

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI**

**OTİTİS MEDIA'LI HASTALARDA ETKEN
MİKROORGANİZMALAR VE DİRENÇ PATERNLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hayat ASLAN MULLAOĞLU

Danışman

Doç. Dr. Nizami DURAN

HATAY-2013

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI**

**OTİTİS MEDIA'LI HASTALARDA ETKEN
MİKROORGANİZMALAR VE DİRENÇ PATERNLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hayat ASLAN MULLAOĞLU

Danışman

Doç. Dr. Nizami DURAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 1101Y0118(139) nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2013

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

OTİTİS MEDIA'LI HASTALARDA ETKEN MİKROORGANİZMALAR
VE DİRENÇ PATERNLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hayat ASLAN MULLAOĞLU

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 30/09/ 2013 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Doç Dr Nizami DURAN
Üye :Doç Dr Burçin ÖZER
Üye :Doç Dr Cemil TÜMER

Bu tez, Enstitümüz Mikrobiyoloji (Tıp) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Yaşar ERGÜN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi, tezin yazılması aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini her zaman biz öğrencileriyle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Nizami DURAN'a,

Yüksek lisans eğitimimde emeği geçen Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Burçin ÖZER, Yrd. Doç. Dr. Melek İNCİ, Yrd. Doç. Dr. Erkan YULA ve Mikrobiyoloji bölümü asistanlarına,

Tez çalışmamda örneklerin toplanmasındaki katkılarından dolayı Kulak Burun Boğaz Ana Bilim Dalı öğretim üyesi. Doç. Dr. Şemsettin OKUYUCU ve bölüm asistanlarına,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum başta bakteriyoloji laboratuvarı olmak üzere tüm laboratuvar çalışanı arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimim süresince beraber eğitim aldığım arkadaşlarım Suphi BAYRAKTAR ve Merve OCAK'a,

Benden hiçbir zaman yardımını, samimiyetini, güler yüzünü ve en önemlisi de dostluğunu esirgemeyen, tezimin her aşamasında bana her anlamda yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Naciye ERYILMAZ, Cansu ÖNLEN, Esra KARAYİĞİT, Başak YAVUZ ve Burcu GÜLKAN'a,

Hayatımın her döneminde benden desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen, iyi kötü her anımda yanımda olan kendileriyle gurur ve onur duyduğum sevgili annem Leyla ASLAN, babam İbrahim ASLAN ve kardeşim Eren ASLAN'a,

Gösterdiği sabır ve emekle her zaman yanımda olan sevgili eşim Eren MULLAOĞLU'na,

Çok teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ	01
2. GENEL BİLGİLER	05
2.1. Tanım	05
2.2. Akut Otitis Media	06
2.3. Efüzyonlu Otitis Media	08
2.4. İnatçı orta kulak efüzyonu	09
2.5. Kronik perforasyon	10
2.6. KSOM(Kronik süpüratif Otitis Media)	11
2.6.1. Ksom'un komplikasyonları	12
2.6.2. Sistemik durumlarda KSOM	13
2.6.3. İşitme ve KSOM ilişkisi	13
2.7. Kolesteatoma ve KSOM ilişkisi	13
2.8. Patogenez	14
2.9. Mikrobiyoloji	15
2.10. İmmünoloji ve Genetik	16
2.11. Epidemiyoloji	17
2.12. Risk faktörleri	18
2.12.1. Yüksek riskli popülasyonlar	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Araç ve Gereçler	21
3.1.1. Araçlar	21
3.1.2. Kimyasal Maddeler	22
3.2. Örneklerin Toplanması ve Kültivasyon	23
3.3. Kullanılan Besiyerleri, Solüsyonlar ve Biyokimyasal Testler	24
3.3.1. Kanlı Agar	24
3.3.2. EMB Agar	24
3.3.3. MüllerHintonAgar	25
3.3.4. Sabouraud Dekstroz Agar	25

3.3.5. Gram Boyama	25
3.3.6. Oksidaz Testi	26
3.3.7. Katalaz Testi	26
3.3.8. Koagülaz Testi	26
3.3.9 Germ tüp deneyi	26
3.3.10. Triptik Soy Buyyon (Saklama Besiyeri)	27
3.3.11 Fosfat Buffer Tamponu (PBS)	27
3.4. Genomik DNA ekstraksiyonu	27
3.5. PCR Amplifikasyonu	30
3.6. 50X TAE Elektroforez Tamponu: 1 litre	39
3.7. Yükleme (Loading) Tamponu (6X)	39
3.8. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Tekniđi ile Görüntülenmesi	39
4. BULGULAR	42
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ	60
7. KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	64

Şekiller Dizini

	Sayfa No
Şekil 2.1. Kulağın Anatomisi	06
Şekil 2.2. Akut Otitis Medianın Klinik Seyri.....	08
Şekil 2.3. Kolesteatoma oluşumu.....	14
Şekil 3.1. Kanlı agarda <i>S.aureus</i> izolatlarının görünümü	24
Şekil 3.2. Müller Hinton agarda <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının görünümü.....	25
Şekil 3.3. PCR cihazı (Thermalcycler, TechneFlexigene, İngiltere)	38
Şekil 3.4. Elektroforez ünitesi (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD)	40
Şekil 3.5 Görüntüleme cihazı (Wealtec, Dolphin-View, ABD, UV Transillumunator)	41
Şekil 4.1. Otitis media tanılı hastaların yaşlara göre dağılımı.....	42
Şekil 4.2. İzole edilen etken mikroorganizmaların dağılımı	43
Şekil 4.3. <i>P.aeruginosa</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıkları	45
Şekil 4.4. Stafilokok suşlarının antibiyotik direnç profilleri.	46
Şekil 4.5. Stafilokok izolatlarında <i>sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei ve sej</i> genlerinin dağılımı	47
Şekil 4.6. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında <i>tetK, tetM, ampC</i> genlerinin dağılımı	48
Şekil 4.7. <i>AmpC</i> geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	49
Şekil 4.8. <i>pvl</i> geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	49
Şekil 4.9. <i>seg</i> geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	50
Şekil 4.10. <i>sei</i> geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	50
Şekil 4.11. <i>tetK ve tetM</i> genlerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	51
Şekil 4.12. <i>tetM</i> geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	51

Çizelgeler Dizini

Sayfa No

Çizelge 3.1. Stafilocoklar için, multiplex PCR’da kullanılan primer dizileri	30
Çizelge 3.2. <i>P.aeruginosa</i> için, multiplex PCR’da kullanılan primer dizileri	31
Çizelge 3.3. <i>sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej</i> gen bölgeleri için PCR karışımları	32
Çizelge 3.4. <i>etaA, mecA</i> ve <i>TST</i> gen bölgeleri için PCR karışımları	32
Çizelge 3.5. <i>pvl</i> ve <i>femB</i> gen bölgeleri için PCR karışımları	33
Çizelge 3.6. <i>sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej</i> gen bölgeleri için ısı döngüleri	34
Çizelge 3.7. <i>etaA, mecA</i> ve <i>TST</i> gen bölgeleri için ısı döngüleri	34
Çizelge 3.8. <i>pvl</i> ve <i>femB</i> gen bölgeleri için ısı döngüleri	35
Çizelge 3.9. <i>ermA</i> ve <i>ermC</i> gen bölgeleri için ısı döngüleri	35
Çizelge 3.10. <i>ampC</i> gen bölgesi için PCR karışımı	36
Çizelge 3.11. <i>tetK</i> ve <i>tetM</i> gen bölgeleri için PCR karışımları	36
Çizelge 3.12. <i>ampC</i> gen bölgesi için ısı döngüsü	37
Çizelge 3.13. <i>tetK</i> ve <i>tetM</i> gen bölgeleri için ısı döngüleri	38
Çizelge 4.1. <i>P. aeruginosa</i> kökenlerinde MİK değerleri ve direnç oranları	44
Çizelge 4.2. Stafilocok kökenlerinde MİK değerleri ve direnç oranları	46
Çizelge 4.3. <i>S.aureus</i> kökenlerinde eritromisin direnci ile <i>erm A, erm B</i> ve <i>erm C</i> direnç genleri arasında ilişki.	47

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

AOM	: Akut Otitis Media
Bp	: Baz çifti
CLSI	: Klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü
CO ₂	: Karbondioksit
EOM	: Efüzyonlu Otitis Media
F	: Forward
Ig	: İmmüoglobulin
KBB	: Kulak Burun Boğaz
MEE	: Middle ear effusion
MIC	: Minimal inhibisyon konsantrasyonu
ml	: Mililitre
µl	: mikrolitre
<i>P. aeruginosa</i>	: Pseudomonas aeruginosa
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
R	: Reverse
<i>S. aureu</i>	: Staphylococcus aureus
TTO	: Timpanostomi tüp otoresi

ÖZET

Otitis Media'lı Hastalarda Etken Mikroorganizmalar ve Direnç Paternleri

Kronik otitis media (KSOM) timpanik membranın bozulduğu, akıntıyla seyreden mastoid mukozaya ve orta kulağın kronik inflamasyonudur. KSOM, önemli bir morbidite sebebi olup gelişmekte ve gelişmiş ülkelerde farklı ırk ve kültürel grupları etkileyen en yaygın kronik infeksiyöz hastalıklardan biridir. Bu çalışmaya yaşları 5-83 arasında değişen kronik otitis media tanılı 122 hasta dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 122 hastadan alınan örneklerden %24.6 (30/122)'sında *Stafilokok* cinsi (21(%70) *S.aureus*, 9 (%30) KNS) tespit edilirken, %24.6 (30/122)'sında da *P.aeruginosa* izole edilmiştir. Toplam 30 stafilokok 30 (%100)'unda da *mecA* geni açısından pozitif olduğu tespit edilirken, kökenlerin 6 (%20)'sında *sea*, 4 (%13.33)'ünde *seb*, 2 (%6.67)'sinde *see*, 17 (%56.67)'sinde *seg*, 20 (66.67)'sinde *seh*, 19 (%63.33)'unda *sei* genlerinin varlığı tespit edildi. Ayrıca, 21 *S.aureus* izolatının 17 (%81.0)'sinin *pvl* (panton valentine leukocidin) geni açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada *S.aureus* kökenleri arasında *etaA*, *fem A*, *femB* ve *tsst* genleri negatif bulunurken, hem *S.aureus* hem de KNS kökenleri arasında *sec*, *sed* ve *sej* genlerine rastlanmamıştır. *P.aeruginosa* kökenleri arasında ise *tetK* geni varlığı %96.7 oranında tespit edilirken, *tetM* geni varlığı ise kökenlerin %76.7'sinde tespit edilmiştir. 30 *P. aeruginosa* izolatının %70'inde ise *ampC* geni pozitif olarak bulunmuştur. Srafilokoklarda penisiline karşı %93.3 (28/30), eritromisin ve gentamisine karşı %60.0 (18/30), rifampine karşı %53.3 (16/30), siprofloksasine karşı 46.7 (14/30), oksasilin ve klindamisine karşı %43.3 (13/30) oranında direnç saptanırken, suşların tamamının vankomisine karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir. Çalışmada tüm suşların PZR yöntemi ile *mecA* geni taşıdığı tespit edilmesine rağmen, fenotipik olarak 13 (%46.7) izolatın oksasiline dirençli olduğu tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* suşlarında ise en yüksek direnç (%90) tetrasikline karşı, en düşük direnç ise imipeneme karşı bulunmuştur. İlaç direnç tespitinde spesifite ve sensitivite açısından duyarlı yöntemler tercih edilmelidir. Hızlı ve doğruluğu yüksek testlerle direnç oranları araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: KSOM, stafilokok, pseudomonas, direnç, gen.

ABSTRACT

Pathogen Microorganisms And Resistance Patterns In Patients With Otitis Media

Chronic Otitis Media is an catarrhal infection of mastoid mucosa and middle ear which affects tympanic membrane. Chronic Otitis Media is a significant morbidity factor and the most common chronic infection which occurs in different ethnic and cultural groups in developing and developed countries. A total of 122 patients were included to the study who diagnosed as chronic otitis media and aged between 5-83. The samples were taken from these 122 patients and while a ratio 24.6% (30/122) of these isolates were Staphylococci [21/30 (70%) were *Staphylococcus aureus*, other 9 were coagulase negative Staphylococci], 24.6% of them were identified as *Pseudomonas aeruginosa*. While *mecA* gene positivity was found in a total 30 staphylococcal isolates, presence of genes *sea* in 6 strains (20%), *seb* in 4 (13.3%), *see* in 2 (6.7%), *seg* in 17 (56.7%), *seh* in 20 (66.7%), *sei* in 19 (63.3%) were determined. Also, 17 of 21 (81.0%) *S.aureus* isolates are determined positive according to *pvl* (panton valentine leukocidin) gene. In this study, while *etaA*, *fem A*, *femB* and *tsst* genes were found as negative in *S.aureus* strains. *Sec*, *sed* and *sej* genes were not found in both *S.aureus* and CoNS (coagulase negative staphylococci) strains. While in *P.aeruginosa* strains, presence of *tetK* gene was determined as 96.7%, *tetM* gene presence was found as 76.7% among the *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *AmpC* gene ratio was found as 70% in a total of 30 *P. aeruginosa* isolates. While resistance detected in staphylococci was 93.3% (28/30) against to penisillin, 60.0% (18/30) against to erythromycin and gentamycin, 53.3% (16/30) against to rifampin, 46.7% (14/30) against to ciprofloxacin, 43.3% (13/30) against to oxacillin and clindamycin. It was determined that all strains were sensitive to vancomycin. Although, all strains were found to carry the *mecA* gene by PCR method in this study, 13 isolates (46.7%) were resistant to oxacillin phenotypically. In *P. aeruginosa* strains the highest resistance (90%) against to tetracyclin, the lowest resistance against to imipenem were found. Sensitive methods in terms of specificity and sensitivity should be preferred for detection of drug resistance. Drug resistance should be investigated using faster and higher accuracy tests.

Key words: KSOM, staphylococci, pseudomonas, resistance, gene.

1-GİRİŞ

Kronik otitis media (KSOM) timpanik membranın bozulduğu, akıntıyla seyreden mastoid mukoza ve orta kulağın kronik inflamasyonudur. Önemli bir morbidite sebebi olup ekstra ve intra kraniyel komplikasyonlara yol açan hem gelişmekte olan ve hem de gelişmiş ülkelerde farklı ırk ve kültürel grupları etkileyen çocukluk çağındaki en yaygın kronik infeksiyöz hastalıklarından biridir (Fliss ve ark 1990, Bluestone 2004). KSOM'da semptomların çeşidi ve süresi farklılıklar göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü KSOM'u en az 2 hafta süren perfore timpanik membran içinden akıntı şeklinde tanımlarken, bazı kaynaklarda ise 6 haftadan uzun süren kronik infeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır (Roland 2002, Morris 1998, WHO 1986). Akut otitis media (AOM)'nin yetersiz ya da başarısız tedavisi sonucu KSOM'un gelişebildiği de bildirilmektedir. Otitis media için tanı kriterleri orta kulak efüzyonu ve orta kulak inflamasyonu semptomları ve belirtilerini içermektedir. *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi mikroorganizmalar kronik otitis media'lı hastaların orta kulak akıntısından izole edilen en yaygın mikroorganizmalardır. Ateş, kulak ağrısı baş ağrısı, duyarlılık, öksürük, rinit, halsizlik, anoreksia, kusma, diyare ve kulağın çınlaması yaygın fakat non-spesifik semptomlar arasında yer almaktadır. Pnömatik otoskopi ile orta kulak efüzyonunun ortaya çıkarılması tanı tespitinde oldukça önemlidir.

Orta kulağın viral ya da bakteriyel infeksiyonları olan otitis media Birleşik Devletlerde antibiyotik verilen çocuklar için en yaygın infeksiyonlar arasında yer almaktadır (Bluestone 2004). Otitis media çalışanlar için iş gücü kaybına yol açarken çocuklar için de okul devamsızlığı gibi sonuçlara yol açan ciddi infeksiyonlardan olup, tedavisi yüksek maliyet gerektiren hastalıklar arasında yer almaktadır (Madana ve ark 2011). Amerika'da hastalığın maliyetine yönelik yapılan bir çalışmada yıllık maliyetin 3 milyon dolar dolaylarında olduğu hesaplanmıştır. Otitis medianın, özellikle akut otitis medianın 6-24 aylık çocuklar arasında oldukça yaygın olduğu ve 3 yaşındaki çocukların %80'inden fazlasının hastalığa yakalandığı bildirilmektedir (Ramakrishnan ve ark 2007).

Efüzyonlu otitis media, akut orta kulak efüzyonuyla seyreden bir hastalıktır. Amerika'da yıllık yaklaşık 2.2 milyon efüzyonlu otitis media vakası bildirilmektedir (Ramakrishnan ve ark 2007). Kronik süperatif otitis media (KSOM) kalıcı ve nükseden bir infeksiyon olup timpanik membran perforasyonu ile sonuçlanabilmektedir.

KSOM, kulak zarı delinmiş ve gri-beyaz homojen, tortulu ve yoğun sekresyonu olan orta kulak ve mastoid mukozanın kronik inflamasyonudur. KSOM, en sık hayatın ilk 5 yılında meydana gelmekte ve gelişen ülkelerde, kroniyofasyal anormalili çocuklar gibi bazı özel popülasyonlarda ve bazı ırklarda yaygın olarak görülmektedir. KSOM'da en sık izole edilen aerob ve fakültatif anaerob mikroorganizmalar arasında *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* başta olmak üzere, proteus, klebsiella türleri ve *Escharichia coli* gibi Gram negatif mikroorganizmalar yer almaktadır. Bunun yanında *Haemophilus influenza* ve *Moraxella cattarhalis* ve anaerob mikroorganizmalardan bakteroides ve fusobacterium gibi türler de etkenler arasında yer alan diğer mikroorganizmalardır.

KSOM kuzey kutbu ile ekvator arasında değişen ekstrem iklimlerde de yaşayan, farklı ırk ve kültür gruplarını etkileyen ve dünya çapındaki birçok popülasyonda görülen major bir sağlık problemidir. Yapılan çalışmalarda değişik popülasyonlarda KSOM'un %7-46 arasında değişen oranlarda görüldüğü bildirilmiştir (Kaplan ve ark 1973, Baxter et al. 1992).

Ülkemizde KSOM'lu hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda en yüksek oranda izole edilen mikroorganizmaların başında *P.aeruginosa* ve stafilokokların geldiği, bu kökenlerde direnç profillerinin ise hastane direnç oranlarıyla benzer ya da daha yüksek düzeyde seyrettiği bildirilmektedir (Görür ve ark 2000, Aktaş ve ark 1999). KSOM'lu vakalarda etken olarak izole edilen *S.aureus* kökenlerinin özellikle penisilin grubu antibiyotiklere ve aminoglikozitlere, *P.aeruginosa* suşlarında ise aminoglikozid grubu antibiyotikler ile safalosporinlere oldukça yüksek oranda (%8.5- 90) direnç geliştiği bildirilmiştir (Görür ve ark 2000). Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada da KSOM'lu hastalardan izole edilen patojenlerin başında *P.aeruginosa* geldiği, hatta *P.aeruginosa*'nın KSOM'da tüm etken patojenlerin yarıya yakınından sorumlu olduğu bildirilirken, aynı çalışmada *P.aeruginosa*'nın penisilin ve 1. ve 2. kuşak sefalosporinlere %90 dolaylarında ilaç direncinin saptandığı bildirilmiştir (Aktaş ve ark 1999).

KSOM'lu hastalar arasında 2008 yılında oldukça geniş bir popülasyon üzerinde yapılan bir çalışmada vakaların %54'ünden etken patojen olarak stafilokokların sorumlu olduğu bildirilmiştir. Stafilokok izolatlarının da yaklaşık %46'nın metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) olduğu bildirilmiştir. *P. aeruginosa* vakalarında olduğu gibi KSOM vakalarında etken stafilokoklar için oldukça yüksek direnç oranları bildirilmektedir (Park et al. 2008).

Antibiyotik dirençli KSOM vakalarının oldukça önemli morbidite ve mortalite sebebi olduğu ve önemli ekonomik maliyetler oluşturduğu bildirilmektedir (Park et al., 2008). Son yıllarda ülkemizde ve dünyada diğer tüm nozokomiyal infeksiyonlarda olduğu gibi KSOM'da da yoğun ve uygun olmayan antibiyotik kullanımına bağlı olarak direnç gelişiminin oldukça yüksek boyutlara ulaştığı bildirilmiştir. Antibiyotik dirençli kökenlerin tanımlanmasında doğru ve hızlı yöntemlerin kullanılması oldukça önemlidir. Ülkemizde ve dünyada direnç profillerinin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemler fenotipik yöntemler olup bu yöntemlerin spesifite ve sensitiviteledeki eksiklikler sebebiyle özellikle son yıllarda direnç genlerinin varlığını göstermeye dayalı moleküler bazlı yöntemlerin kullanılması tercih edilmektedir (Park et al., 2008; Görür ve ark 2000; Aktaş ve ark 1999).

Biz bu çalışmada Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kulak Burun Boğaz polikliniklerine başvuran ve KSOM tanısı almış hastaların kulak kültürlerinde;

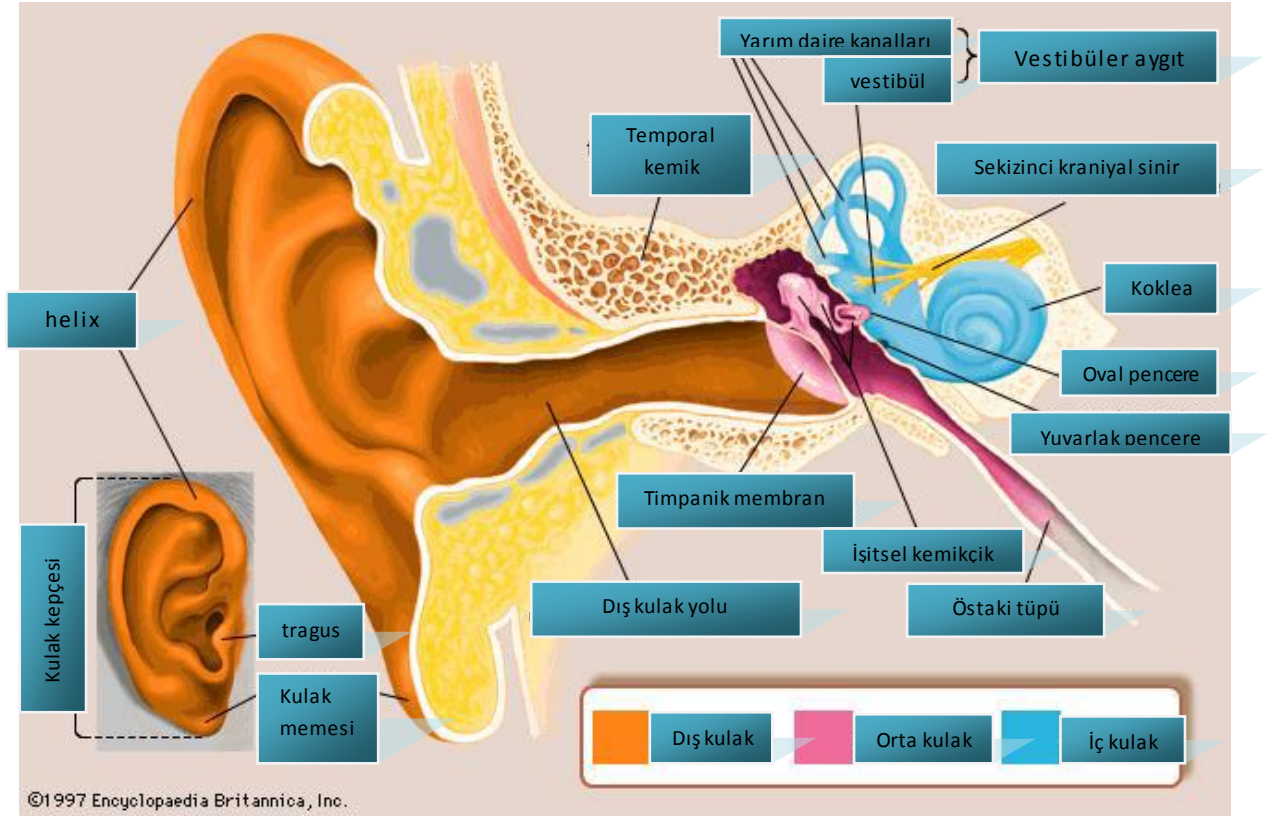
- İzole edilen etken mikroorganizmaların tanımlanmasını,
- P.aeruginosa* ve stafilokok suşlarında direnç profillerinin belirlenmesini,
- P.aeruginosa* kökenlerinde *tetK*, *tetM*, ve *ampC* direnç genlerinin varlığının mültipleks PCR yöntemiyle belirlenmesini,
- *S.aureus* kökenlerinde *tsst*, *pvl* (Panton Valentin Lökositidin), *etaA*, *femA* ve *B genlerinin varlığını*,
- Hem koagülaz negatif (KNS) hemde koagülaz pozitif stafilokok kökenlerinde metisilin direnç geni ile enterotoksin genlerinin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *se* ve *sej*) varlığını mültipleks PCR yöntemiyle belirlemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Tanım

Otitis media, östaki tüpü, orta kulak, mastoid ve non-intakt timpanik membran (timpanostomi tüp perforasyonu gibi) gibi orta kulak yarığının kronik bir infeksiyonu olan kulak hastalığı olup, akıntıyla seyretmektedir. Kulak infeksiyonunun kronik bir hal alan bu safhası kronik otitis media olarak adlandırılmaktadır. Fakat bu terim, perforasyonun olmadığı durumlarda kronik efüzyonlu otitis media (EOM) ile karıştırılabilmektedir. Bir başka karıştırılma potansiyeli olan konu orta kulak infeksiyonunun olmadığı kronik perforasyonun görüldüğü durumlardır. Bu durum KSOM olarak tanımlanmakta ve sadece kronik perforasyon olarak adlandırılmaktadır. Perforasyon timpanostomi tüpünün çıkarılmasını takiben veya bir travma sonucunda oluşan otitis medianin bir komplikasyonu ya da sekeli olarak oluşabilmektedir. İlk episodda kronik drenaj olmayıp hastada hiçbir zaman otore görülmemektedir (Bluestone ve Klein 1996). Bu kesin tanıma rağmen; KSOM'un epidemiyolojisini tanımlayan birçok kaynakta, hastalıkta otoreli veya otoresiz kronik perforasyonun dahil olduğu bildirilmektedir. Bunun yanında bazı klinisyenler, infeksiyon ilişkili perforasyonu aktif, infeksiyonsuz perforasyonu ise inaktif olarak tanımlamaktadır (Browning ve Gatehouse 1992). Kronik mastoid klinisyenler tarafından kullanılan bir başka terim olup, bu terim aynı zamanda KSOM ile eş anlamlı olarak da kullanılmaktadır. İşitsel kolesteatoma KSOM hastalığı adı altına da dahil edilebilmekte ancak kolesteatoma kronik infeksiyonla ilişkili olabilmekte ya da olmayabilmektedir.

KSOM en yaygın timpanostomi tüp komplikasyonlarından olan timpanostomi tüp otoresinden (TTO) ayırt edilmelidir. Fakat AOM ve KSOM'la ilgili olarak, TTO'dan KSOM'a geçiş iyi tanımlanmamıştır. Aynı zamanda, KSOM, aktif infeksiyon veya perforasyonun olmadığı kronik EOM'den ayırt edilmelidir. Ayrıca KSOM orta kulak infeksiyonunun görülmediği timpanik membranın kronik perforasyonundan da ayırt edilmelidir (Bluestone 1998). Eğer kolesteatoma mevcutsa kolesteatomaalı KSOM terimi kullanılmalıdır.

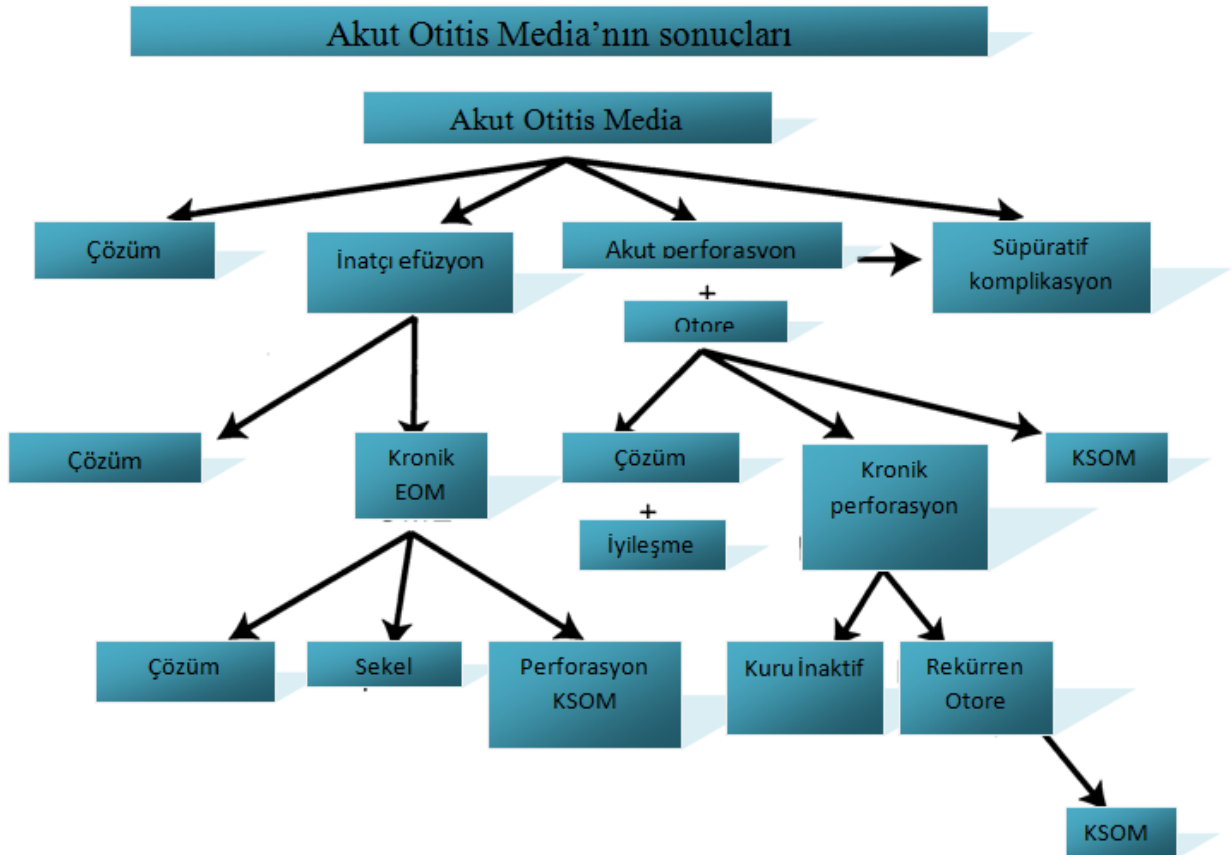


Şekil. 2.1.Kulağın Anatomisi (Encyclopaedia Britannica 1997).

2.2.Akut Otitis Media

Akut otitis media'nın patogenezi, çoğu zaman aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir. Hastada nazofarinks ve östaki tüpünü içeren üst solunum yolundaki solunum mukozasının tıkanması ve daralmasıyla sonuçlanan genellikle bir üst solunum yolu viral enfeksiyonu öyküsü vardır. Negatif orta kulak basıncı gelişmesi ve uzun sürmesiyle nazofarinksten orta kulağa doğru potansiyel patojenlerin (virus ve bakteriler) aspirasyonu gerçekleşmektedir. Östaki tüpünün tıkanması, orta kulak efüzyonunda enfeksiyon, orta kulak sekresyonunda patojenin çoğalması, süperatif ve semptomatik OM ile sonuçlanmaktadır. Buchman ve arkadaşlarının(1995) yaptığı bir çalışmada burunlarına influenza A virusu inoküle edilen 27 gönüllüde bu olaylar dizisi izlenmiş, inokülasyondan sonra hastalarda nazal enfeksiyon geliştiği tespit edilmiştir. Çalışmada gönüllülerin 16'sında sonradan yüksek negatif orta

kulak efüzyonu geliştiği ve AOM gelişen bir gönüllüde orta kulak aspirasyonunda influenza A virusu ve *Streptococcus pneumonia* varlığı tespit edilmiştir. Sık sık AOM ve EOM görülen çocuklarda östaki tüpünün anatomik ve fizyolojik bozukluğunun önemli olduğu bildirilmiştir (Buchman et al 1995). Östaki tüp anomalisi çocuklarda rekürren infeksiyonların en önemli sebepleri arasında yer almaktadır. Rekürren AOM'nin patogenezi üzerine otite yatkın 50 çocukta yapılan bir çalışmada, östaki tüp fonksiyonunu test edilmiş, otitis eğilimli çocukların, AOM hikayesi olmayan çocuklardan tüp fonksiyonunun önemli derecede daha zayıf olduğu tespit edilmiştir (Stenstrom et al 1991). Bu bulgular, rekürren AOM'nin patogenezinin, mekanik olanın aksine östaki tüpünün fonksiyonel olarak tıkanmasının bir sonucu olduğunu göstermektedir. Ancak, kısa ve yumuşak östaki tüpüne sahip bebek ve küçük çocukların viral üst solunum yolu infeksiyonu süresince nazofaringeal sekresyonlarının orta kulağın içine reflüsü (burun kapatılıp yutma hareketini takiben burundan üfleme ve ağlama) olabilmektedir. Bir başka olası mekanizma ise nazofarinkten östaki tüpünün mukozası içine doğru artan akım sonucu infeksiyon riskidir.



Şekil.2.2. Akut Otitis Medianın Klinik Seyri (Bluestone 1998)

2.3.Efüzyonlu Otitis Media

Efüzyonlu otitis media kısmen asemptomatik olmasına rağmen, akut başlangıçlı EOM, yukarıda AOM için anlatıldığı gibi benzer olay dizinine sahiptir (Bluestone et al 1992, Post et al 1995). Bakteri izolasyonu EOM'li hastaların orta kulak akıntısından izole edilebilmektedir. Bununla birlikte orta kulaktaki uzun süreli negatif basınç EOM'yi temizleyebilmektedir. Efüzyonlu otitis media orta kulak basıncı altında östaki tüpünün açılması ve efüzyonla sonuçlanan bir rahatsızlıktır. (Casselbrant et al 1988, Alper ve ark 1997). Bu çalışmalar, östaki tüpünün açılmadığı zamanlarda orta kulak efüzyonu patogenezinin "hydrops ex vacuo" teorisini ortaya koymaktadır. Bu teoriye göre, östaki tüpü disfonksiyonuyla oluşan efüzyon sızıntı ile orta kulakta transüda oluşturmakta ve bu da negatif basınç oluşturmaktadır. Swarts ve arkadaşları (1995) ayrıca negatif orta kulak basıncını tetikleyen, orta kulağın CO₂ ile yıkanmasından kısa süre sonra maymunlarda MEE (middle ear effusion) oluşturabilmişlerdir. Efüzyonlu orta kulakta tüp açılması söz konusu olduğunda nazofaringeal sekresyonların aspirasyonları oluşabilmekte ve böylece EOM ve rekürren akut bakteriyel OM'nin birlikte olduğu kritik durum meydana gelebilmektedir. Yetişkin gönüllü hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada rhinovirus ile nazal inokülasyonu takiben östaki tüpünün tıkanması ve negatif orta kulak basıncı ile sonuçlanırken iki hastada OM gelişimi görüldüğü bildirilmiştir. EOM'li iki bireyde inokülasyon öncesinde, negatif orta kulak basıncı görülmüştür. Eğer hastada östaki tüp disfonksiyonu mevcutsa inokülasyondan önce normal orta kulak basıncına sahip hastalarda viral infeksiyonu takiben EOM ile sonuçlanacak olan efüzyon gelişmemektedir (Buchman ve ark 1994).

Bir çalışmada 33 sağlıklı yetişkin hastaya influenza A virusu intranasal olarak inoküle edilmiş, hastalarda östaki tüp tıkanması, negatif orta kulak basıncı meydana gelirken 21 hastanın 5'inde de orta kulak efüzyonu geliştiği bildirilmiştir (Doyle et al 1994). İnfluenza A virusunun rhinoviruslardan daha virulan olması nedeniyle üst solunum yolu infeksiyonu periyodları sonrasında orta kulağın atelektazisi (yüksek negatif orta kulak basıncı), EOM ve akut bakteriyel OM ile sonuçlanabilmektedir.

2.4.İnatçı orta kulak efüzyonu

Orta kulaktaki akut viral/bakteriyel infeksiyonun ilk aşamasından sonra inatçı orta kulak efüzyonunu veya ardından orta kulakta negatif yüksek basınç varken efüzyonun transüdayonu birbirine benzemektedir. İnflamasyonu takiben orta kulaktaki muköz membranın inflamasyon hücrelerinden interlökin 1, 2, 6 ve 8, tümör nekrozis faktör ve interferon gama gibi sitokinlerin sitimülasyonu gerçekleşmektedir. Aynı zamanda sitokin ve inflamatuvar medyatörleri üreten, mukozanın içine lenfositleri tutan primer olarak selektinler ve integrinler submukoza reseptörlerin upregülasyonu ve muköz membrandan sıvı madde kaçışını tetikleyen platelet aktive edici faktör, prostasiklin, tromboksan, prostoglandin, lökotrien gibi inflamatuvar mediatörlerin stimülasyonu gerçekleşmektedir (Bernstein et al 1976, Tachibana et al 1996).

Bu aşamada, kan damarlarının ve anjiyogenezin (kılcal damar oluşumu) konjesyonundan (venöz kanın dokudan uzaklaşmasında yetersizlik) dolayı muköz membran içinde kan akışı artışı muhtemeldir. Bu da daha sonrasında mukozanın mikrosirkülasyonunun içine doğru N_2 perfüzyonundaki artıştan dolayı orta kulak içinde daha çok negatif basınç oluşmaktadır (Doyle ve Seroky 1994). Buna ek olarak, dar bir çıkışı olan kapalı bir yüzey gibi (östaki tüpü) sistemin anatomisinden dolayı üretilen efüzyon orta kulakta birikmektedir. Bunun yanında mukosilier sistem ve tüpün açılıp kapanma sistemi de büyük olasılıkla bozulacak ve persisten orta kulak efüzyonu meydana gelecektir.

2.5.Kronik perforasyon

Timpanik membranın kronik perforasyonu akut perforasyonun oluşmasından sonra gelişmektedir. Akut (travmadan dolayı değil) gelişen timpanik membran perforasyonları genellikle AOM'a bağlı olmakla birlikte kronik EOM'nin gelişmesiyle de oluşabilmektedir (Boswell ve Nienhuys 1996). Bir spontan perforasyon genellikle bir antimikrobiyal ajanla tedavi edilmeyen akut orta kulak infeksiyonunda görülmektedir. Yeterli tedavi uygulanırsa dahi bir komplikasyondan ziyade hastalığın doğal sürecinin bir bölümü gerçekleşmektedir. Çünkü böyle bir perforasyon, pürülan materyalin dış kanalın içine

boşalmasını sağlayacak ve irin drenajını östaki tüpüne doğru arttıracaktır. Orta kulağa yeterli drenajı olan kulak zarı perforasyonu temporal kemik içinde veya daha önemli olan intrakraniyal kavite içine doğru infeksiyonun daha çok yayılmasını önleyebilmektedir. Genellikle akut perforasyon tedavisi başarısız olduğunda timpanik membranın kronik perforasyonu oluşmaktadır. KSOM varlığında, uygun tedaviyi takiben perforasyon kendiliğinden kapanabilmektedir. Muhtemelen kronik perforasyonun iyileşmesi perforasyon alanında yassı epitel oluşumunun engellenmesi ile gerçekleşmektedir.

2.6. KSOM (Kronik süperatif otitis media)

KSOM 2 haftadan 3 aya kadar ya da daha uzun süreli timpanik membrandan akut bir drenajın bulunması olarak tanımlanabilir. Fakat, bilim adamları arasında otore sürecinin kronik olarak kabul edilmesinde bir fikir birliği bulunmamaktadır. Akut otore KSOM'dan önce oluşmaktadır. Akut otore daha çok AOM'den kaynaklanmaktadır ancak kronik EOM varlığında Avustralyan aborjinleri gibi belirli yüksek riskli gruplarda da ayrıca oluşabildiği bildirilmiştir (Boswell ve Nienhuys 1996). Yukarıda bahsedilen kronik evrede bu faktörler daha çok akut otorenin süreciyle ilişkilidir. Ancak süreç eğer daha çok ilerlemişse orta kulak yarığında kemik iltihabı ile sonuçlanabilmektedir (Bluestone ve Kenna 1988). İnfeksiyon belirtisi olmayan kronik perforasyon görüldüğü zaman, reinfeksiyon muhtemelen 2 yoldan biriyle oluşmaktadır. Ya nazofarinkteki bakterilerin refluksa bağlı olarak orta kulağa erişmesi ile ya da orta kulakta "gaz yastığı" kaybolmasıyla östaki tüpü içinden nazofaringeal salgıların boşalımı (sümkürme sırasında bebeklerin ağlaması veya nazal tıkanma mevcutken ve burun kapalıyken yutkunma sırasında) ile gerçekleşmektedir. Çoğu örnekte timpanik membranın arkasında AOM oluştuğunda *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae* gibi mikroorganizmalar izole edilmektedir (Mandel et al 1994). KSOM aynı zamanda, yüzerken ya da banyo yaparken sağlam olmayan kulak zarı aracılığıyla kulağa giren suda bulunan mikroorganizmalar ile orta kulak yarığının kontamine olmasıyla da oluşabilmektedir. Östaki tüp disfonksiyonunun bu sürece dahil olduğu bilinmektedir. Bir çalışmada kronik perforasyonlu Japon çocuk ve yetişkinlerin kulağındaki östaki tüp fonksiyonu ile ilgili tüpün aktif açılma fonksiyonunun bozulduğunu tespit etmiştir. Tüpün fonksiyonel olarak tıkanıldığını belirtmekle beraber aynı

zamanda mekanik veya anatomik tıkanmanın da yetişkinlerin patogenezinde rol oynayabileceği bildirilmiştir (Iwano et al 1993)

2.6.1.KSOM'un Komplikasyonları

KSOM'un en yaygın sekeli kondüktif ya da sensorinöral işitme kaybıdır. Bu, küçük çocuklarda dil gelişimini ve okul sürecini etkileyebilmektedir. Orta kulağın kronik infeksiyonu orta kulakta ödem, akıntı ve timpanik membran perforasyonu ile sonuçlanabilmekte ve osikular zincir hasarı 20-60 desibele kadar işitme kaybıyla sonuçlanabilmektedir (Bluestone et al 1996, Seely et al 1995). Sensorinöral işitme kaybına sebep olan KSOM ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda yuvarlak pencere membranı içinden iç kulağa penetre olan inflamatuvar medyatörlerinin kokleadaki işitme hücrelerinin kaybına sebep olabileceği gösterilmiştir (Huang et al 1990, Morizono ve Tono 1991). Son zamanlarda insanlarda yapılan bir çalışmada KSOM'lu hastalarda kokleanın bazal kıvrımlarındaki iç ve dış işitme hücrelerinde azalmalar olduğu gösterilmiştir (Cureoglu ve ark 2004). KSOM'da sensorinöral işitme kaybının olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Tek taraflı KSOM'lu 218 hastanın dahil edildiği bir çalışmada (ortalama 35 yaş) kemik iletimi eşliğinin sağlıklı kişilerden 9-14 dB daha düşük olduğu bildirilmiştir (El Sayed 1998). Tek taraflı KSOM'lu 121 hastanın dahil edildiği bir başka çalışmada ise kemik iletimi eşliğinin KSOM'lularda 10-12 dB iken, sağlıklı bireylerde 3-4 dB olduğu gösterilmiştir (Papp et al 2003). Diğer yandan, biri tek taraflı KSOM'lu (50 yaş) 286 hasta diğeri de çift taraflı KSOM'lu (5.5 yaş) 87 çocuk hasta üzerinde yapılan çalışmalarda kemik iletimi eşliğinde infeksiyonun herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (Kaplan ve ark 1996, Browning ve Gatehouse 1989). Çocuklarda sensorinöral işitme kaybı gelişme riskinin yetişkinlerden daha yüksek olduğunu göstren hiçbir kanıt bulunmamaktadır (El Sayed 1998, Browning ve Gatehouse 1989). KSOM ciddi ekstra ve intrakranial komplikasyonlarla sonuçlanabilmektedir. KSOM'da ekstra ve intrakranial komplikasyon gelişme riskinin %0.7-3.2 arasında değiştiği bildirilirken yalnız ekstrakranial komplikasyon gelişme oranının %0.5-1.4 ve yalnız intrakraniyal komplikasyon görülme oranının ise %0.3-2 arasında olduğu bildirilmiştir (Osma et al 2000, Kangsanarak et al

1990). Komplikasyon görölme insidansının KSOM'lu çocuk hastalarda yetişkinlere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. KSOM'un çocuklarda daha sık görölmekle beraber, çocuklarda ve yetişkinlerdeki komplikasyon oranlarını karşılaştırma yapabilecek düzeyde veri bulunmamaktadır.

2.6.2.Sistemik hastalıklar ve KSOM

KSOM mastoid ve orta kulağın bu spesifik inflamasyonunun görülebildiği M.Wegener, tüberküloz ve Histiocytosis X gibi sistemik hastalıkların bir parçası olarak da meydana gelebilmektedir.

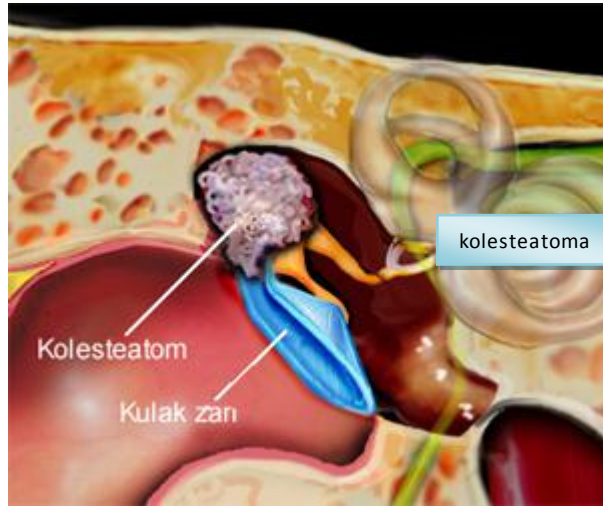
2.6.3. KSOM ve İştime ilişkisi

OM'li çocuklarda işitmenin değerlendirildiği Pittsburgh'da yapılan bir çalışmada EOM'li olduğu bildirilen bebek ve çocuklar çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada 7-24 aylık 222 bebekte ortalama konuşma farkındalık eşiği 24.66 dB, 2-12 yaş arası 540 çocukta ise ortalama hava iletimi eşiği 27 db olarak belirlenmiştir (Fria et al 1985). KSOM'un yüksek görüldüğü toplumlarda işitmeyle ilgili sadece birkaç çalışma bulunurken, ortalama işitme kaybı genellikle EOM'nin var olduğu durumlarda bildirilenden daha kötüdür. Son zamanlarda Sierra Leone'den gerçekleştirilen bir çalışmada süpürasyonlu ve süpürasyonsuz perforasyonu olan çocuklardaki işitme değerlendirilmiş, kuru perforasyonu olan 37 kulaktan 33 (%89)'ünde saf ses ortalamasının 26 db ve KSOM'lu 100 kulaktan 96'sında da aynı derecede işitme kaybının görüldüğü bildirilmiştir (Stewart ve Byrne 1976).

2.7.Kolesteatoma ve KSOM ilişkisi

Orta kulak boşluğunda veya temporal kemiğin havalı bölgelerinde düzensiz şekilde gelişen deriye ait kistlerdir. Edinilmiş ve doğumsal olmak üzere 2 sınıfa ayrılmaktadır. Edinsel kolesteatoma en yaygın kolesteatoma türü olmakla beraber kulak zarında bir delik ya da retraksiyon cebi olarak oluşmaktadır. Edinsel kolesteatoma, Eskimolar, Kızılderililer ve Avustralya Aborijinleri gibi KSOM'un yüksek oranda görüldüğü toplumlarda nispeten nadir görülmektedir. Grönland Eskimoları arasında yapılan bir

çalışmada 14 yaşına kadar kolesteatoma sıklığının 6.6/100.000 olduğu hesaplanmıştır (Homoe ve Bretlau 1994). Sierra Leone’de 2015 çocuk arasında yapılan başka bir çalışmada ise KSOM oranı %6.4 olarak belirlenirken, sadece bir çocukta kolesteatoma görülmüştür (Stewart ve Byrne 1976). Ancak; hayat koşulları ve sağlık alanındaki gelişmelerle, kolesteomanın insidansındaki artışla ilgili bazı kanıtlar olduğu belirlenmiştir. KSOM insidansının düşük olduğu gelişmiş ülkelerde (OM sekeli olarak) kolesteoma oranı nispeten yüksektir. Iowa’da 10-19 yaş aralığındaki çocuklarda yapılan bir çalışmada, insidans 9.2/100000 olduğu bildirilmiştir (Wiet ve ark 1980).



Şekil.2.3. Kolesteatoma Oluşumu (<http://www.kulakburunbogaz.info> 2013)

2.8.Patogenez

Yukarıda bahsedilen risk faktörlerinden bir ya da daha fazlasını içeren KSOM’un etiyolojisi ve patogenezini multifaktöriyeldir. Östaki tüpünün anatomik ve fonksiyonel özellikleri yanında çevresel ve genetik faktörlerin de etkili olabileceği bildirilmiştir. KSOM, akut veya efüzyonlu OM’nin akut başlangıcıyla görülmektedir. Böylece, AOM’la ilişkilendirilmiş faktörler arasında; başta infeksiyon (viral ve bakteriyel), östaki tüp disfonksiyonu gibi anatomik faktörler, genç yaş gibi konak faktörleri, gelişmemiş veya baskılanmış immünolojik durum, üst solunum yolu alerjisi, ailesel yatkınlık, ailedeki kardeş sayısının fazlalığı, cinsiyet (erkek), beslenme şekli, çevresel ve toplumsal faktörleri

sayılabilmektedir (Bluestone ve Klein 1996). Genellikle bebeklerde ve küçük çocuklarda OM'nin başlangıcıyla ilişkili en önemli faktörler; östaki tüpünün yapı ve fonksiyonunun gelişmemiş olması ve immün sistemin zayıf olmasıdır (Bluestone, 1996). Bebekler ve küçük çocuklar üst solunum yolu infeksiyonuna maruz kalmalarıyla birlikte OM yaygın bir infeksiyon haline gelmektedir.

2.9.Mikrobiyoloji

KSOM'da bakteri, östaki tüpü aracılığıyla nazofarinksten ya da sağlam olmayan timpanik membran aracılığıyla dış kulak kanalından orta kulağa ulaşabilmektedir (Bluestone 1996). KSOM'da en sık izole edilen aerobik mikroorganizmalar arasında *P.aeruginosa* (%18-67) ve *Staphylococcus aureus* (%14-33) ilk sıralarda yer alırken bu mikroorganizmaları; *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., ve *Escherichia* spp. gibi Gram negatif mikroorganizmalar (%4-43) ve *Haemophilus influenzae* (%1-11) takip etmektedir (Ibekwe et al 1997). En sık izole edilen anaerob mikroorganizmalar arasında ise *Bacteroides* türleri ile *Fusobacterium* türleri bulunmaktadır (De Uzeda ve Rocha 1989). KSOM'da orta kulak yüzeyinin *P.aeruginosa*, *S.aureus* ve anaeroblar gibi mikroorganizmalara daha toleranslı olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden bu bakterilerin KSOM için gerçek patojen olup olmadığı tartışmalıdır. Bir diğer görüş ise bu mikroorganizmaların dış kulak yolundan kontaminasyon veya sekonder işgalciler için uygun ortam sağladığına ilişkin hipotezdir (Brook 1995, Bluestone et al 1996).

Aerob ve anaerob bakterilerin iyileşme oranındaki geniş değişkenlik, hastalığın seyri boyunca örnekleme zamanındaki farklılıklarla, önceden antibiyotik kullanımı, örnek alınmadan önce bölgenin temizlenmesi, transport besiyeri veya inokülasyonun gecikmesi gibi örnek alımı ve işlenmesiyle ilişkili olan farklı proseslerden kaynaklanabilmektedir (Brook 1995, Bluestone et al 2002).

Mantarlardan özellikle *Aspergillus* spp. ve *Candida* spp. türlerinin de KSOM da rol oynadığı düşünülmektedir. Mantar infeksiyonlarının sık görüldüğü özellikle sıcak ve nemli bölgelerde yaşayan toplumlarda KSOM vakalarının %50'sinden mantarların sorumlu olduğu bildirilmektedir (Tiwari et al 1995, Khanna et al 2000). Son zamanlarda kinolon kulak damlası ile tedavinin komplikasyonu olarak sekonder mantar gelişimine sıkça rastlanmaktadır (Schrader ve Isaacson 2003). Bununla birlikte bakteriyel biyofilmler

kronik infeksiyon kaynağı olarak önem kazanmıştır. Biyofilmler, polisakkarit matriks içine gömülü bir yüzeyde gelişen, ortadan kaldırılması zor olan ve içerisinde bakteri hücreleri barındıran polisakkarit yapıları maddeler olup kronik infeksiyonların gelişiminde son derece önemlidir (Lewis 2001, Stewart ve Costerton 2001). Ayrıca biyofilmlerin, osteolitik kemik ve ülserli orta kulak mukozası veya timpanostomi tüpü gibi otolojik implantlarda hasarlar meydana getirdiği de bildirilmektedir. Bu sebeple biyofilmlerin KSOM'da inatçı infeksiyonlara yol açtığı düşünülmektedir (Roland 2002, Post et al 2004).

2.10. İmmünoloji ve Genetik

Genel olarak KSOM gibi mukozal infeksiyonlara karşı savunmada IgG ve IgA tipindeki antikorlar görev almaktadır. Salgısal IgA (sIgA) orta kulak kavitesinin mukozasındaki plazma hücreleri tarafından lokal olarak sentezlenmekte ve bakterilerin orta kulak mukozasına kolonizasyonun önlenmesinde rol oynamaktadır. KSOM'lu çocuklar sIgA'dan yoksun olabilmektedirler (Stenfors ve Raisanen 1991). IgG sınıfı immunglobulinler direkt veya kompleman aktivasyonu ile fagositozu kolaylaştırmaktadır. IgG ve IgG alt sınıf konsantrasyonları yaşa bağlı olarak değişmektedir (Stenfors ve Raisanen 1992). Rekürren üst solunum yolu infeksiyonu görülen çocuklarda IgG'nin bazı alt gruplarının (özellikle IgG2) düşük titrelerde olduğu (vakaların %10-20'si) bildirilmiştir (Veenhoven et al 2004, Gross et al 1992). Ig seviyeleriyle ilgili olarak KSOM'da böyle bir veri bulunmamaktadır. İmmunglobulinler bakteri duvarına yapışarak aktive olmaktadır (Stenfors ve Raisanen 1992). KSOM'da bakterinin sIgA ve IgG ile kaplanması sık olarak görülse de, infeksiyon etkeni *Pseudomonas aeruginosa* olduğunda Ig'lerle bakteriyel kaplanma görülmemektedir. Bu KSOM'da *Pseudomonas aeruginosa* kaynaklı infeksiyonların tedavisinin ne kadar zor olduğunun göstergesidir (Stenfors ve Raisanen 1991). AOM ve EOM'deki inflamatuvar medyatörler üzerine bir çok çalışma bulunsa da, KSOM'da lokal sitokin üretimi gibi faktörlerin spesifik rolleri hakkındaki yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. KSOM'un genetik determinantları hala bilinmemektedir. OM'li ikizler arasında yapılan çalışmalarda tek yumurta ikizlerinde çift yumurta ikizlerinden daha yüksek oranda bir uyumdan bahsedilmektedir (Rovers et al 2002). MBL (Mannose-binding lectin)'nin düşük serum seviyesi ve Fc gama reseptörünün polimorfizminin çocuklukta nükseden üst solunum yolu infeksiyonu ve OM ile alakalı olduğu bildirilmiştir (Sanders et

al 1995). Bu ve diğer düzenleyici genlerin KSOM'daki rollerinin tam olarak ne olduğunun anlaşılması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.11.Epidemiyoloji

KSOM, timpanostomi tüpünün en yaygın komplikasyonu olan timpanostomi tüpü akıntısından ayırt edilmelidir. KSOM'un doğru prevalansı ve insidansının hesaplanmasında kolesteatomaalı hastaların dikkate alınması oldukça önemlidir. KSOM genellikle hayatın ilk 5 yılında görülmekte olup, en yaygın olarak gelişmekte olan ülkelerde, özellikle kraniyofasyal anomalili çocukların sık görüldüğü toplumlarda (ve bazı etnik gruplarda) görülmektedir (Wintermeyer ve Nahata 1994, Nelson 1988). KSOM, sadece ılıman iklimlerde değil aynı zamanda kuzey kutbu ile ekvator arasında değişen ekstrem iklimlerde de yaşayan, farklı ırk ve kültür gruplarını etkileyen ve dünya çapındaki birçok popülasyonda görülen major bir sağlık problemidir. Son yıllarda yayınlanmış çalışmalarda hastalığın prevalansına dayalı popülasyonlarda farklı topluluklar olduğu bildirilmektedir. Alaska Eskimoları arasında insidansın %30-46, Kanada'da %7-31, Avustralya aborjinleri arasında %12-33, ve bazı Amerikan kabileleri arasında %4-8 arasında değiştiği bildirilmiştir. (Ling et al 1969, Baxter et al 1992). Doğu Kanada'da, kuzey Amerika Kızılderili kabilesi (Cree yerlileri) öğrencileri ile aynı bölgede yaşayan Inuit çocuklar arasında yapılan bir çalışmada Inuit'de hastalığın prevalansının %22 olduğu bildirilirken, Cree'de bu oranın %1 olduğu bildirilmiştir (Baxter et al 1986).

Yapılan bir başka çalışmada da, Güney Afrika kırsalındaki zencilerde oranın %1'den düşük olduğu saptanmıştır (Halama et al 1986). İspanya'da bir çingene popülasyonunda KSOM prevalansı %4 iken, aynı bölgedeki Kafkaslar'da bu oranın sadece %1 olduğu bildirilmiştir. KSOM'un düşük prevalansta görüldüğü popülasyonlar arasında Kore (%2) (Kim et al 1993), Hindistan (%2) (Kapur et al 1965) ve Suudi Arabistan (%1.4) (Muhaimid et al 1993) sayılabilir.

Çok gelişmiş ülkelerdeki çalışmalar en düşük oranda (%1'den daha az ya da hiç görülmeyen yerler) görülen yerler arasında Birleşmiş Devletler (Casselbrant ve ark 1985), Finlandiya (Zeisel ve ark 1995), Birleşmiş Krallık (Williamson ve ark 1994) ve

Danimarka (Fiellau-Nikolajsen 1983) olarak bildirilmiştir. Büyük Britanya'daki bir yetişkin popülasyonunda oranın %3.1 olduğu bildirilmiştir (Browning ve Gatehouse 1992). Ancak, timpanostomi tüpü kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte bebeklerde ve çocuklarda KSOM'un sık görülen bir komplikasyon olarak olduğu görülmüştür (Dohar et al 1996). Bu popülasyonlardaki KSOM'un yüksek oranıyla ilişkili/atfedilen risk faktörleri arasında; emzirme eksikliği, aşırı nüfus yoğunluğu, kötü hijyen, kötü beslenme, sigara kullanımı, potansiyel patojen bakterilerin nazofaringeal kolonizasyonunun yüksek oranı ve sağlık durumundaki elverişsizlik sayılabilmektedir (Leach et al 1994).

2.12.Risk Faktörleri

KSOM'un risk faktörleri arasında; akut veya rekürrent OM hikayesi, ailesel KOM hikayesi ve kalabalık ortamlarda yaşama (çok kardeşli büyük aileler, büyük kreşler) gibi faktörler sayılabilir (Fliss et al 1991). KSOM'un alerji, rekürrent üst solunum yolu enfeksiyonu, emzirme, cinsel ilişki, yaş ve pasif sigara içiciliği ile ilişkisinin olmadığı bildirilmiştir. Ancak AOM için bu risk faktörlerinden bazılarının klinik açıdan KSOM'da rol oynadığı bildirilmektedir. KSOM'un çocuklarda hastalığı önceden tahmin edebilecek kantitatif bir bulgusu bulunmamaktadır.

2.12.1.Yüksek riskli popülasyonlar

Yukarıda anlatıldığı gibi, KSOM'la beraber ya da KSOM'suz timpanik membranın kronik perforasyonunun gelişmesi açısından yüksek risk taşıyan popülasyonlar bulunmaktadır. Bazı konak faktörleri hastalığın prevalansı ile ilgili önemli risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Konak faktörleri arasında hastalığın daha sık görüldüğü kişilerin östaki tüpünün yapısıyla ilgili olabileceği bildirilse de bu konuda yapılan çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Eskimolar, Amerikan kızılderiileri, Kafkaslar ve zenci bireyler arasında kraniyofasiyal kemik yapıları ile ilgili bir çalışmada östaki tüpünün kemik segmentlerinde anatomik farklılıklar olduğunu bilirmiştir (Doyle 1977). Farklı ırklarda tüpün uzunluğu, genişliği ve açısında önemli farklılıklar OM'den korunmada veya yatkınlıkta önemli olabileceği bildirilmiştir. Yaşları 3-36 yaş aralığında değişen 25 beyaz apaçi yerlisi ile aynı

yaş grubundaki Kafkaslar arasında yapılan bir klinik çalışmada apaçi yerlilerinin östaki tüp aralığının daha dar olduğu (yarı açık konu) bildirilmiştir. Çalışmada östaki tüp fonksiyonu inflasyon-deflasyon ve etki-tepki testlerinin uygulanmasıyla kulak zarının kronik perforasyonları değerlendirilmiştir (Beery et al 1980). Başka bir çalışmada üreter kateterli Kanada'lı Eskimolarda östaki tüpü ölçülmüş ve eskimolardaki tüpün kafa kaslarına nazaran daha geniş olduğu saptanmıştır (Ratnesar 1977).

Bu çalışmalarda farklı ırklarda ve toplumlarda östaki tüpünün yapısının nazofaringeal sekresyonların orta kulağın içine refluksunda önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir. Reflüks AOM gelişmesine ve timpanik membranın perforasyonuna sebep olabilmektedir. Bazı bireylerde nazofaringeal sekresyonların reflüsü ilk episoddan sonra devam ederken, bazı bireylerde ise bu süreç, üst solunum yolu infeksiyonu veya bunu takiben yüzme sırasında oluşan kontaminasyonla beraber tekrarlanmaktadır. Orta kulak mastoidinde gaz yastığı ortadan kalktığı için, perforasyon, nazofarinksten sekresyonların reflüksünü arttırmaktadır. Daha çok, nadiren pars tensanın posterosuperior kadranında ya da pars flasida'da kolesteatomalı timpanik membran perforasyonunu olan çoğu kişide, perforasyon içinden epitel göçü mümkün olsa da yaygın olarak görülmemektedir. Çünkü kolestatomların çoğu orta kulakta negatif basıncın başlaması, atelektazi gelişmesi ve bir rekraksion cebinin oluşması gibi olaylar dizisi ile sonlanmaktadır. Orta kulak basıncının oluşması sebebiyle merkezi perforasyon görüldüğü zaman kolesteatoma gelişimi nadirdir. Bu yüzden, KSOM'lu çocuk ve yetişkinlerin bir morbid süreci olsa da, kolesteatomaanın posterosuperior tipi gelişiminden korunuyor gibi görünmektedirler. Bu yüksek oranda kronik perforasyona sahip ırk gruplarında kolesteatomaanın düşük insidansda görülmesiyle açıklanabilir. Bunun yanında yüksek riskli populasyonlardaki östaki tüp fonksiyonunda ırksal gruplardaki olası yaygın soruna ek olarak erken yaşlarda nazofarinks kolonizasyonunda farklılıklar olabilmektedir. Avustralyan yerlisi bebeklerde yapılan bir çalışmada nazofarinks kolonizasyonunun Kafkas yerlilerine nazaran daha hızlı olduğu saptanmıştır (Leach et al 1994). Son zamanlarda Grönland'de AOM'lu (%44 akut otore) çocuklarda yapılan bir çalışmada nazofarinks potansiyel patojen bakterilerin büyük oranda bulunduğu bildirilmiştir (Homoe ve ark 1996). Çalışmalarda izole edilen patojenlerin orta kulaktan izole edilen izolatlarla aynı olduğu bildirilmiştir (Bluestone et al 1990).

Bunun yanında perforasyondan önce oluşan hastalık farklı da olabilmektedir. Eskimolarda çocuklar arasında yapılan bir çalışmada OM'nin, daha hafif formu kronik granülamatoz OM olarak adlandırılmıştır (Timmermans ve Gerson 1980). AOM'nin bir ya da daha fazla episodundan sonra (genellikle antimikrobiyal bir ajanla tedavi edilir) ağrı ya da ateşsiz ani başlangıçlı bir otore mevcuttur. Akıntı yıllarca devam edebilmektedir. Timpanik membranda geniş perforasyon gelişmekte ve orta kulak boşluğu granülamatoz doku ile dolmaktadır. Bir çalışmada, yüksek riskli popülasyonlarda çevre koşullarının önemli risk faktörü olabileceği bildirilse de genetik farklılıkların bu yüksek riskli topluluklarda daha önemli olduğu bildirilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışmaya 31.12.2010- 05.04.2012 tarihleri arasında MKÜ Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz polikliniğine müracaat eden yaşları 5-83 arasında değişen kronik otitis media tanısını almış 122 hasta dahil edildi. Çalışmada; *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında amikasin, meropenem, siprofloksasin, levofloksasin, imipenem, piperasilin, gentamisin, sefepim, seftazidim ve tetrasiklin duyarlılıkları ile stafilocoklarda oksasilin, klindamsin, eritromisin, siprofloksasin, vankomisin, penisilin, gentamisin, TMP-SXT, rifampin duyarlılıkları Vitek-2 (bioMeuriux, Fransa) otomatize sistemle araştırıldı. Mikroorganizmaların duyarlılık testleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine uygun olarak yapıldı.

Çalışmada *P.aeruginosa* kökenlerinde *tetK*, *tetM* ve *ampC* direnç genlerinin varlığı multipleks PCR yöntemiyle belirlendi. Bunun yanında *S.aureus* kökenlerinde *tsst*, *pvl* (Panton Valentin Lökositidin), *etaA*, *femA* ve *femB* genlerinin varlığı ile koagülaz negatif (KNS) ve koagülaz pozitif stafilocok kökenlerinde metisilin direnç geni (*mec A*) ile enterotoksin genlerinin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *se* ve *sej*) varlığı multipleks PCR yöntemiyle araştırıldı.

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)
- Mc farland cihazı (İtalya)

- Otomatik pipetler (Discovery, Transferpette, Almanya)

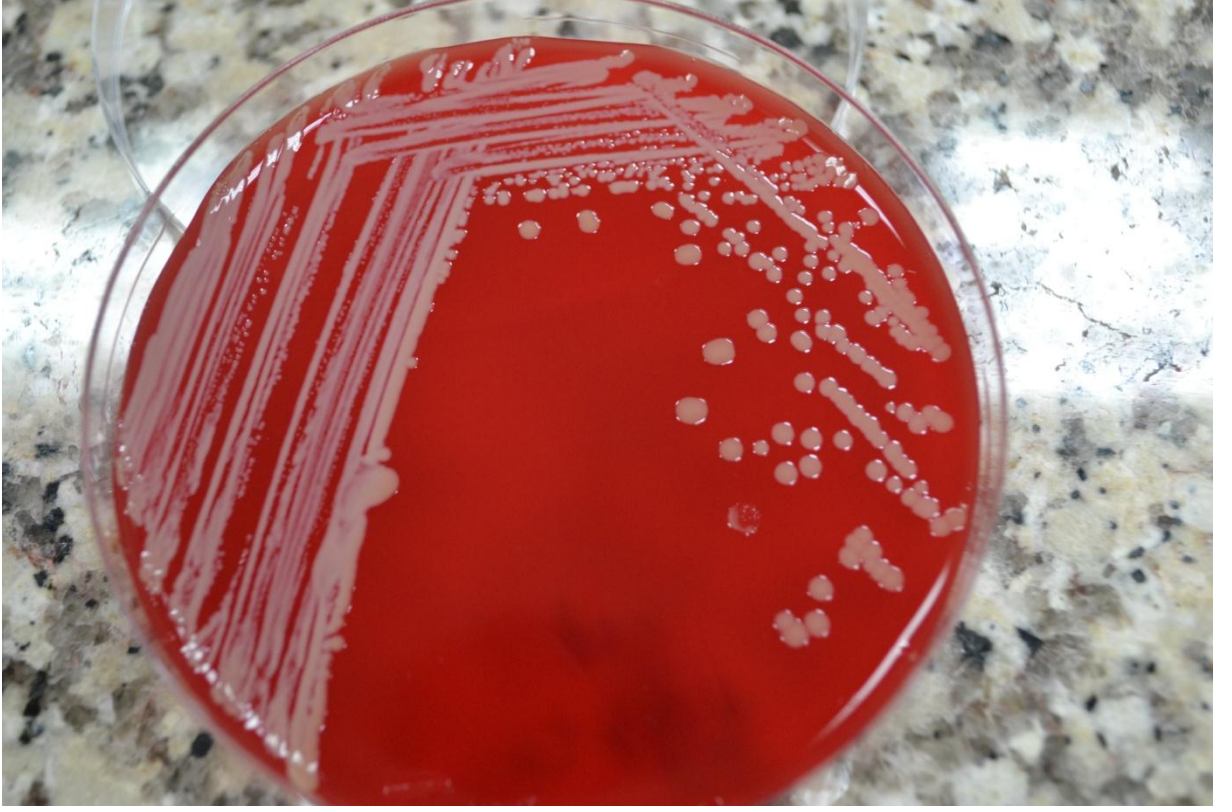
3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Agaroz (Sigma, ABD)
- Kanlı agar (biomrieux, Fransa)
- SDA (sabouraud dextrose agar) (Merck, Almanya)
- Jelli transport besiyeri (Macaristan)
- Müller Hinton Agar (Merck, Almanya)
- Buffer (Fermentas, Avrupa)
- Mg (Fermentas, Avrupa)
- dNTP (Fermentas, Avrupa)
- dH₂O (Fermentas, Avrupa)
- Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific Fermentas, Avrupa)
- Eosin Metilen-Blue Agar (EMB) (biEOMrieux, Fransa)
- DNA Ladder (100 bp, Fermentas, Avrupa)
- 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 Elektroforez Tamponu(Tris Asetat Tamponu) 50X
- GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis, ABD)

3.2. Örneklerin Toplanması ve Kültivasyon

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz polikliniklerine kulak akıntısı şikayeti ile başvuran kronik otitis media tanısı konan 122 hastadan steril eküvyonlarla çevresel etkenlerden kotaminasyona dikkat edilerek alınan örnekler transport besiyeri içinde Mikrobiyoloji kültür laboratuvarına yollandı. Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen örnekler %5 koyun kanlı agar, çukulota besiyeri, Eozin Methylene Blue (EMB) agar ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerlerine inoküle edilerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İzole edilen mikroorganizmaların identifikasyonu, Gram boyama, katalaz testi, plazma koagülaz testi, oksidaz ayırıcı ve biyokimyasal reaksiyonlar temeline dayanan otomatize Vitek-2 sistemi ile İdentifiye edildi. Gram pozitif bakterilerin tiplendirilmesinde Gram boyamayı takiben katalaz ve plazma koagülaz testleri kullanılırken, Gram negatif bakterilerin identifikasyonu otomatize sitem yardımıyla yapıldı. Candida olarak izole edilen örneklerin tiplendirilmesi ise *Candida albicans* ve non-albicans düzeyinde jermantasyon testi ile yapıldı. Tiplendirilen izolatlar istenilen örnek sayısına ulaşılmıncaya kadar içerisinde %20 oranında gliserol (Merck, Almanya) bulunan buyyonda -70 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.1. Kanlı Agarda *S.aureus* İzolatlarının Görünümü.

3.3. Kullanılan Besiyerleri, Solüsyonlar

3.3.1. Kanlı Agar

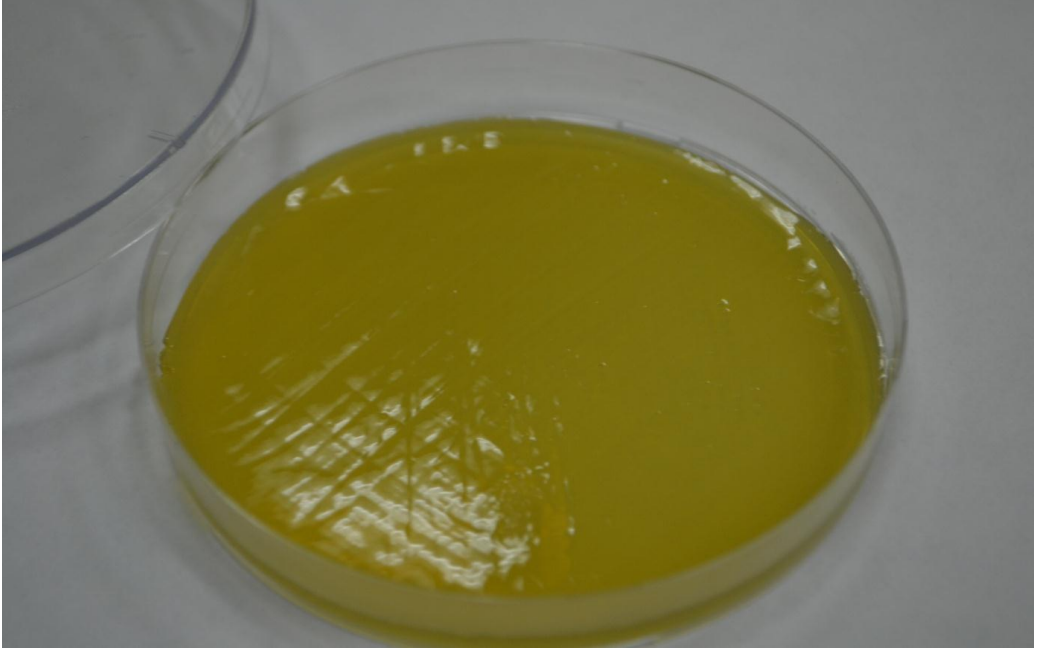
Ticari olarak toz halinde temin edilen kanlı agardan (bioMeurieux, Fransa) 40 gr tartılarak bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Sterilizasyon işleminden sonra 45-50°C'ye kadar soğutuldu. İçerisine %5.0 (v/v) oranında, steril şartlarda alınmış koyun kanı ilave edilip karıştırıldıktan sonra petri kutularına dağıtıldı.

3.3.2. Eosin Metilen-Blue Agar

Ticari olarak toz halde temin edilen EMB (biomrieux, Fransa) agardan 36 gr tartılarak bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildikten sonra 9 cm çapında steril petri plaklarına döküldü. Besiyeri katılaştıktan sonra izolasyon ve identifikasyon için kullanıldı.

3.3.3. Müeller Hinton Agar

Ticari olarak toz halde temin edilen Müeller Hinton agardan (Merck, Almanya) 34 gr tartılarak bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildikten sonra 9 cm çapında steril petri plaklarına döküldü.



Şekil 3.2. Müeller Hinton Agarda *P.aeruginosa* izolatlarının görünümü.

3.3.4. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)

Ticari olarak toz haldeki SDA besiyeri (bioMérieux, Fransa) 65 gr tartılıp, 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildikten sonra içine, 10 ml % 70'lik alkolde eritilen 0.04 gr Kloramfenikol ve 0.5 gr siklohekzimid katılarak karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri 9 cm çapında steril petri plaklarına dökülerek katılaştıktan sonra kullanıldı.

3.3.5. Gram Boyama

Kanlı, çukulota, EMB ve SDA besiyerinden 24 saatlik inkübasyondan sonra üretilen mikroorganizma kolonilerinden öze ile alınarak temiz bir lam üzerine serum fizyolojik ile süspanse edilerek homojenize edildi ve havada kurutuldu. Preparat metanol ile 3-5 dk. tespit edildikten sonra Gram boyama işlemine geçildi. Preparat üzerine ilk olarak

kristal viyole konup 1.5 dk. süre ile muamele edildi. Preparat üzerindeki boya dökülüp çeşme suyuyla yıkandıktan sonra yine 1.5 dk. lügol konup inkübasyon sonunda çeşme suyuyla yıkandı. Takiben preparat %96'lık etil alkol ile dekolorizasyona tabii tutuldu. Son aşamada ise preparat sulu fuksin boyası ile 15 saniye muamele edilip yıkandıktan sonra havada kurutuldu. Preparatlar immersiyon objektifinde incelenerek Gram (+), Gram (-) ve Candida ayrımı yapıldı.

3.3.6. Oksidaz testi

EMB agarda üreyen koloni morfolojisi bakımından pseudomonas açısından şüpheli kolonilerden öze ile alınarak lam üzerinde kurutma kağıtlarına emdirilmiş oksidaz ayırıcı ile muamele edildi. Muamaleden 3-5 dakika sonra mor renge dönüşüm oksidaz pozitif olarak değerlendirildi. Tür düzeyinde tiplendirme Vitek-2 cihazında otomatik sistemle yapıldı.

3.3.7. Katalaz Testi

Katı besiyerinde 37 °C'deki 1 günlük inkübasyon sonunda saf üreyen koloniden öze yardımıyla alınarak temiz bir lam üzerine yayıldı. Üzerine %30'luk hidrojen peroksitten bir damla damlatılarak hava kabarcıklarının görülmesi katalaz pozitif olarak değerlendirildi.

3.3.8. Koagülaz Testi

Test için bir tüpe 0.5 ml plazma konarak öze yardımıyla stafilocok kolonisinden plazma besiyerine inoküle edildi. Tüplerin inkübasyonu 37 °C'de 6 saat inkübe edildi. Koagülasyon varlığı açısından tüpler her 2 saatte bir kontrol edildi. Koagülasyonun tespit edilmesi stafilocok izolatlarının koagülaz pozitif stafilocok (*S.aureus*)a olarak değerlendirilmesiyle sonuçlandı. Süspansiyonda hiçbir değişikliğin olmaması durumunda ise koagülaz negatif olarak tiplendirildi.

3.3.9. Germ tüp Deneyi

SDS besiyerinde saf olarak üreyen ve Gram boyama ile maya tanısı konan izolatlar germ tüp deneyi için seçildi. Bu yöntemde maya kolonisinden 0.5 ml insan serumuna inoküle edilerek germinasyon için 37°C'de 2-4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bu süspansiyondan lam-lamel arası preparat hazırlanarak 40x'lik mikroskopta incelendi.

3.3.10. Triptik Soy Buyyon

Ticari olarak temin edilen Triptik Soy Buyyon besiyeri (Tryptic Soy Broth, Merck Almanya) 3 gr tartılarak bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilazyondan sonra oda ısısında 30 dk bekletilen besiyerine 25 ml gliserol eklendi. Daha sonra 1'er ml olarak eppendorf tüplere porsiyonlanarak bakteri izolatlarının derin dondurucuda saklanması için kullanıldı.

3.3.11. Fosfat Buffer Tamponu (PBS)

- 8.0 gr NaCl
- 0.2 gr KCl
- 1.15 gr Na₂HPO₄
- 0.2 gr KH₂PO₄ tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. pH'sı 7.2 olacak şekilde ayarlanarak +4°C'de saklanır.

3.4. Genomik DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu için ticari olarak temin edilen GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis, Amerika) kullanıldı. Ekstraksiyon adımları aşağıdaki şekilde uygulandı.

Stafilokok için;

- Saklama besiyeri içinde -70 °C'de bulunan bakteriler kanlı BY ve EMB'ye pasaj çekildi 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.
- İnkübasyon sonunda tüpler 3500 devirde 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında süpernatant kısım döküldü.
- Tüplerde bulunan pelletin üzerine 1000 µl serum fizyolojik konularak vorteks ve ardından pipetaj yapıldı.
- 6000 g' de 2dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısım döküldü.

- Pellete 100 µl Buffer R1 eklendi ve hücrelerin tamamı pipetaj yapılarak resüspanse edildi.
- Hücre süspansiyonu içine 20 µl (50mg/ml) lizozim enzimi eklendi, vorteks yapıldı ve 37°C' de 20 dakika inkübe edildi.
- 10.000g'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatantın tamamı uzaklaştırıldı.
- Pellete 180 µl Buffer R2 resüspanse edildi ve 20 µl Proteinaz K eklendi. Vortekslendi. 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. 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.
- 10.000g' de 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 750 µl yıkama tamponu eklendi ve 10.000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- Kalan etanolu uzaklaştırmak için 10,000g' 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.
- 10,000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Spin kolon atıldı ve mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA elde edildi.

Pseudomonas için;

- Saklama besiyeri içinde -70 °C'de bulunan bakteriler kanlı BY ve EMB'ye pasaj çekildi 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.
- İnkübasyon sonunda tüpler 3500 devirde 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında süpernatant kısım döküldü.
- Tüplerde bulunan pelletin üzerine 1000 µl serum fizyolojik konuldu ve vorteks, pipetaj yapıldı.
- 6000 g' de 2dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısım döküldü.
- Pellete 100 µl Buffer R1 eklendi ve hücrelerin tamamı pipetaj yapılarak resüspanse edildi.
- Hücre süspansiyonu içine 10 µl (50mg/ml) lizozim enzimi eklendi, vorteks yapıldı ve 37°C' de 20 dakika inkübe edildi.
- 10.000g'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatantın tamamı uzaklaştırıldı.
- Pellete 180 µl Buffer R2 resüspanse edildi ve 20 µl Proteinaz K eklendi. Vortekslendi. 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. 65°C' de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tüplere 200µl %100'lük etil alkol eklendi ve hemen vortekslendi.
- Ependorf tüplerde bulunan bu karışım toplama tüpünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarıldı.
- 10.000g' de 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 750 µl yıkama tamponu eklendi ve 10.000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- Kalan etanolu uzaklaştırmak için 10,000g' 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.
- 10,000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Spin kolon atıldı ve mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA elde edildi.

3.5. PCR Amplifikasyonu

Ekstrakte edilen *stafilokok* ve *P.aeruginosa* genomik DNA örneklerinden *KNS*'ler için ticari olarak sentezlenen; *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* primerleri, *S.aureus* için *femB*, *mecA*, *pvl*, *etaA* ve *tsst* primerleri ve *P.aeruginosa* için *tetK*, *tetM* ve *ampC* primerleri kullanılarak ısı döngü cihazında PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi (Çizelge 3.1, 3.2).

Çizelge 3.1. Stafilokoklar için, multiplex PCR'da kullanılan primer dizileri

Primer	Hedef gen	Primer dizisi (5'-3')	Fragment boyutu (bp)
<i>Sea</i>	<i>sea-F</i>	GTA GGG AAG CGA ACA GAG	361
	<i>sea-R</i>	AAG CTC CGT GTG CCT GAA	
<i>Seb</i>	<i>seb-F</i>	ACA CTG GAT GAT CTC AGT GG	614
	<i>seb-R</i>	CTG AAT CCC CCT CCA TTA TG	
<i>Sec</i>	<i>sec-F</i>	CCA TGA CAA CGG ACA GCA GTT	779
	<i>sec-R</i>	CCT GTC AAC TGA GCA CTT TG	
<i>Sed</i>	<i>sed-F</i>	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	317
	<i>sed-R</i>	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	
<i>See</i>	<i>see-F</i>	AGG TTT TTT CAC AGG TAC TCC	200
	<i>see-R</i>	CTT TTT TTT CTT CGG TAC ATC	
<i>Seg</i>	<i>seg-F</i>	CGT CTC CAC CTG TTG AAG G	328
	<i>seg-R</i>	CCA AGT GAT TGT CTA TTG TCG	
<i>Seh</i>	<i>seh-F</i>	CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG	360
	<i>seh-R</i>	GTC GAA TGA GTA ATC TCT AGG	

<i>Sei</i>	<i>sei-F</i>	CAA CTC GAA TTT TCA ACA GGT ACC	466
	<i>sei-R</i>	CAG GCA GTC CAT CTC CTG	
<i>Sej</i>	<i>sej-F</i>	CAT CAG AACTGT TGT TCC GCT AG	142
	<i>sej-R</i>	CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC	
<i>femA</i>	<i>femA-F</i>	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG	132
	<i>femA-R</i>	GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	
<i>femB</i>	<i>femB-F</i>	TTA CAG AGT TAA CTG TTA CC	651
	<i>femB-R</i>	ATA CAA ATC CAG CAC GCT CT	
<i>pvl</i>	<i>pvl-F</i>	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC	433
	<i>pvl-R</i>	GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC	
<i>etaA</i>	<i>etaA-F</i>	CTA GTG CAT TTG TTA TTC AA	119
	<i>etaA-R</i>	TGC ATT GAC ACC ATA GTA CT	
<i>mecA</i>	<i>mecA-F</i>	ACT GCT ATC CAC CCT CAA AC	163
	<i>mecA-R</i>	CTG GTG AAG TTG TAA TCT GG	
<i>Tsst</i>	<i>tsst-F</i>	ATG GAC GAC TCA GCT TGA TA	350
	<i>tsst-R</i>	TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	
<i>ermA</i>	<i>ermA-F</i>	AAG CGG TAA ACC CCT CTG A	190
	<i>ermA-R</i>	TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC	
<i>ermB</i>	<i>ermB-F</i>	CTA TCT GAT TGT TGA GAA GGA TT	142
	<i>ermB-R</i>	GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA	
<i>ermC</i>	<i>ermC-F</i>	AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT	299
	<i>ermC-R</i>	TAA TCG TGG AATACG GGT TTG	

Çizelge 3.2. *P.aeruginosa* için, multiplex PCR’da kullanılan primer dizileri

Primer	Hedef gen	Primer dizisi (5'-3')	Fragment boyutu (bp)
<i>tetK</i>	<i>tetK-F</i>	GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT	360
	<i>tetK-R</i>	GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA	
<i>tetM</i>	<i>tetM-F</i>	AGT GGA GCG ATT ACA GAA	158
	<i>tetM-R</i>	CAT ATG TCC TGG CGT GTC TA	
<i>ampC</i>	<i>ampC-F</i>	CGG CTC GGT GAG CAA GAC CTT	200
	<i>ampC-R</i>	AGT CGC GGA TCT GTG CCT GGT	

Stafilokoklar için; PCR karışımı 25 µl olarak ayarlanarak (Çizelge 3.3, 3.4 ve 3.5) aşağıdaki thermal cyclus döngülerinde amplifikasyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.6, 3.7 ve 3.8)

Çizelge 3.3. Enterotoksin genleri için (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*) için PCR karışımları.

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 3.4. *EtaA*, *mecA* ve *TST* gen bölgeleri için PCR karışımları.

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Distile su	14.75µl
Buffer	2.5µl
dNTP	0.5µl
Taq DNA Polimeraz	0.25µl
MgCl ₂	1.5µl
P1-F	0.5µl
P1-R	0.5µl
P2-F	0.5µl
mecA-R	0.5µl
P2-R	0.5µl
P3-F	0.5µl

P3-R	0.5µl
Genomik DNA	2µl
Toplam	25µl

Çizelge 3.5. *Pvl*, *femA* ve *femB* gen bölgeleri için PCR karışımları.

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Distile su	15.25µl
Buffer	2.5µl
dNTP	0.5µl
Taq DNA Polimeraz	0.25µl
MgCl ₂	1.5µl
P1-F	0.5µl
P1-R	0.5µl
P2-F	0.5µl
P2-R	0.5µl
P3-F	0.5µl
P3-R	0.5µl
Genomik DNA	2µl
Toplam	25µl

Çizelge 3.11 *ErmA*, *ermB* ve *ermC* gen bölgeleri için PCR karışımları.

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Distile su	11.5
Buffer	2.5µl
dNTP	0.5µl
Taq DNA Polimeraz	1µl
MgCl ₂	2.5µl
P1 F	1 µl
P1 R	1 µl
P2 F	1 µl
P2 R	1 µl
P3 F	1 µl
P4 R	1 µl
Genomik DNA	1µl
Toplam	25µl

Çizelge 3.6. Enterotoksin genleri için (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*) ısı döngüleri

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	94 °C	4 dk.	
2	Denatürasyon	94 °C	45 sn.	} 30 siklus
	Bağlanma (Annealing)	60 °C	1 dk.	
	Uzama	72 °C	1 dk.	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.	
4	Bekleme	+4 °C	∞	

Çizelge 3.7. *EtaA*, *mecA* ve *TST* gen bölgeleri için ısı döngüleri.

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	94 °C	5 dk.	
2	Denatürasyon	94 °C	30 sn.	} 30 siklus
	Bağlanma (Annealing)	60 °C	30 sn.	
	Uzama	72 °C	1 dk.	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.	
4	Bekleme	+4 °C	∞	

Çizelge 3.8. *Pvl*, *femA* ve *femB* gen bölgeleri için ısı döngüleri.

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	94 °C	4 dk.	
2	Denatürasyon	94 °C	45 sn.	} 30 döngü
	Bağlanma (Annealing)	60 °C	1 dk.	
	Uzama	72 °C	1 dk.	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.	
4	Bekleme	+4 °C	∞	

Çizelge 3.9. *EmA*, *ermB* ve *ermC* gen bölgeleri için ısı döngüleri.

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	94 °C	4 dk.	
2	Denatürasyon	94 °C	1 dk.	} 30 siklus
	Bağlanma (Annealing)	60 °C	1 dk.	
	Uzama	72 °C	50 sn.	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.	
4	Bekleme	+4 °C	∞	

P.aeruginosa için; PCR karışımı 25 µl olarak ayarlanarak (Çizelge 3.7, 3.8, 3.9) aşağıdaki thermal cyclus döngülerinde amplifikasyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.10, 3.11, 3.12).

Çizelge 3.10. *AmpC* gen bölgesi için PCR karışımı

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Distile su	16.50
Buffer	2.5µl
dNTP	1µl
Taq DNA Polimeraz	0.5µl
MgCl ₂	1.5µl
P1 F	0.5 µl
P1 R	0.5 µl
Genomik DNA	2µl
Toplam	25µl

Çizelge 3.11. *TetK* ve *tetM* gen bölgeleri için PCR karışımları.

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Distile su	13.5
Buffer	2.5µl
dNTP	0.5µl
Taq DNA Polimeraz	1µl
MgCl ₂	2.5µl
P1 F	1 µl
P1 R	1 µl
P2 F	1 µl
P2 R	1 µl
Genomik DNA	1µl
Toplam	25µl

Çizelge 3.12. *AmpC* gen bölgesi için ısı döngüleri.

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	94 °C	4 dk.	
2	Denatürasyon	94 °C	1 dk.	} 30 siklus
	Bağlanma (Annealing)	60 °C	1 dk.	
	Uzama	72 °C	50 sn.	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.	
4	Bekleme	+4 °C	∞	

Çizelge 3.13. *TetK* ve *tetM* gen bölgeleri için ısı döngüleri

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	94 °C	4 dk.	
2	Denatürasyon	94 °C	45 sn.	} 30 siklus
	Bağlanma (Annealing)	60 °C	1 dk.	
	Uzama	72 °C	1 dk..	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.	
4	Bekleme	+4 °C	∞	



Şekil 3.3. PCR amplifikasyonunda kullanılan ısı döngü (Thermal cycler, Techne Flexigene, İngiltere) cihazı.

3.6. 50X TAE Elektrophorez Tamponu: 1 litre

- 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.

3.7. Yükleme (Loading) Tamponu (6X)

- 40 gr sükröz
- 0.25 gr Bromfenol mavisı

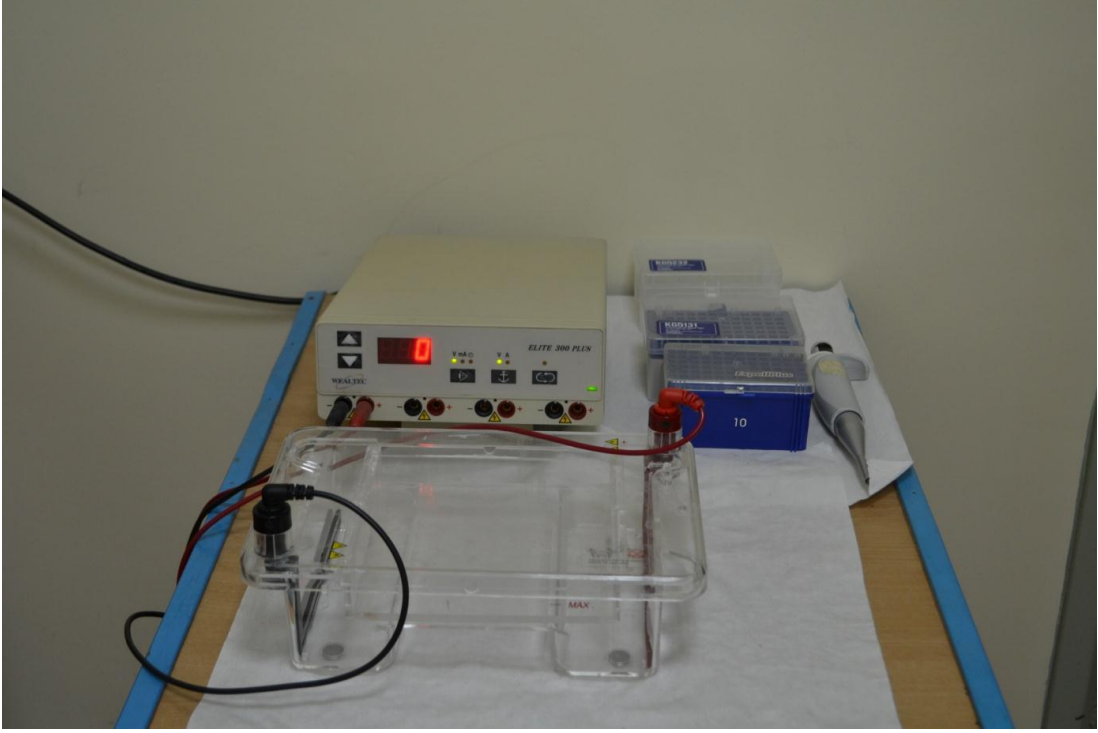
Yukarıda miktarları verilen maddeler karıştırılarak 100 ml olacak şekilde distile su içinde çözdürüldü. Porsiyonlanarak -20 °C'de muhafaza edildi.

3.8. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrophorezi Tekniđi ile Görüntülenmesi

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

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

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.



Şekil 3.4. Elektroforez ünitesi

1. Elektroforez için stok TAE solüsyonundan 1xTAE olacak şekilde distile su ile dilüe edildi.
2. 2 gr agaroz tartılarak 100 ml'lik bir erlenmayere konuldu, 100 ml 01X TAE tamponu eklendi (%2'lük agaroz) ve 10 mg/ml'lik etidyum bromid'den 10 µl ilave edildi.
3. Mikrodalga fırında 1-2 dk kaynatıldı.
4. Elektroforez tarakları jel dökme kabına, tabanda 1mm boşluk kalacak şekilde ayarlanarak yerleştirildi.
5. Yaklaşık 60° C'ye kadar soğutulan agaroz jeli, jel kabına dökülüp donması için oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
6. Taraklar dikkatlice çıkartılarak jel kabı elektroforez tankına (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD) yerleştirildi (Şekil 3.4).
7. Amplifiye edilen örneklerden 10'ar µl 3µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jelde açılan kuyucuklara yerleştirildi.
8. Yükleme sırasında DNA marker (100 bp'lik, Fermentas) kullanıldı.
9. Jele elektrik akımı (15 Volt/cm) verilerek 15 dk elektroforez yapıldı.

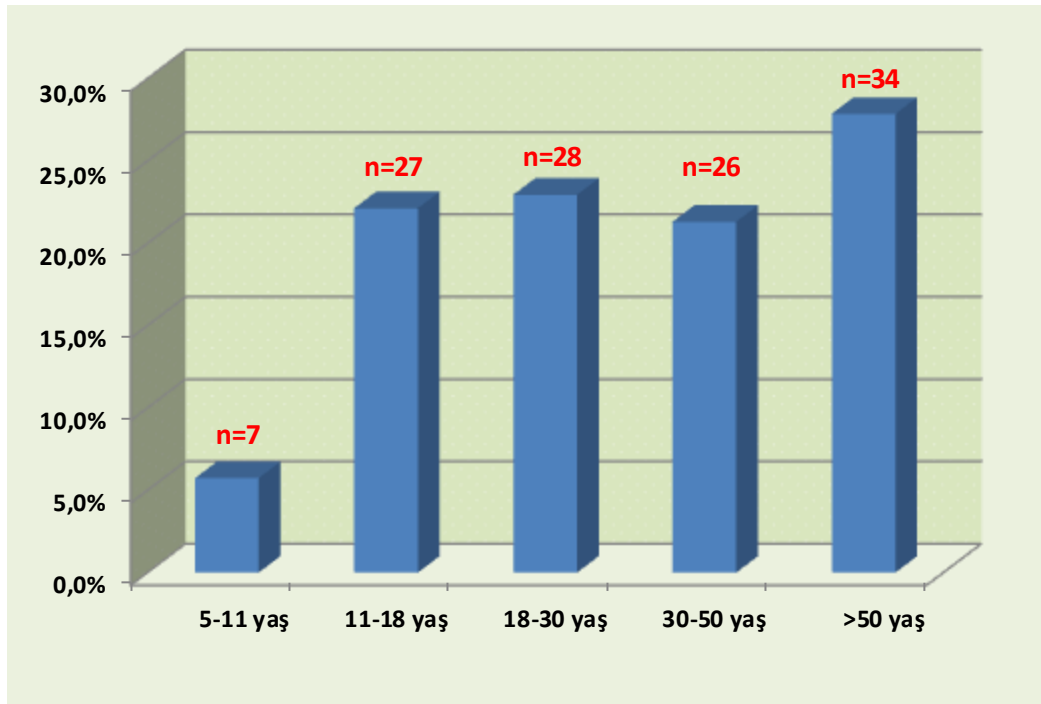
10. Yaklaşık 30 dk sonra yürütme işlemi durdurularak jel görüntüleme cihazı (Wealtec, Dolphin-View, ABD) ile bantların varlığı incelendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Görüntüleme (UV Translimunatör) cihazı.

4. BULGULAR

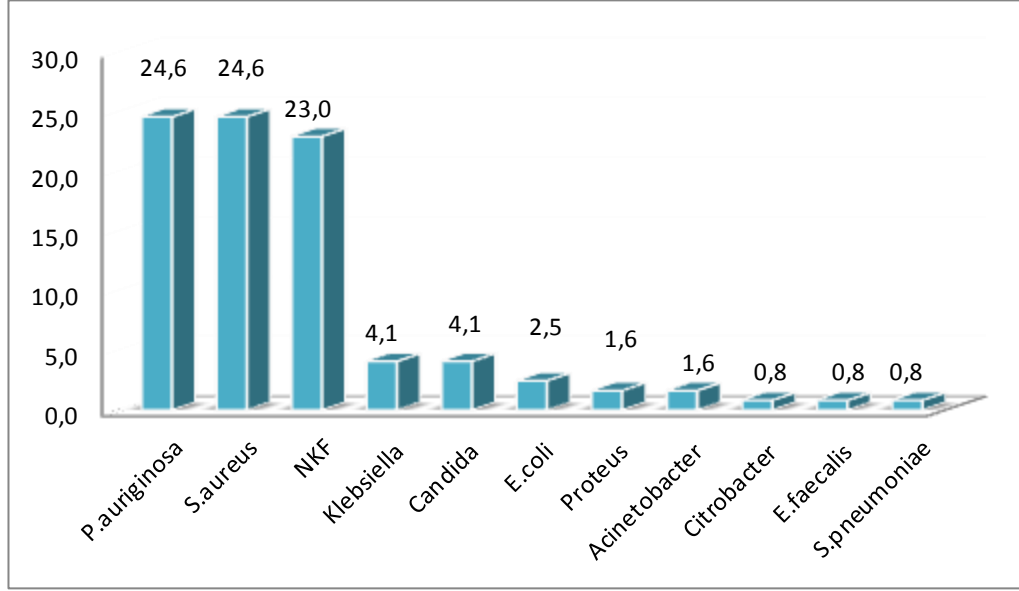
Çalışmaya dahil edilen otitis media tanılı hastaların yaş aralığı 5-83 olup, yaş ortalaması 34.8 ± 19.9 idi. Hastaların 7'si (%5.7) 5-11, 27'si (%22.1) 11-18, 28'si, (%23.0) 18-30, 26'sı (%21.3) 30-50 ve 34'ü (%27.9) ise 50 yaşından büyük idi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Hastaların Yaş Gruplarına Göre Dağılımı.

Çalışmada toplam 122 hastadan alınan kulak akıntı örneklerinin 28'inde (%22.95) normal kulak florası ürediği, 14'ünde (%22.13) üreme olmazken, toplam 60(%49.18) hastanın kulak örneklerinde etken olduğu tespit edilen patojen mikroorganizma üremesi tespit edildi. Bu patojen mikroorganizmaların dağılımı incelendiğinde kronik otitis media klinik tanılı 122 örnekten %24.6 (30/122)'sında *Stafilokok* cinsi (21(%70) *S.aureus* ve 9(%30) *Koagülaz negatif stafilokok*) izole edilirken, %24.6 (30/122)'sında da *P.aeruginosa* izole edildi. Bu patojenler dışındaki etken mikroorganizmaların %4.1 (5/122)'inde *Klebsiella pneumoniae*, %4.1 (5/122)'inde *Candida albicans*, %2.4 (3/122)'ünde *E.coli*, %1.6 (2/122)'sında *Proteus vulgaris*, %1.6 (2/122)'sında *Acinetobacter baumannii*, %0.8

(1/122)'inde *Citrobacter* cinsi, %0.8 (1/122)'inde *E.faecalis* ve % 0.8 (1/122)'inde de *S.pneumoniae* olarak tespit edildi (Şekil 4.2).



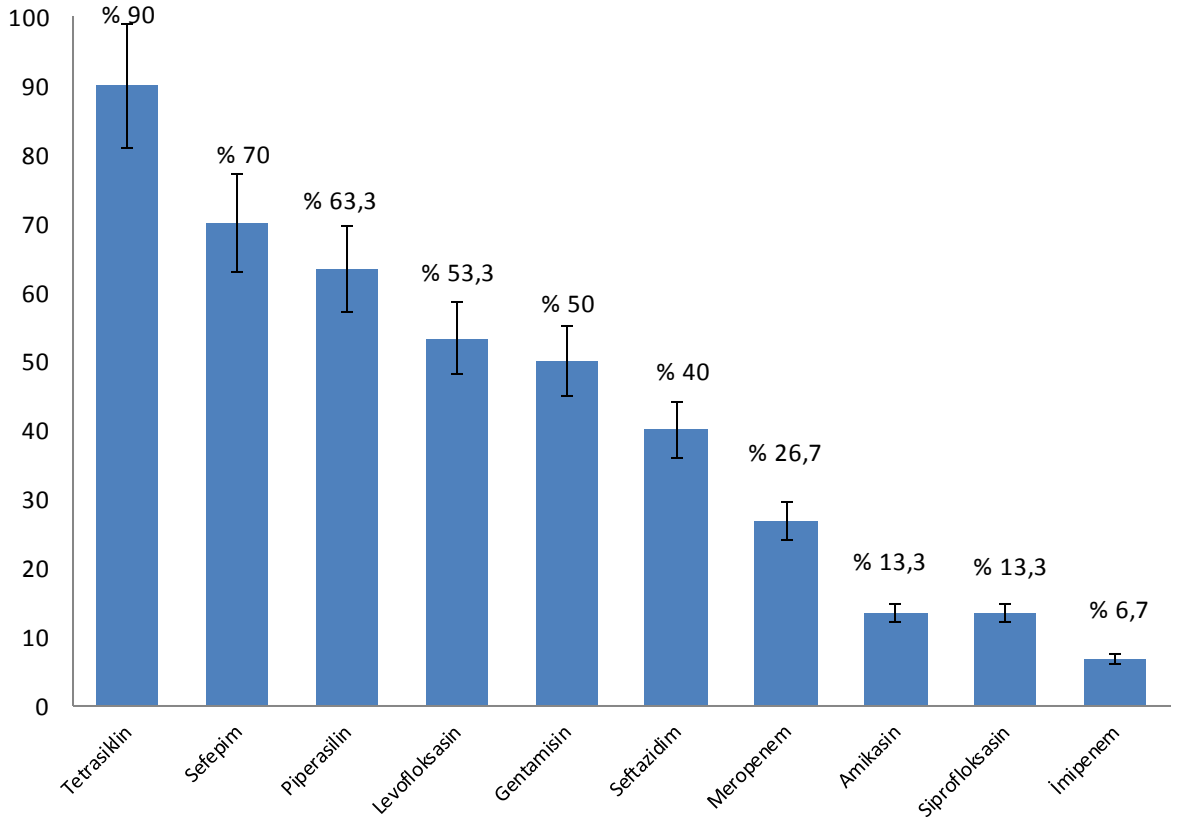
Şekil 4.2. İzole edilen etken mikroorganizmaların dağılımı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmada; *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında amikasin, meropenem, siprofloksasin, levofloksasin, imipenem, piperasilin, gentamisin, sefepim, seftazidim ve tetrasiklin duyarlılıkları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çalışmada en düşük direnç oranı imipeneme karşı (%6.7) olarak bulunurken, bunu %13.3'lük oranla amikasin ve siprofloksasin direnç oraları takip etmektedir. Bu antimikrobiyalleri %26.7'lik direnç oranı ile meropenem ve %40'luk direnç oranı ile seftazidim izlemektedir. *P.aeruginosa* kökenlerinde en yüksek direnç ise %90'luk oran ile tetrasikline karşı elde edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde MİK değerleri ve direnç oranları.

Antibiyotik	MİK Değerleri µg/ml	<i>P.aeruginosa</i> n=30	
		Sayı	(%)
Amikasin	2-32	4	13.3
Meropenem	0.25-4	8	26.7
Siprofloksasin	0.25-4	4	13.3
Levofloksasin	0.25-8	16	53.3
İmipenem	1-2	2	6.7
Piperasilin	4-32	19	63.3
Gentamisin	1-16	15	50.0
Sefepim	1-16	21	70.0
Seftazidim	1-16	12	40.0
Tetrasiklin	4-32	27	90.0

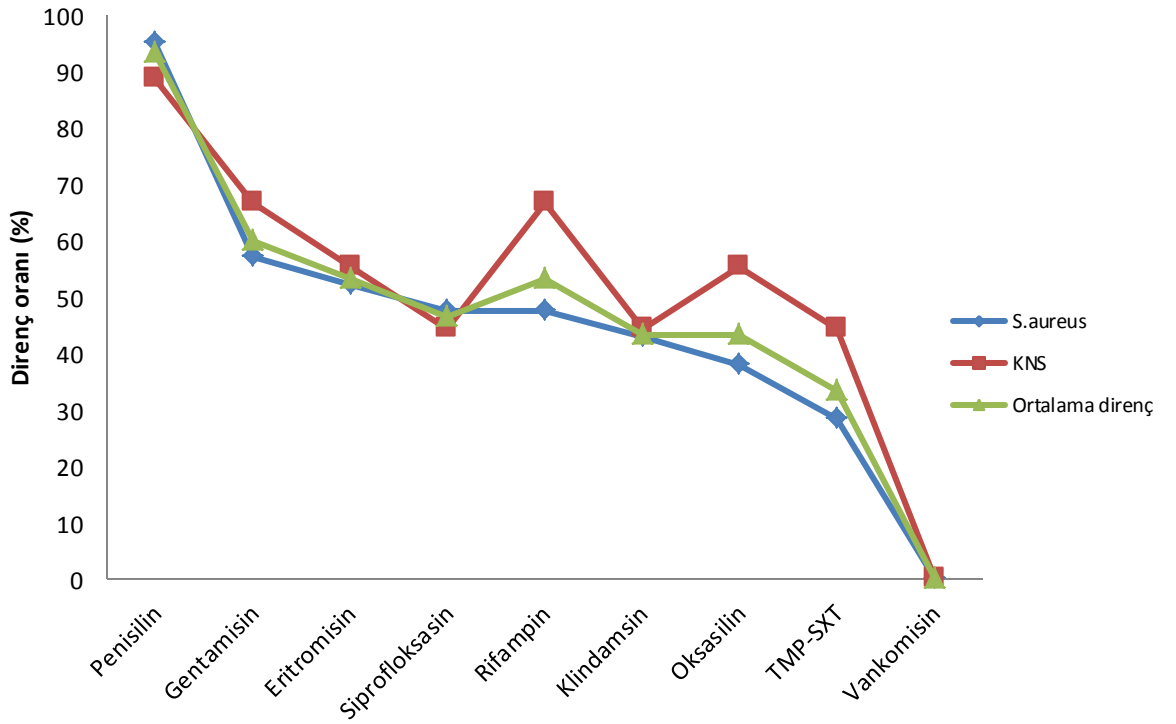


Şekil 4.3. *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç oranları (%).

Kronik otitis medialı hastaların kulak akıntı ve sürüntü örneklerinden izole edilen stafilokok kökenlerinde oksasilin, klindamsin, eritromisin, siprofloksasin, vankomisin, penisilin, gentamisin, TMP-SXT ve rifampine karşı direnç profilleri değerlendirildi. Test edilen antibiyotiklerden TMP-SXT'ye %33.3 (10/30), oksasilin ve klindamisine %43.3 (13/30), siprofloksasine 46.7 (14/30), eritromisin ve rifampine %53.3 (16/30), gentamisine %60.0 (18/30) ve penisiline de %93.3 (28/30) oranında direnç saptanırken, suşların tamamının vankomisine karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir. Çalışmada tüm suşların PZR yöntemi ile *mecA* geni taşıdığı tespit edilmesine rağmen, fenotipik olarak 13 (%46.7) izolatin oksasiline dirençli olduğu tespit edilmiştir. Stafilokok kökenlerinin antibiyotik duyarlılıkları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Staflokok kökenlerinde MİK değerleri ve direnç oranları.

Antibiyotik	MİK Değerleri µg/ml	<i>S.aureus</i>	KNS	Toplam
		n=21	n=9	n=30
		Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Oksasilin	0.25-32	8 (38.1)	5 (55.6)	13 (43.3)
Klindamsin	0.25-2	9 (42.9)	4 (44.4)	13 (43.3)
Eritromisin	0.25-8	11 (52.4)	5 (55.6)	16 (53.3)
Siprofloksasin	0.25-4	10 (47.6)	4 (44.4)	14 (46.7)
Vankomisin	0.25-1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Penisilin	0.125-0.5	20 (95.2)	8 (88.9)	28 (93.3)
Gentamisin	0.25-16	12 (57.1)	6 (66.7)	18 (60.0)
TMP-SXT	0.5-4	6 (28.6)	4 (44.4)	10 (33.3)
Rifampin	0.25-0.5	10 (47.6)	6 (66.7)	16 (53.3)

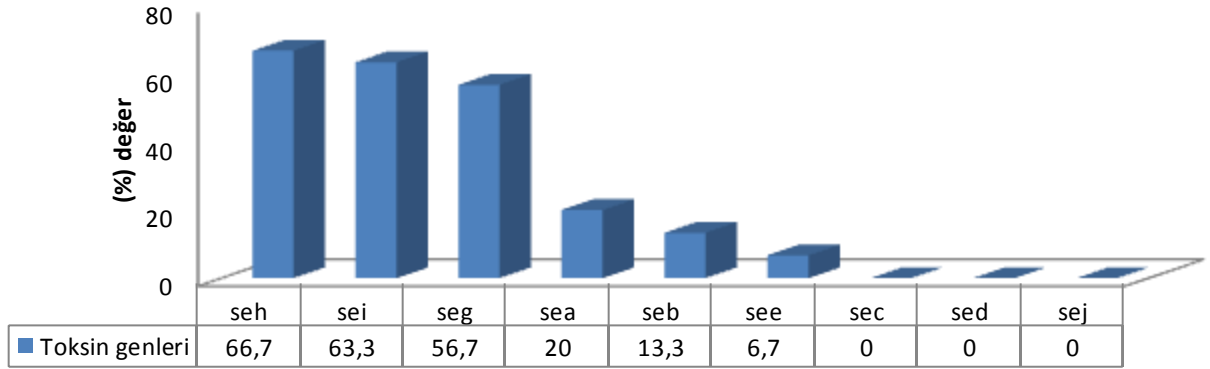


Şekil 4.4. Staflokok suşlarının antibiyotik direnç profilleri

Çizelge 4.3. *S.aureus* kökenlerinde eritromisin direnci ile *erm A*, *erm B* ve *erm C* direnç genleri arasındaki ilişki.

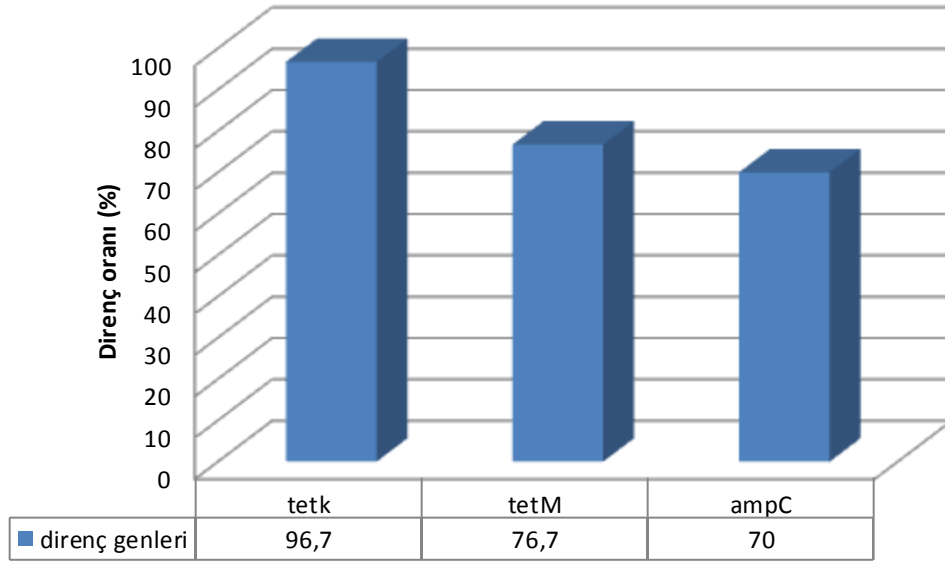
Stafilokok kökenleri	Fenotipik yöntemle eritromisin direnci	Eritromisin direnç genlerinin dağılımı			PCR ile negatif köken sayısı
		<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	
<i>S.aureus</i>	11 (dirençli)	6	4	1	0
<i>S.aureus</i>	10 (duyarlı)	2	1	0	7
KNS	5 (dirençli)	3	2	0	0
KNS	4 (duyarlı)	1	1	0	2
	Toplam	14	7	1	10

Kulak örneklerinden tanımlanmış 30 stafilokok kökeninin 6 (%20)'sında *sea*, 4 (%13.33)'ünde *seb*, 2 (%6.67)'sinde *see*, 17 (%56.67)'sinde *seg*, 20 (66.67)'sinde *seh*, 19 (%63.33)'ünde *sei* ve 30 (%100)'ünde de *mecA* geni açısından pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 4.5). Ayrıca, 21 *S.aureus* izolatının 17 (%81.0)'sinin *pvl* (panton valentine leukocidin) geni açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada *S.aureus* kökenleri arasında *etaA*, *fem A*, *femB* ve *tsst* genleri negatif bulunurken, hem *S.aureus* hem de KNS kökenleri arasında *sec*, *sed* ve *sej* genlerine rastlanmamıştır.

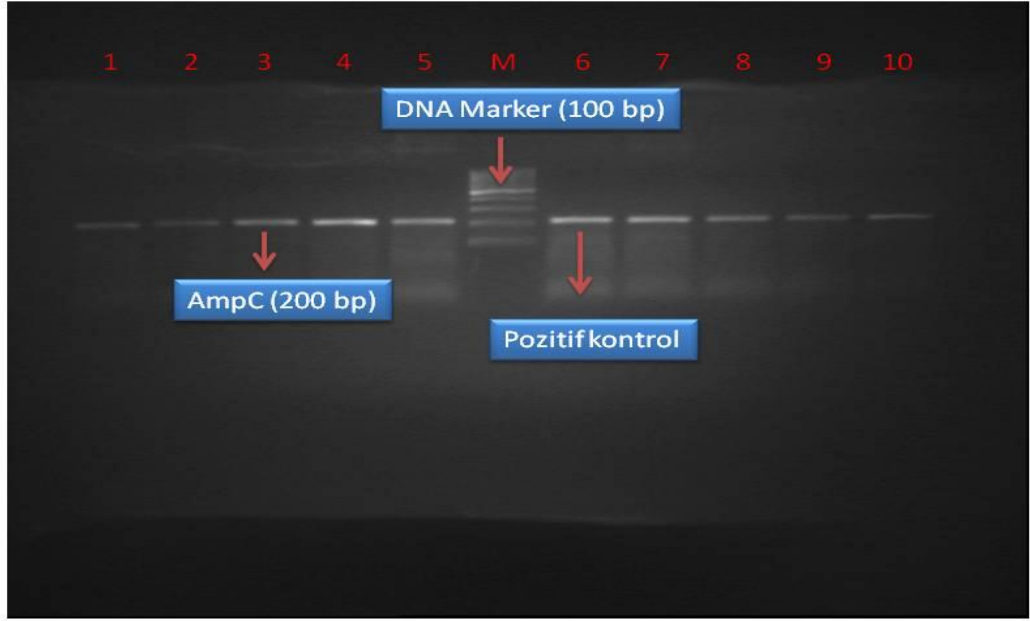


Şekil 4.5. Stafilokok izolatlarında *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* ve *sej* genlerinin dağılımı.

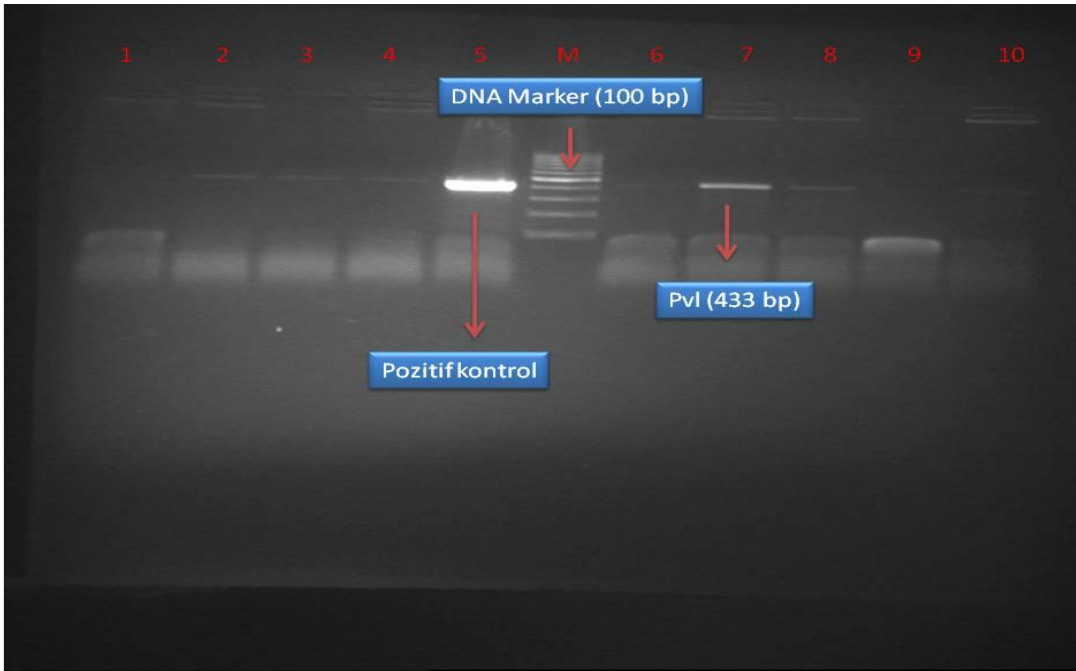
Çalışmada *P.aeruginosa* kökenleri arasında *tetK* geni varlığı 29 kökünde (%96.7) tespit edilirken, *tetM* geni varlığı ise *P.aeruginosa* kökenlerinin 23 (%76.7)'ünde tespit edilmiştir. Fenotipik olarak *P.aeruginosa* kökenlerinde direnç oranı %90 olarak tespit edilmesine rağmen tetrasiklin direncinden sorumlu gen varlığı daha yüksek oranda bulunmuştur. İdentifiye edilen 30 *P. aeruginosa* izolatının 21 (%70)'inde ise *ampC* geni pozitif olarak bulunmuştur (Şekil 4.7).



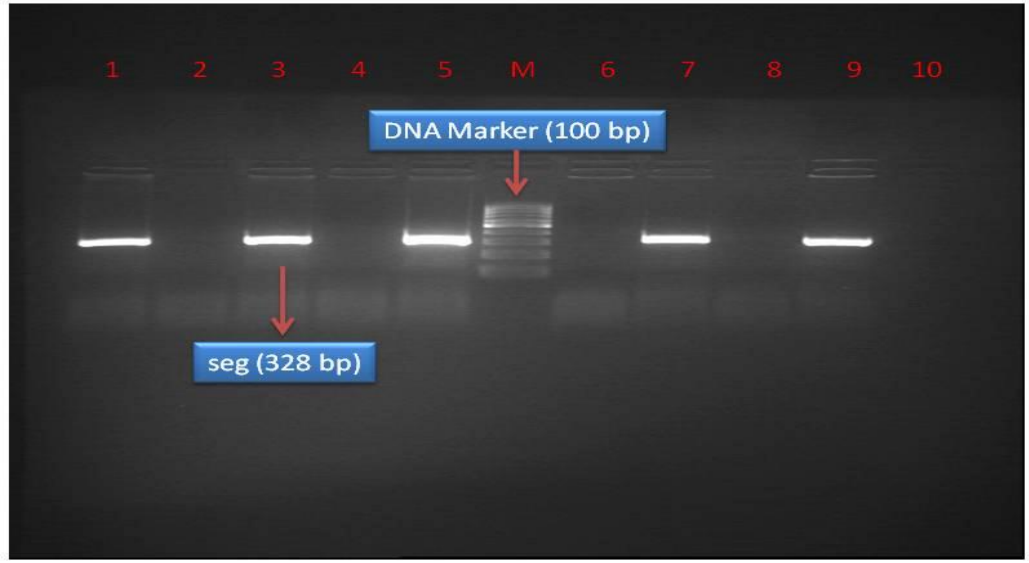
Şekil 4.6. *P. aeruginosa* izolatlarında *tetK*, *tetM*, *ampC* genlerinin dağılımı.



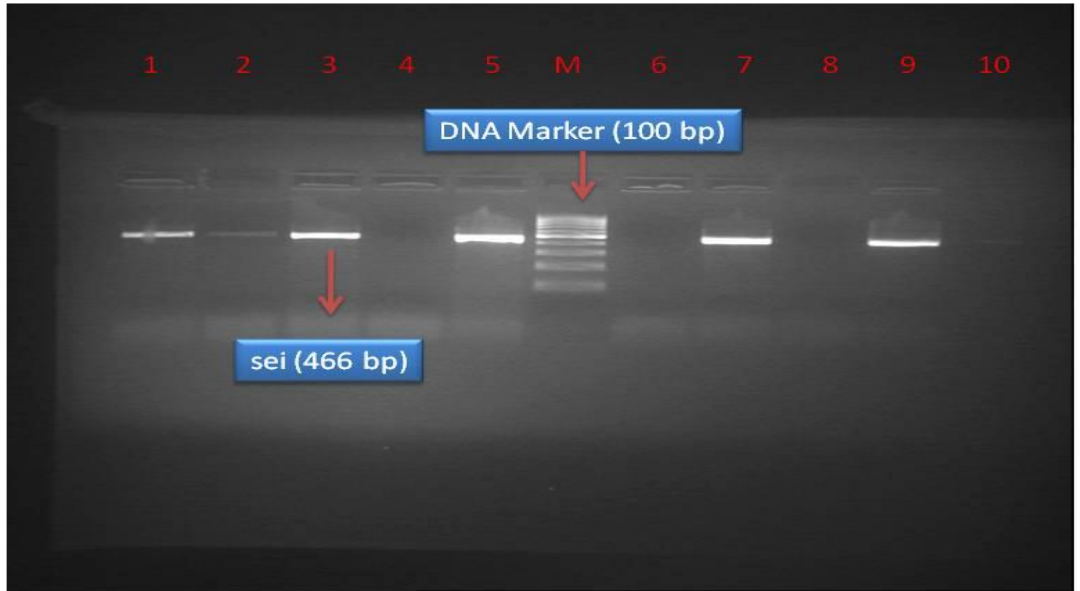
Şekil 4.7. *AmpC* geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü M: 100 bp DNA Ladder. *AmpC* (200 bp): 1-5 ve 7-10; pozitif örnekler. 6; pozitif kontrol.



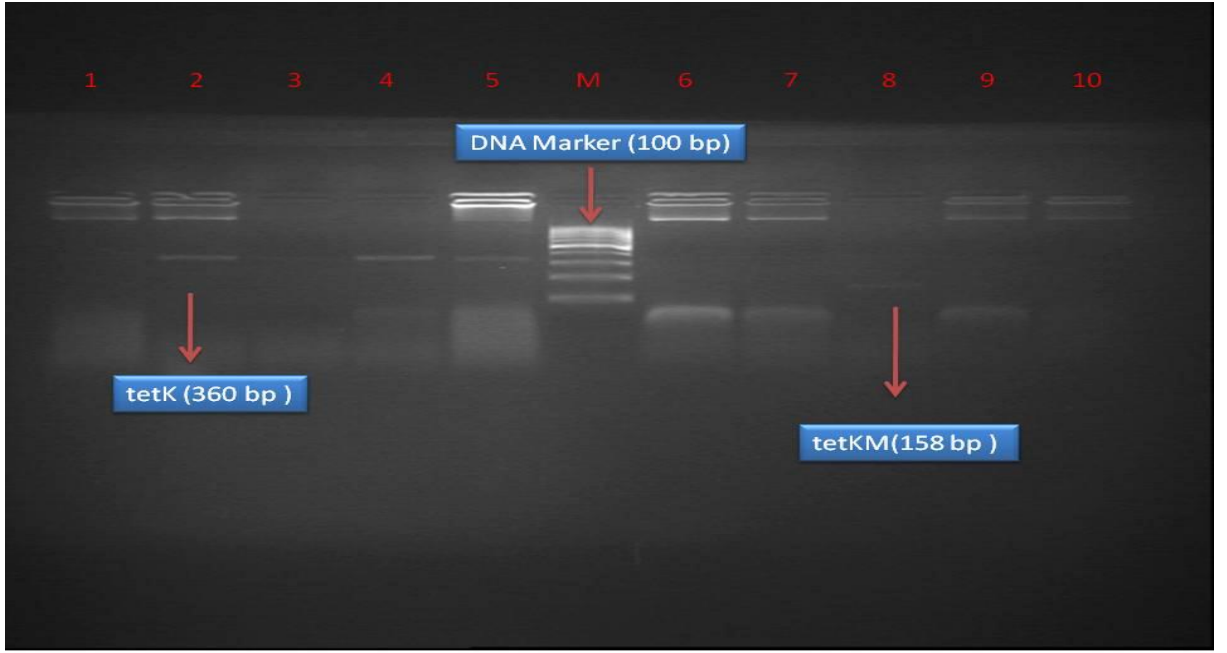
Şekil 4.8. *PVL* geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü M: 100 bp DNA Ladder. 2-4 ve 6. 7. 8. ve 10: *pvl*(433 bp) pozitif örnekler; 5: pozitif kontrol,1. ve 9; negatif örnekler.



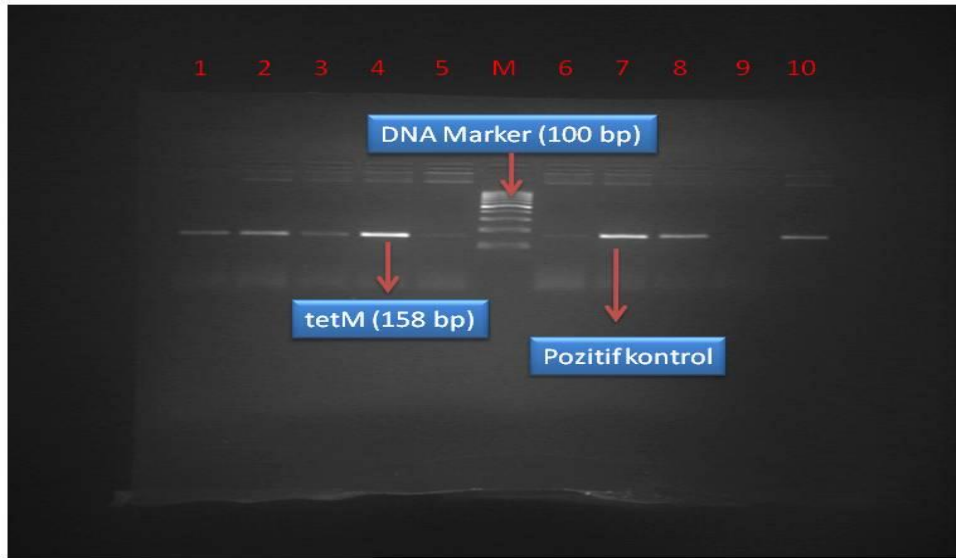
Şekil 4.9. *Seg* geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü M: 100 bp DNA Ladder. 1, 3, 5, 7 ve 9: *seg* (328 bp) pozitif örnekler; 2, 4, 6, 8 ve 10: negatif örnekler.



Şekil 4.10. *Sei* geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü M: 100 bp DNA Ladder. 1, 2, 3, 5, 7 ve 9: *sei* (466 bp) pozitif örnekler; 4, 6, 8 ve 10: negatif örnekler.



Şekil 4.11. *TetK* ve *tetM* genlerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü M: 100 bp DNA Ladder. 2, 3, 4 ve 5: *tetK* (360 bp) pozitif örnekler; 1 ve 6-10 negatif örnekler. 8: *tetM* (158 bp) pozitif örnek; 1-5 ve 6, 7, 9 ve 10 negatif örnek



Şekil 4.12. *TetM* geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agarozjel elektroforezi görüntüsü M: 100 bp DNA Ladder. 1, 2, 3, 4, 8 ve 10: *tetM* (158 bp) pozitifler; 7: pozitif kontrol; 5, 6 ve 9: negatif örnekler.

5.TARTIŞMA

İnsanlar ve hayvanlardaki antibiyotik direncinin en önemli sebeplerinden biri aşırı ve gereksiz antibiyotik kullanımınıdır. Gerek hastane ve gerekse de toplum kökenli dirençli bakterilerin yayılmasındaki önemli risk faktörleri arasında nüfus yoğunluğu, düşük hijyen koşulları ve enfeksiyon kontrol uygulamalarının yetersizliği sayılabilmektedir.

KSOM orta kulak kavitesinde ve mastoid çıkıntısındaki geri dönüşümsüz inflamatuvar değişikliklerle karakterizedir. Pürülan otore KSOM'lu hastalarda sık görülen semptomlardan biridir. KSOM, genellikle rekürren otoreyle ilişkili, timpanik membranın kalıcı perforasyonu ile beraber orta kulak ve mastoid çıkıntısının kronik inflamasyonu ile seyrederek. Muköz membranda inatçı pürülan akıntı ülşerleme, polipoid ve granüloma yol açabilir. Uzun süreli enfeksiyonlar demineralizasyon ve osteoklastik aktivite ile beraber seyreden kulak kemikçikleri ile mastoid kemiğin rezorpsiyonuyla ilişkili olabilmektedir.

Stafilokoklar özellikle metisilin dirençli stafilokoklar KSOM'un en önemli etkenleri arasında yer almaktadır. İlk kez MRSA suşlarının izole edildiği 1961 tarihinden günümüze kadar hastane kökenli MRSA izolatlarının oranının artarak devam ettiği bildirilmektedir. (Jevons 1961). Günümüze kadar yapılan çeşitli çalışmalarda metisilin direncinin %2'den %70'lere kadar değiştiğini bildirilmiştir (Lowy 1998, Park et al 2008). Otore vakalarında yapılan çalışmalarda MRSA insidansında ise sürekli bir artıştan söz edilmektedir (Suh et al 1998, Hunt ve Robb 2006). Örneğin; KSOM'lu hastalar arasında Japonya'da yapılan bir çalışmada MRSA insidansının %22 ve Tayvan'da yapılan başka bir çalışma ise %25 olduğu bildirilmiştir (Furukawa et al 2008, Hwang et al 2002). Kore'de MRSA insidansı konusunda yapılan çalışmalarda 1950'li yıllardan günümüze kadar izole edilen *S.aureus* suşlarında metisilin direncinin %70'lere kadar çıktığı bildirilmiştir. (Park et al 2008).

Metisilin direnci stafilokokların önemli virülens faktörleri arasında yer alır. Stafilokok enfeksiyonları, özellikle metisilin dirençli stafilokoklar tarafından oluşturulan enfeksiyonlar ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Stafilokoklar hücre duvarında trans peptidaz aktivitesine

sahip penicillin binding protein (PBP) olarak isimlendirilen bir proteine sahiptir. Bu proteinler hücre duvarı sentezinde kilit rol oynar ve beta-laktam grubu antibiyotikler için hedefirler. Metisilin dirençli stafilocoklar PBP2 ya da PBP2' olarak adlandırılan beta laktam grubu antibiyotiklere düşük affiniteli bir modifiye PBP üretirler. Metisilin direncine *mecA* geni aracılık eder. *MecA* geni metisilin dirençli stafilocoklarda görülen PBP2a üretiminden sorumludur. Metisilin dirençli stafilocoklar hastane infeksiyonlarının başlıca sorumlularındandır. Fakat son yıllarda toplum kökenli suşlarda da yüksek metisilin direnç oranlarına rastlanılmaktadır. Metisilin dirençli suşlarda diğer antibiyotiklere direnç, metisilin duyarlı suşlardan daha yüksek olduğundan, morbidite ve mortalitede metisilin dirençli kökenlerin sebep olduğu infeksiyonlarda daha yüksektir. Günümüzde metisiline dirençli stafilocoklarda birçok antibiyotiğe yüksek oranda direnç görülmektedir.

Stafilocoklarda metisilin direnci kromozomal *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Sadece metisiline dirençli izolatlarda bu gen bulunmaktadır. *MecA* geni dirençli suşlardan duyarlı suşlara kolayca aktarılabilmektedir. MRSA yayılımının önüne geçilebilmesi için MRSA infeksiyonlarının doğru ve erken tanısının son derece önemli olduğu bildirilmiştir (Hamid et al 2011). Metisilin dirençli kökenlerin oluşturduğu infeksiyonların tedavisi oldukça zor ve maliyetlidir. Bu yüzden metisiline dirençli stafilocokların hızlı ve doğru tanısının yapılması son derece önemlidir.

Metisilin direnç geninin (*mecA*) ülkemizde klinik izolatlar arasında yapılan çeşitli çalışmalarda oldukça yüksek oranlarda olduğu bildirilmiştir(Çiftçi ve ark 2009). Duran ve ark.'nın 2012 yılında çeşitli klinik izolatlardan elde ettikleri stafilocoklar arasında yaptıkları bir çalışmada ise *mecA* geni varlığını *S.aureus* ve *S.epidermidis* kökenleri arasında sırasıyla %25.9, %29.6 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da Duran ve ark.'larının yaptıkları çalışmaya benzer şekilde koagülaz negatif suşlar arasında metisilin direnci daha yüksek bulunmuştur.

Japoni ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise klinik örneklerde *mecA* geni varlığının metisilin direncinin %43'lere kadar çıktığı bildirilmiştir (Japoni Eet al 2004). Bizim çalışmamızda ise *mecA* geni varlığını %43.3 olarak tespit ettik. *MecA* varlığının Duran ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmadan daha yüksek bulunmasının sebebinin çalışmada hastane kökenli izolatların kullanılmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Stafilokokların neden olduğu infeksiyonların kontrol ve tedavisinde uygun antibiyotiğin seçilmesi çok önemlidir. Özellikle çok ilaca dirençli olmalarıyla bilinen metisilin dirençli suşlarda metisilin direncinin hızlı ve doğru olarak tespit edilmesi tedavideki başarı açısından son derece önemlidir. Metisilin direncinin genotipik olarak belirlenmesi son derece önemlidir. Çalışmamızda metisilin direnç geninin varlığı genotipik yöntemle %100 olarak bulunurken fenotipik yöntemle %43.3 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda genotipik yöntemle (PCR yöntemi) *mecA* direnç geni varlığı ile fenotipik yöntemle metisilin direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı derece farklı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Metisilin direnci homojen ve heterojen direnç olarak iki farklı şekilde görülür. Heterojen dirençli suşlarda *mecA* geni eksprese olmadığından dirençli olan suş duyarlı olarak tespit edilebilmekte ve sonuçta yanlış tedavi edilebilmektedir. Bu tür direncin tespit edilmesinde en doğru yöntem PCR yöntemi ile *mecA* geninin varlığının gösterilmesidir (Chambers et al 1997) Stafilokoklarda metisilin direncinin yanlış belirlenmesi tedavi başarısızlıklarına ya da gereksiz glikopeptid grubu antibiyotiklerin kullanımına neden olmaktadır. Bunun neticesinde de glikopeptid grubu ilaçlara direnç gelişimi tetiklenmektedir (Skulnick et al 1996, Chambers et al 1997).

Fenotipik yöntemlerin bir diğer handikapı ise inokülasyon miktarının yanlış sonuçlara yol açabileceğidir. İnokülasyon miktarının fenotipik olarak direnç belirleme çalışmalarında yanlışlıklara yol açabileceği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Bozdoğan ve ark 2003).

Hastane infeksiyonlarının en yaygın sebeplerinden birisi MRSA'dır. Toplum kökenli MRSA infeksiyonlarının kronik hastalıklar ve rekürren antimikrobiyal tedavi gibi risk faktörleriyle yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir. (Crum et al 2006). Özellikle son yıllarda bilinen risk faktörleri olmaksızın yetişkin ve çocuklardaki toplum kökenli MRSA infeksiyonlarının prevalansında önemli artışlar olduğu bildirilmiştir (Saravolatz et al 1982, Herold 1982). Bunun yanında, son zamanlarda özellikle orta kulak operasyonlarından sonra MRSA infeksiyon insidansında artışlar olduğu bildirilmektedir. Sağlık personeli ile hastalar arasındaki karşılıklı bulaş riskinin araştırıldığı bir çalışmada sağlık çalışanları ve hastalardan nazal sürüntü örnekleri ile parmak ucu örnekleri alınmış, MRSA taşıyıcısı olan 12 sağlık çalışanı izolatu ile 6 otoreli hastadan izole suşlardan ribotipleme yöntemi ile 6 MRSA kökeninin aynı olduğu gösterilmiştir(Lee et al 2001). Bu çalışma sağlık personeli ve hastalar arasında MRSA bulaşının olabileceğini göstermektedir.

Timpanostomi tüpü yerleştirilmiş çocukların yaklaşık %30'unda akut otore geliştiği bildirilmektedir. Kış aylarında semptomatik özellikle 2 yaşın altındaki çocuklarda vakaların %40-45'inden *Haemophilus influenza* ve *Streptococcus pneumoniae*'nin sorumlu olduğu bildirilirken, vakaların %55-60'undan ise *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi dış kanaldaki patojenlerin sorumlu olduğu bildirilmiştir (nazofarenjiyal patojenlerin sorumlu olduğu infeksiyonlar genellikle kokusuzdur). *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın etken olduğu hastaların yaş olarak daha büyük hastalar olduğu ve semptomların genellikle yılın kış ayları dışındaki daha sıcak aylarda görüldüğü, akıntılarının ise daha kötü kokulu olduğu bildirilmektedir. Bunun sebebinin inflamatuvar yanıtı tetikleyen kulaktaki sudan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın KSOM'da etken olarak sıkça izole edilmesiyle ofloksosin ve siprofloksasin gibi topikal florokinolonlar tedavide sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Hatta küçük çocuklarda otik preparatların genellikle oral antibiyotiklere üstünlük sağladığı da düşünülmektedir. Çünkü bu ilaçların *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenlere karşı etkili oldukları ve orta kulakta yüksek konsantrasyon düzeylerine ulaşabildiği, sistematik olarak alınmadığından direnç gelişiminin az görüldüğü bildirilmektedir. Ancak son yıllarda CA-MRSA posttimpanostomi tüpü otoresinin artan prevalansı topikal kinolon tedavi stratejisini başarısızlığa uğratma eğilimindedir.

Genellikle pürülan otore tedavisi için topikal antibiyotikler tercih edilmektedir. Yapılan bir çalışmada topikal uygulanan siprofloksasinin *in-vitro* MRSA aktivitesinin iyi olduğu bildirilmiştir. Ancak florokinolon direncinin artması sebebiyle, siprofloksasin kulak damlalarını MRSA infeksiyonlarına etkili olmadığı bildirilmektedir(Jang et al 2004, Limoneu et al 2003)

Özellikle son zamanlarda siprofloksasin-dirençli MRSA otoreli hasta sayısında ciddi artışlar olduğu bildirilmiştir. Klindamisin, trimetoprim/sülfametaksazol, eritromisin ve tetrasiklinlere olan MRSA'ya karşı *in-vitro* olarak etkin görünebilseler de, bu antibiyotiklerin *in-vivo* etkinliği sorgulanmaktadır (Hussian et al 2000, Groom et al 2001).

Çalışmamızda KSOM vakalarından izole edilen stafilokların %70'inin *S.aureus* olduğu tespit edilmiştir. Stafilokok kökenlerinde metisilin direncinin oldukça yüksek olduğu tespit edilirken, koagülaz negatif kökenler arasında metisilin direncinin anlamlı

derecede daha yüksek olduğu görülmektedir ($p<0.01$). Bunun yanında çalışmada koagülaz negatif kökenler arasında klindamisin (%44.4, $p>0.05$) ve rifampin (%66.7, $p<0.05$), gentamisin (%66.7, $p>0.05$), ve eritromisin (%55.6, $p>0.05$) direnç oranlarının *S.aureus* kökenlerine nazaran daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge. 4.2.). Koagülaz negatif kökenlerin son yıllarda artan direnç oranlarıyla seyrettiğini görülmektedir. KSOM vakalarında etken olarak tespit edilen koagülaz negatif kökenleri antibiyotik test sonuçları baz alınarak önemle tedavi edilmelidir.

İntravenöz vankomisin MRSA otore için tek seçenek olduğunda, oral yolla verilemeyen antibiyotiklerin tedavi için uygun olmadığı kabul edilmektedir. Günümüzde ticari olarak tedarik edilemeyen vankomisin kulak preparatları, parenteral tedavi ile kıyaslandığında daha düşük dozlarda etkinlik sağladığı gösterilmiştir. Bir çalışmada ayaktan MRSA otoreli hastalarda vankomisin kulak solüsyonu hazırlanarak lokal tedavi uygulanmıştır. Çalışmada 25 mg/ml vankomisin konsantrasyonlu çalışma solüsyonu hazırlanmış, bu kulak damlası ile tedavi edilen tüm hastaların inatçı otore tedavisinde kesinlikle etkili olduğu bulunmuştur. Dilue sirke irrigasyonunun orta kulak ve dış kulak yolunda MRSA üremesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Günümüzde, bir dilue sirke solüsyonu kullanıldıktan sonra vankomisin kulak damlası tedavisi uygulanmaktadır. Hastalar kulak kanalının içine kulak damlasının yayılması için uygun şekilde kafa pozisyonu sağlaması hususunda bilgilendirilmelidir. Tedaviyi takiben, hastaların çoğunda akıntının tamamı ya da bir kısmı sona ererken, kulak kavitesi kurumakta ve 3-4 hafta içinde infeksiyonun ortadan kalktığı bildirilmektedir. Hastada akıntı devam etmesi durumunda, topikal vankomisinli kulak damlasının daha uzun süreli kullanılması önerilmektedir. Akıntı sona erdiğinde, lokal mupirosin tedavisi verilmelidir. MRSA otorede topikal mupirosin tedavisinin %40'ın üzerinde klinik etkinliğinin olduğu bildirilmiştir (Jang et al 2004, Frukawa et al 2008). Ancak, dilue kulak damlası ve topikal vankomisin uygulamasının, tek başına mupirosin tedavisinden daha iyi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu hastalarda trimetoprin/sülfametaksazol oral antibiyotik ve fusidik asit merhem tedavilerinin verilmesi de önerilmiştir. Fakat bu çalışmadaki incelenen hasta sayısının istatistiksel bir sonuç ortaya çıkması için yeterli olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca, bu tedavinin fusidik asit dirençli MRSA artışına da yol açabileceği düşünülmektedir (Walshe et al 2001).

Topikal vankomisin ve dilue sirke tedavisinden sonra hastaların çoğunda perforasyonla beraber orta kulak mukozasında bir kalınlaşmanın olduğu gözlenmiştir.

Timpanik membrana uygulanan mupirosin tedavisi, MRSA tedavisi için genellikle orta kulak mukozasını yumuşatmada kullanılmaktadır.

MRSA ilişkili deri ve yumuşak doku infeksiyonları için genellikle trimetoprim sülfametaksazol, linezolid veya intravenöz vankomisin etkilidir. Ancak; biyofilm oluşumu ve kan akışı olmadığında timpanostomi tüpünde olduğu gibi yabancı cisimlerin varlığında, tedavi devam etmediği zaman bu ajanlar etkisiz olmakta ve hastalık nüksetmektedir. Son zamanlarda yapılan yeni bir çalışmada. vankomisin ile linezolidin MIC değerlerinin arasındaki *in-vitro* etkinlikleri kıyaslanmış, izole edilen mikroorganizmaların tümünün her iki antibiyotiğe de duyarlı olduğu saptanmıştır (Kaleem et al 2011). Çalışmada vankomisinin MIC değerlerinin linezolidin MİK değerlerinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Linezolidin vankomisin dirençli *Staphylococcus aureus* (VRSA) tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Ancak, KSOM vakalarında VRSA ile karşılaştığı bildirilmemiştir. Timpanostomi tüpü kulağa sokulduktan sonra bakteriyel biyofilm oluşumu yüksek oranda otorenin sorumlusu olarak görülmüştür (Karlan et al 1980, Johnson et al 1990).

Pseudomonas aeruginosa, Gram negatif, aerob, tek kutuplu hareketli basillerdir(Ryan ve Ray 2004). Fırsatçı patojeni olan *Pseudomonas aeruginosa* sıklıkla steril olmayan bölgelerden (ağız çubuğu, balgam v.b.) izole edilmektedir ve bu şartlar altında genellikle kolonizasyon göstermekte ve infeksiyon oluşturmamaktadır. Steril olmayan örneklerden izole edilen *P.aeruginosa*, bu yüzden dikkatle yorumlanmalıdır. Steril vücut bölgelerinden izole edilmişse etken olarak değerlendirilerek tedavi edilmelidir. *P.aeruginosa*, çok sayıda antibiyotiğe doğal dirençlidir ve başarısız bir tedaviden sonra özellikle porin modifikasyonu ile ek bir direnç gösterebilmektedir. Ampirik olarak antibiyotik seçiminden ziyade laboratuvar duyarlılığına bağlı olarak tedavi verilmelidir.

P.aeruginosa, bu konuyla son derece ilişkili fırsatçı bir patojendir. *P.aeruginosa*'nın son derece rahatsız edici özelliklerinden biri, düşük antibiyotik duyarlılığını kapsamaktadır. Bu düşük duyarlılık; bakteriyel selüler kılıfın düşük permablitesi ve kromozomal kodlanmış antibiyotik dirençli genleri ile çoklu ilaç eflüks pompasıyla uyumlu bir duruma dayanmaktadır. Bu yapısal dirence ek olarak, *P.aeruginosa* kromozomla kodlanmış genlerin mutasyonu veya antibiyotik direnç determinantlarının horizontal gen transferi ile kolayca direnç kazanabilen bir mikroorganizmadır. *P.aeruginosa*'nın çoklu ilaca direnç geliştirmesi, farklı mutasyonların oluşu ve/veya

antibiyotik direnç genlerinin horizontal transferi edinimini içeren birkaç farklı genetik olayı gerektirmektedir. Hipermutasyon, kronik infeksiyona yol açan *P.aeruginosa*'daki mutasyon odaklı antibiyotik seçimini kolaylaştırmaktadır oysa ki, integronlardaki birkaç farklı antibiyotik direnç genlerinin kümelenmesi antibiyotik direnç determinantlarının birlikte edinimini kolaylaştırmaktadır. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, biyofilm formasyonu veya küçük koloni varyantların ortaya çıkmasıyla ilişkili olan fenotipik direncin, *P.aeruginosa*'nın antibiyotik tedavisine cevabında önemli olabileceğini göstermektedir (Cornelis 2008). Çalışmamızda KSOM vakalarından etken olarak izole edilen *P.aeruginosa* kökenlerinde en yüksek direnç terasikline karşı elde edilirken (%90; 27/30), bunu sefepim (%70; 21/30), piperasilin (%63.3; 19/30) ve levofloksasinin (%53.3; 16/30) takip ettiği tespit edilmiştir. Pseudomonas kökenlerinde en düşük direnç %6.7 (2/30)'lik bir oranla imipeneme karşı elde edilirken, bunu %13.3 (4/30) 'lük oranla amikasin ve siprofloksasinin takip ettiği tespit edilmiştir.

P.aeruginosa kökenleri çoğu beta-laktam grubu antibiyotiğe intrinsik dirençlidir. İntrensik direncin yanında pseudomonaslar geniş spektrumlu beta laktamaz enzimi üretimi, mannoz bağlayıcı lektin veya benzer enzim üretimleri, efluks pompa sistemi, penisilin bağlayıcı proteinlerin yapısındaki değişimler ve membran geçirgenliğinin azalması gibi mekanizmalarla da antimikrobiallere karşı kolayca dirençli hale gelebilmektedirler (Weldhagen et al 2003).

P.aeruginosa özellikle immunsupresif hastalarda yüksek mortalite ile seyretmektedir. İlaç tedavisi sırasında kullanılan antibiyotiklere dirençli mutant suşların gelişimi görülebilmektedir. Tedavide aminoglikozitler, florokinolanlar veya bu antibiyotiklerle beta lactam antibiyotik kombinasyonları tercih edilmektedir. Tedavide antimikrobialin seçiminin hızlı ve doğru yöntemlerle yapılması dirençli kökenlerin oluşumunun engellenmesinde oldukça önemlidir. Bu sebeple spesifite ve sensitivite problemlerinden dolayı fenotipik yöntemlerin yanında son dönemlerde moleküler bazlı yöntemler direnç tespitinde tercih edilmektedir. İzole edilen kökenlerde direnç genlerinin moleküler olarak gösterilmesi oldukça büyük öneme sahiptir (Deplano et al 2005).

Çalışmada *tetK* geni varlığı 29 kökende (%96.7) tespit edilirken, *tetM* geni varlığı ise *P.aeruginosa* kökenlerinin 23 (%76.7) 'ünde tespit edilmiştir. Fenotipik olarak *P.aeruginosa* kökenlerinde direnç oranı %90 olarak tespit edilmesine rağmen tetrasiklin

direncinden sorumlu gen varlığı daha yüksek oranda bulunmuştur. Gram negatif bakterilerde beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde en önemli mekanizmalardan biri beta laktamaz enzim üretimidir. Çalışmada *P.aeruginosa* kökenlerinde %70 (21/30) oranında *ampC* geni varlığı tespit edilirken, sefalosporinlerden seftazidim direnci %70 olarak tespit edilirken seftazidim direnci ise %40 olarak bulunmuştur. Bunun yanında *ampC* geni varlığı %70 olarak bulunurken antipseudomonal penisilinlerden piperasilin direnci %63.3 olarak bulunmuştur. Beta laktam antibiyotiklerden en düşük direnç oranı karbapenemlerden imipenem (%6.7) ve meropenem (%26.7) karşı elde edilmiştir.

Stafilokoklar hem yapısal hem de salgıladığı ürünlerle infeksiyonun patogeneze katkısı olan çok çeşitli virulans faktörleri ile donatılmıştır. Bunlar arasında Panton Valentin lökositin, toksik şok sendromu toksini, enterotoksinleri en önemlileri arasında yer almaktadır. Stafilokok enterotoksinleri başta *S. aureus* tarafından olmak üzere *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. xylosus* ve *S. epidermidis* tarafından da sentezlenen tek zincirli, düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Şimdiye kadar belirlenmiş 14 enterotoksin antijenite özelliklerine göre ve alfabetik sırayla isimlendirilmiştir (sea-seo). Çalışmamızda en yüksek oranda seh (%66.7) geni tespit edilirken bunu sei (%63.3) ve seg (%56.7) genleri takip etmiştir. Ayrıca toplam 30 kökünde sec, sed ve sej enterotoksin genlerinin varlığına rastlanmamıştır.

PVL bir sitolizin biyokomponent olarak sınıflandırılmaktadır. Çünkü konakçı sitoplazmik membranına giren ve membranda porlar oluşturmak suretiyle hücre ölümüne sebep olan toksindir. *S.aureus*'un en önemli patojenite faktörlerinden biridir. PVL lökositlere karşı yüksek affinite göstermekte ve ciddi nekrotizan pnömoni ve bulaşıcı deri hastalıklarına yol açan çoğunlukla toplum kökenli metisilin dirençli *S. aureus* (CA-MRSA) ile ilişkilendirilmektedir (Foster 2005). Çalışmamızda KSOM hastalarından izole edilen 21 *S.aureus* kökeninin 17 (%81.0)'sinde *PVL* geni varlığı tespit edilmiştir.

6. SONUÇ

1. Bu çalışma, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kulak Burun Boğaz polikliniklerine başvuran KSOM tanısı almış ve yaş aralığı 5-83 olan hastalar arasında yapılmıştır.
2. Kulak sürüntü örneklerinin 14'ünde (%11.5) üreme olmazken, 28'inde (%22.9) normal kulak flora üremesi tespit edilmiştir.
3. Sürüntü örneklerinin %65.6'sında patojen mikroorganizma üremesi tespit edilmezken, örneklerin 30 (%24.6)'unda stafilocok cinsi bakteriler (21 (%17.2) *S.aureus* ve 9 (%7.4) KNS) ve 30 (%24.6)'sında *P.aeruginosa*, 5'inde (%4.1) *Klebsiella pneumoniae*, 5'inde (%4.1) *Candida albicans*, 3'ünde (%2.5) *E.coli*, 2'sinde (%1.6) *Proteus vulgaris*, 2'sinde (%1.6) *Acinetobacter baumannii*, 1'inde (%0.8) *Citrobacter* cinsi, 1'inde (%0.8) *E.faecalis* ve 1'inde (%0.8) de *S.pneumoniae* üremesi saptanmıştır.
4. Çalışmaya dahil edilen 122 hastadan alınan örneklerden %24.6 (30/122)'sında *Stafilokok* cinsi (21(%70) *S.aureus*, 9 (%30) KNS) tespit edilirken, %24.6 (30/122)'sında da *P.aeruginosa* izole edilmiştir.
5. Stafilocok kökenleri arasında fenotipik olarak metisilin direnci toplam 13 (%46.7) izolatta tespit edilirken, PZR yöntemiyle tüm stafilocok kökenlerinde metisilin direnç geni (*mecA* geni varlığı; %100) varlığı saptanmıştır.
6. Stafilocoklarda penisiline karşı %93.3 (28/30), eritromisin ve gentamisine karşı %60.0 (18/30), rifampine karşı %53.3 (16/30), siprofloksasine karşı 46.7 (14/30), oksasilin ve klindamisine karşı %43.3 (13/30) oranında direnç saptanırken, suşların tamamının vankomisine karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir.
7. Stafilocok kökenlerinde enterotoksin genlerinin dağılımı ise şöyle idi; kökenlerin 6 (%20)'sında *sea*, 4 (%13.3)'ünde *seb*, 2 (%6.7)'sinde *see*, 17 (%56.7)'sinde *seg*, 20 (66.7)'sinde *seh*, 19 (%63.3)'unda *sei* genlerinin varlığı tespit edilmiştir.
8. Çalışmada eritromisin dirençli 11 (%52.4; 11/21) *S.aureus* ve 5 (%55.6; 5/9) koagülaz negatif kökenin tamamında *ermA*, *ermB* veya *ermC* genlerinden biri ya da birkaçının birlikte pozitifliği tespit edilirken, fenotipik yöntemlerle eritromisin

duyarlı olduğu bulunan 10 (%47.6;10/21) *S.aureus* kökeninden 3'ünde *ermA* ve *ermB* geni varlığı, KNS kökenleri arasında ise 5 duyarlı kökenden 2'sinde *ermA* ve *ermB* geni pozitivitesi tespit edildi.

9. *S. aureus*'un en önemli patojenite faktörlerinden biri olarak kabul edilen Panton-Valentne lökosidin geni insidansı ise *S.aureus* kökenleri arasında oldukça yüksek oranda bulunmuştur (%81; 17/21).
10. Çalışmada enterotoksin genlerinden *sec*, *sed* ve *sej* genleri varlığı hem *S.aureus* hem de KNS kökenleri arasında negatif bulunmuştur.
11. Bunun yanında stafilokok kökenleri arasında *etaA*, *fem A*, *femB* ve *tsst* genleri varlığına da rastlanılmamıştır.
12. Çalışmada *P.aeruginosa* kökenleri arasında en yüksek antibiyotik direnci tetrasikline karşı saptanırken (%90), tetrasiklini en yüksek direnç oranlarıyla sefepim (%70), piperasilin (%63.3), levofloksasin (%53.3), gentamisin (%50), seftazidim (%40), meropenem (%26.7), amikasin (13.3), siprofloksasin (%13.3), ve imipenem (%6.7) takip etmiştir.
13. *P.aeruginosa* kökenleri arasında tetrasikline karşı fenotipik direnç %90 olarak bulunurken, izolatlar arasında *tetK* geni varlığı %96.7 oranında tespit edilirken, *tetM* geni varlığı ise kökenlerin %76.7'sinde tespit edilmiştir.
14. Toplam 30 *P. aeruginosa* izolatının %70'inde ise *ampC* geni pozitif olduğu tespit edilmiştir.
15. Çalışmada fenotipik ilaç direnç oranlarının genotipik ilaç direnç genlerinden daha düşük düzeyde seyrettiği tespit edilmiştir. Son zamanlarda gerek stafilokok ve gerekse de pseudomonas suşlarında artan direnç oranları sebebiyle tedavi protokollerinin ilaç duyarlılık testleri yapılarak belirlenmesini gerektirmektedir.
16. İlaç direnç tespitinde spesifite ve sensitivite açısından duyarlı yöntemler tercih edilmelidir. Hızlı ve doğruluğu yüksek testlerle direnç oranları araştırılmalıdır.
17. Fenotipik yöntemlerin yanında yüksek spesifite ve sensitiviteyi sebebiyle direnç genlerinin varlığı PZR gibi moleküler bazlı yöntemlerle de belirlenmelidir. Çünkü direnç genleri taşıyan kökenlerin fenotipik yansımasının (ekspresyonunun) her an gerçekleşebileceği akılda tutulmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. **Aktaş AE, Uslu H, Yiğit N, Sütbeyaz Y, Ayyıldız A.** “Kronik Süperatif Otitis Media’da izole edilen Gr(-) bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. Otitis Media tedavisinde yenilikler” Palandöken sempozyum kitabı, **1999**, 42
2. **Alper CM, Tabari R, Seroky JT., Doyle WJ.** “Magnetic resonance imaging of the development of otitis media with effusion caused by functional obstruction of the eustachian tube”, Ann. Otolaryngol. Rhinol. Laryngol. 106, **1997**, 422–431.
3. **Baxter JD, Julien G, Tewfik TL et al.** Observations on the prevalence of ear disease in the Inuit and Cree Indian school population of Kuujuaraapik, J. Otolaryngol. 15, **1986**, 25-30
4. **Baxter JD, Stubbing P, Goodbody L, Terraza O.** “The light at the end of the tunnel associated with the high prevalence of chronic otitis media among Inuit elementary school children in the eastern Canadian Arctic is now visible”, Arct. Med. Res. 51, **1992**, 29–31
5. **Beery QC, Doyle WJ, Cantekin EI. et al.** “Eustachian tube function in an American Indian population”, Ann. Otolaryngol. Rhinol. Laryngol suppl. 89(3 pt.2), **1980**, 28-33
6. **Bernstein JM, Okazaki T, Reisman RE.** “Prostaglandins in middle ear effusions”, Arch. Otolaryngol. 102, **1976**, 257-258
7. **Bluestone CD, Kenna MA.** “Workshop on chronic suppurative otitis media”, etiology and management, Ann. Otolaryngol. Rhinol. Laryngol. 97 (suppl. 131), **1988**, 1-48
8. **Bluestone CD, Klein JO.** “Otitis media, atelectasis and eustachian tube dysfunction, in: C.D. Bluestone, S.E. Stool, M.A. Kenna (Eds.)”, Pediatric Otolaryngology, WB Saunders, Philadelphia, **1996**, pp. 388–390
9. **Bluestone CD, Lundgren K, Tos M. et al.** “Frequency of bacteria isolated from middle-ear effusions from United States, Finland, Japan and Denmark”, in: C.D. Bluestone, M.L. Casselbrant; (Eds.), Workshop on Epidemiology of Otitis Media. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 99 (Suppl. 149), **1990**, 42–43.
10. **Bluestone CD, Stool SE, Kenna MA (Eds.).** “Pediatric Otolaryngology, third ed.”, W.B. Saunders Company, Philadelphia, United States of America, **1996**
11. **Bluestone CD.** “Epidemiology and pathogenesis of chronic suppurative otitis media: implications for prevention and treatment”, Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 42 (3), **1998**, 207—223
12. **Bluestone CD.** “Pathogenesis of otitis media:role of eustachian tube”, Pediatr. Infect. Dis. J. 14, **1996**, 281–291
13. **Bluestone CD.** “Studies in otitis media: children’s Hospital of Pittsburgh-University of Pittsburgh progress report-2004”, Laryngoscope 114 (11 Pt 3 Suppl. 105), **2004**, 1-26
14. **Boswell JB, Nienhuys YG.** “Patterns of persistent otitis media in the first year of life in Aboriginal and non-Aboriginal infants”, Ann. Otolaryngol. Rhinol. Laryngol. 105, **1996**, 893–900
15. **Bozdogan B, Esel D, Whitener C et al.** “Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strain isolated at the hershey medical center” J Antimicrob Chemother, **2003**, 52:864-868.
16. **Brody JA, Overfield T, McAlister R.** “Draining ears and deafness among Alaskan Eskimos”, Arch. Otolaryngol. 81, **1965**, 29–33
17. **Brook I** “Role of anaerobic bacteria in chronic otitis media and cholesteatoma”, Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 31 (2-3), **1995**, 153-157
18. **Browning GG, Gatehouse D.** “The prevalence of middle ear disease in the adult British population”, Clin. Otolaryngol. 17, **1992**, 317–321
19. **Browning GG, Gatehouse S,** “Hearing in chronic suppurative otitis media”, Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 98 (4 Pt 1), **1989**, 245-250

20. **Buchman CA, Doyle WJ, Skoner DP et al.** “Otologic manifestations of experimental rhinovirus infection”, *Laryngoscope* 104, **1994**, 1295–1299.
21. **Buchman CA, Doyle WJ, Skoner DP. et al.** “Influenza A virus-induced acute otitis media”, *J. Infect. Dis.* 172, **1995**, 1348–1351.
22. **Casselbrant ML, Brostoff LM, Cantekin EI et al.** “Otitis media with effusion in pre-school children”, *Laryngoscope* 95, **1985**, 428–436
23. **Casselbrant ML, Cantekin EI, Dirkmaat DC, Doyle WJ, Bluestone CD.** “Experimental paralysis of tensorveli palatini muscle”, *Acta Otolaryngol. Stockh.* 106, **1988**, 178–185
24. **Chambers HF.** “Detection of methicillin-resistant staphylococci”, *Infec Dis Clin North Am*, **1993**, 7: 425-433).
25. **Chambers HF.** “Methicillin-resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications”, *Clin Microbiol Rev*, **1997**, 10:781-791.
26. **Chan KH, Swarts JD, RudoyR et al.** “Otitis media in the Republic of Palau”, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 119, **1993**, 425–428
27. **Cornelis P.** (editor). “*Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*, 1st ed., Caister Academic Press. ISBN, **2008**, 978- 1-904455-19-6 .
28. **Crum NF, Lee RU, Thornton SA, Stine OC, Wallace MR, Barrozo C, Keefer-Norris A, Judd S, Russell KL.**” Fifteenyear study of the changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”, *Am J Med* , **2006** ,119:943-51
29. **Cureoglu S, Schachern PA, Paparella MM, Lindgren BR.** “Cochlear changes in chronic otitis media”, *Laryngoscope* 114 (4), **2004**, 622-626
30. **Çiftci İH, Altındış M, Çetinkaya Z, Aşık G, Aktepe OC.** ”Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilkoklarda *mecA* Varlığının Araştırılması”, *Kocatepe Tıp Dergisi The Medical Journal of Kocatepe* , **2009**, 10: 17-20.
31. **De Uzeda M, Rocha ER.** “Bacteriology of chronic otitis media affecting children living in Rio de Janeiro”, *Ear Nose Throat J.* 68 (6), **1989**, 410- 414
32. Deplano A, Denis O, Poirel L, et al. “Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*”, *J Clin Microbiol*, **2005**, 43(3): 1198-204).
33. **Dohar JE, Kenna MA, Wadowsky RM.** “In vitro susceptibility of aural isolates of pseudomonas aeruginosa to commonly used otological antibiotics”, *Am. J. Otolaryngol.* 17, **1996**, 207–209
34. **Doyle WJ, Seroky JT.** “Middle ear gas exchange in rhesus monkeys”, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 103, **1994**, 636-645
35. **Doyle WJ.** “A functional-anatomic description of eustachian tube vector relations in four ethnic populations”, an osteologic study, Ph.D. Dissertation, University of Pittsburgh, Pittsburgh, **1977**
36. **Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C.** “ Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci”. *Indian J Med Res* 135, March, **2012** , pp 389-396
dysfunction in adults and children”, *Acta Otolaryngol* **1993**; 500:66-9.
37. **Eason RJ, Harding E, Nicholson R et al.** “Chronic suppurative otitis media in the Solomon Islands: a prospective, microbiological, audiometric and therapeutic survey”, *N.Z. Med. J.* 99, **1986**, 812–815
38. **El Sayed Y.**” Bone conduction impairment in uncomplicated chronic suppurative otitis media”, *Am. J. Otolaryngol.* 19 (3), **1998**, 149-153
39. **Elango S, Purohit GN, Hashim M, Hilmi R.** “Hearing loss and ear disorders in Malaysian school children”, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 22, **1991**, 75–8
40. *Encyclopedia Britannica, Inc.*, 1997
41. **Fiellau-Nikolajsen M** “Tympanometry and secretory otitis media: observations on diagnosis, epidemiology, treatment and prevention in prospective cohort studies of three-year old children”, *Acta Otolaryngol. Stockh.* 394, **1983**, 62–63
42. **Fliiss DM, Dagan R, Hourri Z, Leiberman A.** “Medical management of chronic suppurative otitis media without cholesteatoma in children”, *J. Pediatr.* 116 (6), **1990**, 991-996

43. **Franklin R, Jean B, Jeff Alder et al.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-third Informational Supplement (CLSI), **2013**, Volume 33 number 1, 63-81
44. **Fria TJ, Cantekin EI, Eichler JA.** "Hearing acuity of children with otitis media with effusion", Arch. Otolaryngol. 111, **1985**, 10–16
45. **Furukawa M,** Minekawa A, Haruyama T, Narui Y, Sugita G, Sugita R, et al. "Clinical effectiveness of ototopical application of mupirocin ointment in methicillin-resistant Staphylococcus aureus otorrhea". Otol Neurotol, **2008**, 29:676-8
46. **Giles M, O'Brien P.** "The prevalence of hearing impairment amongst Maori schoolchildren", Clin. Otolaryngol. 16, **1991**, 174–178
47. **Görür K, Özcan C, Ünal M, Öztürk C, Delialioğlu N.** "Kronik Süpüratif Otitis Media'da izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları", **2000**;1:48-51.
48. **Groom AV,** Wolsey DH, Naimi TS, Smith K, Johnson S, Boxrud D, et al. "Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a rural American Indian Community", J Am Med Assoc, **2001**, 286:1201-5
49. **Gross S, Blaiss MS, Herrod HG.** "Role of immunoglobulin subclasses and specific antibody determinations in the evaluation of recurrent infection in children", J. Pediatr. 121 (4), **1992**, 516—522
50. **Halama R, Boogt GR, Musgrave GM.** "Prevalence of otitis media in children in a black rural community in Venda (South Africa)", Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 11, **1986**, 73–77
51. **Hamid V,** Alijan T, Abdolvahab M and Ezzat A. Ghaemi. "Evaluation of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from patients in Golestan province-north of Iran African", Journal of Microbiology Research Vol, **2011**, 5(4), pp. 432-436
52. **Herold BC,** Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, Leitch CD, Daum RS. "Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in children with no identified predisposing risk", JAMA, **1998**, 279:593-8
53. **Homoe P, Bretlau P.** "Cholesteatomas in Greenlandic Inuit. A retrospective study and follow-up of treated cases from 1976–1991", Arct. Med. Res. 53, **1994**, 86–90
54. **Homoe P, Prag J, Farholt S ve ark.** "High rate of nasopharyngeal carriage of potential pathogens among children in Greenland", Clin. Infect. Dis. 23, **1996**, 1081–1090
55. **Huang M, Dulon D, Schacht J.** "Outer hair cells as potential targets of inflammatory mediators", Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl. 148, **1990**, 35-38
56. **Hunt A,** Robb PJ. "Successful treatment of MRSA otorrhea: a case report". J Laryngol Otol, **2006**;120:63-4.
57. **Hussian FM,** Boyle-Vavra S, Bethel CD, Daum RS. "Current trends in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus at a tertiary care pediatric facility", Pediatr Infect Dis J, **2000**, 19:1163-6
58. **Hwang J-H,** Tsai H-Y, Liu T-C. "Community-acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus infections in discharging ears", Acta Otolaryngol, **2002**, 122:827-30
59. **Ibekwe AO, Al Shareef Z, Benayam A.** "Anaerobes and fungi in chronic suppurative otitis media", Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 106 (8), **1997**, 649-652
60. **Iwano T,** Kinoshita T, Hamada E, et al. "Otitis media with effusion and eustachian tube
61. **Jang CH,** Song C-H, Wang P-C. "Topical vancomycin for chronic suppurative otitis media with methicillin-resistant Staphylococcus aureus otorrhea", J Laryngol Otol, **2004**, 118:645-57
62. **Jang CH,** Song C-H, Wang P-C. "Topical vancomycin for chronic suppurative otitis media with methicillin-resistant Staphylococcus aureus otorrhea", J Laryngol Otol, **2004**, 118:645-57.
63. **Japoni A,** Alborzi A, Orafa F, Rasouli M and Farshad S. "Distribution Patterns of Methicillin Resistance Genes (*mecA*) in *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Specimens", *Iranian Biomedical Journal* 8 (4), **2004**, 173-178)
64. **Jevons MP.** "Celbenin-resistant staphylococci", BMJ, **1961**, 1:1242

65. **Johnson JR**, Roberts PL, Olsen RJ, Moyer KA, Stamin WE. "Prevention of catheter-associated urinary tract infection with a silver oxide-coated urinary catheter", *Clinical and microbiologic correlates. J Infect Dis*, **1990**, 162: 1145-50.
66. **Kaleem F**, Usman J, Khalid A, Hassan A, Omair M. "Comparison of in vitro efficacy of linezolid and vancomycin by determining their minimum inhibitory concentrations against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)", *J Pak Med Assoc*, **2011**, 61:356-9
67. **Kangsarak J, Foonant S, Ruckphaopunt K, Navachoen N, Teotrakul S.** "Extracranial and intracranial preliminary study", *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 116 (5), **1990**, 557-559
68. **Kaplan GJ, Fleshman JK, Bender TR et al.** "Long-term effects of otitis media: a ten year cohort study of Alaskan Eskimo children", *Pediatrics* 52, **1973**, 577-585
69. **Kapur YP.** "A study of hearing loss in school children in India", *J. Speech Hear Dis.* 30, **1965**, 225-233
70. **Karlan MS**, Mufson RA, Grizzard MB, Buscemi PA, Hench L, Goldberg EP. "Myringotomy tube materials: bacterial adhesion and infection", *Otolaryngol Head Neck Surg*, **1980**, 88:783-95.
71. **Kenna MA, Bluestone CD, Reilly JS, Lusk RP.** "Medical management of chronic suppurative otitis media without cholesteatoma in children", *Laryngoscope* 96 (2), **1986**, 146-15
72. **Khanna V, Chander J, Nagarkar NM, Dass A.** "Clinic microbiologic evaluation of active tubotympanic type chronic suppurative otitis media", *J. Otolaryngol.* 29 (3), **2000**, 148-153
73. **Kim CS, Jung HW, Yoo KY.** "Prevalence of otitis media and allied diseases in Korea", *J. Korea Med. Sci.* 8, **1993**, 34-40
74. **Leach AJ., Boswell JB, Asche V. et al.** "Bacterial colonization of the nasopharynx predicts very early onset and persistence of otitis media in Australian Aboriginal infants", *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13. **1994**, 983-989
75. **Lee ES**, Song JS, Hwang SJ, Suh HK, Cheong HJ. "Possibility of reciprocal infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between medical personnel and patients undergoing middle ear surgery", *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, **2001**, 63(2):87-91
76. **Lewis K.** "Riddle of biofilm resistance", *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (4), **2001**, 999-1007
77. **Ling D, McCoy RH, Levinson ED.** "The incidence of middle ear disease and its educational implications among Baffin Island Eskimo children", *Can. J. Public Health* 60, **1969**, 385-390
78. **Lowy F.** "Staphylococcus aureus infections", *N Engl J Med*, **1998**, 339:520-32
79. **Madana J, Yolmo D, Kalaiarasi R , Gopalakrishnan S , Sujatha S.** "Microbiological profile with antibiotic sensitivity pattern of cholesteatomatous chronic suppurative otitis media among children" *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, **2011**, Sep;75(9):1104-8
80. **Mandel EM., Casselbrant ML, Kurs-Lasky M.** "Acute otorrhea: bacteriology of a common complication of tympanostomy tubes", *Ann. Otolaryngol. Rhinol. Laryngol.* 103, **1994**, 713-718
81. **McBride TP, Doyle WJ, Hayden FG, Gwaltney JM.** "Alterations of the eustachian tube, middle ear and nose in rhinovirus infection", *Arch. Otolaryngol.* 115, **1989**, 1054-1059
82. **Minja BM, Macheemba A.** "Prevalence of otitis media, hearing impairment and cerumen impaction among school children in rural and urban Dar es Salaam, Tanzania", *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 37, **1996**, 29-34
83. **Morizono T, Tono T.** "Middle ear inflammatory mediators and cochlear function", *Otolaryngol. Clin. North Am.* 24 (4), **1991**, 835-843
84. **Morris PS.** "Management of otitis media in a high risk population", *Aust. Fam. Physician* 27 (11), **1998**, 1021-1029
85. **Muhaimid H, Zakzouk S, Bafaqeeh S.** "Epidemiology of chronic suppurative otitis media in Saudi children", *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 26, **1993**, 101-108
86. **Nelson JD.** "Chronic suppurative otitis media", *Pediatr. Infect Dis. J.* 7 (6), **1988**, 446-448
87. **Osma U, Cureoglu S, Hosoglu S.** "The complications of chronic otitis media", report of 93 cases, *J. Laryngol. Otol.* 114 (2), **2000**, 97-100

88. **Papp Z, Rezes S, Jokay I, Sziklai I.** “Sensorineural hearing loss in chronic otitis media”, *Otol. Neurotol.* 24 (2) , **2003**, 141-144
89. **Park DC, Lee SK, Cha CI, Lee SO, Lee MS, Yeo SG.** “Antimicrobial resistance of Staphylococcus from otorrhea in chronic suppurative otitis media and comparison with results of all isolated Staphylococci”. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2008**, 27:571-7
90. **Park DC, Lee SK, Cha CI, Lee SO, Lee MS et al.** “Antimicrobial resistance of staphylococcus from otorrhea in chronic suppurative otitis media and comparison with results of all isolated staphylococci” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* July **2008**, Volume 27, Issue 7, pp 571-577
91. **Pederson CB, Zachau-Christiansen B.** “Otitis media in Greenland children: acute, chronic and secretory otitis media in three-to eight-year olds”, *J. Otolaryngol.* 15, **1986**, 332–335
92. **Post JC, Preston RA, Aul J. et al.** “Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion”, *J. Am. Med. Assoc.* 273, **1995**, 1598–1604
93. **Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD.** “The role of biofilms in otolaryngologic infections”, *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 12 (3), **2004**, 185- 190
94. **Ramakrishnan K, Sparks RA, and Berryhill WE.** “Diagnosis and Treatment of Otitis Media”, *Am Fam Physician* **2007**;76:1650-8, 1659-60
95. **Ratnesar P.** “Aeration—A factor in the sequelae of chronic ear disease along the Labrador and Northern Newfoundland Coast”, in: B.F. McCabe, Sade’, M. Abramson; (Eds.), *Cholesteatoma: First International Conference, Aesculapius, Birmingham*, **1977**, pp. 302-307.
96. **Roland PS** “Chronic suppurative otitis media: a clinical overview”, *Ear Nose Throat J.* 81 (8 Suppl. 1), **2002**, 8-10
97. **Rovers M, Haggard M, Gannon M, Koeppen-SchEOMrus M, Plomin R.** “Heritability of symptom domains in otitis media”, a longitudinal study of 1,373 twin pairs, *Am. J. Epidemiol.* 155(10), **2002**, 958-964
98. **Ryan KJ, Ray CG (editors).** “*Sherrie Medical Microbiology*”, 4th ed., McGraw Hill. ISBN, **2004**, 0-8385-8529-9.
99. **Sanders LA, Feldman RG., Voorhorst-Ogink M.M, De Haas M, Rijkers GT, Capel PJ, et al.** “Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2- mediated bacterial phagocytosis by neutrophils, *Infect. Immun*”, 63 (1), **1995**, 73 81
100. **Saravolatz LD, Pohlod DJ, Arking LM.** “Community acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: a new source for nosocomial outbreak”, *Ann Intern Med* 97, **1982**, 325-9.
101. **Schrader N, Isaacson G.** “Fungal otitis externa—its association with fluoroquinolone eardrops”, *Pediatrics* 111 (5 Pt 1), **2003**, 1123
102. **Seely DR, Gloyd SS, Omope AD, Norton SJ.** “Hearing loss prevalence and risk factors among Sierra Leonean children”, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 121, **1995**, 853–858
103. **Skulnick M, Simor AE, Gregson D.** “Evaluation of commercial and standard methodology for determination of oxacillin susceptibility in Staphylococcus aureus”. *J Clin Microbiol*, **1996**, 30: 1985-1988
104. **Stenfors LE, Raisanen S.** “Immunoglobulin-coated bacteria in effusions from secretory and chronic suppurative otitis media”, *Am. J. Otolaryngol.* 12 (3), **1991**, 161- 164
105. **Stenfors LE, Raisanen S.** “Opsonization of middle ear bacteria during chronic suppurative and secretory otitis media”, *Acta Otolaryngol.* 112 (1), **1992**, 96- 101
106. **Stenstrom C, Bylander-Groth, L A.** “Ingvarsson, Eustachian tube function in otitis-prone and healthy children”, *Int. J. ediatr. Otorhinolaryngol.* 21, **1991**, 127–138
107. **Stewart IA, Byrne W.** “Discharging ears in Melanesian children”, *Letter to the editor, N.Z. Med. J.* 83, **1976**, 287

108. **Stewart JL.** “Current status of otitis media in the American Indian population, in: C.D. Bluestone, M.L. Casselbrant; (Eds.), Workshop on Epidemiology of Otitis Media, Ann. Otolaryngol. Rhinol. Laryngol. 99 (suppl. 149), **1990**, 20–22
109. **Stewart PS, Costerton JW.** “Antibiotic resistance of bacteria in biofilms”, Lancet 358 (9276), **2001**, 135–138
110. **Stuart JE, Quayle CJ, Lewis AN, Harper J.** “Health, hearing and ear disease in Aboriginal schoolchildren”, Med. J. Aust. 1, **1972**, 855–85
111. **Suh HK, Jeon YH, Song JS, et al.** “A molecular epidemiologic study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in patients undergoing middle ear surgery. Eur Arch Otorhinolaryngol, **1998**, 25:347-51
112. **Swartz JD, Alper CM, Seroky JT, Chan KH, Doyle WJ.** “In vivo observation with magnetic resonance imaging of middle ear effusion in response to experimental underpressures”, Ann. Otolaryngol. Rhinol. Laryngol. 104. **1995**, 522–528
113. **Tachibana F, Shimada T, Hori Y, Wada Y, Ishitani Y, et al.** “Platelet-activating factor and leukotrienes in acute otitis media, secretory otitis media and chronic otitis media on acute exacerbation”, Auris Nasus Larynx (Tokyo) 23, **1996**, 20-25
114. **Timmermans FJ, Gerson S.** “Chronic granulomatous otitis media in bottle-fed Inuit children”, Can. Med. Assoc. J. 122, **1980**, 545–547
115. **Tiwari S, Singh SM, Jain S.** “Chronic bilateral suppurative otitis media caused by *Aspergillus terreus*”, Mycoses 38 (7– 8), **1995**, 297- 300
116. **Todd NW, Bowman CA.** “Otitis media at Canyon Day, Arizona: a 16-year follow-up in Apache Indians”, Arch Otolaryngol. 111, **1985**, 606–608
117. **Vartiainen E.** “Results of surgical treatment for chronic noncholesteatomatous otitis media in the pediatric population”, Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 24, **1992**, 209-216
118. **Veenhoven R, Rijkers G, Schilder A, Adelmeijer J, Uiterwaal C et al.** “Immunoglobulins in otitis-prone children”, Pediatr. Res. 55 (1), **2004**, 159- 162
119. **Walshe P, Rowley H, Timon C.** “A worrying development in the microbiology of otitis extern”. Clin Otolaryngol, **2001**, 26:218-20.
120. **Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P.** “Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*,. novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother, **2003**, 47(8): 2385-92
121. **WHO, 1986.** Report by the Director General. Prevention of Deafness and Hearing Impairment. Document A39/14, World Health Organisation, Geneva
122. **Wiet RJ, Stewart J, DeBlanc GB, Weider DJ.** “Natural history of otitis media in the American native”, Ann. Otolaryngol. Rhinol. Laryngol. 89, **1980**, 14–19
123. **Williamson IG, Dunleavy J, Bain J, Robinson D.** “The natural history of otitis media with effusion-a three-year study of the incidence and prevalence of abnormal tympanograms in four South West Hampshire infant and first schools”, J. Laryngol. Otolaryngol. 108, **1994**, 930–934
124. **Wintermeyer SM, Nahata MC.** “Chronic suppurative otitis media”, Ann. Pharmacother. 28 (9), **1994**, 1089-1099
125. **Zeisel SA, Roberts JE, Gunn EB et al.** “Prospective surveillance for otitis media with effusion among black infants in group child care”, J. Pediatr. 127, **1995**, 875–880.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Hatay'da doğdu. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2008 yılında mezun oldu. 2009'da Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.