

**T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI**

**ORTA KULAK BAKTERİYEL PATOJENLERİNİN  
NAZOFARİNGEAL SEKRESYON , ORTA KULAK  
EFÜZYONU VE MUKOZASINDA PCR(Polimeraz  
Zincir Reaksiyonu) VE KÜLTÜR YÖNTEMLERİYLE  
TESPİTİ**

**Dr. Kağan İPÇİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Levent Sennaroğlu**

**ANKARA  
2006**

## TEŞEKKÜR

Bilimsel kiŐiliđiyle beni yÖnlendiren değerli tez hocam Prof. Dr. Levent Sennaroğlu ve tezin ortaya çıkmasında hakkı Ödenmeyecek katkıları ve emeği olan başta Sayın Prof. Dr. Umut Akyol, Prof. Dr.Ömer Faruk Ünal olmak üzere tüm Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Öđretim Üyelerine, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öđretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Deniz Gür ve Doç. Dr.Özgen Köseođlu Eser başta olmak üzere mikrobiyolojik değerlendirmeleri yapan tüm laboratuvar personeline, son olarak tez çalıŐmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma ve odyoloji çalıŐanlarına en içten teŐekkürlerimi borç bilirim.

## ÖZET

**İpçi K, Orta Kulak Bakteriyel Patojenlerinin Nazofaringeal Sekresyon ve Orta Kulak Efüzyonunda PCR(Polymerase Chain Reaction) ve Kültür Yöntemleriyle Tespiti,Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi,Ankara, 2006.**

Efüzyonlu Otitis Media çocukluk çağında çok sık görülen ve çocuklardaki işitme kayıplarının en önemli nedenini teşkil eden bir hastalıktır. Etyolojide rol oynayan etkenler arasında en sık H.İnfluenza başta olmak üzere S.Pneumonia ve M.Catarrhalis gibi patojenler yer almaktadır. Bu patojenlerin tespiti konvansiyonel yöntemlerden olan kültür tekniği veya bugün kendinden sıkça söz ettiren polimeraz zincir reaksiyonu(PCR) ile yapılabilmektedir. PCR,yavaş büyüyen, kültürde üretimi zor olan patojenlerin sensitif ve spesifik olarak saptanmasını sağlayan bir tekniktir. Orta kulak efüzyonlarında kültür pozitifliği %20ile %30 arasında değişirken PCR ile bu oran %75'e kadar çıkabilmektedir. Biz bu çalışmada EOM tanısı alan çocuklarda nazofarinks ve orta kulak efüzyonunda etken patojenleri saptamayı, nazofarinkste yer alan mikroorganizmanın OME'de hastalık etkeni olup olmadığını ortaya koymayı ve hem nazofarinkste hem de orta kulak efüzyonunda multiplex PCR verilerini kültür sonuçları ile karşılaştırarak uygulanan tekniğin farkını ortaya koymayı amaçladık. Bu doğrultuda EOM tanısı almış 100 kulak ve bu hastalara ait 53 nazofarinks sekresyonu hasta grubu olarak alınırken, 102 sağlıklı nazofarinks örneği de kontrol grubu olarak alındı.Sonuçlara baktığımızda örnek sayımızın azlığından ötürü nazofarinksteki patojenin kulakta da hastalık etkeni olduğunu söyleyememekteyiz. S.Pneumonia, H.İnfluenza ve Moraxella Catarrhalis göz önünde bulundurulduğunda kültürle pozitiflik oranı %14 olup, PCR ile bu oran %29'a çıkmaktadır.Sonuç olarak örnek sayısının yetersizliğinden ötürü istatistiksel olarak sensitif ya da spesifik bulunmasa da PCR'ın kültüre göre patojeni saptamada daha etkin olduğunu söyleyebiliriz.EOM olan hastaların nazofarinksinde ise H.İnfluenza % 7.5 oranında, kontrol grubunda % 3.9 olarak saptanmıştır. S.Pneumonia ise hasta nazofarinkslerinde % 17 sıklığında görülürken kontrol grubunda ise % 9.8 olarak bulunmuştur.Dolayısıyla örnek sayısının azlığından ötürü istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hasta popülasyonunun nazofarinksinde orta kulak patojenlerinin daha sık rastlandığını görmekteyiz.

Anahtar kelimeler:Efüzyonlu otitis media, PCR,kültür.

## ABSTRACT

**İpçi K, The Determination of Middle Ear Bacterial Pathogens in Middle Ear Effusion and Nasopharyngeal Secretion by Culture and PCR(Polymerase Chain Reaction) Methods, Hacettepe University Faculty of Medicine , Thesis in Otorhinolaryngology,Ankara 2006.**

Otitis media with effusion is a very frequent disease of the childhood and it is the most frequent cause of hearing loss in children. Among the etiologic agents, H.Influenza is the leading one followed by S.Pneumonia ve M.Catarrhalis. Identification of these agents are carried out either by conventional technique such as culture method or by recently popular method polymerase chain reaction(PCR). PCR is a technique which enables us to identify pathogens that are slowly or hard to grow in in-vitro conditions sensitively and specifically..The culture positivity varies between 20% and 30, but this ratio can rise up to 75% with PCR. In this we aimed to compare the effectiveness of culture and PCR in detecting the pathogen in middle ear effusion; to determine whether the microorganism in nasopharynx is the pathogen in the diseased ear and to show that middle ear pathogens colonize more in nasopharynx of ill children compared to healthy ones. In this respect 100 ears, 53 nasopharynx secretion samples belonging to ill children and 102 control nasopharynx samples are included in the study. In our study, regarding S.Pneumonia, H.Influenza and Moraxella Catarrhalis,culture positivity rate is 14% and rises up to 29% with PCR so we succeeded to conclude that PCR is superior than culture in identifying the microorganism more efficiently. However since the sample size is small, it is not possible yet to call the difference sensitive and specific statistically. We also can not show that the pathogen in nasopharynx is also responsible for the disease in the ear due to small sample size. Finally it is also found out that middle ear pathogens colonize more in nasopharynx of diseased children with respect to healthy ones despite the lack of statistical significance due to limited samle size.

Key words:Otitis media with effusion,PCR, culture.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tanım	3
2.2 Epidemiyoloji	3
2.3 Patogenez	5
2.4 Tanı	9
2.5 PCR( Polimerase Chain Reaction)	11
2.5.1.PCR için Hedef DNA ve Primerlerin Seçilmesi	13
2.5.2. PCR Modifikasyonları	15
3. BİREYLER VE YÖNTEM	16
3.1.Bireyler	16
3.1.1Çalışmaya Alınma Kriterleri	16
3.1.2 Çalışmaya Alınmama Kriterleri	16
3.2.Yöntem	16
3.2.1 Hastalara İlk Başvuruda Yapılan Rutin Muayene , Tetkik ve Tedaviler	17
3.3. EOM Tanı Kriterleri	17
3.4. Tedavi	17
3.5. Klinik Örneklerin Toplanması	18

3.5.1. Orta kulak efüzyonları	18
	Sayfa
3.5.2. Nazofarinks sekresyonları	18
3.6. Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri	19
3.7. Moleküler Tanı Yöntemleri	20
3.7.1. PCR için örneklerin hazırlanması	20
3.7.2. Multipleks PCR primerleri	22
3.7.3. Multipleks PCR protokolü	22
4.BULGULAR	23
5.TARTIŞMA	34
6.SONUÇLAR	42
7.KAYNAKLAR	51

## SİMGELER VE KISALTMALAR

EOM	Efüzyonlu Otitis Media
AOM	Akut Otitis Media
OM	Otitis Media
OKE	Orta Kulak Efüzyonu
ÜSYE	Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktörü $\alpha$
IL-1 $\beta$	İnterlökin 1 $\beta$
IL-8	İnterlökin 8
mmH <sub>2</sub> O	Milimetre su
dB	Desibel
Hz	Hertz
cm <sup>3</sup>	santimetre küp
PCR	Polymerase Chain Reaction
DNA	Deoksiribonükleik Asit
°C	Celcius
G	Guanine
C	Cytosine
A	Adenine
T	Thymine
RT- PCR	Reverse Transcriptase PCR
ml	mililitre
HI	Hemophilus İnfluenza
SP	Streptococcus Pneumonia
MC	Moraxella Catarrhalis
CFU	Colony Forming Unit
NaCl	Sodyum Klorür

## TABLolar

	Sayfa
<b>Tablo 2.1</b> İmpedans tipleri(Jerger,1970).....	10
<b>Tablo 4.1.</b> Orta kulak efüzyonu örneklerinin.....	23
kültür sonuçları	
<b>Tablo 4.2.</b> Orta kulak efüzyonu örneklerinin.....	24
PCR sonuçları	
<b>Tablo 4.3.</b> Sağ kulaklardan alınan efüzyon.....	25
örneklerinin kültür ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması	
<b>Tablo 4.4.</b> Sol kulaklardan alınan efüzyon .....	26
örneklerinin kültür ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması	
<b>Tablo 4.5.</b> Sağ kulak efüzyonları ve nazofarinks sekresyonlarının.....	28
kültür sonuçlarının karşılaştırılması	
<b>Tablo 4.6.</b> Sağ kulak efüzyonları ve nazofarinks sekresyonlarının.....	29
kültür sonuçlarının karşılaştırılması	
<b>Tablo 4.7.</b> Hasta ve kontrol grubu nazofarinks.....	30
kolonizasyonunun karşılaştırılması	
<b>Tablo 4.8.</b> S.Pneumonia için hasta ve kontrol nazofarinkslerinin.....	31
karşılaştırılması	
<b>Tablo 4.9.</b> H.İnfluenza için hasta ve kontrol nazofarinkslerinin.....	32
karşılaştırılması	
<b>Tablo 4.10.</b> Orta Kulak Efüzyonu kültürlerin de ‘Diğer’ başlığı altında.....	33
üremesi saptanan mikroorganizmalar	



## GİRİŞ

Effüzyonlu otit(EOM) çocukluk çağının en sık hastalıklarından biridir(1). OME sıklıkla viral üst solunum yollarıyla yakın ilgisi olan akut otitis media(AOM) epizodunu takip eder ve çocukluk çağının en sık işitme kaybı nedenidir(2). Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 2.2 milyon EOM atağı teşhis edildiği ve bunun yıllık 4 milyar Amerikan Doları harcamaya neden olduğu bildirilmiştir(3). Ülkemizde de bu hastalığa sık rastlanmaktadır.Yapılan çalışmalarda EOM prevalansı %5 ile %18 arasında bulunmuştur(4-7).

Çok sık rastlanan bir hastalık olmasına rağmen etyopatogenezi halen tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Geçmişte EOM'nin tamamen inflamatuvar bir süreç olduğu ve efüzyonun steril olduğu kabul edilmiştir. Ancak bu inanış 1958'de Senturia ve arkadaşlarının efüzyondan yaptıkları kültürlerde bakteri tespit etmesine kadar devam etmiştir(8). Bu dönemden sonra EOM'nin infeksiyöz etyoloji sonucu oluştuğu ortaya konmuştur. Ancak buna rağmen kültürle orta kulak efüzyonlarının sadece %20-40 arası pozitif saptanmaktadır(9).

EOM tedavisinde etyopatogeneзде olduğu gibi tedavide de tam bir görüş birliği yoktur. Hastalığın tedavisi medikal veya cerrahi olabilmekle beraber kombine yaklaşımlar da uygulanmaktadır. Ancak bu tedavilerin etkinliğini tartışan ve tedavi vermeden yakın takibi benimseyen pek çok çalışma da artık literatüre girmektedir. Yaklaşımda en önemli nokta tedavi veya takip ne olursa olsun bu hastalığın kendi haline bırakılmaması gerekliliği ve komplikasyonların önlenme gerçeğidir. Bu aşamada da hastalığın tanınmasının önemi ortaya çıkmaktadır.

Tanı daha çok klinik olarak konmasına ve ampirik tedavi buna göre başlanmasına rağmen seçilen antibiyotik ve etkinliği açısından mikrobiyolojik tanı da önem arz etmektedir.Bu sayede, etkene yönelik tedavi ile direnç

gelişimi ve tedaviye yanıtızsızlık gibi sorunların en aza indirgenmesi ve komplikasyonların önüne geçilmesi amaçlanmaktadır.

Tanıda konvansiyonel yöntemlerden olan kültür yanında yakın zamanda buna ek olarak orta kulak efüzyonlarında bakteriyel DNA tespit etmeye yönelik PCR(Polymerase Chain Reaction) tabanlı testler geliştirilmiştir. Bu testlerle pozitif sonuç elde etme oranları %80 (%50-%77.3)'e kadar ulaşmıştır(10,11). PCR yöntemleri de kendi içlerinde gelişim kaydetmiştir. Günümüzde artık birçok etkenin simultane tespitini sağlayan multiplex PCR ve kontaminasyonu minimuma indiren, hızlı ve sensitif sonuç verebilen, kullanımı kolay real-time PCR metodları kullanılmaktadır. Gerek kültür ve gerek PCR sonuçlarına göre orta kulak efüzyonlarında en sık karşılaşılan bakteriyel ajanlar *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumonia*, ve *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*'dir(12).

Orta kulak efüzyonunda yapılan kültür sonucu saptanma oranları H.İnfluenza %8-20, S.Pneumonia %4-10, M.Catarrhalis için %2-8 olarak saptanmıştır(13).PCR ile patojenlerin tespiti literatürde yapılan çalışmalarda ise *Haemophilus influenza* için %12.5-70.2, *Streptococcus pneumoni* için %6.4-35, ve *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* için %16-63 olarak tespit edilmiştir(14).

Bu çalışmada amaç tanıda kültür yöntemi ve multiplex PCR yönteminin etkinliğinin karşılaştırılması ve EOM etyopatogenezinde en önemli role sahip patojenlerin nazofarinkste kolonizasyonun gösterilmesidir.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tanım

Efüzyonlu otitis media(EOM), intakt bir timpanik membran arkasında ‘orta kulak efüzyonu’ adı verilen sıvı mevcudiyeti ile karakterize ateş ve kulak ağrısı gibi akut semptom bulunmayan, çoğunlukla efüzyona bağlı iletim tipi işitme kaybı sonucu çocuğun dil gelişiminde gecikme ve duyarsızlık sonucu fark edilen bir hastalıktır. EOM efüzyonun mevcut olduğu süreye göre sınıflandırılır.  $\leq 3$  hafta süren efüzyon varlığında ‘akut’, 3 hafta ile 3 ay arası süren efüzyonda ‘subakut’ ve  $\geq 3$  ay varolan efüzyonda ise ‘kronik’ EOM’den bahsedilir(15).

### 2.2. Epidemiyoloji

EOM’nin ülkemizdeki sıklığını gösteren bir rakam mevcut değildir. Ancak çeşitli bölgelerde yapılmış çalışmalar vardır. Kaya ve diğ. (4) 4-8 yaşları arasında 1628 çocukta yaptığı çalışmada EOM prevalansı Ankara çevresinde %12.5 olarak bulmuşlardır. Amerika Birleşik Devletleri’nde 5 yaş altı çocuklarda prevalans %15ve %40 arasında bildirilmiştir(3).

EOM’nin doğal seyrine bakıldığında kulakta bulunan efüzyonun ilk 3 ay içinde hızla azaldığı , takip eden dönemde ise daha az olmak kaydıyla bir miktar daha azaldığı görülür. EOM’nin bir diğer özelliği ise rekürrenslerle giden bir hastalık oluşudur(16,17).

EOM riskini artıran pek çok faktör bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi tekrarlayan akut otitis mediyalar(AOM) ve üst solunum yolu enfeksiyonlarıdır(ÜSYE). AOM sonrası her hastada orta kulakta efüzyon bulunur. Bu efüzyonların %75-90’ı ilk 3 ayda spontan düzelir(18). 3 ay ile 12 ay arasında %30 hastada düzelme olur. 12 aydan sonra spontan düzelme sayısı

çok azdır(19-21). Üçüncü aydan sonra devam eden efüzyonlarda ise EOM düşünülür(22). Üst üste iki AOM atağı sonrası EOM riski 30 kat, üç atak sonrasında ise 40 kat artmaktadır. ÜSYE'ler de östaki tüpünü ve mukosilyer aktiviteyi etkileyerek EOM'ye neden olabilirler.

Spontan rezolüsyonu azaltan risk faktörleri arasında EOM'nin yaz ve sonbahar döneminde başlamış olması , 30 dB'den fazla işitme azlığı olması, daha önce tüp takılmış olması, adenoidektomi yapılmamış olması vardır(23,24).

EOM'nin 6-36 aylar ve 4-7 yaşlar arası iki pik dönemi mevcuttur(25). Sade ve diğ.(26) 2.6 yaştaki pikin erken çocukluktaki bakteriyel AOM sıklığına , 5 yaştaki pikinse viral etyolojiye bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

EOM sıklığı ile yaş arasında negatif bir ilişki vardır. Yaş ilerledikçe bağışıklık sisteminin gelişmesi, ÜSYE sıklığının azalması ve östaki tüpü fonksiyonlarının düzelmesi sonucu EOM sıklığı azalır.

Erkek cinsiyet bir risk faktörü olarak gösterilmişse de , böyle bir ilişki bulunmayan çalışmalar da mevcuttur(27).

EOM sıklığı mevsimlere göre de değişmektedir. EOM sıklığı sonbahar ve kış aylarında sık görülürken yaz aylarında sıklık azalmaktadır. Kış aylarında özellikle kreşe giden çocuklarda ÜSYE sıklığının artması EOM sıklığını da arttırmaktadır(28-30). Gordon ve diğ.(31) kış aylarında EOM olan çocuklardaki iyileşme oranının düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Adenoid hipertrofisinin EOM sıklığına etkisi hakkında çeşitli sonuçlar vardır ancak Watanabe ve diğ.(32) adenoidin bir infeksiyon kaynağı olarak EOM'ye yatkınlığı arttırabileceğini belirtmişlerdir.

EOM'li hastalarda alerji prevalansını %10'la, %80 arasında belirten çalışmalar vardır(33). Fakat alerjinin EOM sıklığını arttırdığı gösterilmemiştir(34).

Düşük doğum yaşı ve düşük doğum ağırlığının EOM riskini arttırdığı görülmüştür(27). Kreşe giden çocuklarda EOM riski artar(27). Anne sütü

almayanlarda ve pasif sigara içiciliği ile EOM sıklığının arttığı yönünde olumlu ve olumsuz bulgular vardır(27,35).

Başta Down sendromu ve takiben yarık damak hastaları olmak üzere kraniyofasiyal anomaliler EOM sıklığını arttırmaktadır(22).

### **2.3.Patogenez**

EOM etyopatogenezi kesin olarak ortaya konulamamıştır.Bununla beraber pek çok teori ortaya atılmıştır. Bu durum EOM'nin tek bir hastalık değil pek çok faktörün, değişik yollar izleyerek ortaya çıkardıkları multifaktoriyel bir hastalık olduğu sonucu çıkmaktadır.Viral, bakteriyel infeksiyonlar, imünolojik durum, alerji ve çevresel faktörler patogenezde suçlanmıştır.

Normalde orta kulak mukozasında bir miktar mukus sürekli olarak salgılanmaktadır ve mukosilyer hareket ile Östaki tüpüne ve oradan da nazofarinkse taşınmaktadır. Bu orta kulağın savunma mekanizmalarından biridir. Orta kulakta muhtemelen bakteri, bakteri yıkım ürünleri, virüsler veya alerji sonucu inflamatuvar bir durum oluştuğunda ilk olarak mukozada vasküler proliferasyon, plazma hücresi ve lenfosit infiltrasyonu oluşur. Takiben goblet hücrelerinde proliferasyon ve mukus bezlerinde hipertrofi gelişerek sekretuvar tipte metaplazik epitel oluşur.

Orta kulakta efüzyon oluşumuyla ilgili ilk teori hastalığın tanımını da yapan Politzer (36) tarafından ortaya atılmış olan *Ex Vacuo* teorisidir. Bu teoriye göre Östaki tüpünün tıkanması sonucu orta kulakta negatif basınç oluşacak ve transüstasyonla steril bir efüzyon oluşacaktır. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda hem negatif basınç nedeni olarak öne sürülen Östaki tüpü tıkanmasının olmadığı, hem de sıvının karakterinin kanın bir ultrafiltratı olmadığı gösterilmiştir.

EOM'nin mikrobiyoloji ile ilgili yapılan erken çalışmalarda hiçbir mikroorganizma üretilmemiştir ve efüzyonların steril olduğu kabul edilmiştir. Ancak daha sonraları bakteri tespitinde kullanılan tekniklerin gelişmesi ile birlikte %40'a varan oranlarda bakteri izolasyonları bildirilmiştir(37,38).

Üretilen mikroorganizmalar genellikle diğer ÜSYE'ler ve AOM'de de karşılaşılan Streptococcus Pneumoniae, Hemophilus İnfluenzae ve Moraxella Catarrhalis'tir. Ancak diğer pek çok mikroorganizma da üretilmiştir. Bunların bir kısmı da nazofarinkste yer alan patojenlerle aynıdır(39). Hemophilus İnfluenzae sağlıklı çocukların nazofarinks kültürlerinde sıklıkla üremesine rağmen taşıyıcılık oranı EOM olan çocuklarda sağlıklı popülasyona göre daha fazladır(40). Kültürde bakteri üretilmediği hallerde bile PCR ve reverse transkriptaz PCR gibi modern metodların kullanılması sonucu %80'e varan oranlarda bakteriyel DNA tespiti bildirilmiştir(41-42).

Ataoğlu ve diğ. (43) orta kulak efüzyonlarında bakterilerin L- formlarını tespit etmişlerdir.

Bakteri kültürlerinde üreme sıklığının düşük oluşunun bir diğer nedeni de bakterilerin metabolik olarak inaktif bir form olan biofilm halinde bulunmalarına bağlanmıştır(44). Biofilm halindeki bakteriler antibiyotiklere dirençli olmaları yanında immün yanıt oluşturabilmektedirler. Bu teori henüz tam olarak ispatlanamamış olmakla birlikte kanıtlandığı takdirde EOM patogenezi yeni bir boyut katacaktır. Dolayısıyla EOM'nin en azından bir kısmından, bir zamanlar düşünüldüğünün aksine bakteriyel etyoloji sorumludur. Orta kulakta bulunan fakat klinik olarak aşikar otite neden olmayan bakterilere karşı oluşan reaksiyon EOM'nin sebebi olarak kabul edilmektedir. Viral ÜSYE'ler sırasında EOM atakları görülmektedir. Efüzyonların incelenmesinde respiratuvar sinsityal virüs, adenovirüs ve rinovirüs nükleik asitleri izole edilmiştir(45,46). Hoşal(34) 1966 yılında yaptığı bir çalışmada viral etyolojiyi ortaya koymuştur.

Efüzyon oluşumunun birtakım inflamatuvar mediatörler aracılığıyla geliştiği düşünülmektedir. Pek çok mediatör orta kulak sıvılarında araştırılmıştır. Ancak en önemli mediatörlerin sitokinler olduğu düşünülmektedir. Efüzyonlarda TNF- $\alpha$  %77-91, IL-1 $\beta$  %67-97 ve IL-8 %92-100 oranında tespit edilmiştir. Bakteriyel endotoksine cevap olarak TNF- $\alpha$  ve

bunun da musin salınımına ve müköz bez hiperplazisine yol açtığı gösterilmiştir (47,48). Orta kulakta CO2 basıncının artmasıyla da müköz metaplazi oluşur. Sonuçta EOM' de orta kulakta bulunan sıvı yine orta kulakta bulunan salgı bezlerinden salgılanmaktadır.

Efüzyonlar incelendiğinde su, hücreler , hücre debris, elektrolitler, musinler, proteinler, lipidler ve DNA'dan oluştukları görülmektedir. Bunların çoğu epitel ve bakteri yıkımı sonucu ortaya çıkarlar. Musinlerse efüzyona aktif olarak salgılanırlar ve efüzyonların transüda olmadığını kanıtıdır(49).

Efüzyonun temizlenememesi de efüzyon oluşumuna yol açar. Siliyer disfonksiyon efüzyon oluşmasına bu yolla neden olur. EOM'de sekretuar hücreler artarken, silyalı hücrelerin de azaldığı ve fonksiyonlarının bozulduğu görülmüştür. Primer siliyer diskinezi sillerin karakterizedir ve bu hastaların neredeyse tümünde efüzyon mevcuttur. Radyasyon, bakteri ve bakteri endotoksinlerinin siliyer hareketi bozduğu gösterilmiştir. Pasif sigara içiciliği de siliyer disfonksiyona yol açtığı düşünülen bir durumdur.

EOM'de efüzyonda bulunan lökotrienler , prostaglandinler ve araziidonik asit metabolitlerinin yol açtığı lokal inflamatuvar cevap nedeniyle , timpanik membranda yapısal hasra oluşması riskinin yanında , havalanma azlığı nedeniyle oluşan negatif basınca bağlı olarak da zarda retraksiyon cepleri, atelektazi ve atrofi oluşmaktadır(50,51).

Alerji ile EOM arasında ilişki kuran ve ilişki olmadığını avunan pek çok çalışma mevcuttur(3,35). Hem alerji, hem de EOM çok sık rastlanan durumlar olduğundan aradaki ilişkinin ortaya konması güçtür. Alerjinin Östaki tüpünde ödeme yol açarak Östaki fonksiyonlarını bozduğu ve efüzyona yol açtığı ileri sürülmektedir (52). EOM ve alerji ilişkisini açıklayan bir diğer teori de birleşik hava yolları teorisidir. Bu teoriye göre tek etkilenen orta kulak değildir. Nazofarinks, burun ve akciğerler yanında hava yollarının bir parçası olan orta kulak da etkilenmektedir (53). Orta kulak mukozasının allerjenlere cevabı gösterilmiştir(54).

Adenoid vejetasyon önceleri Östaki tüpünü tıkayarak EOM'ye neden olan bir faktör olarak suçlanmışsa da günümüzde bakteri rezervuarı görevi gördüğü düşünülmektedir(32).

Orta kulak havalanmasının asıl kaynağı Östaki tüpünden geçen hava değil, mastoid hücrelerden olan gaz alışverişidir(55). Östaki tüpünün protektif ve ventilasyon fonksiyonlarında bozukluk meydana geldiği ancak bunun primer sebep değil, EOM'ye sekonder geliştiği kabul edilmektedir. EOM, akut otitis media sonrasında bir inflamatuvar cevap olarak gelişebileceği gibi Östaki fonksiyonlarındaki bozukluk nedeniyle de kendiliğinden de oluşabilir.

Yarık damak hastalarında EOM sıklığı çok yüksektir. Bu hastalarda Östaki tüpü lateral lamellası gelişimi normal insanlara göre daha azdır ve bu durum Östaki tüpünde fonksiyon bozukluğuna yol açar(56). Yarık damaklı hastalarda patolojinin drenaj bozukluğundan çok koruma fonksiyonundaki eksiklikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Yine kraniyofasyal anomalilerde ve Down sendromu gibi hastalıklarda Östaki tüpünün fonksiyonundaki yapısal bozukluklar nedeniyle EOM'ye sık rastlanmaktadır.

Kliniğimizde yapılan bir çalışmada EOM'de oksidatif stresin yer aldığı gösterilmiştir. Diyetle alınması gereken antioksidanların eksikliği imüneyi bozarak, orta kulakta sekretuar hücre metaplazisine, drenaj bozukluğuna, ödeme neden olarak orta kulaktaki inflamasyonun nedenlerinden biri olabilir(57).

Son yıllarda laringofaringeal reflü kulak burun boğaz hastalıklarının pek çoğunda suçlanmaya başlanmıştır. Laringofaringeal reflünün EOM'nin de sebebi olduğu düşüncesi ortaya atılmıştır. Literatürde bu konuyu destekleyen iki önemli bulgudan birincisi, Tasker ve diğ. (58) tarafından yapılan çalışmada orta kulak efüzyonunda yüksek konsantrasyonlarda pepsin ve pepsinojen üretilmesidir. Diğer çalışma bölümümüzde Ceylan ve diğ.(59) tarafından yapılmıştır ve orta kulak efüzyonunda, adenoid ve tonsil dokusunda Helikobakter pilori üretilmiştir.



## 2.4 Tanı

EOM'de işitme azlığı, kulakla oynama gibi bazı şikayetler olabileceği gibi, hiçbir belirti vermeyebildiğinden vakaların birçoğunun tanısı diğer sebeplerle yapılan muayenelerde konmaktadır. Ayrıca deneyimsiz hekimler bu hastalığı sıklıkla atlayabilmektedirler.

Rosenfeld ve diğ.(3) klinik uygulama kılavuzunda pnömatik otoskopinin mutlaka uygulanması gerektiğini ve timpanometrinin de konfirmasyonda kullanılması gerektiğini önermektedirler. EOM tanısı zarın mat oluşu, radial damarlarda genişleme ve hareketlerinin azalmış olmasıyla konulur. Bazen hava sıvı seviyesi veya baloncuk da görülebilir. Hiperemi de %5 vakada bulunabilir (60). EOM tanısında altın standart miringotomidir. Bu teknikle karşılaştırıldığında pnömatik otoskopinin sensitivitesi %94, spesifisitesi %80'dir (61). Toner ve Mains (62) pnömatik otoskopinin prediktif değerini %88, timpanometrinin prediktif değerini ise %89 olarak bulmuşlardır. Ayrıca iki metodun bir arada kullanılmasının prediktif değeri belirgin derecede arttırmadığını belirtmişlerdir.

Timpanometri pnömatik otoskopide şüphede kalındığında uygulanması önerilen bir metottur. Timpanometrinin bir avantajı da objektif oluşudur. B tipi timpanogramın sensitivitesi %81, spesifisitesi %74'dür. Ayrıca timpanogramda B tipinden farklı bir tipe geçiş iyileşme belirtisidir.

Timpanometri bir diğer adıyla impedans odyometri kolay uygulanabilen, invazif olmayan ve objektif sonuçlar veren bir testtir. İmpedans bir sistemin kendini harekete geçirmeye çalışan bir kuvvete karşı koyma direnci olarak tanımlanır. Timpanik membrana çarpan ses enerjisi timpanik membranı ve orta kulak kemikçiklerini harekete geçirmeye çalışır. Orta kulak, timpanik membran ve kemikçiklerin direnci de bu kuvvete karşı koyar ki buna akustik impedans denilir. Bir miktar enerji karşı orta kulağa geçer. Buna ise admittans denmektedir. İmpedans ölçümünde genellikle dış kulak yoluna 220Hz frekansta

bir ses verilir.zardan yansıyan ses de bir mikrofon yardımıyla alınır. Üçüncü bir kanaldan da dış kulak yolunun basıncı değiştirilir. +200 ve -400 mmH2O arasındaki basınçlarda kompliyans ölçümü yapılarak kaydedilir.Kompliyans kulak zarının titreşim amplitüdüdür ve dış kulak yolu ve orta kulak basıncı eşit olduğunda maksimumdur.Kompliyans birimi  $cm^3$ 'tür ve modern cihazlar genelde bu değeri ölçer. Ortaya çıkan eğriye de timpanogram denilir. Jerger (63) Tablo 2.1 İmpedans tipleri(Jerger,1970)

Timpanogram tipi	Orta kulak basıncı(mmH2O)
A	-100mmH2O ve üstü
C1	-100 ile -199mmH2O arası
C2	-200 mmH2O ve altı
B	Tepe noktası olmayan düz eğri

EOM'de genellikle tip B ve tip C2 timpanogramlar elde edilir. Ancak AOM'de de aynı bulgulara rastlanabileceği gibi aşırı kalın timpanosklerotik kulak zarlarında ve ileri derecede retrakte adezif kulak zarlarında , ayrıca buşon gibi dış kulak yolunu tıkayan patolojilerde B tipi timpanogram görülebilir.Dolayısıyla otoskopik muayene ile birlikte kullanılması gerekir(22).

Tanı amaçlı tarama testleri sağlıklı , asemptomatik çocuklarda önerilmemektedir(3).

EOM ile başvuran hastaya işitme ile ilgili şikayeti yoksa ilk 3 ayda işitme testi yaptırmaya gerek yoktur. 3 ayda iyileşmeyen hastalara işitme testi yapılır. İşitme seviyesi 40dB ve üstünde ise cerrahi önerilir. 21-40dB arasında hastanın durumuna göre karar verilir. 20dB'den az ise ameliyat önerilmez ancak efüzyonun devam etmesi halinde 3-6 ayda bir tekrara odyolojik tetkik yapılması önerilir(3).

Tüm bu tanısal metodların dışında epidemiolojik çalışmalara ışık tutacak ve sonuçlarıyla hastalığın mikrobiyolojisi ve tedavi seçeneklerine yönelik

katkısı olabilecek mikrobiyolojik yöntemler de vardır. Bunlardan en sık kullanılanlardan biri olan kültür dışında artık günümüzde PCR yöntemleri de sıklıkla kullanılmaktadır.Öyle ki PCR yöntemleri de kendi içlerinde çeşitlilik göstermekte, gün geçtikçe zamandan ve maliyetten kazandıran, kontaminasyonu en aza indirgeyen teknikler geliştirilmeye başlanmıştır.

## **2.5 PCR( Polimerase Chain Reaction)**

Hastalıkların başarılı bir şekilde tedavi edilebilmeleri için ilk şart, erken ve doğru tanının sağlanmasıdır. Bu nedenle hızlı tanı sağlayabilen, özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek laboratuvar yöntemlerine ihtiyaç vardır. Geleneksel tanı yöntemleri günümüzde halen birçok patojen mikroorganizmanın saptanmasında vazgeçilmez yöntemler olmalarına rağmen, bazı durumlarda yetersiz kalabilmektedirler. Özellikle viral enfeksiyonların tanısı, geç ve güç üreyen bakterilerin saptanması, ilaç direncine neden olan mutasyonların saptanması, identifikasyon veya tiplendirme çalışmalarında moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. 1983 yılında Kary Mullis'in PCR yöntemini keşfetmesinden günümüze kadar olan süreçte, nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin rutin tanı amacıyla kullanılmaları konusunda önemli gelişmeler kaydedilmiştir.

Nükleik asit çoğaltma yöntemleri, seçilmiş olan hedef bölgenin çoğaltılması ile gerçekleştirilebildiği , nükleik asit üzerinde özgül problemlerin çoğaltılması veya sinyal çoğaltma yöntemleriyle de istenen sonuca ulaşılması mümkündür.

Rutin mikrobiyolojik tanıda PCR yönteminin kullanım amacı, hastalardan alınan örnekler içinde, hastalık etkeni mikroorganizmanın nükleik asit düzeyinde saptanmasıdır. PCR yöntemi, nükleik asitlerin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir.Bir başka deyişle, canlı bir hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonu, PCR yönteminde bir tüp içinde taklit edilir. Bu amaçla, bakteri hücresinde DNA replikasyonu için kullanılan enzimlerin

işlevleri, farklı ısı döngüleri kullanılarak gerçekleştirilir. Bakteri replikasyonunun başlayabilmesi için ilk basamak , DNA çift zincirinin birbirinden ayrılmasıdır. Bakterilerde bu işlem helikaz enzimi tarafından gerçekleştirilirken, PCR yönteminde 94°C gibi yüksek bir ısı uygulanarak , zincirlerin birbirlerinden ayrılması sağlanır. Bakteriyel replikasyon, uygun çalışma sıcaklığı 37°C olan DNA polimeraz enzimi tarafından yapılırken, PCR yönteminde yüksek sıcaklıklarda çalışabilen Taq polimeraz enzimi kullanılır.

Pcr yöntemi, farklı sıcaklıkların uygulandığı üç basamağın, birbirini takip eden döngüler şeklinde tekrarlanması esasına dayanır. Birinci basamak olan **denaturasyon** basamağında amaç, DNA çift zincirlerinin birbirlerinden ayrılmasıdır. Bu ayrılma, 94°C'lik yükdek bir sıcaklık uygulaması ile gerçekleştirilir.

İkinci basamak olan **bağlanma(annealing)** basamağında sıcaklığın düşürülmesi ile primerler, çoğaltılacak olan hedef bölgenin her iki ucunda komplementer oldukları bölgelere tutunurlar. Primerler, hem PCR karışımındaki konsantrasyonları çok yüksek olduğundan , hem de boyları daha küçük olduğundan, ayrılan hedef DNA parçaları birbirlerine bağlanmadan önce hedef DNA'ya bağlanırlar. Bu aşamada primerlerin özgül olarak hedef DNA'ya bağlanabilmeleri için gerekli sıcaklık 50-70°C'dir. Bu sıcaklık kullanılan primerlerin nükleotid içeriğine göre değişir.

Üçüncü basamak olan **sentez** basamağında ise iki primerden itibaren 5'-3' yönünde komplementer DNA sentezi başlar. DNA sentezinin başlayabilmesi için sıcaklığın, Taq polimeraz enziminin optimum çalışma sıcaklığı olan 72°C'ye getirilmesi gerekir. Böylece Taq polimeraz , hedef DNA'ya tutunmuş olan primerin 3' ucundan itibaren zincire yeni nükleotidler ekleyerek komplementer zincir sentezine başlar. Her yeni eklenen nükleotidin 3' hidroksil ucu açıktadır ve bir sonraki nükleotid bu uca bağlanır. Bu işlem hedef DNA'nın her iki tek zincirinde de gerçekleşir. Bu nedenle sentez 5'-3' yönünde diğer uçtaki primer bağlanma bölgesini de geçerek devam eder.

Oluşan bu yeni DNA parçalarına uzun ürün adı verilir. Uzun ürünler primer bağlanma bölgelerini içerdiğinden , bir sonraki döngüde kalıp DNA görevi görebilirler. Yeni bir döngü için sıcaklık tekrar 94°C'ye yükseltildiğinde sentez işlemi sonlanır ve yeni oluşmuş çift zincirler tekraa birbirinden ayrılır. Birleşme ve sentez basamaklarının tekrar uygulanmasıyla , tek zincirlerden yeniden 5'-3' yönünde sentez başlar. Bu aşamada uzun ürünlerin bir ucu primer bağlanma bölgesi iken diğer ucu primer bağlanma bölgesinin ötesine uzanmaktadır. Bu nedenle ikinci sentez basamağında primer bağlanma bölgesinden başlayan sentez, bir önceki döngüdeki diğer primer bağlanma bölgesine kadar devam edebilir ve daha fazla uzayamaz. Bu nedenle bu döngüde oluşan DNA dizileri, iki primer bağlanma bölgesi arasındaki bölge olur ve kısa ürün olarak adlandırılır. Kısa ürünler, çoğaltma için seçilmiş olan hedef DNA dizileridir. Denaturasyon, bağlanma ve sentez basamaklarının birbiri ardı sıra tekrarlanmasıyla kısa ürünler geometrik olarak çoğalır. Döngü sayısı 'n' olarak tanımlanacak olursa , PCR sonrasında çift zincirli bir kalıp DNA'dan  $2^n$  sayıda uzun ürün,  $2$  üzeri n sayıda kısa ürün oluşur. Böylece toplam 40-50 döngü yapılması sonucunda, genom üzerinde seçilmiş olan hedef bölge milyarlarca kopya halinde çoğaltılmış olur.

### **2.5.1.PCR için Hedef DNA ve Primerlerin Seçilmesi:**

Enfeksiyon etkenlerini tanısında PCR yöntemi kullanılırken , çoğaltılacak olan hedef bölgenin seçimi büyük önem taşımaktadır. Birbirinden tamamen farklı organizmalarda bile birçok gende önemli derecede DNA homolojisi bulunabilmektedir. PCR için seçilecek olan hedef DNA, sadece saptanması istenen mikroorganizmada bulunan bir gen bölgesi olmalıdır. Özgül hedef gen bölgesi belirlendikten sonra ikinci önemli aşama , primerrlerin doğru seçilmesidir. Doğru primer seçimi PCR ile yapılacak olan çoğaltma işleminin başarılı olmasını etkileyen en önemli etkenlerden biridir. Bu amaçla ilk dikkat edilmesi gereken nokta primer dizilerinin, varlığı araştırılan mikroorganizma genomunda mutlaka sadece bir yerde bulunmasıdır. Primerlerin 3' ucu DNA

polimerazın bağlanması ve sentezin başlaması için en önemli bölgedir. Bu nedenle primerlerin 3' ucundaki 6-7 nükleotidlik dizinin de genom üzerinde komplementlerinin olmaması gerekmektedir.

Guanin ve sitozin birbirlerine üç hidrojen bağı ile bağlanırken, adenin ve timin iki hidrojen bağı ile bağlanırlar. Bu nedenle G-C bağlanması daha sıkı bir bağlanmadır. G ve C'den zengin 3' ucu bulunan primerler kalıp DNA'ya daha sıkı olarak bağlanabilmekte ve sentezin başlatılması daha başarılı olmaktadır.

Primerlerin kendi üzerine bağlanabilme olasılıkları olmamalıdır. Primerler kendi içlerinde 4 veya daha fazla nükleotidin uyumluluk göstermesi durumunda, kıvrılarak kendi üzerlerine bağlanabilirler. Bunun yanı sıra, primerlerin birbirlerine bağlanabilme olasılıkları da olmamalıdır. Özellikle 3' uçlarında iki veya daha fazla nükleotid uygunluk gösterirse DNA polimeraz bu uçlara bağlanarak primer dimer adı verilen küçük ürünlerin sentezlenmesine neden olur.

Primerlerin nükleotid içerikleri de iyi bir amplifikasyon saptanmasında önemlidir. Primer dizileri içinde tekrarlayan diziler olmamalı, bağlanma ve ayrılma sıcaklıklarında uyum sağlanabilmesi için GC/AT oranı kalıp DNA'daki orana yakın olmalıdır. İki primerin ayrılma – bağlanma sıcaklıkları birbirine mümkün olduğunca yakın olmalıdır. PCR döngüsünde primerlerin bağlanma aşamasındaki sıcaklık, bağlanma sıcaklığı düşük olan primere göre ayarlanmalıdır.

Magnezyum iyonu, DNA polimerazın çalışmasını sağlayan önemli bir kofaktördür. İki pozitif yük taşıyan magnezyum iyonu, iki DNA zincirinin arasına girerek negatif yükleri çeker ve bir araya getirir. Bunun yanı sıra, sentez sırasında nükleotidlerin de yeni yapılmakta olan zincire eklenmesini kolaylaştırır. Magnezyum konsantrasyonunun yüksek olması, primerlerin kalıp DNA'ya bağlanmalarını kolaylaştırır. Ancak yüksek magnezyum konsantrasyonu bir yandan da, kalıp DNA'nın ve yeni sentezlenen zincirlerin

birbirinden ayrılmasını zorlaştırır. Bu nedenle en iyi performansı sağlayacak optimal bir magnezyum konsantrasyonunun kullanılması çok önemlidir.

### 2.5.2.PCR Modifikasyonları

Bugün kullanılmakta olan çok çeşitli teknikler olmakla beraber bunlardan adından en çok söz ettirenler RT-PCR(Reverse Transcriptase PCR), Multiplex PCR ve Real-time PCR'dır.

- RT-PCR: Bu yöntem RNA hedeflerini çoğaltılması için kullanılır. Hedef RNA öncelikle revers transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrilir. Bundan sonraki aşamada cDNA kullanılarak normal PCR ile çoğaltma işlemi yapılır.
- Multiplex PCR: Bu yöntemle tek bir tüp içinde iki veya daha fazla hedef bölgeye özgül primerlerin kullanılmasıyla farklı çoğaltma ürünleri elde edilmesi mümkündür. Ancak kullanılacak olan primerlerin benzer bağlanma sıcaklığına sahip olmamalarına ve birbirlerine komplementer bölgeleri olmamasına dikkat edilmelidir. Multiplex PCR yöntemi aynı klinik örnek içindeki farklı mikroorganizmaların tanısı için kullanılabileceği gibi aynı mikroorganizmanın farklı hedef bölgelerini saptayabilmek için de kullanılabilir.
- Real-time PCR: Çoğaltılan ürünlerin elektroforez yapılmaksızın saptanmasına yönelik olarak yapılan çalışmalar sonucunda, real-time PCR yöntemi ve otomatize PCR sistemleri geliştirilmiştir. Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır.

## **BİREYLER VE YÖNTEM**

### **3.1. Bireyler**

Çalışma kriterlerine uygun özelliklere sahip olan ve 1 Ocak 2006-30 Haziran 2006 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'na başvuran hastalar davet edilmiştir. Hasta ve hasta yakınlarından bilgilendirilmiş onam sonrası çalışmaya katılmak isteyenler dahil edilmiştir.

#### **3.1.1. Çalışmaya Alınma Kriterleri**

1-12 yaş arası efüzyonlu otitis media tanısı alan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubuna ise aynı yaş aralığında benzer demografik özellikleri olan ancak otolojik nedenler dışında operasyon endikasyonu olan hastalar dahil edilmiştir.

#### **3.1.2. Çalışmaya Alınmama Kriterleri**

Sistemik hastalık, immün supresyon, konjenital anomaliler(yarık dudak-damak, Down sendromu, kraniofasyal anomali), son 2 hafta içinde antibiyotik kullanımı, yakın zamanda üst solunum yolu enfeksiyonu ve bilinen alerji öyküsü olan hastalar çalışmaya dışı tutulmuştur.

### **3.2. Yöntem**

Çalışma kapsamında hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Hasta grubuna klinik olarak tek taraflı veya bilateral EOM tanısı alıp yeterli süre ve dozda uygulanan tedaviye yanıt vermeyen, bu nedenle parasentez veya ventilasyon tüpü tatbiki endikasyonu konan hastalar dahil edilirken, kontrol grubuna ise nazofarinks sekresyonlarının hasta grubu ile değerlendirilmesi için, otolojik nedenler dışında herhangi bir nedenle operasyon endikasyonu konan hastalar dahil edilmiştir. Çalışma randomize ve prospektif bir çalışma olarak planlanmıştır.



### **3.2.1. Hastalara İlk Başvuruda Yapılan Rutin Muayene ,Tetkik ve Tedaviler**

Çalışmaya hasta grubunda dahil edilen vakalar, otolojik şikayetlerle polikliniğimize başvuran ve yapılan otoskopik muayenelerinde EOM tanı kriterlerine uygun bulgular saptanan hastalar olup tanı akustik impedans ile desteklenmiştir.

Bu şekilde EOM tanısı alan hastalara daha önce herhangi bir sağlık kuruluşunda tedavi alıp almamalarına göre polikliniğimizde antibiotik tedavisi başlanmıştır. Tedaviye yanıtız kalan vakalara kontrol akustik impedans ve preoperatif odyogram ile parasentez veya ventilasyon tüpü tatbiki endikasyonu konmuştur.

### **3.3.EOM Tanı Kriterleri**

1-Otoskopik muayenede donuk gri, mat görünümde intakt timpanik membran, radial kapillerlerde dolgunluk,pnömotik otoskopide zarın hareketsiz veya hareketinin azalmış olması EOM yönünde bulgular olarak değerlendirilmiştir.

2- Akustik impedansta basıncın -200'den daha negatif bulunması destekleyici bulgu olarak kabul edilmiştir.

3- Odyogramda iletim tipi işitme kaybı bulunması tanıyı destekler.

### **3.4.Tedavi**

Başvuran hastalara, daha önce tedavi alıp almamalarına göre , aldılarsa hangi antibiyotik şemasını ne süre kullandıkları göz önünde bulundurularak tedavi başlanmıştır.Buna göre ilk basamak olarak amoksisilin 10-14 gün boyunca, önceden tedavi almış veya ilk basamak antibiyotik seçiminden fayda görmeyen hastalarda ise amoksisilin klavulonat 10-14 gün boyunca uygulanmıştır.Tedavi bitiminden 15 gün sonra hastalar kontrol muayeneye

çağırılmışlar ve akustik impedans sonuçları ile tedaviye yanıtları karşılaştırılmıştır. Tedaviye yanıt vermeyenlerde bir başka antibiyotik seçimine gidilmiştir. İlk kez tedavi alan hastalara 3 ay , daha önceden de muhtelif tedavi alanlara 3 aydan kısa süren tedaviye yanıtızsızlıkla giden takip sonrasında preoperatif odyogram ile tek veya çift taraflı parasentez veya ventilasyon tüpü tatbiki endikasyonu konmuştur.

### **3.5. Klinik Örneklerin Toplanması**

#### **3.5.1. Orta kulak efüzyonları:**

Parasentez veya ventilasyon tüpü tatbiki endikasyonu konan 53 hastaya genel anestezi altında dış kulak yolu mekanik olarak temizlenmiş, takiben salin ve batikon karışımı ile irige edilmiştir.İrigasyonun ardından mikroskop altında miringotomi yapılmış, sadece parasentez yapılacak hastalarda ameliyat sonlandırılmadan orta kulak efüzyonu tüp seti içinde yer alan kulak aspiratörü yardımı ile aspire edilmiştir. Aynı işlem tüp tatbiki yapılacak hastalarda ventilasyon tüpü yerine yerleştirilmeden yapılmıştır. Steril şartlarda alınan efüzyon örneği yine 2 ml steril %0.9'luk NaCl ile dilüye edilip 1 ml'si "BACTEC Ped Plus" kan kültür şişelerine enjekte edildi, 1 ml de DNA ekstraksiyonu için steril mikrosantrifüj Eppendorf tüpüne alınmıştır. Kan kültürü vasatları 30 dakika içinde Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na, Eppendorf tüpleri de dondurulup kullanılmak üzere Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na yollanmıştır.

#### **3.5.2. Nazofarinks Sekresyonları:**

Gerek hasta grubunda gerek kontrol grubunda nazofarinks sekresyonları genel anestezi altında steril şartlarda nelaton tüp yardımıyla aspire edilerek alınmıştır. Alınan örnekler yine steril serum fizyolojik ile dilüye edilmiştir. Bu

örneklerde PCR yapılmayacağından sadece kan kültürü vasatına alınarak Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na yollanmıştır.

### **3.6.Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri.**

Moleküler testlerde kullanılacak orta kulak aspiratı DNA saflaştırma işlemlerinin uygulanacağı güne kadar bekletilmek üzere -20°C'lik derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Orta kulak aspiratının enjekte edildiği kan kültür şişeleri "BACTEC 9120" kan kültür sisteminde inkübasyona alınmıştır. Nazofaringeal aspirasyon materyalleri ise sıvı tiyoglikolat besiyerlerine aktarılmıştır ve 35-37°C'ye ayarlanmış etüvde 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tiyoglikolat besiyerinden %5 koyun kanlı agara ve basitrasinli çikolata agara pasajlar yapılmıştır. Orta kulak aspiratını içeren kan kültür şişelerinin inkübasyonu 5 gün devam ettirilmiş; bu süre içinde klinik örneği içeren kan kültür şişesinde pozitif sinyal elde edilmesi halinde kan kültür şişesinden %5 koyun kanlı agar, basitrasinli çikolata agar ve "eosin methylene blue" (EMB) agara pasaj yapılmış ve plaklar 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Orta kulak aspiratı içeren kan kültür şişesinde inkübe edildiği 5 günlük süre içinde pozitif sinyal elde edilmemesi halinde kan kültür şişesinden %5 koyun kanlı agara pasaj yapılmış, plaklar 35-37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Pasajların yapıldığı plaklarda inkübasyon sonrası üreme saptanmışsa, koloniler makroskopik olarak incelenmiştir. Gram boyama yöntemi ile boyanmaları sonrası Gram boyanma özellikleri ve mikroskopik morfolojileri dikkate alınarak, *Streptococcus pneumoniae*'nin tanımlanması için %5 koyun kanlı agarda optokin duyarlılık testi uygulanmıştır; *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis* ise "BBL Crystal N/H (Neisseria/Haemophilus) paneli"ndeki biyokimyasal reaksiyonlarına göre tanımlanmıştır. Plaklarda üremiş olduğu saptanan *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ve *M. catarrhalis*

dışındaki diğer bakteriler standart mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanarak kültür sonuçları kaydedilmiştir (ref. Murray PR).

### **3.7.Moleküler Tanı Yöntemleri:**

#### **3.7.1. PCR için örneklerin hazırlanması**

Steril mikrosantrifüj tüpünde -20°C'de bekletilmekte olan örnekler derin dondurucudan çıkartılıp, çözünmeleri beklendikten sonra 12,000 xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, çökelti ile birlikte 200 µl örnek kalacak şekilde üstteki süpernatant atılmıştır. DNA saflaştırma işlemi QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) kan ve vücut sıvısı spin protokolü doğrultusunda yapılmıştır. Bu amaçla 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne, sırasıyla, 20 µl QIAGEN proteazı (proteinaz K), 200 µl örnek ve 200 µl AL tamponu konulmuş, mikrosantrifüj tüpü 15 saniye vortekslenmiştir. Karışım 56°C'de 10 dakika inkübe edilmiş, inkübasyonun ardından kapakta kalan damlacıkların toparlanması için mikrosantrifüj tüpü çok kısa bir süre santrifüj edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpündeki karışıma 200 µl etanol (%96-100) eklenmiş ve 15 saniye vortekslenerek tekrar karıştırılmıştır. Ardından, mikrosantrifüj tüpü kapakta kalan damlacıkların toparlanması için çok kısa bir süre santrifüj edilmiştir. QIAamp spin kolon 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilip, mikrosantrifüj tüpündeki karışım kenarlarını ıslatmadan QIAamp spin kolona aktarılmıştır. Toplama tüpüyle birlikte QIAamp spin kolon 6000 xg'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, QIAamp spin kolon 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiş ve filtratı içeren tüp atılmıştır. QIAamp spin kolona kenarlarını ıslatmadan 500 µl AW1 tamponu eklenmiştir, ardından toplama tüpüyle birlikte 6000 xg'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, QIAamp spin kolon 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiş ve filtratı içeren toplama tüpü atılmıştır. QIAamp spin kolona kenarlarını ıslatmadan 500 µl AW2 tamponu eklenmiş, toplama tüpüyle birlikte

20,000 xg'de (14,000 rpm) 3 dakika santrifüj edilmiştir. QIAamp spin kolon 1.5 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek filtrat içeren toplama tüpü atılmıştır. QIAamp spin kolona 200 µl AE tamponu veya distile su eklenmiş, oda sıcaklığında (15-25°C) 1 dakika inkübe edildikten sonra 6000 xg'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası filtratı içeren tüp PCR'ın uygulanacağı güne kadar bekletilmek üzere -20°C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiştir.

### 3.7.2. Multipleks PCR primerleri

Multipleks PCR protokolü için bir adet ortak 3'→5' alt uç primeri ve 3 adet 5'→3' üst uç primerleri kullanılmıştır. Alt uç primeri 21 baz çifti uzunluğunda olan (5'-CTA CGC ATT TCA CCG CTA CAC-3') universal primerdir. Özgül üst uç primerleri ise şöyledir: 24 baz çiftlik *Haemophilus influenzae* primeri (5'- CGT ATT ATC GGA AGA TGA AAG TGC-3') 177-200 pozisyonunda; 20 baz çiftlik *Moraxella catarrhalis* primeri (5'- CCC ATA AGC CCT GAC GTT AC-3') 416-435 pozisyonunda; 22 baz çiftlik *Streptococcus pneumoniae* primeri (5'- AAG GTG CAC TTG CAT CAC TAC C-3') 106-127 pozisyonunda; 20 baz çiftlik *Alloiococcus otitidis* primeri (5'- GGG GAA GAA CAC GGA TAG GA-3') 437-456 pozisyonundadır.

### 3.7.3. Multipleks PCR protokolü

Multipleks PCR karışımı toplam 25µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR örneği 1.6 µM *A. otitidis* primeri, 1.4 µM *H. influenzae* primeri; 0.2 µM *M. catarrhalis* primeri; 0.04 µM *S. pneumoniae* primeri; 0.4 µM universal primeri; 1X PCR tamponu; 200 µM deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP karışımı); 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ve 0.3 U Taq polimeraz (QIAGEN) içermektedir. DNA örneklerinden her bir PCR tüpüne 5 µl kadar konulmuştur. Her bir testin uygulanması sırasında pozitif ve negatif kontroller çalışmaya dahil edildi. Pozitif kontrol olarak *Streptococcus pneumoniae* ATCC .., *Moraxella catarrhalis*

ATCC .. ve *Haemophilus influenzae* ATCC .. suşlarına ait DNA örnekleri kullanılmıştır.

Isı döngü cihazında PCR döngüsü, 3 dakikalık başlangıç denatürasyon basamağını takiben 94°C’de 30 saniye denatürasyon, 66°C’de 45 saniye primer birleşmesi ve 72°C’de 1 dakika polimerizasyon döngüsünün 38 kez tekrarı ve en sonda 72°C’de 5 dakikalık uzama basamağı şeklinde uygulanmıştır. Çoğaltılan PCR ürünleri %2’lik agaroz jelde 1x TAE tamponu içinde 100 voltta 2 saatte ayrıştırılmış ve 0.5 g/ml etidyum bromid içerisinde jelin boyanmasının ardından distilme suda yıkanmıştır. Jeldeki amplifikasyon ürünleri ultraviyole transilüminatör (UVP) ile görüntülenmiş ve jel dökümantasyon sisteminde (UVP-Grab-IT 2.0) programı ile fotoğrafı çekilmiştir. Agaroz jel elektroforezi sırasında her bir jel için  $\phi$ x174 Hae III moleküler ağırlık standardı, örneklerin band büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

**Şekil 1.** Multipleks PCR. Sıra M, moleküler ağırlık standardı ( $\phi$ x174 Hae III); 1-3 klinik örnekler; 4 pozitif kontrol (*S. pneumoniae*; 484 bp, *H. influenzae*; 525 bp, *M.catarrhalis*; 237 bp); 5 negatif kontrol.

## BULGULAR

Tedavi grubuna uygun bulunarak alınan hasta sayısı 53 olup toplam 100 kulak çalışmaya dahil edilmiştir. Endikasyona göre bazı hastaların her iki kulağından, bazılarının ise sadece tek kulağından efüzyon örneği toplanmıştır. Hastaların 33'ü erkek, 20'si kız olup toplam 49 sağ kulak, 51 sol kulak üzerinde çalışma yürütülmüştür. Ortalama yaş 5.7'dir. Nazofarinks kontrol grubunda hasta sayısı 102'dir. 102 nazofarinks sekresyonu örneği alınmıştır. Kontrol grubunun 61'i erkek, 41'i kızdır. Ortalama yaşları 5.2'dir.

**Tablo 4.1.** Orta kulak efüzyonu örneklerinin kültür sonuçları

		kültür	
		Frequency	Valid Percent
Valid	üreme yok	64	64,0
	strept pneumonia	4	4,0
	H. Influenza	8	8,0
	Morexella	2	2,0
	Diger	22	22,0
	Total	100	100,0

Çalışmamızda 100 kulak üzerinde yapılan kültür sonuçlarına göre 64 kulakta(%64) üreme saptanmazken, 36 kulakta (%36) üreme bulunmuş; bunların 4(%4) 'ünde S.Pneumonia, 8(%8) 'inde H.İnfluenza, 2(%2) 'sinde Moraxella saptanmıştır. 22(%22) kulakta ise diğer normal flora elemanları ve farklı grup bakteriler saptanmıştır(Tablo 4.10). %36 üreme yüzdesi içinde 3 major orta kulak patojeni bu oranın % 14'lük kısmını oluşturmaktadır.

**Tablo 4.2.** Orta kulak efüzyonu örneklerinin PCR sonuçları

		PCR		
		Frequency	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	üreme yok	71	71,0	71,0
	strept pneumonia	10	10,0	81,0
	H. İnfluenza	13	13,0	94,0
	Morexella	6	6,0	100,0
	Total	100	100,0	

PCR metodunda ise 100 kulağın 71'inde (%71) üreme saptanmazken; S.Pneumonia, H. İnfluenza ve Moraxella sırasıyla 10(%10), 13(%13) ve 6(%6) kulakta pozitif saptanmıştır. Çalışmamızda PCR pozitiflik oranımız %29 olarak saptanmıştır. Literatüre göre bu düşük oranı PCR metodumuzda kullanılan primerlerin sadece 3 major orta kulak efüzyonuna yönelik olması ve diğer patojenleri negatif grubuna almasından kaynaklandığını söyleyebiliriz. Kültür sonuçlarımıza baktığımızda toplam %36 oranında üreme saptanmasına rağmen ki buna patojen olmayan bakteriler de dahildir- üreme yüzdesinin sadece %14'ünü orta kulak patojenleri oluşturmaktadır. Sonuç olarak sadece S.Pneumonia, H.İnfluenza ve Moraxella Catarrhalis göz önünde bulundurulduğunda kültürle pozitiflik %14 olup, PCR ile bu oran %29'a çıkmaktadır. Bu da literatürdeki diğer sonuçlarla uyumludur. PCR patojeni saptamada kültüre göre daha etkindir.



**Tablo 4.3.** Sağ kulaklardan alınan efüzyon örneklerinin kültür ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması

**SAG\_PCR \* SAG\_KX Crosstabulation**

			SAG KX					Total
			ureme yok	strept pneumonia	H. Influenza	Morexella	Diger	
SAG_PCR ureme yok	Count	23	0	0	0	10	33	
	% within SAG_PCR	69,7%	,0%	,0%	,0%	30,3%	100,0%	
strept pneumonia	Count	2	2	0	0	2	6	
	% within SAG_PCR	33,3%	33,3%	,0%	,0%	33,3%	100,0%	
H. Influenza	Count	0	0	4	1	1	6	
	% within SAG_PCR	,0%	,0%	66,7%	16,7%	16,7%	100,0%	
Morexella	Count	2	0	0	1	1	4	
	% within SAG_PCR	50,0%	,0%	,0%	25,0%	25,0%	100,0%	
Total	Count	27	2	4	2	14	49	
	% within SAG_PCR	55,1%	4,1%	8,2%	4,1%	28,6%	100,0%	

Toplam 49 sağ kulakta yaptığımız incelemede kültürde 2 kulakta S.Pneumonia saptanmış, aynı kulaklarda PCR da pnömokok için pozitif sonuç vermiştir. Ayrıca PCR, kültürün ‘ürüme yok’ olarak saptadığı 2 kulakta ve ‘diğer’ başlık altında üreme olan 2 kulakta da pnömokok saptamıştır. Sonuç olarak şunu söyleyebiliriz ki PCR’ın pnömokok saptadığı kulakların sadece %33.3’ünde kültür aynı patojeni saptamıştır. PCR kültürün tespit ettiklerini yakalamakla kalmayıp kültürde negatif çıkanlarda da etken patojeni bulmuştur.

Sağ kulaklarda yapılan kültür sonrası 49 kulaktan 4’ünde H.İnfluenza saptanmış, PCR aynı kulaklarda H.İnfluenza için pozitif sonuç vermiştir.PCR ayrıca kültürde Moraxella üreyen 1 ve diğer gruptan bakteri üreyen 1 kulakta da etken patojeni saptamıştır. Sonuç olarak, PCR’da H.İnfluenza saptanan kulakların %66.7’sinde kültürde H.İnfluenza bulunmuştur.

Moraxella göz önünde bulundurulduğunda ise kültür 49 kulaktan 2’sinde patojeni saptarken PCR bunların sadece 1’ini yakalayabilmiş. PCR tek başına,

kültürde üreme saptanmayan 2 kulakta ve diğer gruptan bakteri üreyen kulaklardan

1'inde de etkeni saptamıştır. Sonuç olarak Moraxella için pozitif olan örneklerin sadece %25'inde kültürde de aynı etken bulunmuştur.

Genel olarak baktığımızda sağ kulaklarda kültürde 2/49 örnekte S.Pneumonia saptanırken PCR ile 6/49 örnekte etken saptanmıştır. Benzer şekilde H.İnfluenza 4/49 örnekte saptanırken PCR 6/49 örnekte saptanmıştır. Moraxella için ise kültürde üreme 2/49 örnekte olurken PCR da ise 4/49 örnekte etken etken bulunmuştur. Tüm bu sonuçları ele aldığımızda, PCR özellikle S.Pneumonia ve H.İnfluenza başta olmak üzere major orta kulak patojenlerinin tespitini gözden kaçırmamaktadır. Kültürde saptanana pozitif sonuç verdiği gibi kültürde üreme olmayan örneklerde de etkeni bulabilmektedir. Sonuçlarımız literatürü desteklese de örnek sayısının azlığından ötürü PCR yönteminin kültüre göre daha spesifik ve sensitif olduğunu söylemek istatistiksel olarak mümkün değildir.

**Tablo 4.4.** Sol kulaklardan alınan efüzyon örneklerinin kültür ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması

**SOL\_PCR \* SOL\_KX Crosstabulation**

			SOL_KX				Total
			ureme yok	strept pneumonia	H. Influenza	Diğer	
SOL_PCR	ureme yok	Count	29	1	1	7	38
		% within SOL_PCR	76,3%	2,6%	2,6%	18,4%	100,0%
	strept pneumonia	Count	2	1	0	1	4
		% within SOL_PCR	50,0%	25,0%	,0%	25,0%	100,0%
	H. Influenza	Count	4	0	3	0	7
		% within SOL_PCR	57,1%	,0%	42,9%	,0%	100,0%
	Morexella	Count	2	0	0	0	2
		% within SOL_PCR	100,0%	,0%	,0%	,0%	100,0%
Total		Count	37	2	4	8	51
		% within SOL_PCR	72,5%	3,9%	7,8%	15,7%	100,0%

Sol kulaklarda PCR ve kültürü karşılaştırdığımızda ise şu sonuçlara varmaktayız. Toplam 51 sol kulağın 2'sinde kültürde S.Pneumonia üremiş ve PCR bunların 1'ini saptamıştır. PCR ise tek başına, 4 pnömokok için pozitif değer saptamıştır. Yani PCR'da etken patojen saptanan kulakların %25'inde kültür de aynı sonucu vermiştir. PCR ayrıca kültürün üretemediği 2 örnekte de pnömokok bulmuştur. Ancak kültür 1 örnekte PCR'ın negatif saptadığına S.Pneumonia sonucu vermiştir.

H.İnfluenza için değerlendirme yapıldığında ise kültürde toplam 4 kulakta üreme saptanırken PCR bunların 3'ünü saptamıştır. PCR'da H.İnfluenza saptananların %42.9'unda kültürde de aynı etken bulunmuştur. Buna ek olarak PCR kültürde üreme olmayan 4 örnekte de etken patojeni saptamıştır. Farklı olarak kültür, PCR'ın negatif saptadığı 1 kulakta H.İnfluenza saptamıştır.

Genel olarak baktığımızda PCR sol kulaklarda S.Pneumonia ve H.İnfluenza patojenlerinden 1'er vakayı kaçırmış ve bunları kültür tespit etmiştir. Kültürde 2/51 örnekte S.Pneumonia saptanırken, PCR'da 4/51 örnekte etken saptanmıştır. H.İnfluenza için baktığımızda kültürde 4/51 örnekte patojen saptanırken, PCR'da 7/51 örnekte patojen saptanmıştır. Kültürde sol kulaklarda Moraxella üremezken PCR 2/51 örnekte etkeni bulmuştur. Sonuçlarımız literatürü desteklese de örnek sayısının azlığından ötürü PCR yönteminin kültüre göre daha spesifik ve sensitif olduğunu söylemek istatistiksel olarak mümkün değildir.

**Tablo 4.5.** Sağ kulak efüzyonları ve nazofarinks sekresyonlarının kültür sonuçlarının karşılaştırılması

**Crosstab**

			SAG KX					Total
			ureme yok	strept pneumonia	H. Influenza	Morexella	Diger	
NZF_KX	ureme yok	Count	8	0	0	0	3	11
		% within NZF_KX	72,7%	,0%	,0%	,0%	27,3%	100,0%
	strept pneumonia	Count	5	1	0	0	3	9
		% within NZF_KX	55,6%	11,1%	,0%	,0%	33,3%	100,0%
	H. Influenza	Count	0	0	1	1	0	2
		% within NZF_KX	,0%	,0%	50,0%	50,0%	,0%	100,0%
	Diger	Count	14	1	3	1	8	27
		% within NZF_KX	51,9%	3,7%	11,1%	3,7%	29,6%	100,0%
Total		Count	27	2	4	2	14	49
		% within NZF_KX	55,1%	4,1%	8,2%	4,1%	28,6%	100,0%

Araştırmamızın 2 kısmında ise nazofarinkste üreyen etken patojenin kulakta da hastalık etkeni olup olmadığını inceledik. Bunu hem OKE hem de nazofarinksten alınan aspiratların kültür sonuçlarına göre değerlendirdik.

Sağ kulakları ve nazofarinksi karşılaştırdığımızda nazofarinkste üreme olmayan vakaların %72.7'sinde kulakta da üreme olmadığını gördük. 49 nazofarinks örneğinden 9'unda S.Pneumonia saptanırken bunlardan sadece 1'inde kulakta aynı patojen üremiş.Kısaca nazofarinkste S.Pneumonia saptanan vakaların sadece %11.1'inde kulakta aynı patojenin saptandığı söylenebilir.

H.Influenza için değerlendirme yaptığımızda ise 49 nazofarinks örneğinden 2'sinde üreme gözlenirken bunlardan 1'i yani %50'sinde kulakta da aynı patojen izlenmiştir.

Sağ kulaklarda yapılan kültürlerde 2 örnekte Moraxella görülürken,nazofarinks kültürlerinde Moraxella'ya rastlanmamış.

Sonuç olarak bu bulgularla hem örnek sayımızın yetersizliğinden hem de yüzdelerin azlığından ötürü nazofarinkteki H.İnfluenza, S.Pneumonia gibi patojenlerin kulakta hastalık etkeni olduğunu söylemek güçtür.

**Tablo 4.6.** Sağ kulak efüzyonları ve nazofarinks sekresyonlarının kültür sonuçlarının karşılaştırılması

			Crosstab				Total
			SOL_KX				
			ureme yok	strept pneumonia	H. Influenza	Diger	
NZF_KX	ureme yok	Count	11	0	0	0	11
		% within NZF_KX	100,0%	,0%	,0%	,0%	100,0%
	strept pneumonia	Count	5	0	0	3	8
		% within NZF_KX	62,5%	,0%	,0%	37,5%	100,0%
	H. Influenza	Count	2	0	1	1	4
		% within NZF_KX	50,0%	,0%	25,0%	25,0%	100,0%
	Diger	Count	19	2	3	4	28
		% within NZF_KX	67,9%	7,1%	10,7%	14,3%	100,0%
Total	Count	37	2	4	8	51	
	% within NZF_KX	72,5%	3,9%	7,8%	15,7%	100,0%	

Sol kulak OKE'leri ve nazofarinks aspiratlarının kültür sonuçlarına baktığımızda; nazofarinkste üreme olmayan örneklerin hiçbirinde OKE'de da üreme olmamış. Nazofarinkste S.Pneumonia saptanan vakaların(8/51) hiçbirinde OKE'da S.Pneumonia saptanmamış. Yine nazofarinkste H.İnfluenza saptanan örneklerden(4/51) sadece 1'i aynı zamanda OKE'de da rastlanmıştır. OKE kültür sonuçlarına baktığımızda ise S.Pneumonia ve H.İnfluenza saptanan örneklerin hiçbirinde nazofarinkste bu patojenler gösterilememiş.

Bu sonuçlarla gerek örnek sayısının azlığından gerek üremedeki farklılıklardan ötürü nazofarinkteki patojenin kulakta da hastalık etkeni olduğunu

söylemek güçtür.

**Tablo 4.7.** Hasta ve kontrol grubu nazofarinks kolonizasyonunun karşılaştırılması

**GRUP \* NZF\_KX Crosstabulation**

			NZF_KX					Total
			ureme yok	strept pneumonia	H. Influenza	Morexella	Diger	
GRUP	hasta	Count	12	9	4	0	28	53
		% within GRUP	22,6%	17,0%	7,5%	,0%	52,8%	100,0%
	kontrol	Count	41	10	4	3	44	102
		% within GRUP	40,2%	9,8%	3,9%	2,9%	43,1%	100,0%
Total	Count	53	19	8	3	72	155	
	% within GRUP	34,2%	12,3%	5,2%	1,9%	46,5%	100,0%	

Çalışmamızın üçüncü aşamasında EOM (+) olan hasta nazofarinksleri ve EOM(-) kontrol grubu nazofarinksleri arasında 3 major orta kulak patojenlerinin saptanma oranı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu şekilde literatürde yapılan diğer çalışmalarda ki gibi OME(+) olan hastaların nazofarinksinde OME(-) olanlara göre daha yüksek oranda H.Influenza, S.Pneumonia veya Moraxella'ya rastlamak amaçlanmıştır.

Kültür sonuçlarımıza baktığımızda hasta grubunda üreme oranı % 77.4 olarak saptanırken, kontrol grubunda % 59.8 olarak bulunmuştur. Mikroorganizmaları tek tek göz önünde bulundurduğumuzda hasta nazofarinksinde H.Influenza % 7.5 oranında, kontrol grubunda ise % 3.9 olarak saptanmıştır. S.Pneumonia ise hasta nazofarinkslerinde % 17 sıklığında görülürken kontrol grubunda ise % 9.8 olarak bulunmuştur.

Bu oranlar arasında yaklaşık 2 kat fark olmasına rağmen sonuçlara istatistiksel olarak anlamlı diyebilmek için iki grup arasında S.Pneumonia için karşılaştırma yapıldığında Pearson Chi-Square istatistiksel yöntemi ile  $p=0.196$  olarak saptanmıştır(Tablo-8). H.İnfluenza için karşılaştırılma yapıldığında ise örnek sayısı az olduğundan Fischer's Exact Test kullanılmış ve  $p=0.446$  olarak saptanmıştır(Tablo-9).

Bu nedenle her ne kadar hasta ve kontrol grubu arasında patojenin üreme yüzdeleri açısından 2 kata yakın fark olsa ve literatürü desteklese de örnek sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bulunmamaktadır.

**Tablo 4.8.** S.Pneumonia için hasta ve kontrol nazofarinkslerinin karşılaştırılması

**GRUP \* NZF\_PN Crosstabulation**

			NZF_PN		Total
			,00	1,00	
GRUP hasta	Count	44	9	53	
	% within GRUP	83,0%	17,0%	100,0%	
kontrol	Count	92	10	102	
	% within GRUP	90,2%	9,8%	100,0%	
Total	Count	136	19	155	
	% within GRUP	87,7%	12,3%	100,0%	

**Chi-Square Tests**

	Value	df	p-degeri
Pearson Chi-Square	1,670	1	,196
N of Valid Cases	155		

a. Computed only for a 2x2 table

**Tablo 4.9.** H.İnfluenza için hasta ve kontrol nazofarinkslerinin karşılaştırılması

**GRUP \* NZF\_INF Crosstabulation**

			NZF_INF		Total
			,00	1,00	
GRUP	hasta	Count	49	4	53
		% within GRUP	92,5%	7,5%	100,0%
	kontrol	Count	98	4	102
		% within GRUP	96,1%	3,9%	100,0%
Total	Count	147	8	155	
	% within GRUP	94,8%	5,2%	100,0%	

**Chi-Square Tests**

	Value	p-degeri
Fisher's Exact Test		,446
N of Valid Cases	155	

a. Computed only for a 2x2 table



**Tablo 4.10.** Orta Kulak Efüzyonu kültürlerin de ‘Diğer’ başlığı altında üremesi saptanan mikroorganizmalar

MİKROORGANİZMA	n(100)
Streptococcus İntermedius	1
Staphylococcus Warneri	1
Neisseria Flavescens	1
Hemophilus Ducreyi	2
Staphylococcus Epidermidis	4
Aerosporlu Basil	1
Bacillus	1
Pseudomonas	2
Staphylococcus Auricularis	1
Streptococcus Sanguis	2
$\alpha$ –Hemolitik Streptococcus	1
Candida Albicans	1
Non-albicans Candida	2
Micrococcus	1
Microkristenea	1
Toplam	22

## TARTIŞMA

EOM, tanımlandığı üzere intakt bir timpanik membran arkasında efüzyon toplanmasıyla karakterize çocukluk çağının en sık işitme azlığı sebeplerinden biridir. EOM'nin gerek medikal gerek cerrahi tedavisi global sosyoekonomik bir öneme haiz olduğundan , yeni tedavi modalitelerine; özellikle aşı ile önleme gibi girişimlere her geçen gün ilgi artmaktadır. EOM'den sorumlu olan veya patogeneze rol oynayan mikroorganizmaların prevalansı hakkında edinilecek bilgiler, en uygun antibiyotiğin seçilmesine ve dolayısıyla cerrahi gerektiren komplikasyonların azaltılmasına yardımcı olabilecektir.

EOM patogenezi her ne kadar tam aydınlanmamış olsa da ileri sürülen birtakım nedenler ya tek başına ya da kombinasyon halinde hastalıkta rol oynamaktadırlar. Bunlar arasında uzun süren veya rekürren AOM , sık ÜSYE, çocuklardaki Östaki tüpünün yetiştikine göre anatomik farklılık göstermesi, mastoid havalanmanın az olması, birtakım konjenital anomaliler ve immün yetmezlik gibi faktörler sayılabilir. OM'de saptanan bakterilerin çoğu nazofarinksin benign kommensal mikroorganizmalarıdır. Oysa bu mikroorganizmalar Östaki tüpü içerisinden retrograd yolla timpanik kaviteye ulaştıklarında , oportunistik patojenler olarak davranmaktadır. Bu patojenler orta kulak boşluğuna bir kere ulaştıktan sonra bu ortamı yabancı kabul edip farklı birtakım bakteriyel yüzey antijenleri oluşturmaktadırlar. Benzer şekilde metabolizma da nazofarinksin bu mikroorganizma çeşitliliğine karşı toleransını değiştirmekte ve orta kulaktaki bu patojenlere karşı immün cevabını arttırmaktadır.

Literatüre bakıldığında gerek kültür ve gerek PCR gibi yöntemlerle EOM mikrobiyolojisi hakkında epidemiyolojik çalışmalar için faydalı olabilecek değerli sonuçlara ulaşıldığını görmekteyiz. Önceden infeksiyöz kabul

edilmeyen bu hastalığın etyopatogenezi hakkındaki fikirler, kültür yöntemleriyle orta kulak efüzyonlarında %20-30 arasında üreme saptanmasıyla artık değişmiştir. PCR yöntemlerinin de tanısal metodlar arasında yer almasıyla OKE'de bakteriyel DNA saptama oranları %75'e kadar çıkmış, bu da aslında kültürle vardığımız yüzdelerin olduğundan ne kadar düşük saptandığını göstermiştir.

Kurono ve diğ.(39) yaptıkları çalışmada OKE'de kültür yöntemleriyle bakteri saptama insidansı sadece %23.7 olarak bulunmuştur. Hotomi ve diğ.(10) ise kültürle pozitiflik oranını %20-40 arasında, PCR ile pozitifliği ise %80'e yakın bulunmuştur. Üzeyir Gök ve diğ.(64) 4 ile 14 yaş arası 20 hastadan aldıkları 37 örneği incelemişler, 9'unda(%24.3) kültürle pozitiflik saptamışlardır.37 örneğin 35'inde(%94.5) PCR ile pozitiflik bulunmuştur. Panu ve diğ.(11) yaptıkları bir diğer çalışmada ise 25 OKE örneğini incelemiş; kültürle bunların 8(%32)'inde üreme saptarken, 21(%84)'inde PCR ile pozitiflik görmüşlerdir. Gerek kültür gerek PCR ile orta kulakta en sık saptanan patojenler Haemophilus İnfluenza başta olmak üzere Streptococcus Pneumonia ve Moraxella( Branhamella) Chatarrhalis'tir. Sutton ve diğ(9)'nin çalışmasında kültür pozitifliği HI için %10.2, SP için %6.3 ve MC için %3.9 olarak saptanmıştır. Saffer ve diğ.(65) ise yukarda bahsedilen 3 major patojen dışında S. aureus, S. epidermidis ve P.aeruginosa gibi patojenlerin sıklığından da söz etmişlerdir.

Çalışmamızda da ilk amaç olarak literatürdeki bu bulguları destekleyecek sonuçlara ulaşmak hedeflenmiştir. Uygulamamızda 100 kulak üzerinde yapılan kültür sonuçları 36 kulakta(%36) üreme saptamış, bunların 4(%4) 'ünde S.Pneumonia, 8(%8) 'inde H.İnfluenza, 2(%2) 'sinde Moraxella görülmüştür. Kültür sonuçlarımıza baktığımızda toplam %36 üreme yüzdesinin -ki buna patojen olmayan bakteriler de dahildir- sadece %14'ünü orta kulak patojenleri oluşturmaktadır. Diğer çalışmalardan farklı olarak kültür sonuçlarımıza göre S.Pneumonia önde gelen mikroorganizma olarak saptanmıştır.

PCR metodunda ise 100 kulağın 29'unda (%29) üreme saptanırken ; S.Pneumonia, H. İnfluenza ve Moraxella sırasıyla 10(%10), 13(%13) ve 6(%6) kulakta pozitif bulunmuştur. PCR ile en sık rastlanan patojen H.İnfluenza olarak tespit edilmiştir.

Literatüre göre bu düşük PCR pozitifliği, metodumuzda kullanılan primerlerin sadece 3 major orta kulak patojenine yönelik olmasından ve diğer patojenlerin negatif grubuna alınmasından kaynaklanabilir. Yine de PCR ile %29 oranında H.İnfluenza, S.Pneumonia ve Moraxella Chatarrhalis saptama yüzdesi, %14 oranında kültür ile aynı patojenleri saptama yüzdesinden büyüktür ve yukarıda bahsedilen çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Kısaca PCR'ın patojeni saptamada kültüre göre daha etkin olduğu söylenebilir.

Sadece sağ kulakları göz önüne aldığımızda kültürde 2/49 örnekte S.Pneumonia saptanırken PCR ile 6/49 örnekte etken saptanmıştır. Benzer şekilde H.İnfluenza 4/49 örnekte kültürle saptanırken, PCR ile 6/49 örnekte saptanmıştır. Moraxella için ise kültürde üreme 2/49 örnekte olurken PCR da ise 4/49 örnekte etken etken bulunmuştur. Tüm bu sonuçları ele aldığımızda, PCR özellikle S.Pneumonia ve H.İnfluenza başta olmak üzere major orta kulak patojenlerinin tespitini gözden kaçırmamaktadır. Kültürde saptanana pozitif sonuç verdiği gibi kültürde üreme olmayan örneklerde de etkeni bulabilmektedir. Sonuçlarımız literatürü desteklese de örnek sayısının azlığından ötürü PCR yönteminin kültüre göre daha spesifik ve sensitif olduğunu söylemek istatistiksel olarak mümkün değildir.

Sadece sol kulakları göz önüne aldığımızda ise kültürde 2/51 örnekte S.Pneumonia saptanırken, PCR'da 4/51 örnekte aynı etken saptanmıştır. H.İnfluenza için baktığımızda kültürde 4/51 örnekte patojen saptanırken, PCR'da 7/51 örnekte patojen saptanmıştır. Kültürde sol kulaklarda Moraxella üremezken PCR 2/51 örnekte etkeni bulmuştur. PCR S.Pneumonia ve H.İnfluenza patojenlerinden 1'er vakayı kaçırmış ve bunları kültür tespit etmiştir. Sonuçlarımız literatürü desteklese de örnek sayısının azlığından ötürü

PCR yönteminin kültüre göre daha spesifik ve sensitif olduğunu söylemek istatistiksel olarak mümkün değildir.

Kültürde üreme yüzdesinin PCR yöntemi ile saptanana göre düşük olması farklı şekillerde açıklanabilir: (a) Orta kulakta varolan mikroorganizma miktarı 10000CFU/ml cinsinden kültür ile saptanacak limitlerin altında olabilir (b) Bakteriler hücre duvarlarının peptidoglikan tabakasını sentezleyemeyen, bu şekilde orijinal şekillerini değiştirip antibiyotik rezistansı kazanan ve in-vitro ortamda koloni oluşturmayan L-formuna dönüşebilirler (c) Orta kulakta bakteriler bir yüzeye veya birbirini üzerine yapışıp biofilm haline geçerek metabolik aktivitelerini azaltabilir ve antibiyotik direnci kazanabilir. Bu 3 durum da tedavi veya konakçının immün cevabı sonucu olabilir. Ek olarak biofilm halindeki bakteriler, metabolik faaliyetleri ve üreme hızı açısından yavaş olduklarından planktonik bakterilere oranla kronik enflamasyondan ve uzun süreli semptomsuz efüzyon varlığından da sorumlu tutulmaktadır(14). Kültürde üremenin az oluşu yine yakın zamanda antibiyotik kullanımından kaynaklanıyor olabilir. Bu faktörün etkinliğini azaltmak için çalışmamıza 2 haftadan daha yakın zaman içinde antibiyotik kullanım öyküsü veren hastalar dahil edilmemiştir.

PCR ile saptanan pozitiflik oranlarının kültüre göre fazla olması ise bu yöntemin hastalık etkeni olmayan ölü bakterilerden ekstrakte olmuş DNA parçalarını saptayabiliyor olabileceği kuşkusunu gündeme getirmiş, Cantekin ve diğ.(66) PCR ile tespit edilenlerin fosilize bakteri DNA kısımları olduğunu belirtmişlerdir. Bu doğrultuda literatürde yapılan çalışmalarda özellikle Post ve diğ.(12,67) değerli sonuçlara ulaşmışlardır. Yaptıkları hayvan çalışmasında DNA yıkımının, bakteri ölümünü takiben 2 gün içinde gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu da tespit edilen DNA'nın geçirilmiş eski AOM ataklarından kalan artık DNA olmadığını göstermektedir. PCR pozitifliğinin yüksek olmasının bir nedeni olarak da literatürdeki bazı çalışmalarda belirtilen PCR yalancı pozitifliği gösterilmiştir. Çalışmamızda yalancı pozitifliği önlemek

maksatlı hem negatif hem de pozitif kontrol örnekleri, PCR örneklerine katılmıştır.

Bilindiği gibi PCR ile çok az miktarda genetik materyalin amplifikasyonu mümkün olabilmekle beraber örnek içindeki DNA materyali 9 gün ile 3 hafta arasında değişen bir zaman aralığı boyunca amplifiye edilebilir kalabilmektedir(64). PCR tabanlı mikrobiyolojik yöntemlerin çoğu Southern hibridizasyonu kullanmakta olup bu hem zaman ve maliyet kaybı oluşturmakta hem de 1'den çok tanısal basamak gerektirmektedir. Günümüzde artık PCR yöntemleri de kendi içlerinde oldukça ilerleme sarfetmiş, daha kısa zamanda daha güvenilir sonuçlar veren, az miktarda örnekle çalışıp kontaminasyon riskini en aza indirgeyen yöntemler kullanıma girmiştir. Bunlar arasında multiplex PCR ve real-time PCR sayılabilir.

Çalışmamızda faydalandığımız multiplex PCR, diğer PCR yöntemlerine göre zamandan ve kullanılan ara maddelerden tasarruf sağlamaktadır. Çünkü tek bir reaksiyon planlanmakta ve analiz edilmektedir. Multiplex PCR'ın yer aldığı literatürdeki diğer çalışmalarda bakteriyel 16S rRNA gen sıralaması hedef olarak kullanılırken, bazı çalışmalarda da H.İnfluenza dış membran proteinlerinden biri ve H.İnfluenza infeksiyonlarına karşı önleyici potansiyel aşı komponenti olan p6 proteini kullanılmaktadır(68,69). Pnömonok için ise 1995'de Salo ve diğ tarafından cinse özgü bir toksin olan 'Pnömolizin' kullanılmıştır(70,71). Multiplex PCR ile sonuçların elde edilmesi 7 saati geçmemekte, kültüre göre çok daha hızlı sonuç verebilmektedir(72).

Real-time PCR ise multiplex PCR'dan daha ileri bir metod olup hızlı, sensitif ve kullanımı kolaydır. Hazır ekstrakte edilmiş DNA kullanıldığında sonuçların elde edilmesi yaklaşık bir buçuk saati bulmaktadır. Real-time PCR ile kontaminasyon da en aza indirgenmiştir(73).

Östaki tüpü ve patojenlerin nazofarinksten orta kulağa olan retrograd uzanımı EOM etyopatogenezinde rol aldığından (74) çalışmamızın ikinci amacı olarak nazofarinkste üreyen etkenin hasta kulakta da EOM etkeni olup olamayacağını ortaya konması hedeflenmiştir. Literatüre baktığımızda Tomoya ve diğ.(75) çalışmalarında PCR ile nazofarinkste p6 gen DNA'sı saptanan hastaların yarısından fazlasında aynı DNA'nın OKE örneğinde de olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda OKE içinde p6 gen DNA'sı saptanan hastaların tümünde de hedef DNA nazofarinkste saptanmıştır. Tüm bunlar EOM'nun nazofarinksten Östaki tüpü boyunca bakteriyel invazyon sonucu ortaya çıkabileceğini desteklemektedir.

Bu doğrultuda sağ kulakları ve nazofarinksi karşılaştırdığımızda 49 nazofarinks örneğinden 9'unda kültürle S.Pneumonia saptanırken bunların sadece 1'inde kulakta aynı patojenin ürediğini görülmüştür. H.İnfluenza için değerlendirme yaptığımızda ise 49 nazofarinks örneğinden 2'sinde üreme gözlenirken bunlardan 1'i yani %50'sinde kulakta da aynı patojenin varlığı saptanmıştır. Sağ kulaklarda yapılan kültürlerde 2 örnekte Moraxella görülürken, nazofarinks kültürlerinde Moraxella'ya rastlanmamıştır.

Sol kulak OKE'leri ve nazofarinks aspiratlarının kültür sonuçlarına bakıldığında; nazofarinkste üreme olmayan örneklerin hiçbirinde OKE'de de üreme olmamıştır. Nazofarinkste S.Pneumonia saptanan vakaların(8/51) hiçbirinde OKE'de S.Pneumonia saptanmamıştır. Yine nazofarinkste H.İnfluenza saptanan örneklerden(4/51) sadece 1'i aynı zamanda OKE'de de rastlanmıştır. OKE kültür sonuçlarına baktığımızda ise S.Pneumonia ve H.İnfluenza saptanan örneklerin hiçbirinde nazofarinkste aynı patojenler gösterilememiştir.

Bu bulgularla gerek örnek sayısının azlığından gerek üremedeki farklılıklardan ötürü nazofarinksteki patojenin kulakta da hastalık etkeni olduğunu söylemek güçtür. Bu nedenle kendi sonuçlarımız Tomoya ve diğ.'nin sonuçlarını desteklememektedir.

Çalışmamızda son olarak normal popülasyonda nazofarinkste kolonize olan orta kulak patojenlerinin, EOM olan hasta popülasyonundaki nazofarinks kolonizasyonu ile karşılaştırılması hedeflenmiştir. Literatüre baktığımızda Freijd ve diğ. (40) ve Faden ve diğ.(76) yaptıkları çalışmada; H.İnfluenza'nın her ne kadar normal nazofarinks florasında olmasına rağmen, taşıyıcılığın sağlıklı çocuklara oranla EOM olan çocuklarda daha fazla olduğunu saptamışlardır. Kültür yöntemleri ile nazofarinksteki H.İnfluenza sıklığı Freijd ve diğ.'nin çalışmasında %9 ile %20 arasında düşük oranlarda seyrederken sağlıklı popülasyonda nazofarinks sekresyonlarında PCR ile p6 gen pozitifliği %46 olarak saptanmıştır(75). Kuro no ve diğ.(39) yaptıkları çalışmada ise H.İnfluenza'ya yönelik olarak nazofarinkste p6 geni DNA'sı %86 hastada tespit edilmiştir.Bu da PCR'ın kültüre oranla nazofarinkste varolan mikroorganizmayı daha sensitif olarak gösterdiğini ve nazofarinksteki H.İnfluenza çoğalmasının EOM patogeneziyle ne kadar yakın ilgili olduğunu ortaya koymaktadır. Kendi çalışmamızda literatürden farklı olarak laboratuvar imkanlarımız dahilinde nazofarinks sekresyonlarının değerlendirilmesinde sadece kültür yöntemi kullanılmış olup PCR, nazofarinks sekresyonlarında çalışılmamıştır.

Nazofarinks sekresyonları kültür sonuçlarımıza baktığımızda hasta grubunda üreme oranı % 77.4 olarak saptanırken, kontrol grubunda % 59.8 olarak bulunmuştur. Mikroorganizmaları tek tek göz önünde bulundurduğumuzda hasta nazofarinksinde H.İnfluenza % 7.5 oranında, kontrol grubunda ise % 3.9 olarak saptanmıştır. S.Pneumonia ise hasta nazofarinkslerinin % 17 sıklığında görülürken kontrol grubunda ise % 9.8 olarak bulunmuştur.

Bu oranlar arasında yaklaşık 2 kat fark olmasına rağmen sonuçlara istatistiksel olarak anlamlı diyebilmek için iki grup arasında S.Pneumonia için karşılaştırma yapıldığında Pearson Chi-Square istatistiksel yöntemi ile  $p=0.196$  olarak saptanmıştır(Tablo-8). H.İnfluenza için karşılaştırılma yapıldığında ise örnek sayısı az olduğundan Fischer's Exact Test kullanılmış ve  $p=0.446$  olarak



saptanmıştır(Tablo-9). Her iki değer için de istatistiksel olarak anlamlı( $p<0.05$ ) demek mümkün değil ama literatürü destekleyicidir.

Bu nedenle her ne kadar hasta ve kontrol grubu arasında patojenin üreme yüzdeleri açısından 2 kata yakın fark olsa ve literatürü desteklese de örnek sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bulunmamaktadır.

## SONUÇLAR

1-EOM etkeni olarak en sık rastlanan patojenler olan H.İnfluenza, S.Pneumonia ve Moraxella Catarrhalis'i saptamada PCR ve kültürü karşılaştırdığımızda PCR'ın etkeni bulmada daha etkin olduğunu ve kültür ile saptanamayan mikroorganizmaları da saptadığı söylenebilir. Ancak örnek sayısı yetersiz olduğundan bu fark için istatistiksel olarak anlamlı diyebilmek güçtür.

2-Nazofarinkteki patojenin EOM etkeni olup olmadığını kültürle saptamaya çalıştığımızda gerek örnek sayısının yetersizliği gerek sadece kültür yönteminin kullanılmasından ötürü ikisi arasında ilişkili bir sonuç bulamamaktayız.

3- Son olarak, EOM olan hastalarda nazofarinkte kolonize olan orta kulak patojenlerinin normal popülasyona oranla daha fazla olduğunu göstermek için yaptığımız hasta ve kontrol grubu nazofarinks kültürlerinin sonucu bu hipotezimizi desteklemekte, EOM patogenezi açısından nazofarinks florasının önemini göstermekte ve her iki grup arasında 2 kata yakın fark görmekteyiz. Ancak yine de yukarıda bahsettiğimiz nedenlerden ötürü bu fark için istatistiksel olarak anlamlı demek mümkün değildir.

## KAYNAKLAR

1. Klein, J.O., M.Tos, B.Hussl, R.F. Naunton, M. Ohyama, and P.B. Van Cauwenberge.1989.Definition and classification. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.98(Suppl.139):10.
2. Shurin, P.A.,S. I. Pelton, A. Donner, and J.O.Klein. 1997.Persistence of middle-ear effusion after acute otitis media in children.300:1121-1123.
3. Rosenfeld R M,Culpepper L, Doyle K J, Grundfast K M, Hoberman A, Kenna M A, Lieberthal A S, Mahoney M, Wahl R A, Woods C R Jr, Yawn B. American Academy of Pediatrics Subcommittee on otitis media with effusion; American Academy of Family Physicians ; American Academy of Otolaryngology—Head and Neck Surgery.Clinical practice guideline.Otitis media with effusion.Otolaryngol Head Neck Surg. 2004;130:95-118.
4. Kaya S, Aktaş F, Belgin E, Derinsu U, Babayiğit S, Köselioğlu B. Ankara İli ve çevresinde okul dönemi çocuklarında orta kulak hastalıkları insidansı.Türk Otolaringoloji Arşivi 1987;25:184-185.
5. Öztürk O, Harputoğlu U, Egeli E, Oğlan F, Mayda A. İlkokul çağındaki çocuklarda kulak burun boğaz hastalıkları tarama sonuçlarının sosyoekonomik seviyeye göre değerlendirilmesi. Türk Otolaringoloji Arşivi 2002;40:53-57.
6. Okur E, Yıldırım I, Kılıç M A, Güzelsoy S. Prevalence of otitis media with effusion among primary school children in Kahramanmaraş, in Turkey. Int J Pediatr Otolaryngol. 2004;68:557-562.
7. Demireller A. İlkokul öncesi çocuklarda seröz otitis media insidansı. Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı, Ankara, 1985.

8. Senturia, B.H., C.F. Gessart, C.D. Carr, and E.S. Baumann. 1958. Studies concerned with tubotympanitis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 67:440-467.
9. Sutton et al. Resistant bacteria in the middle ear fluid at the time of tympanostomy tube surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:24-9.
10. Hotomi M, Tabata T, Kakiuchi H, Kunimoto M. Detection of *Haemophilus influenzae* in middle ear of otitis media with effusion by polymerase chain reaction. *Int J Ped Otol.* 1993;27:119-26.
11. Hendolin P, Markkanen A, Ylikoski J, Wahlfors J. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusion. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2854-8.
12. Post, J. C., J.J. Aul, M.L. Pettigrew, J.R. White, K.W. Anderson, R.M. Wadowsky, D.R. Reagan, E.S. Walker, L.A. Kingsley, A.E. Magit, and G.D. Ehrlich. 1995. Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion. *JAMA* 273:1598-1604.
13. Park HJ et al. Detection of bacteria in the middle ear effusion and adenoid tissue of chronic otitis media patient using PCR method. *Korean j Otolaryngol* 2000;43:913-7.
14. M. Beatriz Rotta Pereira et al. Prevalence of bacteria in children with otitis media with effusion. *J Pediatr* 2004.
15. Senturia, B.H., C.D. Bluestone, J.O. Klein, D.J. Lim, and J.L. Paradise. 1980. Report of the Ad Hoc Committee on Definition and Classification of Otitis Media and Otitis Media with Effusion. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 89(Suppl. 68):3.
16. Zielhuis G A, Straatman H, Racht G H, van Der Broekt P. Analysis and presentation of data on the natural course of otitis media with effusion in children. *Int J Epidemiolog.* 1994;19:1037-1044.
17. Fiellau Nikolajsen M. Tympanometry and secretory otitis media, observation on diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention in

prospective cohort studies of three year old children. *Acta Otolaryngol.* 1985,Suppl 394.

18. Tele D W, Klein J O, Rosner B A. Epidemiology of otitis media in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 1980; 89: 5-6.
19. Thomsen J, Tos M. Spontaneous improvement of secretory otitis. A long-term study. *Acta Otolaryngol.* 1981;92: 493-499.
20. Tos M. Spontaneous improvement of secretory otitis media and impedance screening. *Arch otolaryngol.* 1980;106:345-349.
21. Tos M, Holm-Jensen S, Sorensen CH, Mogensen C. Spontaneous course and frequency of secretory otitis in 4-year old children. *Arch Otolaryngol.* 1982;108:4-10.
22. Akyıldız N A: Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 1998, 275-330.
23. MRC Multi-centre Otitis Media Study Group. Risk factors for persistence of bilateral otitis media with effusion. *Clin Otolaryngol* 2001;26:147-156.
24. Van Balen F A, De Melker R A. Persistent otitis media with effusion. Can it be predicted. A family practice follow-up study in children aged 6 months to 6 years. *J Fam Pract.* 2000;49:605-611.
25. Kessner D, Snow C K, Singer T. Assessment of medical care for children. *Contrasts in health care status, vol:3.* Washington, DC, National Academy of Sciences, 1974.
26. Sade J, Russo E, Fuchs C, Cohen D. Is secretory otitis media a single entity. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003;112:342-347.
27. Engel J, Anteunis L, Volovics A, Hendriks J, Marres E. Risk factors of otitis media with effusion during infancy. *Int J Ped Otorhinolaryngol.* 1999;48:239-249.

28. Casselbrant M L, Brostoff L M, Flaherty M R. Otitis media with effusion in preschool children. *Laryngoscope*. 1985;95:428-436.
29. Moriniere S, Soin C, Lescanne E, Ployet M J. Epidemiology of the otitis media with effusion. *Rev Prat*. 1998;48:838-842.
30. Sanyal M A, Henderson F W, Stempel E C. Effect of the upper respiratory tract infection on Eustachian tube ventilatory function in the preschool children. *J Pediatrics*. 1980;97:11-15.
31. Gordon M A, Grunstein E, Burton W B. The effect of the season on otitis media with effusion resolution rates in the New York Metropolitan area. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2004;68:191-195.
32. Watanebe T, Fujiyoshi T, Tomogana K, Mogi G. Adenoids and otitis media with effusion in children. *Adv Otorhinolaryngol*. 1992;47:290-296.
33. Corey J P , Adham R E, Abbass A H. The role of IgE-mediated hypersensitivity in otitis media with effusion. *Am J Otolaryngol*. 1994;15:138-144.
34. Hoşal İ N. Seröz otitis medianın etyolojisi üzerine çalışmalar. Doçentlik Tezi. Ankara Üniversitesi Hacettepe Tıp ve Sağlık Bilimleri Fakültesi, Ankara, 1966.
35. Stool S E, Berg A O, Berman S, Carney C J, Cooley J R, Culpepper L, Eavey R D, Feagans L V, Finitzo T, Friedman E. Managing otitis media with effusion in young children .Quick Referance Guide for Clinicians. AHCPR publication 94-0623.
36. Politzer A, Ballin M J, Heler C L(eds). A Text book of the diseases of the ear, 4th ed. London: Balliere, Tindall & Cox, 1902.
37. Hilton A, Herdman R D C, Hartley C. The incidence of bacteria in middle ear effusions . *Clin Otolaryngol*. 1996;21:158-161.
38. Brook I, Yocum P, Shah K, Feldman B, Epstein S. Microbiology of serous otitis media in children. Correlation with age and length of effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110:87-90.

39. Kurono, Y., K. Tomonaga, and G. Mogi. 1988. Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus in otitis media with effusion. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 114:1262-1265.
40. Freijd, A., S. Bygdeman, and B. Rynnel-Dagöö. 1984. The nasopharyngeal microflora of otitis-prone children, with emphasis on H. Influenzae. Acta Otolaryngol. 97:117-126.
41. Post J C, Preston R A, Aul J J. Molecular Analysis of bacterial pathogenesis in otitis media with effusions. JAMA. 1995;273:1598-1604.
42. Rayner M G, Zhang Y, Gorry M C. Evidence for bacterial activity in culture negative otitis media with effusion. JAMA. 1998;279:296-299.
43. Ataoğlu H, Göksu N, Kemaloğlu Y, Bengisun S, Özbilen S. Preliminary report on L- forms. Possible role in the infectious origin of secretory otitis media. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1994;103:434-438.
44. Fergie N, Bayston R, Pearson J P, Birchall J P. Is otitis media with effusion a biofilm infection. Clin Otolaryngol. 2004 Feb;29:38-46.
45. Pitkaranta A, Jero J, Arruda E. Polymerase chain reaction-based detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus in otitis media with effusion. J Ped. 1998;133:390-394.
46. Shaw C B, Obermyer N, Wetmore S J. Incidence of adenovirus, respiratory syncytial virus in chronic otitis media with effusion using polymerase chain reaction. Otolaryngol Head Neck Surg. 1995;113:234-241.
47. Ball S S, Prazma J, Dais C G. Role of tumour necrosis factor and interleukin 1 in endotoxin induced middle ear effusions. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1997;106:633-639.
48. Hunter S E, Singla A K, Prazma J. Mucine production in the middle ear in response to lipopolysaccharides. Otolaryngol Head Neck Surg. 1999;120:884-888.

49. Carrie S, Hutton D A, Birchall J P, Gren G G R, Pearson J P. Otitis media with effusion. Components with contribute to the viscous properties. *Acat Otolaryngol(Stockh)*. 1992;112: 504-511.
50. Sano S, Kamide Y, Schachern P A. Micropathologic changes of pars tensa in children with otitis media with effusion. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1994;120:815-819.
51. Yellon R F, Doyle W J, Whiteside T. Cytokines, immunoglobulins, and bacterial pathogens in middle ear effusions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;121:865-869.
52. Bernstein J M. Role of allergy in eustachian tube blockage and otitis media with effusion. A review . *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996;114:562-568.
53. Nguyen L H P, Manoukian J J, Sobol S E, Tewfik T L, Mazer B D, Schloss M D, Taha R, Hamid Q A. Similar allergic inflammation in the middle ear and the upper airway. Evidence linking otitis media with effusion to the united airways concept. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1110-1115.
54. Hurst D S, Venge P. Evidence of eosinophil, neutrophil, and mast-cell mediators in the effusion of OME patients with and without atopy. *Allergy*. 2000;55:435-41.
55. Hergils L, Magnuson B. Regulation of negative middle ear pressure without tubal opening. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987;113:829-832.
56. Matsune S, Sando L, Takahashi H. Abnormalities of lateral cartilaginous lamina and luman of eustachian tube in cases of cleft palate. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1991;100:909-913.



57. Koçan E G. kronik tonsillit ve efüzyonlu otitis media hastalıklarında oksidan ve antioksidan maddelerin rolü. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı , Ankara,2001.
58. Tasker A, Dettmar P W, Panetti M, Koufman J A, Birchall J, Pear J P. Is gastric reflux a cause of otitis media with effusion in children. *Laryngoscope*. 2202;112:1930-1934.
59. Ceylan S M. Efüzyonlu otitis media'da helicobakter pilori'nin rolü.Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Ankara 2004.
- 60.Karma P H, Penttila M A, Sipila M M. Otosopic diagnosis of middle ear effusion in acute and non-acute otitis media. The value of different otoscopic findings. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1989;17:37-49.
- 61.Shekelle P, Takata G, Chan L S. Diagnosis, natural history and late effects of otitis media with effusion. Evidence report/technology assessment no 55. Rockville, MD. Agency for Healthcare Research and Quality 2003 AHRQ Publication No 03-E023.
62. Toner J G, Mains B. Pneumatic otoscopy and tympanometry in the detection of middle ear effusion. *Clin Otolaryngol*. 1998;15:121-123.
- 63.Jerger J. Clinical experience with impedance audiometry. *Arch Otolaryngol*. 1970;92:311-315.
- 64.Üzeyir Gök,Yasemin Bulut,Erol Keleş Bacteriological and PCR analysis of clinical material aspirated from otitis media with effusions. *Int J Pediatr.Otorhinolaryngol* 60(2001) 49-54.
- 65.Saffer M, Lubianca Neto JF, Piltcher OB, Petrillo VF. Chronic secretory otitis media: negative bacteriology.*Acta Otolaryngol*. 1996; 116: 836-9.
66. Cantekin EI. Bacterial DNA fragments in otitis media with effusion. *JAMA* 1996; 275:186.

67. Post, J.C., J. J. Aul, G.J. White, et al. 1996. PCR-based detection of bacterial DNA after antimicrobial treatment is indicative of persistent, viable bacteria in the chinchilla model of otitis media. *Am. J. Otolaryngol.* 17:106-111.
68. Murphy, T.F., L.C. Bartos, A. A. Campagnari, M.B. Nelson and M.A. Apicella. 1986. Antigenic characterization of the p6 protein of nontypable HI. *Infect. Immun.* 54:774-779.
69. Murphy, T. F., M. B. Nelson, and M.A. Apicella. 1992. The p6 outer membrane protein of nontypable HI as a vaccine antigen. *J. Infect. Dis.* 165(Suppl.1):203-205.
70. Salo, P., Örtqvist, A. & Leinonen, M. 1995. Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum. *Journal of Infectious Diseases* 171, 479-82.
71. Paton, J. C., Lock, R.A. & Hansman, D.J. 1983. Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with streptococcus pneumonia. *Infection and immunity* 40,548-52.
72. Edwards, M.C., and R. A. Gibbs. 1994. Multiplex PCR: advantages, development and applications. *PCR Methods Appl.* 3:S65-S75.
73. Annika Saukkoriipi, Arto Palmu, Terhi Kipli, Maija Leinonen. Real-time quantitative PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear fluid of children with acute otitis media. *Molecular and Cellular Probes* (2002) 16,385-390.
74. Lim, D. J., T. F. DeMaria, and L.O. Bakaletz. 1988. Current concepts of pathogenesis of otitis media: a review. *Acta Oto-laryngol.* 458:174- 180.
75. Tomoya Ueyama, Yuichi Kurono, Komei Shirabe, Masazumi Takeshita, Goro Mogi. High Incidence of *Haemophilus influenzae* in Nasopharyngeal secretions and Middle Ear Effusions as Detected by PCR. *J of Clin Microbiol* July 1995, p.1835-1838.

76. Faden H, Waz MJ, Bernstein JM, et al: Nasopharyngeal flora in the first three years of life in normal and otitis-prone children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 100:612-615, 1991.



