ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORTA KULAK EFÜZYONUN İZOLE EDİLEN *HEAMOPHİLUS İNFLUENZAE*, *STREPTOCOCCUS PNEUMONİA* VE *MORAXELLA CATARRHALİS* BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER TANIMLANMASI

Abdullah Musaa KADHIM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Abdullah Musaa KADHİM tarafından hazırlanan **"Orta Kulak Efüzyonundan İzole *Heamophilus influenzae, Streptococcus pneumonia* ve *Moraxella catarrhalis* Bakterilerinin Moleküler Tanımlanması"** adlı tez çalışması 11.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN

Eş Danışman : Dr. Amran Mezher Lawas AL-LAWAS

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Laborant ve Veteriner Sağlık Programı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Selin Özkan KOTİLOĞLU
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"Orta Kulak Efüzyonundan İzole Edilen *Heamophilus influenzae, Streptococcus pneumonia* ve *Moraxella catarrhalis* Bakterilerinin Moleküler Tanımlanması**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu, çalışmanın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik, ilke ve kurallarına uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne uygun göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitütüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı ile tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmam ile ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (13/08/2021).

Abdullah Musaa KADHIM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ORTA KULAK EFÜZYONUNDAN İZOLE EDİLEN *HEAMOPHİLUS İNFLUENZAE, STREPTOCOCCUS PNEUMONİA* VE *MORAXELLA CATARRHALİS* BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER TANIMLANMASI

Abdullah Musaa KADHIM

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN
Eş Danışman: Dr. Amran Mezher Lawas AL-LAWAS

Otitis media efüzyonu (OME), sıklıkla çocuklarda görülen bir orta kulak hastalıklarından biri olup tedavi edilmediği takdirde işitme kaybına neden olabilir. OME'ye yaygın olarak bakteriler etki ettiği gibi virüsler de hastalık etkeni olabilirler. Bu nedenle, OME oluşturan mikrobiyota türlerinin bilinmesi önemlidir. Bu tez çalışmasında, beyin omurilik sıvısı ve orta kulak efüzyon örnekleri alınan bireylerde OME etkeni olduğu bilinen *Haemophilus influanze, Streptococcus pneumonia* ve *Moraxella catarrhalis* bakterilerinin kültür ortamı ve moleküler yöntemler ile teşhislerinin yapılması sonucu karşılaştırılmaları amaçlanmıştır. Kültür ortamında beyin omurilik sıvısından elde edilen örneklerde *S.pneumoniae* (%1,9), orta kulak efüzyon örneklerinde *M.catarrhalis,* ve *H.influenzae* non b (%13,6) kültür pozitifliği saptanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonrasında elde edilen sonuçlarda ise beyin omurilik sıvısında %9,4 (*S.pneumoniae*) ve orta kulak efüzyon örneklerinde %36,3 (*H.influenzae, M.catarrhalis ve S.pneumoniae + M.catarrhalis*) oranında pozitiflik saptanmıştır. Çalışma sonucunda, PCR tekniğinin menenjit ve OME vakalarından alınan örneklerden en sık görülen üç patojeni daha etkili bir şekilde tespit edebileceğini göstermiştir. PCR tekniğinin bu alanda rutin kullanıma sokulması ve mikrobiyolog, moleküler biyolog ve klinisyen arasında iyi bir diyalog sağlanması durumunda bu hastalıklarda etiyolojik ve dolayısıyla tedavi sorunlarına doğru yaklaşımın azaltılabileceği sonucuna varılmıştır.

2021, 37 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: BOS, OME, Kültür, Menenjit, PCR Tekniği

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *HEAMOPHILUS INFLUENZAE*, *STREPTOCOCCUS PNEUMONIA*, AND *MORAXELLA CATARRHALIS* BACTERIA ISOLATED FROM MIDDLE EAR EFUSION

Abdullah Musaa KADHIM

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Pınar ARSLAN
Co-Advisor: Dr. Amran Mezher Lawas AL-LAWAS

Otitis media effusion (OME) is one of the middle ear diseases frequently seen in children and can cause hearing loss if left untreated. Bacteria commonly affect OME, and viruses can also be the cause of the disease. Therefore, it is important to know the types of microbiota that makeup OME. In this thesis, it was aimed to compare the results of the diagnosis of *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumonia* and *Moraxella catarrhalis* bacteria, which are known to be OME agents, in individuals from whom cerebrospinal fluid and middle ear effusion samples were taken, using culture media and molecular methods. Culture positivity of *S. pneumoniae* (1.9%) in samples obtained from cerebrospinal fluid in culture medium, *M.catarrhalis*, and *H.influenzae* non-b (13.6%) in middle ear effusion samples were detected. In the results obtained after the polymerase chain reaction (PCR), 9.4% (*S.pneumoniae*) in the cerebrospinal fluid and 36.3% (*H.influenzae*, *M.catarrhalis* and *S.pneumoniae* + *M.catarrhalis*) were detected in the middle ear effusion samples. The results of the study showed that the PCR technique can more effectively detect the three most common pathogens from samples from meningitis and OME cases. It has been concluded that if the PCR technique is put into routine use in this field and a good dialogue between microbiologists, molecular biologists and clinicians is provided, the correct approach to etiological and therefore treatment problems in these diseases can be reduced.

2021, 37 pages

Keywords: CSF, EOM, Culture, Meningitis, PCR Technique

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hayatımda tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destekleyen en değerli insanlar babam ve anneme, çalışmanın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, her zaman destekleyen, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım, büyük bir anlayış gösteren ve hiç kırmayan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN ve Dr. Amran Mezher Lawas AL-LAWAS'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Abdullah Musaa KADHIM
Çankırı, Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **v**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **vii**
1. GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL TEMELLER **3**
2.1 Otitis Media **3**
2.2 Menenjit **4**
2.3 Otitis Media ve Menenjit Hastalıklarının Bazı Biyolojik Etkenleri **5**
2.3.1 *Haemophilus influenzae* **5**
2.3.2 *Streptococcus pneumoniae* **6**
2.3.3 *Moraxella catarrhalis* **7**
3. MATERYAL VE METOT **9**
3.1 Çalışma Grubu **9**
3.2 Klinik Örneklerinin Alınması **9**
3.2.1 Orta kulak efüzyonu **9**
3.2.2 Beyin omurilik sıvısı **9**
3.3 Mikrobiyolojik Analiz **10**
3.3.1 Standart suşlar **10**
3.3.2 Kültür ve morfolojik tanımlama **10**
3.4 Moleküler Yöntemler **11**
3.4.1 Klinik örneklerden DNA ekstraksiyonu **12**
3.4.2 PCR karışımı **13**
3.4.3 Amplifikasyon **14**
3.4.4 Amplifiye ürünlerin gösterilmesi **14**
3.5 İstatiksel Analiz **15**
4. BULGULAR **15**
4.1 Kültür ve PCR sonuçları **18**
5. TARTIŞMA **26**
6. SONUÇ **29**
KAYNAKLAR **30**
EKLER **34**
ÖZGEÇMİŞ **37**

SİMGELER DİZİNİ

BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EOM	Efüzyonlu Otitis Media
LP	Lomber Ponksiyon
NKD	Negatif Kestirim Değeri
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKD	Pozitif Kestirim Değeri
RNA	Ribonükleik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Bakteri kültürü sonuçları **18**
Şekil 4.2 PCR sonuçları. **20**
Şekil 4.3 PCR ve bakteri kültürü ile belirlenen pozitif örnek sayısı. **22**
Şekil 4.4 *S.pneumoniae*, *M.catarrhalis* ve *H.influenzae* multipleks PCR sonuçlarının jel görüntüsü **23**
Şekil 4.5 *H.influenzae* PCR sonuçlarının jel görüntüsü. **24**
Şekil 4.6 Multiplex PCR sonuçlarının jel görüntüsü. **24**
Şekil 4.7 *H.influenzae* multipleks PCR sonuçlarının jel görüntüsü **25**

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *Haemophilus influenzae'*nın sınıflandırılması **6**
Çizelge 2.2 *Streptococcus pneumoniae'*nin sınıflandırılması **6**
Çizelge 2.3 *Moraxella catarrhalis'*in sınıflandırılması **8**
Çizelge 3.1 PCR karışımı (1): Multiplex PCR (*M.catarrhalis + S.peumoniae)* **13**
Çizelge 3.2 PCR karışımı (2): Normal PCR *(H.influenzae)* **13**
Çizelge 4.1 PCR ve bakteri kültürü sonuçlarının karşılaştırılması (Grup A: 43 adet BOS, Grup B: 17 adet OKE örnekleri). **16**
Çizelge 4.1 PCR ve bakteri kültürü sonuçlarının karşılaştırılması (Grup A: 43 adet BOS, Grup B: 17 adet OKE örnekleri) (devamı) **17**
Çizelge 4.2 Bakteriyoloji kültür ve PCR sonuçları **19**
Çizelge 4.3 BOS ve OKE ile elde edilen bakteri kültürü ve PCR istatistikleri **21**

1. GİRİŞ

Efüzyonlu otitis media (EOM), orta kulak kısmında meydana gelen akut iltihaplanmaya bağlı olarak efüzyon oluşması durumudur. Özellikle, Kulak Burun Boğaz kliniklerine başvuruda bulunan çocuklarda yüksek oranda prevalansına rastlanılan bir hastalıktır. Tedavi sürecinde geç kalınması veya iyi bir şekilde tedavi edilmediği takdirde çocuklarda duyma kaybı, davranışsal gelişimde değişiklikler ve konuşma bozuklukları gibi fiziksel sonuçlar meydana gelmesine neden olur. Östaki borusunda, bakteriyel ve viral kaynaklı enfeksiyonlar EOM'un nedenleri arasındadır (Huang *et al.* 2021).

Orta kulak, üst solunum yolları ile ilişkide olan bir bölge olduğu için üst solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan bakteriler, EOM hastalık etkeni de olabilmektedirler. Üst solunum yolları hastalıklarının etkenleri olan *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae* ve *Moraxella catarrhalis* bakterilerinin EOM oluşmasına da neden olduğu bilinmektedir (Jörissen *et al.* 2021).

Menenjit, EOM'un en sık rastlanılan intrakraniyel komplikasyonu sonucu oluşan bir hastalıktır ve yüksek düzeyde ölüm riski meydana getirir (Yıldırım-Baylan vd. 2014). Bütün yaş gruplarında görülme olasılığı olan menenjit, bir bakteri nedeniyle meydana geliyorsa epidemi oluşmasına ve 24 saatten kısa sürede ölüm olaylarının meydana gelmesine neden olur. Aşı gelişmesine paralel olarak, menenjit görülme sıklığında azalma meydana gelmiştir (WHO 2021).

Menenjit hastalığında tanı koyarken, hastalık etkeni olan bakterilerin büyümesinden bağımsız olarak düşük miktarda bakteri popülasyonundan elde edilen DNA örnekleri ile yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler tanı yöntemleri ile erken teşhis sağlanabilir. Menenjit hastalığına neden olan sıklıkla karşılaşılan patojen bakteri türlerine *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae* örnek olarak verilebilir (Sharma *et al.* 2021). Ayrıca, menenjit etkeni olan ve üst solunum yolu enfeksiyonlarında sıklıkla karşılaşılan patojen bakteri türlerinden *Moraxella catarrhalis* ise hastalık teşhisi olarak otitis media konulan kişilerde %15-20 oranında teşhis edilmiştir (Özerol vd. 2002). Bu

üç patojen bakteri türü, hasta kişilerden örnek alınmasından sonra laboratuvar ortamına getirilmesi ve sonrasındaki işlemler sonrasında kültür ortamında hayatta kalma oranlarında düşüş göstermektedirler. Bu nedenle, PCR yöntemlerinden multiplex PCR yöntemi ile tek bir reaksiyonda üç bakteri türünün aynı anda saptanması gerçekleştirilebilir (Sharma *et al.* 2021).

EOM'un yaygın bir hastalık olması ve belirtilen diğer hastalıklar ile ilişkide olması hastalığın izlenme sürecini ve hastalık etkeni olan bakterilerin tanımlanmasını gerekli kılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde, orta kulak efüzyonuna neden olan mikrobiyotanın saptanması çalışmaları çok sayıda yapılmışken, Irak gibi gelişmekte olan ülkelerde çalışma sayıları oldukça sınırlıdır (Xu *et al.* 2020).

Bu tez çalışmasında, Irak Al- Hussein Eğitim Hastanesi ve Al-Şatra Genel Hastanesi Kulak Burun Boğaz Kliniği ve Çocuk Sağlığı Polikliniği'nde klinik olarak efüzyonlu otitis media şüpheli vakalardan bilinen kişilerden alınan beyin omurilik sıvısı ve orta kulak efüzyon kültür örneklerinde normal ve multiplex PCR yöntemi ile *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Moraxella catarrhalis*'in saptanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Otitis Media

Otitis media (OM) hastalığı orta kulak boşluğunda meydana gelen enflamatuvar bir hastalıktır. Nazofarinks bölgesinden başlayan solunum yolu hastalıklarının komplikasyonları sonucunda meydana gelir. Hastalığın östaki tüpüne doğru yayılmasından sonra orta kulak boşluğuna gelmesi ile oluşur (Koçyiğit vd. 2016).

Otitis media, akut, efüzyonlu ve kronik olmak üzere üç ana gruba ayrılır.

- Akut OM, bakteriyel ve viral kaynaklı olabilir. Viral kaynaklı olduğu durumlarda efüzyon göstermeyen inflamasyona neden olmaktadır. Ayrıca akut nekrotizan olarak belirtilen alt grubu kişide hastalık etmeninin hızlı ilerlemesine bağlı olarak bağışıklık sisteminin yetersiz kalması sonucu oluşan ciddi bir enfeksiyon durumudur.
- Efüzyonlu OM, hastalık etiyolojisi ve patogenizine bakılmaksızın dünya çapında kabul edilen orta kulak efüzyonlarıdır.
- Kronik OM, kişide hastalığın bir sonucu olarak kulak zarı bölgesinde kalıcı bir deformasyon sonucu oluşan bir durumdur (Koçyiğit vd. 2016).

OM epidemiyolojisi incelendiğinde, her yaşta görüldüğü ancak en sık bebek ve çocuklarda rastlanılan bir hastalık olduğu tespit edilmiştir (Leibovitz *et al.* 2004; Koçyiğit vd. 2016). Küçük yaştaki bireylerin bağışıklık sisteminin zayıf olması, üst solunum yolu enfeksiyonlarının sıklığı, kulak iç yapısının anatomik yapısı, beslenmeye bağlı olarak meydana gelen kulak içi enfeksiyonlar, aile nüfusunun fazlalığı, kreş ortamlarının kalabalık olması gibi faktörler OM nedenleri arasında yer almaktadır (Koçyiğit vd. 2016, Sezgin 2016).

OM'ye etki eden biyolojik ajanlar incelendiğinde virüsler ve bakteriler olmak üzere iki grup bulunmaktadır. Akut OM vakalarında tespit edilen virüsler (adenovirus, rinovirus, influenza A ve B gibi virüsler), aynı zamanda bakteriler ile birlikte saptanmaktadır

(Koçyiğit vd. 2016). OM'a neden olan bakteri türleri arasında en sık rastlanılanları *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae* ve *Moraxella catarrhalis*'dir. Bu etkenlerden ise, *H. influenzae* ve *S. pneumoniae* EOM'da görülme olasılığı en yüksek olan bakteriler olup (Leibovitz *et al.* 2004) patojenik olarak aktivitesi en yüksek olan tür *S. pneumoniae*'dir (Koçyiğit vd. 2016).

Hastalık teşhisi olarak OM konulmuş bireylerde, kulak ağrısı, ateş, uyku bozukluğu gibi yakınma şikâyetleri; otoskobik muayenede kulak sıvısının kırmızı veya sarı renkte olması, bombeleşme, kalınlaşma, kulakta akıntı olması; timpanogramda ise azalmış komplians görülmektedir. Hastalığın erken döneminde teşhis konulduktan sonra alınan örneklerden hastalık etkeninin saptanması doğru bir şekilde yapılır ve tedavi buna göre ilerler (Hacımustafaoğlu 2003).

Pnömokok ve konjüge pnömokok aşıları ile *S. pneumoniae* hedef alınırken OM hastalık korumasındaki etkisi tartışma konusudur. *H. influenzae* ve *M. catarrhalis* gibi yaygın etki gösteren bakteriler için ise henüz bir aşı geliştirilmemiştir (Hacımustafaoğlu 2003).
H. influenzae'nın tiplendirilmemiş türlerinin neden olduğu EOM, altı aylık ve üç yaş dönemindeki çocuklar arasında %23-%67 oranında değişen sıklıkta gözlenmektedir. Çocuklarda konjuge pnömokok aşısının kullanılmaya başlanması ile birlikte, tiplendirilemeyen, β-laktamaz üreten *H. influenzae* suşlarının amoksisilin tedavisinin başarısız olduğu hastalarda daha yaygın olmasına neden olmuştur. Tip I penisilin alerjisi olan hastalarda, azitromisin, klaritromisin, sefdinir, sefuroksim aksetil kullanılırken tip I olmayan penisilin alerjisi olan hastalarda sefpodoksim kullanılmaktadır (Tristram *et al.* 2020).

2.2 Menenjit

Bakteriyel kaynaklı menenjit, çocuklarda spesifik olmayan etkiler göstermesi nedeniyle tanısı zor bir hastalıktır. Bu etkiler, yüksek ateş, zayıf beslenme, mide bulantısı, kusma gibi birçok hastalık bulgusu ile ortaktır (El Bashir *et al.* 2003).

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki özellikle çocukluk çağındaki bireylerde oldukça ölümcül sayılabilecek olan menenjit (El Bashir *et al.* 2003), pnömokok aşılarının geliştirilmesi ve uygulanmaya başlanması ile daha az sıklıkta gözlenmektedir (Acar vd. 2014).

OM'a neden olan *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Moraxella catarrhalis* bakterilerinin dışında (Sharma *et al.* 2021), grup B streptokoklar, *Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes* gibi bakteriler de bakteriyel menenjit hastalığına neden olmaktadır (Acar vd. 2014).

Menenjit tanısı, hastanın yukarıda sayılan diğer hastalıklarla ortak belirtilerinin gözlenmesinin dışında beyin omurilik sıvısının alınıp analiz edilmesi ve kafatası tomografisinin çekilmesi, hastanın kan örneklerinin incelenmesi gibi yöntemler ile tespit edilmektedir (El Bashir *et al.* 2003).

Menenjit tedavisinde, penisilin, sefotaksim, amfisilin, vankomisin, seftriakson ve seftazidim antibiyotikleri kullanılmaktadır (El Bashir *et al.* 2003).

2.3 Otitis Media ve Menenjit Hastalıklarının Bazı Biyolojik Etkenleri

2.3.1 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae'nın sistematik olarak sınıflandırılması şu şekildedir (Çizelge 2.1):

Çizelge 2.1 *Haemophilus influenzae'*nın sınıflandırılması

Alem	Bacteria
Altalem	Negibacteria
Şube	Probacteria
Sınıf	Gammaproteobacteria
Takım	Pasteurellales
Aile	Pasteurellaceae
Cins	*Haemophilus*
Tür	*Haemophilus influenzae* (Lehmann and Neumann 1896, Winslow et al.1917)

Haemophilus influenzae, insan solunum yollarında bulunan gram negatif bir kokobasil bakteri türüdür. *H. influenzae* izolatları, kapsüllü olan ve kapsüllü olmayan bakteri suşları içermektedir. Kapsüllü suşları, a'dan f'ye tanımlanan altı adet farklı kapsüler polisakkaritten birini ifade etmektedir. Kapsüllenmemiş suşlar ise *H. influenzae* polisakkarit kapsüllerine karşı antiserumlarla reaksiyona girememeleri ile tanımlanır ve tiplendirilmeyen suşlar olarak ifade edilir (Geme 2000, Tristram *et al.* 2020).
H. influenzae tip b (Hib) suşları, tanımlanmasının iyi yapılması nedeniyle protein konjüge polisakkarit aşılarının kullanımından etkilenmektedir. *H. influenzae*'nın neden olduğu hastalıklar özellikle tip b suşlarının meydana getirdiği çocukluk çağı pnömonisi, menenjit, EOM, akut sinüzit ve akut alevlenmelerdir (Tristram *et al.* 2020).

OM etkeni olmaları *H. influenzae*'nın nazofarinks bölgesine yerleşmesi ve koloni oluşturması ile başlar. İstilacı bir tür olduğu için hızlı bir şekilde yayıldıktan sonra östaki borusu ile orta kulak bölgesine ulaşır ve enfeksiyon oluşumuna neden olur (Geme 2000).

2.3.2 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae'nin sistematik olarak sınıflandırılması şu şekildedir (Çizelge 2.2):

Çizelge 2.2 *Streptococcus pneumoniae'*nin sınıflandırılması

Alem	Bacteria
Altalem	Posibacteria
Şube	Firmicutes
Sınıf	Bacilli
Takım	Lactobacillales
Aile	Streptococcaceae
Cins	*Streptococcus*
Tür	*Streptococcus pneumoniae* (Klei 1884, Chester 1901)

Streptococcus pneumoniae, H. influenzae gibi insan solunum sistemine yerleşen bir patojendir. Nazofarinkste koloni haline geldikten sonra menenjit, pnömoni ve sepsis gibi ölümcül hastalıklara neden olan gram pozitif bir bakteri türüdür (Eichner *et al.* 2021). Özellikle beş yaş altı çocuklarda ve yaşlı bireylerde görülen pnömoni etkenidir (von Specht *et al.* 2021).

OM etkeni olması nedeniyle pediatri alanında sıklıkla karşılaşılan bir bakteridir. Dünya Sağlık Örgütü Antimikrobiyallere Dirençli Türler listesinde yer alması ise B-laktam ve diğer antibiyotik sınıflarına direnç geliştirmiş olmasındandır (Silva *et al.* 2021).

2.3.3 Moraxella catarrhalis

Moraxella catarrhalis'in sistematik olarak sınıflandırılması şu şekildedir (Çizelge 2.3):

Çizelge 2.3 *Moraxella catarrhalis'*in sınıflandırılması

Alem	Bacteria
Altalem	Negibacteria
Şube	Probacteria
Sınıf	Gammaproteobacteria
Takım	Pseudomonadales
Aile	Moraxellaceae
Cins	*Moraxella*
Tür	*Moraxella catarrhalis* (Frosh and Kohle 1896, Henriksen and Bovre 1968)

M. catarrhalis teşhis edildiği ilk yıllarda üst solunum yolları florasında bulunan zararsız bir bakteri olarak düşünülürken zaman içinde OM'a neden bir bakteri olduğu anlaşılmıştır (İçağasıoğlu vd. 1995). Ayrıca, OM gibi lokal enfeksiyonel hastalıkların yanı sıra endokardit, menenjit gibi ölümcül olabilen enfeksiyonel hastalıkların da etkenidir (Özerol, vd. 2002). OM nedeni olan sıklıkla karşılaşılan bakterilerden biri olmasının yanı sıra, görülme sıklığı *S. pneumoniae* ve *H. influenzae*'ya göre daha düşüktür (Verduin *et al.* 2007).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Çalışma Grubu

Bu tez çalışmasında, çalışma grubu Irak Al- Hussein Eğitim Hastanesi ve Al-Şatra Genel Hastanesi Kulak Burun Boğaz Kliniği ve Çocuk Sağlığı Polikliniği'ne başvuran çocukluk çağındaki bireylerdir. Çalışma, Zi Kar Valiliği Zi Kar Sağlık Departmanı Eğitim ve İnsani Gelişme Bölümü 55 sayı numaralı 10/2/2020 tarihli etik kurul belgesi alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir (EK 1).

3.2 Klinik Örneklerinin Alınması

3.2.1 Orta kulak efüzyonu

Örnekler, genel anestezi altında dış kulak yoluna povidone - iodine (Betadine) ile antisepsi uygulandıktan sonra mikroskop eşliğinde myringotomy (kulak zarı kesilmesi) yöntemi ile steril tüplere aspire edilerek alınarak en kısa sürede Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (AD) laboratuvarlarına ulaştırılmıştır.

3.2.2 Beyin omurilik sıvısı

Çocuk Hastalıkları Kliniği'nde lomber ponksiyon (LP) ile iki steril tüp içine alınan BOS örnekleri en kısa sürede Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD laboratuvarlarına ulaştırılmıştır.

3.3 Mikrobiyolojik Analiz

3.3.1 Standart suşlar

Haemophilus influenzae ATCC 49247, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 ve *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238 suşları kontrol olarak kullanılmıştır.

3.3.2 Kültür ve morfolojik tanımlama

a) BOS Kültürü:

BOS örnekleri, steril bir pastör pipeti ile kanlı ve çikolatamsı ağar besiyerine ekilmiştir. Kalan materyal steril eppendorf tüpüne alınarak -70°C'de PCR çalışmasında kullanılmak üzere saklanmıştır. Petri kaplarına ekimi yapılan örnekler 24-48 saat süreyle 37°C de %5 $C0_2$'li etüvde inkübe edilmiştir.

b) OKE Kültürü:

OKE örnekleri, kanlı ve çikolatamsı agara ve Thioglikolatlı buyyon besiyerlerine ekildikten sonra kalan materyal, steril eppendorf tüp içerisinde 0,5 mL steril serum fizyolojik ile süspanse edilerek PCR çalışmasında kullanılmak üzere -70° C'de saklanmıştır. Petri kaplarına ekimi yapılan örnekler ise 24-72 saat süreyle 37°C de %5 $C0_2$'li etüvde inkübe edilmiştir.

c) Tanımlama

Petri kaplarında inkübe edilen örneklerde bakterilerin çoğalarak kolonileşmesini takiben morfolojik tanımlaması bakteriyolojik yöntemlere göre yapılmıştır.

X ve V bağımlı, porfirini metabolize etmeyen, non-hemolitik olmasının yanı sıra kültürel ve morfolojik özellikleri ile uyumlu koloniler *H.influenzae* olarak tanımlanmışlardır (Schuchat *et al.* 1997).

Kanlı ağarda yayvanlaşarak su damlası veya düğme şeklini almaya başlayan katalaz negatif ve alfa-hemolitik streptekok kolonilerinin buyyondaki saf kültürlerinden yapılan optokin hassasiyet testi sonucunda *S.pneumoniae* tanımlaması yapılmıştır.

Kanlı ve çikolatamsı agarda oksidaz pozitif, nitrat negatif, glukoz, sukroz, maltoz, fruktoz ve laktoz için negatif karbohidrat fermentasyonu gösteren gram negatif diplokoklar *M.catarrhalis* olarak kabul edilmiştir.

Ayrıca, bakteri türlerinin tanımlanması için üretici firma tarafından standardize edilmiş türe özgü bilgi altyapısına sahip otomotize (API NH - bio Merieux) sistemi de kullanılmıştır.

3.4 Moleküler Yöntemler

Çalışmada hastalardan elde edilen örneklerin bir kısmı ile rutin mikrobiyolojik işlemlerin yapılmasının ardından kalan örneklerle multiplex polimeraz zincir reaksiyonu ile bakteri türlerinin tanımlanması işlemi yapılmıştır. Bu amaçla, polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan cihazlar, solüsyonlar ve bakterilerin primer dizileri aşağıda verilmiştir.

Kullanılan Cihazlar

Elektroforez tankı ve güç kaynağı (Mini Sub Celi GT System-BioRad/ABD)
Hassas terazi (Precisa 125 A SCS/lsveç)
Jel Görüntüleme Sistemi (GelDoc/BioRad/ABD)
Muhtelif Mikropipetler (Biohit Proline Pipette/Finlandiya)
Santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417R/Almanya)
Thermal cycler cihazı (MJ Research/İngiltere)

Kullanılan Solüsyonlar

2-propanol (Riedel-dehaen/Almanya)
10XTBE:Tris (Sigma/Almanya)108 gr/lt
Borik asid (Sigma/Almanya) 55 gr/lt
EDTA (Sigma/Almanya) 20 mL/lt [0,5 M (pH: 8,0)]
Agaroz (Genaxis/Almanya)
Etidyum Bromid (Boehringer Mainheim/Almanya): 10 mg/mL (steril distile su içinde)
Mineral oil (Sigma/Almanya)

Thermus aquaticus (Taq) DNA Polimeraz (Fermentas/Almanya)

%40 Sukroz (Sigma/Almanya): %40 (distile su içinde, w/v)

Orange-G (Sigma/Almanya): %0.25

Çalışma kapsamında kullanılan primerler aşağıda belirtilmiştir.

Organizma	Primer dizileri	Pozisyon
H.influenza	CGTATTATCGGAAGATGAAAGTGC	177-200
S.pneumoniae	AAGGTGCACTTGCATCACTACC	106-127
M.catarrhalis	CCCATAAGCCCT GACGTTAC	416-435
Universal	CTACGCATTTCACCGCTACAC	682-702

3.4.1 Klinik örneklerden DNA ekstraksiyonu

1. Steril 1,5 mL eppendorf tüplere 10 µL proteinaz K, 250 µL K buffer, 100 µL hasta materyali (BOS, OKE), kontrol örnekleri (pozitif ve negatif) eklenerek 42°C'de 1 saat inkübe edildi.

2. Karışımın üzerine 250 µL alkali fenol ve 250 µL kloroform-izoamilalkol (24:1) eklenerek + 4°C'de 12000 rpm 5dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.

3. Homojenat üzerine 500 µL izopropil alkol eklenerek vorteks yapıldı. Karışım +4°C'de 12000 g 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

4. Homojenat üzerine 500 µL etil alkol (%70'lik) eklenerek vortekslendi. Karışım +4°C'de 12000 g 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

5. Hücre lizatına 3 µL RNase solüsyonu eklendi. Tüpü 2-5 kez karıştırmak için alt-üst çevirme yapılarak 37 C'de 15-60 dakika inkübe etti.

6. İnkübasyon sonrasında süpernatant atıldı ve 37°C'de kurumaya bırakıldı.

7. Ependorflar içine 100 µL steril Dnase free distile su ilave edildi.

8. Ekstraktlar kullanılıncaya kadar -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.4.2 PCR karışımı

Çalışmada kullanılan multiplex PCR ve normal PCR karışımları aşağıdaki gibi yapılmıştır (Çizelge 3.1 ve 3.2).

Çizelge 3.1 PCR karışımı (1): Multiplex PCR (*M.catarrhalis + S.peumoniae)*

dNTP (Sigma/Almanya)	2 µL
dNTP (Sigma/Almanya)	2 µL
10X PCR buffer	5 µL
MgCI2	4 µL (2.5 mM)
Taq DNA polimeraz	0.3 µL (1.5 U)
Primer 2	0.5 µL (100 pmol)
Primer 3	0.5 µL (100 pmol)
Universal 4	0.5 µL (100 pmol)

Çizelge 3.2 PCR karışımı (2): Normal PCR *(H.influenzae)*

dNTP (Sigma/Almanya)	2 µL
Distile su	37.7 µL
10X PCR buffer	5 µL
MgCI2	4 µL (2.5 mM)
Taq/ DNA polimeraz	0.3 µL (1.5 U)
Primerl	0.5 µL (100 pmol)
Universal 4	0.5 µL (100 pmol)

3.4.3 Amplifikasyon

Örneklerin çevreden ve çapraz kontaminasyonlardan korunması için hem ekstraksiyon aşamasında hem de amplifikasyon aşamasında gerekli hassasiyet gösterildi ve örneklerin ekstraksiyonu ile amplifikasyonu ayrı ayrı odalarda yapıldı.

1) Her tüpte 50 µL PCR karışımı olacak şekilde hazırlanarak tüplere dağıtıldı.
2) Elde edilen 50 µL karışım ile 10 µL DNA karıştırılarak üzerlerine iki damla mineral oil koyuldu ve amplifikasyon işlemine geçildi.
3) Amplifikasyon, Thermal cycler cihazında aşağıdaki şekilde programlanarak gerçekleştirildi.

*94°C 5dk. 1döngü
*94°C 30 sn
*52°C 30 sn
*72°C 35 sn
*72°C 5dk. 40 döngü

olacak şekilde programlanmıştır.

3.4.4 Amplifiye ürünlerin gösterilmesi

Amplifikasyondan sonra elde edilen numunelerin görüntülenmesi elektroforez ile yürütülmesinin ardından yapılmıştır.

1) 20 mL TBE buffer bulundurulan erlene 400 mg agaroz eklenmesinin ardından hazırlanan %2'lik jel mikrodalga içinde eritildi.
2) Mikrodalgadan çıkarılan erlen içindeki agaroz jele 5mL (10mg/mL) etidyum bromid koyularak 0.5x8x10 cm boyutlarındaki tarak yerleştirilmiş elektroforez tabağına döküldü ve jelin donması için 15 dk beklenildi.
3) 20 µL PCR ürünü 2 µL yükleme solüsyonu ile pipetlenmesinden sonra kuyucuklara yüklenerek 100 voltta 20 dk süre ile elektroforez işlemine başlandı.
4) Elektroforez tamamlandıktan sonra band görüntüleri UV altında GelDoc görüntüleme

sistemi yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı.

5) Oluşan bant görüntüleri PCR ölçü birimi ve pozitif kontrol ile birlikte karşılaştırıldı.

3.5 İstatiksel Analiz

Tüm istatistiksel hesaplamalarda SPSS 21.0 (SPSS inc, IL, ABD) programı kullanılmıştır. Pozitif ve negatif sonuçlar PCR ve kültür testlerinin her biri için ölçülmüştür. Araştırma grubunun tanımlayıcı istatistikleri için aritmetik ortalama ± standart sapma gösterimi kullanılmıştır. Hassasiyet, özgüllük, pozitif prediktif değer (PKD), negatif prediktif değer (NKD) ile ifade edilerek ve etkinlik değerleri çapraz Çizelgeler yardımıyla hesaplanmıştır. Olabilirlik oranı, (LR) ve Spearman sıra korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. P<0,005 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilerek analizler yorumlanmıştır.

Duyarlılık, özgüllük, PKD ve NKD ve yöntemlerin bütün olarak korelasyonu aşağıda tarif edilen standart yöntemlerle hesaplanmıştır (Wright 2000).

1)

$$Duyarlılık = \frac{Doğru\ Pozitif}{Doğru\ Pozitif\ +\ Yalancı\ Negatif}$$

2)

$$Özgüllük = \frac{Doğru\ Negatif}{Doğru\ Negatif\ +\ Yalancı\ Pozitif}$$

3)

$$Duğru\ Pozitif\ TM\ KD = \frac{Doğru\ Pozitif + Yalancı\ Pozitif - Doğru\ Negetif}{Doğru\ Negetif + Yalancı\ Negetif}$$

4)

$$Korelasyon = \frac{Doğru\ Pozitif\ +\ Doğru\ Negatif}{Doğru\ Pozitif\ +\ Doğru\ Negatif\ +\ Yalancı\ Pozitif\ +\ Yalancı\ Negatif}$$

Verilerin istatistiksel değerlendirmelerinde Ki-kare (Chi-square) testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, hastalık şüphesi olan kişilerden alınan 60 örnekten 43 tanesi BOS ve 17 tanesi OKE örnekleridir. Bu örnekler bireysel olarak çalışmada elde edilen sonuçlara göre iki grup altında toplanmıştır: Grup A örneklerini ve Grup B OKE örneklerini göstermektedir (Çizelge 4.1).

Kırk üç BOS örneğinin, 2 aylık ile 14 yaş (yaş ortalaması 3,81 yaş) arasında bulunan 48 çocuktan alındığı ve bunların 24'ünün (%50) erkek, 24'ünün (%50) kız çocuğu oldukları belirlenmiştir.

17 OKE örneğinin 3-14 yaş (yaş ortalaması:7,14 yaş) arasında bulunan 22 çocuktan alındığı ve bunların 12'sinin (%54,5) erkek, 10'unun (%45,5) kız çocuğu oldukları belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 PCR ve bakteri kültürü sonuçlarının karşılaştırılması (grup A: 43 adet BOS, grup B: 17 adet OKE örnekleri)

Grup	Sayı	Yaş		Cinsiyet	Bakteri Kültürü	Multiplex PCR	*H.influenza* PCR
		Yıl	Ay				
A	1	2		E	-	-	-
A	2		10	K	-	-	-
A	3	1	10	K	-	-	-
A	4	2		E	-	-	-
A	5	2	5	K	-	-	-
A	6		10	K	-	-	-
A	7		6	K	-	-	-
A	8	5		E	-	-	-
A	9	1	2	K	-	-	-
A	10		8	K	-	-	-
A	11	1	2	K	-	-	-
A	12	7		K	-	-	-
A	13		11	E	-	-	-
A	14	10		E	-	-	-
A	15	6		K	-	-	-
A	16	1		E	-	-	-
A	17	7		K	-	-	-

Çizelge 4.1 PCR ve bakteri kültürü sonuçlarının karşılaştırılması (grup A: 43 adet BOS, grup B: 17 adet OKE örnekleri) (devamı)

Grup	Sayı	Yaş		Cinsiyet	Bakteri Kültürü	Multiplex PCR	*H.influenza* PCR
		Yıl	Ay				
A	18		6	E	-	-	-
A	19	2		E	-	-	-
A	20	3		K	-	-	-
A	21		4	E	*S.pneumonia*	*S.pneumoniae*	-
A	22		5	K	-	-	-
A	23	2	1	E	-	-	-
A	24		5	K	-	-	-
A	25	12		K	-	-	-
A	26		2	K	-	*S.pneumoniae*	-
A	27	1	1	E	-	*S.pneumoniae*	-
A	28		8	K	-	*S.pneumoniae*	-
A	29	1	8	K	-	-	-
A	30	8		K	-	-	-
A	31	3	9	E	-	-	-
A	32		7	E	-	-	-
A	33		4	E	-	-	-
A	34	3	3	K	-	*S.pneumoniae*	-
A	35		5	E	-	-	-
A	36		5	E	-	-	-
A	37	6	4	E	-	-	-
A	38	2	6	E	-	-	-
A	39		9	E	-	-	-
A	40	11		E	-	-	-
A	41	5		K	-	-	-
A	42	14		K	-	-	-
A	43		7	E	-	-	-
B	44	13		K	-	-	-
B	45	9		K	-	-	-
B	46	11		E	-	-	-
B	47	8		E	-	-	*H.influenzae*
B	48	5		E		*S.pneumoniae*	
B	49	4		E	-	-	-
B	50	5		K	*Moraxella sp.*	*M.catarrhalis*	-
B	51	8		K	-	-	-
B	52	6		E	*M.catarrhalis*	*M.catarrhalis*	-
B	53	6		K		*S.pneumoniae*	

Çizelge 4.1 PCR ve bakteri kültürü sonuçlarının karşılaştırılması (grup A: 43 adet BOS, grup B: 17 adet OKE örnekleri) (devamı)

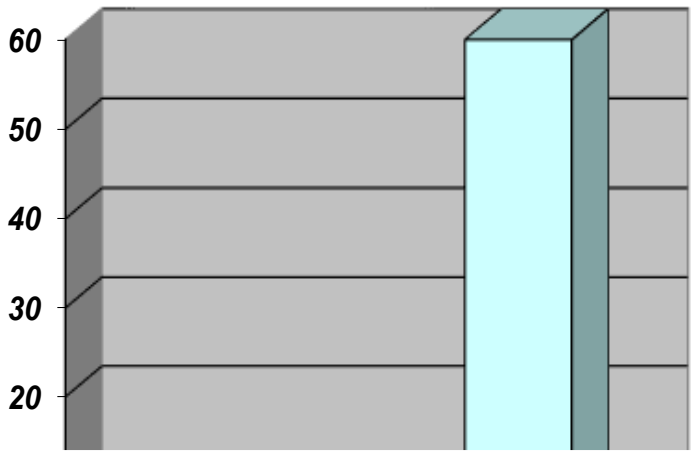
Grup	Sayı	Yaş		Cinsiyet	Bakteri Kültürü	Multiplex PCR	*H.influenza* PCR
		Yıl	Ay				
B	54	7		E	-	-	-
B	55	3		K	-	-	-
B	56	7		E	*H.influenza*	-	*H.influenzae*
B	57	8		E	-	-	*H.influenzae*
B	58	7		K	-	*M.catarrhalis*	-
B	59	8		E	-	-	-
B	60	5		E	-	-	-

E: Erkek, K: Kadın

4.1 Kültür ve PCR sonuçları

Bu çalışmada 43 BOS örneğinin sadece bir (%1,6) tanesinde (*S.pneumoniae*) kültür pozitifliği saptandı. ABM'de major patojenlerden olan *H.influenzae* izole edilmedi. 17 OKE örneğinin, 2'si *M.catarrhalis* 1'i *H.influenzae* non b olmak üzere üçünde (%13,6) kültür pozitifliği bulundu.

Çalışmamız süresince ABM ve EOM şüpheli hastalardan gönderilen toplam 60 örnekten sadece 4 tanesi (%5,3) kültür-pozitif olarak bulundu ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.1 ve Çizelge 4.2'de gösterildi.

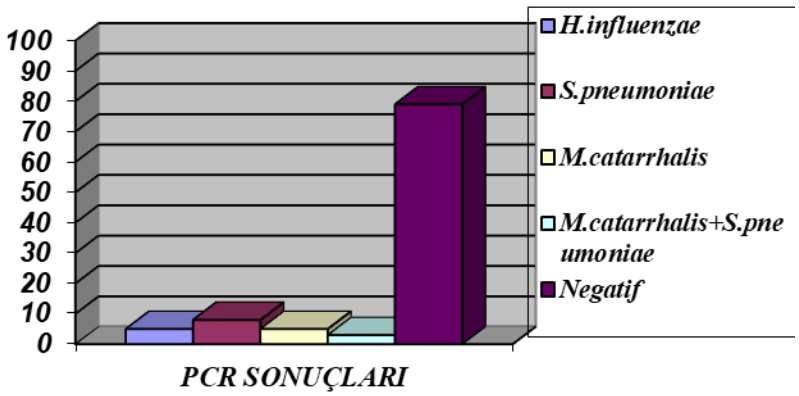


Not: Yüzde değerleri tam rakamlara tamamlanmıştır.
Şekil 4.1 Bakteri kültürü sonuçları

Çizelge 4.2 Bakteriyoloji kültür ve PCR sonuçları

Grup	**Bakteriyel Türler**	**Kültür Pozitif(%)**	**PCR Pozitif** (%)
A	*H.influenzae*	0/43 (0)	0/43 (0)
A	*S.pneumoniae*	1/43(2,3)	5/43 (11,6)
A	*M.catarrhalis*	0/43 (0)	0/43 (0)
A	*H.influenzae*	1/17 (5,9)	3/17(17,6)
A	*S.pneumoniae*	0/17 (0)	0/17 (0)
A	*M.catarrhalis*	2/17 (11,8)	3/17(17,6)
B	Miks bakteri		
B	*S.pneumoniae*	0/17 (0)	2/17(11,7)
B	*M.catarrhalis*		
B	Total Bakteri	4/60 (6,7)	13/60 (21,7)

Çalışma örneklerine PCR testi uygulandığında, 43 BOS örneğinin 5'inde (% 11,6), 17 OKE örneğinin 8'inde (%47,1) pozitiflik saptandı. BOS öreneklerinde saptananların hepsi *S.pneumoniae,* OKE örneklerinde saptananların 3'ü (%17,6) *H.influenzae,* 3'ü (%17,6) *M.catarrhalis ye* 2'si ise (%11,7) hem *S.pneumoniae* hem de *M.catarrhalis* olarak belirlendi. Bu durumda PCR uygulanan toplam 60 örneğin 13'ünde (%21,7) pozitiflik saptanmıştır. Bunların 7'sinde (karışık bulunan iki *S.pneumoniae* dâhil) (%11,6) *S.pneumoniae* DNA'sı, 5'inde (karışık bulunan iki *S.pneumoniae* + *M.catarrhalis* dâhil) (%8,3) *M.catarrhalis* DNA'sı ve 3'ünde (%5) ise *H.influenza* DNA'sı PCR ile gösterildi. Bu sonuçlar Şekil 4.2 ve Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.



Not 1: Yüzde değerleri tam rakamlara tamamlanmıştır.
Not 2: Karışık olarak pozitiflik saptanan iki örnek burada ayrı olarak değerlendirilmiştir.
Şekil 4.2: PCR sonuçları

Kültür ve PCR sonuçları alındıktan sonra, hasta dosyalarından hastanın LP öncesi antibiyotik alıp almadığı ve BOS hücre sayıları araştırılmıştır. Kültür pozitif bulunan örnekte nötrofil sayısının 70 olduğu ve LP öncesi antibiyotik hikâyesi olmadığı belirlenmiştir. PCR pozitif bulunan örneklerden ikisinin bilgilerine ulaşılamamış, ulaşılan iki PCR pozitif örnekte de hücre mevcudiyeti ve antibiyotik hikâyesine rastlanmamıştır.

- Kültür ve PCR'ın karşılaştırılması:

Grup A: BOS örneklerinin 43'ünün 4'ü (% 9,3) PCR pozitif ve kültür negatif bulundu. Sadece örneklerinde (%1,9) PCR-pozitif ve kültür-pozitif, 38'inde ise (%90,6) PCR-negatif ve kültür-negatif bulundu. Kültür-pozitif ve PCR-negatif örnek belirlenmedi.
Grup B: OKE örneklerinin 17'sinin 5'i (%29,4) PCR-pozitif ve kültür-negatif, 3'ü (%17,6) PCR-pozitif ve kültür-pozitif, 12'ü ise (%82,3) PCR-negatif ve kültür-negatif olarak bulundu. Kültür-pozitif ve PCR-negatif örnek belirlenmedi.

Beyin omurilik sıvısı ve OKE örneklerinin kültür ve PCR sonuçları ile bunların Ki-kare istatistik testi ile saptanan duyarlılık, özgüllük, PKD ve NKD değerleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

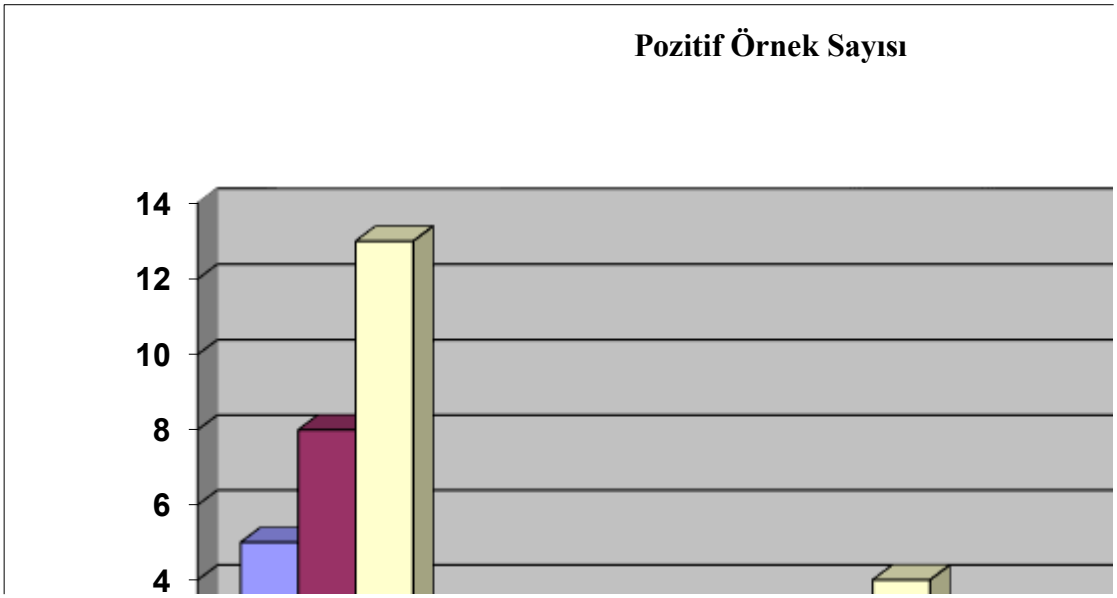
Çizelge 4.3 BOS ve OKE ile elde edilen bakteri kültürü ve PCR istatistikleri

		Pozitif	Negati	Topla	Duyarlılık	Özgüllük (%)	PK	NKD (%)	Korelasyon (%)	LR	P
BOS (53)	Pozitif	1	4	5	100	92,3	20	100	92,4	4.918	
	Negatif	0	38	38							0,027
	Toplam	1	42	43							
OKE (22)	Pozitif	3	5	8	100	73,7	37,5	100	77,3		
	Negatif	0	12	12							0,008
	Toplam	3	17	20							
Tüm örnekle	Pozitif	4	g	13	100	87,3	30,8	100	88		
	Negatif	0	50	50							<0,00
	Toplam	4	60	60							

Kültür sonuçları A ve B gruplarındaki 60 örnekten sadece 4 (%6,6) örnek için elde edildi. Bunlardan çoğunluğu (3 örnek) B grubunda yer almaktadır. PCR prosedürü ile 60 örneğin 13'ünde (%21,6) pozitif sonuç elde edildi.

Bu durumda kültür ve PCR verileri arasında %12'lik (%5,3 - %17,3) bir uyumsuzluğun olduğu görülmektedir. Örnek tipleri ayrı ayrı incelendiğinde, kültür ve PCR uyumsuzluklarının BOS için %7,5, OKE için %22,7 olduğu gözlenmiştir.

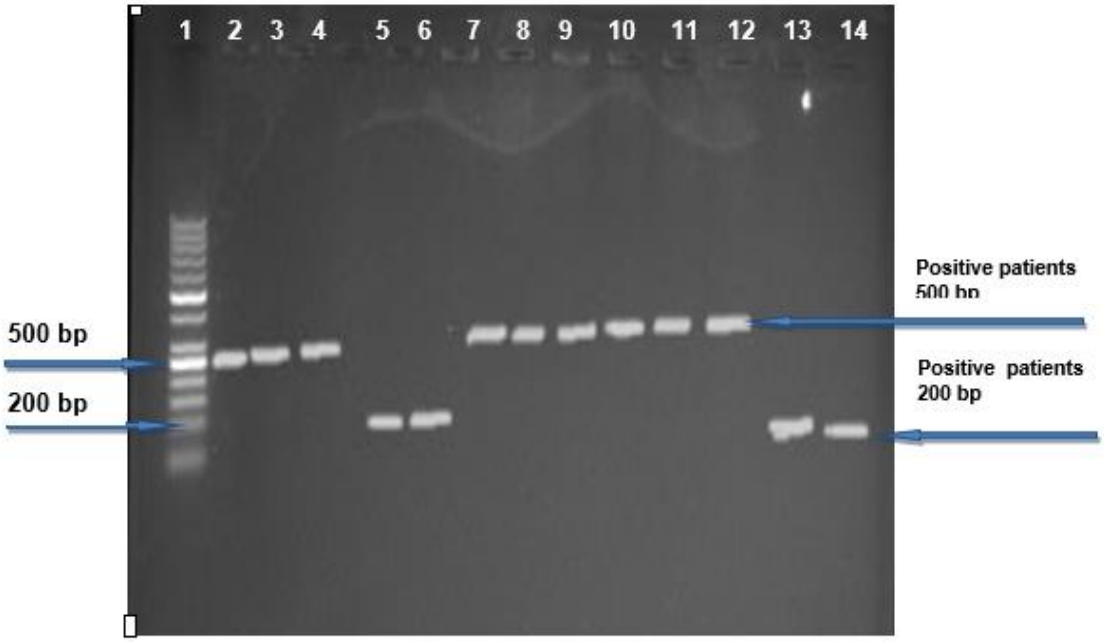
İkisi BOS'ta 2'si OKE'de olmak üzere kültürlerde elde edilen çalışma dışı bakterilere Çizelgelarda ve istatistiksel hesaplamalarda yer verilmemiştir. Grup A ve B' nin her ikisinde elde edilen PCR ve kültür pozitif sonuçların karşılaştırılması Şekil 4.3'te yapılmıştır.



Şekil 4.3 PCR ve bakteri kültürü ile belirlenen pozitif örnek sayısı

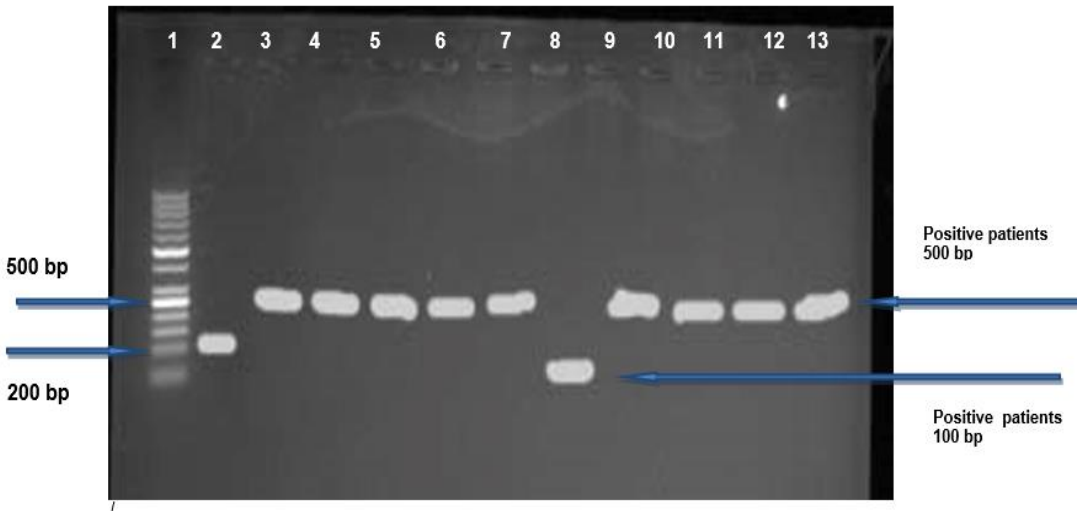
PCR ve kültür testlerinin tanı benzerliklerinin yüksek olduğu, bu uyumun istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (LR: 15,184; $p<0,001$). Bu ilişkinin boyutunu belirlemek için hesapladığımız Spearman sıra korelasyon katsayısının da istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p=0,518;p<0,001$).

Numunelerin PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin elektroforez işleminden sonraki görüntüleri Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

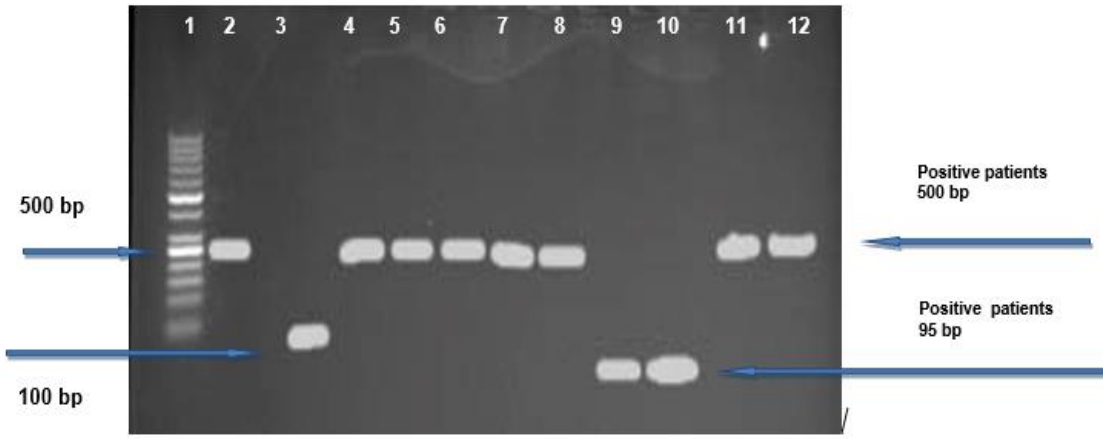


Şekil 4.4 *S.pneumoniae, M.catarrhalis* ve *H.influenzae* multipleks PCR sonuçlarının jel görüntüsü. *S. pneumoniae* geni, *M. catarrhalis* ve *H. influenzae* geninin PCR ürünlerinin %1,5 agaroz jel üzerinde 10 volt/cm'de 1 saat jel elektroforezi. Hat SM: 1Kb DNA merdiveni, hat 2,3,4: Pozitif kontrolün PCR ürünleri, hat 5,6: Negatif kontrolün PCR ürünleri, hat 7,8,9,10,11,12: Pozitif hastaların PCR ürünleri, hat 13, 14: Negatif hastaların PCR ürünleri

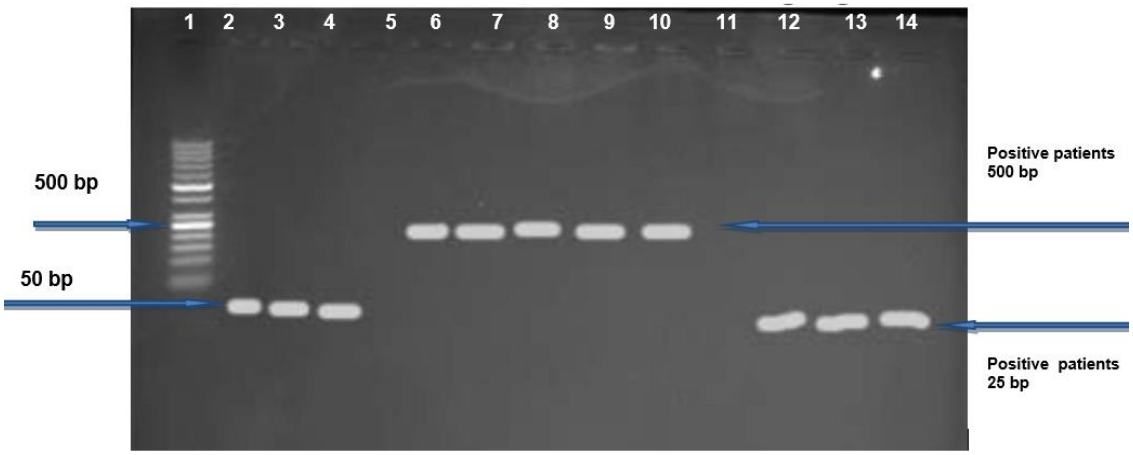
Pozitif kontrol ve pozitif hasta örneklerinde *H.influenzae* amplifikasyon bandları *S.pneumoniae* amplifikasyon bandıyla yakın büyüklükte olduğundan süperpoze olmuştur. Bu nedenle *S.pneumoniae* ve *M.catarrhalis* için multiplex PCR çalışılıp Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'deki jel görüntüsü elde edilirken *H.influenzae* için ayrıca PCR çalışması yapılmak zorunda kalınmış ve Şekil 4.5'deki jel görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 4.5 *H.influenzae* PCR sonuçlarının jel görüntüsü. Hat SM: 1Kb DNA merdiveni, hat 2,3,4: Pozitif kontrolün PCR ürünleri, hat 5,6: Negatif kontrolün PCR ürünleri, hat 7,8,9,10,11,12: Pozitif hastaların PCR ürünleri, hat 13: Negatif hastaların PCR ürünleri



Şekil 4.6 Multiplex PCR sonuçlarının jel görüntüsü. Şerit SM: 1Kb DNA merdiveni, hat 2,3,4: Pozitif kontrolün PCR ürünleri, hat 5,6: Negatif kontrolün PCR ürünleri, hat 7,8,9,10,11,12: Pozitif hastaların PCR ürünleri



Şekil 4.7 *H.influenzae* multipleks PCR sonuçlarının jel görüntüsü. Hat SM: 1Kb DNA merdiveni, hat 2,3,4: Pozitif kontrolün PCR ürünleri, hat 5,6: Negatif kontrolün PCR ürünleri, hat 7,8,9,10,11,12: Pozitif hastaların PCR ürünleri, hat 13, 14: Negatif hastaların PCR ürünleri

5. TARTIŞMA

Otitis media ve menenjit hastalıklarının görülme prevalansı bebek ve çocuklarda yüksek olup nörolojik olarak deformasyon bırakmasının yanı sıra ölüm olaylarına da yol açmaları nedeniyle hastalık etkeni patojen mikrobiyotanın incelenmesi gereklidir (Balganesh *et al.* 2003). Orta kulak iltihabından sorumlu en yaygın bakteriyel ajanlar olan *H.influenzae, M.catarrhalis* ve *S.pneumoniae* aynı zamanda bakteriyel menenjit vakalarının da önemli patojenlerindendirler (Sakamoto *et al.* 1996). Etkenlerin genellikle zor üreyen bakteriler olması ve öncesinde antibiyotik kullanılmaya bağlı olarak tespit edilme durumunun zor olma olasılığı gibi nedenlerden dolayı, konvansiyonel mikrobiyolojik kültür yöntemleri ile OME ve ABM'in altta yatan patojenik nedenlerini aydınlatmak kolay değildir (Radström *et al.* 1994).

Bakteri kültürlerinin teşhisi için morfolojik incelemeler halen uygulanmakta ve tanıda ilk olarak tercih edilen yöntemler olmaktadırlar. Uzun bir kültür sürecinin olması, kontamine olma durumu gibi zorluklar olsa da direkt tanı için ilk aşamada kullanılırlar. PCR gibi hızlı tanı yapan moleküler tekniklerin gelişmesi ile birlikte az miktarda örnek olsa bile mikrobiyal genom açığa çıkarılarak kültürde negatif verme durumu veya yavaş büyüyen patojenlerin olduğu zamanlarda tanımlamayı sağlamaktadır (Aboutalebian *et al.* 2021).

Özellikle hastalıkların hızlı ilerlemesi ve konvansiyonel yöntemlerle etken patojenlerin tanımlanmasının 36 saat veya daha uzun sürmesi gibi nedenler gözönüne alındığında, bu tür olgularda moleküler yöntemlerden PCR gibi hızlı tanı yöntemleri uygulanmaktadır (Post *et al.* 1995).

Bu çalışmada, konvensiyonel mikrobiyolojik yöntemlerle 43 BOS örneğinin sadece 1 (%1,9) tanesinde *(S.pneumoniae)* kültür pozitifliği saptanmıştır. ABM'de mojor patojenlerden olan *H.influenzae* izole edilmemiştir. 17 OKE örneğinin, 2'si *M.catarrhalis,* 1'i *H.influenzae* non b olmak üzere 3'ünde (%13,6) kültür pozitifliği bulunmuştur. Çalışma süresince ABM ve OME şüpheli hastalardan gönderilen toplam 60 örnekten sadece 4 tanesi (%5,3) kültür-pozitif olarak bulunmuştur.

Çalışma örneklerine PCR testi uygulandığında, 43 BOS örneğinin 5'inde (%9,4), 17 OKE örneğinin 8'inde (%36,3) pozitiflik saptanmıştır. BOS öreneklerinde saptananların hepsi *S.pneumoniae*, OKE örneklerinde saptananların 3'ü (%13,6) *H.influenzae,* 3'ü (%13,6) *M.catarrhalis ve* 2'si ise (%9,1) hem *S.pneumoniae* hem de *M.catarrhalis* olarak belirlenmiştir. Bu durumda PCR uygulanan toplam 60 örneğin 13'ünde (%17,3) pozitiflik saptanmıştır. Bunların 7'sinde (karışık bulunan iki *S.pneumoniae* dahil) (%9,3) *S.pneumoniae* DNA'sı, 5'inde (karışık bulunan iki *M.catarrhalis* dahil) (%6,7) *M.catarrhalis* DNA'sı ve 3'ünde (%4) ise *H.influenza* DNA'sı PCR ile gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, kültür ortamı ile PCR verileri arasında %12'lik (%5,3 - %17,3) bir uyumsuzluk olduğunu göstermektedir. Örnek tipleri ayrı ayrı incelendiğinde, kültür ve PCR uyumsuzluklarının BOS için %7,5, OKE için %22,7 olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, BOS örneklerinin hücre sayım sonuçları gözardı edilerek işlem uygulanmış ve örnek az olduğu için Gram boyama uygulanamamıştır. Kültür ve PCR sonuçları elde edildikten sonra, hasta dosyaları incelenerek hastanın LP öncesi antibiyotik kullanıp kullanmadığı, BOS hücre sayıları incelediğinde kültür sonucu pozitif bulunan numunelerde nötrofil sayısının 70 olarak gözlemlendiği ve LP öncesi antibiyotik hikâyesinin bulunmadığı anlaşılmıştır. Hasta dosyaları içerisinde bulunan bilgilere bakıldığında bazı örneklerde farklı miktarlarda nötrofil bulunmasına ek olarak lenfositlerin de varlığı görülmüş fakat bu numunelerde hem kültür hem de PCR poztifliği gözlemlenmemiştir.

PCR sonucu pozitif çıkan örneklerin 2 tanesinin bilgisine ulaşılamamış, ulaşılan 2 PCR pozitif örnekte ise hücre varlığı ve antibiyotik ile ilgili bilgiler görülmemiştir. Bu bilgi daha fazla sayıda kültür negatif-PCR pozitif olan örnekler de araştırılma yapılması gerektiğini göstermektedir.

van Ketel ve arkadaşları (1990) yaptıkları çalışmada, PCR DNA amplifikasyonu ile menenjitli hastalardan aldıkları serebrospinal sıvıda *H. influenzae*'nin saptanması için yaptıkları çalışmada *H. influenzae* kültür pozitifliği tespit etmişlerdir. Kullandıkları primerler de dâhil, PCR yönteminin hastalık tanısında uygun olabileceği sonucuna varmışlardır.

İngiltere'de halk sağlığı laboratuvarlarında hastalık şüphesi bulunan kişilerden alınan kan ve beyin omurilik sıvısı örneklerinde *Neissaria meningitidis* ve *S. pneumoniae* tanısı için PCR yöntemlerinin kullanıldığı ve bu yöntemin hassasiyetinin %87 olduğu tespit edilmiştir (El Bashir *et al.* 2003). Bu çalışmada da, PCR sonuçlarından pozitiflik saptamanın yüksek olması nedeniyle çalışmadaki amacımız doğrulanmıştır.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, otitis media ve menengit şüpheli kişilerden alınan beyin omurilik sıvısı ve orta kulak efüzyon örneklerinde konvensiyonel mikrobiyolojik yöntemlerle kültüre edilmesi ve moleküler biyoloji yöntemlerinden PCR ve multiplex PCR işlemleri yapılmıştır. Kültür negatif çıkan örnekler, moleküler yöntemler sonucunda pozitif olarak saptanmıştır. Buradan yola çıkılarak, PCR ve multiplex PCR metodlarının uygulanarak bakteriyel DNA'nın örneklerde saptanması işlemi hastalıkların tanısı için oldukça önemli olduğu görülmüştür. Ayrıca, örneklerin laboratuvar ortamlarında hızlı bir şekilde kültüre alınması ve bekletilmemesi sonucuna varılmıştır.

Otitis media ve bakteriyel menenjit hastalıklarının tanısında, örnekleri alan doktor, laboratuvar ortamında tanımlayan mikrobiyolog ve moleküler biyolog arasında sistematik bir çalışma düzeni yapılarak örnekler hızlı ve etkin bir şekilde işleme alınmalıdır. Bu şekilde, hızlı bir tanı yapılarak hastalık etkeni olan bakteri veya bakterilere karşı tedavi yöntemleri erken uygulanmaya başlayacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Aboutalebian, S., Ahmadikia, K., Fakhim, H., Chabavizadeh, J., Okhovat, A., Nikaeen, M. and Mirhendi, H. 2021. Direct Detection and Identification of the Most Common Bacteria and Fungi Causing Otitis Externa by a Stepwise Multiplex PCR. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11(210).

Acar, M., Sütçü, M. ve Somer, A. 2014. Çocuklarda Menenjite Güncel Yaklaşım. Çocuk Dergisi, 14(3), 95-99.

Eichner, H., Karlsson, J., Spelmink, L., Pathak, A., Sham, L.-T., Henriques-Normark, B. and Loh, E. 2021. RNA thermosensors facilitate *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* immune evasion. PLoS Pathogens, 17(4), e1009513.

El Bashir, H., Laundy, M. and Booy, R. 2003. Diagnosis and treatment of bacterial meningitis. Archives of Disease in Childhood, 88(7), 615-620.

Frosh and Kohle. 1896, Henriksen and Bovre. 1968, Lehmann and Neumann. 1896, Winslow et al. 1917. ITIS Report website [2021]. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=963642#null.

Geme III, J. W. S. 2000. The pathogenesis of nontypable *Haemophilus influenzae* otitis media. Vaccine, 19, S41-S50.

Hacımustafaoğlu, M. 2003. Çocuklarda Akut Otitis Media. Güncel Pediatri, 1: 29-34.

Huang, C. C., Wu, P. W., Chiu, C. H., Lee, T. J. and Chen, C. L. 2021. Assessment of sleep-disordered breathing in pediatric otitis media with effusion. Pediatrics & Neonatology, 1-29.

İçağasioğlu, D., Baskin, E., Kafali, G., Koçoğlu, F., Toksoy, H.B., Tanzer. F. 1995. *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*: Üst Solunum Yolu Enfeksiyonlarındaki Rolü, Ampirik Tedavisinde Ampisilin Ile Ampisilin-Sulbaktam Kombinasyonunun Karşılaştırıldığı Randomize Klinik Bir Çalışma. Turkiye Klinikleri J Med Sci.15(4):244-247.

Jörissen, J., van den Broek, M. F., De Boeck, I., Van Beeck, W., Wittouck, S., Boudewyns, A. and Wouters, I. 2021. Case-Control Microbiome Study of Chronic Otitis Media with Effusion in Children Points at Streptococcus salivarius as a Pathobiont-Inhibiting Species. Msystems, 6(2), e00056-00021.

Klei. 1884, Chester. 1901, ITIS Report Website [2021]. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=963642#null.

Koçyiğit, M., Giran Örtekin, S. ve Çakabay, T. 2016. Otitis Media, Sınıflandırma ve Tedaviye Yaklaşım Prensipleri. İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Tıp Dergisi (IKSST), 8(2), 65-70.

Lehmann and Neumann. 1896, Winslow et al. 1917. ITIS Report Website [2021]. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=963642#null.

WHO 2021. Defeating meningitis by 2030: A Global Road Map.

Özerol, I. H., Asgin, N. ve Kalcioglu, M. T. 2002. Üst Solunum Yolu Infeksiyonlarinda Moraxella catarrhalis' in Önemi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9(1), 25-27.

Post J.C., Preston R.A., Aul J.J., Larkîns - Pettigrevv M., Rydquist - VVhite J. Anderson K.W., Wadowsky R.M., Reagan D.R., Valker E.S., Kingsley L.A., Magit A.E. and Ehrlich G.D. 1995. Molecular Analysis of Bacterial Pathogens in Otitis Media with Effusion, JAMA, 273 (20): 1598 – 1604.

Radström P., Backman A., Qian N., Kragsbjerg P., Pahlson C. and Olcen P. 1994. 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., 32 (11): 2738-44.

Sakamoto N., Kurono Y., Ueyama T. and Mogi G. 1996. Detection of Haemophilus influenzae in Adenoids and Nasopharyngeal Secretions by Polymerase Chain Reaction, Açta Otolaryngol (Stock h), 523: 145 – 146.

Sezgin, Z. 2016. Efüzyonlu otitis media: tanı ve tedavi yaklaşımlarına genel bakış otitis media with effusion: overview of diagnosis and treatment approaches. Pediatric Practice and Research, 4(1), 1-11.

Sharma, S., Acharya, J., Caugant, D. A., Banjara, M. R., Ghimire, P. and Singh, A. 2021. Detection of Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis and Haemophilus influenzae in Culture Negative Cerebrospinal Fluid Samples from Meningitis Patients Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction in Nepal. Infectious Disease Reports, 13(1), 173-180.

Silva, M. D., Paris, J. L., Gama, F. M., Silva, B. F. and Sillankorva, S. 2021. Sustained Release of a Streptococcus pneumoniae Endolysin from Liposomes for Potential Otitis Media Treatment. ACS Infectious Diseases. 7(8), 2727-2737.

Tristram, S., Jacobs, M. R. and Appelbaum, P. C. 2007. Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae. Clinical microbiology reviews, 20(2), 368-389.

Van Ketel, R., de, De Wever, B. and Van Alphen, L. 1990. Detection of Haemophilus influenzae in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. Journal of Medical microbiology, 33(4), 271-276.

Verduin, C. M., Hol, C., Fleer, A., van Dijk, H. and van Belkum, A. 2002. Moraxella catarrhalis: from emerging to established pathogen. Clinical microbiology reviews, 15(1), 125-144.

Von Specht, M., Gabarrot, G. G., Mollerach, M., Bonofiglio, L., Gagetti, P., Kaufman, S. and Lopardo, H. A. 2021. Resistance to β-lactams in Streptococcus pneumoniae. Revista Argentina de Microbiología, 1-6.

Xu, J., Dai, W., Liang, Q., and Ren, D. 2020. The microbiomes of adenoid and middle ear in children with otitis media with effusion and hypertrophy from a tertiary hospital in China. International journal of pediatric otorhinolaryngology, 134, 110058.

Yıldırım-Baylan, M., Schachern, P., Tsuprun, V., Shiabata, D., Paparella, M. M. and Cureoglu, S. 2014. The pathology of silent otitis media: A predecessor to

tympanogenic meningitis in infants. International journal of pediatric otorhinolaryngology, 78(3), 451-454.

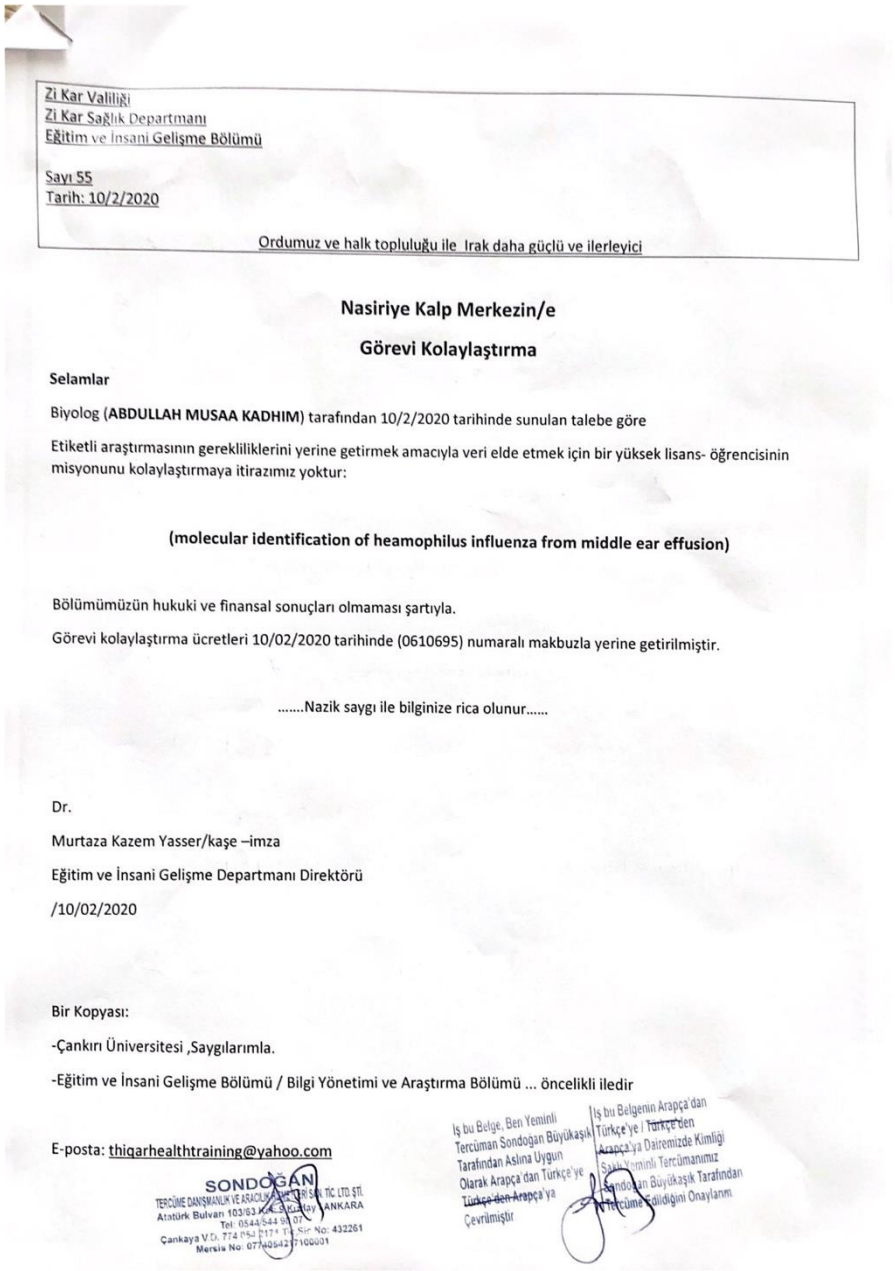
EKLER

EK 1. Zi Kar Valiliği Zi Kar Sağlık Departmanı Eğitim Ve İnsani Gelişme Bölümü 55 Sayı Numaralı 10/2/2020 Tarihli Etik Kurul Belgesi

EK 2. Zi Kar Valiliği Zi Kar Sağlık Departmanı Eğitim Ve İnsani Gelişme Bölümü 55 Sayı Numaralı 10/2/2020 Tarihli Etik Kurul Belgesi (Arapça Metin)

EK 1

Zi Kar Valiliği Zi Kar Sağlık Departmanı Eğitim Ve İnsani Gelişme Bölümü 55 Sayı Numaralı 10/2/2020 Tarihli Etik Kurul Belgesi



Zi Kar Valiliği
Zi Kar Sağlık Departmanı
Eğitim ve İnsani Gelişme Bölümü

Sayı 55
Tarih: 10/2/2020

Ordumuz ve halk topluluğu ile Irak daha güçlü ve ilerleyici

Nasiriye Kalp Merkezin/e

Görevi Kolaylaştırma

Selamlar

Biyolog (**ABDULLAH MUSAA KADHIM**) tarafından 10/2/2020 tarihinde sunulan talebe göre

Etiketli araştırmasının gerekliliklerini yerine getirmek amacıyla veri elde etmek için bir yüksek lisans- öğrencisinin misyonunu kolaylaştırmaya itirazımız yoktur:

(molecular identification of heamophilus influenza from middle ear effusion)

Bölümümüzün hukuki ve finansal sonuçları olmaması şartıyla.

Görevi kolaylaştırma ücretleri 10/02/2020 tarihinde (0610695) numaralı makbuzla yerine getirilmiştir.

.....Nazik saygı ile bilginize rica olunur.....

Dr.

Murtaza Kazem Yasser/kaşe –imza

Eğitim ve İnsani Gelişme Departmanı Direktörü

/10/02/2020

Bir Kopyası:

-Çankırı Üniversitesi ,Saygılarımla.

-Eğitim ve İnsani Gelişme Bölümü / Bilgi Yönetimi ve Araştırma Bölümü ... öncelikli iledir

E-posta: thiqarhealthtraining@yahoo.com

SONDOĞAN
TERCÜME DANIŞMANLIK VE ARAÇLIK [illegible] SAN. TİC. LTD. ŞTİ.
Atatürk Bulvarı 103/63 Kat: 3 Kızılay / ANKARA
Tel: 0544/544 98 07
Çankaya V.D. 774 053 2171 Tic. Sic. No: 432261
Mersis No: 0774053217100001

İş bu Belge, Ben Yeminli Tercüman Sondoğan Büyükaşık Tarafından Aslına Uygun Olarak Arapça'dan Türkçe'ye ~~Türkçe'den Arapça'ya~~ Çevrilmiştir

İş bu Belgenin Arapça'dan Türkçe'ye / ~~Türkçe'den~~ Arapça'ya Dairemizde Kimliği Saptanmış Yeminli Tercümanımız Sondoğan Büyükaşık Tarafından Tercüme Edildiğini Onaylarım

EK 2

Zi Kar Valiliği Zi Kar Sağlık Departmanı Eğitim Ve İnsani Gelişme Bölümü 55 Sayı Numaralı 10/2/2020 Tarihli Etik Kurul Belgesi (Arapça Metin)



Goverment Of Thi Qar
Health Office Of Thi Qar
Training &
Human Development Department

محافظة ذي قار
دائرة صحة محافظة ذي قار
قسم التدريب والتنمية البشرية

العدد/ ٥٥
التاريخ ٢٠٢٠/٢/١٠

بجيشنا و الحشد الشعبي العراق اقوى و أمضى

إلى / مركز الناصرية للقلب
م/تسهيل مهمة

تحية طيبة :-

بناءا على الطلب المقدم من قبل البيولوجي (عبدالله موسى كاظم) بتاريخ ٢٠٢٠/٢/١٠.

لا مانع لدينا من تسهيل مهمة طالب الدراسات العليا- ماجستير لغرض الحصول على بيانات لغرض استكمال متطلبات بحثه الموسوم:

(molecular identification of heamophilus influenza from middle ear effusion)

على ان لا تتحمل دائرتنا اي تبعات قانونية ومالية.
تم استيفاء اجور تسهيل المهمة بموجب الوصل المرقم (٠٦١٠٦٩٥) بتاريخ ٢٠٢٠/٢/١٠.
.....للتفضل بالاطلاع مع الاحترام....

الدكتور
مرتضى كاظم ياسر
مدير قسم التدريب والتنمية البشرية
٢٠٢٠/٢/ ١٠

دائرة صحة ذي قار
قسم التدريب والتنمية البشرية

SONDOĞAN
TERCÜME DANIŞMANLIK VE ARAÇLIK HİZMETLERİ SAN. TİC. LTD. ŞTİ.
Atatürk Bulvarı 103/53 Kat:1 KAVAKLIDERE / ANKARA
Tel: 0542 [illegible]
Çankaya V.D. 774 [illegible] No: 432261
Mersis No: [illegible]

نسخة منه الى :
- جامعة جانكيري / تركيا.... مع الاحترام
-قسم التدريب والتنمية البشرية/شعبة ادارة المعرفة والبحوث...مع الاولويات

عبير ٢٠١٩

البريد الالكتروني thiqarhealthtraining@yahoo.com

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Abdullah Musaa KADHIM

Yabancı Dili : Arapça-İngilizce-Türkçe

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ibn Almoaatem Lisesi (2011-2012)

Lisans : Thi-Qar Üniversitesi (2012-2016)

Yüksek Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi (2019-2021)