

**ORTA KULAK EFÜZYONU VE BEYİN OMURİLİK SIVILARINDA
HAEMOPHILUS INFLUENZAE, STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE VE
MORAXELLA CATARRHALIS'İN SAPTANMASINDA KÜLTÜR VE POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI***

COMPARISON OF CULTURE AND POLYMERASE CHAIN REACTION
METHODS FOR THE DETECTION OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*,
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AND *MORAXELLA CATARRHALIS* IN
CEREBROSPINAL FLUIDS AND MIDDLE EAR EFFUSIONS

**İbrahim JBARA¹, Mehmet BAYSALLAR¹, Abdullah KILIÇ¹
Sertaç YETİŞER², Bülent ÜNAY³, Cengizhan AÇIKEL⁴
Mehmet YAPAR¹, Levent DOĞANCI¹**

ÖZET: Etkin tedavinin varlığına rağmen efüzyonlu orta kulak iltihabı (EOKİ) ve akut bakteriyel menenjit (ABM), çocuklarda halen önemli sağlık sorunları oluşturmaya devam eden enfeksiyonlardır. ABM'li çocukların beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinden sıklıkla sırasıyla *Haemophilus influenzae* tip b, *Neisseria meningitidis* ve *Streptococcus pneumoniae*; EOKİ olan çocuklardan alınan orta kulak efüzyonu (OKE) örneklerinden ise *H.influenzae*, *S.pneumoniae* ve *Moraxella catarrhalis* izole edilmektedir. Bu mikroorganizmaların konvansiyonel kültür yöntemleri ile üretilmeleri zor ve zaman alıcı olduğundan hızlı tanıda sorunlar ortaya çıkmaktadır. Sunulan çalışmada, kültür yöntemi altın standart olarak kabul edilmek suretiyle bu etkenlerin BOS ve OKE örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanmasının tanısallık değeri araştırılmıştır. Bu amaçla, ABM ve EOKİ şüpheli çocuklardan alınan toplam 75 örnek (53 BOS, 22 OKE) çalışmaya dahil edilmiştir. Konvansiyonel yöntemle yapılan BOS kültürlerinin birinden *S.pneumoniae*, OKE kültürlerinin ise birinden *H.influenzae* (tip b dışı) ve ikisinden *M.catarrhalis* suşu izole edilmiştir (toplam izolasyon oranı: %5.3; 4/75). PCR yöntemi ise, *H.influenzae*'nin amplifikasyon ürün boyutunun *S.pneumoniae*'ya yakın olması nedeniyle, *M.catarrhalis* ve *S.pneumoniae* için multipleks PCR, *H.influenzae* için standart PCR şeklinde uygulanmıştır. PCR ile BOS örneklerinin beşinde *S.pneumoniae*, OKE örneklerinin ise üçünde *H.influenzae*, üçünde *M.catarrhalis* ve ikisinde *S.pneumoniae* ve *M.catarrhalis* birlikte tanımlanmıştır (toplam saptama oranı: %17.3; 13/75). PCR yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü BOS örnekleri için sırasıyla %100 ve %92.3, OKE örnekleri için sırasıyla %100 ve %73.7 olarak hesaplanmıştır. Tüm örnekler birlikte değerlendirildiğinde duyarlılık %100, özgüllük %87.3, pozitif öngörü değeri %30.8, negatif öngörü değeri %100 olarak

* 14. Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde (1-4 Mayıs 2004, Prag/Çek Cumhuriyeti) poster olarak sunulmuştur.

¹ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (mbaysallar@gata.edu.tr)

² Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

³ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

⁴ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara.

saptanmıştır. Çalışmamızın verileri, PCR yönteminin, menenjit ve EOKİ etiolojisinde rol oynayan ancak zor üreyen bakterilerin tespit edilmesinde hızlı, güvenilir ve kolay uygulanabilen bir yöntem olarak kabul edilebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: *Menenjit, otit, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, kültür, polimeraz zincir reaksiyonu.*

ABSTRACT: Although the availability of effective antimicrobial therapy, both otitis media with effusion (OME) and acute bacterial meningitis (ABM) are still important infections for children, leading serious health problems. The most frequently isolated bacteria from cerebrospinal fluid (CSF) of ABM patients are *Haemophilus influenzae* type b, *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*, and middle ear effusion (MEE) samples of OME patients are *H.influenzae*, *S.pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, respectively. Since they are fastidious bacteria, various problems may arise in the rapid diagnosis in both ABM and OME settings. In this study, the diagnostic value of polymerase chain reaction (PCR) has been searched for the detection of bacterial DNA in CSF and MEE specimens and evaluated in comparison to conventional culture method accepted as the "gold standard". A total of 75 samples (53 CSF, 22 MEE) collected from meningitis and OME suspected children were included in the study. With the conventional culture method, one *S.pneumoniae* strain was isolated from a CSF sample, and one *H.influenzae* (non-type b) and two *M.catarrhalis* strains were isolated from three of MEE samples (total isolation rate: %5.3; 4/75). Standard PCR protocol was applied for the detection of *H.influenzae*, while multiplex PCR protocol was used for *M.catarrhalis* and *S.pneumoniae*, since *H.influenzae* and *S.pneumoniae* amplification products were of similar size. PCR revealed genomic DNA sequences of *S.pneumoniae* from five of the CSF samples, while three *H.influenzae*, three *M.catarrhalis* and two *S.pneumoniae*+*M.catarrhalis* were detected from MEE samples (total detection rate: %17.3; 13/75). Sensitivity and specificity rates of PCR method were found as 100% and 92.3% for CSF samples, and 100% and 73.7% for MEE samples, respectively, with a total sensitivity of 100%, specificity of 87.3%, positive predictive value of 30.8%, and negative predictive value of 100%. As a result it was concluded that PCR method could be considered as a rapid, reliable and feasible method for the detection of the most common fastidious bacteria that lead to meningitis and OME.

Key words: *Meningitis, otitis, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, culture, polymerase chain reaction.*

GİRİŞ

Nedeni bilinmeyen akut bakteriyel menenjit (ABM), çocuklarda hala ölümler ve nörolojik hasarların önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir. Efüzyonlu orta kulak iltihabı (EOKİ) çocukluk dönemindeki işitme kaybının en önemli nedenlerinden biridir. Hem ABM hem de EOKİ etkili tedavilerine rağmen hala çocuklarda önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir^{1,2}. Çocuklarda ABM olgularının beyin omurilik sıvılarından (BOS) en sık olarak sırasıyla *Haemophilus influenzae* tip b, *Neisseria meningitidis* ve *Streptococcus pneumoniae*^{3,4}, EOKİ olgularından alınan orta kulak efüzyonu (OKE) örneklerinden ise *H.influenzae*, *S.pneumoniae* ve *Moraxella catarrhalis*⁵ izole edilmektedir. Bu mikroorganizmalar yavaş üredikleri ve kültürleri zor olduğu için tespit edilmesinde güçlükler ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte mikroorganizmaya kesin tanı konulması için altın standart kültür olarak kabul edilmektedir⁴.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) özellikle çok küçük miktarlardaki örneklerde ve ampirik olarak antibiyotik tedavisi almış hastalarda, bakterilerin kısa sürede tespit edilmesini sağlamaktadır. PCR aynı zamanda, ölü, yavaş üreyen, kültürü zor olan ve teşhis amaçlı laboratuvarlarda çalışılması tehlikeli patojenlerin belirlenmesinde de faydalı olmaktadır^{2,4}. Bu çalışmanın amacı, BOS ve OKE örneklerinde PCR'in tanısal değerinin araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve kültür işlemleri: Çalışmaya, GATA Kulak Burun Boğaz Kliniği'ne EOKİ öyküsü ve Çocuk Hastalıkları Kliniği'ne menenjit öyküleri ile başvuran çocukluk yaş grubundaki toplam 75 hasta alındı. BOS örnekleri (n=53) klinik olarak ABM şüpheli çocuklardan lomber ponksiyon (LP) ile, OKE örnekleri (n=22) ise, genel anestezi altında dış kulak yoluna povidon-iodin (Betadine) ile antisepsi uygulandıktan sonra mikroskop eşliğinde steril tüplere aspire edilerek alındı. Bakteriyolojik kültür işlemleri hemen gerçekleştirildi, PCR için ayrılan örnekler ise -80°C'de saklandı. İzole edilen bakterilerin tanımlanmasında standart bakteriyolojik yöntemler ve otomatize API NH sistemi (bio Merieux) kullanıldı⁶. *H.influenzae* ATCC 49247, *S.pneumoniae* ATCC 49619 ve *M.catarrhalis* ATCC 25238 kontrol izolatları olarak kullanıldı.

Kültür ve PCR sonuçları alındıktan sonra, hastanın LP öncesi antibiyotik alıp almadığı ve BOS hücre sayıları hasta dosyalarından araştırıldı.

DNA izolasyonu ve PCR: Hasta örnekleri ve kontrol suşları 50 µg/ml proteinaz K ve fenol-kloroform kullanılarak ekstrakte edildi ve etanol ile presipite edilerek 100 µl distile suda tekrar süspanse edildi⁷. Çalışmada kullanılan primerler Tablo I'de gösterildi⁸. *M.catarrhalis* ve *S.pneumoniae* için yapılan multipleks PCR için; 50 µl'lik reaksiyon karışımında 1 x PCR tamponu (Fermentas, Almanya), 400 µl dNTP (Sigma-Aldrich, Almanya), 2.5 mM MgCl₂, 50 pmol her bir primer (primer 2, primer 3 ve universal) ve 0.5 ünite Taq polimeraz (Fermentas, Almanya) kullanıldı. *H.influenzae* (primer 1) için yapılan standart PCR işlemi, kullanılan primer karışımı hariç multipleks PCR işlemi gibi uygulandı. Reaksiyon 40 siklus 94°C'de 30 sn, 52°C'de 30 sn, ve 72°C'de 35 sn olacak şekilde gerçekleştirildi.

Tablo I. PCR'da Kullanılan Primerler⁸

Organizma	Pozisyon	Dizin (5'→3')
<i>H.influenzae</i>	CGT ATT ATC GGA AGA TGA AAG TGC	177-200
<i>S.pneumoniae</i>	AAG GTG CAC TTG CAT CAC TAC C	106-127
<i>M.catarrhalis</i>	CCC ATA AGC CCT GAC GTT AC	416-435
Universal	CTA CGC ATT TCA CCG CTA CAC	682-702

PCR amplifikasyonu sonunda elde edilen ürünün 5 µl'si jel elektroforezde (%1.5 agarose, 1x TBE, 100V) 100 baz çiftlik (bp) moleküler standart (K180-250 UL, Amresco, USA) kullanılarak yürütüldü. Jel etidyum bromür ile boyandı ve UV (Gel Doc 2000, BIO-RAD, USA) kullanılarak görüntülendi. Her bir örnek için PCR iki kez yapıldı. *H.influenzae* amplifikasyon ürünü büyüklüğü *S.pneumoniae*'ya yakın olduğundan ayrı PCR karışımı hazırlanarak işlem yapılırken, *M.catarrhalis* ve *S.pneumoniae* için multipleks PCR işlemi yapıldı.

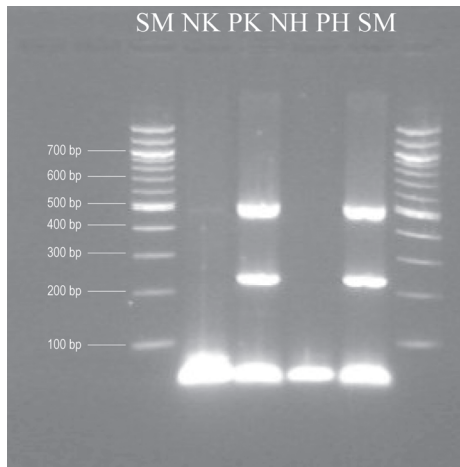
İstatistiksel analiz: Tüm istatistiksel analizler SPSS 10.0 (SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, IL., USA) kullanılarak yapıldı. PCR ve kültür yöntemlerinin her biri için pozitif ve negatif sonuçlar ölçüldü. Bakteri kültürü altın standart kabul edilerek, seçicilik, duyarlılık, negatif ve pozitif öngörü değerleri hesaplandı. Karşılaştırmalarda Mc Nemar testlerinden yararlandı. $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edildi⁶.

BULGULAR

Çalışmada ABM ve OME şüpheli hastalardan alınan toplam 75 örnek işleme alınmış ve elde edilen bulgular Tablo II'de gösterilmiştir. Pozitif kontrol ve pozitif hasta örneklerinde *H.influenzae* amplifikasyon bantları *S.pneumoniae* amplifikasyon bandıyla yakın büyüklükte olduğundan 500 bp seviyesinde örtüşmüşlerdir. Bu nedenle *S.pneumoniae* ve *M.catarrhalis* için multipleks PCR çalışılıp Şekil 1'deki jel görüntüsü elde edilirken, *H.influenzae* için ayrıca

Tablo II. Bakteriyolojik Kültür ve PCR Sonuçları

Örnek (sayı)	Bakteriler	Kültür Pozitif (%)	PCR Pozitif (%)
BOS (53)	<i>H.influenzae</i>	0	0
	<i>S.pneumoniae</i>	1 (1.9)	5 (9.4)
	<i>M.catarrhalis</i>	0	0
OKE (22)	<i>H.influenzae</i>	1 (4.5)	3 (13.6)
	<i>S.pneumoniae</i>	0	0
	<i>M.catarrhalis</i>	2 (9.1)	3 (13.6)
	<i>S.pneumoniae</i> + <i>M.catarrhalis</i>	0	2 (9.1)
Toplam (75)		4 (5.3)	13 (17.3)



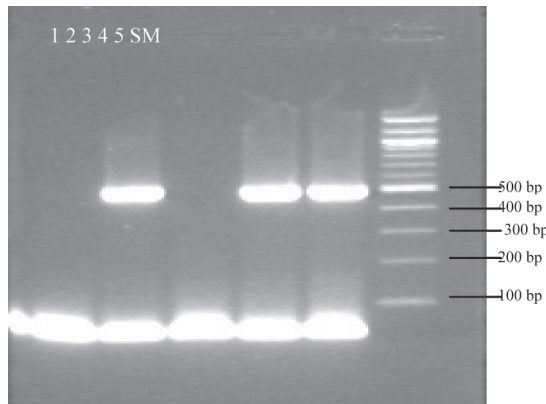
Şekil 1. *S.pneumoniae* ve *M.catarrhalis* multipleks PCR sonuçlarının jel görüntüsü. SM: Moleküler standart; NK: Negatif kontrol; PK: Pozitif kontrol; NH: Negatif hasta; PH: Pozitif hasta.

PCR çalışması yapılmak zorunda kalınmış ve Şekil 2'deki jel görüntüsü elde edilmiştir. BOS ve OKE örneklerinin kültür ve PCR sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo III'de verilmiştir. Bakteri izolasyonu için altın standart kabul edilen kültüre göre PCR için BOS örneklerinde %100 duyarlılık, %92.3 özgüllük, %20 pozitif öngörü değeri ve %100 negatif öngörü değeri hesaplanmıştır. Bu değerler OKE örnekleri için sırasıyla %100, %73.7, %37.5 ve %100 olarak saptanmıştır. Tüm örnekler birlikte değerlendirildiğinde duyarlılık %100, özgüllük %87.3, pozitif öngörü değeri %30.8, negatif öngörü değeri %100 olarak hesaplanmıştır.

BOS ve OKE örneklerinin kültür ve PCR sonuçları ile bunların Ki-kare yöntemiyle hesaplanan P değerleri Tablo III'de görülmektedir. Kültür pozitif bulunan örnekte nötrofil sayısının 700 hücre/mm³ olduğu ve hastanın LP öncesi antibiyotik kullanma hikayesi olmadığı belirlenmiştir. PCR pozitif bulunan örneklerden ikisinin bilgilerine ulaşılamamış, ulaşılan iki PCR pozitif örnekte de hücre mevcudiyeti ve antibiyotik alma hikâyesine rastlanmamıştır.

Tablo III. BOS ve OKE ile Elde Edilen Bakteri Kültürü ve PCR İstatistikleri

	PCR	Kültür			p
		Pozitif	Negatif	Toplam	
BOS	Pozitif	1	4	5	0.027
	Negatif	0	48	48	
OKE	Toplam	1	52	53	0.008
	Pozitif	3	5	8	
	Negatif	0	14	14	
Tüm olgular	Toplam	3	19	22	<0.001
	Pozitif	4	9	13	
	Negatif	0	62	62	
	Toplam	4	71	75	



Şekil 2. *H.influenzae* PCR sonuçlarının jel görüntüsü. SM: Moleküler standart (Biolabs, New England 100 bp); Hat 1: Negatif kontrol; Hat 2: Pozitif kontrol; Hat 3: Negatif örnek; Hat 4 ve 5: Pozitif örnekler.

TARTIŞMA

Akut bakteriyel menenjitin özellikle çocuklarda hala önemli ölüm ve nörolojik hasarlara, EOKİ'nin yine çocuklarda önemli işitme kayıplarına neden olmaları, şüpheli olgularda olası etkenlerin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır^{3,9}. EOKİ'da sık izole edilen *H.influenzae*, *S.pneumoniae* ve *M.catarrhalis*'den ilk ikisine aynı zamanda ABM olgularında da rastlanmaktadır⁵. Etkenlerin genellikle zor üreyen bakteriler olması ve öncesinde antibiyotik kullanılmış olma olasılığı gibi nedenlerden dolayı, konvansiyonel kültür yöntemleri ile EOKİ ve ABM'e neden olan mikroorganizmaların tespit edilmesinde zorluklar ortaya çıkmaktadır^{1,10}. Post ve arkadaşları¹¹ PCR verilerinin ışığı altında, EOKİ olgularının yarısında *H.influenzae*'nin rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bir çalışmada, mevcut bakteriyel kültür teknikleri ile, akut orta kulak iltihaplarında %20-30 ve kronik orta kulak iltihaplarında %30-40 oranında etken bakterinin kültür yöntemleri ile tanımlanamadığı bildirilmektedir¹². Özellikle ABM tablosunun hızlı ilerlemesi ve konvansiyonel yöntemlerle etkenin tanımlanmasınının 36 saat veya daha uzun sürebilmesi gibi nedenler de göz önüne alındığında, bu tür olgularda son zamanlarda PCR gibi hızlı tanı yöntemleri önerilmektedir^{1,10,13}.

Kanra ve arkadaşları⁴ 1996 yılında yaptıkları bir çalışmada, ABM şüpheli olguların BOS kültürlerinden %13.6 (8/59) oranında *S.pneumoniae* veya *H.influenzae* izole etmişlerdir. Yine Balganes ve arkadaşları³ ABM şüpheli olguların %25.7'sinde (17/66) aynı iki bakteriyi izole edebilmişlerdir. Çalışmamızda saptanan çok düşük izolasyon oranı (%1.9), olgu seçimindeki klinisyen yaklaşımı, hastanemizdeki hasta popülasyonunun sosyoekonomik düzeyi ve ilişkili olarak rutin çocukluk aşılama esnasında özellikle *H.influenzae*'ya karşı aşılama artışı gibi faktörlerden kaynaklanıyor olabilir. Kanra ve arkadaşları⁴ literatür verilerine dayanarak *H.influenzae* tip b (Hib)'nin yıllardır Türk çocuklarında invaziv enfeksiyon oluşturmadığını, bunun da *H.influenzae* ve *E.coli* arasındaki antijenik çapraz reaktiviteye bağlı olabileceğine inandıklarını ifade etmişlerdir. *E.coli* K100'ün kapsül antijeninin immünokimyasal olarak Hib'e yakın olduğu ve bu mikroorganizmaya karşı oluşan antikorların çocukları Hib enfeksiyonlarından da koruduğu düşünülmektedir⁴. Kanra ve arkadaşlarının⁴ kültür pozitiflik oranlarındaki yükseklik ayrıca, BOS'da hemen kantitatif hücre sayımı yapmış ve polimorfonükleer lökosit olmayan veya lenfosit baskınlığı gösteren örnekleri çalışma dışı tutmuş olmalarından kaynaklanabilir. Zira çalışmamızda, alınan BOS örnekleri hücre sayım sonuçları dikkate alınmadan mikrobiyolojik işleme tabi tutulmuş ve ayrıca zaten çok az olan BOS örneğinin bir kısmı PCR için de ayrıldığından Gram boyama yapılamamıştır. Kültür ve PCR sonuçları alındıktan sonra, hasta dosyalarından hastanın LP öncesi antibiyotik alıp almadığı ve BOS hücre sayıları araştırıldığında kültür pozitif bulunan örnekte nötrofil sayısının 700 hücre/mm³ olduğu ve LP öncesi antibiyotik kullanma hikayesi olmadığı belirlenmiştir. Hasta dosyalarındaki bilgilerden ayrıca bazı örneklerde, çeşitli sayılarda nötrofillerin yanı sıra lenfositlerin de bulunduğu gözlenmiş, ancak bu örneklerde ne kültür ne de PCR pozitifliği görülmüştür. PCR pozitif bulunan örneklerden ikisinin bilgilerine ulaşılammış, ulaşılan iki PCR pozitif örnekte de

hücre mevcudiyeti ve antibiyotik kullanma hikayesine rastlanmamıştır. Bu durum daha çok sayıda kültür negatif – PCR pozitif örnekte inceleme yapılmasını gerekli kılmaktadır. Van Ketel ve arkadaşları¹⁴ yaptıkları çalışmada, 200 BOS örneğinin kültüründen 40 *H.influenzae* ve 16 *S.pneumoniae* izole etmeyi başarmışlardır. Bu araştırmacılar, kültür pozitif örneklerin bir tanesi hariç hepsinde PCR pozitifliği de saptamışlar, ayrıca *H.influenzae* dışı bakteriler de dahil edildiğinde, 40 döngülük amplifikasyon ile %5 örnekte yanlış pozitiflik belirlemişlerdir. Bu yanlış pozitiflikleri kontaminasyona bağlamışlar ve 35 döngülük amplifikasyon ile tekrarladıklarında yanlış pozitifliklerin yok olduğunu gözlemişlerdir¹⁴.

Gök ve arkadaşları⁹ 37 OKE örneği üzerinde yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada, en önemli üç sorumlu bakteri (*S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*) açısından %24.3 oranında kültür pozitifliği ve %94.5 oranında PCR pozitifliği saptamışlardır. Yine Matar ve arkadaşları¹⁵ 47 örnek üzerinde aynı bakteriler için %21.3 kültür ve %70.2 PCR pozitifliği, Liederman ve arkadaşları¹² 19 yetişkin örneği üzerinde %5.3 kültür ve %78.9 PCR pozitifliği, Hendolin ve arkadaşları¹ 25 örnek üzerinde %32 kültür ve %76 PCR pozitifliği, Post ve arkadaşları¹¹ ise 97 örnek üzerinde %28.9 kültür ve %77.3 PCR pozitifliği bulmuşlardır. Sadece *H.influenzae* açısından değerlendirildiğinde, kültür ve PCR pozitiflik oranlarını Gök⁹ sırasıyla %10.8 ve %70.3, Matar¹⁵ %21.3 ve %95.7, Liederman¹² %0 ve %26.3, Hendolin¹ %8 ve %52, Post¹¹ ise %21.6 ve 54.6 olarak saptamışlardır. Her bir çalışmada değişik PCR teknikleri ve değişik primerlerin kullanılmış olması ve her çalışmadaki hasta popülasyonunun örnek alımı öncesindeki antibiyotik kullanma hikayelerinin farklı olma olasılığı oranlar arası farklarda rol oynamış olabilir. BOS örneği ile ilgili olarak, Van Ketel ve arkadaşlarının¹⁴ çalışması dışında bu çalışmadaki bakteriler açısından kültür ve PCR verilerinin basitçe karşılaştırılmasına yönelik çalışmaya rastlanmamıştır. Bu oranlar aynı zamanda kültür negatif – PCR pozitif olguları vurgulamaktadır. Van Ketel ve arkadaşlarının¹⁴ bir olgusu dışında ne diğer araştırmacıların çalışmalarında ne de bu çalışmada kültür pozitif – PCR negatif olguya rastlanmamıştır.

Hendolin ve arkadaşları¹, ABM ve EOKI'da çeşitli mikroorganizmaların izole edilmesi nedeniyle çalışmalarında multipleks PCR yöntemini kullanmışlar, önemli derecede zamandan (sadece 7 saat sürmektedir) ve malzemeden tasarruf edildiğini ve bu yöntemin aynı zamanda sınırlı miktarda örneklerle çalışmada ideal olduğunu bildirmişlerdir. Rutin uygulamalarda hala %49.2 kültür pozitifliği olmasına rağmen, bakteriyel menenjit tanısında, aynı zamanda ucuz olan bakteri kültürü hala "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Araştırmamızda bulduğumuz BOS örnekleri için %100 duyarlılık ve %92.3 özgüllük ile OKE örnekleri için %100 duyarlılık ve %73.7 özgüllük değerleri daha hızlı olan PCR yönteminin bakteriyel menenjitin erken laboratuvar tanısında önemli bir alternatif olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ve birçok araştırmacının yukarıda verilen sonuçları, kültür negatif BOS ve OKE örneklerinde PCR temelli yöntemlerin bakteriyel DNA'yı saptamadaki yeteneklerini açıkça ortaya koymaktadır.

Sonuçlarının 7 saat gibi kısa bir zamanda alınıp kültürden çok daha hızlı olması ve zor üreyen mikroorganizmaları çeşitli nedenlerle üretememe gibi risklerinin olmaması PCR konusundaki olumlu yorumları desteklemektedir.

Akut bakteriyel menenjit ve OME olgularının tanısı için alınacak örneklerde, kültür için özel besiyerleri ve standart tekniklerin kullanımı ve PCR gibi hızlı ve duyarlı tekniklerin kullanılmaya başlanmış olmasının yanı sıra mikrobiyoloji uzmanı ve klinisyen arasındaki iyi bir diyalogun, bu olgulardaki etken bakterilerin belirlenebilme ve dolayısıyla doğru tedavi protokollerinin uygulanabilme problemini çözebileceği veya en azından asgariye indirebileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Hendolin PH, Markkanen A, Ylikoski J, Wahlfors JJ. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions. J Clin Microbiol 1997; 35: 2854-8.
2. Hotomi M, Tabata T, Kakiuchi H, Kunimoto M. Detection of *Haemophilus influenzae* in middle ear of otitis media with effusion by polymerase chain reaction. Int J Pediatr Otorhinolaryngology 1993; 27: 119-26.
3. Balganes M, Lalitha MK, Nathaniel R. Rapid diagnosis of acute pyogenic meningitis by a combined PCR dot-blot assay. Mol Cell Probes 2000; 14: 61-9.
4. Kanra G, Akan Ö, Ecevit Z, Ceyhan M, Seçmeer G. Microorganisms involved in acute bacterial meningitis in children and the role of *Haemophilus influenzae*. Turk J Pediatr 1996; 38: 407-12.
5. Sakamoto N, Kurono Y, Ueyama T, Mogi G. Detection of *Haemophilus influenzae* in adenoids and nasopharyngeal secretions by polymerase chain reaction. Acta Otolaryngol (Stockh) 1996; 523: 145-6.
6. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (eds). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 1998, 10th ed. Mosby Inc. Missouri, USA.
7. Rubin LG, Rizvi A. PCR-based assays for detection of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3, 14, 19F and 23F in respiratory specimens. J Med Microbiol 2004; 53: 595-602.
8. Hendolin PH, Paulin L, Ylikoski J. Clinically applicable multiplex PCR for four middle ear pathogens. J Clin Microbiol 2000; 38: 125-32.
9. Gök U, Bulut Y, Keleş E, Yalçın S, Doymaz MZ. Bacteriological and PCR analysis of clinical material aspirated from otitis media with effusions. Int J Pediatr Otorhinolaryngology 2001; 60: 49-54.
10. Radström P, Backman A, Qian N, Kragstjerg P, Pahlson C, Olcen P. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and streptococci using a seminested PCR strategy. J Clin Microbiol 1994; 32: 2738-44.
11. Post JC, Preston RA, Aul JJ, et al. Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion. JAMA 1995; 273: 1598-604.
12. Liederman EM, Post JC, Aul JJ, et al. Analysis of adult otitis media: polymerase chain reaction versus culture for bacteria and viruses. Ann Otol Rhinol Laryngol 1998; 107: 10-5.
13. 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: 1553-8.
14. Van Ketel RJ, De Wever B, Van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. J Med Microbiol 1990; 33: 271-6.
15. Matar GM, Sidani N, Fayad M, Hadi U. Two-step PCR-based assay for identification of bacterial etiology of otitis media with effusion in infected Lebanese children. J Clin Microbiol 1998; 36: 1185-8.