



Kolesteatoma ve Timpanosklerotik Plak Oluşumunda Bakterilerin Rolü: DNA Dizi Analizine Dayalı Moleküler Araştırma

Program Kodu: 3001

Proje No: 116S078

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Mahmut Tayyar KALCIOĞLU

Araştırmacılar:

Dilek GÜLDEMİR

Özlem ÜNALDI

Bekir ÇELEBİ

EKİM 2017

İSTANBUL



ÖNSÖZ

TÜBİTAK tarafından 116S078 proje numarası ile desteklenen ve 3001 proje kapsamında gerçekleştirilen bu çalışmada Dünya üzerinde milyonlarca insanı etkileyen bir hastalık olan Kronik otitis media'ya bağlı gelişen kolesteatoma veya timpanoskleroz durumunda varlığı muhtemel olan mikrobiyotanın, gelişen moleküler teknolojinin ışığında 16s rRNA gen sekans analizi ile ortaya konması amaçlanmış ve yapılacak metagenomik analiz ile elde edilecek verilerle literatüre katkı sağlamak umulmuştur. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmada 65 timpanosklerotik plak ve 37 kolesteatoma örneği üzerinden araştırma gerçekleştirilmiş ve 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonu ile pozitif tespit edilen 32 örneğin 28'i Sanger dideoksi yöntemi ile sekanslanmıştır. Ayrıca seçilmiş 44 örnekte 16S rRNA gen bölgesi metagenomiks analize alınmıştır. Elde edilen veriler başta stafilokoklar olmak üzere çok geniş spektrumda gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmaların bu patolojilerde yer aldığını göstermiştir. Bu veriler, aynı zamanda kronik inflamatuvar kulak hastalıklarının patogenezinde mastoid ve orta kulak mikrobiyotasının rolünü anlamamıza olanak sağlamıştır ve tedaviye yön vermek için önem arz etmektedir.

TÜBİTAK proje desteği sayesinde dünya literatüründe ilk defa metagenomiks analize dayalı araştırmalar gerçekleştirilmiş ve bu hastalığın tanısı ve patogenezi konusuna ışık tutacak önemli veriler ortaya konulmuştur. Bunun için teşekkürlerimizi sunarız.



İÇİNDEKİLER

1 – ÖZET	Sayfa 1
2 – ABSTRACT	Sayfa 2
3 – GİRİŞ	Sayfa 3
4 - LİTERATÜR ÖZETİ	Sayfa 4-6
5 – GEREÇ VE YÖNTEM	Sayfa 7-9
6 – BULGULAR	Sayfa 10-11
7 – TARTIŞMA / SONUÇ	Sayfa 12-15
8 – KAYNAKLAR	Sayfa 16-18
9 –TABLO VE ŞEKİLLER	Sayfa 19-29

1. ÖZET

Amaç: Kronik otitis media, milyonlarca insanı etkiler ve kolesteatom veya timpanikleroz gibi ek patolojilere neden olabilir. Bu tür hastalıkların patofizyolojisi tamamen bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı 16s rRNA sekansı analizi ile kolesteatom ve timpanosklerotik plaklardaki tüm bakteriyel patojenleri tespit etmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda kronik otitis media nedeniyle operasyon geçiren hastalardan elde edilen 102 örnek (65 timpanosklerotik plak, 37 kolesteatoma) incelenmiştir. DNA ekstraksiyonu yapılan tüm örneklerde 16S rRNA gen bölgesine özgü olarak tasarlanan primerler ile PCR amplifikasyonu yapıldı. 16S rRNA PCR pozitif örnekler Sanger yöntemi ile sekanslandı. Seçilen 46 örnek, İon 16S™ Metagenomik kiti kullanılarak yeni nesil sekanslama (YNS) yöntemi ile analiz edildi.

Sonuç: Sanger dizilemesiyle 102 numunenin 18'inde (%17.6) spesifik bir tür veya cins tanımlanmıştır. Bu 18 örnekten 12'si timpanosklerotik plak, 6'sı ise kolesteatomdu.

Tanımlanan bakteriler *Alloicoccus otitis*, *Staphylococcus aureus*, *S. auricularis*, *Alcaligenes sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. epidermidis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Escherichia coli*, *S. sciuri*, *S. caprae*, *Parvimonas sp.*, *Bacillus sp.*'dir. YNS yöntemiyle 46 test numunesinin 44'ünde (% 95.7) iki veya daha fazla farklı bakteri buldu. YNS ağırlıklı olarak *Staphylococcaceae* (18 örnek), *Corynebacteriaceae* (15 örnek, *Turicella otitidis*'e sahip 6 örnek), *Clostridiales* Family XI'i, Incertae Sedis (7 samples), *Alloicoccus otitis* (4 örnek) ve *Propionibacteriaceae* (4 numune) tespit etmiştir.

Tartışma: Orta kulakta önceden bilinenin aksine çeşitli mikrobiyal topluluklar flora oluşturmaktadır. Moleküler biyolojik çalışmaların kullanımı, bu bakterilerin tanımlanması daha kolay hale getirmiş ve kronik inflamatuvar kulak hastalıklarının patogeneğinde mastoid ve orta kulak mikrobiyotasının rolünü anlamamızı kolaylaştırarak tedaviye yön vermemizde önemli hale gelmiştir.

Anahtar Kelimeler: kolesteatoma, timpanoskleroz, 16S rRNA PCR, DNA bazlı sekans analizi, bakteri

2. ABSTRACT

Objective: Chronic otitis media affects millions of people around the world and can cause additional pathologies such as cholesteatoma or tympanosclerosis. Pathophysiology of such conditions is not completely known. The aim of this study was to identify all bacterial pathogens in cholesteatoma and tympanosclerotic plaques by 16s rRNA sequence analysis.

Material and Methods: A total of the 102 samples (65 tympanosclerotic plaques, 37 cholesteatomas) obtained from patients undergoing operation due to chronic otitis media were evaluated. PCR was performed using the primers designed for amplification of bacterial 16S rRNA gene. 16S rRNA PCR positive samples were sequenced by Sanger method. Selected 46 samples were analyzed with next-generation sequencing (NGS) method by using Ion 16S™ Metagenomics kit.

Results: Sanger sequencing identified a specific bacterium in a total of 18 (17.6) of the 102 samples tested. Of these 18 samples, 12 were tympanosclerotic plaques and 6 were cholesteatoma. The identified bacterium was *Alloicoccus otitis*, *Staphylococcus aureus*, *S.auricularis*, *Alcaligenes sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *S.epidermidis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Escherichia coli*, *S. sciuri*, *S. caprae*, *Parvimonas sp.*, and *Bacillus sp.* NGS found one or more than two different bacteria in 44 (95.7%) of the 46 tested samples. NGS predominately identified *Staphylococcaceae* (18 samples), *Corynebacteriaceae* (15 samples; 6 samples having *Turicella otitidis*), *Clostridiales* Family XI. Incertae Sedis (7 smples), *Allio-coccus otitidis* (4 samples), and *Propionibacteriaceae* (4 samples).

Conclusion: The middle ear is inhabited by more diverse microbial communities in contrast to previously known. With the usage of molecular biological studies, it has become easier to identify these bacteria, and improve our understanding of the role of the mastoid and middle ear microbiota in the pathogenesis of chronic inflammatory ear diseases and important to give direction to the treatment.

KEYWORDS: cholesteatoma, tympanosclerosis, 16S rRNA PCR, DNA base sequence analysis

3. GİRİŞ

Kolesteatoma, ilk olarak 1838 yılında Johannes Müller tarafından, kola (Choledoc), stearin ve oma (tümör) atıflarıyla tanımlanmıştır (Ferlito (1993)). Ancak tümör ile gerçek bir ilişki yoktur. Olmaması gereken yerde cilt varlığı olarak tanımlanabilir. Normalde kötü huylu değildir ancak ilerleyici ve yıkıcı etkisi nedeniyle orta kulak, attik ve mastoid bölgede çok ciddi sorunlara neden olabilir (Özgirgin (2013)).

Timpanoskleroz aşırı kolajen fibrotik dokunun orta kulakta biriktiği bir iyileşme bozukluğudur. Kolajen yeterli bir kalınlığa ulaştığında füzyon meydana gelir ve homojen bir hiyalin kütlesi oluşur. Ardından kalsiyum ve fosfat kristalleri bu kitleye çökerek patolojik dokunun son halini oluşturur. Bu lezyon, orta kulaktaki kronik enfeksiyon ve bununla bağlantılı inflamasyon sonucu ortaya çıkar (Özgirgin (2013)).

Daha yoğun olarak kolesteatoma olmakla birlikte her iki klinik durumunun mikrobiyolojik aktivite ile ilişkisi olduğu düşünülmüş olmakla birlikte olası faktörleri belirlemek için yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır ve etiyopatojenez hakkında kesin bir görüş oluşturmak için yeterli değildir (Mann (1986), Li vd (2007), Iriz vd (2011), Dinç vd (2016)). Günümüzdeki teknolojik gelişmeler, daha önce tespit imkanı olamayan farklı mikroorganizmaların saptanabilmesini mümkün kılmaktadır. Bu çalışmada, kolesteatom ve timpanosklerotik plak örneklerinde faktör spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yönteminin yanı sıra, örneklerdeki tüm bakterileri tespit etmek için 16S rRNA sekansı analizine dayanan moleküler biyoloji tekniğini kullanarak literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

4. LİTERATÜR ÖZETİ

Kolesteatom; chole=safra, stearin= yağ, ve oma=tümör isimlerinin çağrışımları ile ilk kez 1838 yılında Johannes Müller tarafından tarif edilmiş bir lezyondur (Ferlito, 1993). Gerçek anlamda safra ve yağ asitleri içeren bir tümörle ilişkisi yoktur; derinin bulunmaması gereken yerlerde var olması şeklinde tarif edilebilir. Genel olarak orta kulak, attik ve mastoid yapıları tehdit eden, normalde malign olmayan fakat ilerleyiş ve sebep olduğu bulgular nedeniyle agresif seyirli bir epidermal ve bağ dokusu yapısıdır. Oluşum mekanizmaları ile ilgili birçok teori öneri sürülmüştür. Bunlar epitelyal metaplazi teorisi, epitelyal migrasyon teorisi, bazal hiperplazi teorisi, retraksiyon cepleri ve invajinasyon teorisi ve posttravmatik, postoperatif ve iatrojenik şeklindedir. Günümüzde en sık kabul gören görüş retraksiyon cepleri sebebiyle kolesteatom oluşum mekanizmasıdır. Son yıllarda immünohistokimyasal uygulamalar, polimeraz zincir reaksiyonları, insitu hibridizasyon yöntemleri, hücre ve doku kültürleri ve hayvan modelleri ile yapılan araştırmalar kolesteatom oluşum patogenezi anlamada büyük bir yol alınmasını sağlasalar da kolesteatomun orta kulağa nasıl ulaştığı ve ilerlediği hakkında kesin bir fikir birliği sağlanmamıştır (Özgirgin, 2013).

Kolesteatomlu olgularda basit kronik otitis mediadan farklı olarak orta kulak florasında, kolesteatom ve granülasyon dokusunda egemen olan bakterilerin gram (-) basil ve aneoroblarla beraber mikobakterilerin olabileceği ileri sürülmüştür (Özgirgin, 2013). 1980'lerden günümüze kolesteatom ve kronik otitis mediadaki bakteriyel kolonizasyon oluşumları çeşitli bilimsel çalışmalarla araştırılmış olup Brook (1981) yayınlamış olduğu makalesinde 28 hastadan elde ettiği kolesteatom örneklerinde aerob ve anaerob bakterilere rastlamış olup en sık aerobik bakterileri *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *S. aerus* ve *E. coli* olarak; en sık anaerobik bakterileri de gram (+) koklar, *Bakteroides* sp., *Clostridium* sp ve *Bifidobacterium* sp. şeklinde rapor etmiştir. Atallah (2000), 88 hastanın dahil olduğu çalışmada, hastalardan alınan kolesteatom örneklerinden en sık *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *Proteus* sp. ürediğini rapor etmiş ve ayrıca 15 hastada da fungus (en sık *Aspergillus* sp. ve *C. albicans*) ürediğini bildirmiştir. Chole ve Faddis (2002), 24 adet insan ve 22 adet deney hayvanın kullanıldığı çalışmalarında, alınan örneklerin büyük çoğunluğunda gram (+) ve gram (-) bakteri ürediğini, ve bunların da kolesteatomun biofilm matriksinde oluştuğunu bildirmişlerdir. Ronchetti vd. (2003) 32 hastadan topladıkları örnekleri *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Mycoplasma pneumoniae* açısından incelemişler ve örneklerin %50'sinde *C. pneumoniae*'ye, dört örnekte *H. influenzae*'ya ve hiçbir örnekte *M. pneumoniae*'ya rastlamışlardır ve kolesteatom oluşumunda *C. pneumoniae*'nin sorumlu olabileceğini bildirmişlerdir. Ricciardiello vd. (2009) yaptıkları çalışmalarında da örneklerde aynı şekilde aerobik ve anaerobik bakteriler ve fungusların

bulunabileceğini ve florokinolon ve 3. kuşak sefalosporinlerin anaerobik etkinliklerinden dolayı tedavide yararlı olabileceğini rapor etmişlerdir. Madana vd. (2011)'nin çalışmalarında da *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *Proteus* sp. en sık saptanan bakteri türleri olarak bildirilmiştir. Kaya vd. (2013)'nin çalışmasında kronik otitis media ve kolesteatomda biofilm oluşumu araştırılmış ve bu dokularda oluşabileceği belirtilerek, tedavide cerrahi esnasında hipertrofik mukozanın da mutlaka çıkarılması gerektiği vurgulanmıştır.

Kolesteatomun histopatolojik incelemesinde özellikle agresif tipinde epitelde karakteristik olarak papiller hiperplazisi ve yaygın koilositoz gözlenir. Bu karakteristik özellikler Human Papilloma Virüs'ün yaptığı etkilere benzer olmasından ötürü bazı çalışmalarda kolesteatoma neden olarak HPV olup olmayacağı araştırılmış ve çoğunda anlamlı pozitif sonuçlar elde edilmiş, fakat kontrol grubu içeren ve HPV'nin bilinen yada bilinmeyen tiplerini ayırt edebilecek yeni tekniklerin yer alacağı farklı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Bergmann vd., 1994; Stremlau vd., 1995; Bai vd., 2000; Chao vd., 2000; Ferekidis vd., 2006).

Effat ve Madany (2014) kolesteatomda fungus izolasyonuna yönelik olarak yaptıkları çalışmalarında %89 oranında fungus ürediğini rapor etmişler ve hastalık gelişiminde ve özellikle kötü kokunun oluşmasında fungusların neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Timpanoskleroz orta kulakta aşırı miktarda kollajenöz fibrotik dokunun biriktiği bir iyileşme bozukluğudur. Kollajen yeterli kalınlığa ulaştığında füzyona uğrar ve homojen bir hyalin kitlesi oluşur. Sonrasında da kalsiyum ve fosfat kristalleri bu kitlenin içine çökerek patolojik dokunun son halini oluşturur. Bu lezyon orta kulakta kronik enfeksiyon ve buna bağlı oluşan enflamasyon sonucunda meydana gelmektedir. Ventilasyon tüpü yerleştirmek gibi timpanik membrana cerrahi travma öyküsü olan hastalarda insidansi daha yüksektir (Özgirgin, 2013). Oluşumunda hücre dışı lizozomal aktivite ve lokal immunolojik aşırı duyarlılık gibi başka sebepler de öne sürülmüştür (Mann vd., 1980). Fakat patofizyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Literatürde enfeksiyöz sebeplerin de bu patolojiye sebep olabileceği üstünde durulmuş olsa da yeterli miktarda araştırma yapılmamıştır (Mann, 1986; Li vd., 2007; Iriz vd., 2011; Dinç vd., 2015).

Mann, 1986 yılında yaptığı bir hayvan modelinde timpanosklerozu araştırmış ve orta kulağa *Streptococcus pyogenes* inokülasyonu ve parenteral D3 vitamini verdiği ratlarda timpanosklerozun klasik bulgularının oluştuğunu tespit etmiştir. Li vd. (2007)'nin çalışmasında 21 adet guinea pig kullanılmış ve hayvanların orta kulaklarına *S. aureus* inoküle edilmiş. Bir, 3 ve 6. aylarda hayvanlar incelendiğinde bir kısmında timpanoskleroz oluştuğu saptanmış ve bu modelin timpanoskleroz araştırmalarında kullanılabileceği bildirilmiştir. 2011'de Türkiye'den yapılan bir çalışmada 14 timpanosklerozlu ve 26 kronik otitin farklı formları olan hastaların orta kulaklarından cerrahi işlem esnasında alınan mukoza

örneklerinde *H. pylori* araştırması yapılmış ve timpanosklerozlu hastalarda *H. pylori* birlikteliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuş (Iriz vd., 2011). Fakat yine Türkiye’den 2015 yılında rapor edilen bir çalışmada ise timpanosklerozu bulunan 30 hasta *Chlamydia pneumoniae* ve 35 hasta *Helicobacter pylori* için PCR yöntemi ile taranmış ve bütün sonuçlar negatif olarak rapor edilmiş; *C. pneumoniae* ve *H. pylori* ile timpanoskleroz birlikteliği arasında bir korelasyon olmadığı öne sürülmüştür (Dinç vd., 2015).

Sunulan literatür taramalarında da görüleceği gibi yapılan çalışmalarda araştırmacılar spesifik etkenleri araştırmaya yönelik çalışmalarında kolesteatoma ve timpanosklerotik örneklerde bazı mikroorganizmaların bulunabileceğini göstermişlerdir. Ancak, araştırmaların hiçbirinde, bu projede olduğu gibi örneklerde olabilecek herhangi bir mikroorganizmanın DNA’sını çoğaltarak onun gösterilmesine dayanan moleküler biyolojik çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle projemizde daha önce saptanmış olan mikroorganizmaların bulunması yanında, yeni bakterilerin saptanabilme olasılığı mevcuttu. Yapılan ön çalışmalarımızın sonuçları bu hipotezimizi desteklemekteydi. Bu durum projemize özgün değer kazandırmıştır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1.Kolesteatoma ve timpanosklerotik örneklerin toplanması, sınıflandırılması ve transferi

Çalışmada kullanılan örnekler, kronik otitis media nedeniyle ameliyat edilen hastalardan alınmıştır. Ameliyatın bir gereği olarak cerrahi alandan çıkartılan kolesteatoma ve timpanosklerotik plaklar ependorf tüplerine yerleştirildi. Tüpler serum fizyolojik ile

doldurularak örneklerin bunun içine tamamen gömülmesi sağlandı. Numuneler -20 derece dondurucuda saklandı. Her örnek, oluşturulan Excel dosyasında numaralandı ve hastanın yaşı ve cinsiyeti gibi demografik detaylar kaydedildi. Bu numaralar, ilgili numunenin yerleştirildiği ependorf tüpünde de yazılarak eşleştirildi. Numuneler, laboratuvar örnekleri nakliye kurallarına uyularak analizlerin gerçekleştirileceği Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ankara Hıfzıssıhha Enstitüsü Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderildi.

5.2. DNA İzolasyonu

Doku numuneleri MagNA Lyser cihazında (Roche Diagnostic, Rotkreuz, İsviçre) MagNA Lyser Green Beads kullanılarak homojenize edildi. 250 µL TE tampon (10 mM Tris-HCl, 1 mM disodyum EDTA, pH 8.0.) ve 1.4 mm çaplı seramik beads ile dolu olan numune tüpüne 25 µg doku ilave edildikten sonra homojenizasyon cihazına yerleştirildi. Daha sonra, homojenleştirilmiş doku, bir QIAamp DNA mini kiti (Qiagen, Hilden Almanya) tarafından üreticinin talimatlarına uygun olarak DNA ekstraksiyonu için kullanıldı. Kısaca, 200 uL homojenize edilmiş numune, 20 µL Proteinaz K ve 180 ATL tampon ile karıştırıldı ve 56 ° C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından 200 uL AL tampon eklenerek 70 ° C'de 10 dakika inkübe edildi. İki yüz mikronluk etanol ilave edildi ve DNA bir QIAamp dönme kolonu üzerinde toplandı. DNA'nın 100 µL AW tamponunda ayrıştırılmasından sonra DNA, Qubit 2.0 florometresi (Life Technologies, Carlsbad, CA, ABD) kullanılarak nicelleştirildi ve daha ileri analiz edilene kadar -20 ° C'de saklandı.

5.3. 16S rRNA amplifikasyonu

16S rRNA gen bölgesi, 27 ileri (7F 5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3 ') ve 1492 ters (1492R 5'-GGTTACCTTGTTACG ACTT-3') primerleri kullanılarak toplam 102 numunede amplifiye edildi (7). Her bir PCR karışımı, toplam 50 µL reaksiyon karışımı içinde, ileri ve geri primerlerden her biri 20 pmol, 5 µl kalıp DNA ve 25 µL 2X PCR Master karışımı (Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix, Life Technologies, ABD) içeriyordu. Amplifikasyon koşulları sırasıyla: DNA'nın ilk denatürasyonu için 95°C'de 15 dakika, ardından 40 döngü olarak uygulanan; 94 °C'de 45 saniye denatürasyon, 58 °C'de 45 saniye bağlanma ve 72 °C'da 1 dakika uzama ve takiben 72°C 10 dakika son uzama döngüsü şeklindedir. Amplifiye ürünler% 2 agaroz jeli üzerinde 100 V'de 1 saat süreyle ayrılmış ve DNA bantları etidyum bromür ile görselleştirilmiştir (Maiwald 2011).

5.4. DNA Dizi Analizi

5.4.1. Sanger Yöntemi

Sanger dizilemesi, 16S rRNA PCR ile pozitif sonuç veren 28 örnek üzerinde gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünlerindeki primerler ve nükleotidler Agincourt AMPure (Beckman Coulter Company, Massachusetts, ABD) kullanılarak çıkarıldı. DNA saflaştırıldıktan sonra, yoğunluk ve kalitesini belirlemek amacıyla elektroforeze tabi tutuldu. 16S rRNA'nın hiperdeğişken V2 ve V3 bölgeleri analiz etmek için sırayla 787 ters (787R 5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') ve 27 ileri (27F 5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3') primerler ile sekanslama yapıldı (Maiwald 2011). Sekans reaksiyonu, 5 pmol primer, saflaştırılmış ampikonun 3.5-5 µL'si ve 4 big-dye terminator cycle sequencing quick start kiti (Beckman Coulter, Massachusetts, ABD) içermektedir. Sekans koşulları aşağıdaki gibiydi: başlangıç denatürasyonu için 3 dakika boyunca 94°C, ardından 20 saniye için 96°C'de denatürasyon, 30 saniye boyunca 55°C'de bağlanma ve 4 dakika süreyle 60 °C'de uzama dahil olmak üzere 30 döngü izledi. Dizilim ürünlerinin saflaştırılmasından sonra, dizi verisi, Beckman Coulter CEQ 8000 genetik analiz ve sıralama sisteminden toplandı. Her bir numuneden elde edilen sekans sonuçları GenBank veritabanında bulunan sıralama verileri ile karşılaştırıldı (www.ncbi.nlm.gov/genbank).

5.4.2.Yeni nesil sekanslama yöntemi

Proje bütçesinin kısıtlı olması nedeniyle 20 timpanosklerotik plak ve 26 kolesteatom dahil olmak üzere seçilen 46 örnek üzerinde YNS yapılabildi. 20 timpanosklerotik plaktan 16 numune 16S rRNA PCR pozitif, kalan 4 tanesi PCR negatif numuneler arasından rasgele seçildi. Kolesteatomun 26'sından 16'sı PCR pozitif ve 10'u negatifti.

16S rRNA geni, yedi hiperdeğişken bölgeleri (V2, 3, 4, 6-7, 8 ve 9) çoğaltmak için iki ayrı primer havuzlardan oluşan Ion 16S Metagenomics kiti kullanılarak amplifiye edildi. İki ayrı çoklu PCR reaksiyonları V2, V4, V8 ve V3, V6-7, V9 primer setleri kullanılarak gerçekleştirildi. Agencourt AMPure XP saflaştırmasından sonra, her numunenin iki PCR ürününün eşit hacimleri aynı PCR tüpünde birleştirildi. Ion Plus Fragment Library Kit™ ve Ion Xpress Barkod Adaptörleri, 1-96™ (Life Technologies, Grand Island, NY) kullanılarak DNA kütüphanesi oluşturdu. Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Inc, Atlanta, Georgia) ile adaptörle bağlanmış ve nick ile onarılan DNA kütüphanelerinin saflaştırılmasından sonra işlenmiş kütüphanelerin boyutu ve miktarı Ion Universal Library Quantitation Kit (Life Technologies, Grand Island, NY) ile değerlendirildi. Kitlesel olarak paralel sıralama stratejisi elde etmek adına, her numune için eşit hacmimde kütüphaneler aynı reaksiyon tüpüne eklenmiştir. Bir araya toplanan kütüphaneler, şablon hazırlanması için

saflaştırıldı ve nicelleştirildi. Toplanan kütüphane, Ion One Touch 2 aletinde (Thermo Fisher Scientific, ABD) Ion PGM™ şablonu OT2 200 Kit kullanılarak nano boyutlu iyon küre parçacıkları üzerinde klon olarak amplifiye edildi. Ion Personal Genome Machine (PGM) üzerinde 200 bp sıralama kimyası ve Ion 318v2 cips (RDI) kullanılarak büyük paralel sıralama reaksiyonu sağlandı. İşlenmiş veriler, sıralama ve kalite açısından kontrol edildi ve Ion Torrent Suite v5.0.2 kullanılarak düzeltildi. Veri analizi, Life Technologies Ion Reporter (IR) yazılımı sürüm 5.6 kullanılarak gerçekleştirildi.

6. BULGULAR

16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonu, test edilen 102 numunenin 32'sinde pozitif sonuç verdi (Şekil 1a). Bu 32 numunenin saflaştırılmasından sonra, 17 timpanosklerotik plak ve 11 kolesteatom içeren 28 numune, Sanger dizilimi için mevcut DNA kalitesi ve niceliğe sahipti. Saflaştırmadan sonra zayıf PCR amplifikasyon bantlarına sahip dört numune sıralanamadı (Şekil 1b).

Test edilen 46 numunenin yeni nesil sekanslanması 20 timpanosklerotik plaktan 18'inde ve 26 kolesteatomun tamamında pozitif sonuçlar verdi. YNS ile test edilen 48 örneğin 44'ünde (%95.7) bakteri tespit etti. Olumlu örneklerin 41'inde (% 93.2) birden fazla bakteri vardı. Kalan 3 örneğin her biri farklı bakteriler içermektedir. *Turicella otitidis*, *Alliococcus otitidis* ve *Propionibacterium acnes*. Timpanosklerotik plakların ve kolesteatom örneklerinin her birinde bulunan farklı bakterilerin sayısı 2 ile 12 arasında değişmiştir. Hem timpanosklerotik plaklarda hem de kolesteatom örneklerinde, YNS başlıca *Staphylococcaceae*, *Alcaligenaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Microbacteriaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Peptoniphilaceae*, *Prevotellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* ve *Moraxellaceae* gibi bakterileri tespit etmiştir. Aile düzeyinde tanımlamaya ek olarak, tür düzeyinde sınıflandırma da yapılmıştır. Örneğin; T4 numunesinde *A. otitis* % 94, *Propionibacterium acnes* (% 3) ve *S. aureus* (% 2) bulunurken; T38 örneğinde, *Turicella otitidis*'i % 91, *Corynebacteriaceae*'ya % 9 oranında saptanmıştır. Tespit edilen bakterilerin yoğunluğu % 1 ile % 100 arasında değişim göstermekte idi. Örneklerin çoğu, %29 ile %100 arasında bir oranda baskın bir bakteri çeşidi barındırmakta ve aynı zamanda bazı örneklerde %10'dan daha az bakteri bulunabilmekteydi (Tablo 1 ve Tablo 2).

Timpanosklerotik plak örneklerinde tanımlanan en yaygın bakteriler saptanış sıklığına göre; yedi örnekte *Staphylococcaceae*, 4'er örnekte *Clostridiales* Family XI. *Incertae Sedis*, *Alloiococcus otitis*, *Staphylococcus auricularis*, *Turicella otitidis*, 3'er örnekte unclassified *Bifidobacteriales*, *Propionibacterium acnes*, *Peptoniphilaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Alcaligenaceae*, *Enterobacteriaceae* ikişer örnekte, *Bacteroidaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, birer örnekte ise *Propionibacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Microbacteriaceae*, *Beutenbergiaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Staphylococcus cohnii*, *Streptococcus thermophilus*, *Corynebacterium amycolatum*, *Streptococcaceae*, *Francisella tularensis*, *Peptostreptococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pettenkoferi*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Actinomyces europaeus*, *Fingoldia magna*, *Lactobacillaceae* olarak bulundu (Tablo-1).

Kolesteatoma örneklerinde saptanan bakteri sıklığı şöyledir; 17 örnekte *Staphylococcaceae*, 12 örnekte *Clostridiales*, 11 örnekte *Clostridiales* Family XI. *Incertae Sedis*, 9 örnekte *Peptoniphilaceae*, 5'şer örnekte *Pseudomonadaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Turicella otitidis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus aureus*, and *Corynebacteriaceae*, 4 örnekte *Moraxellaceae*, 3'er örnekte *Fusobacteriaceae*, *Actinomycetaceae*, *Ruminococcaceae*, 2'şer örnekte *Campylobacteraceae*, *Peptococcaceae*, *Pasteurellaceae*, *Propionibacterium acnes*, *Comamonadaceae*,

Bacteroidaceae, Erysipelotrichaceae, Enterobacteriaceae, and Staphylococcus epidermidis, ve 1 örnekte *Porphyromonas somerae*, *Campylobacter ureolyticus*, *Prevotellaceae*, *Leptotrichiaceae*, *Neisseriaceae*, *Streptococcaceae*, *Corynebacterium amycolatum*, *Pseudomonaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Spirochaetaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Actinomycetales*, *Corynebacterium*, *Veillonellaceae*, *Peptococcus niger*, *Kallipyga massiliensis*, *Dermabacter hominis*, *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium jeikeium*, *Actinobacteria*, unclassified *Bifidobacteriales*, *Nostocaceae*, *Achromobacter*, *Alcaligenaceae*, *Staphylococcus sp.*, *Dermabacteraceae* dir (Tablo-2).

Sanger dizilimi ve YNS sonuçlarının karşılaştırılması, tanımlanmış bakteriler açısından iyi uyuma gösterdi. Sanger sekanslama ile elde edilen herhangi bir numunenin bakteri türleri YNS tarafından da tür veya aile seviyesinde bulundu. Diğer taraftan, Sanger sekanslama ile sıralanamayan 9 timpanoskleroz ve 15 kolesteatoma örneğinin farklı bakteriler barındırdığı YNS ile tespit edildi (Tablo 1 ve Tablo 2).

7. TARTIŞMA/SONUÇ

Moleküler yaklaşımlardaki son gelişmeler, klinik örneklerde mevcut olabilecek mikroorganizmaların çeşitliliğini ve karmaşıklığını ayrıntılı olarak incelememize olanak sağlar. Basit ve ucuz olduğu için önce tüm örnekleri taramak adına Sanger dizilişini kullandık. Ne yazık ki bu yöntem, test edilen örneklerin sadece %17.6'sında sonuç verdi. Daha sonra, 46 seçilmiş örnek için YNS yöntemi kullanmaya karar verdik. YNS ile sekanslama sonucu elde

etme oranı % 95.7 idi. Her iki yöntemin sekanlama sonucu verme oranları üzerinde önemli farklılıklar olmasına rağmen, tanımlanan bakteriler üzerinde bu yöntemler arasında iyi korelasyon mevcuttu. Sanger dizilemesi ile bulunan bakteriler YNS tarafından tür veya aile seviyesi olarak da teyit edildi. Bulgularımız, YNS'nin en önemli avantajlarının, test edilen numunelerde bulunan bakterilerin çeşitliliğini ve karmaşıklığını gösterme yeteneğiydi. Sanger dizilemesi, test edilen örneklerin her birinde sadece bir bakteri tespit etti; ancak YNS sonuçları, bu numunelerin çoğunun mikst bakteri içerdiğini gösterdi. Bu veriler, YNS'deki ilerlemenin, kültür temelli yöntemlerle ve Sanger sekanlama yöntemleri ile daha önce imkansız olan birçok hipotezin test edilmesine olanak sağladığını göstermektedir (Claesson vd 2010, Barb vd 2016).

16s rRNA ile ilgili orta kulak çalışmalarına 80'lerin sonu 90'ların başlarında başlanmıştır. Aguirre ve Collis'in (1992a) yaptıkları çalışmada orta kulak sıvısında sıklıkla saptanan bakterilerden farklı olarak 16s rRNA sekans analiz tekniği ile yeni bir bakteri tipi tanımlanmış ve *Alloiococcus otitis* gen. nov., sp. nov., olduğu belirtilmiştir. Aynı yıl içinde aynı yazarlar tarafından *Alloiococcus Otitis*'in spesifik teşhisi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)-prob testi geliştirildiği rapor edilmiştir (Aguirre ve Collins 1992b). Yapılan bir başka çalışmada 25 orta kulak sıvısı incelenmiş ve kültür sonuçları ile 16s rRNA analiz sonuçları karşılaştırılmış ve multipleks PZR'nin bakteri tespit yüzdelerini konvansiyonel kültür metodlarına göre çok daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir (Hendolin vd 1997). Matar ve ark.'nın Lübnan'lı çocuklar üstünde yaptığı benzer çalışmada da orta kulak örneklerinin 16s rRNA sekans analizi ile değerlendirilmesinin kültür sonuçlarına göre daha sensitif, daha hızlı ve daha az külfetli olduğu rapor edilmiştir (Matar vd 1998). Beswick ve ark.'nın çalışmasında effüzyonlu kronik otitis medialis 12 hasta çalışmaya dahil edilmiş, effüzyon örnekleri hem kültür hem 16s rRNA sekans analiz yöntemi ile değerlendirilmiş ve sonuç olarak 10 hastada kültürde üreme olmamasına rağmen PZR ile birçok mikroorganizmanın varlığı saptanmış, ayrıca kültürde hiçbir örnekte üremeyen *Alloiococcus otitis*'in 12 hastanın 6'sında bulunduğu PZR yöntemi ile gösterilmiştir (Beswick vd 1999). Liv ve ark.'nın 2011 yaptıkları bir çalışmada kronik seröz otitis medialis çocuklar incelenmiş ve orta kulaktaki sıvıdan, adenoid ve tonsil dokularından alınan örneklerin 16s rRNA gen temelli pyrosekanslama analiz metodu ile araştırılması yapılmıştır (Liu vd 2011). Bu çalışmada 17 özgün bakteri familyası tespit edilmiş olup adenoid mikrobiotasının orta kulak ve tonsil bakterileri ile örtüştüğü tespit edilmiştir. Chan ve ark.'nın benzer bir çalışmada ise buna tezat olarak adenoid ve orta kulaktaki lokal mikrobiota arasında farklılıklar olduğu rapor edilmiştir (Chan vd 2016). Sillanpaa ve ark.'nın akut otitis medialis ve Minami ve ark., Kruger ve ark. ve Neeff ve ark.'nın kronik otitis medialis hastalarda yaptıkları çalışmalarda 16s rRNA tekniği kullanılmış ve birçok bakteri familyasının örneklerde

bulunduğu gösterilmiştir (Sillanpaa vd 2017, Minami vd 2017, Krueger vd 2017, Neeff vd 2016).

Kronik ve seröz otitis media'da çoğunlukla görülen mikroorganizmalar *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Alloiococcus otitis*'dir (Kalcioğlu vd 2002). Bu patojenlerden farklı olarak, kolesteatom olgularındaki bakterilerin Mikobakteriler, gram (-) basiller ve anaerobik bakteriler olabileceği ileri sürülmüştür (Özgirgin 2013). Kolesteatom ve kronik otitis media'daki bakteriyel kolonizasyon çeşitli bilimsel araştırmalarda araştırılmıştır. Brook, 28 kolesteatoma olgusunda gerçekleştirdiği çalışmada aerobik bakteriler olarak *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*, anaerobik bakteriler olarak gram (+) kok, *Bakteroides sp.*, *Clostridium sp.* ve *Bifidobacterium sp.* rapor etmiştir (Brook 1981). Atallah, kolesteatomlu 88 hastadaki çalışmasında bakterilerin çoğunlukla *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Proteus sp.* olduğunu bildirmiştir (Attallah 2000). Ayrıca 15 örnekte *Aspergillus sp.* ve *Candida albicans* gibi mantar çeşitlerinin görüldüğünü rapor etmiştir. Chloe ve Faddis, çoğu örnekte gram (+) ve gram (-) bakterileri rapor etmiş ve bunların kolesteatomun biyofilm matriksinde olduğunu kaydetmişlerdir (Chole ve Faddis 2002). Ronchetti ve ark. *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Mycoplasma pneumoniae*'yi 32 kolesteatoma örneğinde araştırmış ve 16 örnekte *Chlamydia pneumoniae*, 4'ünde *Haemophilus influenzae* saptanırken, *Mycoplasma pneumoniae* herhangi bir örnekte tespit edilememiştir (Ronchetti vd 2003). Ricciardiello ve ark. çalışmalarında aerobik ve anaerobik bakteri ve mantarların numunelerde bulunabileceğini ve fluorokinolonların ve 3. nesil sefalosporinlerin anaerobik aktiviteleri nedeniyle tedavide yararlı olabileceğini not etmişlerdir (Ricciardiello vd 2009). Madana ve ark. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Proteus sp.* en sık tespit edilen bakteri türü olarak bildirmişlerdir (Madana vd 2011).

Timpanosklerozisin patofizyolojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte oluşumunda travma yanısıra hücre dışı lizozomal aktivite ve lokal immunolojik aşırı duyarlılık gibi başka sebepler öne sürülmüştür (Özgirgin 2013, Mann vd 1980). Literatürde enfeksiyöz sebeplerin de bu patolojiye sebep olabileceği üstünde durulmuş olsa da yeterli miktarda araştırma yapılmamıştır (Mann 1986, Liv d 2007, Iriz vd 2011, Dinç vd 2016). Timpanosklerozun araştırıldığı bir hayvan modelinde parenteral D3 vitamini yanı sıra orta kulağa *Streptococcus pyogenes* inokülasyonu verilmiş ve ratlarda timpanosklerozun klasik bulgularının oluştuğu tespit edilmiştir (Mann 1986). Li ve ark.'nin çalışmasında 21 adet guinea pigi kullanılmış ve hayvanların orta kulaklarına *Staphylococcus aureus* inoküle edilmiş ve 1, 3 ve 6. aylarda hayvanların bir kısmında timpanoskleroz oluştuğu saptanmıştır (Liv vd 2007). Son yıllarda yapılan bir çalışmada 14 timpanoskleroz örneğinde *Helicobacter pylori* birlikteliği istatistiksel

olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (Iriz vd 2011). Bunun yanı sıra 2015 yılında rapor edilen bir çalışmada farklı bir sonuç elde edilmiş ve timpanosklerozu bulunan 30 hasta *Chlamydia pneumoniae* ve 35 hasta *Helicobacter pylori* için PCR yöntemi kullanılarak yapılan analizde bütün sonuçlar negatif olarak rapor edilmiş ve *Chlamydia pneumoniae* ve *Helicobacter pylori* ile timpanoskleroz birlikteliği arasında bir korelasyon olmadığı öne sürülmüştür (Dinç vd 2016).

Bakterilerde 16S rRNA bölgesinin Sanger dizilimi ve YNS ile yapılan çalışmamızda, kronik otitis media hastalarından alınan kolesteatom ve timpanosklerotik plak örneklerinde birçok farklı bakteri saptanmıştır. Timpanosklerotik plak ve kolesteatom örneklerinin çoğunda *Staphylococcaceae*, *Clostridiales*, *Peptoniphilaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *A. otitis*, *T. otitidis* ve *S. aureus* bulunur. Daha önceki çalışmalarla (2-4, 21, 23, 24, 27) uyumlu olarak, YNS ile birçok gram-negatif, gram-pozitif, aerobik ve anaerobik bakteri tespit edilmiştir. Ayrıca *Staphylococcus pettenkoferi*, *S. auricularis*, *S. sciuri*, *Fingoldia magna* ve *Dermatobacter hominis* gibi şimdiye kadar bildirilmemiş olan bazı yeni bakteri türleri tespit edilmiştir. Her numunede bakteri sayısının (2 ila 12 arasında değişen) farklı olmasının yanı sıra, aynı numunelerde ve numuneler arasında bakteri yoğunluğu üzerinde de büyük farklılıklar mevcuttu. Örneğin, *A. otitidis*'in miktarı bir timpanosklerotik plakta % 100 iken diğer bir numunede % 26'ydı. Öte yandan, bir timpanosklerotik plakta bulunan *A. otitidis*, *T. otitidis* ve *S. auricularis*'in yoğunluğu sırasıyla %59, %26 ve %11 idi. Bu bakteri çeşitliliğinin ve yoğunluğunun timpanoskleroz ve kolesteatom oluşumuna katkısı yeni araştırmalarla gösterilmelidir.

SONUÇ

Literatürde daha önceki çalışmalar, spesifik faktörleri araştırarak kolesteatom ve timpanosklerotik örneklerde bazı mikroorganizmaların bulunabileceğini göstermiştir. Ancak, bu çalışmaların hiçbiri, örnekte mevcut olabilecek mikroorganizma DNA'sının gösterilmesine dayanan moleküler biyolojik araştırmalarla yürütülmemiştir. Bu yüzden; çalışmamızda daha

önceden tespit edilenlerin yanı sıra yeni bakterilerin saptanması da mümkün olmuştur. Böylece, kolesteatom ve timpanosikloz etyopatogenezisine, tedavi protokollerinin oluşturulmasına ve literatüre katkıda bulunabilecek benzersiz bulgular elde edilmiştir.

9. KAYNAKLAR

Aguirre M, Collins MD.1992. “Phylogenetic analysis of *Alloiococcus otitis* gen. nov., sp. nov., an organism from human middle ear fluid”, *Int J Syst Bacteriol*, 42(1), 79-83.

Aguirre M, Collins MD. 1992. "Development of a polymerase chain reaction-probe test for identification of *Alloiococcus otitis*", *J Clin Microbiol*, 30(8), 2177-80.

Attallah MS. 2000. "Microbiology of chronic suppurative otitis media with cholesteatoma", *Saudi Med J*, 21(10), 924-7.

Barb JJ, Oler AJ, Kim H-S, Chalmers N, Wallen GR, Cashion A, Munson PJ, Ames NJ. 2016. "Development of an Analysis Pipeline Characterizing Multiple Hypervariable Regions of 16S rRNA Using Mock Samples", *PLoS ONE*, 11(2): e0148047.

Beswick AJ, Lawley B, Fraise AP, Pahor AL, Brown NL. 1999. "Detection of *Alloiococcus otitis* in mixed bacterial populations from middle-ear effusions of patients with otitis media", *Lancet*, 354(9176), 386-9.

Brook I. 1981. "Aerobic and anaerobic bacteriology of cholesteatoma", *Laryngoscope*, 91(2), 250-3

Chan CL, Wabnitz D, Bardy JJ, Bassiouni A, Wormald PJ, Vreugde S, Psaltis AJ. 2016. "The microbiome of otitis media with effusion", *Laryngoscope*, 126(12), 2844-51.

Chole RA, Faddis BT. 2002. "Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas", *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 128(10), 1129-33.

Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, O'Toole PW. 2010. "Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions", *Nucleic Acids Res*, 38(22): 200.

Dinç AE, Cömert F, Damar M, Şevik Eliçora S, Erdem D, Işık H. 2016. "Role of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacteria pylori* in the development of tympanosclerosis", *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 273(4), 889-92.

Ferlito A. 1993. "A review of the definition, terminology and pathology of aural cholesteatoma," *J Laryngol Otol*, 107(6), 483-8.

Hendolin PH, Markkanen A, Ylikoski J, Wahlfors JJ. 1997. "Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions", *J Clin Microbiol*, 35(11), 2854-8.

- Iriz A, Eryilmaz A, Gocer C, Acar A, Boynuegri S, Dursun E. 2011. "Could *Helicobacter pylori* play a role in the aetiopathogenesis of tympanosclerosis?", *J Laryngol Otol*, 125(11), 1121-4.
- Kalcioglu MT, Oncel S, Durmaz R, Otlu B, Miman MC, Ozturan O. 2002. "Bacterial etiology of otitis media with effusion; focusing on the high positivity of *Alloiococcus otitidis*", *New Microbiol*, 25(1), 31-5.
- Krueger A, Val S, Pérez-Losada M Panchapakesan K, Devaney J, Duah V, DeMason C, Poley M, Rose M, Preciado D. 2017. "Relationship of the Middle Ear Effusion Microbiome to Secretory Mucin Production in Pediatric Patients With Chronic Otitis Media", *Pediatr Infect Dis J*, 36(7), 635-40.
- Li Y, Xie NP, Wan LC. 2007. "Establishment of tympanosclerosis by intratympanic injection of *Staphylococcus aureus* in guinea pigs", *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 27(11), 1784-6.
- Liu CM, Cosetti MK, Aziz M, Buchhagen JL, Contente-Cuomo TL, Price LB, Keim PS, Lalwani AK. 2011. "The otologic microbiome: a study of the bacterial microbiota in a pediatric patient with chronic serous otitis media using 16SrRNA gene-based pyrosequencing" *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 137(7), 664-8.
- Madana J, Yolmo D, Kalaiarasi R, Gopalakrishnan S, Sujatha S. 2011. "Microbiological profile with antibiotic sensitivity pattern of cholesteatomatous chronic suppurative otitis media among children", *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 75(9), 1104-8.
- Maiwald M. [Broad-Range. 2011. "PCR for Detection and Identification of Bacteria"](#) Sayfa: 491-505. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*, Editör: Persing DH, Tenover FC, Tang Y, Nolte FS, Hayden RT, van Belkum A, Washington DC, ASM Press.
- Mann W, Riede UN, Jonas I, Beck C. 1980. "The role of matrix vesicles in the pathogenesis of tympanosclerosis", *Acta Otolaryngol*, 89(1-2), 43-52.
- Mann W. 1986. "Experimental tympanosclerosis following infection with *Streptococcus pyogenes* and vitamin D3 intoxication", *Arch Otorhinolaryngol*, 243(5), 296-303.
- Matar GM, Sidani N, Fayad M, Hadi U. 1998. "Two-step PCR-based assay for identification of bacterial etiology of otitis media with effusion in infected Lebanese children", *J Clin Microbiol*, 36(5), 1185-8.
- Minami SB, Mutai H, Suzuki T, Horii A, Oishi N, Wasano K, Katsura M, Tanaka F, Takiguchi T, Fujii M, Kaga K. 2017. "Microbiomes of the normal middle ear and ears with chronic otitis media", *Laryngoscope*, 127(10), 371-377.

Neeff M, Biswas K, Hoggard M, Taylor MW, Douglas R. 2016. "Molecular Microbiological Profile of Chronic Suppurative Otitis Media", *J Clin Microbiol*, 54(10), 2538-46.

Özgirgin ON, 2013. "Kolesteatom". Sayfa: 285-333. *Otoloji ve Nöro-otoloji*. Editör: Celik O, İstanbul, Elif Ofset.

Ricciardiello F, Cavaliere M, Mesolella M, Iengo M. 2009. "Notes on the microbiology of cholesteatoma: clinical findings and treatment", *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 29(4), 197-202.

Ronchetti F, Ronchetti R, Guglielmi F, Chiappini I, Contini C, Filippo R, Santino I, CerruR, Bernardeschi D, Barbara M. 2003. "Detection of *Chlamydia pneumoniae* in cholesteatoma tissue: any pathogenetic role?", *Otol Neurotol*, 24(3), 353-7.

Sillanpää S, Kramna L, Oikarinen S, Sipilä M, Rautiainen M, Aittoniemi J, Laranne J, Hyöty H, Cinek O. 2017. "Next-Generation Sequencing Combined with Specific PCR Assays To Determine the Bacterial 16S rRNA Gene Profiles of Middle Ear Fluid Collected from Children with Acute Otitis Media". *mSphere*, 2(2), e00006-17.

10. TABLO VE ŞEKİLLER

Tablo 1: Altmış beş timpanoskleroz örneğinde 16S rRNA Sanger sekans ve yeni jenerasyon sekans sonuçları.

Örnek Kod	DNA Konsantrasyonu (ng/uL)	16S -rRNA PCR (Konvansiyonel metod)	16S -rRNA Sekans analizi (Konvansiyonel metod)	16S -rRNA PCR (NGS) Mix-1	16S -rRNA PCR (NGS) Mix-2	NGS ile elde edilen 16S-rRNA Sekans Analizi Sonuçları
T1	8,76	Negatif		Negatif	Negatif	35% <i>Propionibacteriaceae</i> 14% unclassified <i>Bifidobacteriales</i> 15% <i>Pseudomonadaceae</i> 16% <i>Comamonadaceae</i> 7% <i>Staphylococcaceae</i> 4% <i>Carnobacteriaceae</i> 3% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 2% <i>Bacteroidaceae</i>
T2	Çok yüksek	Negatif		Negatif	Negatif	
T3	16,3	Negatif		Negatif	Negatif	
T4	1,09	Pozitif	<i>Alloicoccus otitis</i>	Pozitif	Pozitif	94% <i>Alloicoccus otitis</i> 2% <i>Staphylococcus auricularis</i> 3% <i>Propionibacterium acnes</i>
T5	5	Negatif		Negatif	Negatif	
T6	5,11	Negatif		Negatif	Negatif	
T7	43,3	Pozitif	<i>S.aureus</i>	Negatif	Negatif	
T8	6,01	Negatif		Negatif	Negatif	
T9	Çok düşük	Negatif				
T10	0,4	Negatif		Negatif	Negatif	
T11	0,3	Negatif		Negatif	Negatif	
T12	0,8	Negatif		Negatif	Negatif	
T13	0,5	Negatif		Negatif	Negatif	

T14	Çok düşük	Negatif				
T15	0,7	Negatif		Negatif	Negatif	
T16	1,93	Negatif		Negatif	Negatif	
T17	4,3	Negatif				
T18	47,7	Pozitif	Karışık Sekans	Negatif	Negatif	
T19	59	Negatif		Negatif	Negatif	
T20	46,9	Pozitif	<i>S.auricularis</i>	Negatif	Negatif	
T21	Çok düşük	Negatif				
T22	0,28	Negatif		Negatif	Negatif	
T23	Çok düşük	Negatif				
T24	Çok düşük	Negatif				
T25	Çok düşük	Negatif				
T26	10,1	Negatif		Negatif	Negatif	
T27	0,29	Negatif		Negatif	Negatif	
T28	1,25	Negatif		Negatif	Negatif	
T29	1,41	Negatif		Negatif	Negatif	
T30	0,11	Negatif		Negatif	Negatif	100% <i>Alloiococcus otitis</i>
T31	Çok düşük	Negatif				
T32	Çok düşük	Negatif				
T33	Çok düşük	Negatif				
T34	0,26	Negatif		Negatif	Negatif	
T35	1,42	Negatif		Negatif	Pozitif	47% <i>Pasteurellaceae</i> 26% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 6% <i>Peptoniphilaceae</i> 5% <i>Staphylococcaceae</i> 15% unclassified <i>Bifidobacteriales</i>
T36	0,1	Negatif		Negatif	Pozitif	30% <i>Microbacteriaceae</i> 12% <i>Corynebacteriaceae</i> 12% <i>Beutenbergiaceae</i>

						9% <i>Brevibacteriaceae</i> 6% <i>Micrococcaceae</i> 2% unclassified <i>Bifidobacteriales</i> 11% <i>Alcaligenaceae</i> 8% <i>Enterobacteriaceae</i> 5% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 1% <i>Peptoniphilaceae</i> 4% <i>Staphylococcaceae</i>
T37	Çok düşük	Negatif				
T38	1,2	Negatif		Negatif	Negatif	91% <i>Turicella otitidis</i> 9% <i>Corynebacteriaceae</i>
T39	Çok düşük	Negatif				
T40	1,72	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif
T41	0,1	Pozitif	Karışık Sekans	Negatif	Negatif	
T42	Çok düşük	Pozitif	<i>Bacillus sp.</i>			
T43	0,1	Negatif		Negatif	Negatif	Negatif
T44	0,1	Pozitif	Karışık Sekans	Pozitif	Pozitif	82% <i>Staphylococcaceae</i> 14% <i>Staphylococcus aureus</i> 3% <i>Staphylococcus cohnii</i>
T45	1,07	Negatif		Negatif	Negatif	57% <i>Turicella otitidis</i> 26% <i>Alloiococcus otitis</i> 4% <i>Streptococcus thermophilus</i> 8% <i>Staphylococcus auricularis</i> 5% <i>Staphylococcaceae</i>
T46	Çok düşük	Negatif				
T47	Çok düşük	Pozitif	<i>E.coli</i>			
T48	Çok düşük	Negatif				
T49	0,54	Negatif		Negatif	Negatif	

T50	0,15	Negatif		Negatif	Negatif	80% <i>Turicella otitidis</i> 8% <i>Corynebacterium amycolatum</i> 6% <i>Streptococcaceae</i> 3% <i>Enterobacteriaceae</i> 2% <i>Francisella tularensis</i>
T51	Çok yüksek	Zayıf pozitif	Karışık Sekans	Negatif	Negatif	
T52	0,85	Pozitif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pozitif	Pozitif	81% <i>Staphylococcaceae</i> 18% <i>Staphylococcus aureus</i>
T53	0,067	Pozitif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negatif	Negatif	
T54	Çok yüksek	Zayıf Pozitif	Karışık Sekans	Negatif	Negatif	29% <i>Bacteroidaceae</i> 19% <i>Corynebacteriaceae</i> 2% <i>Peptoniphilaceae</i> 1% <i>Peptostreptococcaceae</i> 17% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 1% <i>Porphyromonadaceae</i> 21% <i>Prevotellaceae</i>
T55	0,64	Negatif		Negatif	Negatif	100% <i>Propionibacterium acnes</i>
T56	0,51	Negatif		Negatif	Negatif	
T57	18,3	Zayıf pozitif	Sekanslanamadı (çok zayıf pozitif)	Negatif	Negatif	
T58	0,25	Zayıf pozitif	Sekanslanamadı (çok zayıf pozitif)	Pozitif	Pozitif	92% <i>Pseudomonadaceae</i> 8% <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
T59	0,19	Negatif		Negatif	Negatif	
T60	Çok yüksek	Pozitif	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negatif	Negatif	96% <i>Alcaligenaceae</i> 4% <i>Xanthomonadaceae</i>
T61	0,54	Zayıf pozitif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negatif	Negatif	59% <i>Alloiococcus otitis</i> 26% <i>Turicella otitidis</i> 11% <i>Staphylococcus auricularis</i>

T62	0,17	Zayıf pozitif	<i>S.caprae</i>	Negatif	Negatif	41% <i>Staphylococcus auricularis</i> 41% <i>Staphylococcaceae</i> 17% <i>Staphylococcus pettenkoferi</i> 1% <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
T63	5,82	Pozitif	<i>Alcaligenes sp.</i>	Pozitif	Pozitif	97% <i>Alcaligenaceae</i> 2% <i>Xanthomonadaceae</i>
T64	Çok düşük	Negatif				
T65	20,3	Pozitif	<i>E.coli</i>	Pozitif	Pozitif	26% <i>Actinomyces europaeus</i> 14% <i>Finagoldia magna</i> 52% <i>Enterobacteriaceae</i> 2% <i>Lactobacillaceae</i>

Tablo 2. Otuz yedi Kolesteatoma örneğinde 16S rRNA Sanger sekans ve yeni jenerasyon sekans sonuçları.

Örnek Kod	DNA Konsantrasyon (ng/uL)	16S -rRNA PCR (Konvansiyonel metod)	16S -rRNA Sekans analizi (Konvansiyonel metod)	16S -rRNA PCR (NGS) Mix-1	16S -rRNA PCR (NGS) Mix-2	NGS ile elde edilen 16S-rRNA Sekans Analizi Sonuçları
-----------	---------------------------	-------------------------------------	--	---------------------------	---------------------------	---

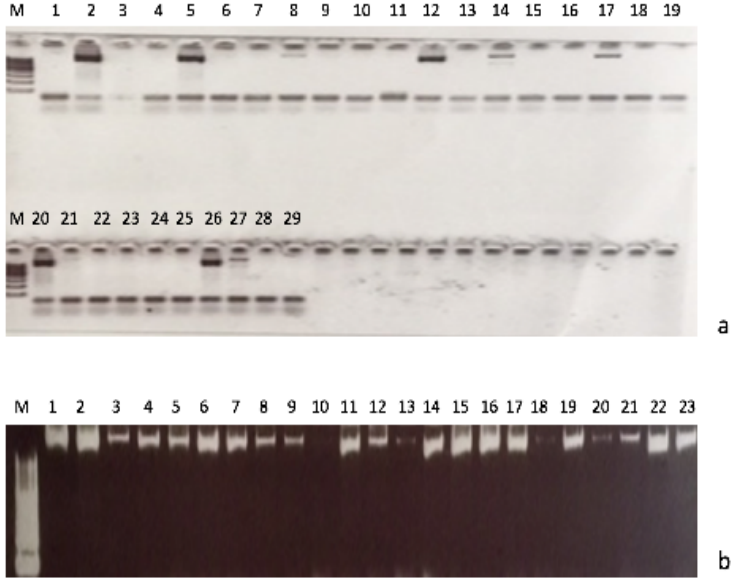
K1	7,64	Pozitif	Karışık Sekans	Pozitif	Pozitif	24% <i>Porphyromonas somerae</i> 11% <i>Porphyromonadaceae</i> 5% <i>Campylobacter ureolyticus</i> 3% <i>Pseudomonadaceae</i> 5% <i>Actinomycetaceae</i> 5% <i>Campylobacteraceae</i> 3% <i>Pseudomonadaceae</i> 29% <i>Peptoniphilaceae</i> 10% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 7% <i>Ruminococcaceae</i> 3% <i>Peptococcaceae</i> 3% <i>Clostridiales</i>
K2	4,3	Negatif		Negatif	Negatif	
K3	9,1	Negatif		Negatif	Negatif	
K4	13,8	Pozitif	Karışık Sekans	Pozitif	Negatif	50% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 49% <i>Peptoniphilaceae</i>
K5	22,4	Pozitif	Karışık Sekans	Pozitif	Negatif	30% <i>Fusobacteriaceae</i> 46% <i>Prevotellaceae</i> 3% <i>Leptotrichiaceae</i> 9% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 2% <i>Peptoniphilaceae</i> 3% <i>Staphylococcaceae</i> 3% <i>Pasteurellaceae</i> 2% <i>Neisseriaceae</i>
K6	18,1	Negatif		Negatif	Negatif	100% <i>Turicella otitidis</i>
K7	1,05	Negatif		Negatif	Negatif	
K8	2,93	Pozitif	<i>Staphylococcus sciuri</i>	Pozitif	Pozitif	89% <i>Staphylococcus sciuri</i> 2% <i>Staphylococcaceae</i> 4% <i>Streptococcaceae</i> 3% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i>

K9	43,6	Negatif		Negatif	Negatif	52% <i>Corynebacterium amycolatum</i> 29% <i>Propionibacterium acnes</i> 13% <i>Comamonadaceae</i> 3% <i>Pseudomonaceae</i> 4% <i>Staphylococcaceae</i>
K10	11,9	Negatif		Negatif	Negatif	40% <i>Propionibacterium acnes</i> 23% <i>Pseudomonadaceae</i> 2% <i>Moraxellaceae</i> 5% <i>Comamonadaceae</i> 16% <i>Staphylococcaceae</i> 6% <i>Carnobacteriaceae</i> 6% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 2% <i>Porphyromonadaceae</i>
K11	5,14	Pozitif	<i>S.caprae</i>	Pozitif	Negatif	75% <i>Staphylococcaceae</i> 11% <i>Corynebacterium tuberculostearicum</i> 9% <i>Corynebacteriaceae</i>
K12	3,56	Negatif		Pozitif	Pozitif	46% <i>Bacteroidaceae</i> 37% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 10% <i>Peptoniphilaceae</i> 5% <i>Pseudomonadaceae</i> 2% <i>Staphylococcaceae</i>
K13	Çok düşük	Negatif				
K14	1,36	Pozitif	Karışık Sekans	Pozitif	Pozitif	93% <i>Staphylococcaceae</i> 6% <i>Staphylococcus aureus</i>
K15	0,06	Negatif		Negatif	Negatif	44% <i>Moraxellaceae</i> 36% <i>Fusobacteriaceae</i> 5% <i>Spirochaetaceae</i> 4% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 3% <i>Erysipelotrichaceae</i> 3% <i>Xanthomonadaceae</i>

						2% <i>Erysipelotrichaceae</i> 1% <i>Actinomycetales</i> 1% <i>Enterobacteriaceae</i>
K16	3,42	Negatif		Negatif	Negatif	55% <i>Staphylococcaceae</i> 38% <i>Corynebacterium</i> 5% <i>Turicella otitidis</i>
K17	0,24	Negatif		Negatif	Negatif	59% <i>Staphylococcaceae</i> 41% <i>Staphylococcus sciuri</i>
K18	3,34	Negatif		Negatif	Negatif	68% <i>Moraxellaceae</i> 17% <i>Staphylococcaceae</i> 4% <i>Pasteurellaceae</i> 2% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 2% <i>Veillonellaceae</i> 2% <i>Actinomycetaceae</i> 1% <i>Porphyromonadaceae</i> 1% <i>Peptoniphilaceae</i>
K19	3,34	Negatif		Negatif	Negatif	72% <i>Staphylococcaceae</i> 3% <i>Staphylococcus aureus</i> 2% <i>Staphylococcus sciuri</i> 9% <i>Peptococcaceae</i> %5 <i>Peptococcus niger</i> %4 <i>Kallipyga massiliensis</i> %3 <i>Ruminococcaceae</i> 1% <i>Peptoniphilaceae</i>
K20	0,06	Zayıf pozitif	Sekanslanamadı (çok zayıf pozitif)	Pozitif	Negatif	91% <i>Staphylococcaceae</i> 7% <i>Staphylococcus aureus</i>
K21	0,16	Pozitif	Karışık Sekans	Pozitif	Pozitif	94% <i>Staphylococcaceae</i> 6% <i>Staphylococcus aureus</i>
K22	2,56	Negatif		Negatif	Negatif	

K23	0,6	Zayıf pozitif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pozitif	Pozitif	51% <i>Dermabacter hominis</i> 27% <i>Turicella otitidis</i> 20% <i>Corynebacteriaceae</i>
K24	12,1	Negatif		Negatif	Negatif	
K25	0,06	Negatif		Negatif	Negatif	
K26	Çok düşük	Zayıf pozitif	<i>Parvimonas sp.</i>			
K27	0,14	Negatif				
K28	0,25	Negatif		Pozitif	Pozitif	81% <i>Turicella otitidis</i> 11% <i>Corynebacterium accolens</i> 7% <i>Corynebacteriaceae</i>
K29	0,35	Pozitif	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pozitif	Pozitif	86% <i>Staphylococcaceae</i> 13% <i>Staphylococcus epidermidis</i>
K30	0,66	Negatif		Pozitif	Pozitif	80% <i>Staphylococcaceae</i> 11% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 5% <i>Peptoniphilaceae</i> 3% <i>Porphyromonadaceae</i>
K31	Çok düşük	Negatif				
K32	2,6	Negatif		Pozitif	Negatif	41% <i>Corynebacterium jeikeium</i> 58% <i>Corynebacteriaceae</i>
K33	0,7	Negatif		Negatif	Negatif	91% <i>Staphylococcaceae</i> 4% <i>Staphylococcus aureus</i> 3% <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1% <i>Actinobacteria</i>
K34	0,49	Negatif		Negatif	Negatif	35% unclassified <i>Bifidobacteriales</i> 35% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 2% <i>Actinomycetaceae</i> 9% <i>Campylobacteraceae</i>

						6% <i>Porphyromonadaceae</i> 1% <i>Nostocaceae</i> 8% <i>Peptoniphilaceae</i> 1% <i>Ruminococcaceae</i> 4% <i>Staphylococcaceae</i>
K35	0,02	Pozitif	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Pozitif	Pozitif	51% <i>Achromobacter</i> 43% <i>Alcaligenaceae</i> 5% <i>Enterobacteriaceae</i>
K36	0,22	Zayıf pozitif	Sekanslanamadı (çok zayıf pozitif)	Pozitif	Negatif	45% <i>Staphylococcus sciuri</i> 26% <i>Staphylococcus sp.</i> 5% <i>Clostridiales</i> Family XI. <i>Incertae Sedis</i> 5% <i>Peptoniphilaceae</i> 18% <i>Corynebacteriaceae</i> 2% <i>Dermabacteraceae</i> 3% <i>Turicella otitidis</i> 6% <i>Pseudomonadaceae</i> 4% <i>Moraxellaceae</i> 7% <i>Bacteroidaceae</i>
K37	Çok düşük	Negatif				



Şekil 1 : 16S rRNA PCR ürünlerine örnekler (a) ve arındırma sonrası amplifikasyon bantları (b). Moleküler ağırlık markörü 1000 bp. Şekil 1a'da 1'den 29'a kadar olan çizgiler, pozitif (2, 5, 8, 12, 14, 17, 20, 26 ve 27 gibi) ve negatif (1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 21-25, 28 ve 29) numuneleri göstermektedir. Şekil 1b'deki 1'den 23'e kadar olan çizgiler, yüksek (örnek no: 1 ila 4, 6, 7, 11, 14-17, 19, 22 ve 23 numuneleri), orta (5 ve 8) ve düşük, 12, 13, 18, 20, 21) DNA konsantrasyonlarını göstermektedir.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. MAHMUT TAYYAR KALCIOĞLU
Proje No:	116S078
Proje Başlığı:	Kolesteatoma ve Timpanosklerotik Plak Oluşumunda Bakterilerin Rolü: DNA Dizi Analizine Dayalı Moleküler Araştırma
Proje Türü:	3001 - Başlangıç AR-GE
Proje Süresi:	15
Araştırmacılar:	DİLEK GÜLDEMİR, ÖZLEM ÜNALDI, BEKİR ÇELEBİ
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İSTANBUL MEDENİYET Ü. TIP F.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/06/2016 - 01/09/2017
Onaylanan Bütçe:	102850.0
Harcanan Bütçe:	59332.03
Öz:	Amaç: Kronik otitis media, milyonlarca insanı etkiler ve kolesteatom veya timpanikleroz gibi ek patolojilere neden olabilir. Bu tür hastalıkların patofizyolojisi tamamen bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı 16S rRNA sekansı analizi ile kolesteatom ve timpanosklerotik plaklardaki tüm bakteriyel patojenleri tespit etmektir. Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda kronik otitis media nedeniyle operasyon geçiren hastalardan elde edilen 102 örnek (65 timpanosklerotik plak, 37 kolesteatoma) incelenmiştir. DNA ekstraksiyonu yapılan tüm örneklerde 16S rRNA gen bölgesine özgü olarak tasarlanan primerler ile PCR amplifikasyonu yapıldı. 16S rRNA PCR pozitif örnekler Sanger yöntemi ile sekanslandı. Seçilen 46 örnek, İon 16S ? Metagenomik kiti kullanılarak yeni nesil sekanslama (YNS) yöntemi ile analiz edildi. Sonuç: Sanger dizilemesiyle 102 numunenin 18'inde (%17.6) spesifik bir tür veya cins tanımlanmıştır. Bu 18 örnekten 12'si timpanosklerotik plak, 6'sı ise kolesteatomdu. Tanımlanan bakteriler Alloicoccus otitis, Staphylococcus aureus, S.auricularis, Alcaligenes sp., Stenotrophomonas maltophilia, S.epidermidis, Achromobacter xylosoxidans, Escherichia coli, S. sciuri, S. caprae, Parvimonas sp., Bacillus sp.?dir. YNS yöntemiyle 46 test numunesinin 44'ünde (% 95.7) iki veya daha fazla farklı bakteri buldu. YNS ağırlıklı olarak Staphylococcaceae (18 örnek), Corynebacteriaceae (15 örnek, Turicella otitidis'e sahip 6 örnek), Clostridiales Family XI'i, Incertae Sedis (7 samples), Alloicoccus otitis (4 örnek) ve Propionibacteriaceae (4 numune) tespit etmiştir. Tartışma: Orta kulakta önceden bilinenin aksine çeşitli mikrobiyal topluluklar flora oluşturmaktadır. Moleküler biyolojik çalışmaların kullanımı, bu bakterilerin tanımlanması daha kolay hale getirmiş ve kronik inflamatuvar kulak hastalıklarının patogeneğinde mastoid ve orta kulak mikrobiyotasının rolünü anlamamızı kolaylaştırarak tedaviye yön vermemizde önemli hale gelmiştir.
Anahtar Kelimeler:	kolesteatoma, timpanoskleroz, 16S rRNA PCR, DNA bazlı sekans analizi, bakteri
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır