

Akut Orta Kulak İltihabı Örneklerinde *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae*'nin Saptanmasında Kültür ve Gerçek Zamanlı PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması*

Comparison of Culture and Real-Time PCR Methods in the Detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in Acute Otitis Media Effusion Specimens

Özgen KÖSEOĞLU ESER¹, Şehnaz ALP², Alper ERGİN³, Kaan İPÇİ⁴,
Alpaslan ALP¹, Deniz GÜR¹, Gülşen HASÇELİK¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara.

² Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Infectious Diseases Unit, Ankara, Turkey.

³ Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ankara.

³ Hacettepe University School of Health Services, Ankara, Turkey.

⁴ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Ankara.

⁴ Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Ear, Nose and Throat, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından (Proje no: 0302 101 003) desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 27.06.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 05.09.2012

ÖZET

Akut orta kulak iltihabına en sık neden olan bakteriler *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae*'dir. Bu çalışmada, orta kulak iltihabı tanısı konulmuş hastaların orta kulak efüzyonlarında, *S.pneumoniae* ve *H.influenzae* varlığının kültür ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemleriyle araştırılması ve yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, efüzyonlu orta kulak iltihabı tanısı konulan çocuk yaş grubundaki 60 hastadan elde edilen orta kulak aspirasyon örnekleri dahil edilmiştir. Örneklerin kültürü için BACTEC Ped Plus kan kültür şişeleri ve BACTEC 9120 sistemi (BD Diagnostic Systems, MD) kullanılmış; tanımlama konvansiyonel yöntemlerle yapılmıştır. Rt-PCR yöntemiyle *S.pneumoniae* ve *H.influenzae* varlığını göstermek için sırasıyla *ply* pnömolizin geni ve HIB kapsül bölgesi LightCycler cihazı (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak çoğaltılmıştır. Konvansiyonel kültür yöntem-

leriyle hasta örneklerinin 5 (%8.3)'inden *H.influenzae*, 3 (%5)'ünden *S.pneumoniae* izole edilmiştir. Ayrıca, örneklerin %11.6'sında diğer mikroorganizmalar (*Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguinis*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*) üretilmiştir. Rt-PCR yöntemiyle örneklerin 38 (%63.3)'inde *H.influenzae*, 24 (%40)'ünde ise *S.pneumoniae* varlığı saptanmıştır. Rt-PCR ile, kültür yöntemlerine göre *H.influenzae* ve *S.pneumoniae* tespitinde yaklaşık sekiz kat artış olduğu izlenmiştir. Kültür yöntemi referans alındığında, Rt-PCR yönteminin *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*'nin saptanmasındaki duyarlılık, özgüllük ve negatif prediktif değeri sırasıyla %80, %51 ve %98.2 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, Rt-PCR yönteminin, akut orta kulak iltihabının etiyolojik tanısında, özellikle bakteri kültür yöntemlerinin negatif olduğu durumlarda, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*'nin hızlı tanısında duyarlılığı yüksek, tercih edilebilir bir yöntem olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Orta kulak efüzyonu; *Streptococcus pneumoniae*; *Haemophilus influenzae*; gerçek zamanlı PCR.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae and *Haemophilus influenzae* are the major etiologic agents of acute otitis media. This study was aimed to compare the detection rate of *S.pneumoniae* and *H.influenzae* by culture and real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) in the middle ear effusions of patients diagnosed as acute otitis media. A total of 60 middle ear effusion samples collected from children with acute otitis media were included in the study. The samples were inoculated and incubated in BACTEC Ped Plus blood culture bottles and BACTEC 9120 system (BD Diagnostic Systems, MD), respectively, and the isolates were identified by conventional methods. For the molecular diagnosis of *H.influenzae* and *S.pneumoniae*, *ply* pneumolysin gene and HIB capsule region, respectively were amplified by Rt-PCR (LightCycler, Roche Diagnostics, Germany). *H.influenzae* and *S.pneumoniae* were isolated from 5 (8.3%) and 3 (5%) of the patient samples with conventional culture methods, respectively. In addition in 11.6% of the samples other microorganisms (*Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguinis*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*) were also isolated. On the other hand *H.influenzae* and *S.pneumoniae* were detected in 38 (63.3%) and 24 (40%) of the samples with Rt-PCR, respectively. There was about eight fold increase in the detection frequency of *H.influenzae* and *S.pneumoniae* with Rt-PCR compared to culture methods. When culture was accepted as the gold standard method, the sensitivity, specificity and positive predictive value of Rt-PCR in the detection of *H.influenzae* and *S.pneumoniae* were estimated as 80%, 51% and 98.2%, respectively. As a result, Rt-PCR was shown to be a sensitive method and could be preferred for the rapid diagnosis of *H.influenzae* and *S.pneumoniae* in the etiologic diagnosis of acute otitis media, especially in culture negative cases.

Key words: Middle ear effusion; *Streptococcus pneumoniae*; *Haemophilus influenzae*; real-time PCR.

GİRİŞ

Akut orta kulak iltihabı bebeklik ve çocukluk döneminde sıklıkla görülen hastalıklar arasında yer almaktadır. Hastalık, olguların hemen hepsinde üst solunum yolu viral enfeksiyonunu takiben ortaya çıkmaktadır. Olguların üçte ikisi bakterilere bağlı gelişmekte olup efüzyonlu orta kulak iltihabına en sık neden olan bakteriler arasında *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis* yer alır¹. Akut otitis media olgularının %80'den fazlası ise, *S.pneumoniae* ve tiplendirilemeyen *H.influenzae*'ya bağlı gelişmektedir. Mikrobiyolojik tanının birkaç günlük gecikmesine bağlı olarak patojenin eradike edilememesi durumunda, klinik başarısızlık belirgin şekilde artmaktadır. Etkili te-

davi yöntemlerinin gecikmesi halinde, bu hastalığa bağlı işitme kaybı gibi önemli yan etkiler görülmektedir². Bu nedenle, bakteriyel etkenlerin laboratuvarında erken tanımlanması, orta kulak iltihabına bağlı tedavi başarısında önemli bir yer tutmaktadır.

Klinik örnekten bakteri izolasyonu ve tanımlanması mikrobiyolojik açıdan altın standart kabul edilmekle birlikte, günümüzde bazı bakterilerin üremesindeki güçlükler ve hasta sonuçlarının daha çabuk elde edilmesinin klinik önemi nedeniyle, hızlı moleküler yöntemler kullanıma girmiştir. Bu moleküler yöntemlerden birisi de gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR)'dur³. Rt-PCR yöntemi diğer moleküler yöntemlere göre daha hızlı tanı olanağı sağlaması ve klinik örnekte bulunan düşük sayıdaki mikroorganizmaları tanımlayabilmesi nedeniyle tercih edilmektedir³.

Bu çalışmanın amacı; akut orta kulak iltihabı tanısı konulmuş hastaların orta kulak efüzyonlarında, *S.pneumoniae* ve *H.influenzae* varlığının kültür ve Rt-PCR yöntemleriyle karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesinin onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmaya efüzyonlu orta kulak iltihabı tanısı konulan çocuk yaş grubundaki 60 hasta alındı. Ameliyathane koşullarında orta kulak efüzyonları aspire edildi, elde edilen aspirasyon materyalleri 1 ml steril %0.9'luk NaCl ile sulandırıldıktan sonra moleküler testlerde kullanılmak üzere steril mikrosantrifüj tüpüne 500 µl aktarıldı. Materyalin arta kalan bölümü ise hasta başında "BACTEC Ped Plus (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD)" kan kültür şişelerine enjekte edildi⁴. Kan kültür şişeleri ve mikrosantrifüj tüpleri hemen laboratuvara ulaştırıldı. Kan kültür şişeleri "BACTEC 9120 (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD)" sisteminde inkübasyona bırakıldı ve beş gün inkübasyona devam edildi. Bu süre içinde kan kültür şişesinden pozitif sinyal elde edilmesi halinde, %5 koyun kanlı agar, basitrasinli çikolata agar ve EMB agara pasaj yapıldı ve besiyerleri 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Beş günlük inkübasyon süresince pozitif sinyal elde edilmemesi halinde ise, yine kan kültür şişesinden %5 koyun kanlı agara pasaj yapıldı ve besiyerleri 35-37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Pasajların yapıldığı besiyerlerinde üreme olduğunda koloniler makroskobik olarak incelendi. İzolatların Gram yöntemiyle boyanma özellikleri ve mikroskopik morfolojileri dikkate alınarak, *S.pneumoniae*'nin tanımlanması için %5 koyun kanlı agarda optokin duyarlılık testi uygulandı. *H.influenzae* ve *M.catarrhalis* ise "BBL Crystal N/H (Neisseria/Haemophilus) paneli (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD)"ndeki biyokimyasal reaksiyonlarına göre tanımlandı. Besiyerlerinde üreyen *S.pneumoniae*, *H.influenzae* ve *M.catarrhalis* dışındaki diğer bakteriler standart mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanarak kültür sonuçları kaydedildi⁵.

Rt-PCR yöntemi için ayrılan örnekler DNA saflaştırma işlemlerinin uygulanacağı güne kadar -20°C'de saklandı. Örneklerden DNA izolasyonu QIAamp (Qiagen Hilden, Almanya) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Rt-PCR yöntemiyle *S.pneumoniae* ve *H.influenzae* varlığını göstermek için sırasıyla *ply* pnömolizin geni ve HIB kapsül bölgesi LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) cihazı kullanılarak çoğaltıldı. Bu amaçla

pnömokok tanısı için *ply* F5'-TgCAgAgCgTCCTTTggTCTA T-3', *ply* R5'-CTCTTACTCgTggTTTCCAAGTgA-3' ve *ply*TM 5'-Cy5-TggCgCCCATAAgCAACTC-gAA-BBQ problemleri ve *H.influenzae* tanısı için HIB-A 5'-gAAGATgAgAAGTTTTgTggTgC-3' ve HIB-TM2 5'-YAK-ATgATATgggTACATCATgTTCgC CAT-BBQ problemleri modifiye edilerek kullanıldı^{6,7}.

BULGULAR

Konvansiyonel kültür yöntemleriyle hasta örneklerinin %8.3'ünden *H.influenzae*, %5'inden *S.pneumoniae* izole edilmiştir. Örneklerde ayrıca *Staphylococcus epidermidis* (%3.3), *Candida albicans* (%3.3), *Streptococcus intermedius* (%1.6), *Streptococcus sanguinis* (%1.6), *M.catarrhalis* (%1.6) ve *Pseudomonas aeruginosa* (%1.6) üretilmiştir. Rt-PCR yöntemiyle örneklerin %63.3'ünde *H.influenzae*, %40'ında *S.pneumoniae* pozitifliği saptanmıştır. Rt-PCR ile, kültür yöntemlerine göre *H.influenzae* ve *S.pneumoniae* varlığında yaklaşık olarak sekiz kat artış tespit edilmiştir. Orta kulak sıvısı örneklerinde *H.influenzae* ve *S.pneumoniae* varlığının kültür ve Rt-PCR ile karşılaştırılması Tablo I'de gösterilmiştir.

Gerçek zamanlı PCR yönteminin, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae* kültür yöntemleriyle karşılaştırılması sonucu duyarlılığının %80, özgüllüğünün %51 ve negatif prediktif değerinin %98.2 olduğu tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Akut orta kulak iltihabı genellikle çocukluk çağında görülmekte ve sıklıkla antibiyotiklerle tedavi edilmektedir. Bu hastalığın bakteriyolojik tanısında orta kulak sıvısı örneğinin kültürünün yapılması önerilmektedir. Orta kulak sıvısı örneklerinin yaklaşık olarak, en fazla %60'ında bakteriyel etken saptanabilmektedir⁸. Vücudun savunma mekanizmaları, örnek alımından önce antibiyotik kullanımı, orta kulak mukozasında biyofilm yapımı ve viruslara bağlı enfeksiyonlar gibi faktörler etken patojenlerin tanısını etkilemektedir^{8,9}. Bizim çalışmamızda, kültür yöntemleriyle etken olan temel patojen mikroorganizmalar

Tablo I. Orta Kulak Sıvısı Örneklerinde *H.influenzae* ve *S.pneumoniae* Varlığı

	Gerçek zamanlı PCR		Toplam
	Pozitif sayı	Negatif sayı	
<i>H.influenzae</i>			
Kültür pozitif	4 (%80)	1 (%20)	5
Kültür negatif	34 (%62)	21 (%38)	55
Toplam	38	22	60
<i>S.pneumoniae</i>			
Kültür pozitif	3 (%100)	0	3
Kültür negatif	21 (%37)	36 (%63)	57
Toplam	24	36	60

%13 oranında saptanmıştır. Bu oran düşük seviyede gözükse de, yukarıda belirtilen faktörlere göre kültür yöntemleriyle etkenleri üretmek güç olabilmektedir.

Akut orta kulak iltihabı etkenlerinin genellikle zor üreyen bakteriler olması ve öncesinde antibiyotik kullanılmış olma olasılığı gibi nedenlerden dolayı, konvansiyonel kültür yöntemleriyle mikroorganizmaların tespit edilmesinde zorluklar ortaya çıkmaktadır. Günümüzde birçok PCR yöntemi tanıya doğru ve hızlı bir şekilde ulaşmak için kullanılmaktadır⁸. Nükleik asitlerin tespitine dayanan bu yöntemler cansız bakterileri de tanımladıkları için, bu yöntemlerin kullanılması bazen tartışmalara neden olmaktadır. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, orta kulak sıvısında bakteri ölümünü takip eden iki gün içerisinde bakteriyel DNA'ların parçalandığı ve nükleik asit varlığını gösteren yöntemlerin aktif hastalığa neden olan bakteriden kaynaklanan DNA'ları tespit ettiği saptanmıştır¹⁰. Bu nedenle orta kulak sıvısı örneğinde patojen mikroorganizmaların varlığını göstermek için kullanılan PCR yöntemlerinin güvenilir olduğu kanıtlanmıştır. Rt-PCR yöntemi özellikle rutin tanı için çok tercih edilen bir yöntemdir. Pnömonokok tanısında Rt-PCR yönteminin bakteriyel kültür yöntemine göre 50 kat daha duyarlı olduğu, küçük hacimdeki klinik örnekte az sayıda bakterinin varlığı durumunda doğru tanı koyma imkanı verdiği bildirilmektedir¹¹. Bu çalışmada, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*'nin kültürden izolasyon oranları sırasıyla %8.3 ve %5 iken, Rt-PCR yöntemiyle bu oranların sırasıyla %63.3 ve %40'a yükseldiği gözlenmiştir.

Konvansiyonel kültür yöntemleri daha geniş aralıkta bakteri türlerini tanımlama imkânına sahip olmalarına rağmen, efüzyonlu akut orta kulak iltihabının tanısında Rt-PCR yönteminin duyarlılığının yüksek olması ve hızlı tanı nedeniyle hastanede yatma süresini kısaltması nedeniyle, kültürle birlikte kullanıldığında, maliyet/yarar oranını oldukça düşürmektedir¹². Sonuç olarak bu çalışmada, Rt-PCR yönteminin, orta kulak iltihabının etiyolojik tanısında, özellikle kültür yöntemlerinin negatif olduğu durumlarda, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*'nin tanısında duyarlı ve hızlı bir yöntem olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

TEŞEKKÜR

Orta kulak klinik örneğinin alınmasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Levent Sennaroğlu, Prof. Dr. Umut Akyol ve Prof. Dr. Ömer Faruk Ünal'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Principi N, Baggi E, Esposito S. Prevention of acute otitis media using currently available vaccines. Future Microbiol 2012; 7(4): 457-65.
2. Dagan R, Schneider S, Givon-Lavi N, et al. Failure to achieve early bacterial eradication increases clinical failure rate in acute otitis media in young children. Pediatr Infect Dis J 2008; 27(3): 200-6.
3. Saukkoripi A, Palmu A, Kilpi T, Leinonen M. Real-time quantitative PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear fluid of children with acute otitis media. Mol Cell Probes 2002; 16(5): 385-90.
4. Eser OK, İpci K, Alp S, et al. Efficacy of nasopharyngeal culture in identification of pathogen in middle ear fluid in chronic otitis media with effusion. Indian J Med Microbiol 2009; 27(3): 237-41.

5. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology. 2007, 9th ed. ASM Press, Washington, DC.
6. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol 2001; 39(4): 1553-62.
7. Marty A, Greiner O, Day PJ, Gunziger S, Muhlemann K, Nadal D. Detection of *Haemophilus influenzae* type b by real-time PCR. J Clin Microbiol 2004; 42(8): 3813-5.
8. Xu Q, Kaur R, Casey JR, Adlowitz DG, Pichichero ME, Zeng M. Identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in culture-negative middle ear fluids from children with acute otitis media by combination of multiplex PCR and multi-locus sequencing typing. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2011; 75(2): 239-44.
9. Abu Sittih MH, Şener K, Yapar M, et al. Akut otitis medialis çocuklardan alınan orta kulak efüzyonu örneklerinde viral nükleik asit varlığının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2008; 42(3): 437-43.
10. Post JC, Aul JJ, White GJ, et al. PCR-based detection of bacterial DNA after antimicrobial treatment is indicative of persistent, viable bacteria in the chinchilla model of otitis media. Am J Otolaryngol 1996; 17(2): 106-11.
11. Saukkoriipi A, Leskela K, Herva E, Leinonen M. *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions of healthy children: comparison of real-time PCR and culture from STGG-transport medium. Mol Cell Probes 2004; 18(3): 147-53.
12. Kais M, Spindler C, Kalin M, Örtqvist A, Giske CG. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in lower respiratory tract samples by real-time PCR. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 55(3): 169-78.