşturmaktadır. Sorbitol ve manitolü fermente etmemektedir. ^{42,164,191}

2.5.2.2 Streptococcus sanguinis

Gram (+), fakültatif, 0.8-1.2 µm çapında, küresel veya oval şekilli, orta veya uzun zincirler oluşturan mikroorganizmalardır. *S. sanguinis* 'in, diş yüzeyinde erken kolonize olan mikroorganizmalardan biri olduğu ifade edilmektedir. Kanlı agarda alfa hemoliz yapmakta ve anaerob ortamda üreyebilmektedir. Diğer oral suşlardan farklı olarak; arjinini ve eskülini hidroliz etmekte, sakkarozdan glukoz üretmekte ve hidrojen peroksit üretmektedir. Mikrobiyal dental plakta bulunan başlıca suşlardan biri olan *S. sanguinis*, dişlerin düz yüzeylerinde kolonize olmaktadır. Ayrıca insanlarda dışkıdan da izole edilebileceği ve kan dolasımına karıştığı durumlarda kalp kapakçıklarına yerleşerek bakteriyel endokardite sebep olabileceği bildirilmektedir. ^{24,268,448}

2.5.2.3 Streptococcus mitis

S. mitis, alfa-hemolitik, arjinini, eskülini, sorbitol ve mannitolü hidrolize etmeyen streptokok grubu olarak tanımlanmaktadır. Hücreleri 0.6-0.8 µm çapında, yuvarlak veya oval şekildedir. Ayrıca sıvı kültürde uzun zincirler oluşturmaktadır. Diğer oral suşlardan farklı olarak; eskülin hidrolizi, inülin fermentasyonu yapmamakta ve ekstrasellüler polisakkarit oluşturmamaktadır. *S. mitis* MSB agarda yuvarlak, yumuşak, kahverengi-siyah koloniler meydana getirmektedir. İnsanlarda boğaz, ağız boşluğu ve kandan izole edilebilmektedir. Diş çürüğü, endokardit ya da septisemi oluşumunda rol alabilecekleri de belirtilmektedir. ^{164,448,378}

2.5.2.4 Streptococcus anginosus

S. anginosus grubunun üyeleri, gram-pozitif, oksidaz ve katalaz-negatif koklardır. Bunlar, koyun kan agarında değişken hemoliz kalıpları (alfa, beta veya gamma) gösteren non-hareketli fakültatif anaeroblardır. Kolonileri genellikle küçüktür ve koloni boyutu 0.5 mm'den daha azdır. Birçok suş CO₂ varlığında artmış büyüme gösterirken, bazı suşlar anaerobik koşulları gerektirebilir. *S. anginosus* grubu boğaz, nazofarenks, gingival bölge, vajina ve gastrointestinal sistemin normal flora bakterileri arasında bulunmakla beraber, çeşitli infeksiyonlara yol açabilmektedir. ^{423,360,41,201}

2.5.2.5 Mutans Streptokokları- MS

Dental biyofilmde bulunan, mannitol, sorbitol gibi karbonhidratları fermente eden, sakkarozdan ekstrasellüler polisakkarid üreten MS, *S. ferus* dışında karyojenik olan streptokoklardır. Hücre duvarında lokalize olan karbonhidrat antijenlerinin serolojik özgülüğüne bağlı sekiz serotipi vardır. Mutans streptokoklar fakültatif anaeropturlar ve üremeleri için gereken optimal sıcaklık 37°C'dir. Mutans streptokoklar, insanlarda diş çürüğüne sebep olan en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Mutans streptokokların sabit kolonizasyonları için dişlerin ya da başka sert yüzeylerin varlığı gerekmektedir. Bu nedenle çocuklarda dişlerin sürmesinden sonra ortaya çıkmaktadırlar.

Diş çürüklerinin başlangıcında MS'ler minede fissürlere, hatta dentine invaze olabilirler. Çocukların ağız florasında MS yaşamın erken dönemlerinde tespit edilebilmektedir. Yapılan çalışmalara göre çocuklar 1.5-3 yaş arasında MS ile tanışmaktadır. Erken dönemlerde enfekte olan çocuklarda yüksek çürük riski söz konusudur. Mutans streptokokları'nın, başlangıç lezyonlarında ve çürük kavitelere alınarak yapılan çalışmalarda yüksek oranda, sağlam kök yüzeylerindeki plakta düşük oranda bulunduğu vurgulanmaktadır. Mutans streptokokları'nın dental plaktan düzenli olarak izole edilebildiği, sağlam mine yüzeyinde görülme oranının daha düşük olduğu belirtilmektedir. Mutans streptokoklar sakkarozdan çözünebilen veya çözünemeyen ekstrasellüler polisakkaritler oluştururlar. Bu durum dental biyofilm oluşumu ve karyojenite ile yakından ilgilidir. Ayrıca diyetdeki karbonhidratların uygun olmadığı dönemlerde karbonhidrat rezervi olarak görev yapan intrasellüler polisakkarit sentezi gerçekleştirirler. Mutans streptokoklar fermente edilebilen karbonhidratlardan asit üretirler, asit ortamda büyüme ve yaşama özelliğine sahiptirler. Bu özellikleri diş çürüğü patojenitesinde rol oynamaktadır. ^{179,164,80,93,404,398,234,195,358,475}

İnsanlarda diş çürüğüne neden olan en önemli etiyolojik ajan olarak kabul edilen Mutans streptokoklar, dental biyofilmde bulunan ve karbonhidratları fermente eden streptokok grubu olarak tanımlanmaktadır. Mutans streptokoklar, diş çürüğüne neden olan asit ve ekstrasellüler polisakkarit üretiminin yüksek düzeyde olması gibi biyolojik özellikleri sebebiyle oral kavitede bulunan karyojenik bakteri grubu olarak tanımlanmaktadır. Yapılan serolojik çalışmalarda hücre duvarında bulunan polisakkaritlere göre *S. mutans* (serotip c, e, f), *S. sobrinus* (serotip d, g), *S. rattus* (serotip b), *S. cricetus* (serotip a), *S. macacae* (serotip c), *S. ferus* (serotip c) ve *S. downei* (serotip h) olarak sekiz serotipi tanımlanmıştır. ^{394,501,164,258,320,322,344,425,443}

Nakano ve arkadaşları 2004 yılında, *S. mutans*'ın rhamnoz-glukoz polimerlerinin glukoz yan zincirlerinde ciddi azalma gösteren suşlarının yeni bir serotip olduğunu ve bu serotipin Japon çocuklarının yaklaşık olarak %2'sinin ağız boşluğunda tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bu yeni serotipi serotip *k* olarak adlandırmışlardır. ³²⁰ Ayrıca *S. mutans* serotip *k* suşlarının fagositoza daha az duyarlı oldukları ve infeksiyöz endokardit gelişmesi ile yakından ilişkili oldukları bildirilmiştir. Bu grup içinde, *S. mutans* ve *S. sobrinus* insanlarda mikrobiyal diş biyofilminde en sık izole edilen ve diş çürüğü ile ilişkisi olan mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Mutans streptokoklar mannitol ve sorbitolu

fermente etmekte ve sakkarozdan glukun sentezlemektedirler. Kanlı agarda genellikle alfa ya da beta hemoliz yapmaktadırlar. ^{323,318,93,131,164,258,475,499,279,319,322}

2.5.2.5.1 Mutans Streptokoklarının Virulansı

Virulans terimi, bir mikroorganizmanın konakta hastalık oluşturma kapasitesi olarak tanımlanmaktadır. Mutans streptokokların kariyojenitesinde etkili olan başlıca virulans faktörleri; ekstrasellüler ve intrasellüler polisakkarit sentezi, adezyon, asidojenite ve asit toleransı olarak bildirilmektedir.

Mutans streptokokların diş çürüklerinin oluşumu ve gelişimindeki rolleri yıllardır araştırılan bir konudur. Bu mikroorganizmaların virulansı, asidojenitesine, dental pelikula yapışma ve çoğalma yeteneklerini içeren birçok faktöre bağlıdır. Pelikuldaki kolonizasyonları değişik şekillerde olabilmektedir. Bununla birlikte, bakteriler sakkaroz varlığında diş yüzeyine yapışarak bağlanmakta ve bu bağlanmada suda çözünmeyen glukun önemli rolü olduğuna inanılmaktadır. Glukun sentezi ise, glukoz ve sakkarozu substrat olarak polimerize eden glukoziltransferaz enzimi (GTF) (dextranaz) ile katalize edilmektedir. Birçok çalışmanın sonucunda, kariyojenik bakteriler tarafından glukana bağlı gerçekleşen yapışma ve birikimin patojenik dental plağın gelişiminde kritik önem taşıdığı bildirilmektedir. ^{68,398,277}

2.5.2.5.1.1 Ekstrasellüler Polisakkarit (EPS) Sentezi

S. mutans diş çürüğünün başlıca patojeni olarak tanımlanmaktadır. *S. mutans*'ın sıklıkla üzerinde durulan virulans faktörleri arasında; sakkarozdan suda çözünmeyen ekstrasellüler glukun sentezleme özelliği yer almaktadır. Ekstrasellüler polisakkaritlerden (EPS) özellikle suda çözünmeyen glukunlar diş yüzeyine bakteri adezyonunda rol oynamaktadır. Sakkarozdan suda çözünmeyen glukun sentezi, glukoziltransferaz (GTF) aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Glukun sentezinin, dental biyofilmde bakteri birikiminin başlıca sebebi olduğu belirtilmektedir. ^{424,42}

2.5.2.5.1.2 Diş Yüzeyine Yapışma (Adezyon)

Diş çürüğünün başlaması ve ilerlemesinden sorumlu olan MS'ler dental biyofilm içerisinde çok sayıda bulunmaktadır. Mutans streptokokların diş yüzeyine yapışması dental biyofilm oluşumunda anahtar rol oynamaktadır. *S. mutans*'lar sakkaroz varlığında diş yüzeyine yapışmakta ve diyetle alınan çeşitli şekerleri fermente ederek asit üretmektedir. *S. mutans*'ın diş yüzeyine yapışması iki aşamadan oluşmaktadır: Birinci aşamada, organizma ve tükürük ile kaplı diş yüzeyi arasındaki geri dönüşümlü ilk etkileşim gerçekleşmekte, geri dönüşümsüz ikinci aşamada ise GTF enziminin etkisi ile sakkarozdan suda çözünmeyen glukan sentezlenmektedir. Mutans streptokokların sakkarozdan sentezledikleri EPS'ler ve yüzey proteinleri diş yüzeyine yapışmalarında rol oynamaktadır. *S. sobrinus*'un diş yüzeyine yapışmasında öncelikle EPS'lerin etkili olduğu, yüzey proteinlerinin ise çok az etkisi olduğu belirtilmektedir. Bu mikrobiyolojik özelliklerin yanı sıra konağa bağlı faktörler de diş yüzeyine adezyonu etkilemektedir. ^{431,163,72,396}

2.5.2.5.1.3 İntrasellüler Glikojen-Benzeri Polisakkarit (IPS) Sentezi

Sürekli ve fazla miktarda şeker alımı; *S. mutans*'ın IPS sentezlemesine neden olmaktadır. İntrasellüler polisakkaritler, eksojen şeker alımının sınırlı olduğu durumlarda organizmaların yeterli düzeyde asit üremesini sağlayacak depo görevi gören glukanlar olarak tanımlanmaktadır. ¹⁶³

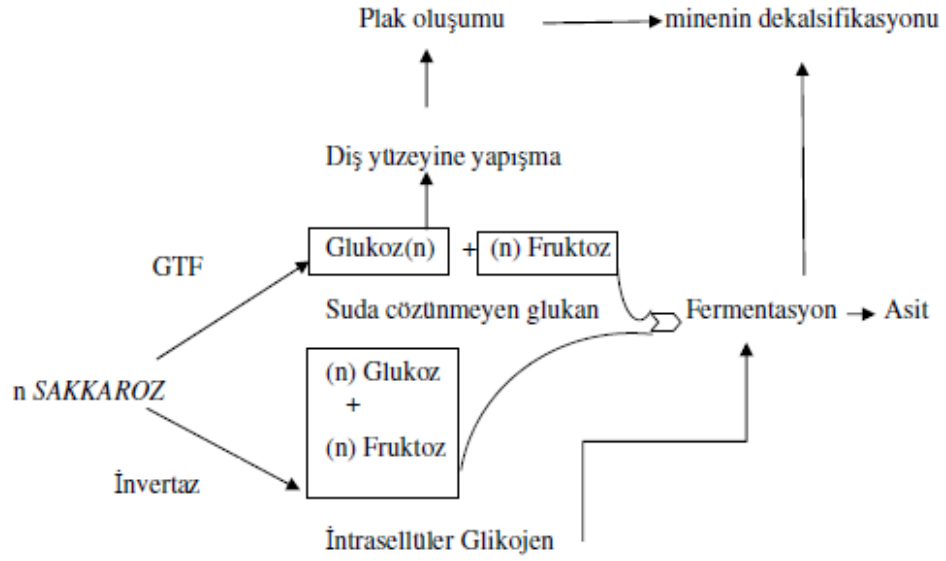
2.5.2.5.1.4 Asit Toleransı (Asidürite) Ve Asit Üretimi (Asidojenite)

Mutans streptokokların birçok farklı şekeri fermente ettiği bildirilmektedir. Ortamda şekerin fazla bulunduğu durumlarda, glikoliz sonucu oluşan pürivik asit laktatdehidrogenaz (LDH) enzimi ile laktik asite çevrilmekte ve oluşan laktik asitin, çürük oluşumunda en etkili asit olduğu bildirilmektedir. Diğer ağız bakterileri ile karşılaştırıldığında MS'lerin sakkarozdan laktik asit üretimlerinin daha hızlı olduğu belirtilmektedir. *S. mutans* ürettiği adenozintrifosfaz (ATPaz) enzimi ile H⁺ iyonlarını hücre dışına pompalamakta ve hücre içi asit yoğunluğunu azaltmaktadır. Bu özelliği ile *S. mutans* pH<5 olduğu durumlarda glikolize devam etmektedir. ^{238,327,53}

2.5.2.5.2 Mutans Streptokoklarının Sakkaroz Metabolizması

Sakkaroz metabolizması, MS'nin çürük oluşturmada önemli rol oynamaktadır. Mutans streptokoklar, sakkaroz metabolizması için gerekli ekstrasellüler, hücre yüzeyine bağlı ve sitoplazmik enzimleri üretmektedir. Glikoziltransferaz enzimi, sakkarozdan glukoz oluşumunu kataliz eder ve serbest fruktoz oluşturur. Fruktoziltransferaz enzimi ise sakkarozun fruktoz kısmını polimerize eder ve serbest fruktan ve glukoz oluşturur. Fruktan, plak bakterileri tarafından üretilen hidrolaz enzimi tarafından katabolize edilmektedir. Mutans streptokoklar tarafından glukozun üretimi, bakterinin birikimi ve çürük oluşturmada için önemli reaksiyonlardır. Sakkaroz metabolizmasına katılan diğer enzimlerden fosforiltransferaz, sakkaroz-6-fosfat hidrolaz; sakkaroz transportundan ve fosforilasyonundan sorumludur. Mutans streptokoklar fosforiltransferaz sistemi ile karbonhidratların hücre içine transportunu sağlamaktadır. Bu bakterilerin karbonhidratları hücre içine taşıma ve metabolize etme yeteneğine sahip olmaları, plakta bulunan metabolik yetenekleri sınırlı diğer bakterilerden daha üstün olmalarını sağlamaktadır. İntrasellüler şeker metabolizması; çürük oluşumu açısından önemli bir diğer konu olup intrasellüler polisakkarit (IPS) üretimi ve katabolize edilmesidir. Depolanan IPS'nin kullanılması, uyku dönemleri gibi bakterilerin metabolizması için herhangi bir besin maddesi bulamadıkları dönemlerde gerçekleşmektedir. Karbonhidratların depolanması ve sonra parçalanmasıyla asit oluşumu, plak pH'sının düşmesine neden olmaktadır. Böylece, düşük plak pH'sının sürekliliği sağlanarak minenin demineralizasyonuna sebep olmaktadır. Mutans streptokokların sakkarozdan moleküler ağırlıkları büyük glukozları sentezleyebilmesi, diş çürüklerinin patogeneğinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. Mutans streptokoklar sakkarozdan, ekstrasellüler suda çözünmeyen ve suda çözünen polisakkaritleri ve intrasellüler polisakkaritler ile glikoliz boyunca büyük oranda laktik asit üretmektedir. Glukozla kaplı bu bakterilerin mine yüzeyinde lokalize olmaları, minenin tükürük tarafından tamponlanmasını engelleyerek üretilen asidin mine yüzeyinden uzaklaşmasını önlemektedir. Suda çözünen glukozlar, bakteriler için zayıf bir bağlanmaya neden olmaktadır. Suda çözünmeyen glukozlar güçlü bir bağlanma sağladıkları için, dental biyofilm oluşumunda bu polisakkaritlerin büyük önemi olduğu düşünülmektedir. ^{431, 163, 72, 396, 238, 327, 53, 171, 398, 42, 68, 114}

Polisakkaritler, suda çözünebilir ya da çözünemeyen olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Suda çözünebilir polisakkaritler hareketlidir ve ortamda bulunan bakteriler tarafından metabolize edilebilmektedir. Suda çözünmeyen polisakkaritler ise, dental biyofilm oluşumuna katılmakta ve bakterilerin biyofilme tutunmasını sağlamaktadır. Sakkarozun, GTF enzimi tarafından suda çözünebilir glukanın sentezi için kullanılan tek substrat olduğu bildirilmektedir. Sakkaroz, asit oluşturmak için, ağızda bulunan streptokoklar tarafından kolaylıkla fermente edilebilmektedir. Sakkaroz, *S. mutans* tarafından farklı metabolik yollarla kullanılabilir (Şekil 2.2.). *S. mutans* sakkaroz içeren besiyerinde, suda çözünebilir (α 1-6 bağlı) ve suda çözünmeyen (α 1-3 bağlı) glukanın (dekstran) büyük miktarda sentezlenmesini sağlayan GTF enzimi salgılamaktadır. Glikoziltransferaz enzimi de, hücre yüzeyine bağlanmakta ve sakkarozdan glukanoz sentezlemektedir. *S. mutans* GTF enziminin bağlanma özelliği ile diğer oral bakterilerden ayrılmaktadır. Sakkaroz; fruktoziltransferaz (FTF) ya da glukoziltransferaz (GTF) enzimi ile ekstrasellüler polisakkaritler (EPS) ve intrasellüler polisakkaritleri (İPS) oluşturmaktadır. Bu monosakkaritler asidik ortam oluşturmak için birçok plak bakterisi tarafından kolaylıkla fermente edilebilmektedir. Asitlik derecesindeki düşüş, mine ya da dentinin dekalsifiye olmasına neden olmaktadır (Şekil 2.2.).^{163, 231, 298, 299, 325, 164, 449}



Şekil 2.2 Sakkarozun *S. mutans* tarafından metabolize edilmesi ¹⁶³

2.5.2.5.3 Mutans Streptokokları Subtipleri

2.5.2.5.3.1 Streptococcus sobrinus

S. mutans ile birlikte insanlarda mikrobiyal dental biyofilmde en sık izole edilen ve diş çürüğü ile yakından ilişkisi olan mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Bakteri hücresi 0.5 μm çapındadır ve çift ya da uzun zincirler şeklinde bulunmaktadır. Sakkaroz içeren agarda 1 mm çapında, pürüzlü ve kümelenmiş koloniler oluşturdukları belirtilmektedir. İnsan tükürük ve mikrobiyal dental biyofilm örneklerinden en sık izole edilen mikroorganizmalar olarak tanımlanan *S. mutans* ve *S. sobrinus*, diş yüzeyine adezyon, asit oluşturma kapasiteleri ve flora karşı duyarlılık gibi özellikler açısından farklılıklar göstermektedir. ^{37, 147, 259, 394, 450, 131, 93, 164, 47, 175, 466}

Ortamda bulunan sakkaroz ve GTF, *S. sobrinus*'un diş yüzeyinde kolonize olabilmesi için önem taşımaktadır. *S. sobrinus* kazanılmış mine pelikülüne minimum düzeyde ve nonspesifik bir biçimde bağlanmakta ve ortamda sakkarozun bulunduğu durumlarda kolonize olduğunda glukun oluşumu izlenmektedir. *S. mutans* ve *S. sobrinus* tarafından salgılanan ekzoproteinlerin (GTF, FTF, levan, dekstran, hücre yüzeyindeki proteinler) bu bakterilerin virulans faktörlerini meydana getirdiği bildirilmiştir. ^{37, 149, 271}

Yapılan çalışmalarda, *S. sobrinus*'un ağız florasında *S. mutans*'tan daha az oranda saptandığı ve düz yüzey çürüklerinin oluşumunda etkili olduğu bildirilmektedir. *S. mutans*'tan daha az sıklıkla ve daha az sayıda izole edilmesinde, ağızda doğal olarak oluşan bir amino şeker olan N-asetilglukozamin'in (GlcNAc) rolü olduğu belirtilmektedir. *S. mutans*'ın GlcNAc'ı fermente etmesine karşın *S. sobrinus*'un bu amino şekeri fermente edemediği ve ayrıca GlcNAc'ın *S. sobrinus*'un fermente edilebilir karbonhidratları kullanmasını da inhibe ettiği vurgulanmaktadır. *S. sobrinus*'un, *S. mutans*'tan daha asidojenik ve asidürik özellikte olduğu, sakkarozdan suda erimeyen polimer yapımının daha fazla olduğu ve gnotobiyotik hayvanlarda çürük yapıcı özelliğinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda *S. sobrinus* sıklığının yüksek çürük aktivitesi ile *S. mutans*'tan daha çok ilişkili olduğu belirtilmiş; bu durumun *S. sobrinus*'un *S. mutans*'tan daha hızlı asit üretme özelliğinden kaynaklanabileceği vurgulanmıştır. ^{48, 188, 271, 344, 348}

2.5.2.5.3.2 Streptococcus mutans

S. mutans diş çürüğünden sorumlu esas etiyolojik ajandır. Epidemiyolojik çalışmalara göre çocuklarda ve gençlerde mine çürüğünün, yaşlılarda kök çürüğünün ve bebeklerde biberon çürüğünün etiyolojisinde birincil patojendir. *S. mutans*'ın, hücre duvarında lokalize olan karbonhidrat antijenlerinin serolojik spesifitesine bağlı yedi serotipi vardır ve bu serolojik özelliğın, hücre duvarındaki rhamnoz-glukoz polimerlerinin kimyasal yapısı baz alınarak gerçekleştirildiği vurgulanmaktadır. Ayrıca serotip c'nin insanlarda oral kavitede baskın olarak bulunan serotip olduğu belirtilmektedir. İnsanlardan izole edilen MS 'nın %74-94'ünü *S. mutans*'ın oluşturduğu, pit ve fissür çürüklerinin gelişiminde rol oynadığı bildirilmektedir. Yapılan çalışmalara göre *S. mutans*'ın fissürlerde *S. sobrinus*'tan daha fazla bulunduğu bildirilmektedir. *S. mutans*, 0.5-0.75 µm çapında, çift ya da kısa zincirler halinde bulunmakta ve kanlı agarda, 0.5-1 mm'lik koloniler oluşturmaktadır. Bu koloniler yarı saydam, beyaz renkte, dairesel, düzensiz bazen pürüzlü yüzeyli ve agara yapışık olabilmektedir. *S. mutans*, genellikle α hemolitikdir. Ancak β hemolitik suşlarının da olduğu belirtilmektedir. Sakkaroz içeren besiyerinde *S. mutans*, ekstrasellüler polisakkarit oluşturmakta ve *S. mutans*'a karakteristik özellik kazandıran opak, düzensiz, beyaz koloniler oluşturmaktadır. *S. mutans* ve diğer mutans grubunda yer alan suşların sorbitol

ve mannitol fermentasyonu yapmaları ile diğer oral streptokoklardan ayrıldıkları bildirilmektedir. Ayrıca *S. mutans*'ın diğer suşlardan farklı serolojik özelliklerinin bulunduğu ve basitrasine karşı dirençli olduğu vurgulanmaktadır. 186, 204, 358, 292, 286, 323, 404, 412, 271, 253, 93, 268, 448

2.5.2.5.3.3 Streptococcus ferus

Streptococcus ferus serotip c insanlardan izole edilmediği ve *S. mutans* ile diğer MS'lerden genetik olarak farklı olduğu için *S. ferus* olarak isimlendirilmiştir. *S. ferus* haricinde bütün MS'ler hayvan modellerinde karyojeniktir. Vahşi ratlardan izole edildikleri bildirilmektedir. Rafinoz ve melibiozu fermente edemedikleri ve basitrasine karşı duyarlı oldukları belirtilmektedir. Hücreleri 0.5 µm çapındadır ve çift ya da zincirler halinde bulunmaktadır. Sakkaroz içeren agarda 1 mm çapında, kabarık koloniler oluşturmaktadır. 268, 93, 448, 164, 469

2.5.2.5.3.4 Streptococcus cricetus

S. cricetus hamsterlarda, ratlarda, seyrek olarak insanlarda ağız boşluğunda gözlenmektedir. Fenotipik bakterileri, dolayısıyla *S. cricetus*'u, MS grubunda kalan diğer üyelerden ayırt etmek kolay değildir. Rafinoz ve melibiozu fermente etmektedirler. Aerop ortamda üredikleri ve basitrasine karşı duyarlı oldukları belirtilmektedir. Hücreleri 0.5 µm çapındadır ve çift ya da zincirler halinde bulunmaktadırlar. Kanlı agarda 2-3 mm çapında koloniler oluşturdukları, sakkaroz içeren besiyerinde ise kolonilerin daha küçük ve düzensiz olduğu bildirilmektedir. 268, 93, 448, 164, 469

2.5.2.5.3.5 Streptococcus rattus

S. rattus (serotip b) hamsterlarda ve laboratuvar ratlarında bulunurlar. Rafinoz ve melibiozu fermente etmektedirler. Aerop ortamda üredikleri ve basitrasine karşı duyarlı olmadıkları belirtilmektedir. Hücreleri 0.5 µm çapında, çiftler ya da zincirler halinde bulunmaktadır. *S. mutans* gibi intrasellüler polisakkarit oluşturmada ve depolamaktadır.

Sakkaroz içeren besiyerinde üreyen koloniler, pürüzlü, 1 mm çapında ve kümelenmiş halde görülmektedir. Nadir olarak dental plaktan da izole edilebilirler.^{268, 93, 448, 164, 469, 333}

2.5.2.5.3.6 Streptococcus macacae

İnsan orijinli değildir ve serotip c antiserumu ile reaksiyon vermektedir. Maymunlardan izole edildikleri bildirilmektedir. *S. mutans* ile benzerlik gösterdikleri, buna karşın basitrasine duyarlı olmadıkları vurgulanmaktadır. Sakkaroz içeren agarda saydam, 1-2 mm çapında koloniler oluşturmaktadır.^{268, 93, 448, 164, 469}

2.5.2.5.3.7 Streptococcus downei

Serotip h olarak adlandırılır ve insandan izole edilmemektedir. Mitis salivarius agarda koyu mavi, kıvrımlı, en fazla 1 mm çapında olan koloniler oluşturdukları; sakkaroz içeren agarda ise kolonilerin 2-3 mm çapında, konik ve beyaz bir hale ile çevrili olduğu bildirilmektedir.^{268, 93, 448, 164, 469} Yoo ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmalarında, daha önceki yıllarda sadece maymunlardan izole edildiği bildirilen *S. downei*'nin insanlarda mikrobiyal dental biyofilmden de izole edildiği belirtilmiştir.⁵⁰⁰

2.5.3 EÇÇ Oluşumunda Etkili Olan MS'lerin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Çürük mikrobiyolojisinin anlaşılmasında; kültür, biyokimyasal ve serolojik testler, florometrik teknikler, ışık mikroskopisi gibi geleneksel mikrobiyolojik çalışmaların dışında; yeni teknolojik olanaklar ve moleküler genetik incelemeler de karyojenik mikrobiyotada özel türlerin düzeylerini saptamada yeni bir devrim yaratmıştır.⁹⁴

Ağızdaki bakterilerin neredeyse yarısı kadarı kültür edilememiştir. Oral mikrobiyotanın incelenmesinde kullanılan moleküler tanı ve teşhis yöntemleri ile kompleks bakteri toplulukları tespit edilebilmiştir. Günümüzde DNA merkezli yöntemler,

dental hastalıkların etiyolojisinde yer alan bakteriyel çeşitliliğin anlaşılabilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. ^{215,480}

2.5.3.1 MS'lerin İzolasyonunda Kullanılan Kültür Yöntemleri

Mutans streptokokları, fakültatif anaerop mikroorganizmalar olarak tanımlanmakta ve 37°C'de optimal üreme gösterdikleri bildirilmektedir. Mutans streptokokların izolasyonunda beş farklı besiyeri kullanılabilir. Bu besiyerleri; mitis salivarius basitrasin agar (MSB), mitis salivarius basitrasin kanamisin agar (MSKB), glukoz-sakkaroz-tellürit basitrasin agar (GSTB), basitrasin ve sakkarozlu triptoz soy broth (TYS20B), sakkaroz ve basitrasin içeren tripton-maya ekstrasistein broth (trypton-yeast extracysteine) (TYCSB) olarak sıralanmaktadır. ^{164,399}

Mitis salivarius basitrasin agarda, *S. mutans*'ların küçük, kabarık, düzensiz sınırlı koloniler oluşturdukları ayrıca *S. sobrinus* kolonilerinin ise jelatin benzeri kıvamda bir koloni ile sınırlandırıldığı belirtilmektedir. Mutans streptokokların primer izolasyonu için en sık kullanılan besiyerinin sakkaroz, basitrasin, ve potasyum tellürit içeren MSB agar olduğu belirtilmekte ve *S. mutans*, *S. sobrinus* ve *S. rattus* için seçici olduğu vurgulanmaktadır. Mitis salivarius basitrasin agarda, *S. mutans* kolonilerinin buzlu cam görünümünde olduğu; *S. sobrinus* kolonilerinin ise krem gibi, badem ezmesi kıvamında, mat tanecikli yüzeyli olduğu bildirilmektedir. ^{164,440}

Mitis salivarius basitrasin agara kanamisin sülfat ve sorbitol ilavesi ile MSKB agar elde edilmektedir. Tryptone yeast extract cystine sucrose bacitracin agar (TYCSB), TYC agar [triptoz, maya özü ve sistein (trypticase, yeast extract and cysteine)] sakkaroz ve basitrasin içermektedir. Tryptone yeast extract cystine sucrose bacitracin agarda *S. sobrinus*'un beyaz süt benzeri bir zon ile sınırlandırılan koloniler oluşturduğu ifade edilmektedir. ^{399,440}

Mutans streptokokların belirlenmesi, seçici ve seçici olmayan agarda olusan koloni morfolojisindeki farklılıklara, gram boyama, ışık mikroskopunda görülen farklı hücre şekli, şeker fermentasyonu ve enzimatik aktivitelere dayanmaktadır. Son yıllarda moleküler mikrobiyolojide geliştirilen yöntemler, bakteriyel izolatların tam olarak saptanmasını sağlamakta ve ayrıca MS'lerin genetik çeşitliliğinin ve geçişinin belirlenmesinde kullanılabilmektedir. ^{347,10,80,197}

2.5.3.2 Tükürük Örneklerinden *S. mutans* Sayımı

2.5.3.2.1 Laboratuvar Metodları

Tükürük ve plaktaki mutans streptokokların nicel olarak değerlendirilmesi MSB agar kullanılarak yapılmaktadır. Tükürük toplandıktan sonra uygun bir taşıyıcı ortamla mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilerek; örnekler seri halinde seyreltilir ve pipetle agar yüzeyine yerleştirilir. Dört günlük anaerobik inkübasyondan sonra mutans kolonileri sayılır ve 1 mL tükürükte koloni oluşturan birim sayısı (CFU) sayısı olarak ifade edilir.^{152,31}

Laboratuvar testlerinin, 1980'lerden sonra giderek kullanımı daha kolay olan, MSB içeren dip-slide şeklindeki ticari kitler halinde piyasaya sunulduğu görülmektedir. Bu ticari test kitleri *S. mutans* için, Dentocult SM Strip Mutans, Clinpro Cario L-pop, CRT (Ivoclar Vivadent), CariScreen, Cariescreen SM, Cariocheck (Hain Diagnostika, Nehren, Almanya) ve GC Saliva-Check SM'dir.

2.5.3.2.2 Diş Kliniğinde Uygulanan Yöntemler (Chairside Metodu)

Tükürükteki mutans streptokok seviyesinin belirlenmesi için günümüzde kullanılan en yaygın yöntemler *Strip mutans* testi (*Dentocult-SM*) ve Saliva-Check Mutans (GC Amerika)'dır. Bu testler MS'ların sert dokularda çoğalabilme yeteneklerine dayanır. Dentocult-SM metodunda %20 sukroz içeren, basitrasine kombine edilmiş, seçici mitis salivarius agar kullanılırken; SALIVA-CHECK MUTANS yönteminde oldukça spesifik immünokromatografi işlemi kullanarak tükürükte *S. mutans* tespit edilebilmektedir.^{205, 146}

Her iki yöntemde de üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan çizelgeler ile oluşan koloni yoğunlukları karşılaştırılarak skorlama yapılır. Risk düzeyine göre *S. mutans* sayıları Çizelge 2.4' te gösterilmektedir.

Yüksek düzey	$\geq 10^6$ cfu/ml
Orta düzey	$\geq 10^5$ - $< 10^6$ cfu/ml
Düşük düzey	$< 10^5$ cfu/ml

Çizelge 2.4. Tükürükteki *S.mutans* düzeyleri

2.5.3.3 Plakta Mutans Streptokokların Sayımı

Bu yöntemle, selektif bir besiyerinde çizgi şeklinde hazırlanmış seyreltilmiş plak örnekleri incelenmektedir. Testin uygulanması; steril kürdanlar, Ringer çözeltisi (5 ml), platin lup, Mitis salivarius agarın bulunduğu petriler ve etüv kullanımını gerektirmektedir. Plak örnekleri dişlerin bukkal yüzlerinin gingival üçlüsünden alınarak Ringer çözeltisine yerleştirilir. Örnekler homojenize oluncaya kadar çalkalanır. Plağı içeren solüsyon, besiyerinin bulunduğu petrinin yüzeyinde konumlandırılır. 37°C de 72 saat inkübasyondan sonra meydana gelen koloniler mikroskop kullanılarak kaydedilir.³³¹

2.5.3.4 MS'lerin İzolasyonunda Kullanılan Moleküler Yöntemler

2.5.3.4.1 MS'lerin Tiplendirilmesi

Bakteriyel izolatların tiplendirilmesi, spesifik hastalıklar ile ilişkili belirli suşların ve infeksiyonların çeşitliliğinin saptanması amacıyla yapılmaktadır. Özellikle genotipleme yöntemlerinin, tükürük ve mikrobiyal dental plaktan izole edilen MS'lerin genotipik çeşitliliğini ortaya çıkardıkları bildirilmekte ve bu yöntemlerle bireylerin birden fazla MS genotipi ile kolonize olabileceğinin gösterilmesinin mümkün olduğu belirtilmektedir. Mutans streptokokların tiplendirilmesinde fenotipleme ve genotipleme yöntemleri kullanılabilir. *S. mutans*'in tiplenmesinde kullanılan yöntemler, tekrarlanabilirlik (her tekrarda aynı sonuca ulaşabilme), tiplenebilirlik (her izolat için bir sonuç alınması) ve ayırt edilebilirlik (ilgili olmayan türleri ayırt edebilme) kriterlerine uymalıdır.^{326, 28, 202, 14}

2.5.3.4.1.1 Fenotipleme Yöntemleri

Bakterilerin karakterizasyonunda kullanılan fenotipleme yöntemleri arasında, bakteriyosin tipleme, serotipleme ve biyotipleme yer almaktadır.²⁵⁴

2.5.3.4.1.1.1 Bakteriyosin tipleme

Ağızda bulunan streptokoklar için geliştirilen ilk epidemiyolojik tipleme yöntemi olduğu bildirilmektedir. Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen ve diğer bakterilerin çoğalmasını inhibe eden protein yapısında ajanlar olarak tanımlanmaktadır. Bakteriyosin tipleme, belirli isaretili suşların bakterilerin çoğalması üzerindeki inhibe edici özelliğinin saptanması ve diğer suşlar tarafından tiplendirilen bakteriyosinlere karşı duyarlılığın ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin, mikroorganizmaların anneden bebeğe geçişinin tanımlandığı çalışmalarda ve bakterilerin epidemiyolojik tiplendirilmesi için uygulandığı bildirilmektedir.^{213, 269, 158, 181, 236, 478}

2.5.3.4.1.1.2 Biyotipleme

Shklair ve Keene isimli araştırmacılar, mutans streptokoklarını; fermentasyon, arjinin hidrolizi ve bakteriyosin duyarlılık özelliklerine göre a'dan e'ye kadar beş farklı biyotipe ayırmışlardır. Ayrıca biyotiplerin daha önce tanımlanmış olan serotiplerle uyumlu olduklarını bildirmişlerdir. Bu yöntemlerden başka, hücresel yağ asidi analizi, hücre protein analizi gibi yöntemlerin de biyotiplemede kullanılabileceği bildirilmektedir.²¹⁹

2.5.3.4.1.1.3 Serotipleme

Serotipleme yönteminin, MS'lerin tiplendirilmesinde sıklıkla kullanıldığı ve bu yöntemde sınıflamanın, hücre duvarındaki antijenler esas alınarak gerçekleştirildiği bildirilmektedir. Buna karşın bu yöntemin kolonileri karşılaştırmaya ve farklı bireylerden elde edilen benzer serotipler arasındaki değişikliklerin belirlenmesine izin vermediği belirtilmektedir.³⁰⁶

2.5.3.4.1.2 Genotipleme Yöntemleri

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin, mikroorganizmaların DNA'ları ile ilgili, tekrarlanabilirliği ve ayırt ediciliği yüksek yöntemler oldukları belirtilmektedir. Bu tiplendirme yöntemleri arasında; Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR), Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi: RFLP) gibi yöntemler yer almaktadır. ^{166, 386, 469}

2.5.3.4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Son yıllarda *S. mutans*'ın dental plak ve çürük oluşumu ile olan ilişkisinin belirlenmesinde moleküler genetik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimlerle sentezlenmesi biçiminde tanımlanan in vitro bir yöntemdir. Kolay uygulanabilir olması ve hızlı sonuç vermesi gibi avantajları nedeniyle; kalıtsal hastalıkların teşhisinden, prenatal (doğum öncesi) teşhiste, adli tıpta, klinik örneklerde patojen (hastalık yapabilecek) organizmaların saptanmasında, klonlamada, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (annelik-babalık tayini), gen tanımlaması araştırmaları, doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi gibi tıp alanlarında ve tarım alanındaki çalışmalara kadar birçok farklı alanda kullanılabilir. ^{315, 414, 454}

2.5.3.4.2.1 PCR'ın Temel Bileşenleri

Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleşmesi için uygun bileşenler ve işlem basamaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. ^{382, 454}

2.5.3.4.2.1.1 Kalıp DNA

Polimeraz zincir reaksiyonunda genomik DNA'lar, plazmid ve bakteriyofaj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak

kullanılabilmektedir. Kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA'da kullanılabilmektedir.⁴⁵⁴

2.5.3.4.2.1.2 Primerler

Polimeraz zincir reaksiyonunda birçok uygulanma şeklinde kalıp DNA'ya tamamlayıcı olan ve genellikle 18-20 oligonükleotidden oluşan primerlere gerek duyulmaktadır. Sentetik olarak kolayca hazırlanabilen tek iplikli spesifik DNA segmentlerine primer adı verilir. Primer dizileri, hedef DNA üzerinde tamamlayıcı olan baz dizilimini bularak onlara bağlanır ve 3'-OH (hidroksil) ucundan DNA sentezinin devam etmesinde basamak teşkil ederler. Primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan ya da ticari olarak elde edilebilmektedir.^{353, 454}

2.5.3.4.2.1.3 Polimerazlar

Polimeraz enzimleri, kalıp parçaya tamamlayıcı bir DNA ipliği oluşturmak üzere, orjinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak primer çiftine bir enzim yardımıyla dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) ekleyerek zincirin sentezini gerçekleştirirler. Enzim sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan primer çiftine gerek duymaktadır. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3'-OH ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki oluşturmaları ile fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Termostabil (ısıya dayanıklı) DNA polimeraz enzimlerinden PCR'de en yaygın olarak kullanılan, *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimeraz enzimidir.^{353, 454}

2.5.3.4.2.1.4 Tamponlar Ve MgCl₂

Tamponlar ve MgCl₂, DNA polimeraz enziminin çalışması için gerekmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan çeşitli tamponlar arasında genellikle önerilen PCR tamponununun, -20°C'de saklanan 10-50 mM Tris-HCl olduğu vurgulanmaktadır. Tris amplifikasyon süresince pH'nın 6.8 ile 7.8 arasında olmasını sağlamaktadır. Mg⁺² iyonları,

dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluşturmakta, polimeraz aktivitesini uyarmakta ve çift iplikli DNA'nın denatürasyon derecesini artırmaktadır. Düşük MgCl₂ konsantrasyonu ürün oluşumunda azalmaya; yüksek MgCl₂ konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açabilmektedir.^{353, 454}

2.5.3.4.2.1.5 dNTP Karışımı

Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dNTP, dATP, dGTP, dTTP, dCTP), tek tek ya da dördü karışım halinde ticari olarak sağlanmaktadır. Her deoksiribonükleozid trifosfat konsantrasyonunun eşit olması (20-200mM) ürünün spesifikliği ve doğru sonuç elde edilebilmesi açısından önem teşkil etmektedir. Optimal dNTP konsantrasyonu; MgCl₂ konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün boyuna, PCR döngü sayısına bağlıdır.^{353, 454}

2.5.3.4.2.2 PCR Tipleri

Ağız mikrobiyolojisinde en çok kullanılan PCR çeşitleri arasında; Arbitrarily Primed Polimeraz Zincir Reaksiyonu (AP-PCR), Nested PCR, Multipleks PCR, Real Time (RT) PCR (Gerçek Zamanlı PCR), Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi: RFLP) gibi farklı metodlar bulunmaktadır.

2.5.3.4.2.2.1 Arbitrarily Primed Polimeraz Zincir Reaksiyonu (AP-PCR)

İlk olarak 1990 yılında Welsch ve McClelland tarafından geliştirildiği bildirilen AP-PCR yöntemi, rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (random amplified polymorphic DNA) yöntemi olarak da isimlendirilmektedir. Bu yöntem, DNA'nın birçok bölgesinin, rastgele seçilmiş bir ya da birden fazla primer kullanılarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Kullanılan primerler yaklaşık 9-10 baz çifti uzunluğunda kısa primerler olup bunların bağlanma dereceleri düşüktür. Bu düşük sıcaklıkta seçilen primer kendisi için özgül olan bölgelere bağlanabildiği gibi özgül olmayan bölgelere de bağlanabilmektedir. Günümüzde kullanılan en basit DNA temelli tiplendirme yöntemi

olarak tanımlanan AP-PCR, çeşitli türlerdeki suşların tür içindeki değişik serotiplerin ve serotip içerisindeki çeşitli subtiplerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda, *S. mutans* ve *S. sobrinus* tiplendirilmesinde, geçiş ve kolonizasyon özelliklerinin saptanmasında kullanılabilecek uygun bir metod olduğu bildirilmektedir. Kısa sürede sonuç vermesi ve kolay olması yöntemin avantajları arasında sayılırken; standardizasyonunun sağlanamamış olması yöntemin dezavantajı olarak belirtilmektedir. 488, 88, 251, 385, 437, 38, 454, 469, 166, 259

2.5.3.4.2.2 Nested PCR

Bu yöntemde klasik PCR'dan farklı olarak iki takım amplifikasyon primeri kullanılmaktadır. Bir primer seti ile DNA sekansının birinci amplifikasyonu yapılmakta, ikinci primer seti ile reamplifikasyon sağlanmaktadır. Kullanılan ikinci primer seti diziyeye özgüdür. Tek aşamalı PCR metoduna göre daha duyarlı ve spesifik bir yöntem olduğu belirtilmektedir. Toplam döngü sayısının fazlalığı nedeni ile yüksek oranda hassas olan bu metod dental plaktan mutans streptokoklarının direkt olarak tespit edilebilmesinde de kullanılabilmektedir. Bu yöntemin en büyük avantajının, mutans streptokoklarının izolasyon ve kültür işlemleri gerekmeden direkt olarak tespit edilmesi olduğu; en büyük dezavantajının ise, ilk amplifikasyon aşamasının tamamlanmasından sonra ürünlerin ikinci tüpe transferi sırasında yüksek kontaminasyon riski taşıması olduğu bildirilmektedir. 196, 394, 454

2.5.3.4.2.3 Multipleks PCR

Multipleks PCR, aynı tüpe farklı hedefler için özgül olan iki veya daha fazla primerin beraber konulduğu ve aynı zamanda çok sayıda hedef dizinin amplifiye edildiği bir amplifikasyon reaksiyonu olarak tarif edilmektedir. Bu metod, farklı bakteri türlerinin, aynı zamanda tanımlanmasını sağlamaktadır. Klasik PCR ile aynı basamaklarda gerçekleşmektedir. Verilen hedef bakteriye özgü olan çeşitli primer çiftleri, tek tüplü amplifikasyon reaksiyonunda kullanılmaktadır. 124, 180, 414

2.5.3.4.2.2.4 Real Time (RT) PCR (Gerçek Zamanlı PCR)

Reaksiyon sırasında oluşan ürünlerin sürekli ölçülmesi ile karakterize olduğu belirtilmektedir. Gerçek zamanlı PCR’da DNA, işaretli bir prob yardımıyla üretilmektedir. Bu yöntemde; her bir PCR döngüsünde oluşan floresans ısınımı aracılığı ile son ürün miktarı eşzamanlı olarak saptanabilmektedir. Cihaz boyayı ışık ile yaymakta ve optik sistem ile oluşan floresan miktarını okumaktadır. Gerçek zamanlı PCR kapalı bir sistem içinde gerçekleştiği için, bu yöntemde çok sayıdaki örnekle son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir.^{295, 454}

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

Restriction Fragment Length Polymorphism, kromozomal DNA veya viral ribonikleikasit (RNA)’nın endonükleaz enzimleri ile kesilmesi ve elde edilen farklı büyüklükteki bantların agaroz jel elektroforezi ile görüntülendikten sonra ultraviyole (UV) ışık altında incelenmesi esasına dayanan bir yöntem olarak tanımlanmaktadır. *S. mutans* ve *S. sobrinus*’un tanımlanması için kullanılan yöntemlerden biri olan RFLP, suşlarının besiyerlerinde kültür ve izolasyonu yapıldıktan sonra uygulanmaktadır. İşlemlerin uzun zaman gerektirmesi bu yöntemin dezavantajı olarak bildirilmektedir.^{306, 353, 393, 394, 454}

2.5.3.4.2.3 PCR’in Oluşum Mekanizması

Polimeraz zincir reaksiyonu, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef bölgeye iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanmaktadır. Kalıp DNA molekülü, yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra primerler, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle hibridleşmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu, istenilen süreler için otomatik olarak değişik ısı dereceleri ayarlayabilen "Thermal Cycler" aracılığıyla yapılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu 0.2 veya 0.5 ml’lik steril kapaklı tüplerde yapılmaktadır. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşmektedir. Uygun tampon, DNA polimeraz enzimi ve dNTP varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlamaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu; denatürasyon, primerlerin bağlanması ve

elongasyon (DNA sentezi) olmak üzere üç aşamadan oluşan döngülerin tekrarlanması ile meydana gelmektedir. Her tekrarlama için iki primer arasında kalan hedef DNA'nın iki zincirine ait kopyaları elde edilmektedir. ^{454, 129, 390}

2.5.3.4.2.3.1 Denatürasyon

Polimeraz zincir reaksiyonu için gereken maddeler gerekli konsantrasyonlarda PCR yapılacak tüplere konulduktan sonra Thermal Cycler aletine yerleştirilir. çoğaltılması istenen çift zincirli kalıp DNA, 94-96°C'ye kadar ısıtılarak zincirleri birleştiren hidrojen bağlarının kopması sonucunda birbirinden ayrılmaktadır. Eğer çalışılacak genetik materyal RNA ise önce revers transkriptaz enzimi ile komplementer DNA (cDNA) oluşturulmakta ve daha sonra oluşturulan cDNA primere kalıplık etmektedir. Etkin denatürasyon sıcaklığı ve süresi 92-95°C ve 3-5 dakika olarak belirlenmiştir. ^{390, 276, 454}

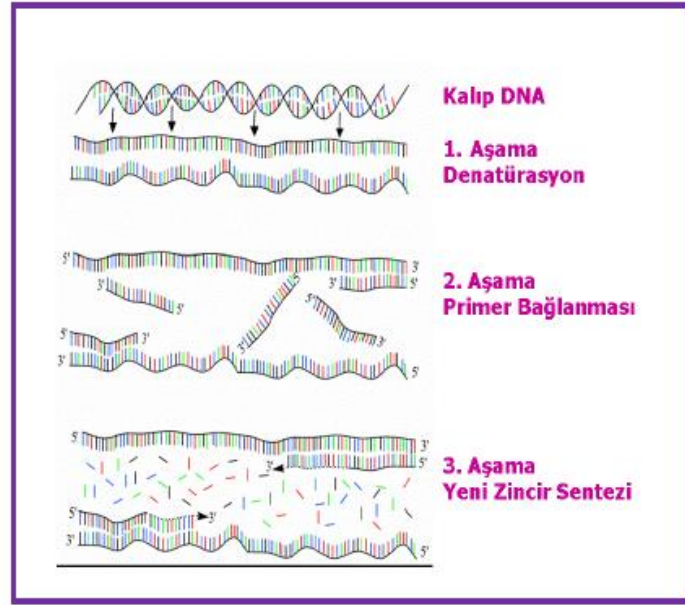
2.5.3.4.2.3.2 Bağlanma (Annealing)

Sıcaklığın düşürülmesi ile, çoğaltılması düşünülen DNA için spesifik primerler kendilerine özgü dizileri tanıyıp bağlanmaktadır. Her primer, örnekteki orijinal DNA sarmalının 3' veya 5' sarmalından birinin tamamlayıcısıdır. Ortam sıcaklığının, primerlerin optimum koşullarda bağlanabildiği sıcaklığa kadar soğutulması ile primerler kendileri için özgül dizileri tanıyarak 5'—> 3' yönünde bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık değeri genellikle 55- 65°C arasında değişmektedir. Bu ısı primerin özelliğine göre değişir. ²⁷⁸

2.5.3.4.2.3.3 Uzama (Elongasyon)

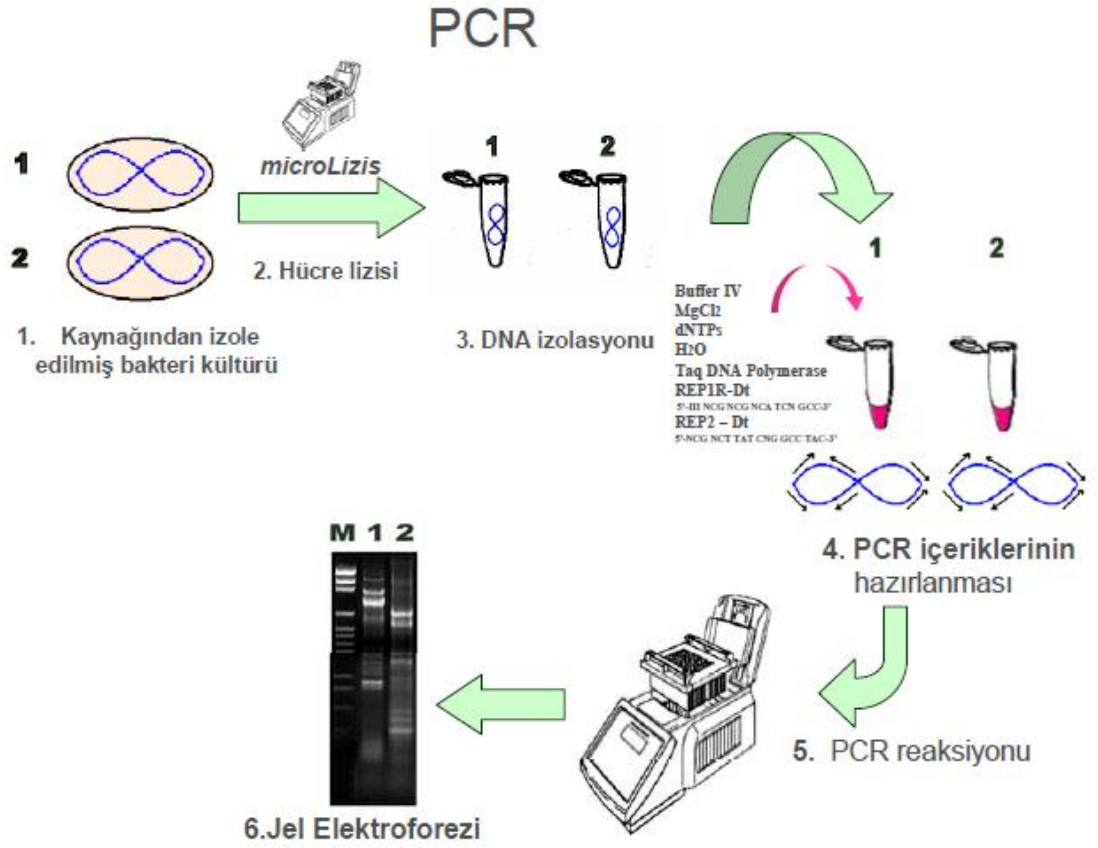
Her primer hibridleştiği tek iplikçiğin karşılığını sentezler. Bu sentezin meydana gelmesi için termostabil özelliği olan ve *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen Taq DNA polimeraz enzimine gereksinim vardır. Ortam sıcaklığı Taq DNA polimerazın çalışabileceği optimum sıcaklık olan 72°C'ye getirildiğinden enzim molekülleri

primerlerin 3' OH uçlarına bağlanarak DNA sentezine başlar. Enzim, primerlerin 3' OH ucuna dNTP'leri ekleyerek her iki zincir üzerinde 5'—>3' yönünde DNA sentezi yapar. DNA sentezi diğer uçtaki primer bölgesine de geçer. Dolayısıyla yeni zincirler ile beraber yeni primer bağlanma bölgeleri oluşturulmaktadır. Bu şekilde hedef DNA kopyaları elde edilmeye devam eder. Uzama aşaması için 2 dakika yeterli olurken tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanması için son PCR döngüsü yaklaşık 10-15 dakika devam ettirilir. Polimeraz zincir reaksiyonu protokolü üç aşamalı bir döngü olarak kabul edilir ve tipik olarak 30-50 siklustan oluşur (Şekil 2.3.).^{278, 390, 381, 454}



Şekil 2.3. PCR aşamaları⁴⁴¹

Tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleri ile DNA parçaları üssel biçimde artmaktadır. Her PCR döngüsü DNA üzerinde istenen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.4.).⁴⁵⁴



Şekil 2.4. PCR reaksiyonunun işleyişi ⁴⁵⁴

Çoğaltılan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görünür hale getirilmektedir. Agaroz jel elektroforezi, elektriksel güç uygulanarak DNA'nın katoddan anoda doğru göç etmesi ilkesine dayalı olan ve DNA'nın moleküler ağırlığının ve/veya saflığının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Varsayılan patojenlerin saptanmasında direkt mikroskop incelemesi, kültür, enzim testleri gibi çeşitli metodlar kullanılabilir. Diğer geleneksel yöntemler ile karşılaştırıldığında, PCR yöntemi ile bakteri suşlarının daha hassas bir şekilde saptanabildiği vurgulanmaktadır. Ayrıca PCR incelemesinin, *S. mutans* ve *S. sobrinus* gibi karyojenik bakterilerin tespitinde ve tanımlanmasında kolaylıkla uygulanabileceği ifade edilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi, yüksek kesinlik ve kısa sürede sonuç elde edilmesi sebebi ile tanımlanan DNA sekanslarının amplifikasyonu yapılarak bakteri ya da virüslerin saptanmasında kullanılabilir. ^{330, 348, 379, 380, 393}

2.6 Laktobasiller

Lactobacillus sınıfındaki mikroorganizmalar, çubuk şeklinde, gram pozitif boyanan, spor oluşturmeyen ve katalaz negatif bakterilerdir ve 2-53°C'de gelişmektedirler. Hafif asidik ortamda hızlı bir şekilde çoğalarak streptokoklardan daha fazla miktarda laktik asit üretir. Yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir. Diş yüzeyine afinitesi olmadığından, çürüğün başlamasından çok ilerlemesinde etkilidir. Laktobasiller sıklıkla, çürük lezyonunun derin bölgelerinde bulunur ve önceden oluşmuş olan bir lezyonun ilerlemesinden sorumludur. Fırsatçı bir mikroorganizmadır, tek başına çürüğe neden olmaz.^{503, 164, 475}

Normal florada sayısı oldukça azdır, ancak lezyon derinleştikçe diğer bakteriler tarafından asiditenin yükseltilmesi sonucu kavitede çoğalmaya başlarlar. Laktobasillerin tamamı, karışık bir fermentasyon reaksiyonu gerçekleştirmektedir. Bu reaksiyon sonucu karbonhidratlar, laktik asit gibi kuvvetli asitlere dönüşmektedir. Laktobasiller metabolik ürünlerine göre "homofermentatif" (laktik asit meydana getirenler) ve "heterofermentatif" (laktik asidin yanı sıra asetik asit ve etil alkol meydana getirenler) olarak sınıflandırılmaktadır.³³¹

Takei ve arkadaşları, 1971'de laktobasillerin oral kavitedeki dağılımını incelemiş ve buldukları yerlere göre yüzdelerini bildirmişlerdir.⁴⁴⁵ Bunun sonucunda, homofermantatif olan *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. plantarum* ve heterofermantatif olan *L. buncheri*, *L. fermenti*, *L. brevis* türlerinin varlığını rapor etmişlerdir. Oral kavitede ve dişlerde en sık görülen türleri *L. casei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. Salivarius*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. cellobiosus*, *L. buchneri* ve *L. brevis* olarak bildirilmiştir. Bunlardan *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus fermentum* karyojenik özellikleri sebebiyle EÇÇ görülen çocuklarda en fazla rastlanan türlerdir. Yang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Ş-EÇÇ'li çocuklarda geleneksel kültür ve moleküler yöntemleri kullanarak *L.vaginalis*, *L. oris*, *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L.rhamnosus* ve *L. casei* olmak üzere yedi değişik türde laktobasil bulmuşlardır.^{285, 496}

Asidofilik ve asidojenik olan laktobasiller ağız florasının %1'den daha azını oluştururlar. Çürüksüz ağızlarda kolonize olmazlar. Kolonize olmak için fissürler ve dolgu yüzeyleri gibi retansiyon yüzeylerine ihtiyaç duyar. Yaygın çürük lezyonları, protez, ortodontik aparey gibi ağızda retansiyon alanları ve ağızdaki karbonhidrat düzeyinin artması ile doğru orantılı olarak sayıları da artar.²²⁷

Diş çürüğü oluşum mekanizmasında Laktobasiller, *S. mutans* ile birlikte çürük gelişiminde kilit rol oynar. Tükürükte bulunan karyojenik bakteri oranı arttıkça diş çürüğü oluşma riskinin arttığı bilinmektedir. İnsanlarda laktobasil türleri, tükürükten, diş yüzeylerinden, sert damaktan, dil dorsumu ve bukkal mukozadan izole edilebilir. Laktobasiller, aktif çürük lezyonu içerisinde ve plak pH'sının düşük olduğu yerlerde çoğalır.^{428, 475}

Fermente olabilen karbonhidratların alımına bağlı olarak plak pH'sının kritik pH'nın altına düştüğü durumlarda mikrobiyal ekoloji değişir ve pH düşüşüne bağlı olarak *S. mutans* ve laktobasiller çoğalarak dengenin demineralizasyon yönüne kaymasına neden olurlar. *S. mutans*'ın, çürük başlangıcından, laktobasillerin dentin çürüklerinden sorumlu oldukları düşünülmektedir. *S. mutans* ve laktobasiller ile çürük görülme sıklığı arasında pozitif bir ilişki olduğu bilinmektedir. İnsanlarda süt dişlenme döneminde karyojenik mikroorganizmaların mevcudiyeti, miktarı ile bu kritik dönemdeki çürük oluşumu ile daimi dişlenme döneminde çürük insidansının ilişkisi içinde olduğunu göstermektedir.^{286, 8}

2.6.1 Laktobasil Sayım Testleri

2.6.1.1 Laboratuvar Testleri

2.6.1.1.1 Tükürükte Laktobasil Sayımı

Tükürükte laktobasil sayımında besiyeri olarak Rogasa SL agar kullanılmaktadır. Rogasa agar asidiktir ve yüksek konsantrasyonlarda asetat ile diğer tuzlarını içerir. Bu besiyerinin yüzey gerilimi düşük olduğundan laktobasiller dışında birçok asidürik bakteri bu besiyerinde üreyebilir. Bir parça parafin çiğnenmesi ile toplanan tükürük, bakterilerin çökmesini önlemek için cam boncuklarla çalkalanır. Tampon solusyonu ile karıştırılan tükürükten laktobasil sayımı için en az 4 petri hazırlanır. Petrilerin birine 1 ml tükürük örneği; ikincisine 1 ml 1/10, üçüncüsüne 1 ml 1/100, dördüncüsüne de 1/1000 seyreltilmiş örnek damlatılır. Petrilerin içine steril edilmiş ve 45°C sıcaklıktaki besiyeri dökülür ve 37°C'de 48-72 saat inkübe edilir. Laktobasil kolonileri petri üzerinde sayılır ve ml'de CFU olarak hesaplanır. Sonuçlar Çizelge 2.5'e göre değerlendirilir.^{332, 31}

Yüksek düzey	$\geq 10^5$ cfu/ml
Orta düzey	$\geq 10^4$ - $< 10^5$ cfu/ml
Düşük düzey	$< 10^4$ cfu/ml

Çizelge 2.5. Tükürükte saptanan laktobasil düzeyleri

Tükürükten laktobasil tayini yapabilen testler arasında Synder testi ve Cariostat testi de sayılabilir.

2.6.1.1.2 Plakta Laktobasil Sayımı

Plaktan laktobasil sayımı fissürler, ara yüzeyler veya düz yüzeylerdeki plaktan örnek alınarak yapılır. Dişler öncelikle hava-su spreyi ile yıkanır. Pamuk tamponlarla izole edilir ve hafifçe hava ile kurutulur. Alınan plak miktarının standart olmasına dikkat edilmelidir. Plak örnekleri özel transport sıvısı içinde laboratuvara ulaştırılır.

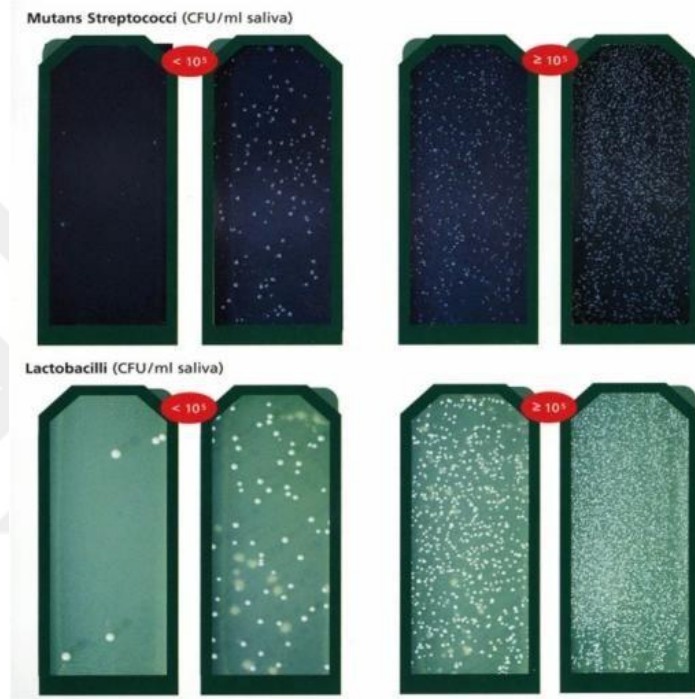
Laktobasil için ise Rogosa SL agar üçe ayrılır ve 10^{-1} , 10^{-2} lik sulandırmadan 50 µl damlatılarak yüzeye yayılır; 37°C de 48 saat mum söndürme kavanozunda bekletilir. Sonuçlar Çizelge 2.5'e göre değerlendirilir. ^{332, 220, 230}

Laktobasil tespiti için piyasaya sürülen ticari kitler Bactotest, CRT bacteria (Ivoclar Vivadent, Schaan/Lihtenştayn) ve Dentocult LB'dir.

2.6.1.2 Diş Kliniğinde Uygulanan Yöntem (Chairside Metodu)

Tükürük laktobasil sayısı Dentocult-LB (Orion Diagnostica, Espoo, Finlandiya) metodunun selektif agarla kaplı plastik aleti kullanılarak hesaplanır. Dentocult LB (Orion Diagnostica, Espoo, Finlandiya) parafin, besiyeri içeren çubuk ve plastik tüp içermektedir. Parafin pelet 1 dk boyunca hasta tarafından çiğnendikten sonra, salgılanan tükürük kitte bulunan kaba tükürülür ve çubuğun iki yüzünün kontamine olması sağlanır. Çubuk tüpün

içine yerleştirilip, sıkıca kapatılır. Tüp 37°C' de 96 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra çubuk üzerinde oluşan koloni yoğunluğu üretici firmaya ait skala ile karşılaştırılır.^{242, 31} CRT bacteria çürük risk testi ise (Ivoclar Vivadent, Schaan/Lihtenştayn), tükürük *S. mutans* ve laktobasillerin sayısını tespit etmek için kullanılan başka bir chairside metoddur (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. CRT ® bacteria (Ivoclar Vivadent, Amherst, N.Y.)

S. mutans ve laktobasillerin yüksek oranları, çürük gelişiminin göstergesi (biyomarker) olarak kabul edilmektedir. Bu bakterilerin tükürükteki düzeyi, plaktaki düzeyiyle pozitif korelasyondadır. Bu gerçek, tükürük testlerinin temelini oluşturmaktadır. Aynı zamanda *S. mutans* ve laktobasil düzeyi çürük duyarlılığı ile ilişkilidir.^{342, 81, 126, 459}

Birçok çalışmada, mutans streptokok ve laktobasil sayıları çürük tespitinde ve çürüğün açıklanmasında kullanılmıştır. Uygulanış kolaylığından dolayı oral mikroorganizma tespitinde uyarılmış tükürük örneklerinden faydalanılmaktadır.^{316, 438}

Çürük prevalansı ile *S. mutans* ve laktobasil düzeyi arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirilmektedir. Tükürüğün mililitresinde 10⁶'nın üzerinde *S. mutans* sayısı ile

10⁵'in üzerinde laktobasil sayısı çürüğe sebep olabilecek infeksiyon riski olarak değerlendirilmektedir. Bu durumdaki kişiler diş çürüğüne duyarlı olarak kabul edilmekte ve bu bireyler için koruyucu önlemler alınması gerekmektedir.^{9, 27}

2.7 Diş Çürüğünden Korunma Yöntemleri

Çürükten korunma yöntemleri; çürük başlangıçlarını önlemeyi, klinik olarak görülen ve görülmeyen çürük lezyonlarının ilerleyişini engellemeyi, bu lezyonları tedavi etmeyi, dişlere optimum flor temasını sağlamayı, ebeveynlerin iyi oral hijyene sahip olmasını sağlamayı, karyojenik olmayan tatlandırıcıların kullanılması gibi diyet uygulamaları konusunda ebeveynlerin eğitilmelerini kapsamaktadır.¹³³

Diş çürüğünün kontrol altına alınmasında; ilk basamak oluşmuş aktif çürük lezyonlarının durdurulması veya yavaşlatılması olmalıdır. İyi bir oral hijyen sağlanması ile dental plağın azaltılması, florlu topikal ajanların uygulanması karyojenik besin tüketiminin azaltılmaya çalışılması, kontrolü sağlamadaki yaklaşımlar olmalıdır.^{300, 339}

American Academy of Pediatric Dentistry'nin yayınladığı rehber kitapçıklarına göre; EÇÇ ve Ş-EÇÇ tablosu gelişmemesi için, bebeğin süt dişlerinin çıkmaya başladığı dönem olan 6-12 aylık dönemde ilk diş hekimi ziyareti yapılmalı ve bu ziyarette ebeveyn ile doğru ağız-diş bakımı hakkında konuşularak, ebeveyne bebeğinin ağız bakımı ile ilgili bilgilerin verilmesi gereklidir.²²

Oral hijyen kriterlerinin etkinliği çocuğun bakımından sorumlu kişilerin özen ve dikkatlerine bağlıdır. Çocuklarda arzu edilen oral hijyen uygulamalarının yerine getirilebilmesi için öncelikle annelerini eğitmek gerekmektedir. Annenin sadece karyojenik bakteri rezervuarı olmadığı, çocuğun genel sağlığına gösterilen ilgisi kadar onun dental bilgisi ve tutumunun da çürük riskini azaltmak için önemli faktörlerden birini teşkil etmekte olduğu belirtilmektedir.^{472, 337, 398}

Anne-babanın ya da kardeşlerin mutans streptokok seviyesi ve karyojenik bakterilerin bebeğe geçişinin azaltılabilmesi sağlanmalıdır. Şeker içerikli sıvıların ve besinlerin sık tüketiminden uzak durulmalıdır.²²

Ortamda şeker bileşenleri bulunmadığında çürük oluşmadığından çoğu araştırma ve profesyonel tavsiye; çocukların diyetlerini ve beslenme alışkanlıklarını, ebeveynlerinin eğitimi yoluyla değiştirmeye odaklanmıştır. Sukroz gibi fermente edilebilen

karbonhidratlar yerine xylitol gibi non-karyojenik tatlandırıcılar çürük miktarının azaltılmasında kullanılabilirler. Xylitollu sakız ya da şekerin günde birkaç kez tüketilmesinin, daimi dişlerin çürüklerden korunmasındaki etkinliği %30-60 arasında arttırdığı ifade edilmektedir. ^{200, 374, 297, 472, 421}

Mikroorganizma geçişine neden olabilecek tükürük paylaşımlı davranışlardan kaçınılmalıdır. Biberon içerisinde şeker eklenmiş süt, meyve suları gibi besinlerin verilmesinin önüne geçilmeli, bu içeceklerin özellikle bebek uyurken verilmesi engellenmeli, biberon kullanımı 12-18 ay arası bir dönemde bırakılmaya çalışılmalıdır. Çocuğun dişlerinin ebeveyn tarafından, süt dişleri sürmeye başladığı anda mutlaka günde iki kez yaşına uygun miktarda florlu diş macunu kullanılarak yumuşak bir diş fırçası ile fırçalanması önerilmektedir. İki yaşa kadar pirinç tanesi ya da sürüntü şeklinde önerilen diş macunu miktarı; 2-6 yaş arası çocuklarda yarım bezelye büyüklüğünde olmalıdır. ²²

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda; flor içeren diş macunlarının en uygun maliyetli korunma yöntemi olduğu gösterilmiştir. Küçük çocuklar genellikle diş macununun %30'unu yutarlar. Bu yüzden kullanılan diş macunu miktarının bir bezelye tanesi ya da daha azıyla sınırlandırılması önerilmektedir (Çizelge 2.6.). Flor uygulaması yapılmayan durumlarla karşılaştırıldığında, çürük miktarı; florlu diş macunlarının kullanımı, gargaralar ve kliniklerde topikal olarak uygulanan flor tedavileri ile %30-70 oranında azalmıştır. ^{472, 406, 133, 160}

Yaş Grubu	Flor Konsantrasyonu	Günlük Kullanım	Günlük Kullanım Miktarı
6 ay-2 yaş	500 ppm	Sabah kahvaltıdan sonra ve akşam yatmadan önce 2 kez	Sürüntü şeklinde
2-6 yaş arası	1000 + ppm	Sabah kahvaltıdan sonra ve akşam yatmadan önce 2 kez	Yarım bezelye büyüklüğünde
6 yaş ve üstü	1450 ppm	Sabah kahvaltıdan sonra ve akşam yatmadan önce 2 kez	Bezelye büyüklüğünde

Çizelge 2.6. Yaş gruplarına göre diş macunlarındaki flor konsantrasyonları ve günlük kullanım miktarları ²¹

Okul öncesi dönemde dişlerini fırçalarken çocuğun yanında bulunulması veya çocukların diş fırçalamasının ebeveyn tarafından yapılması özellikle önerilmektedir. Ebeveyn fırçalamayı özellikle okluzal yüzeylerdeki fırçalama etkinliğine daha fazla özen göstererek yapmalıdır. Çocuğun macunu yutmaması, tükürmeyi öğrenmesi konusunda da teşvik edilmesi gereklidir. Gece tükürük akışının azaldığı dönemde ağız içinin temizliği sağlanmalı, gece yatmadan önce dişler mutlaka fırçalanmalıdır. Diğer zamanlarda alışkanlığa bağlı olarak fırçalama; sabah kalkınca, kahvaltıdan önce ya da kahvaltıdan sonra olacak şekilde planlanmalıdır. Çocuğun süt dişlenme dönemindeki bu yaşlarında posterior dişlerinin kontakları çok sıkı ve diastemalar yoksa; yine ebeveynin diş ipi ile ara yüzleri temizlemesi tavsiye edilmektedir. Ayrıca EÇÇ riski olan çocuklara risk durumuna göre belli aralıklarla profesyonel flor vernik uygulanmalıdır. ^{22, 224, 59, 106}

Erken çocukluk çağı çürüğü tablosu varlığında da mutlaka çocuğun beslenme alışkanlığı düzenlenmeli, flor veya CPP-ACP ajanları uygulanmalı, gerekli ise restorasyonlar ve ileri aşamalarda ise diş çekimleri yapılmalıdır. Diş çekimlerini takiben de çekim yapılmış bölgeye komşu dişlerin devrilmelerini ve karşıt dişlerin uzamasını engellemek, alttan gelecek olan daimi dişin yerini korumak için hasta uyumu ve eksik diş

sayısına göre sabit ya da hareketli yer tutucu yapılması koruyucu bir uygulama olarak gereklidir.⁶⁹

Oral hijyen eğitimi ve motivasyonu; çocuklar için okul bazlı çürük önleme programlarında ilk basamağı oluşturmaktadır. Biyofilmin etkin uzaklaştırılması, dişin pit ve fissürlerinde dental plak kalmaması yeni çürük oluşumunu engellemede ve oluşmuş olan çürüğün ilerlemesini önlemede kritik rol oynamaktadır. Dijkmann ve arkadaşları çalışmalarında, florlu diş macunu ile günde iki kez diş fırçalama yapılmasının mineral kaybını %90 önlediği göstermişlerdir. Bu durum hem florun oluşturduğu topikal etki hem de fırçalamanın sağladığı mekanik temizlik ile ilişkilendirilebilir. Flor preparatı temel olarak ağız içinde gösterdiği topikal etki ile, doğru yerde, doğru zamanda, doğru miktarda kullanılarak demineralizasyon, remineralizasyon sürecine dönüştürülebilir.^{339, 109, 122}

2.8 Flor Uygulamaları

Doğada bulunan çeşitli elementlerin mine yapısına katılarak dokunun organik ve inorganik yapısını etkilediği bilinmektedir. İnsan metabolizması için gerekli eser elementlerden biri olan florun, çocuk ve erişkinlerdeki çürük önleyici etkinliği kanıtlanmıştır.^{240, 107}

Florun diş hekimliğinde topikal ve sistemik olmak üzere iki uygulama şekli bulunmaktadır. Tuz ve sütün florlanması, içme suyunun florlanması, flor tabletleri sistemik uygulamalara örnektir. Topikal florür uygulamaları içerisinde ise; jeller, profilaksi patları, vernikler, köpükler, flor içeren solüsyonlar, kontrollü flor salınımı yapan sistemler ve dental materyaller, florürlü gargaralar, diş macunları ve diş ipleri yer almaktadır.^{245, 87, 482}

Diş çürüğünü önleme özelliği olan flor etkisini birkaç yolla gösterir. Tükürük ve plakta konsantre olmuş flor minenin demineralizasyonunu önler. Demineralize mine tarafından kalsiyum ve fosfatla birlikte alınan flor mine kristal yapısının bakteriyel asit üretimine karşı daha dirençli olmasını sağlar. Topikal flor uygulamaları sonrası oluşan kalsiyum florür (CaF_2) hızla tükürüğe geçer ve ortamda fosfat varlığında CaF_2 tekrar florapatit olarak çökerek remineralizasyon sağlamaktadır. Florun bakteriyel metabolizmayı inhibe ederek asit üretimini ve bakteriyel polisakkarid yapımını önlediği gösterilmiştir. Uzun yıllar sistemik olarak alınan florun, gelişmekte olan mineyi güçlendirerek, çürüğü inhibe edici bir etki sağladığına inanılmaktaydı; fakat Thylstrup

sistemik olarak alınan florun diş çürüğünü önlemedeki etkisinin sanılandan çok daha az olduğunu göstermiştir. ^{134, 460, 51, 167}

2.8.1 Uzun Süreli Salınım Yapan Ajanlar (Dental Vernikler)

Topikal olarak uygulanan florlu bileşiklerin mine yüzeyinde CaF_2 birikimi yaptığı bilinmektedir. Flor içeren topikal jel ve solüsyonların uygulanmasının ardından ilk 24 saat içerisinde uygulanan florun büyük bir kısmının kaybedilmesi araştırmacıları mine yüzeyinde daha uzun süre dişle temas halinde kalabilecek yöntemlere yöneltmiştir. Flor verniği, doğal ya da sentetik bazlı, flor tuzlarının etanol gibi bir solventin içinde çözüldüğü bir lak ya da likit olarak tanımlanabilir. Florlu vernikler daha uzun süre diş yüzeyinde kalmakta ve ağız ortamına yavaş bir şekilde flor salmaktadır. Mine yüzeyine tutunan flor miktarı artmakta, florlanmış hidrosiapatit oluşumunu sağlayarak minenin asitler karşısındaki direncini artırmaktadır. Florlu vernik uygulamalarından sonra, minenin kristal yapısına florapatit bağlanır ve CaF_2 mine yüzeyine çöker. Topikal flor uygulamaları sonrası oluşan CaF_2 hızla tükürüğe geçer ve ortamda fosfat varlığında CaF_2 tekrar florapatit olarak çökelerek remineralizasyon sağlamaktadır. ^{51, 179, 190}

Flor vernikleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldığı zaman yutulma ile oluşacak toksik etki çok düşük olacağından küçük çocuklarda da güvenle kullanılabilir. Erken çocukluk çürüğü olan çocuklar, engelli bireyler gibi yüksek çürük risk grubundaki bireylerde, flor cilaları sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda verniklerin, 2 yıl düzenli uygulandıklarında çürük sıklığını %38 oranında azalttığı bildirilmektedir. Profesyonel olarak uygulanan flor tedavileri için en yaygın kullanılan maddeler, %5 sodyum flor vernik (NaFV ; 22.500 ppm F) ve %1.23 asidüle fosfat florürdür (APF; 12.300 ppm F). Flor verniğinin süt dişlerinde yılda en az iki kez kullanıldığında etkinliği en az dört randomize kontrollü çalışmada bildirilmiştir. ^{51, 123, 474, 87, 85, 29, 485, 418, 65, 457, 25}

Flor verniklerinin çürük önleyici etkileri sebebiyle belirli aralıklarla uygulanmaları gerekmektedir. Yüksek çürük riski olan hastalarda 3-6 aylık periyodlarla kullanımı, orta dereceli risk gruplarında ise, yıllık kullanımı önerilmektedir. Yılda dört uygulamayı tavsiye eden klinik deneyler geniş bir çürük önleyici etkinlik elde etmişlerdir. ^{356, 51}

Flor vernikleri, kök çürüklerinde, hassasiyeti olan dişlerde ve kavite lakı olarak da kullanılmaktadır. Flor vernikleri aynı zamanda klorheksidinle kombine olarak kullanılmış ve flor verniklerinin olumlu etkileri artırılmaya çalışılmıştır. ^{51, 190, 474}

2.8.2 Uzun Süreli Salınım Yapan Ajanların Etki Mekanizması

Uzun süreli salınım yapan ajanlar ağız dokularına sıklıkla iyonik, van der Waals bağları, hidrofobik ya da kovalent bağlar gibi spesifik olmayan bağlarla bağlanmaktadır. Kimyasal ajanlar uygulandıktan sonra ağız içindeki tutunumları, oral yüzeylere bağlanma yeteneklerine, doz, konsantrasyon, tükürük ve dişeti oluğu sıvısı akış hızlarına, kontakt zamanına ve uygulanma sıklığına bağlıdır. Ajanın salınması tükürükteki kalsiyum değerlerine, pH, tükürük akış hızı ve ayrılma oranına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Diş çürüğünü önlenmesi için yapılan çalışmalarda genellikle uzun süreli salınım yapan ajanlar üzerinde durulmuştur. Kimyasal ajanlar dental plak oluşumunu bir ya da birkaç mekanizmayla beraber engellemektedir. ^{401, 127, 476, 402, 427}

1. Mikrobiyal kolonizasyonun engellenmesi
2. Bakteri üremesinin ve metabolizmasının engellenmesi
3. Olgun biyofilmin parçalanması
4. Plak biyokimyasının ve ekolojisinin modifikasyonu

2.8.2.1 Mikrobiyal Kolonizasyonun Engellenmesi

Anti plak etkiler, diş yüzeylerine mikrobiyal yapışmayı engelleyerek ortaya çıkarılabilir. Diş yüzeylerinin, pelikül ve/veya mikroorganizmaların yüzey özellikleri çeşitli yöntemlerle modifiye edilerek mikrobiyal yapışma önlenmeye çalışılmıştır. In vitro çalışmalarda serbest yüzey enerjisinin düşürülmesinin mikrobiyal yapışmaya azalttığı gösterilmiştir. Antimikrobiyal ajanlardan klorheksidin, setilpiridinium klorid, aminflorid ve sodyumdodesilsulfat yüzey özelliklerini değiştirerek mikrobiyal kolonizasyonu önlemektedir. Birçok antimikrobiyal ajanın minimal konsantrasyonları yüzey adezinlerini etkileyerek mikrobiyal yapışmayı engellemektedir. Diş çürüğü profilaksisinde kullanılan

yüzey özelliklerini değiştiren bu ajanların klinik etkilerinin araştırılması için birçok çalışmaya gereksinim vardır. ^{401, 402, 427}

2.8.2.2 Bakteri Üremesinin Ve Metabolizmasının Engellenmesi

Günümüzde kullanılan antiplak ajanlarının çoğu geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlar olup bakterisid ya da bakteriyostatik etkilere sahiptir. Bu ajanlar, non-spesifik plak teorisine göre, plak birikimini ya da metabolizmasını önlemek ya da sınırlamak amacıyla kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların membranına bağlanmakta ve transport gibi normal hücre zarı fonksiyonlarını engellemektedir. Bu durum mikrobiyal metabolizmaya zarar vermekte ve mikroorganizmalar üzerinde bakterisidal bir etki oluşturmaktadır. Mikrobiyal membrana yapışma aynı zamanda geçirgenliği değiştirmekte, protein denaturasyonu ya da sitoplazmadakilerin pıhtılaşmasıyla birlikte hücre içi komponentlerin sızıntısına neden olmaktadır. ^{401, 402, 427}

2.8.2.3 Olgun Biyofilmin Parçalanması

Olgun biyofilmin parçalanması için kimyasal ajanın biyofilm içine difüzyonu önemli bir sorundur. Dental biyofilm oluşumunda glukonların sentezi önemli yer tutmaktadır. Organize olmuş plağı parçalamak için dextranaz ve mutanaz gibi enzimlerin hidrolitik aktivitesiyle, glukonun α 1,6 ve α 1,3 glukosidik bağları kırılmaktadır. Böylece plak oluşumu da önlenmektedir. Mesela; glukoziltransferaz enziminin zarar görmesi, bakterilerin zayıf adezyonuna neden olmaktadır. Glukoziltransferaz glukon oluşumundan sorumlu olan enzimdir. ^{401, 402, 427}

2.8.2.4 Plak Biyokimyasının Ve Ekolojisinin Modifikasyonu

Teorik olarak, plak mikroorganizmalarının metabolik aktivitesini azaltan ya da değiştiren kimyasal ajanlar dış çürüğünü önleyebilmektedir. Bir yaklaşım da potansiyel patojenik mikrobiyal neslin genetik olarak değiştirilerek daha az virulan duruma getirilmesidir. ^{401, 402, 427}

2.8.3 Oral Bakteriler Tarafından Flor Alımı

Florun oral bakterilerin enerji ve biyosentez metabolizmasına direkt ve indirekt etkisi üzerine birçok çalışmalar yapılmıştır. Florlu besiyerlerinde üretilen oral bakterilerinin flor depoladığı bulunmuştur. Bakterilerde biriken flor, dental plaktaki florun yüksek konsantrasyonlu olmasını ve buna bağlı olarak da florun plak metabolizmasını inhibe ederek kariyostatik etki göstermesini sağlamaktadır. ^{60, 167, 138}

Bakteriler tarafından flor alımı, ortamda baskın olarak bulunan mikroflora yapısına bağlı olarak; solüsyondaki flor iyonunun formuna, çeşitli plak bakterilerinin içeriğine ve fizyolojik durumlarına göre farklılık gösterir. Ayrıca, plak pH'sı bakterilerin flor alımını etkileyen en önemli etmenlerden birisidir. ¹⁶⁸

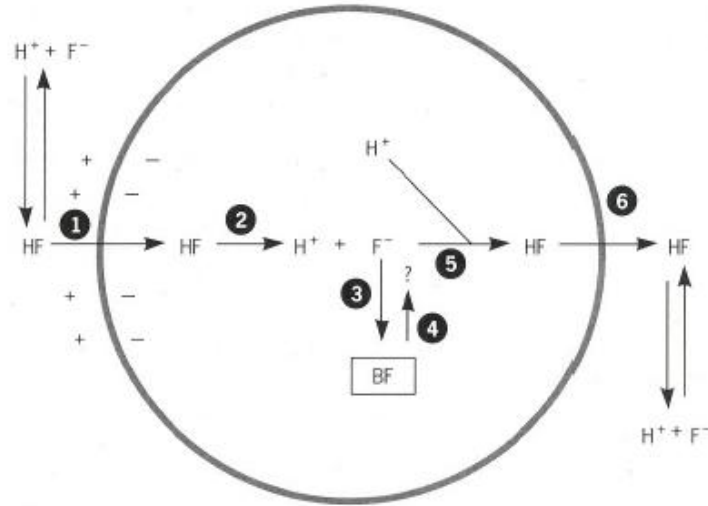
Tükürük akış hızı ve tamponlama kapasitesi, bireydeki çürük diş sayısı, diyetteki karbonhidrat içeriği de flor aktivitesi üzerine etkili olan diğer etkenlerdir. Flor bakteri hücrelerinde pH değerine bağlı olarak etki gösterir. Farklı çalışmalarda, bakterilerin flor alımının; ortamda bir enerji kaynağı yokken, buna karşılık metabolik inhibitörler varlığında, farklı sıcaklıklarda, aerobik ve anaerobik şartlarda oluştuğunu ve Ca^{+2} ile stimüle edildiği gösterilmiştir. ¹⁷²

Antibakteriyel etkinin görülebilmesi için florun hücre yapısına girmesini sağlamak gerekmektedir. Hücrelerin flor alımı; enerji kaynağının yokluğunda, metabolik inhibitörlerin varlığında ve farklı sıcaklıklarda oluşur. Plak pH'sı değişken olmakla birlikte, ortamda bulunan florun büyük bir çoğunluğu F^- formundadır ve flor bu formdayken plağa yapışır. Plak pH'sı 5'in üzerinde olduğu zaman serbest florun %98'den fazlası iyonize olurken % 1.4'ü Hidroflorik asit (HF) olarak kalır. Plak pH'sı 4 iken florun %12'si Hidroflorik asit formundadır ve plak pH'sı düştükçe bu değer artar. Flor hücre içine HF şeklinde girer (Şekil 2.6, reaksiyon 1). Düşük dış ortam pH'sında daha çok HF oluşumu ve hücre içine HF girişi artar. ^{167, 168}

Bakteri hücrelerine flor girişi, hücre içi pH ile dış ortam pH'sı arasındaki fark olan pH gradyanı (Δ pH) ile sağlanır. Hücrede pH gradyanının artmasıyla paralel olarak artan hücre içi flor birikimi, ilk kez Borei tarafından belirtilmiştir. Hidroflorik asit hücre içinde alkalin ortam sebebiyle H^+ ve F^- moleküllerine ayrılır (Şekil 2.6, reaksiyon 2). Hidroflorik asit alımı iç ve dış ortamda HF konsantrasyonu eşit olana kadar sürer. Hidroflorik asitin H^+ ve F^- moleküllerine ayrılması, hücre fizyolojisinde iki önemli etkiye sebep olur. Bunlardan birincisi; F^- ayrışması, flora karşı duyarlı enzimler dahil olmak üzere farklı hücresel

yapıları etkileyerek enzim aktivitesinde inhibisyona neden olur (Şekil 2.6 reaksiyon 3). İkinci etki H^+ salınımı ile sitoplazmada asidik ortamın oluşmasıdır. Hidroflorik asit alımı ile hücre pH'nın düşmesi, bakteri üremesi için gerekli birçok enzim aktivitesini olumsuz yönde etkiler. ^{167, 168}

Sitoplazmanın asidikleşmesi, florun bakteri üremesi ve metabolizmasını inhibe etmesinde önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir. Sonuç olarak ağız bakterilerinin asit ortama dayanıklılığı da çürük yapıcı özellikleri de azalır. Özetle; karbonhidrat metabolizması sırasında ortam pH'sı 7 ile 5 arasında sınırlı kalırsa, flor dental plak tarafından HF olarak alınır ve daha alkali olan sitoplazma içerisinde H^+ ve F^- iyonlarına ayrışır. Protonlar sitoplazmada asidik ortam oluşturarak ΔpH 'yı düşürürler ve florun hücre işleyişini engelleyebilmesi için gerekli ortamı yaratırlar. ¹⁶⁸



Şekil 2.6. Bakteri hücreindeki flor birikimi, dağılımı ve salımı ²⁶

1. Florun hücreye HF olarak girmesi
2. HF'nin alkalen ortama girişi ve H^+ ve F^- olarak ayrışması
3. Hücre içinde sıkı bağlı F
4. Hücre içinde gevşek bağlanan F
5. Sitoplazmanın asitleşmesi ve HF miktarının artması
6. Artan HF'nin hücre dışına salımı

2.8.4 Florun Metabolik Etkileri

Florun antimikrobiyal etkisi, bakterilerin karbonhidrat metabolizmasını inhibe etmesiyle gerçekleşir. Şekil 2.7' de oral bakterilerin karbonhidrat metabolizmasında rol oynayan reaksiyonlar gösterilmektedir. Bakterilerin karbonhidrat metabolizması için en çok kullandıkları yol glikolizdir (Şekil 2.7, reaksiyon 4). Flor bakteri hücrelerinde, glikoliz için gerekli 2-P-gliserat (2PGA)'yı P-enol piruvat (PEP)'a çeviren bir metalloenzim olan enolazı inaktive eder. Enolaz aktivasyonu için Mg^{+2} iyonuna gereksinim vardır. Florun Mg^{+2} ile birleşmesi, Mg^{+2} iyonunun katalizör görevi görememesine ve böylece enzim aktivitesinin inhibe edilmesine sebep olur. *S. salivarius* ve *S. mutans* hücreleri pH 7.2'de glukoz metabolize ederken ortama 2.4 mM flor eklenmesiyle 2PGA'nın intrasellüler konsantrasyonunda hızlı bir yükseliş, PEP de ise düşüş gözlemlenmiştir. Ortama flor ilave edilmesi, hücre devamlılığının sağlanması ve üremede anahtar görevi gören ana metabolit ATP yapımını da önemli derecede azaltır. Hücresel enzimler genellikle çok değişken olmayan pH değerlerinde fonksiyon görürler. Sitoplazmanın asidik olması bakterinin üreme ve metabolizması için gerekli olan metabolik aktivitesini azaltır. ^{167, 168}

Glikojen sentezinde yer alan enzimler flora karşı hassas değildir. Bu nedenle flor varlığında glikojen sentezinin (IPS) engellenmesi Glukoz-6-fosfat'ın (glukoz-6-P) kullanılmaması nedeniyle gerçekleşir (Şekil 2.7, reaksiyon 3). ²³⁹

Florun oral bakteriler üzerine biyolojik etkileri Çizelge 2.7'de özetlenmiştir. Bakterilerdeki H⁺/ATPaz enzimi, *S. mutans* gibi asidürik ve asidojenik oral bakterilerin düşük pH değerlerinde karbonhidrat metabolizmasını devam ettirmeleri ve asidik ortamda üremeleri için gereklidir. ²³⁹

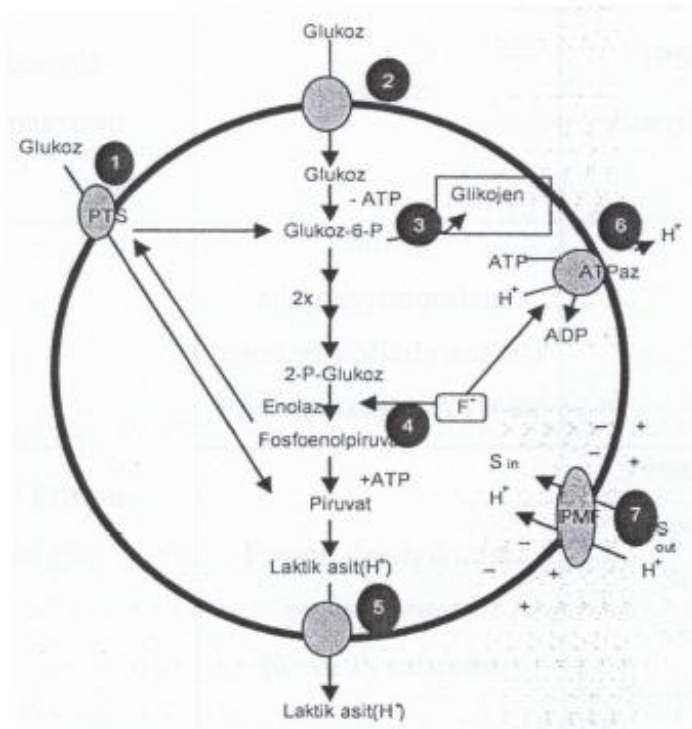
Flor ağız bakterilerinde H⁺/ATPaz enzimini inhibe ederek hücresel pH dengesini bozar. Bu etki florun önemli antimikrobiyal etkilerinden birisidir. İnhibisyon düşük flor konsantrasyonlarında reversibl olmakla birlikte yüksek florid irreversibldir. ¹⁶⁸

Flor birçok pH değerinde hücrenin pH gradyanlarını bozar. Böylece proton motive edici gücü (PMF) etkileyerek bu enerjiyle gerçekleşen tüm metabolik faaliyetleri engeller. Bakteri üremesinin inhibe edilmesi için yüksek konsantrasyonlu flora gereksinim olduğu bildirilmiştir. Örneğin, *A. viscosus* hücrelerinde üremenin %50'sinin inhibisyonu için 200 pmm flora gereksinim olduğu belirtilmiştir. ^{168, 502}

Nassar ve arkadaşlarının in vitro olarak yaptıkları güncel bir çalışmada 100 ppm flor varlığında *S. mutans*'ın EPS üretiminin azaldığı, 225 ppm'de biyofilm oluşumunun

neredeyse gerçekleşmediği, daha yüksek konsantrasyonlarda ise *S. mutans* büyümesini inhbe ettiği ve flora bağlı gelişen dirence bağlı olarak bu değerlerin değişebileceği bildirilmiştir. ³²⁸

Oral bakteriler, diyet karbonhidratı fazla olduğunda intrasellüler (IPS) ve ekstrasellüler polisakkarid (EPS) sentezi yaparlar. Intrasellüler polisakkarid, glikojene benzer yapıda olup, bakteriler tarafından dış kaynaklı enerji kaynağı olmadığı zaman kullanılır. Flor, IPS yapımı üzerine etkiyi glukoz-6-P oluşumunu engelleyerek sağlar. ^{167, 168}



Şekil 2.7. Asidojenik oral bakterilerin karbonhidrat metabolizmalarında yer alan reaksiyonlar ²⁶

- 1.PEP-fosfotransferaz sistemiyle şeker transportu
- 2.ATP'ye bağlı şeker transport sistemi
- 3.Glikojen sistemi
- 4.Enolaz
- 5.Laktik asit çıkışı
- 6.Proton çıkarıcı ATPaz ($H^+/ATPaz$)
- 7.Proton motive edici güç (PMF)

Parametreler	Spesifik etki	
	Direkt	İndirekt
Hücresele düzeyde glikoliz formasyonu	Enolaz	PTS sistemi, İPS formasyonu, Enerji metabolizması ve üreme
Transmembran gradyanları/proton motive edici güç	Fluorid adaptasyonundan sonra glikolizde azalma	
	Proton çıkarıcı ATP-az	Proton gradyanının parçalanması Sitoplazmanın asidifikasyonu Proton motive edici gücün parçalanması
Makromoleküler sentez	Lipoteikoik asit	
	Peptidoglikan	
Hücresele düzeyde ve dental plakta enzimler	Asit fosfataz Pirofosfataz Pirofosforilaz Peroksidaz Katalaz	
Dental plakta kolonizasyon	Apatite yapışma Apatitten ayrılma	
Bakteriyel rekabet	Bakteri suşları için toksik pH düşüşünde azalma	Dental plakta pH farklılıklarına karşı korunma

PTS= Fosfotransferaz Transport Sistemi İPS= İntrasellüler Polisakkarit

Çizelge 2.7. Florun ağız bakterileri üzerine biyolojik etkileri ²⁶

2.8.4.1 Florun Ağız Mikroorganizmaları Üzerine Etkisi

Florun, bakteri hücrelerine direkt veya indirekt etkileri vardır. Bunlardan bazıları özellikle dental plaktaki asidojenik (asit üreten) bakterileri etkileyen önemli etkilerdir. Farklı bakteri suşlarının flora karşı gösterdikleri duyarlılık da farklıdır. *S. mutans* flora karşı laktobasillere oranla daha fazla duyarlılık gösterir. Ortamda gerekli iyonların bulunması ve pH, florun üremeyi inhibe etmesini etkileyen önemli parametrelerdir. Birçok ağız bakterisi flor konsantrasyonundaki artışa uyum sağlayarak üremeye devam eder. Bu adaptasyon birçok çalışma ile de gösterilmiştir. Bakterilerdeki doğal bağışıklık ve fenotipik adaptasyon özelliği, plakta bulunan birçok mikroorganizmanın in vivo olarak yüksek konsantrasyonlu flor uygulamasına karşın üremeye devam etmesine olanak sağlar. Bununla beraber florlu ortama adapte olan bakterilerin asit üretme yeteneği azalır. Bu durum pH artışına sebep olarak minenin sürekliliğinin korunmasına ve asidürik bakterilerin karbonhidrat metabolizmasının etkilenmesine neden olur. ^{167, 168, 453, 60}

Flora direnç gösteren *S. mutans*'larla ilgili çalışmalarda, flora karşı direnci değişmiş suşların ana *S. mutans* suşuna göre daha az asidojenik ve farelerde daha az karyojenik olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda en az %0.1'lik flor içeren (52.6mM) diş macunu kullanımı sonucu alınan plak örneklerinde asit yapıcı etkinin azaldığı gözlenmiştir. Bununla beraber flor adaptasyonunun dental plağının asidojenitesinde azalmaya neden olduğu ve florun antibakteriyel ve antikaryojenik etkisini değiştirmediğini gösterilmiştir. ^{169, 270, 121}

Florun antimikrobiyal etki göstermesi için öncelikle hücre içerisine girmesi gerekir. Hücre içerisine girdikten sonra florun büyük bir kısmı hücre içerisindeki çeşitli yapılara bağlanır. Florun, enolaz ve proton açığa çıkaran ATP-az enzimlerine bağlanması sonucunda, asidojenik ağız bakterilerinin karbonhidrat metabolizması ve şeker alımı etkin bir şekilde inhibe edilir. Florun asit üretimini inhibe etmesi dental plakta bulunan bakterilerin karyojenitesini de azaltması bakımından önem taşımaktadır. ¹⁶⁷

2.8.4.2 Florun Biyofilm Üzerine Etkileri

2.8.4.2.1 Florun Biyofilm Oluşumunun İlk Aşaması (Hücre Yapışması) Üzerine Etkileri

In vivo koşullarda florun ilk yapışmayı tükürük makromoleküllerinin birikimini değiştirerek önleyebileceği bildirilmektedir. *S. mutans*'ların mineye tutunmasında florun etkisinin ekstrasellüler polisakkarit üretimine bağlı olmadığı, mine yüzeyindeki değişikliklerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Dental biyofilm oluşumunda hidroksiapatit yüzeylerine proteinlerin yapışması fikri giderek ağırlık kazanmaktadır. Yüzeyde bulunan pozitif yüklü kalsiyum ve negatif yüklü fosfat grupları proteinlerle etkileşerek, proteinleri tutarlar. Proteinlerin karboksilik grupları kalsiyumla, amino grupları ise fosfatlarla elektrostatik bağlar kurarak hidroksiapatite yapışırlar. Flor bu bağlanmayı kalsiyuma olan yüksek ilgisi ile önler. Bunların dışında flor minenin serbest yüzey enerjisini azaltır. Daha zor nemlenen bir yüzeye plak tabakalarının yapışması daha da zorlaşmaktadır. ^{376, 483, 70}

2.8.4.2.2 Florun Biyofilm Oluşumunun İkinci Aşaması (Yapışan Hücrelerin Çoğalması ve Birikimi) Üzerine Etkileri

In vitro ortamda, diş yüzeylerine %1'lik flor jeli uygulandığında flor uygulanmayan kontrol grubuyla kıyaslandığında *S. mutans* birikiminde azalma olduğu belirtilmiştir, ancak florun etkisinin zamanla kaybolduğu ve 5 günün sonunda *S. mutans*'ın kontrol grubuyla benzer oranda birikim gösterdiği saptanmıştır. *S. mutans* biyofilminde florun hücre birikimine etkisi olup olmadığı araştırılmış florlu yüzeylerle flor içermeyen kontrol grubu karşılaştırıldığında, pH 7'de ya da sınırlı miktarda glukoz varlığında birikimi etkilemediği bildirilmiştir. İçme suyunda yüksek konsantrasyondaki florun (250 µg/ml) ya da %1'lik flor jelinin insan ve hayvanlarda oluşturulan plaklarda organizma sayısını etkileyeceği bildirilmektedir. İçme suyundaki 250 µg/ml florun ratlarda oluşturulan plakta *S. mutans* sayılarını azalttığı, *Actinobasillus* sayılarını ise artırdığı bildirilmiştir. Bildirilen bu çalışmalar, florun plak ekosistemlerinde farklı bakteri türlerini etkileme potansiyeli olduğunu göstermektedir. ^{435, 252, 60, 168}

2.8.4.2.3 Florun Biyofilm Oluşumunun Üçüncü Aşaması (Biyofilm Topluluğunun Devamlılığı) Üzerine Etkileri

Plak içerisindeki flor, asidojenik ve asidürik bakterilerin karbonhidrat metabolizmasını azaltarak dış ortam pH'sının önemli derecede düşmesini önler. Plak pH'sının yüksek seviyelerde kalması, mine demineralizasyon riskini azaltmaktadır. İçme sularında profilaktik miktarda flor bulunan (1 µg /ml F) toplumlarda, plak bakterilerin flora karşı direnç kazanmaları konusunda yeterli kanıt bulunmazken; yüksek flor miktarı olan (10 µg /ml F) uzun süreli günlük flor jeli uygulamalarıyla plak bakterilerinin flora karşı direnç kazandığı bildirilmiştir. ^{168, 67}

Flora karşı dirençli bakterilerin daha az karyojenik olabileceği bildirilmektedir. Flora karşı dirençli *S. sobrinus* flor varlığında asit oluştururken buna kıyasla flora karşı direnç kazanmış *S. mutans* flora duyarlı türleriyle karşılaştırıldığında daha fazla asit oluşturduğu ve demineralizasyona sebep olduğu bildirilmektedir. ¹⁶⁸

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Bilimler Bölümü Çocuk Dişhekimliği Anabilim Dalı ile Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı polikliniklerine 6.03.17- 4.06.17 tarihleri arasında başvuran yaşları 2-6 arasında değişen erken çocukluk çürüğü tanısını almış 30 hasta çalışma grubu ve dişlerinde çürük bulunmayan 30 hasta kontrol grubu olarak toplam 60 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1 Araç ve Gereçler

3.1.1. Araçlar

İnkübatör (Heal Force HF90, Çin)

Santrifüj (NF 048; Nüve, Türkiye)

Elektroforez sistemi (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD)

PCR Cihazı (Thermal cycler, Techne Flexigene™, İngiltere)

UV Transillumunator (Wealtec, Dolphin-View, ABD)

Vitek 2 (bioMeuriux, Fransa)

Mac farland cihazı (İtalya)

Otomatik pipetler (Discovery, Transferpette, Almanya)

Güç kaynağı

Anaerob Jar

Bunzen beki

Buzdolabı

Derin dondurucular (-20 ve -80° C)

Distile su cihazı

Hassas terazi

Laminar kabin

Manyetik karıştırıcı

Mikrodalga fırın

Mikroskop, Olympus
Otoklav, Nüve
Otomatik mikropipetler
Pasteur fırını; Nüve
Soğutmalı santrifüj
Mikrosantrifüj
Benmari, Nüve

3.1.2. Besiyerleri Ve Kimyasal Maddeler

Agaroz (Sigma, ABD)
Kanlı agar (biEOMrieux, Fransa)
SDA (sabouraud dextrose agar) (Merck, Almanya)
Jelli transport besiyeri (Macaristan)
Müller Hinton Agar (Merck, Almanya)
Beyin kalp infüzyon sıvı besiyeri, Merck
Mitis salivarius agar
Sorbitol, Sigma
Mueller-Hinton broth, Merck
Buffer (Fermentas, EU)
Mg (Fermentas, EU)
dNTP (Fermentas, EU)
dH₂O (Fermentas, EU)
Taq DNA polimeraz enzimi (Thermo Scientific Fermentas, EU)
Eosin Metilen-Blue Agar (EMB) (biEOMrieux, Fransa)
DNA Ladder (100 bp, Fermentas, EU)
Etil Alkol (Merck, Almanya)
Etidium Bromid (Sigma, ABD)
Potasyum dihidrojen fosfat, KH₂PO₄ (Sigma, ABD)
Proteinaz K (Sigma, ABD)
Potasyum klorür, KCl (Sigma, ABD)
Sodyum hidrojen fosfat, Na₂HPO₄ (Sigma, ABD)

Sodyum klorür, NaCl (Sigma, ABD)

TAE Elektrozefrez Tamponu(Tris Asetat Tamponu) 50X

RTA-DNA genomic extraction kit (Kocaeli, Türkiye)

3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Balon Jojeler (100, 250 ve 500 ml)

Farklı ebatlarda cam tüpler (10 ml)

Eppendorf tüpleri (0.2 ml,0.5 ml,1.5 ml)

Falcon tüpü (50 ml)

Sedir yağı, Merck

Lam

Platin ve tek kullanımlık özeler

Eküvyon çubukleri

Petri kutuları

Pipet uçları (10µl,100 µl,1000 µl)

Steril tükürük kapları (50 ml)

Tüp rackları

3.1.4 Kullanılan Standart Suşlar

- *Streptococcus mutans* ; ATCC 25175
- *Streptococcus sobrinus* ; ATCC 33478
- *Streptococcus mutans* ; NCTC 10449

3.2. YÖNTEM

Bu tez Projesi için T.C Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 01/03/2016/74 protokol kodlu 10/03/2016 tarihli, çalışmanın etik yönden bir sakınca taşımadığı ve uygulamaya konulabileceğine ilişkin onay raporu alındı (Ek-1).

Çalışma öncesi çocuklara ve ebeveynlere, çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında bilgilendirme yapıldı ve istedikleri takdirde çalışma kapsamından çıkabilecekleri belirtildi. Çalışmaya katılmak isteyen çocukların ebeveynlerine ‘Gönüllülerin Bilgilendirilmiş Olur/(Rıza) Formu’ (Ek-2) ve ‘Koruyucu Flor Vernik Uygulaması Aydınlatılmış Onam Formu’ (Ek-3) imzalatıldı.

3.2.1. Hasta Seçimi

Çalışmaya 24-71 aylık, herhangi fiziksel veya mental engeli bulunmayan ve son 1 ay için antibiyotik veya flor uygulamasına maruz kalmamış kooperasyon gösteren çocuklar dahil edilmiştir. American Academy of Pediatric Dentistry tarafından kabul edilen kriterlere göre; 71 aylık veya daha küçük çocuklarda herhangi bir veya daha fazla süt dişinde çürük (kavitasyonlu veya kavitasyonsuz) yüzey, diş çürüğüne bağlı süt dişi kaybı veya çürüğe bağlı dolgu yapılmış diş yüzeyi bulunan 11 kız, 19 erkek toplam 30 çocuk EÇÇ grubu; benzer yaş gruplarından çürüğü bulunmayan 13 kız, 17 erkek toplam 30 çocuk ise kontrol grubu olarak belirlendi. Her iki gruptaki çocukların 20 adet süt dişinin sürmüştü ve altı yaş dişlerinin sürmemiş olmasına dikkat edildi (Şekil 3.1, 3.2).



Şekil 3.1. EÇÇ grubundan örnek hasta



Şekil 3.2. Çürüksüz gruptan örnek hasta

3.2.2. Ağız İçi Muayene

Çocukların ağız ve diş sağlığı muayenesi, Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Dişhekimliği Anabilim Dalı kliniğinde, DSÖ'nün (WHO 1997) belirlediği kriterlere uygun olarak diş hekimi koltuğunda reflektör ışığı altında, ağız aynası ve dişhekimliği sondu kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışma ve kontrol grubundaki çocukların hasta anamnez bilgileri ve çürük indeks değerleri 'Hasta Muayene Formu'na kaydedildi (Ek- 4).

3.2.3. Çürük İndeksi Ve Hasta Değerlendirmesi

Öncelikle dişler rulo pamuklarla izole edilip, arkasından 5 saniye süre ile nazıkçe hava-su spreyi ile kurutularak tüm çürük lezyonları rahatlıkla fark edilebilir hale getirildi. İzolasyonu takiben araştırmaya dahil edilecek olan hastaların tedavi öncesi durumlarının saptanması amacıyla DSÖ'nün (WHO 1997) belirlediği kriterlere uygun olarak dmft ve dmfs değerleri kayıt edildi. Süt dişleri için çürük, dolgulu ve çürük sebebiyle çekilmiş diş sayısı dmft; diş yüzeyi ise dmfs olarak kodlandı. dmft değeri hesaplanırken, her hasta için çürük, dolgulu ve çürük nedeniyle çekilmiş diş sayıları toplanarak o bireye ait olan indeks değeri kaydedildi. dmfs ölçümlerinde ise her hasta için çürük, dolgulu ve çürük nedeniyle çekilmiş süt azı dişlerin distal, mezyal, okluzal, bukkal/vestibül ve lingual/palatinal yüzeyleri; süt keser dişlerin distal, mezyal, vestibül/labial, palatinal/lingual yüzey sayıları toplanarak bireye ait yüzey indeksi kaydedildi. Travma ve fizyolojik kök rezorpsiyonu nedeniyle kaybedilen dişler değerlendirmeye alınmadı. Her iki gruptaki hastalara ve ebeveynlere başlangıç döneminde oral hijyen ve beslenme eğitimi verildi. Her iki gruptaki çocuklara başlangıç plak ve tükürük örnekleri alındıktan sonra flor vernik uygulaması

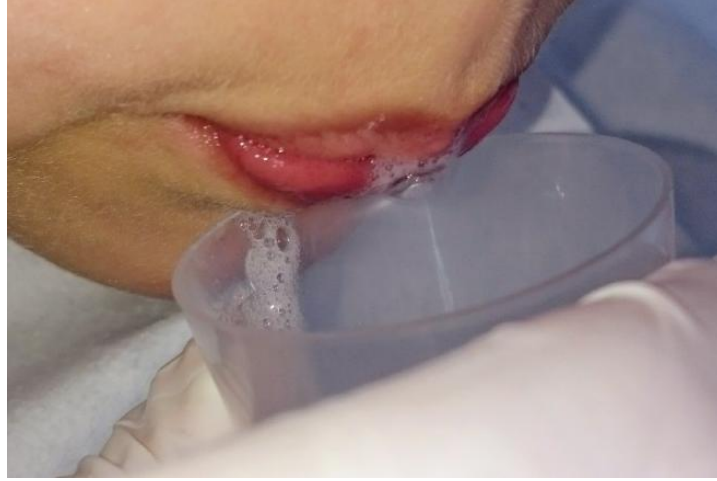
(President Dental ProShield Varnish) yapıldı (Şekil 3.3.). Hastaların tedavi gerektiren dişlerinin rutin tedavi işlemleri örneklerin toplanmasından sonra gerçekleştirildi.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan flor verniği preparatı

3.2.4. Mikrobiyolojik Örneklerin Alınması Ve Bakteriye Kültür

Uyarılmamış tükürük örnekleri alınırken hastalar dik pozisyonda oturup başları öne eğdirilerek ağız tabanında tükürük birikimi sağlandı. Hastalara 10 dakika boyunca herhangi bir dil, dudak ve yanak hareketi yapmadan ağza gelen tükürüğü biriktirip tükürmeleri söylendi. Örnekler sirkadiyan ritim değişikliğinden kaçınmak için sabah 9:30-10:30 saatleri arasında ve kahvaltıdan 2 saat sonra toplandı (Şekil 3.4.). Plak örnekleri ise yine steril eküvyonlar vasıtasıyla, molar dişlerin okluzal ve kesici dişlerin vestibül yüzeylerinden alınarak içerisinde 1'er ml transport besiyeri bulunan eppendorf tüplerine transfer edildi (Şekil 3.5.). Örnekler soğuk zincir altında Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür laboratuvarı mikrobiyolojik ekimleri ve değerlendirmeleri için yollandı. Örneklerin alınmasından sonra her iki guptaki hastalara da flor vernik uygulaması yapıldı. İkinci seans için örnek alınması işlemi hastalara tekrar flor vernik uygulaması yapılmaksızın, ilk randevudan 6 hafta sonra gerçekleştirildi.



Şekil 3.4. Uyarılmamış tükürük örneklerinin toplanması



Şekil 3.5. Plak örneklerinin toplanması ve transport besiyerine aktarılması

3.2.5. Örneklerin Mikrobiyolojik Analizi

Bu çalışmada tükürükte MS izolasyonu için tüm örnekler 30 sn vortekslenerek 50 µl olacak şekilde kanlı agar (Şekil 3.6, 3.7) ve %15 sükröz içeren trypticase, yeast cystine bacitracin agara (TYCSB) ekimleri gerçekleştirildi.



Şekil 3.6. Çalışmada kullanılan vorteks cihazı (Boeco, Germany)



Şekil 3.7. Kanlı ağara ekilen mutans kolonilerinin görüntüsü

Kırk sekiz saatlik saat inkübasyondan sonra izole edilen mikroorganizmaların identifikasyonu konvansiyonel yöntemler (Gram boyama, katalaz testi, PYR testi, hemoliz aktivitesi vs.) gibi biyokimyasal testler ve otomatize Vitek-2 (bioMeuriux, France) sistemi ile identifiye edildi (Şekil 3.8.). Koloniler büyüteç yardımıyla sayıldı. Beyaz renkli,

yüzeyden kalkık ve besiyerine yapışık koloniler mutans streptokok olarak değerlendirildi. Koloniler sayılarak cfu/ml cinsinden, MS için düşük düzey $<10^5$ cfu/ml, orta düzey $\geq 10^5$ - $<10^6$ cfu/ml, yüksek düzey $\geq 10^6$ cfu/ml olarak hesaplandı. Hiç üreme olmayan ve tespit limiti olan $<10^3$ cfu/ml'nin altında kalan miktar '0' olarak kabul edildi.



Şekil 3.8. Bakteri tiplendirmesinde kullanılan otomatize kültür sistemi

Çalışmada tükürükten LB izolasyonu için Rogosa SL besiyeri kullanıldı. Steril koşullarda petri ikiye ayrıldı. Tükürük örneği 10 kat sulandırılarak, bir tarafa 10^{-1} , diğer tarafa 10^{-2} lik sulandırmadan 50 μ l damlatılarak yüzeye yayıldı. Rogosa SL jelozlar mum söndürme kavanozunda (%5-10 CO_2) $37^\circ C$ 'de 48 saat inkübe edildi. Tipik koloniler sayılarak tükürüğün ml'sindeki düzeyleri cfu/ml olarak hesaplanmıştır. Laktobasiller için düşük düzey $<10^4$ cfu/ml, orta düzey $\geq 10^4$ - $<10^5$ cfu/ml, yüksek düzey $\geq 10^5$ cfu/ml olarak hesaplandı. Hiç üreme olmayan ve tespit limiti olan $<10^2$ cfu/ml'nin altında kalan miktar '0' olarak kabul edildi.

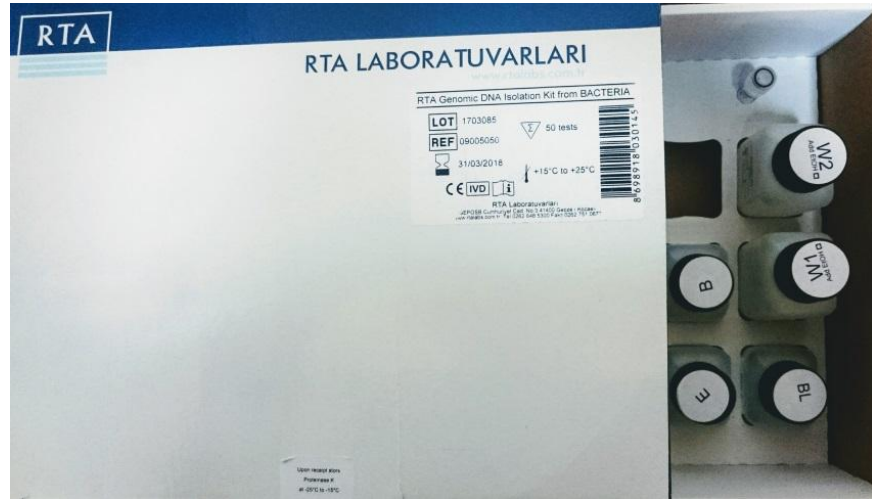
Çalışmada EÇÇ'li hastalar ile sağlıklı kontrol grubundaki hastaların oral flor uygulama öncesi ve sonrası total streptococcus, *S. mutans* ve Lactobacillus kantitasyonları karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Hastalardan izole edilen *S. mutans* izolatlarının subtiplerinin belirlenmesi PCR yöntemiyle gerçekleştirildi. Hastalardan alınan tükürük ve plak sürüntü örneklerinden konvansiyonel kültür yöntemleri ve gerektiğinde Vitek-2 otomatize kültür sistemi yardımıyla bakteri tiplendirmeleri yapıldı. Ayrıca hastalardan alınan örneklerden mikroorganizma tür tayinleri ve mikroorganizma kantitasyonları da gerçekleştirildi.

Tiplendirilen izolatlar PCR çalışmaları yapılması için hedeflenen örnek sayısına ulaşıncaya kadar içerisinde %20 oranında gliserol bulunan buyyonda -70 °C'de muhafaza edildi.

3.2.5.1. PCR İncelemesi

Tükürük örneklerinden bakteriyel DNA ekstraksiyonu RTA-DNA genomic extraction kiti (Kocaeli, Türkiye) kullanılarak ticari firmanın test prosedürüne uygun olarak aşağıdaki adımlarda gerçekleştirildi (Şekil 3.9.).

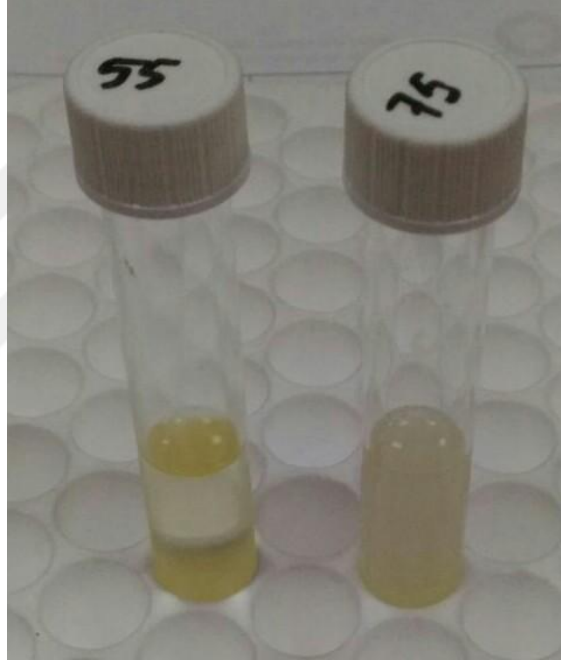


Şekil 3.9. DNA ekstraksiyonu sırasında kullanılan ticari kit

3.2.5.1.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu için ticari olarak temin edilen RTA markasının DNA genomic extraction kiti kullanıldı. Ekstraksiyon adımları aşağıdaki gibi uygulandı:

Saklama besiyeri içinde -70°C 'de bulunan bakteriler kanlı besiyerine pasaj yapıldı ve 37°C 'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda saf olarak bulunan tek bir koloniden alınarak steril kapaklı santrifüj tüplerine 1-3 ml konulmuş olan Müller Hinton Broth besiyerine ekim yapıldı ve 37°C 'de 48 saat inkübe edildi (Şekil 3.10.)



Şekil 3.10. Müller Hinton Broth besiyeri

İnkübasyon sonunda tüpler 3500 devirde 15 dakika soğutmalı santrifüj cihazında (Nüve, Türkiye) santrifüj edildi (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. İnkübasyon sırasında kullanılan soğutmalı santrifüj cihazı

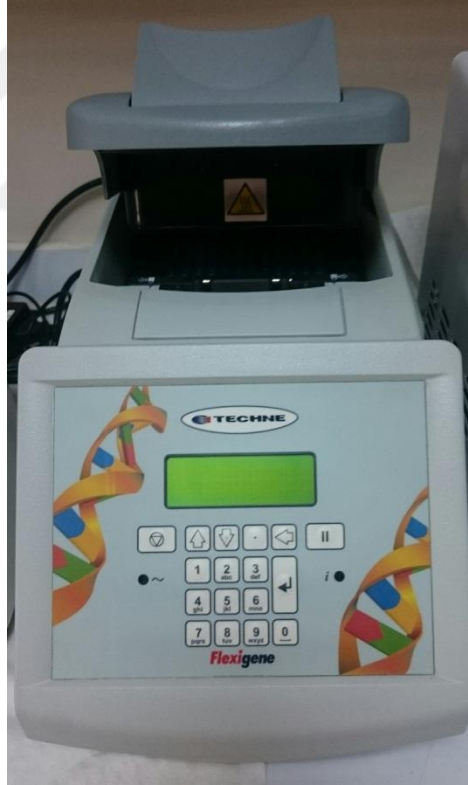
Santrifüj sonrasında süpernatant kısım döküldü. Tüplerde bulunan pelletin üzerine 1000 µl serum fizyolojik konularak vorteks ve ardından pipetaj yapıldı. 6000 g' de 2 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısım döküldü. Pellete 100 µl Buffer R1 eklendi ve hücrelerin tamamı pipetaj yapılarak resüspanse edildi.

Hücre süspansiyonu içine 20 µl (50 mg/ml) lizozim enzimi eklendi, vorteks yapıldı ve 37°C' de 20 dakika inkübe edildi. 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatantın tamamı uzaklaştırıldı. Pellete 180 µl Buffer R2 resüspanse edildi ve 20 µl Proteinaz K eklendi ve vortekslendi ve 65°C, 1000 rpm' de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 400 µl Buffer BG eklendi ve homojen bir solüsyon elde edilene kadar tüp birkaç kez alt üst edilerek iyice karıştırıldı. Karışım 65°C' de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 200 µl %100'lük etil alkol eklendi ve hemen vortekslendi. Ependorf tüplerde bulunan bu karışım toplama tüpünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarıldı. Aktarılan karışım 10.000 g' de 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı içeren alttaki tüp atıldıktan sonra kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerine 750 µl yıkama tamponu eklendi ve 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi. Kalan etanolü uzaklaştırmak için 10,000 g' de 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolon 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpe transfer edildi. Mikrosantrifüj tüpe transfer edilen spin kolon üzerine 50-100 µl 70°C' ye ısıtılmış Elution Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Daha sonra 10.000 g'de 1

dakika santrifüj edilerek spin kolon atıldı ve mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA elde edildi.

3.2.5.1.2. PCR Amplifikasyonu

Ekstrakte edilen *S. aureus* ve *P. aeruginosa* genomik DNA örneklerinden *S. aureus* için ticari olarak sentezlenen; *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *femB*, *mecA*, *pvl*, *etaA* ve *tst* primerleri ve *P. aeruginosa* için *tetK*, *tetM*, *ermA*, *ermC*, *ampC*, *Toho*, *ctxm914* primerleri kullanılarak ısısız döngü cihazında (Thermal cyclers, Techne Flexigene, İngiltere) PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. PCR amplifikasyonunda kullanılan ısısız döngü cihazı

Çalışmada hastalardan izole edilen *S. mutans* kökenlerinde *gtfD*, *gtfT*, *gtfK*, *gtfP*, *gtfR* ve *gtfG* kullanılarak PCR *S. mutans* tip tayini gerçekleştirildi (Çizelge 3.1.). Mikroorganizmaların tür düzeyindeki tayinlerinin yapılabilmesi için konvansiyonel kültür yöntemleri ve Vitek-2 otomatize kültür sistemleri kullanıldı. Çalışmada aşağıdaki *gtfB* geni amplifikasyonunu takiben *S. mutans* kökenlerinde *S. mutans* izolatları subtiplerinin RFLP yöntemi ile belirlenmesi için HaeIII restriksiyon enzimi ile kesimi yapılarak RFLP yöntemi ile subtiplerinin tanımlamaları yapıldı.

Primer	Hedef Gen	Primer Dizisi (5'-3')	Fragment Boyutu (bp)
MKD-F	<i>S. mutans gtfD</i>	GGCACCACAACATTGGGAAGCTCAGTT	433
MKD-R		GGAATGGCCGCTAAGTCAACAGGAT	
MKT-F	<i>S. sobrinus gtfT</i>	GATGATTTGGTCTCAGGATCAATCCTC	328
MKT-R		ACTGAGCCAGTAGTAGACTTGGCAACT	
MKK-F	<i>S. salivarius gtfK</i>	GTGTTGCCACATCTTCACTGCCTTCGG	544
MKK-R		CGTTGATGTGCTTGAAAGGGCACCATT	
MKP-F	<i>S. sanguinis gtfP</i>	GGATAGTGGCTCAGGGCAGCCAGTT	313
MKP-R		GAACAGTTGCTGGACTTGCTTGTC	
MKR-F	<i>S. oralis gtfR</i>	TCCCGGTCAGCAAACCTCCAGCC	374
MKR-R		GCAACCTTTGGATTTGCAAC	
MKG-F	<i>S. gordonii gtfG</i>	CTATGCGGATGATGCTAATCAAGTG	440
MKG-R		GGAGTCGCTATAATCTTGTCAGAAA	

Çizelge 3.1. Streptokoklar için multiplex PCR'da kullanılan primer dizileri

Çalışmada ayrıca *S. mutans* NCTC 10449 kontrol suşunun 16S rRNA'sı kontrol olarak kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu karışımı 25 µl olarak ayarlanarak aşağıdaki thermal cyler döngülerinde amplifikasyon gerçekleştirildi (Çizelge 3.2, 3.3).

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Distile su	15.5
Buffer	2.5µl
Dntp	0.5µl
Taq DNA Polimeraz	1µl
MgCl ₂	2.5µl
P1 forward (F)	1µl
P1 reverse (R)	1µl
Genomik DNA	1µl
Toplam	25µl

Çizelge 3.2. gtfB geni amplifikasyonu için PCR karışımı

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	95 °C	5 dk.	
2	Denatürasyon	95 °C	1 dk.	} 30 siklus
	Bağlanma (Annealing)	70 °C	1 dk.	
	Uzama	72 °C	1 dk.	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.	
4	Bekleme	+4 °C	∞	

Çizelge 3.3. gtfB geni ısı döngüleri

3.2.5.1.3 50X TAE Elektroforez Tamponu

- -242 gr Tris Base (Sigma)
- -57.1 ml Glasiyal asetik asit
- -100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma)

Tris base, 600 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra glasiyal asetik asit ve son olarak EDTA eklendi. Son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. TAE 50X olacak şekilde stok solüsyon olarak hazırlandı ve 1xTAE olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı.

3.2.5.1.4. Yükleme (Loading) Tamponu (6X)

- 40 gr Sükroz
- 0.25 gr Bromfenol mavisi

Yukarıda miktarları verilen maddeler karıştırılarak 100 ml olacak şekilde distile su içinde çözdürüldü. Porsiyonlanarak -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.5.1.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Tekniği İle Görüntülenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu işleminden sonra amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek araştırıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu kullanıldı. Tris-Asetat-EDTA 50X olacak şekilde stok solüsyon olarak hazırlandı ve 1xTAE olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı.

- 50X TAE Elektroforez Tamponu: 1 litre
- 242 gr Tris Base (Sigma)
- 57.1 ml Glasiyal asetik asit
- 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma)

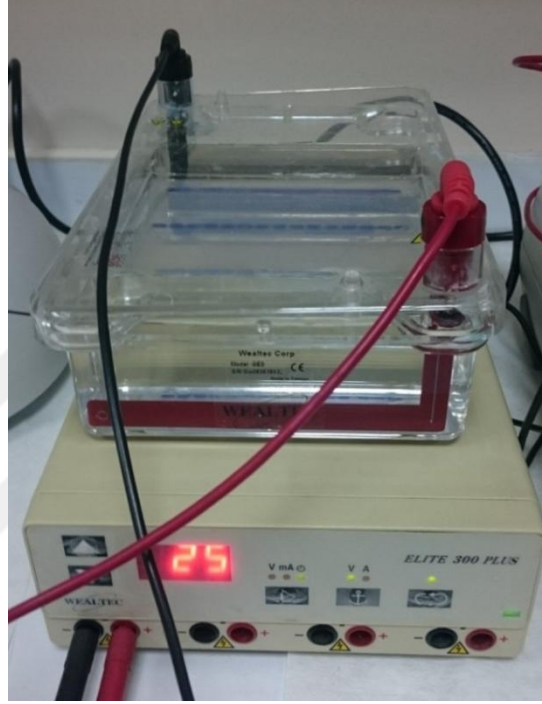
Karışım hazırlanırken 242 gram Tris base 600 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra glasiyal asetik asit eklendi. En son olarak EDTA eklendi ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Elektroforez için stok TAE solüsyonundan 1xTAE olacak şekilde distile su ile dilüe edildi ve 2 g agaroz tartılarak 100 ml'lik bir erlenmayere konuldu. Üzerine 100 ml 01X TAE tamponu eklendi (%2'lük agaroz) ve 10 mg/ml'lik etidyum bromid'den 10 µl ilave edildi. Mikrodalga fırında (Kenwood, Japonya) 1-2 dk kaynatıldı (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. Elektroforez sırasında kullanılan mikrodalga fırın

Elektroforez tarakları jel dökme kabına, tabanda 1 mm boşluk kalacak şekilde ayarlanarak yerleştirildi. Yaklaşık 60°C'ye kadar soğutulan agaroz jeli, jel kabına dökülüp donması için oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Taraklar dikkatlice çıkartılarak jel kabı elektroforez tankına (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD) yerleştirildi (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. Elektroforez ünitesi

Amplifiye edilen örneklerden 10'ar µl 3µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jelde açılan kuyucuklara yerleştirildi. Yükleme sırasında DNA marker (100 bp'lik, Fermentas) kullanıldı. Jele elektrik akımı (15 Volt/cm) verilerek 15 dk elektroforez yapıldı. Yaklaşık 30 dk sonra yürütme işlemi durdurularak UV görüntüleme cihazı (Wealtec, Dolphin-View, ABD) ile bantların varlığı incelendi (Şekil 3.15.).



Şekil 3.15. UV görüntüleme cihazı

3.2.6. Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi için IBM SPSS Statistics (spss version 22, SPSS INC, Chicago, IL, ABD) programı kullanıldı. Çalışma bulgularının değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, frekans, standart sapma) yanında normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Paired Simple t testi, niteliksel verilerin karşılaştırmasında ise Ki-Kare testi ve Fisher's Exact Ki-Kare testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

3. BULGULAR

Çalışma ve kontrol grupları, 24'ü kız (%39.3), 36'si (%60.7) erkek olmak üzere toplam 60 hastadan oluşturuldu. Çalışmada 11 kız (%35.5), 19 erkek (%64.5) toplam 30 çocuk EÇÇ grubu; benzer yaş gruplarından çürüğü bulunmayan 13 kız (%43.3), 17 erkek (%56.7) toplam 30 çocuk ise kontrol grubu olarak belirlendi. Çocuklarda yaş dağılımı 3-6, ortalaması ise 4.98 olarak bulundu (Çizelge 4.1.).

	Toplam	Çalışma Grubu	Kontrol Grubu
	Ort ±SS	Ort ±SS	Ort ±SS
Yaş	4.98 ± 0.7	5.03 ± 0.7	4.9 ± 0.7

		n (%)	n (%)	n (%)
		Toplam	Çalışma Grubu	Kontrol Grubu
Cinsiyet	Kız	24 (%39.3)	11 (%35.5)	13 (%43.3)
	Erkek	37 (%60.7)	19 (%64.5)	17 (%56.7)

Çizelge 4.1. Yaş ve cinsiyete göre grupların dağılımı

Çalışma grubunda saptanan çürük indeks değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir:

Çalışma grubundaki çocukların dmft ve dmfs değerleri sırasıyla ortalama 7.7 ve 23.7 olarak bulundu.

	Min-Max	Ort ± SS (medyan)
dt	2-17	7.16 ± 3.3
ft	0-3	0.32 ± 0.7
mt	0-3	0.29 ± 0.6
dmft	3-18	7.77 ± 3.6
ds	4-66	21.41 ± 14.3
fs	0-6	0.6 ± 1.5
ms	0-15	1.38 ± 3.1
dmfs	6-71	23.77 ± 16.8

Çizelge 4.2. Çalışma grubunda saptanan dmft/dmfs değerleri

Bakteriyel kültür bulgularına göre gruplarda MS ve LB seviyelerinin dağılımı Çizelge 4.3'te gösterilmiştir:

	Düzye	Toplam	Çalışma Grubu	Kontrol Grubu	p
		n (%)	n (%)	n (%)	
MS*	Düşük	14 (%24.6)	7 (%23.6)	7 (%23.3)	0.098
	Orta	36 (%59.0)	15 (%50.0)	21 (%70.0)	
	Yüksek	10 (%16.4)	8 (%26.4)	2 (%6.7)	
LB**	Düşük	30 (%50.0)	6 (%20.0)	24 (%80.0)	0.001
	Orta	22 (%36.7)	16 (%51.6)	6 (%20.0)	
	Yüksek	8 (%13.3)	8 (%27.4)	0 (%0.0)	

Ki-kare test

* $<10^5$ cfu/ml: Düşük düzey MS

$<10^6$ $>10^5$ cfu/ml: Orta düzey MS

$>10^6$ cfu/ml: Yüksek Düzey MS

** $<10^4$ cfu/ml: Düşük düzey LB

$<10^5$ $>10^4$ cfu/ml: Orta düzey LB

$>10^5$ cfu/ml: Yüksek Düzey LB

Çizelge 4.3. Bakteriyel kültür bulgularına göre gruplarda MS ve LB düzeylerinin dağılımı

Çalışma ve kontrol grubundaki çocuklarda toplam MS kolonileri karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0.098; p>0.05).

Çalışma ve kontrol grubundaki çocuklarda toplam LB kolonileri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu (p:0.001; p<0.05).

Çalışma grubunda yüksek LB görülme oranının (%27.0), kontrol grubundan (%0.0) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu bulundu.(p<0.05).

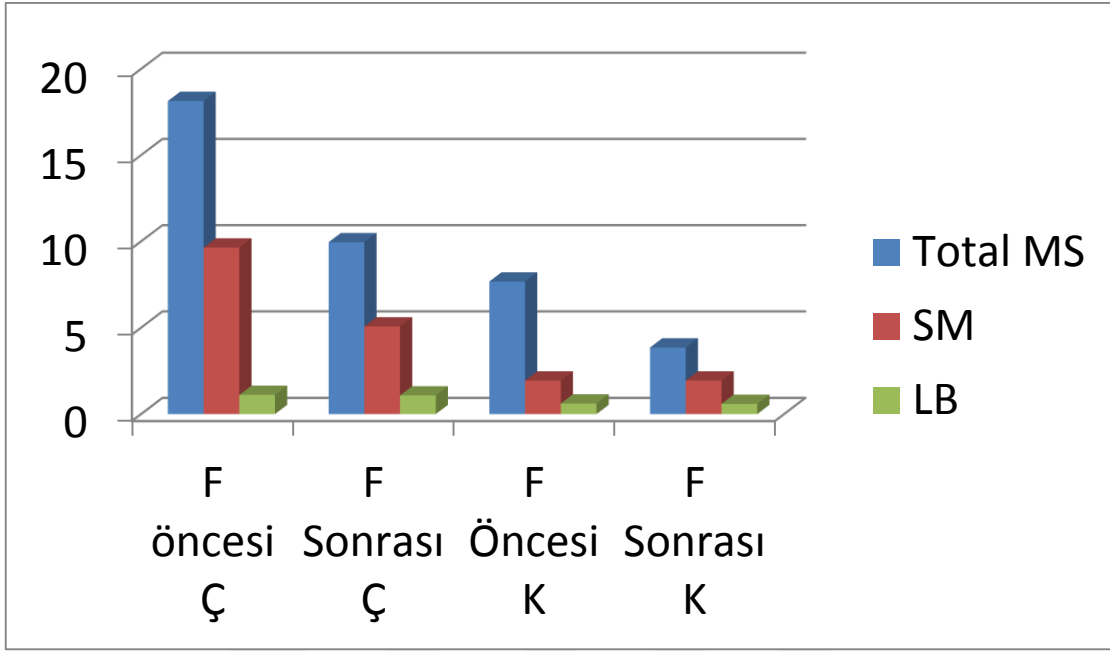
Kontrol grubunda düşük LB görülme oranının (%80.0), çalışma grubundan (%20.0) anlamlı şekilde yüksek olduğu bulundu.(p<0.05).

Bakteri sayılarındaki değişimin çalışma gruplarına göre flor öncesi ve flor sonrası istatistiksel analizleri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir:

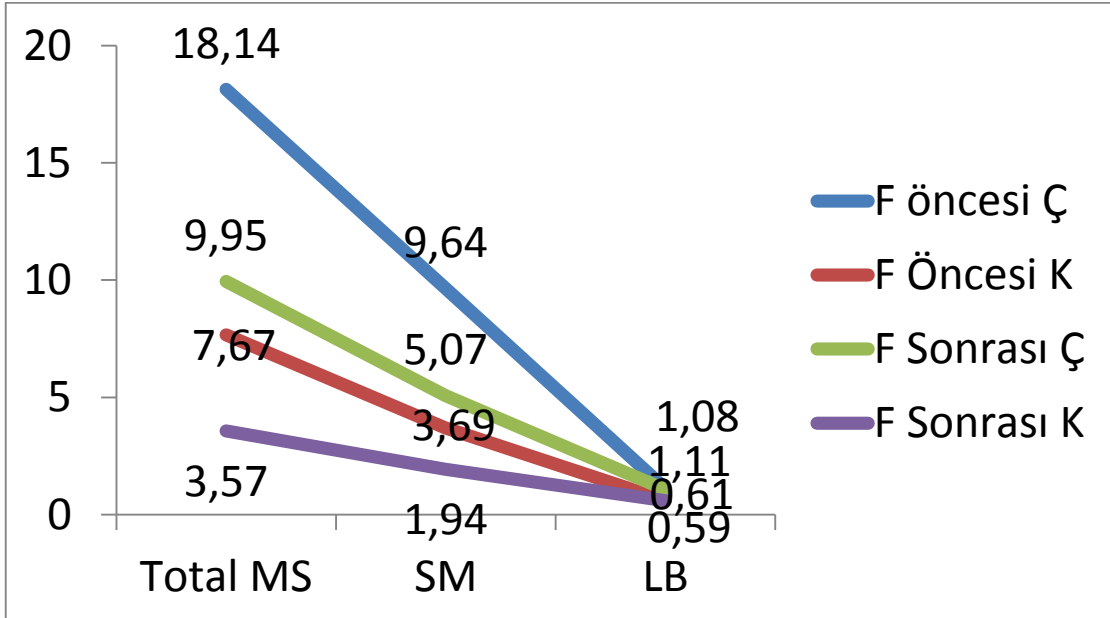
		Flor Öncesi	Flor Sonrası	
		Ort ± SS	Ort ± SS	p
Total Streptokok (10 ⁵ cfu/mL)	Çalışma Grubu	18.1400±22.10	9.9531±1.3598	0.00
	Kontrol Grubu	7.6730±6.9262	3.8573±3.4280	0.00
S.mutans (10 ⁵ cfu/mL)	Çalışma Grubu	9.6498±1.1705	5.0722±5.6293	0.00
	Kontrol Grubu	3.6971±3.3622	1.9466±1.6798	0.00
Laktobasil (10 ⁴ cfu/mL)	Çalışma Grubu	1.1115±1.8362	1.0812±1.8393	0.00
	Kontrol Grubu	0.6121±0.5520	0.5913±0.5287	0.00

Paired Simple t test

Çizelge 4.4. Bakteri sayılarındaki değişimin çalışma gruplarına göre flor öncesi ve flor sonrası istatistiksel analizleri



Şekil 4.1. Bakteri sayılarının çalışma ve kontrol gruplarındaki değişimi-1



Şekil 4.2. Bakteri sayılarının çalışma ve kontrol gruplarındaki değişimi-2

Çalışma grubunda total streptokok, *S. mutans* ve Laktobasil düzeylerinin flor vernik sonrası istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü gözlemlendi. (p:0.00; p<0.05)

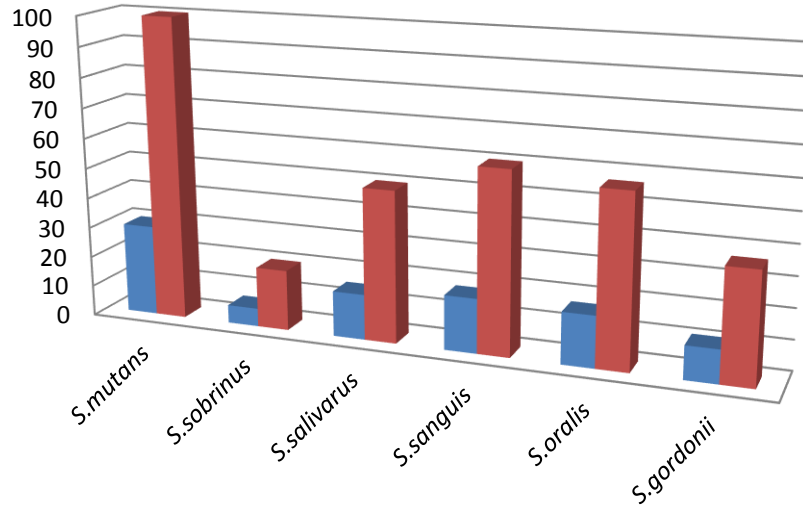
Kontrol grubunda total streptokok, *S. mutans* ve Laktobasil düzeylerinin flor vernik uygulaması sonrası istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü gözlemlendi. (p:0.00; p<0.05)

Oral streptokokların çürüklü ve çürüksüz hasta gruplarında PCR yöntemiyle alt tiplerinin dağılımı Çizelge 4.5. ; Şekil 4.3. ; 4.4. ve 4.5'te gösterilmiştir:

		Çürüklü (n=30)	Çürüksüz (n=30)	p
		n(%)	n(%)	
S.mutans	Pozitif	30 (%100)	30 (%100)	-
	Negatif	0 (%0)	0 (%0)	
S.sobrinus	Pozitif	6 (%20)	2 (%6.7)	0.129
	Negatif	24 (%80)	28 (%93.3)	
S.salivarius	Pozitif	15 (%50)	11(%36.7)	0.267
	Negatif	15 (%50)	19 (%63.3)	
S.sanguinis	Pozitif	19 (%63.3)	13 (%43.3)	0.121
	Negatif	11 (%36.7)	17 (%56.7)	
S.oralis	Pozitif	17 (%56.7)	8 (%26.7)	0.018
	Negatif	13 (%43.3)	22 (%73.3)	
S.gordonii	Pozitif	11 (%36.7)	7 (%23.3)	0.260
	Negatif	19 (%63.3)	23 (%76.7)	

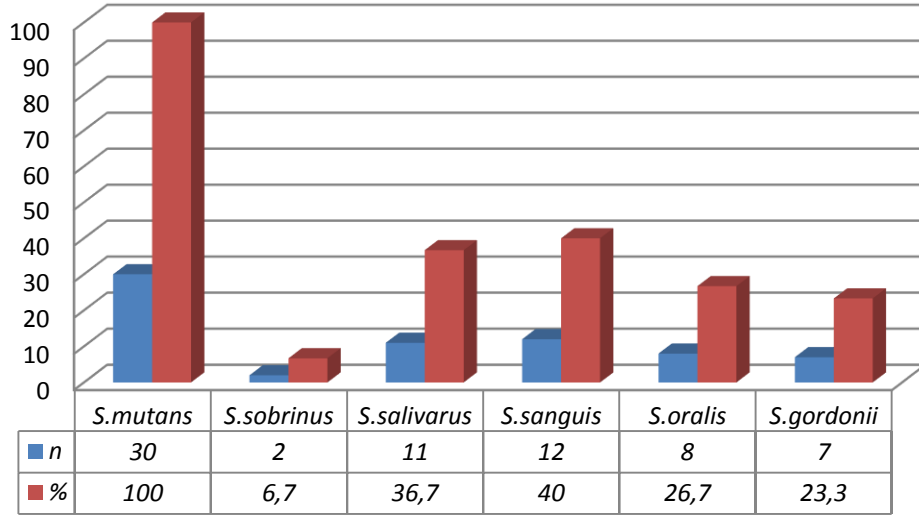
Ki-kare test

Çizelge 4.5. Oral streptokokların çürüklü ve çürüksüz hasta gruplarında PCR yöntemiyle alt tiplerinin dağılımı



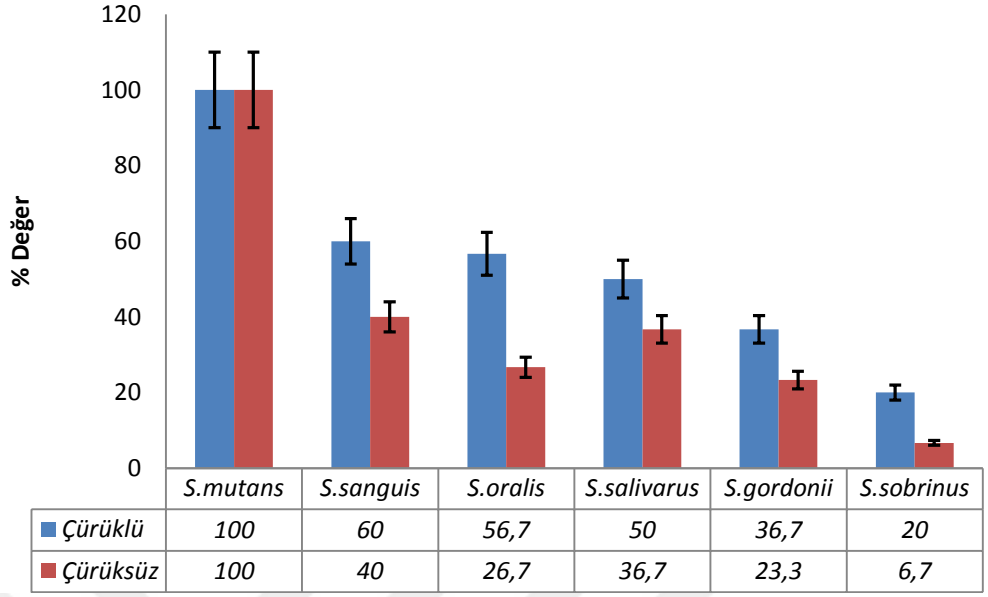
	<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.sanguis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.gordonii</i>
■ n	30	6	15	18	17	11
■ %	100	20	50	60	56,7	36,7

Şekil 4.3. PCR incelemesi sonucu çürüklü çocuklarda izole edilen streptokok türlerinin dağılımı



	<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.sanguis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.gordonii</i>
■ n	30	2	11	12	8	7
■ %	100	6,7	36,7	40	26,7	23,3

Şekil 4.4. PCR incelemesi sonucu çürüksüz çocuklardan izole edilen streptokok türlerinin dağılımı



Şekil 4.5. PCR incelemesi sonucu çürüklü ve çürüksüz çocuklarda streptokok türlerinin karşılaştırılması

Çalışma ve kontrol gruplarında tüm hastalarda *S.mutans* gözlenmiştir (Çizelge 4.5.).

Çalışma grubunda *S. sobrinus* görülme sıklığı (%20), kontrol grubundan (%6.7) yüksek olmasına rağmen aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p:0.129$; $p>0.05$) (Çizelge 4.5.).

Çalışma grubunda *S. salivarius* görülme sıklığı (%50), kontrol grubundan (%36.7) yüksek olmasına rağmen aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p:0.297$; $p>0.05$) (Çizelge 4.5.).

Çalışma grubunda *S. sanguinis* görülme sıklığı (%60), kontrol grubundan (%40) yüksek olmasına rağmen aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p:0.121$; $p>0.05$) (Çizelge 4.5.).

Çalışma grubunda *S. oralis* (%56.7) görülme sıklığı, kontrol grubundan (%26.7) yüksek bulunmuş ve aralarındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p:0.018$; $p<0.05$) (Çizelge 4.6.).

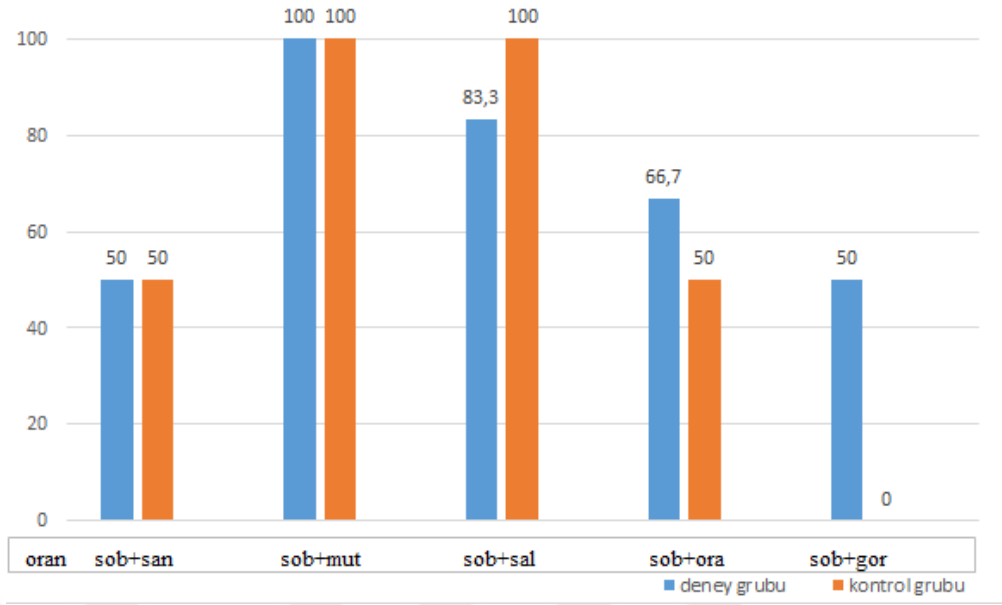
Çalışma grubunda *S. gordonii* görülme sıklığı (%36.7), kontrol grubundan (%26.3) yüksek olmasına rağmen aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p:0.26$; $p>0.05$) (Çizelge 4.5.).

S. sobrinus ve diğ er bakterilerin birlikte pozitif olma oranları Ç izelge 4.6 ve Ş ekil 4.6'te gösreilmif tir:

		Toplam	Ç alif ma	Kontrol	p
		n (%)	n (%)	n (%)	
Sob+sanguinis	Pozitif	4 (%50)	3 (%50)	1 (%50)	0.786
	Negatif	4 (%50)	3 (%50)	1 (%50)	
Sob+mutans	Pozitif	8 (%100)	6 (%100)	2 (%100)	-
	Negatif	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	
Sob+salivarius	Pozitif	7 (%87.5)	5 (%83.3)	2 (%100)	0.750
	Negatif	1 (%12.5)	1 (%16.7)	0 (%0)	
Sob+oralis	Pozitif	5 (%62.5)	4 (%66.6)	1 (%50)	0.643
	Negatif	3 (37.5)	2 (%33.3)	1 (%50)	
Sob+gordoni	Pozitif	3 (%60)	3 (%50)	0 (%0)	0.357
	Negatif	2 (%40)	3 (%50)	2 (%100)	

Fisher's Exact test

Ç izelge 4.6. *S. sobrinus* ve diğ er bakterilerin birlikte pozitif olma oranlarının değ erlendirilmesi



Şekil 4.6. *S. sobrinus*'un diğer bakterilerle birlikte pozitif görülme oranları

S. sobrinus'un *S. mutans* ile birlikte pozitif görülme oranı, hem çalışma hem kontrol gruplarında %100'dür (Çizelge 4.6.).

S. sobrinus'un *S. sanguinis* ile birlikte pozitif görülme oranı çalışma ve kontrol grubunda sırasıyla %50 ve %50 olarak bulunmuş ve aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.786; p<0.05) (Çizelge 4.6.).

S. sobrinus'un *S. salivarius* ile birlikte pozitif görülme oranı çalışma ve kontrol grubunda sırasıyla %83.3 ve %100 olarak bulunmuş ancak aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.750; p<0.05) (Çizelge 4.6.).

S. sobrinus'un *S. oralis* ile birlikte pozitif görülme oranı çalışma ve kontrol grubunda sırasıyla %66.6 ve %50 olarak bulunmuş ancak aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.643; p<0.05) (Çizelge 4.6.).

S. sobrinus'un *S. gordonii* ile birlikte pozitif görülme oranı deney ve kontrol grubunda sırasıyla %50 ve %0 olarak bulunmuş ancak aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.357; p<0.05) (Çizelge 4.6.).

5. TARTIŞMA

S. mutans insanlarda mikrobiyal diş biyofilminde en sık izole edilen ve diş çürüğü ile yakın ilişkisi olan mikroorganizma olarak tanımlanmaktadır. Çürük sıklığı ile *S. mutans* seviyesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu ve bu mikroorganizmanın ortamdan uzaklaştırılması ile çürük sıklığında azalma görülebileceği bildirilmektedir.^{37, 147, 259, 394, 448, 271, 309} Choi ve arkadaşları, *S. mutans* seviyesinin, EÇÇ'de çürüksüz çocuklardan daha yüksek olduğunu bildirmiştir.⁸³

Çalışma grupları AAPD'nin kabul ettiği sınıflama doğrultusunda, 71 aylık ve daha küçük çocuklardan oluşturulmuştur. Yaş dağılımları 24-71 ay olan çocuklar çalışmaya dahil edilmiştir. Ağızdaki diş sayısının artması ile ekolojik ortamda ve buna bağlı olarak ağız mikroflorasında farklılıklar olabileceği düşünülerek çalışmaya katılan çocuklarda tüm süt dişlerinin sürmüş olmasına dikkat edilmiştir.¹⁹

Dünya Sağlık Örgütü'nün 1999 Kopenhag zirvesinde; 2020 yılına kadar 6 yaşındaki bireylerin en az %80'inin çürüksüz olması ve 12 yaşındaki bireylerin ortalama DMFT indeksinin 1.5'ten düşük olmasının hedeflendiği belirtilmektedir.⁴⁹¹

Bu çalışmada çocukların çürük, dolgulu ve çekilmiş diş düzeyleri DSÖ (1997) kriterleri doğrultusunda belirlenmiş; EÇÇ grubunda dmft ve dmfs düzeyleri sırasıyla 3-18 ve 6-71 olarak bulunmuştur. EÇÇ'li çocukların birçoğunda amputasyon, kanal tedavisi ve çekim gibi komplike tedavilerin yapılmasını gerektiren derin kaviteli çürük lezyonları izlenmiştir.

Çocuklarda çürük saptanmasının *S. mutans*'ın tükürük içindeki miktarına bağlı olduğu vurgulanmaktadır. Bu nedenle bireylerde çürük sıklığının belirlenmesinde tükürüğün bir tanı aracı olarak kullanılabilmesi belirtilmektedir.^{116,271,373} Nurelhuda ve arkadaşları, plak yerine tükürüğü numune aracı olarak seçmişlerdir.³³⁶ Plakın, diş yüzeyleri arasındaki bakteri sayılarının büyük değişimi nedeniyle oral bakteri / mutans streptokok prevalansını tahmin etmede tamamen güvenilir olmadığı belirten araştırmacılar mevcuttur.²⁶⁴ Buna ek olarak Emilson ve arkadaşları, tükürüğün sürekli olarak tüm dişlerle temas halinde bulunmasının mutans streptokokların tüm dentisyon üzerindeki kolonizasyonunu daha iyi yansıtabileceğini belirtmiştir.¹²⁶ Başka bir çalışmada ise tükürük mutans streptokok sayısının; bir bireyin, bu bakterilerin oral yükünün bir yansıması olarak düşünülebileceği de ifade edilmiştir.⁴⁶⁵

Çürüklü hastalarda bakteri topluluğu ve dental plak kompozisyonu arasındaki ilişkiyi gösteren birçok çalışma mevcuttur.^{351,215,308,147,45,447,260,296,284,444} Aynı şekilde Jiang ve arkadaşları dental plak mikrobiotasının EÇÇ ile yakından ilişkili olduğunu belirtmişleridir.²⁰⁶

Sánchez-Pérez ve arkadaşları, dental plak kültüründen saptanan *S. mutans* varlığı ile çürük varlığı arasındaki korelasyonun; tükürüğün bakteriyel kültür kaynağı olarak kullanıldığında ortaya çıkmadığını tespit etmişlerdir.³⁸⁹ Kariojenik bakterilerin ve diş çürüğü varlığını ilişkilendirmek amacıyla, incelenen bakterilerin kaynağı olarak tükürüğün kullanılması etkili bir ilişki kurulmasına izin vermeyeceği ve tükürük yerine dental plak bakterilerini kullanmanın daha etkili sonuçlar vereceği belirtilmektedir. Tükürükte *S. mutans* varlığının yüksek olmakla birlikte diş minesinin yüzeyinde daha düşük olduğu ve çürüğün diş üzerinde başladığı düşünüldüğünde plak örneği alınmasının daha doğru sonuçlar verebileceği bildirilmektedir.^{422,74,125}

Daha önce yapılan bazı çalışmalar EÇÇ'li çocuklarda çeşitli populasyonlarındaki mikrobiyotayı tanımlarken, çoğunlukla tükürük yerine plak örneği alınması üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bununla birlikte, tükürüğe erişilmesi kolaydır ve tüm ağız boşluğundaki mikrobik populasyon hakkında bilgi sağlamak için en uygun örnek olarak kabul edilmektedir. Buna karşın, dental plak içerisindeki karyojenik türlerin prevalansında lokal varyasyonlar bulunabileceği de belirtilmektedir.^{83,45,447,273,37} Lang ve ark. tükürük maruziyeti farklılıkları veya flor düzeylerindeki değişiklikler gibi yerel faktörlerin, mutans streptokokların ağızda farklı bölgelere dağılmasına sebep olabileceğini ifade etmişlerdir.²⁴¹ Bu sebeplerle çalışmamızda dişlerin sağlıklı veya çürüklü, kesici veya molar diş fark etmeksizin farklı bölgelerinden plak örnekleri toplanmasına dikkat edilmiştir.

Baca ve arkadaşları AP-PCR metodu ile yapmış oldukları çalışmalarında, tükürük örneklerinden *S. mutans* genotipi saptanmasının plak örneklerinden *S. mutans* genotipi saptanması kadar etkili olabilse de, bakteriyel çeşitliliğin en fazla plak örneklerinden sağlandığını ve bunlardan bukkal plak örneklerinin genetik çeşitlilik açısından daha değerli olduğunu bulmuşlardır.³⁸

Tüm bu bulgular göz önüne alındığında; bu çalışmada, her iki bakteriyel ortamdaki sayı ve çeşitlilik açısından oluşabilecek farklılıkları elimine etmek için hem plak hem de tükürük örnekleri kullanılmış ve MS değerleri belirlenmiştir.

S. mutans'ın izolasyonunda en çok kullanılan besiyerleri MSB ve TYCSB agarolarak belirtilmektedir. Bu iki besiyeri ile ilgili yapılan karşılaştırma çalışmalarında bazı araştırmacılar MSB agar içerisindeki tripan mavisinin birçok *S. mutans* suşunu inhibe ettiğini bildirmiş; bazı araştırmacılar ise MS izolasyonunda iki besiyeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını vurgulamışlardır. Çalışmalar göstermiştir ki MSB agar, MS'ler için ideal bir seçici besiyeri olmasına karşın, *S. sobrinus* üremesini inhibe edebilmektedir. *S. sobrinus* tespitinde PCR gibi moleküler yöntemlerin daha hassas bilgi verebileceği bildirilmiştir. ^{279,162,265,440,312,192}

Saaerela ve arkadaşları, AP-PCR metodunun oral patojenlerin de içinde bulunduğu bir çok bakteri türünün genotipik karakterizasyonunda kullanılabileceğini belirtilmektedir. ³⁸⁵ Ayrıca, yapılan çalışmalarda, AP-PCR yönteminin hızlı ve kolay bir yöntem olduğu da vurgulanmaktadır. ¹⁶⁵

Loyola-Rodriguez ve arkadaşları çalışmalarında PCR'ın, çürük çalışmalarının moleküler epidemiyolojisinde kullanılabilecek faydalı bir yöntem olduğunu bildirmiş; ayrıca çocuklardan alınan tükürük örneklerinde *S. mutans* ve *S. sobrinus* saptanmasında kolaylıkla kullanılabileceğini vurgulamışlardır. ²⁷¹

Çürük mikrobiyotasının anlaşılmasında; besiyeri, ekim, kültür ve ışık mikroskopisi gibi geleneksel mikrobiyolojik çalışmalar yanında; moleküler genetik incelemeler de karyojenik mikrobiyotada özel türlerin düzeylerini belirlemede yeni bir devrim yaratmıştır. Ağızdaki bakterilerin neredeyse yarısı kültür edilememiştir ve oral mikrobiyotanın incelenmesinde kullanılan moleküler tanı yöntemleri ile diş çürüğünde rol alan kompleks bakteri toplulukları tespit edilebilmektedir. ^{214,444,480}

Araştırmacılar, AP-PCR yönteminin *S. mutans*'ların tiplendirilmesinde kullanılabilecek hızlı, hassas ve güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde daha önceki çalışmalar, *S. mutans* ve çocuklarda diş çürükleri arasındaki ilişkiyi bulmuş ve bunların birçoğu niceliksel gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanmıştır. ^{317,271,351,214,308,147,45,447,260,296} Saraithong ve arkadaşları, moleküler temelli qPCR kullanımı ile spesifik türlere daha erişilebilir olabileceğini, bu nedenle PCR yönteminin saha çalışmalarında *S. mutans* ve *S. sobrinus* sayımı amacıyla EÇÇ risk değerlendirmesinde kullanılabilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. ³⁹¹ Bazı araştırmacılar da PCR yönteminin, konvansiyonel kültür tekniklerine kıyasla, karyojenik mikroorganizmaların tespitinde daha hassas bir araç olduğu göstermişlerdir. ^{196,413,346}

Bu çalışmada geleneksel kültür yöntemleri ile beraber; türe özgü 16SrRNA primerleri kullanılarak seçilmiş mikroorganizmaların saptanmasını sağlayan PCR incelemesi kullanılmıştır. Araştırmacılar PCR yöntemini, çeşitli örneklerde bulunan mikroorganizmaları teşhis etmede, kültür yöntemi kadar güvenilir ve duyarlılığa sahip olduğunu bildirmişlerdir.⁵⁰⁷

Bu çalışmada MS'lerin kantitatif sayımı için kanlı agar ve TYCSB agar kullanılmış, *S. mutans* ve *S. sobrinus*'un gerçek prevalansını ortaya çıkarabilmek için türe özgü PCR incelemesi yapılmıştır.

Çalışmadaki kültür incelemesi sonucunda; EÇÇ'li ve çürüksüz gruptaki çocuklarda MS görülme oranları arasında belirgin farklılık bulunmuştur. EÇÇ grubunda yüksek düzeyde MS görülme oranının (%26.4) çürüksüz gruba kıyasla (%6.2) daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuç yüksek MS seviyesinin EÇÇ ile ilişkili olduğu sonucu ile örtüşmektedir.

Ağızdaki MS sayısı arttıkça ortam pH'sının düşmesine bağlı olarak LB sayısında artış gözlenmektedir. LB'ler çürüğün erken evrelerinden çok çürüğün ilerlemesinden sorumlu patojen olarak gösterilmektedir. Bunun yanında artmış LB seviyeleri, fermente karbonhidratla beslenmenin dolaylı bir göstergesi olarak ifade edilmiştir. Çalışmadaki kültür incelemesi sonucu EÇÇ'li grupta yüksek LB görülme oranı (%27.0) çürüksüz gruba kıyasla (%0) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.^{352,226,257}

EÇÇ mikrobiyotasını değerlendiren çalışmalarda, çocuklarda tükürük, plak veya sürüntü örneklerinin incelendiği ve örneklerin de farklı yöntemlerle alındığı ifade edilmiştir. Tao ve Hulan, steril eküvyonlar (pamuk çubuklar) ile; Li ve Ge, steril periodontal küretler ile; Becker, Acevedo, Soni, Choi, Singla ve Franco, dişhekimliği sondu ile; Hughes, Tanner, Mitrakul ve Palmer, steril tahta kürdan ile; Okada ve Saraithong, steril diş fırçası ile; Gross, endodontik paper point ile plak örnekleri alınabileceğini bildirmişlerdir.^{451,193,262,147,45,2,422,83,415,117,192,447,309,351,349,346,391,157}

Çocuklardan dental plak örnekleri alırken küret ya da paper point sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak dişhekimliği sondu, periodontal küret, paper point veya kürdan gibi sivri uçlu cisimler çocuklarda dental anksiyeteyi arttırarak, hedeflenen bölgelerden istenen düzeyde örnek alınmasını sınırlandırabilmektedir. Okada ve arkadaşlarının önerdiği steril diş fırçası, Tao ve arkadaşlarının önerdiği steril eküvyonlar ile plak toplama yöntemlerinde ise çocuklarda korkuya neden olmadan, hızlı ve güvenilir bir biçimde örneklerin

toplanmasının sağlanabileceği belirtilmektedir.^{349,451} Bu sebeple, bu çalışmada dental plak örneklerinin toplanmasında Tao ve arkadaşları ile Hulan ve arkadaşlarının önerdikleri steril eküvyon metodu kullanılmıştır.^{451,193}

MS'ler oral floranın normal üyeleri olup, ağız ortamında bulunan karbonhidratları hızlıca fermente edip asit üretebilen ve asit ortamda da yaşamını sürdürebilen karyojen bakterilerdir. *S. mutans* ve *S. sobrinus* MS grubunda yer alan, insanlarda diş plağı ve tükürükten sıklıkla izole edilen ve çürük başlaması ve gelişmesinden sorumlu tutulan bakteriler olarak ifade edilmektedir.^{397,367,271,49,184,267,147}

Rodriguez ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada, Meksikalı okul öncesi çocuklarda; aktif çürüklü grupta *S. mutans* izolasyonunun %75, çürüksüz grupta ise %60 olduğunu belirtilmişlerdir.³⁷² Choi ve arkadaşlarının bir başka çalışmasında *S. mutans*'ın diş çürüğü olan çocuklarda %100 ve diş çürüğü olmayan çocuklarda %80 oranında tespit edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, ister aktif çürüklü ister çürüksüz olsun, tüm bireylerde *S. mutans* saptanmıştır.⁸³

Çalışmamızda *S. mutans* koloni sayıları çalışma grubunda (9.6×10^5) kontrol grubuna kıyasla (3.6×10^5) daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.4). Bu çalışmadaki PCR incelemesinde hem çalışma hem kontrol gruplarında; plak ve tükürük örneklerindeki MS'ler arasında en fazla izole edilen bakteriler *S. mutans* ve *S. sanguinis* olarak bulunmuştur. Bu bulgular MS düzeylerinin okul öncesi çocuklarda çürük oluşumu ve gelişiminde etkili olduğunu bildiren araştırmacıların bulgularını destekler niteliktedir.

Birçok çalışmada çürüğün başlamasında *S. mutans*, en etkili bakteri olarak gösterilmiş olmasına rağmen; EÇÇ tablosunun şiddetlenmesinde *S. mutans*'ın *S. sobrinus* ile sinerjistik etkili olduğu belirtilmiştir.^{271,83,391,346,4,228,345,404,184,434} Gross ve arkadaşları *S. sobrinus*'u bazı örneklerde çürük ile bağlantılı primer patojen olarak göstermiş ve *S. sobrinus*'un hakim olduğu birçok örnekte *S. mutans* düzeyinin düştüğünü belirtmişlerdir.¹⁵⁷ Bu çalışmanın bulgularına ters olarak, çalışmamızda tüm gruplarda *S. sobrinus* en düşük düzeyde gözlenen MS türü olmuştur. *S. mutans* ve *S. sobrinus* pozitif olan çürüksüz iki çocuk olduğu gibi sadece *S. mutans* pozitif olup *S. sobrinus* negatif olan çocuklarda da çürük geliştiği gözlenmiştir.

Hughes ve arkadaşları 2-6 yaşlarındaki Ş-EÇÇ'li ve çürüksüz çocuklarda asidürik mikrobiotayı araştırdıkları çalışmalarında, *S. sobrinus* seviyelerinin Ş-EÇÇ'li grupta daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.¹⁹² Soni ve arkadaşlarının 4-8 yaş arası çocuklarda yapmış

oldukları çalışmada, *S. sobrinus*'un aktif çürüklü grubun %60'ında, çürüksüz grubun % 30'unda mevcut olduğu ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir.⁴²² Buna karşın Ghasempour ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada aktif çürüğü olan çocukların tükürük örneklerinde *S. mutans* sıklığının çürüksüz çocuklardan anlamlı derecede yüksek olduğunu, ancak *S. sobrinus*'un sıklığının anlamlı olarak farklı olmadığını bulmuşlardır.¹⁴⁸ Bu çalışmada EÇÇ'li grupta *S. sobrinus* görülme sıklığının (%20), çürüksüz grupla kıyaslandığında (%6.7) daha yüksek bulunmuş olmasına rağmen aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.129; p>0.05). Ayrıca *S. sobrinus*'un en fazla *S. mutans* ve *S. salivarius* ile birlikte bulunduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.6.).

Çalışmamızda yaptığımız PCR deneyi sonucunda *S. sobrinus*'un diğer bakterilerle birlikte pozitif bulunması ile EÇÇ oluşumu ve gelişimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.6.). Ayrıca çalışmamızda yapılan kültür incelemesinde MS'ler EÇÇ'li çocuklarda yüksek düzeyde bulunmasına rağmen, türe özgü yaptığımız PCR çalışmasında *S. sobrinus* hem çürüksüz (%6.7) hem de EÇÇ grubunda düşük oranda (%20) saptanmıştır.

Mutans streptokokları ve özellikle de *S. mutans*, çürük gelişmesinde ve ilerlemesinde aktif rol oynayan spesifik patojen olarak tanımlanmasına rağmen, son çalışmalar göstermiştir ki dental plakta çok sayıda farklı tür vardır ve bunlar karbonhidratlardan asit üreterek çürük oluşumu ve gelişiminde etkili olmaktadır. PCR teknikleri ve 16S rRNA gen dizi analizi gibi gelişmiş moleküler yöntemler ile diş çürüklerinin gelişiminde sanıldığından daha karmaşık bakteri topluluklarının olduğu daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir.^{192,422,148,161,45,89,1,157,208}

Bakteriyel suşların tiplendirilmesi, spesifik hastalıklar ile ilişkili belirli suşların saptanması ve infeksiyonların heterojenitesinin karakterize edilmesi amacı ile gerçekleştirilmektedir. Tükürük ve mikrobiyal diş biyofilminden izole edilen *S. mutans*'ların heterojenitesi, genotipleme yöntemleri ile belirlenebilmektedir. Bu yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmaların sonucunda, bireylerin birden fazla *S. mutans* genotipi ile kolonize olabileceği bildirilmektedir. Redmo Emanuelsson ve arkadaşları çalışmalarında, bir bireyde en fazla yedi farklı genotip saptandığını belirtmişlerdir.³⁶⁸ Kozai ve arkadaşları çalışmalarında, bir bireyin 1-4 arasında farklı *S. mutans* genotipine

sahip olabileceğini bildirirken; Kulkarni ve arkadaşları ile Zhou ve arkadaşları ise bir bireyde 1-5 arasında farklı *S. mutans* genotipinin saptanabileceğini bildirmişlerdir.^{225,236, 507}

Zhou ve arkadaşları çalışmalarında, bir çocukta en çok 5 farklı *S. mutans* genotipi olduğunu bulmuşlardır.⁵⁰⁷ Bir başka çalışmada yetişkinlerin en fazla 8 genotip *S. mutans* ile kolonize olabileceği ve okul öncesi çocukların en fazla 4 farklı genotipte *S. mutans* tarafından kolonize edildiği bildirilmiştir.³²⁵ Türe özgü yaptığımız PCR çalışmasına göre bir çocukta 6 farklı genotip olduğu bulunmuştur.

Kısıtlı yaşam alanı ve besin varlığı nedeni ile biyofilm içerisindeki farklı bakteri türleri kendi aralarında rekabet etmektedirler. *S. mutans* ve *S. sanguinis* birbirlerinin gelişimlerini inhibe eden iki bakteridir. Buna göre; *S. mutans* sayısı yüksekse *S. sanguinis* sayısı azdır. Ortamda bulunan besin miktarı bu iki bakteri arasındaki rekabette önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda *S. sanguinis*'in EÇÇ'li grupta bulunma sıklığı (%60) çürüksüz grupla kıyaslandığında (%40) daha yüksek bulunmuş olmasına rağmen aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.121; p>0.05).

S. salivarius genellikle dil sırtında baskın olan bakteri topluluğu olup normal oral floranın bir üyesidir. *S. salivarius* suşlarının *S. mutans*'in biyofilm oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Buna karşılık çalışmamızda *S. salivarius*'un EÇÇ'li grupta bulunma sıklığı (%50) çürüksüz grupla kıyaslandığında (%36.7) daha yüksek bulunmuş olmasına rağmen aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.297; p>0.05).

Streptococcus gordonii dişeti yüzeyinde oluşan pelikül üzerine ilk tutunan mikroorganizmalardan biri olup *S. mutans* ile rekabet eden bir bakteridir. Çalışmamızda *S. gordonii*'nin EÇÇ'li grupta bulunma sıklığı (%36.7) daha yüksek bulunmuş olmasına rağmen aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.260; p>0.05).

Streptococcus oralis, oral florada yer alan ve plak oluşumu evresinde primer kolonizasyonda yer alan fırsatçı mikroorganizmadır. Çalışmamızda *S. oralis*'in EÇÇ'li grupta bulunma sıklığı (%56.7) çürüksüz grupla kıyaslandığında (%26.7) daha yüksek bulunmuş ve aralarındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.018; p<0.05). EÇÇ'li grupta *Streptococcus oralis* oranı arttıkça çürük gelişiminin arttığı ve çürüksüz grupta ise bu bakterinin oranı azaldıkça çürük gelişiminin azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.5.).

Dental biyofilm, diş yüzeylerindeki biyolojik birikintiler olarak tanımlanır ve tükürük komponentlerini, fruktoziltransferaz ve glukoziltransferaz gibi bakterilere ait serbest hücre

enzimlerini, polisakkarit ve bakterileri içermektedir. Diş çürüğünü önleme ya da kontrol altına alma yönündeki girişimler direkt ya da indirekt olarak biyofilm aktivitelerini modifiye etme yönündedir. Dental biyofilmlerle ilgili geniş çaplı araştırmalarda biyofilmin yapısı, bakteriyel içeriği, bakteriyel tutunma mekanizmaları ve immün yanıtlar gibi özellikler araştırılmıştır. ^{231,94,199,409,338,430,61,92,97,112,150}

Topikal flor uygulamalarının minenin yüzey enerjisini azaltarak bakteri kolonizasyonunu azalttığı kanıtlanmıştır. Birçok çalışmada, topikal flor uygulanmış minede oluşan plaktaki bakteri metabolizmasının düşük pH'da etkilendiği bildirilmiştir. Mine yüzeyinde depo edilen florun düşük pH'da bakterilerin asit üretimini durdurmak için gereken miktarda salındığı bildirilmektedir. ^{82,174,477}

Flor plak kompozisyonunu değiştirerek plak oluşumunu etkiler ve plak bakterilerinin karbonhidratlardan asit üretme kabiliyetini azaltmaktadır.³⁰² Chau ve arkadaşları flor verniklerinin *S. mutans*'in adezyonunu ve biyofilm birikimini azalttığını ve flor verniklerin klinik yararının zamanla azalabileceğini belirtmişlerdir.⁷⁸

Flor vernikleri yüzeyde kalın kalsiyum florid tabakası oluşturarak antimetabolik faaliyetler için depo görevi görmektedir. Florun, ağız florasına etkisinin incelendiği çalışmalarda; yüksek konsantrasyonlarda bakterisid, düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik özelliği olduğu bildirilmiştir. Flor, bakterilerin glikoz alımını veya metabolik aktivitelerini azaltabilmektedir. Streptokokların yüksek konsantrasyonlu flor varlığında adaptasyon ve direnç geliştirdikleri bilinmektedir.^{249,167,169,168,62}

Florun kısa süreli ve yüksek konsantrasyonlarda uygulanması yerine, uzun süreli ve düşük konsantrasyonlarda uygulanmasının yeni çürük lezyonlarını önlemede daha etkili olduğu bildirilmektedir. ^{418,244}

Florun karyostatik etkisi çeşitli mekanizmalarla anlatılmaktadır. Minenin çözünürlüğünü azalttığı ya da erken çürük lezyonlarının remineralizasyonunu sağladığı bilinmektedir. Aynı zamanda florun mikrobiyal metabolizma üzerine de direkt etkileri vardır. Bakterilerin karbonhidrattan asit üretme kapasitelerini azalttığı plağın yapışmasında ve gelişiminde etkili olduğu bildirilmektedir.^{62,26} Divaris ve arkadaşları ile Gold ve arkadaşları, Avustralya'da Aborijin okul öncesi çocukları arasında yılda iki kez flor vernik uygulamalarını içeren çalışmalarında, florun yüzey seviyesindeki 2 yıllık çürük riskini %25 oranında azalttığı sonucuna varmışlardır. ^{110,151}

Diş çürümelerini önlemek için flor verniğin rolü birçok çalışmada bildirilmiştir ve ayrıca sistematik incelemeler ve meta-analizle de doğrulanmıştır.^{39, 182, 436, 283, 485} Petersen ve arkadaşları, diş çürüğünü önlemede flor vernik kullanımının diğer topikal floridlerden daha etkili olduğunu göstermişlerdir.³⁵⁵ Daha önce yapılan birçok çalışmada da, verniklerin çürüğe olan olumlu etkisi gösterilmiştir.^{281, 182, 363, 310}

Belirli donanımlara ve klinik uygulamaya ihtiyaç duyan flor jellerinin aksine, vernik, özellikle tükürük varlığında bile daha kolay uygulama anlamına gelmektedir.³¹⁰

Uzun süreli salınım yapan sistemler, antimikrobiyal ajanın yavaşça salınmasını sağlayarak uzun dönem bakterisid etki göstermektedir. Aynı zamanda uzun süreli etki, uygulanan ajanın konsantrasyon miktarına da bağlıdır. Bu çalışmada, antibakteriyel etki gösteren ajanların uzun süreli salınımlarının dental biyofilm oluşumunu daha etkin bir şekilde azaltabileceği görüşünden yola çıkılarak deneysel ajan olarak dental vernikler seçilmiştir.¹²⁷

Bradshaw ve arkadaşları, düşük konsantrasyondaki florun biyofilm bakterileri üzerindeki etkilerini inceleyerek antimikrobiyal etkisi olduğu sonucuna varmışlardır. Florun *S. mutans* üzerindeki antibakteriyel etkilerinin direkt (bakteri metabolizmasının engellenmesi) ve indirekt (çürük yapıcı bakteriler için gerekli düşük dış ortam pH oluşumunun engellenmesi) etkilerle gerçekleştiği bildirilmiştir.⁶⁴

NaF verniğin çürük önleyici etkinliğini kanıtlayan birçok çalışma mevcuttur. Ayrıca şişe formunda satılan flor vernikler yerine tek kullanımlık verniklerin iyice karıştırılarak uygulanması tavsiye edilmiştir. Uygulamalar arasında flor oranının değişmesinin, zamanla vernikten florür ayrılmasıyla oluştuğu belirtilmekte ve şişe formun kullanımı önerilmemektedir.^{84,354,30,101,140,15,144,75,118,411,35} Bu yüzden çalışmamızda tek kullanımlık flor NaF verniği uygulanması tercih edilmiştir. Li ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, düşük dış ortam pH'sında ve glukoz fazlalığında, flor ile kaplanmış hidroksiapatit çubuklarına *S. mutans*'ın biyofilm hücrelerinin birikiminde anlamlı derecede azalma olduğunu bildirmişlerdir.²⁵² Tükürük ve plakta az miktarda flor miktarı artışının diş çürüğü oluşumunu önleyebileceği, demineralizasyonu durdurup remineralizasyonu başlatabileceği belirtilmiştir. Flor solüsyonları ve flor içeren dental materyallerin antibakteriyel etkisi ve dental plağın ekolojisindeki değişimleri anlatan literatürde birçok çalışma mevcuttur.^{419,508,62,294,477,54,143}

Yapılan bir çalışmada kullanılan dental verniklerin deney gruplarında flor konsantrasyonları ve antimikrobiyal etkileri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde flor konsantrasyonu azaldıkça canlı bakteri sayısının arttığı saptanmıştır.²⁶

Çalışmamızda, tüm gruplarda total streptokok, *S. mutans* ve Laktobasil düzeylerinin flor vernik uygulaması sonrası istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü gözlemlendi ($p<0.05$). Bu sonuçlar florun bakteri sayılarını azaltarak EÇÇ'yi önlemede etkin bir ajan olduğunu göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Erken çocukluk çürüğü olan çocuklarda bakteri florasının incelendiği ve flor vernik uygulamasının bakteri florasına olan etkisinin değerlendirildiği çalışmamızın sonuçlarına göre;

- Geleneksel mikrobiyolojik çalışmaların yanında, yeni teknolojik imkanlar ve moleküler metodlar ile çürük etiyojisinde daha karmaşık mikroorganizma toplulukları olduğu gözlenmiştir.
- Farklı protokollerle yapılan PCR çalışmaları özgüllük, tekrarlanabilirlik ve duyarlılık sağlayabilmesi açısından çürük mikrobiyolojisi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızda türe özgü PCR yöntemi ile 16S rRNA primerleri kullanılarak, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. oralis*, *S. salivarius* ve *S. gordonii* gibi subtiplerin varlığı gösterilmiştir. Ayrıca seçici besiyerlerinde kantitatif kültür yapılarak MS ve LB düzeyleri incelenmiş, bu bakterilerin çalışma grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek seviyelerde bulunduğu görülmüştür.
- Bu çalışmada, ister aktif çürüklü ister çürüksüz olsun, tüm bireylerde *S. mutans* bakterisine rastlanılmıştır. *S. mutans* koloni sayıları çalışma grubunda (9.6×10^5) kontrol grubuna kıyasla (3.6×10^5) daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.4.).
- Bu çalışmadaki PCR incelemesinde hem çalışma hem kontrol grubunda; plak ve tükürük örneklerindeki MS'ler arasında en fazla izole edilen bakteriler *S. mutans* ve *S. sanguinis* olarak bulunmuştur.
- Farklı araştırmaların bulgularına benzer olarak bir çocukta en fazla 6 farklı türde mutans genotipi saptanmıştır.
- Önceki araştırmaların bulgularına ters olarak, çalışmamızda tüm gruplarda *S. sobrinus* en düşük düzeyde gözlenen MS türü olmuştur. Ağız florasında hem *S. mutans* hem *S. sobrinus* bakterilerini bulundurduğu halde çürüksüz iki çocuk olduğu gibi; sadece *S. mutans* bakterisini bulundurup *S. sobrinus* bakterisini bulandırmayan çocuklarda da çürük geliştiği gözlenmiştir. *S. sobrinus*'un hiçbir çocukta tek başına izole edilemediği ve tüm bireylerde mutlaka *S. mutans* ile birlikte bulunduğu için bu bakterinin tek başına çürük oluşturamadığı sonucuna

varılmıştır. Çalışmamızda ayrıca *S. sobrinus*'un en fazla *S. mutans* ve *S. salivarius* bakterileri ile birlikte bulunduğu gözlenmiştir.

- Çalışmamızda yaptığımız PCR deneyi sonucunda EÇÇ'li grupta *S. sobrinus* görülme sıklığı (%20), çürüksüz gruptan (%6.7); daha yüksek bulunmuş olmasına rağmen aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p:0.129$; $p>0.05$). *S. sobrinus*'un diğer bakterilerle birlikte bulunması ile EÇÇ oluşumu ve gelişimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- Çalışmamızda *S. oralis*'in EÇÇ'li grupta bulunma sıklığı (%56.7) çürüksüz grupla kıyaslandığında (%26.7) daha yüksek bulunmuş ve aralarındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p:0.018$; $p<0.05$). EÇÇ'li grupta *S. oralis* oranı arttıkça çürük gelişiminin arttığı ve çürüksüz grupta ise bu bakterinin oranı azaldıkça çürük gelişiminin azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.5.).
- Diğer araştırmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak çalışmamızda, tüm gruplarda total streptokok, *S. mutans* ve Laktobasil düzeylerinin flor vernik uygulaması sonrası istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu sonuçlar florun patojenik bakteri sayılarını azaltarak EÇÇ'yi önlemede etkili bir ajan olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak; çürükten sorumlu tek bir patojen olmadığı gibi çürüğün oluşumu ve gelişiminde bakteriler dışında birçok etiyolojik faktör etkilidir. Her ağızdaki ekolojik dengenin farklı olması sebebiyle araştırmalardan elde edilen bulgular da farklılık gösterebilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, et al.** Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of clinical microbiology*, **2008**, 46(4): 1407-1417.
2. **Acevedo AM, Ray MV, Socorro M, Rojas-Sánchez F.** Frequency and distribution of Mutans Streptococci in dental plaque from caries-free and caries-affected Venezuelan children. *Acta odontologica latinoamericana*, **2009**, 22(1): 15-20.
3. **Acs G, Lodolini G, Kaminsky S, Cisneros GJ.** Effect of nursing caries on body weight in a pediatric population. *Pediatric dentistry*, **1992**, 14(5): 303.
4. **Ahmady K, Marsh PD, Newman HN, Bulman JS.** Distribution of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus at sub-sites in human approximal dental plaque. *Caries Res.* **1993**; 27(2): 135–39.
5. **Aktaş A, Giray B, Aktaş G.** Tükürük (Salya); Özellikleri ve Görevleri Tanı Açısından Değeri. *ADO Klinik Bilimler Dergisi*, **2009**, 3(2): 361-367.
6. **Alaki SM, Burt BA, Garetz SL.** The association between antibiotics usage in early childhood and early childhood caries. *Pediatric dentistry*, **2009**, 31(1): 31-37.
7. **Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L, Innilä S, Torkko H, et al.** Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. *Archives of oral biology*, **1996**, 41(2): 167-173.
8. **Alaluusua S, Kleemola-Kujala E, Grönroos L, Evälahti M.** Salivary caries - related tests as predictors of future caries increment in teenagers. A three - year longitudinal study. *Molecular Oral Microbiology*, **1990**, 5(2): 77-81.
9. **Alaluusua S, Kleemola-Kujala E, Nystrom M, Evalahti M, Gronroos L.** Caries in the primary teeth and salivary Streptococcus mutans and lactobacillus levels as indicators of caries in permanent teeth. *Pediatr Dent*, **1987**, 9(2): 126-30.
10. **Alaluusua S, Alaluusua SJ, Karjalainen J, Saarela M, Holttinen T, et al.** The demonstration by ribotyping of the stability of oral Streptococcus mutans infection over 5 to 7 years in children. *Archives of oral biology*, **1994**, 39(6): 467-471.
11. **Alaluusua S, Malmivirta R.** Early plaque accumulation—a sign for caries risk in young children. *Community dentistry and oral epidemiology*, **1994**, 22(5): 273-276.

12. **Alaluusua S, Renkonen OV.** Streptococcus mutans establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. *European Journal of Oral Sciences*, **1983**, 91(6): 453-457.
13. **Alani AH, Toh CG.** Detection of microleakage around dental restorations: a review. *Oper Dent*, **1997**, 22(4): 173-85.
14. **Allaker RP, Seddon SV, Tredwin C, Lynch E.** Detection of Streptococcus mutans by PCR amplification of the spaP gene in teeth rendered caries free. *Journal of dentistry*, **1998**, 26(5-6): 443-445.
15. **Almeida MQ, Costa OXI, Ferreira JMS, Menezes VA, Leal RB, et al.** Therapeutic potential of Brazilian fluoride varnishes: an in vivo study. *Braz Dent J.* **2011**, 22(3):193–7.
16. **American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD).** Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies. (**2008**).
17. **American Dental Association (ADA).** A look at toothbrushes. (**2007**). Erişim: [http://www.ada.org/sections/scienceAndResearch/pdfs/patient_78.pdf]
18. **American Academy of Pediatric Dentistry.** Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences and preventive strategies. *Pediatric Dentistry*, **2014-2015**, 36, 50-53.
19. **American Academy of Pediatric Dentistry.** Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies. (**2016**). http://www.aapd.org/policies&guidelines/ G_Oral health policies.
20. **American Academy of Pediatric Dentistry.** Reference manual 2003-2004. *Pediatr Dent*, (2003), 25, 1-150.
21. **American Academy of Pediatric Dentistry.** Council on Clinical, A. Guideline on Fluoride Therapy. (**2015**) Reference Manual V 37(6): 15 / 16
22. **American Academy of Pediatric Dentistry.** Council on Clinical, A. Policy on Early Childhood Caries (ECC): Classifications, Consequences, and Preventive Strategies. (**2017**) Reference Manual V 39(6): 17 / 18
23. **American Academy of Pediatrics.** Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies. *Pediatr Dent* 2016, V 39(6) ; 17 / 18
24. **Ando T, Tsumori H, Shimamura A, Sato Y, Mukasa H.** Classification of oral streptococci by two - dimensional gel electrophoresis with direct activity stain for glycosyltransferases. *Molecular Oral Microbiology*, **2003**, 18(3): 171-175.

25. **Arruda AO, Senthamarai Kannan R, Inglehart MR, Rezende CT**, et al. Effect of 5% fluoride varnish application on caries among school children in rural Brazil: a randomized controlled trial. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2012**, 40(3): 267-276.
26. **Erdem AP**. Streptococcus mutans ve streptococcus sobrinus biyofilmlerinde üç farklı florid verniğinin florid konsantrasyonlarının ve antibakteriyel etkinliklerinin incelenmesi. Doktora, İstanbul Üniveritesi, İstanbul, **2006**.
27. **Attin R, Tuna A, Attin T, Brunner E, Noack MJ**. Efficacy of differently concentrated chlorhexidine varnishes in decreasing mutans streptococci and lactobacilli counts. *Archives of Oral Biology*, **2003**, 48(7): 503-509.
28. **Ausubel FM, Brent R, Kingston RE**. *Short protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, 3rd ed., New York, **1997**, 836.
29. **Autio-Gold JT, Courts F**. Assessing the effect of fluoride varnish on early enamel carious lesions in the primary dentition. *The Journal of the American Dental Association*, **2001**, 132(9): 1247-1253.
30. **Autio-Gold J**. Recommendations for fluoride varnish use in caries management. *Dentistry Today*, **2008**, 27(1): 64-7.
31. **Axelsson P**. *Etiologic factors involved in dental caries*. In: Diagnosis and risk prediction of dental caries. Quintessence Publishing Company, Germany, **2000**, 2-39.
32. **Axelsson P**. *Development and diagnosis of caries lesions*. In: Diagnosis and risk prediction of dental caries. Quintessence Publishing Company, Germany, **2000**, 179-181.
33. **Aydın M**. *Endodontic microbiology*. In: Endodontics, 1st ed., Mimtaş yayıncılık, Ankara, **2012**, 589-624
34. **Ayhan E**. Çocuklarda streptokokkus mutans' in vertikal (aile içi) ve horizontal (çevreden) geçişinin araştırılması. Doktora, Ankara Üniversitesi, Ankara, **2013**.
35. **Azarpazhooh A, Main PA**. Fluoride varnish in the prevention of dental caries in children and adolescents: a systematic review. *Journal of the Canadian Dental Association*, **2008**, 74(1), 73-9.
36. **Azevedo TD, Bezerra AC, de Toledo OA**. Feeding habits and severe early childhood caries in Brazilian preschool children. *Pediatric Dentistry*, **2005**, 27(1): 28-33.
37. **Babaahmady KG, Challacombe SJ, Marsh PD, Newman HN**. Ecological study of Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus and Lactobacillus spp. at sub-sites from approximal dental plaque from children. *Caries research*, **1998**, 32(1): 51-8.

38. **Baca P, Castillo AM, Baca AP, Liébana MJ, Junco P, et al.** Genotypes of *Streptococcus mutans* in saliva versus dental plaque. *Archives of oral biology*, **2008**, 53(8): 751-754.
39. **Bader JD, Shugars DA, Bonito AJ.** Systematic reviews of selected dental caries diagnostic and management methods. *Journal of Dental Education*, **2001**, 65(10): 960-8.
40. **Badjatia S, Badjatia RG, Thanveer K, Krishnan AC.** Effects of Fluoride Varnish on *Streptococcus mutans* Count in Saliva. *International journal of clinical pediatric dentistry*, **2017**, 10(1): 62-66.
41. **Bala A, Saxena P, Konstantinov IE.** Transthoracic drainage of large *Streptococcus milleri* liver abscess. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, **2006**, 131(3): 744-745.
42. **Banas JA, Vickerman MM.** Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **2003**, 14(2): 89-99.
43. **Bankson NW, Byrne MC.** The relationship between missing teeth and selected consonant sounds. *Journal of Speech and Hearing Disorders*, **1962**, 27(4): 341-348.
44. **Bayne SC, Thompson JY, Roberson TM, Heymann HO, Ritter AV.** Sturdevant's art and science of operative dentistry. *Chaper*, **2006**, 7: 307-44.
45. **Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, et al.** Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *Journal of Clinical Microbiology*, **2002**, 40: 1001-9.
46. **Begzati A, Meqa K, Siegenthaler D, Berisha M, Mautsch W.** Dental health evaluation of children in Kosovo. *European journal of dentistry*, **2011**, 5(1): 32-39.
47. **Beighton D, Russell RR, Whiley RA.** A simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries research*, **1991**, 25(3): 174-178.
48. **Beighton D.** The complex oral microflora of high - risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2005**, 33(4): 248-255.
49. **Beighton D, Manji F, Baelum V, Fejerskov O, Johnson NW, et al.** Associations between salivary levels of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, lactobacilli, and caries experience in Kenyan adolescents. *Journal of Dental Reserarch*, **1989**, 68(8): 1242-46.
50. **Bektaş S, Turgut M.** Çocuk Diş Hekimliğinde Çürük Risk Tayini. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **2010**, 11(3): 109-118.

51. **Beltrán-Aguilar ED, Goldstein JW, Lockwood SA.** Fluoride varnishes: a review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *The Journal of the American Dental Association*, **2000**, 131(5): 589-596.
52. **Ben-Aryeh H, Fisher M, Szargel R, Laufer D.** Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: changes with age. *Archives of Oral biology*, **1990**, 35(11): 929-931.
53. **Bender GR, Sutton SV, Marquis RE.** Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infection and immunity*, **1986**, 53(2): 331-338.
54. **Benelli EM, Serra MC, Rodrigues AL Jr, Cury JA.** In situ Anticariogenic Potential of Glass Ionomer Cement. *Caries Research*, **1993**, 27(4): 280-284.
55. **Berkowitz RJ.** Causes, treatment and prevention of early childhood caries: a microbiologic perspective. *Journal-Canadian Dental Association*, **2003**, 69(5): 304-307.
56. **Berkowitz RJ.** Mutans streptococci: acquisition and transmission. *Pediatric dentistry*, **2006**, 28(2): 106-109.
57. **Birkhed D.** Salivary secretion, buffer capacity and pH. *Human saliva: clinical chemistry and microbiology*, **1989**, 1: 25-73.
58. **Bloemendal E, de Vet HC, Bouter LM.** The value of bitewing radiographs in epidemiological caries research: a systematic review of the literature. *Journal of dentistry*, **2004**, 32(4): 255-264.
59. **Borremans M, Van Loco J, Van Den Meerssche P, Meunier J, Vrindts E, et al.** Analysis of fluoride in toothpastes on the Belgian market. *International journal of cosmetic science*, **2008**, 30(2): 145-152.
60. **Bowden GH.** Effects of fluoride on the microbial ecology of dental plaque. *Journal of dental research*, **1990**, 69(2): 653-659.
61. **Bowden GH, Li YH.** Nutritional influences on biofilm development. *Advances in Dental Research*, **1997**, 11(1): 81-99.
62. **Bowden GH, Odlum O, Nolette N, Hamilton IR.** Microbial populations growing in the presence of fluoride at low pH isolated from dental plaque of children living in an area with fluoridated water. *Infection and immunity*, **1982**, 36(1): 247-254.
63. **Bönecker M, Abanto J, Tello G, Oliveira LB.** Impact of dental caries on preschool children's quality of life: an update. *Brazilian oral research*, **2012**, 26(1): 103-107.

64. **Bradshaw DJ, Marsh PD, Hodgson RJ, Visser JM.** Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. *Caries research*, **2002**, 36.2: 81-86.
65. **Bravo M, Garcia-Anllo I, Baca P, Llodra JC.** A 48 - month survival analysis comparing sealant (Delton) with fluoride varnish (Duraphat) in 6 - to 8 - year-old children. *Community dentistry and oral epidemiology*, **1997**, 25(3): 247-250.
66. **Broadbent JM, Thomson WM.** For debate: problems with the DMF index pertinent to dental caries data analysis. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2005**, 33(6): 400-409.
67. **Brown LR, White JO, Horton IM, Dreizen S, Streckfuss JL.** Effect of continuous fluoride gel use on plaque fluoride retention and microbial activity. *Journal of dental research*, **1983**, 62(6): 746-751.
68. **Burne RA.** Oral streptococci... products of their environment. *Journal of Dental Research*, **1998**, 77(3): 445-452.
69. **Cameron AC, Widmer RP.** *Handbook of Pediatric Dentistry E-Book*. 4th ed., Elsevier Health Sciences, Australia, **2013**, 47-62.
70. **Camosci DA, Tinanoff N.** Anti-bacterial determinants of stannous fluoride. *Journal of dental research*, **1984**, 63(9): 1121-1125.
71. **Campus G, Lumbau A, Sanna AM, Solinas G, Lugliè P, et al.** Oral health condition in an Italian preschool population. *European Journal of Paediatric Dentistry*, **2004**, 5: 86-91.
72. **Canettieri AC, Kretchetoff FY, Koga Ito CY, Moreira D, Fajarra FJ, et al.** Production of monoclonal antibodies against *Streptococcus mutans* antigens. *Brazilian oral research*, **2006**, 20(4): 297-302.
73. **Cariño KM, Shinada K, Kawaguchi Y.** Early childhood caries in northern Philippines. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, **2003**, 31(2): 81-89.
74. **Carmona LE, Reyes N, González F.** Polymerase Chain Reaction for detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque of children from Cartagena, Colombia. *Colombia Médica*, **2011**, 42(4): 430-437.
75. **Castillo JL, Milgrom P.** Fluoride release from varnishes in two in vitro protocols. *The Journal of the American Dental Association*, **2004**, 135(12): 1696-1699.
76. **Caufield PW, Li Y, Dasanayake A.** Dental caries: an infectious and transmissible disease. *Pediatric Clinics of North America*, **2000**, 47(5): 1001-1019.

77. **Cengiz AT, Mısırlıgil A, Aydın M.** *Tip ve Dişhekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji*. 1. Baskı, Güneş Kitapevi, Ankara, **2004**, 17-57.
78. **Chau NP, Pandit S, Jung JE, Jeon JG.** Evaluation of Streptococcus mutans adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity. *Journal of dentistry*, **2014**, 42(6): 726-734.
79. **Chen L, Mao T, Du M, Yang Y, Xu Q,** et al. Caries status and quantification of four bacteria in saliva of Chinese preschool children: a cross-sectional study. *Journal of Dental Sciences*, **2014**, 9(3): 283-288.
80. **Chen Z, Saxena D, Caufield PW, Ge Y, Wang M,** et al. Development of species-specific primers for detection of Streptococcus mutans in mixed bacterial samples. *FEMS microbiology letters*, **2007**, 272(2): 154-162.
81. **Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA,** et al. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *Journal of clinical microbiology*, **2005**, 43(2): 843-849.
82. **Chin MY, Sandham A, Pratten J, Joop De Vries, van der Mei HC,** et al. Multivariate analysis of surface physico - chemical properties controlling biofilm formation on orthodontic adhesives prior to and after fluoride and chlorhexidine treatment. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **2006**, 78.2: 401-408.
83. **Choi EJ, Lee SH, Kim YJ.** Quantitative real-time polymerase chain reaction for Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in dental plaque samples and its association with early childhood caries. *International Journal of Paediatric Dentistry*, **2009**, 19: 141-147.
84. **Chu CH, Lo EC.** A review of sodium fluoride varnish. *General Dentistry*, **2005**, 54(4): 247-53.
85. **Clark DC, Stamm JW, Robert G, Tessier C.** Results of a 32-month fluoride varnish study in Sherbrooke and Lac-Megantic, Canada. *The Journal of the American Dental Association*, **1985**, 111(6): 949-953.
86. **Clark WB, Gibbons RJ.** Influence of salivary components and extracellular polysaccharide synthesis from sucrose on the attachment of Streptococcus mutans 6715 to hydroxyapatite surfaces. *Infection and immunity*, **1977**, 18(2): 514-523.
87. **Clarkson BH.** Rational use of fluorides in caries control. *Fluoride in dentistry*, **1996**, 347-357.
88. **Cogulu Dilsah, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F.** Genotyping of Streptococcus mutans by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. *Archives of oral Biology*, **2006**, 51(3): 177-182.

89. **Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, et al.** Microbial risk indicators of early childhood caries. *Journal of clinical microbiology*, **2005**, 43(11): 5753-5759.
90. **Corrêa-Faria P, Martins-Júnior PA, Vieira-Andrade RG, Marques LS, Ramos-Jorge ML.** Factors associated with the development of early childhood caries among Brazilian preschoolers. *Brazilian oral research*, **2013**, 27(4): 356-362.
91. **Costa LR, Daher A, Queiroz MG.** Early childhood caries and body mass index in young children from low income families. *International journal of environmental research and public health*, **2013**, 10(3): 867-878.
92. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **1999**, 284(5418): 1318-1322.
93. **Coykendall AL.** Classification and identification of the viridans streptococci. *Clinical Microbiology Reviews*, **1989**, 2(3): 315-328.
94. **Çakır FY, Gürkan S, Attar N.** Çürük Mikrobiyolojisi. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **2010**, 34(3): 78-91.
95. **Çolak H, Dülgergil ÇT, Dalli M, Hamidi MM.** Early childhood caries update: A review of causes, diagnoses, and treatments. *Journal of natural science, biology, and medicine*, **2013**, 4(1): 29-38.
96. **Dasanayake AP, Caufield PW.** Prevalence of dental caries in Sri Lankan aboriginal Veddha children. *International dental journal*, **2002**, 52(6): 438-444.
97. **Davey ME, O'toole GA.** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, **2000**, 64(4): 847-867.
98. **Davies GN.** Early childhood caries—a synopsis. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, **1998**, 26(1): 106-116.
99. **Dawes C.** Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *Journal of Dental Research*, **1987**, 66(1): 648-653.
100. **De Almeida Pdel V, Grégio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR.** Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The Journal of Contemporary Dental Practise*, **2008**, 9(3): 72-80.
101. **De Amorim RG, Leal SC, Bezerra AC, de Amorim FP, de Toledo OA.** Association of chlorhexidine and fluoride for plaque control and White spot lesion remineralization in primary dentition. *International Journal of Paediatric Dentistry*, **2008**, 18(6): 446-51.

102. **De Grauwe A, Aps JK, Martens LC.** Early Childhood Caries (ECC): what's in a name?. *European Journal of Paediatric Dentistry*, **2004**, 5(2): 62-70.
103. **De Marsillac Mde W, Vieira Rde S.** Assesment of artificial caries lesions through scanning electron microscopy and cross-sectional microhardness test. *Indian Journal of Dental Research*, **2013**, 24(2): 249.
104. **De Soet JJ, van Dalen PJ, Pavicic MJ, de Graaff J.** Enumeration of mutans streptococci in clinical samples by using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, **1990**, 28(11): 2467-2472.
105. **Dean HT, Arnold FA, Elvove E.** Domestic water and dental caries. *Public Health Reports*, **1942**, 57(32): 1155-79.
106. **Dean JA, Hughes CV.** Mechanical and chemotherapeutic home oral hygiene. *McDonald and Avery's Dentistry for the Child and Adolescent*. 9th Ed., Maryland Heights, Mosby Elsevier, **2011**, 205-22.
107. **Diamanti I, Koletsi-Kounari H, Mamai-Homata E, Vougiouklakis G.** In vitro evaluation of fluoride and calcium sodium phosphosilicate toothpastes, on root dentine caries lesions. *Journal of dentistry*, **2011**, 39(9): 619-628.
108. **Diaz-Arnold AM, Marek CA.** The impact of saliva on patient care: A literature review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, **2002**, 88(3): 337-343.
109. **Dijkman A, Huizinga E, Ruben J, Arends J.** Remineralization of human enamel in situ after 3 months: the effect of not brushing versus the effect of an F dentifrice and an F-free dentifrice. *Caries research*, **1990**, 24(4): 263-266.
110. **Divaris K, Preisser JS, Slade GD.** Surface-specific efficacy of fluoride varnish in caries prevention in the primary dentition: results of a community randomized clinical trial. *Caries research*, **2013**, 47(1): 78-87.
111. **Do LG, Spencer A.** Oral Health - Related Quality of Life of Children by Dental Caries and Fluorosis Experience. *Journal of public health dentistry*, **2007**, 67(3): 132-139.
112. **Donlan RM.** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 2002, 8(9): 881-90.
113. **Dos Santos AP, Nadanovsky P, de Oliveira BH.** A systematic review and meta - analysis of the effects of fluoride toothpastes on the prevention of dental caries in the primary dentition of preschool children. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2013**, 41(1): 1-12.
114. **Douglas CW, Russell RR.** Effect of specific antisera on adherence properties of the oral bacterium *Streptococcus mutans*. *Archives of oral biology*, **1982**, 27(12): 1039-1045.

115. **Drucker DB, Green RM.** The relative cariogenicity of different streptococci in the gnotobiotic WAG/RIJ rat. *Archives of oral biology*, **1981**, 26(7): 599-606.
116. **Duchin S, van Houte J.** Colonization of teeth in humans by *Streptococcus mutans* as related to its concentration in saliva and host age. *Infection and Immunity*, **1978**, 20(1): 120-5.
117. **Franco e Franco TC, Amoroso P, Marin JM, de Avila FA.** Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from Brazilian preschool children by polymerase chain reaction. *Brazilian dental journal*, **2007**, 18(4): 329-333.
118. **Eakle WS, Featherstone JD, Weintraub JA, Shain SG, Gansky SA.** Salivary fluoride levels following application of fluoride varnish or fluoride rinse. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2004**, 32(6): 462-469.
119. **Edgar WM.** Saliva: its secretion, composition and functions. *British dental journal*, **1992**, 172(8): 305-312.
120. **Edwardsson S.** *Microorganisms associated with dental caries*. In: Textbook of cariology. 1st Ed., Copenhagen, Munksgaard Ltd, **1986**, 107-130.
121. **Eisenberg AD, Wegman MR, Oldershaw MD, Curzon ME.** Effect of fluoride, lithium or strontium on acid production by pelleted human dental plaque. *Caries research*, **1985**, 19(5): 454-457.
122. **Ellwood R, Fejerskov O, Cury JA, Clarkson B.** Fluorides in caries control. In: Dental caries. The disease and its clinical management. 2nd Ed., Oxford, Munksgaard Ltd, **2008**, 287-322.
123. **Ellwood R, Fejerskov O, Cury JA, Clarkson B.** The role of saliva. In: Dental caries. The disease and its clinical management. 2nd Ed., Oxford, Munksgaard Ltd, **2008**, 189-203.
124. **Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE.** Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews*, **2000**, 13(4): 559-570.
125. **Emanuelsson IM.** *Mutans streptococci in families and on tooth sites. Studies on the distribution, acquisition and persistence using DNA fingerprinting.* *Swedish Dental Journal Supplement*, **2001**, 148: 1-66.
126. **Emilson CG.** Prevalence of *Streptococcus mutans* with different colonial morphologies in human plaque and saliva. *European Journal of Oral Sciences*, **1983**, 91(1): 26-32.
127. **Emilson CG.** Potential efficacy of chlorhexidine against *mutans streptococci* and human dental caries. *Journal of Dental Research*, **1994**, 73(3): 682-691.

128. **Ericsson Y, Hardwick L.** *Individual diagnosis, prognosis and counselling for caries prevention.* In: Progress in Caries Prevention. 1st Ed., Stockholm, Karger Publishers, **1978**, 94-102.
129. **Erlich HA.** PCR technology: Principles and Applications for DNA Amplification. X+ 246 S. *Journal of Basic Microbiology*, **1990**, 30(10): 736-736.
130. **Brambilla E, García-Godoy F, Strohmeier L.** Principles of diagnosis and treatment of high-caries-risk subjects . *Dental Clinics of North America*, **2000**, 44(3): 507.
131. **Facklam R.** What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical microbiology reviews*, **2002**, 15(4): 613-630.
132. **Featherstone JD.** Dental caries: a dynamic disease process. *Australian dental journal*, **2008**, 53(3): 286-291.
133. **Featherstone JD.** Caries prevention and reversal based on the caries balance. *Pediatric dentistry*, **2006**, 28(2): 128-132.
134. **Featherstone JD.** Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community dentistry and oral epidemiology*, **1999**, 27(1): 31-40.
135. **Featherstone JD.** The science and practice of caries prevention. *The Journal of the American dental association*, **2000**, 131(7): 887-899.
136. **Fejerskov O, Kidd E.** *Dental Caries and The Disease and It's Clinical Management.* 1st Ed., Oxford, Blackwell Munsgaard Ltd , **2003**, 61-142.
137. **Fejerskov O, Kidd E.** *Defining the disease: an introduction.* In: Dental caries: the disease and its clinical management. 2nd Ed., Oxford, Blackwell Munksgaard Ltd , 2008, 4-6.
138. **Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ.** Rational use of fluorides in caries prevention: a concept based on possible cariostatic mechanisms. *Acta Odontologica Scandinavica*, **1981**, 39(4): 241-249.
139. **Ferraz NK, Nogueira LC, Pinheiro ML, Marques LS, Ramos-Jorge ML, Ramos-Jorge J.** Clinical consequences of untreated dental caries and toothache in preschool children. *Pediatric dentistry*, **2014**, 36(5): 389-392.
140. **Ferreira JMS, Aragão AKR, Rosa ADB, Sampaio FC, Menezes VA.** Therapeutic effect of two fluoride varnishes on white spot lesions: a randomized clinical trial. *Brazilian Oral Research*, **2009**, 23(4): 446-51.

141. **Finlayson TL, Siefert K, Ismail AI, Sohn W.** Psychosocial factors and early childhood caries among low - income African–American children in Detroit. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2007**, 35(6): 439-448.
142. **Fisher-Owens SA, Gansky SA, Platt LJ, Weintraub JA, Soobader MJ,** et al. Influences on children's oral health: a conceptual model. *Pediatrics*, **2007**, 120(3): 510-520.
143. **Forss H, Seppä L.** Studies on the effect of fluoride released by glass ionomers in the oral cavity. *Advances in Dental Research*, **1995**, 9(4): 389-393.
144. **Gao SS, Zhang S, Mei ML, Lo EC, Chu CH.** Caries remineralisation and arresting effect in children by professionally applied fluoride treatment—a systematic review. *BMC oral health*, **2016**, 16: 12.
145. **Gao XJ, Fan Y, Kent RL Jr, Van Houte J, Margolis HC.** Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *Journal of dental research*, **2001**, 80(9): 1834-1839.
146. **Gao XL, Seneviratne CJ, Lo EC, Chu CH, Samaranayake LP.** Novel and conventional assays in determining abundance of *Streptococcus mutans* in saliva. *International journal of paediatric dentistry*, **2012**, 22(5): 363-368.
147. **Ge Y, Caufield PW, Fisch S, Li Y.** *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* Colonization Correlated with Caries Experience in Children. *Caries Research*, **2008**, 42(6): 444-448.
148. **Ghasempour M, Rajabnia R, Irannejad A, Hamzeh M, Ferdosi E,** et al. Frequency, biofilm formation and acid susceptibility of *streptococcus mutans* and *streptococcus sobrinus* in saliva of preschool children with different levels of caries activity. *Dental research journal*, **2013**, 10(4): 440-5.
149. **Gibbons RJ.** Microbial ecology adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *Journal of Dental Research*, **1984**, 63(3): 378-385.
150. **Gibbons RJ.** Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *Journal of dental research*, **1989**, 68(5): 750-760.
151. **Gold J.** Fluoride varnish with community-based oral health promotion may reduce surface-level caries risk in preschool children. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, **2013**, 13(2): 55-57.
152. **Gold OG, Jordan HV, Van Houte J.** A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, **1973**, 18(11): 1357-1364.
153. **Gopinath VK, Arzreanne AR.** Saliva as a diagnostic tool for assessment of dental caries. *Archives of orofacial sciences*, **2006**, 1: 57-59.

154. **Goswami M, Saha S, Chaitra TR.** Latest developments in non-fluoridated remineralizing technologies. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, **2012**, 30(1): 2-6.
155. **Gökalp, S, Doğan BG, Tekçiçek M, Berberoğlu A, Ünlüer Ş.** *Türkiye Ağız-Diş Sağlığı Profili*. TC Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Basımevi, Ankara, **2006**, 31-32.
156. **Grindefjord M, Dahllöf G, Nilsson B, Modéer T.** Stepwise prediction of dental caries in children up to 3.5 years of age. *Caries research*, **1996**, 30(4): 256-266.
157. **Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL.** Beyond Streptococcus mutans: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PloS one*, **2012**, 7(10): e47722.
158. **Grönroos L, Saarela M, Mättö J, Tanner-Salo U, Vuorela A, et al.** Mutacin production by Streptococcus mutans may promote transmission of bacteria from mother to child. *Infection and immunity*, **1998**, 66(6): 2595-2600.
159. **Guido JA, Martinez Mier EA, Soto A, Eggertsson H, Sanders BJ, et al.** Caries prevalence and its association with brushing habits, water availability, and the intake of sugared beverages. *International journal of paediatric dentistry*, **2011**, 21(6): 432-440.
160. **Gussy MG, Waters EG, Walsh O, Kilpatrick NM.** Early childhood caries: evidence for aetiology and prevention. *Journal of Paediatrics and Child Health*, **2006**, 42(1-2): 37-43.
161. **Ünsal G.** Şiddetli Erken Çocukluk Çağı Çürüğünde Rol Oynayan Mikroorganizmalar ve Yeni Patojen Scardovia Wiggisiae'nin Bulunma Sıklığının Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. Doktora, İstanbul Üniveristesi, İstanbul, **2015**.
162. **Hamada S, Torii M.** Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of Streptococcus mutans and cell adherence to glass surfaces. *Infection and Immunity*, **1978**, 20(3): 592-9.
163. **Hamada S, Koga T, Ooshima T.** Virulence factors of Streptococcus mutans and dental caries prevention. *Journal of dental research*, **1984**, 63(3): 407-411.
164. **Hamada S, Slade HD.** Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. *Microbiological reviews*, **1980**, 44(2): 331-384.
165. **Ersin NK, Kocabas EH, Alpoz AR, Uzel A.** Transmission of Streptococcus mutans in a group of Turkish families. *Molecular Oral Microbiology*, **2004**, 19(6): 408-10.

166. **Hameş-Kocabaş EE, Uçar F, Kocataş Ersin N, Uzel A, Alpöz AR.** Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish children. *Microbiological research*, **2008**, 163(2): 168-172.
167. **Hamilton IR, Ellwood DC.** Effects of fluoride on carbohydrate metabolism by washed cells of *Streptococcus mutans* grown at various pH values in a chemostat. *Infection and immunity*, **1978**, 19(2): 434-42.
168. **Hamilton IR, Bowden GHW.** *Fluoride effects on oral bacteria*. In: Fluoride in dentistry. Copenhagen, Munksgaard, **1996**, 230-51.
169. **Hamilton IR, Bowden GH.** Response of freshly isolated strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus mitior* to change in pH in the presence and absence of fluoride during growth in continuous culture. *Infection and immunity*, **1982**, 36(1): 255-262.
170. **Hamilton IR.** Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *Journal of Dental Research*, **1990**, 69(2): 660-667.
171. **Hannig C, Hannig M, Attin T.** Enzymes in the acquired enamel pellicle. *European journal of oral sciences*, **2005**, 113(1): 2-13.
172. **Hardie JM.** Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. *British Dental Journal*, **1992**, 172(7): 271-278.
173. **Hardie JM.** The microbiology of dental caries. *Dental update*, **1982**, 9(4): 199-200.
174. **Harper DS, Loesche WJ.** Inhibition of acid production from oral bacteria by fluorapatite-derived fluoride. *Journal of dental research*, **1986**, 65(1): 30-33.
175. **Harper DS, Loesche WJ.** Basic Biological Sciences: Effect of pH Upon Sucrose and Glucose Catabolism by the Various Genogroups of *Streptococcus mutans*. *Journal of dental research*, **1983**, 62(5): 526-531.
176. **Harrison R.** Oral health promotion for high-risk children: case studies from British Columbia. *Journal-Canadian Dental Association*, **2003**, 69(5): 292-297.
177. **Hashim R, Williams SM, Murray Thomson W.** Diet and caries experience among preschool children in Ajman, United Arab Emirates. *European journal of oral sciences*, **2009**, 117(6): 734-740.
178. **Hata S, Hata H, Miyasawa-Hori H, Kudo A, Mayanagi H.** Quantitative detection of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of Japanese preschool children by real - time PCR. *Letters in applied microbiology*, **2006**, 42(2): 127-131.

179. **Hazelrigg CO, Dean JA, Fontana M.** Fluoride varnish concentration gradient and its effect on enamel demineralization. *Pediatric Dentistry*, **2003**, 25(2): 119-26.
180. **Hegde PP, Kumar BA, Ankola VA.** Dental caries experience and salivary levels of Streptococcus mutans and Lactobacilli in 13-15 years old children of Belgaum city, Karnataka. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, **2005**, 23(1): 23-6.
181. **Hegde SK, Kumar KBS, Sudha P, Bhat SS.** Estimation of salivary bacteria capable of inhibiting and stimulating Streptococcus mutans and its correlation to dental caries and untreated carious teeth. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, **2005**, 23(3): 126-130.
182. **Helfenstein U, Steiner M.** Fluoride varnishes (Duraphat): A meta-analysis. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, **1994**, 22(1): 1-5.
183. **Herguner SS, Hurmuzlu F.** Çürük aktivite testleri. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **2005**, 8(2): 113-118.
184. **Hirose H, Hirose K, Isogai E, Miura H, Ueda I.** Close association between Streptococcus sobrinus in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. *Caries Research*, **1993**, 27(4): 292-297.
185. **Holan G, Needleman HL.** Premature loss of primary anterior teeth due to trauma—potential short - and long - term sequelae. *Dental Traumatology*, **2014**, 30(2): 100-106.
186. **Holbrook WP, Beighton D.** Streptococcus mutans levels in saliva and distribution of serotypes among 9 - year - old Icelandic children. *European Journal of Oral Sciences*, **1987**, 95(1): 37-42.
187. **Holm AK.** Effect of a fluoride varnish (Duraphat) in preschool children. *Community dentistry and oral epidemiology*, **1979**, 7(5): 241-5.
188. **Homer KA, Patel R, Beighton D.** Effects of N-acetylglucosamine on carbohydrate fermentation by Streptococcus mutans NCTC 10449 and Streptococcus sobrinus SL-1. *Infection and immunity*, **1993**, 61(1): 295-302.
189. **Hooley M, Skouteris H, Boganin C, Satur J, Kilpatrick N.** Parental influence and the development of dental caries in children aged 0–6 years: a systematic review of the literature. *Journal of dentistry*, **2012**, 40(11): 873-85.
190. **Horowitz HS.** *Topical fluoride in caries prevention*. In: Fluoride in dentistry. 2nd Ed., Munksgaard, Copenhagen, **1996**, 347-357.

191. **Hoshino T, Fujiwara T, Kilian M.** Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *Journal of clinical microbiology*, **2005**, 43(12): 6073-6085.
192. **Hughes CV, Dahlan M, Papadopoulou E, Loo CY, Pradhan NS, et al.** Aciduric microbiota and mutans streptococci in severe and recurrent severe early childhood caries. *Pediatric dentistry*, **2012**, 34(2): 16-23.
193. **Hulan U, Sarantuya J, Tselmeg B, Soyolmaa M.** Detection of mutans streptococci in plaque samples from Mongolian preschool and school children. *Pediatric Dental Journal*, **2010**, 20(2): 171-176.
194. **Humphrey SP, Williamson RT.** A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of prosthetic dentistry*, **2001**, 85(2): 162-169.
195. **Hunter PB.** Risk factors in dental caries. *International dental journal*, **1988**, 38(4): 211-217.
196. **Igarashi T, Yamamoto A, Goto N.** PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*. *Journal of medical microbiology*, **2000**, 49(12): 1069-74.
197. **Igarashi T, Ichikawa K, Yamamoto A, Goto N.** Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the dex genes. *Journal of microbiological methods*, **2001**, 46(2): 99-105.
198. **Iheozor-Ejiofor Z, Worthington HV, Walsh T, O'Malley L, Clarkson JE, et al.** Water fluoridation for the prevention of dental caries. *Cochrane database of systematic reviews*, **2015**, 12(6).
199. **Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, Reid G, Okada M, et al.** Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the in vitro growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. *Applied and environmental microbiology*, **2012**, 78(7): 2190-9.
200. **Ismail AI.** Prevention of early childhood caries. *Community dentistry and oral epidemiology*, **1998**, 26(1): 49-61.
201. **Jacobs JA, Pietersen HG, Stobberingh EE, Soeters PB.** *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius* clinical relevance, hemolytic and serologic characteristics. *American journal of clinical pathology*, **1995**, 104(5): 547-53.
202. **Jacques N.** Molecular biological techniques and their use to study streptococci in dental caries. *Australian dental journal*, **1998**, 43(2): 87-98.

203. **Jayaraman GC, Penders JE, Burne RA.** Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* hrcA, grpE and dnaK genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Molecular microbiology*, **1997**, 25(2): 329-341.
204. **Jenkins S, Addy M, Wade W.** The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *Journal of clinical periodontology*, **1988**, 15(7): 415-424.
205. **Jensen B, Bratthall D.** A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva. *Journal of dental research*, **1989**, 68(3): 468-471.
206. **Jiang W, Zhang J, Chen H.** Pyrosequencing analysis of oral microbiota in children with severe early childhood dental caries. *Current microbiology*, 2013, 67(5): 537-542.
207. **Johansson I, Holgerson PL, Kressin NR, Nunn ME, Tanner AC.** Snacking habits and caries in young children. *Caries research*, **2010**, 44(5): 421-430.
208. **Jose T, Thomas A, Pidamale R, Mhambrey S, Shetty SB.** Research Article- Correlation Between C. Albicans, S. Mutans, S. Sanguinis and Lactobacillus in ECC, S-ECC and Caries Free Children. *International Journal of Recent Scientific Research*, **2014**, 5(2): 352-356.
209. **Kagihara LE, Huebner CE, Mouradian WE, Milgrom P, Anderson BA.** Parents' perspectives on a dental home for children with special health care needs. *Special Care in Dentistry*, **2011**, 31(5):170-7.
210. **Kagihara LE, Niederhauser VP, Stark M.** Assessment, management, and prevention of early childhood caries. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, **2009**, 21(1): 1-10.
211. **Kaikurel MK, Thomas A, Shetty SB, Jose T, Pidamale R, et al.** The Prevalence of Early Childhood Caries (ECC) and Its Associated Risk Factors Among Immigrant Tibetan Pre-School Children in Bylakuppe, Mysore, India. *Science Journal of Public Health*, **2015**, 3(3): 384-390.
212. **Kalra N.** Sequelae of neglected pulpal infections of deciduous molars. *Endodontology*, **1994**, 6(2): 19-23.
213. **Kamiya RU, Napimoga MH, Höfling JF, Gonçalves RB.** Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. *Journal of medical microbiology*, **2005**, 54(6): 599-604.
214. **Kanasi E, Johansson I, Lu SC, Kressin NR, Nunn ME, et al.** Microbial risk markers for childhood caries in pediatricians' offices. *Journal of dental research*, **2010**, 89(4): 378-383.
215. **Kanasi E, Dewhirst FE, Chalmers NI, Kent JR, Moore A, et al.** Clonal Analysis of the Microbiota of Severe Early Childhood Caries. *Caries Research*, **2010**, 44(4): 485-497.

216. **Karjalainen S, Söderling E, Sewón L, Lapinleimu H, Simell O.** A prospective study on sucrose consumption, visible plaque and caries in children from 3 to 6 years of age. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2001**, 29(2): 136-142.
217. **Kaprinski TM, Szkaradkiewicz AK.** Microbiology of dental caries. *Journal of biology and earth sciences*, **2013**, 3(1): 21-24.
218. **Kavanagh DA, Svehla G.** Variation of salivary calcium, phosphate and buffering capacity in adolescents. *Archives of oral biology*, **1998**, 43(12): 1023-1027.
219. **Keene HJ, Shklair IL, Anderson DM, Mickel GJ.** Relationship of Streptococcus mutans biotypes to dental caries prevalence in Saudi Arabian naval men. *Journal of dental research*, **1977**, 56(4): 356-361.
220. **Kelstrup J, Theilade J, Poulsen S, Møller IJ.** Bacteriological, electron microscopical, and biochemical studies on dento-gingival plaque of Moroccan children from an area with low caries prevalence. *Caries research*, **1974**, 8(1): 61-83.
221. **Kessler HE.** The relationship of dentistry to speech. *The Journal of the American Dental Association*, **1954**, 48(1): 44-49.
222. **Kidd EAM.** *Clinical and histological features of carious lesions*. In: Essentials of Dental Caries. 3rd Ed., New York, NY, Oxford University Press Inc, **2005**, 22-41.
223. **Kidd EAM.** *Introduction*. In: Essentials of Dental Caries. 3rd Ed., New York, NY, Oxford University Press Inc, **2005**, 1-19.
224. **Kidd EAM.** *Prevention of caries by plaque control*. In: Essentials of Dental Caries. 3rd Ed., New York, NY, Oxford University Press Inc, **2005**, 68-87.
225. **Kleinberg I.** A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to Streptococcus mutans and the specific-plaque hypothesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **2002**, 13(2): 108-25.
226. **Klinke T, Urban M, Lück C, Hannig C, Kuhn M, et al.** Changes in Candida spp., mutans streptococci and lactobacilli following treatment of early childhood caries: a 1-year follow-up. *Caries research*, **2014**, 48(1): 24-31.
227. **Klock B, Krasse B.** Microbial and salivary conditions in 9-to 12-year-old children. *European Journal of Oral Sciences*, **1977**, 85(1): 56-63.

228. **Kohler B, Bjarnason S, Finnbogason SY, Holbrook WP.** Mutans streptococci, lactobacilli and caries experience in 12-year-old Icelandic urban children, 1984 and 1991. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, **1995**, 23(2): 65–68.
229. **Koray F.** *Diş çürükleri*. 1. Baskı, İstanbul, Altın Matbaacılık, **1981**, 45-50.
230. **Krasse B, Jordan HV, Edwardsson S, Svensson I, Trelle L.** The occurrence of certain “caries-inducing” streptococci in human dental plaque material: With special reference to frequency and activity of caries. *Archives of oral biology*, **1968**, 13(8): 911-918.
231. **Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F.** Competition and Coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *Journal of Bacteriology*, **2005**, 187(21), 7193–7203.
232. **Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC.** Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, **2008**, 190(13): 4632-40.
233. **Kreth J, Zhu L, Merritt J, Shi W, Qi F.** Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. *Molecular Oral Microbiology*, **2008**, 23(3): 213-219.
234. **Kreulen CM, de Soet HJ, Hogeveen R, Veerkamp JS.** *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. *ASDJ Journal of Dentistry for Children*, **1997**, 64(2): 107-11.
235. **Kulkarni VV, Damle SG.** Comparative evaluation of efficacy of sodium fluoride, chlorhexidine and triclosan mouth rinses in reducing the mutans streptococci count in saliva: An in vivo study. *Journal of Indian Society of the Pedodontics and Preventive Dentistry*, **2003**, 21(3): 98-104.
236. **Kulkarni GV, Chan KH, Sandham HJ.** An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. *Journal of Dental Research*, **1989**, 68(7): 1155-61.
237. **Padma Kumari B, Retnakumari N.** Loss of space and changes in the dental arch after premature loss of the lower primary molar: a longitudinal study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, **2006**, 24(2): 90-6.
238. **Kuramitsu HK.** Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **1993**, 4(2): 159-176.
239. **Külekcı HG.** Ağız mikroorganizmaları üzerine florürün etkisi. *İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **2000**, 34: 1-6.

240. **Lam A, Chu CH.** Caries management with fluoride varnish of children in US. *The New York state dental journal*, **2011**, 77(4): 38-42.
241. **Lang NP, Hotz PR, Gusberti FA, Joss A.** Longitudinal clinical and microbiological study on the relationship between infection with *Streptococcus mutans* and the development of caries in humans. *Molecular Oral Microbiology*, 1987, 2(1): 39-47.
242. **Larmas M.** A new dip-slide method for the counting of salivary lactobacilli. *Proceedings of the Finnish Dental Society*, **1975**, 71(2): 31-35.
243. **Larmas M.** Simple tests for caries susceptibility. *International dental journal*, **1985**, 35(2): 109-117.
244. **Lawrence HP, Binguis D, Douglas J, McKeown L, Switzer B,** et al. A 2-year community-randomized controlled trial of fluoride varnish to prevent early childhood caries in Aboriginal children. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2008**, 36(6): 503-516.
245. **Lecompte EJ.** Clinical application of topical fluoride products—risks, benefits, and recommendations. *Journal of dental research*, **1987**, 66(5): 1066-1071.
246. **Lee C, Tinanoff N, Minah G, Romberg E.** Effect of *Mutans streptococcal* colonization on plaque formation and regrowth in young children—A brief communication. *Journal of public health dentistry*, **2008**, 68(1): 57-60.
247. **Lee PY, Chou MY, Chen YL, Chen LP, Wang CJ,** et al. Comprehensive dental treatment under general anesthesia in healthy and disabled children. *Chang Gung Medical Journal*, **2009**, 32(6): 636-42.
248. **Leroy R, Hoppenbrouwers K, Jara A, Declerck D.** Parental smoking behavior and caries experience in preschool children. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2008**, 36(3): 249-257.
249. **Leung KP, Crowe TD, Abercrombie JJ, Molina CM, Bradshaw CJ,** et al. Control of oral biofilm formation by an antimicrobial decapeptide. *Journal of dental research*, **2005**, 84(12): 1172-1177.
250. **Levine RS, Nugent ZJ, Pitts NB.** Pain prediction for preventive non-operative management of dentinal caries in primary teeth in general dental practice. *British dental journal*, **2003**, 195(4): 202-206.
251. **Li Y, Caufield PW.** Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of *mutans streptococci* from humans. *Molecular Oral Microbiology*, **1998**, 13(1): 17-22.
252. **Li YH, Bowden GH.** Characteristics of accumulation of oral gram-positive bacteria on mucin-conditioned glass surfaces in a model system. *Molecular Oral Microbiology*, **1994**, 9(1): 1-11.

253. **Li Y, Caufield PW, Emanuelsson IR, Thornqvist E.** Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Molecular Oral Microbiology*, **2001**, 16(1): 16-23.
254. **Li Y, Caufield PW.** The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *Journal of Dental Research*, **1995**, 74(2): 681-685.
255. **Li Y, Navia JM, Bian JY.** Caries experience in deciduous dentition of rural Chinese children 3–5 years old in relation to the presence or absence of enamel hypoplasia. *Caries research*, **1996**, 30(1): 8-15.
256. **Li Y, Zhang Y, Yang R, Zhang Q, Zou J, et al.** Associations of social and behavioural factors with early childhood caries in Xiamen city in China. *International journal of paediatric dentistry*, **2011**, 21(2): 103-111.
257. **Li Y, Navia JM, Caufield PW.** Colonization by mutans streptococci in the mouths of 3-and 4-year-old Chinese children with or without enamel hypoplasia. *Archives of Oral Biology*, **1994**, 39(12): 1057-1062.
258. **Linossier AG, Valenzuela CY, Toledo H.** Differences of the oral colonization by *Streptococcus* of the mutans group in children and adolescents with Down syndrome, mental retardation and normal controls. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, **2008**, 13(9): 536-9.
259. **Liu J, Bian Z, Fan M, He H, Nie M, Fan B, et al.** Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed PCR in patients undergoing orthodontic treatment. *Caries research*, **2004**, 38(6): 523-529.
260. **Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, et al.** Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, **2004**, 97(6): 1311-1318.
261. **Li YH, Bowden GH.** The effect of environmental pH and fluoride from the substratum on the development of biofilms of selected oral bacteria. *Journal of dental research*, **1994**, 73(10): 1615-1626.
262. **Li Y, Ge Y, Saxena D, Caufield PW.** Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *Journal of clinical microbiology*, **2007**, 45(1): 81-87.
263. **Li Y, Argimón S, Schön CN, Saraithong P, Caufield PW.** Characterizing diversity of Lactobacilli associated with severe early childhood caries: a study protocol. *Advances in microbiology*, **2015**, 5(1): 9-20.
264. **Lindquist B, Emilson CG.** Distribution and prevalence of mutans streptococci in the human dentition. *Journal of dental research*, **1990**, 69(5): 1160-1166.

265. **Linke HA.** New method for the isolation of *Streptococcus mutans* and its differentiation from other oral streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*, **1977**, 5(6): 604-9.
266. **Liu J, Bian Z, Fan M, He H, Nie M,** et al. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed PCR in patients undergoing orthodontic treatment. *Caries Research*, **2004**, 38(6): 523-9.
267. **Loesche WJ, Straffon LH.** Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. *Infection and Immunity*, **1979**, 26(2): 498-507.
268. **Loesche WJ.** Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*, **1986**, 50(4): 353-380.
269. **Longo PL, Mattos-Graner RO, Mayer MP.** Determination of mutacin activity and detection of mutA genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. *Molecular Oral Microbiology*, **2003**, 18(3): 144-149.
270. **Van Loveren C, Van de Plassche-Simons YM, De Soet JJ, De Graaff J, Ten Cate JM.** Acidogenesis in relation to fluoride resistance of *Streptococcus mutans*. *Molecular Oral Microbiology*, **1991**, 6(5): 288-291.
271. **Loyola-Rodriguez JP, Martinez-Martinez RE, Flores-Ferreira BI, Patiño-Marin N, Alpuche-Solis AG,** et al. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Mexican preschool caries-free and caries-active children by microbial and molecular (PCR) assays. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, **2007**, 32(2): 121-126.
272. **Roberson TM, Lundeen TF.** *Cariology: The lesion, etiology, prevention and control*. In: Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry, 4th Ed., St. Louis, Mosby, **2002**, 98-129.
273. **Luo AH, Yang DQ, Xin BC, Paster BJ, Qin J.** Microbial profiles in saliva from children with and without caries in mixed dentition. *Oral Diseases*, **2012**, 18(6): 595-601.
274. **Lussi A, Angmar-Mansson B.** *Additional diagnostic measures*. In: Dental caries. 2nd Ed., Oxford, Blackwell Munksgaard, **2008**, 89-101.
275. **Luzzi V, Fabbrizi M, Coloni C, Mastrantoni C, Mirra C,** et al. Experience of dental caries and its effects on early dental occlusion: a descriptive study. *Annali di stomatologia*, **2011**, 2(1-2): 13-18.
276. **Ma TS.** Applications and limitations of polymerase chain reaction amplification. *Chest*, **1995**, 108(5): 1393-1405
277. **Ma Y, Lassiter MO, Banas JA, Galperin MY, Taylor KG,** et al. Multiple glucan-binding proteins of *Streptococcus sobrinus*. *Journal of bacteriology*, **1996**, 178(6): 1572-1577.

278. **Mackay IM.** Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, **2004**, 10(3): 190-212.
279. **Maiden MFJ.** Characteristics of oral gram-positive bacteria. *Contemporary oral microbiology and immunology*, **1992**, 356-357.
280. **Majithia U, Venkataraghavan K, Choudhary P, Trivedi K, Shah S, et al.** Comparative evaluation of application of different fluoride varnishes on artificial early enamel lesion: An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, **2016**, 27(5): 521-527.
281. **Mandel ID.** Fluoride varnishes – A welcome addition. *Journal of Public Health Dentistry*, **1994**, 54(2): 67.
282. **Marinho VC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE.** Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *The Cochrane Library*, **2013**, 11(7), CD002279.
283. **Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A.** Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Review*, **2002**, (3), CD002279.
284. **Marsh PD.** Dental plaque as a biofilm and a microbial community— implications for health and disease. *BMC Oral Health*, **2006**, 6(1): 14.
285. **Marsh PD, Martin MV.** *Oral Microbiology*. 5th Ed., Oxford, Elsevier, **2009**, 74-102.
286. **Marsh PD.** Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *Journal of Dental Research*, **1992**, 71(7): 1431-1438.
287. **Marsh PD.** The significance of maintaining the stability of the natural microflora of the mouth. *British dental journal*, **1991**, 171(6): 174-177.
288. **Marsh PD, Bradshaw DJ.** The effect of fluoride on the stability of oral bacterial communities in vitro. *Journal of dental research*, **1990**, 69(2): 668-671.
289. **Marsh PD.** Are dental diseases examples of ecological catastrophes?. *Microbiology*, **2003**, 149(2): 279-294.
290. **Marsh PD.** Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dental clinics of north America*, **1999**, 43(4): 599-614.
291. **Marsh PD.** Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dental Clinics of North America*, **2010**, 54(3): 441-454.
292. **Marsh PD, Martin MV.** *Oral Microbiology*, 5th Ed., Elsevier health sciences, 2009, 45-72.

293. **Marshall TA.** Diet and nutrition in pediatric dentistry. *Dental Clinics of North America*, **2003**, 47(2): 279-303.
294. **Marsh PD, Bradshaw DJ.** Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology*, **1995**, 15(3): 169-75.
295. **Martin EF, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N.** Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *Journal of Clinical Microbiology*, **2002**, 40(5): 1698-1704.
296. **Martinez-Martinez RE, Fujiwara T, Patino-Marin N, Hoshino T, Wilson M, et al.** Comparison of oral streptococci biofilm in cariesfree and caries-affected preschool Mexican children. *Acta Odontologica Latinoamericana*, **2012**, 25(1): 27-32.
297. **Matis BA, Crigger LP.** *Sugar and oral sweeteners*. In: Primary preventive dentistry. 6th Ed., New Jersey, Pearson Education Inc. , **2004**, 14: 463-477.
298. **Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Ooshima T.** Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Molecular Oral Microbiology*, **2007**, 22(1): 30-35.
299. **Mattos-Graner RO, Napimoga MH, Fukushima K, Duncan MJ, Smith DJ.** Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. *Journal of clinical microbiology*, **2004**, 42(10): 4586-4592.
300. **McDonald RE, Avery DR, Stookey GK, Chin JR, Kowolik JE, et al.** *Dental caries in the child and adolescent*. In: McDonald and Avery Dentistry for the Child and Adolescent. 9th Ed., Elsevier Inc., **2011**, 177-204.
301. **McNeill K, Hamilton IR.** Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS microbiology letters*, **2003**, 221(1): 25-30.
302. **Mei ML, Chu CH, Low KH, Che CM, Lo EC.** Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, **2013**, 18(6): 824-31.
303. **Mejare I, Raadal M, Espelid I.** Diagnosis and management of dental caries. In: Pediatric Dentistry – A clinical approach, 2nd Ed., Wiley-Blackwell, **2009**, 110-140.
304. **Melvin CS.** A collaborative community-based oral care program for school-age children. *Clinical Nurse Specialist*, **2006**, 20(1): 18-22.

305. **Milgrom P, Riedy CA, Weinstein P, Tanner AC, Manibusan L**, et al. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6-to 36-month-old children. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2000**, 28(4): 295-306.
306. **Mineyama R, Yoshino S, Maeda N**. DNA fingerprinting of isolates of *Streptococcus mutans* by pulsed-field gel electrophoresis. *Microbiological research*, **2007**, 162(3): 244-249.
307. **Misra S, Tahmassebi JF, Brosnan M**. Early childhood caries--a review. *Dental update*, **2007**, 34(9): 556-8, 561-2, 564.
308. **Mitrakul K, Asavanund Y, Vongsavan K**. Prevalence of Five Biofilm-Related Oral Streptococci Species from Plaque. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, **2011**, 36(2): 161-166.
309. **Mitrakul K, Vongsawan K, Sriutai A, Thosathan W**. Association between *S. mutans* and *S. sanguinis* in severe early childhood caries and caries-free children a quantitative real-time PCR analysis. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, **2016**, 40(4): 281-289.
310. **Mohammadi TM, Hajizamani A, Hajizamani HR, Abolghasemi B**. Fluoride varnish effect on preventing dental caries in a sample of 3-6 years old children. *Journal of international oral health: JIOH*, **2015**, 7(1): 30-5.
311. **Mohd Said SN, Ekambaram M, Yiu CK**. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *International Journal of Paediatric Dentistry*, **2017**, 27(3): 163-173.
312. **Momeni SS, Patrick P, Wiener HW, Cutter GR, Ruby JD**, et al. *Mutans streptococci* enumeration and genotype selection using different bacitracin-containing media. *Journal of microbiological methods*, **2014**, 103: 53-57.
313. **Monse B, Heinrich-Weltzien R, Benzian H, Holmgren C, van Palenstein Helderman W**. PUFA--an index of clinical consequences of untreated dental caries. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2010**, 38(1): 77-82.
314. **Mouradian WE, Wehr E, Crall JJ**. Disparities in children's oral health and access to dental care. *Jama*, **2000**, 284(20): 2625-2631.
315. **Mullis KB**. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, **1990**, 262(4): 56-61, 64-5.
316. **Mundorff SA, Eisenberg AD, Leverett DH, Espeland MA, Proskin HM**. Correlations between Numbers of Microf lora in Plaque and Saliva. *Caries research*, **1990**, 24(5): 312-317.

317. **Nakano Y, Yoshimura M, Koga T.** Correlation between oral malodor and periodontal bacteria. *Microbes and infection*, **2002**, 4(6): 679-83.
318. **Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Lapidirattanakul J, Taniguchi N,** et al. Protein antigen in serotype k *Streptococcus mutans* clinical isolates. *Journal of dental research*, **2008**, 87(10): 964-968.
319. **Nakano YJ, Kuramitsu HK.** Mechanism of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases: hybrid-enzyme analysis. *Journal of bacteriology*, **1992**, 174(17): 5639-46.
320. **Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T.** Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. *Journal of clinical microbiology*, **2004**, 42(1): 198-202.
321. **Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M,** et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *Journal of clinical microbiology*, **2006**, 44(9): 3313-3317.
322. **Nakano K, Nomura R, Shimizu N, Nakagawa I, Hamada S,** et al. Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. *Journal of clinical Microbiology*, **2004**, 42(11): 4925-4930.
323. **Nakano K, Lapidirattanakul J, Nomura R, Nemoto H, Alaluusua S,** et al. *Streptococcus mutans* clonal variation revealed by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*, **2007**, 45(8): 2616-2625.
324. **Napimoga MH, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB.** Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *Journal of oral science*, **2005**, 47(2): 59-64.
325. **Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EA, Höfling JF,** et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *Journal of Medical Microbiology*, **2004**, 53(7): 697-703.
326. **Nascimento MM, Höfling JF, Gonçalves RB.** *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries research*, **2004**, 38(5): 454-463.
327. **Nascimento MM, Lemos JA, Abranches J, Gonçalves RB, Burne RA.** Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*. *Journal of bacteriology*, **2004**, 186(19): 6383-6390.
328. **Nassar HM, Gregory RL.** Biofilm sensitivity of seven *Streptococcus mutans* strains to different fluoride levels. *Journal of Oral Microbiology*, **2017**, 9(1): 1328265.

329. **Nelson S, Albert JM, Geng C, Curtan S, Lang K**, et al. Increased enamel hypoplasia and very low birthweight infants. *Journal of dental research*, **2013**, 92(9): 788-794.
330. **Neumaier M, Braun A, Wagener C**. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clinical Chemistry*, **1998**, 44(1): 12-26.
331. **Newburn E**. *Current Concepts of caries etiology*. In: Cariology. 3rd Ed., Quintessence, Chicago Illinois USA, **1989**, 52-64.
332. **Newburn E**. *Caries activity tests*. In: Cariology. 3rd Ed., Quintessence, Chicago Illinois USA, **1989**, 3: 273-93.
333. **Nisengard RJ, Newman MG**. *Oral microbiology and immunology*. 2nd Ed., WB Saunders company, **1994**.
334. **Nobile CG, Fortunato L, Bianco A, Pileggi C, Pavia M**. Pattern and severity of early childhood caries in Southern Italy: a preschool-based cross-sectional study. *BMC public health*, **2014**, 14(1): 206.
335. **Nowak A, Crall JJ**. *Prevention of dental disease*. In: Pediatric dentistry: infancy through adolescent. 4th Ed., Philadelphia- Elsevier Co, **2005**, 511-19.
336. **Nurelhuda NM, Al-Haroni M, Trovik TA, Bakken V**. Caries experience and quantification of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in saliva of Sudanese schoolchildren. *Caries research*, **2010**, 44(4): 402-407.
337. **Nurko C, Skur P, Brown JP**. Caries prevalence of children in an infant oral health educational program at a WIC clinic. *Journal of dentistry for children*, **2003**, 70(3): 231-234.
338. **Nyvad B, Machiulskiene V, Bælum V**. Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions. *Caries research*, **1999**, 33(4): 252-60.
339. **Nyvad, B**. *Role of oral hygiene*. In: Dental caries. The disease and its clinical management. 2nd Ed., UK: Blackwell Munksgaard, **2008**, 257-264.
340. **Nyvad B, Fejerskov O, Baleum V**. *Visual-tactile caries diagnosis*. In: Dental Caries. The disease and its clinical management. 2nd Ed., Blackwell Munksgaard, Oxford, **2008**, 50-68.
341. **Nyvad B**. *Role of oral hygiene*. In: Dental Caries. The disease and its clinical management. 2nd Ed., UK: Blackwell Publishing Ltd, **2008**, 262-264.
342. **Nyvad B, Kilian M**. Microflora associated with experimental root surface caries in humans. *Infection and immunity*, **1990**, 58(6): 1628-1633.

343. **Odyakmaz S.** Mikrobiyal Dental Plak ile Diş Eti Hastalıkları Arasındaki İlişki. Lisans, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, İzmir, **2004**.
344. **Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiya M, Koga T.** Simple and rapid detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in human saliva by polymerase chain reaction. *Molecular Oral Microbiology*, **2000**, 15(4): 258-262.
345. **Okada M, Kawamura M, Kaihara Y, Matsuzaki Y, Kuwahara S,** et al. Influence of parents' oral health behaviour on oral health status of their school children: an exploratory study employing a causal modelling technique. *International journal of paediatric dentistry*, **2002**, 12(2):101-8.
346. **Okada M, Kawamura M, Oda Y, Yasuda R, Kojima T,** et al. Caries prevalence associated with Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in Japanese schoolchildren. *International journal of paediatric dentistry*, **2012**, 22(5): 342-348.
347. **Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J,** et al. Longitudinal study of dental caries incidence associated with Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in pre-school children. *Journal of medical microbiology*, **2005**, 54(7): 661-665.
348. **Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J,** et al. PCR detection of Streptococcus mutans and S. sobrinus in dental plaque samples from Japanese pre-school children. *Journal of medical microbiology*, **2002**, 51(5): 443-447.
349. **Okada M, Hayashi F, Nagasaka N.** Detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *Journal of clinical periodontology*, **2000**, 27(10): 763-768.
350. **Oliveira GM, Ritter AV, Heymann HO, Swift E Jr, Donovan T,** et al. Remineralization effect of CPP-ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. *Journal of dentistry*, **2014**, 42(12): 1592-1602.
351. **Palmer CA, Kent R Jr, Loo CY, Hughes CV, Stutius E,** et al. Diet and caries-associated bacteria in severe early childhood caries. *Journal of dental research*, **2010**, 89(11): 1224-1229.
352. **Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Duque C, Peres RC, Rodrigues LK,** et al. Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries. *Archives of oral biology*, **2010**, 55(5): 365-373.
353. **Persing DH, Unger ER, Tenover FC, White TO, Relman DA,** et al. *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar*. 1. Baskı, Ankara, Palme yayıncılık, **2006**.

354. **Petersen PE.** The World Oral Health Report: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and oral epidemiology*, **2003**, 31(1): 3-24.
355. **Petersen PE, Lennon MA.** Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, **2004**, 32(5): 319–21.
356. **Petersson LG.** Fluoride mouthrinses and fluoride varnishes. *Caries research*, **1993**, 27(1): 35-42.
357. **Petersson L, Twetman S, Dahlgren H, Norlund A, Holm AK,** et al. Professional fluoride varnish treatment for caries control: a systematic review of clinical trials. *Acta Odontologica Scandinavica*, **2004**, 62(3): 170-6.
358. **Petersson LG, Maki Y, Twetman S, Edwardsson S.** Mutans streptococci in saliva and interdental spaces after topical applications of an antibacterial varnish in schoolchildren. *Molecular Oral Microbiology*, **1991**, 6(5): 284-287.
359. **Petti S, Cairella G, Tarsitani G.** Rampant early childhood dental decay: an example from Italy. *Journal of public health dentistry*, **2000**, 60(3): 159-166.
360. **Poole PM, Wilson G.** Infection with minute-colony-forming beta-haemolytic streptococci. *Journal of clinical pathology*, **1976**, 29(8): 740-745.
361. **Post JC, Stoodley P, Hall–Stoodley L, Ehrlich GD.** *The role of biofilms in otolaryngologic infections.* In: Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery. **2004**, 12(3): 185-190.
362. **Prakash P, Subramaniam P, Durgesh BH, Konde S.** Prevalence of early childhood caries and associated risk factors in preschool children of urban Bangalore, India: A cross-sectional study. *European journal of dentistry*, **2012**, 6(2): 141-52.
363. **Primosch RE.** A report on the efficacy of fluoridated varnishes in dental caries prevention. *Clinical Preventive Dentistry*, **1985**, 7(6): 12-22.
364. **Qin M, Li J, Zhang S, Ma W.** Risk factors for severe early childhood caries in children younger than 4 years old in Beijing, China. *Pediatric dentistry*, **2008**, 30(2): 122-128.
365. **Quiñonez RB, Keels MA, Vann WF Jr, McIver FT, Heller K,** et al. Early Childhood Caries: analysis of psychosocial and biological factors in a high–risk population. *Caries research*, **2001**, 35(5): 376-383.

366. **Rajab LD, Hamdan MA.** Early childhood caries and risk factors in Jordan. *Community dental health*, **2002**, 19(4): 224-229.
367. **Ramamurthy PH, Swamy HS, Bennete F, Rohini M, Nagarathnamma T.** Relationship between severe-early childhood caries, salivary mutans streptococci, and lactobacilli in preschool children of low socioeconomic status in Bengaluru city. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, **2014**, 32(1): 44-7.
368. **Redmo Emanuelsson IM, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D.** Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiology and Immunology*, **2003**, 18(1): 24-9.
369. **Reisine S, Douglass JM.** Psychosocial and behavioral issues in early childhood caries. *Community dentistry and oral epidemiology*, **1998**, 26(1): 32-44.
370. **Ribeiro NM, Ribeiro MA.** Breastfeeding and early childhood caries: a critical review. *Jornal de pediatria*, **2004**, 80(5): 199-210.
371. **Ripa LW.** Nursing caries: a comprehensive review. *Pediatric Dentistry*, **1988**, 10(4): 268-82.
372. **Rodrigues CS, Sheiham A.** The relationships between dietary guidelines, sugar intake and caries in primary teeth in low income Brazilian 3-year-olds: a longitudinal study. *International Journal of Paediatric Dentistry*, **2000**, 10(1): 47-55.
373. **Rogers AH.** Bacteriocin typing of Streptococcus mutans strains isolated from family groups. *Australian Dental Journal*, **1980**, 25(5): 279-83.
374. **Rosenblatt A, Zarzar P.** The prevalence of early childhood caries in 12-to 36-month-old children in Recife, Brazil. *Journal of dentistry for children*, **2002**, 69(3): 319-324.
375. **Roth GI, Calmes RB.** *Oral biology*. St. Louis, The CV Mosby Company, **1981**.
376. **Rölla G.** Effects of fluoride on initiation of plaque formation. *Caries research*, **1977**, 11(1): 243-261.
377. **Rölla G, Ekstrand J.** *Fluoride in oral fluids and dental plaque*. In: Fluoride in dentistry. 2nd Ed., Copenhagen-Munksgaard, **1996**, 215-29.
378. **Rudney JD, Larson CJ.** Identification of oral mitis group streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Molecular Oral Microbiology*, **1999**, 14(1): 33-42.
379. **Rupf S, Merte K, Kneist S, Al-Robaiy S, Eschrich K.** Comparison of different techniques of quantitative PCR for determination of Streptococcus mutans counts in saliva samples. *Molecular Oral Microbiology*, **2003**, 18(1): 50-53.

380. **Rupf S, Kneist S, Merte K, Eschrich K.** Quantitative determination of *Streptococcus mutans* by using competitive polymerase chain reaction. *European journal of oral sciences*, **1999**, 107(2): 75-81.
381. **Russell RR.** The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. *Caries research*, **1994**, 28(2): 69-82.
382. **Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE.** Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, **1990**, 18(21): 6409-6412.
383. **Rythén M.** Preterm Infants-Odontological Aspects. Doctorate, University of Gothenburg, Sweden, **2012**.
384. **Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Mättö J, Mattila-Sandholm T.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, **2000**, 84(3): 197-215.
385. **Saarela M, Asikainen S, Chen C, Alaluusua S, Slots J.** Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction and ribotyping for subtyping *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Anaerobe*, **1995**, 1(2): 97-102.
386. **Saarela M, Hannula J, Mättö J, Asikainen S, Alaluusua S.** Typing of *Streptococcus mutans* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Archives of oral biology*, **1996**, 41(8-9): 821-826.
387. **Saha S, Freeman M, Toure J, Tippens KM, Weeks C, et al.** Racial and ethnic disparities in the VA health care system: a systematic review. *Journal of General Internal Medicine*, **2008**, 23(5): 654-671.
388. **Samaranyake L.** *Essential Microbiology for Dentistry*. 3rd Ed., China, Churchill Livingstone Inc, Elsevier, **2007**, 11.
389. **Sánchez-Pérez L, Acosta-Gío AE.** Caries risk assessment from dental plaque and salivary *Streptococcus mutans* counts on two culture media. *Archives of oral biology*, **2001**, 46(1): 49-55.
390. **Santos CF, Sakai VT, Machado MA, Schippers DN, Greene AS.** Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *Journal of Applied Oral Science*, **2004**, 12(1): 1-11.
391. **Saraithong P, Pattanaporn K, Chen Z, Khongkhunthian S, Laohapensang P, et al.** *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* colonization and caries experience in 3- and 5-year-old Thai children. *Clinical oral investigations*, **2015**, 19(8): 1955-1964.
392. **Sato Y.** Method for conducting PCR protected from evaporation. U.S. Patent No: 6,664,044, **2003**.

393. **Sato T, Hu JP, Ohki K, Yamaura M, Washio J**, et al. Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction - amplified 16S ribosomal RNA genes. *Molecular Oral Microbiology*, **2003**, 18(5): 323-326.
394. **Sato T, Matsuyama J, Kumagai T, Mayanagi G, Yamaura M**, et al. Nested PCR for detection of mutans streptococci in dental plaque. *Letters in applied microbiology*, **2003**, 37(1): 66-69.
395. **Savanheimo N¹, Sundberg SA, Virtanen JI, Vehkalahti MM**. Dental care and treatments provided under general anaesthesia in the Helsinki Public Dental Service. *BMC Oral Health*, **2012**, 12(1): 45.
396. **Scannapieco FA**. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **1994**, 5(3): 203-248.
397. **Scannapieco FA**. The oral microbiome: its role in health and in oral and systemic infections. *Clinical Microbiology Newsletter*, **2013**, 35(20): 163-169.
398. **Schachtele CF**. *Dental caries: prevention and control*. In: A Textbook of Preventive Dentistry. 2nd Ed., Philadelphia, WB Saunders Company, **1982**, 241-54.
399. **Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Franken HC**. Comparative recovery of Streptococcus mutans on five isolation media, including a new simple selective medium. *Journal of Dental Research*, **1986**, 65(6): 906-8.
400. **Schafer TE, Adair SM**. Prevention of dental disease: the role of the pediatrician. *Pediatric Clinics of North America*, **2000**, 47(5): 1021-42.
401. **Scheie AA**. *The role of antimicrobials*. In: Dental caries, the disease and its clinical management. 1st Ed., Blackwell Munksgaard, Oxford, **2003**, 179-188.
402. **Scheie AA**. Modes of action of currently known chemical anti-plaque agents other than chlorhexidine. *Journal of Dental Research*, **1989**, 68: 1609-16.
403. **Schroth RJ, Smith PJ, Whalen JC, Lekic C, Moffatt ME**. Prevalence of caries among preschool-aged children in a northern Manitoba community. *Journal Canadian Dental Association*, **2005**, 71(1): 27.
404. **Seki M, Yamashita Y, Shibata Y, Torigoe H, Tsuda H**, et al. Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. *Oral Microbiology and Immunology*, **2006**, 21(1): 47-52.
405. **Senesombath S, Nakornchai S, Banditsing P, Lexomboon D**. Early childhood caries and related factors in Vientiane, Lao PDR. *The Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health*, **2010**, 41(3): 717-25.

406. **Seppä L.** The future of preventive programs in countries with different systems for dental care. *Caries Research*, **2001**, 35(1): 26-29.
407. **Seward FS.** Natural closure of deciduous molar extraction spaces. *The Angle Orthodontist*, **1965**, 35(1): 85-94.
408. **Özer S, Tunç EŞ.** Erken Çocukluk Çağı Çürükleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **2009**, 19(2): 115-123.
409. **Shank EA, Kolter R.** New developments in microbial interspecies signaling. *Current Opinion in Microbiology*, **2009**, 12(2): 205–214.
410. **Shaw WC.** The influence of children's dentofacial appearance on their social attractiveness as judged by peers and lay adults. *American journal of orthodontics*, **1981**, 79(4): 399-415.
411. **Shen C, Autio-Gold J.** Assessing fluoride concentration uniformity and fluoride release from three varnishes. *The Journal of the American Dental Association*, **2002**, 133(2): 176-182.
412. **Shibata Y, Ozaki K, Seki M, Kawato T, Tanaka H, et al.** Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. *Journal of clinical microbiology*, **2003**, 41(9): 4107-4112.
413. **Shiroza T, Shinozaki N, Watanabe T, Ikemi T, Fukushima K, et al.** Rapid isolation of chromosomal DNA from oral streptococci and polymerase chain reaction-oriented restriction fragment-length polymorphism analysis for genetic heterogeneity. *Oral Microbiology and Immunology*, **1998**, 13(1): 11–6.
414. **Siqueira JF Jr, Rôças IN.** PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *Journal of dentistry*, **2003**, 31(5): 333-9.
415. **Singla D, Sharma A, Sachdev V, Chopra R.** Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Dental Plaque of Indian Pre-School Children Using PCR and SB-20M Agar Medium. *Journal of clinical and diagnostic research*, **2016**, 10(11): 60-63.
416. **Sjöberg L, Edberg J.** Dental caries prevalence among 3-and 5-year old children in Da Nang. Doctorate, Jönköping University, Vietnam. 2015.
417. **Skeie MS, Raadal M, Strand GV, Espelid I.** Caries in primary teeth at 5 and 10 years of age: a longitudinal study. *European Journal of Paediatric Dentistry*, **2004**, 5(4): 194-202.

418. **Moberg Sköld U, Petersson LG, Lith A, Birkhed D.** Effect of school-based fluoride varnish programmes on approximal caries in adolescents from different caries risk areas. *Caries research*, 2005, 39(4): 273-279.
419. **Sköld-Larsson K, Modéer T, Twetman S.** Fluoride concentration in plaque in adolescents after topical application of different fluoride varnishes. *Clinical oral investigations*, 2000, 4(1): 31-34.
420. **Smith GA, Riedford K.** Epidemiology of early childhood caries: clinical application. *Journal of pediatric nursing*, 2013, 28(4): 369-373.
421. **Söderling E, Isokangas P, Pienihäkkinen K, Tenovuo J.** Influence of maternal xylitol consumption on acquisition of mutans streptococci by infants. *Journal of Dental Research*, 2000, 79(3): 882-887.
422. **Soni H, Vasavada M.** Distribution of *S. mutans* and *S. sorbinus* in Caries Active and Caries Free Children by PCR Approach. *International Journal of Oral and Craniofacial Science*, 2015, 1(1): 27-30.
423. **Spellerberg B, Brandt C.** *Streptococcus*. In: Manual of Clinical Microbiology, 9th Ed., ASM Press, Washington DC, 2009, 1: 412.
424. **Spinell DM, Gibbons RJ.** Influence of culture medium on the glucosyl transferase-and dextran-binding capacity of *Streptococcus mutans* 6715 cells. *Infection and immunity*, 1974, 10(6): 1448-51.
425. **Spolidorio DM, Höfling JF, Pizzolitto AC, Rosa EA, Negrini TD, et al.** Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2003, 34(3): 213-17.
426. **Sreebny LM.** Saliva in health and disease: an appraisal and update. *International Dental Journal*, 2000, 50(3): 140-161.
427. **Sreenivasan P, Gaffar A.** Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *Journal of clinical periodontology*, 2002, 29(11): 965-974.
428. **Stecksén-Blicks C.** Salivary counts of lactobacilli and *Streptococcus mutans* in caries prediction. *European Journal of Oral Sciences*, 1985, 93(3): 204-212.
429. **Steinberg Doron, Friedman M.** Development of sustained - release devices for modulation of dental plaque biofilm and treatment of oral infectious diseases. *Drug development research*, 2000, 50(3-4): 555-565.

430. **Steinberg D, Moldovan M, Molukandov D.** Testing a degradable topical varnish of cetylpyridinium chloride in an experimental dental biofilm model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2001**, 48(2): 241-243.
431. **Stenudd C, Nordlund A, Ryberg M, Johansson I, Källestål C,** et al. The association of bacterial adhesion with dental caries. *Journal of dental research*, **2001**, 80(11): 2005-2010.
432. **Stephen A, Krishnan R, Ramesh M, Kumar VS.** Prevalence of early childhood caries and its risk factors in 18–72 month old children in Salem, Tamil Nadu. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, **2015**, 5(2): 95-102.
433. **Stevens A, Freeman R.** The role of the mother-child interaction as a factor in nursing caries (EEC): a preliminary communication. *European Journal of Paediatric Dentistry*, **2004**, 5(2): 81-85.
434. **Straetemans MM, van Loveren C, de Soet JJ, de Graaff J, ten Cate JM.** Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five. *Journal of Dental Research*, **1998**; 77(10): 1851–5.
435. **Streckfuss JL, Perkins D, Horton IM, Brown LR, Dreizen S,** et al. Fluoride resistance and adherence of selected strains of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces after exposure to fluoride. *Journal of dental research*, **1980**, 59(2): 151-158.
436. **Strohmenger L, Brambilla E.** The use of fluoride varnishes in the prevention of dental caries: A short review. *Oral Diseases*, **2001**, 7(2): 71-80.
437. **Struelens MJ.** Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **1998**, 93(5): 581-585.
438. **Sullivan A, Borgström MK, Granath L, Nilsson G.** Number of mutans streptococci or lactobacilli in a total dental plaque sample does not explain the variation in caries better than the numbers in stimulated whole saliva. *Community dentistry and oral epidemiology*, **1996**, 24(3): 159-163.
439. **Svanberg M, Krasse B.** Comparative recovery of mutans streptococci on two selective media. *Caries Research*, **1990**, 24(1): 36-8.
440. **Svanberg M, Krasse B.** Comparative recovery of mutans streptococci on two selective media. *Caries research*, **1990**, 24(1): 36-38.
441. <http://genotyping.files.wordpress.com/2007/03/PZR.gif>.

442. **Şengün A, Ünlü N, Özer F, Öztürk B, Çağlayan O.** Tükürüğün uyarılmasının tükürük akış hızına, pH'ına tamponlama kapasitesine, Ca, P ve total protein konsantrasyonlarına etkisi. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **1998**, 23: 47-52.
443. **Takada K, Igarashi M, Yamaguchi Y, Hirasawa M.** New serotype of mutans streptococci isolated from pig oral cavity. *Microbiology and immunology*, **2008**, 52(2): 64-68.
444. **Takahashi N, Nyvad B.** The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *Journal of dental research*, **2011**, 90(3): 294-303.
445. **Takei M, Kobayashi Y, Iwasaki S, Fujihashi T.** Distribution of lactobacilli in oral cavities. *Microbiology and Immunology*, **1971**, 15(1): 109-112.
446. **Tang C, Quinonez RB, Hallett K, Lee JY, Whitt JK.** Examining the association between parenting stress and the development of early childhood caries. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2005**, 33(6): 454-460.
447. **Tanner ACR, Kent RL, Holgerson PL, Hughes CV, Loo CY, et al.** Microbiota of Severe Early Childhood Caries before and after Therapy. *Journal of Dental Research*, **2011**, 90(11): 1298-1305.
448. **Tanzer JM.** *Microbiology of dental caries.* In: Contemporary Oral Microbiology and Immunology, Mosby Year Book, St.Louis, **1992**, (22):337-424.
449. **Tanzer JM, Thompson A, Wen ZT, Burne RA.** Streptococcus mutans: fructose transport, xylitol resistance, and virulence. *Journal of dental research*, **2006**, 85(4): 369-373.
450. **Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM.** The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of dental education*, **2001**, 65(10): 1028-37.
451. **Tao Y, Zhou Y, Ouyang Y, Lin H.** Dynamics of oral microbial community profiling during severe early childhood caries development monitored by PCR-DGGE. *Archives of oral biology*, **2013**, 58(9): 1129-38.
452. **Targino AG, Rosenblatt A, Oliveira AF, Chaves AM, Santos VE.** The relationship of enamel defects and caries: a cohort study. *Oral diseases*, **2011**, 17(4): 420-6.
453. **Tatevossian A.** Fluoride in dental plaque and its effects. *Journal of Dental Research*, **1990**, 69(2): 645-652.
454. **Temizkan G, Arda N.** *Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler.* 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, İstanbul, **2004**, 62.

455. **ten Cate JM, Featherstone JD.** Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **1991**, 2(3): 283-296.
456. **ter Pelkwijk A, van Palenstein Helderma WH, van Dijk JW.** Caries experience in the deciduous dentition as predictor for caries in the permanent dentition. *Caries research*, **1990**, 24(1): 65-71.
457. **Tewari A, Chawla HS, Utreja A.** Comparative evaluation of the role of NaF, APF & Duraphat topical fluoride applications in the prevention of dental caries--a 2 1/2 years study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, **1991**, 8(1): 28-35.
458. **Thitasomakul S, Thearmtree A, Piwat S, Chankanka O, Pithpornchaiyakul W, et al.** A longitudinal study of early childhood caries in 9 - to 18 - month - old Thai infants. *Community dentistry and oral epidemiology*, **2006**, 34(6): 429-436.
459. **Thylstrup A, Fejerskoy O.** *Textbook of Clinical Cariology*. 2nd Ed., Copenhag- Munsgard, **1994**, 17-31.
460. **Thylstrup A.** Clinical evidence of the role of pre-eruptive fluoride in caries prevention. *Journal of dental research*, **1990**, 69(2): 742-750.
461. **Tinanoff N.** Introduction to the conference: Innovations in the prevention and management of early childhood caries. *Pediatric dentistry*, **2015**, 37(3): 198-199.
462. **Tinanoff N, Kanellis MJ, Vargas CM.** Current understanding of the epidemiology, mechanisms, and prevention of dental caries in preschool children. *Pediatric dentistry*, **2002**, 24(6): 543-551.
463. **Tinanoff N, Reisine S.** Update on early childhood caries since the Surgeon General's Report. *Academic pediatrics*, **2009**, 9(6): 396-403.
464. **Tiwari T, Quissell DO, Henderson WG, Thomas JF, Bryant LL, et al.** Factors associated with oral health status in American Indian children. *Journal of racial and ethnic health disparities*, **2014**, 1(3): 148-156.
465. **Togelius J, Kristoffersson K, Anderson H, Bratthall D.** Streptococcus mutans in saliva: intraindividual variations and relation to the number of colonized sites. *Acta Odontologica Scandinavica*, **1984**, 42(3): 157-163.
466. **Toi CS, Bönecker M, Cleaton-Jones PE.** Mutans streptococci strains prevalence before and after cavity preparation during Atraumatic Restorative Treatment. *Molecular Oral Microbiology*, **2003**, 18(3): 160-164.

467. **Touger-Decker R, van Loveren C.** Sugars and dental caries. *The American journal of clinical nutrition*, **2003**, 78(4): 881-892.
468. **Toumba J, Lygidakis N, Oulis C, Espelid I, Poulsen S,** et al. Guidelines on the use of fluoride in children: an EAPD policy document. *European Archives of Paediatric Dentistry*, **2009**, 10(3): 129-135.
469. **Truong TL, Ménard C, Mouton C, Trahan L.** Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of medical microbiology*, **2000**, 49(1): 63-71.
470. **Turner JG.** Two cases of hypoplasia of enamel. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, **1912**, 5: 73-76.
471. **Twetman S, Axelsson S, Dahlgren H, Holm AK, Källestål C,** et al. Caries - preventive effect of fluoride toothpaste: A systematic review. *Acta Odontologica Scandinavica*, **2003**, 61(6): 347-55.
472. **Twetman S, García-Godoy F, Goepferd SJ.** Infant oral health. *Dental Clinics of North America*, **2000**, 44(3): 487-505.
473. **Vaikuntam J.** Resin-modified glass ionomer cements (RM GICs) implications for use in pediatric dentistry. *ASDC journal of dentistry for children*, **1997**, 64(2): 131-4.
474. **Vaikuntam J.** Fluoride varnishes: should we be using them?. *Pediatric dentistry*, **2000**, 22(6): 513-6.
475. **van Houte J.** Role of micro-organisms in caries etiology. *Journal of dental research*, **1994**, 73(3): 672-681.
476. **van Loveren C, Buijs JF, Buijs MJ, ten Cate JM.** Protection of bovine enamel and dentine by chlorhexidine and fluoride varnishes in a bacterial demineralization model. *Caries research*, **1996**, 30(1): 45-51.
477. **van Loveren C, Buijs JF, ten Cate JM.** Protective effect of topically applied fluoride in relation to fluoride sensitivity of mutans streptococci. *Journal of dental research*, **1993**, 72(8): 1184-1190.
478. **van Loveren C, Buijs JF, ten Cate JM.** Similarity of bacteriocin activity profiles of mutans streptococci within the family when the children acquire the strains after the age of 5. *Caries Research*, **2000**, 34(6): 481-485.
479. **Vogell S.** Chairside Salivary Diagnostics for Oral Diseases. *RDH Magazine*, **2013**, 33(10): 62-70.
480. **Wade WG.** The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological research*, **2013**, 69(1): 137-143.

481. **Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC**, et al. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2010**, 20(1).
482. **Warren JJ, Levy SM**. Systemic fluoride. Sources, amounts, and effects of ingestion. *Dental Clinics of North America*, **1999**, 43(4): 695-711.
483. **Wefel JS, Wei SHY**. *Mechanisms of action of fluorides*. In: Pediatric Dentistry Scientific Foundations and Clinical Practice. St. Louis, CV Mosby Co, **1982**: 772-9.
484. **Weintraub JA, Hysan L**. Fluoride varnish for caries prevention: comparisons with other preventive agents and recommendations for a community - based protocol. *Special Care in Dentistry*, **2003**, 23(5): 180-6.
485. **Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Jue B, Shain S, Hoover CI**, et al. Fluoride varnish efficacy in preventing early childhood caries. *Journal of Dental Research*, **2006**, 85(2): 172-6.
486. **Wellappuli N, Amarasena N**. Influence of family structure on dental caries experience of preschool children in Sri Lanka. *Caries research*, **2012**, 46(3): 208-212.
487. **Wellington PB**. Risk factors in dental caries. *International Dental Journal*, **1988**, 38(4): 211-217.
488. **Welsh J, McClelland M**. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, **1990**, 18(24): 7213-18.
489. **Wendt LK, Birkhed D**. Dietary habits related to caries development and immigrant status in infants and toddlers living in Sweden. *Acta Odontologica Scandinavica*, **1995**, 53(6): 339-344.
490. **Weyant RJ¹, Tracy SL, Anselmo TT, Beltrán-Aguilar ED, Donly KJ**, et al. Topical fluoride for caries prevention: executive summary of the updated clinical recommendations and supporting systematic review. *Journal of the American Dental Association*, **2013**, 144(11): 1279-91.
491. **Hobdell M, Petersen PE, Clarkson J, Johnson N**. Global goals for oral health 2020. *International Dental Journal*, **2003**, 53(5): 285-8.
492. **Wikner S, Söder PO**. Factors associated with salivary buffering capacity in young adults in Stockholm, Sweden. *European Journal of Oral Sciences*, **1994**, 102(1): 50-3.
493. **World Health Organization**. *Oral health surveys, basic methods*. World Health Organization, **1997**.
494. **World Health Organization**. *Oral health surveys: basic methods*. World Health Organization, **2013**.

495. **Wulaerhan J, Abudureyimu A, Bao XL, Zhao J.** Risk determinants associated with early childhood caries in Uygur children: a preschool-based cross-sectional study. *BMC oral health*, **2014**, 14(1): 136.
496. **Wyne AH.** Early childhood caries: nomenclature and case definition. *Community dentistry and oral epidemiology*, **1999**, 27(5): 313-315.
497. **Yang R, Argimon S, Li Y, Gu H, Zhou X,** et al. Determining the genetic diversity of lactobacilli from the oral cavity. *Journal of microbiological methods*, **2010**, 82(2): 163-169.
498. **Yankell SL, Saxer UP.** *Toothbrushes and toothbrushing methods*. In: Primary preventive dentistry. 6th Ed., Pearson Education Inc, New Jersey, **2004**: 93-118.
499. **Yoder S, Cao C, Ugen KE, Dao ML.** High-level expression of a truncated wall-associated protein A from the dental cariogenic Streptococcus mutans. *DNA and cell biology*, **2000**, 19(7): 401-408.
500. **Yoo SY, Kim KJ, Lim SH, Kim KW, Hwang HK,** et al. First isolation of Streptococcus downei from human dental plaques. *FEMS microbiology letters*, **2005**, 249(2): 323-326.
501. **Yoo SY, Park SJ, Jeong DK, Kim KW, Lim SH,** et al. Isolation and characterization of the mutans streptococci from the dental plaques in Koreans. *The Journal of Microbiology*, **2007**, 45(3): 246-255.
502. **Yoon NA, Berry CW.** The antimicrobial effect of fluorides (acidulated phosphate, sodium and stannous) on Actinomyces viscosus. *Journal of dental research*, **1979**, 58(8): 1824-1829.
503. **Yörük GN, Güner A.** Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve Weissella türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, **2011**, 6(2).
504. **Zafar S, Harnekar SY, Siddiqi A.** Early childhood caries: etiology, clinical considerations, consequences and management. *International Dental SA*, **2009**, 11(4): 24-36.
505. **Zero DT.** Sugars – The arch criminal. *Caries Research*, **2004**, 38(3): 277-85.
506. **Zero DT.** Dental caries process. *Dental Clinics of North America*, **1999**, 43(4): 635-664.
507. **Zhou Q, Qin X, Qin M, Ge L.** Genotypic diversity of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in 3–4 - year - old children with severe caries or without caries. *International journal of paediatric dentistry*, **2011**, 21(6): 422-431.
508. **Zickert I, Emilson CG.** Effect of a fluoride - containing varnish on Streptococcus mutans in plaque and saliva. *European Journal of Oral Sciences*, **1982**, 90(6): 423-428.

EKLER

Ek-1

MKÜ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Erken çocukluk çürüğü olan çocuklarda bakteri florasının incelenmesi ve flor vernik uygulamasının bakteri florasına etkisinin değerlendirilmesi”
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	01/03/2016/74

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	2016/68	1
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:13	Tarih: 10/03/2016		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	DOÇ.DR.NAZAN SAVAŞ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Nazan SAVAŞ	Halk Sağlığı	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Cumali GÖKÇE	İç Hastalıkları	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Aydiner KALACI	Ortopedi ve Travmatoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Zafer YÖNDEN	Tıbbi Biyokimya	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Burçin ÖZER	Tıbbi Mikrobiyoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Neslihan PINAR	Tıbbi Farmakoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı : Doç.Dr.Nazan SAVAŞ
İmza:

Doç.Dr.Nazan SAVAŞ
Etik Kurul Sekreteri

Ek-2

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ ETİK KURULU
Gönüllülerin Bilgilendirilmiş Olur/ (Rıza) Formu
(Kont)

Araştırmanın Konusu	: Erken Çocukluk Çürüğü Olan Çocuklarda Bakteri Florasının İncelenmesi ve Flor Vernik Uygulamasının Bakteri Florasına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi
Araştırmanın Amacı	: Erken çocukluk çürüğü olan çocuklarda oral bakteri florasını incelemek ve flor vernik uygulamasından sonraki oral flora bakterilerinin karşılaştırılmasıdır
Araştırmaya Katılma Süresi	: Örnek alım süresince
Araştırmaya Katılacak Yaklaşık Gönüllü Sayısı	: 60

Sayın Gönüllü;

'Erken Çocukluk Çürüğü Olan Çocuklarda Bakteri Florasının İncelenmesi ve Flor Vernik Uygulamasının Bakteri Florasına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi ' başlıklı bilimsel araştırma projemize mikrobiyal dental plak/ tükrük sağlamak amacıyla rızanızla çocuklarınızdan alınan örneklerin çalışmamızda kullanılmasına izin verdiniz. Plak ve tükrük örnekleri Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti polikliniğinde alınarak ardından çocuklarınıza flor vernik uygulanacaktır.

Çalışmaya gönüllü olmanız durumunda size herhangi bir ücret ödenmeyecek veya sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir.

Çalışmaya katılmak istememeniz durumunda veya çalışmanın herhangi bir aşamasında çalışmadan ayrılmak istememeniz durumunda tedavinizde bir değişiklik olmayacaktır.

Sağlayacağınız katkı için teşekkür eder, acil şifalar dilerim.

Yukarıdaki, araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bana, tanık huzurunda yukarıda konusu belirtilen araştırmayla ilgili yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı ve katılmama hakkımın olduğunu, araştırma başladıktan sonra devam etmeyi istememe hakkına sahip olduğum gibi kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, kendi rızam ile katılmayı kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜ	
Adı Soyadı:	Telefon :
Adresi:	Faks :
	İmza
Bilgi Verebilecek Kişi:	
VELİ, VASİ VEYA VEKİL (18 Yaşından küçük Olanlar İçin)	
Adı Soyadı:	Telefon :
Adresi:	Faks :
Yakınlığı:	İmza
ARAŞTIRMACI	
Adı Soyadı:	Telefon :
Adresi:	Faks :
	İmza
GEREKTİĞİNDE GÖNÜLLÜ VEYA YAKINININ BAŞVURABİLECEĞİ KİŞİ	
Adı Soyadı:	Telefon :
Adresi:	Faks :
	İmza



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ PEDODONTİ ANABİLİM DALI
KORUYUCU FLOR VERNİK UYGULAMASI AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Bu form Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından koruyucu ağız ve diş sağlığı çalışmaları kapsamında gerçekleştirilecek florürlü vernik uygulaması hakkında hasta ebeveynleri /yakınlarına yönelik hazırlanmış bir bilgilendirme formudur. **Lütfen bu formu dikkatlice okuyunuz. Sorularının ve anlamadığınız hususlar varsa bilgi almak için diş hekimine/ sağlık personeline danışınız.**

UYGULAMANIN GEREKÇELERİ

1. Diş çürükleri toplumumuzda yaygın olarak görülen, sistemik hastalıklara da sebep olabilen ve uygulanacak koruyucu önlemlerle oluşması engellenebilecek hastalıklar arasındadır.
2. Diş çürükleri genellikle küçük yaşlarda başlamaktadır. Bu nedenle erken dönemde tedbirlerin alınması gerekmektedir.
3. Diş çürüklerinden korunmada diş fırçalama, düzenli ve sağlıklı beslenme, diş hekimi kontrolü ve florür kullanımı çok önemlidir.
4. Florürün çürük oluşumunu engelleyici etkisi bilimsel olarak kanıtlanmıştır. Çocuklarda çürük riskinin yüksek olduğu dönemlerde ve okullarda uygulanacak en uygun koruyuculardan biridir. Bu nedenlerden dolayı Amerika, Kanada,Avustralya ve bazı Avrupa ülkeleri başta olmak üzere birçok ülkede uzun yıllardan beri uygulanmaktadır.
5. Üniversitemizde yürütülen bu çalışmada florürlü vernik kullanılacaktır. Flor vernikleri her yaş grubundaki çocuklarda güvenle kullanılabilir.

UYGULAMANIN BASAMAKLARI

1. Uygulama öncesinde hastanın dişlerini iyi bir şekilde fırçalaması gerekmektedir.
2. Florürlü vernik uygulaması uzman diş hekimi tarafından gerçekleştirilecektir.
3. Tek kullanımlık flor vernikleri bir fırça ile alt ve üst her iki çeneye 1,5-2 dakika süreyle uygulanacaktır.
4. Uygulamadan sonra hasta, 1 saat boyunca hiçbir şey yiyip içmeyecek, sadece o gün içinde süt ve süt ürünleri (süt, peynir, yoğurt ve ayran) ile asitli içecekler tüketmeyecektir.
5. Sadece flor verniğin yapıldığı gün hasta dişlerini fırçalamayacak, ertesi gün düzenli olarak günde 2 kere fırçalamaya devam edecektir.

Yukardaki bilgileri eksiksiz olarak okudum ve anladım.

Velisi olduğum oğlum/kızım.....'ın dişlerine florlu vernik uygulanmasına;

izin veriyorum.

izin vermiyorum.

Bilgilendirmeyi yapanın:

Adı-Soyadı:.....

Tarih:.....

İmza:.....

Velinin:

Adı-Soyadı:.....

Tarih:.....

İmza:.....

Ek-4

Tarih:/...../.....

Ağız İçi Muayene Formu

Hastanın Adı-Soyadı:

Yaşı:

Cinsiyet: K / E

Telefon numarası:

16	55	54	53	52	51	61	62	63	64	65	26
46	85	84	83	82	81	71	72	73	74	75	36

dmft: d _____ m _____ f _____ = _____

dmfs: d _____ m _____ f _____ = _____

Ebeveynin Adı-Soyadı:

İmza:

ÖZGEÇMİŞ

14 Ağustos 1988'de Hatay' da doğdu. İlköğretim eğitimini Samandağ İlköğretim Okulu'nda, ortaöğretimini ise 2006 yılında Antakya Hüseyin Özbuğday Lisesi'nde tamamladı. 2013 yılında Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden mezun oldu. 2014 bahar dönemi Diş Hekimliğinde Uzmanlık Sınavı'nda Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Dişhekimliği Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladı.

