

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ
ANABİLİM DALI

**KRONİK EFFÜZYONLU OTİTİS
MEDIADA ORTA KULAK
EFFÜZYONUNDA,
NAZOFARENKS VE DIŞ KULAK YOLU
FLORASINDA BAKTERİYOLOJİ:
“ALLOİOKOKKUS OTİTİDİS’İN”
ARAŞTIRILMASI**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**TEZ YÖNETİCİSİ
PROF. DR. SEMİH ÖNCEL**

**UZMANLIK TEZİ
DR. M. TAYYAR KALCIOĞLU**

99085

**MALATYA
Ağustos - 2000**

Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda dört sene süren uzmanlık eğitimim sırasında ve tez çalışmam esnasında bilgi ve deneyimlerini aktararak eğitimimin en iyi şekilde tamamlanması için gayret gösteren ve üzerimde olan emeklerini hiçbir zaman unutmayacağım değerli hocalarım, Anabilim Dalı Başkanımız ve tez yönetici hocam Sayın Prof.Dr.Semih ÖNCEL'e, Sayın Doç.Dr.Davut AKTAŞ'a, Sayın Doç.Dr.Orhan ÖZTURAN'a, Sayın Doç.Dr.Yaşar ÇOKKESER'e, Sayın Yard.Doç.Dr. Ahmet KIZILAY'a, Sayın Yard.Doç.Dr. Murat Cem MİMAN'a, bölümümüzden ayrılmış olan Sayın Doç.Dr.Levent SAYDAM'a ve Bölümümüzden uzmanlığını alıp ayrılmış olan kıdemlilerim Sayın Op.Dr.Fatih BULUT'a, Sayın Op.Dr.Fevzi SOLMAZ'a ve beraberce uyumlu ve çok güzel günler geçirdiğimiz çok sevgili mesai arkadaşlarım Sayın Op.Dr.Zeki KAYA'ya, Sayın Dr.Mustafa AKARÇAY'a, Sayın Dr.Ibrahim ALADAĞ'a, Sayın Dr.Bahri YİĞİT'e, Sayın Dr.Erkan KARATAŞ'a, Sayın Dr.Tuba PİLTEN'e, Sayın Dr.Kemal ÖZCAN'a, ayrıca tezimin kültür ve PCR çalışmaları sırasında özveri göstererek mesayi kavramı dışında kalıp geç vakitlere kadar uğraş veren Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan başta Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Rıza DURMAZ olmak üzere Sayın Uz.Dr.Nergis AŞGIN'a ve Sayın Araştırma Görevlisi Barış OTLU'ya ve istatistik çalışmalarımda katkısından dolayı Sayın Yard.Doç.Dr.Saim YOLOĞLU'na ve tez materyallerini toplamam esnasında yardımlarını esirgemeyen ameliyathane hemşireleri Sevilay ÖZÇELİK'e, Gönül ŞAHİN'e, Günyüz ÖZBEY'e ve ameliyathane personeli Bekir UZUNKAYA'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. M. Tayyar KALCIOĞLU

Ağustos - 2000

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	:	1
GENEL BİLGİLER	:	2
MATERYAL VE METOD	:	19
BULGULAR	:	26
TARTIŞMA	:	40
SONUÇ	:	48
ÖZET	:	49
REFERANSLAR	:	50

GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik effüzyonlu otitler, özellikle çocukların çevreleriyle iletişimlerinin en yoğun olduğu yaşlarda işitme kayıplarına yol açmaları nedeniyle önem arz etmektedirler. (1). Bu konuda östaki tüpü disfonksiyonları, allerji, immunoloji, mastoid havalanmasındaki yetersizlikler, biyokimyasal çalışmaların yanısıra, enfeksiyona yönelik araştırmalar da halen devam etmektedir (1, 2, 3, 4).

Araştırma konusu olarak kronik effüzyonlu otitis mediada mikrobiyolojiyi seçmemizin nedeni, bugüne kadar sorumlu tutulan etken patojenlerin yanısıra literatürde yeni bir patojen olarak adı geçen *Alloiokokus otitidis*'in ne denli rolünün olabileceğini göstermek, nazofarenks ve dışkulak yolunun da ne ölçüde bu bakteriyal patojenler için rezervuar olabileceğini araştırmaktır.

Bu konuda literatürde çeşitli çalışmalar mevcut olup özellikle *A. otitidis*'e yönelik çalışmalar çok sınırlı sayıdadır. Bizim bulabildiğimiz kadarıyla orta kulak effüzyonlarında *A. otitidis* varlığı ile ilgili olarak yedi yayın saptadık (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) Nazofarenks ve dış kulak yolu florasında *A. otitidis*'in yeri konusunda bizim rastlayabildiğimiz bir çalışma yoktur.

Bu çalışmamızı hem kronik effüzyonlu otitis mediada *Streptokok pnömoni*, *Hemofilus influenza*, *Moraksella kataralis* ve özellikle *Alloiokokus otitidis*'in yeri konusundaki çalışmalara katkı sağlamayı, hem de bunun nazofarenks ve dışkulak yolundaki bakteriyal içerik ile bağlantısının mevcudiyetini araştırmak için başlattık.

GENEL BİLGİLER

Effüzyonlu otitis medianın semptomlarının tarifi ve tedavisi 1869 yılında Politzer tarafından yapılmıştır(12). Ancak 1950'lerin sonlarına kadar bu konuda uzun yıllar bir çalışma yapılmamıştır (12). Effüzyonlu otitis media (EOM), genel ve lokal infeksiyon belirti ve bulguları olmaksızın sağlam kulak zarı arkasında sıvı toplanması ile karakterize otitis media tipidir (13). Çocuklarda saptanan işitme kayıplarının en sık görülen sebebidir (14). Kronik effüzyonlu otitis media, sekretuar otitis media, non süpüratif otitis media, kataral otit, seröz otitis media, serotimpanium, mukoid otitis media ve mukotimpanium gibi isimlerle anılmaktadır. Bunlar arasında en sık kullanılan terimler effüzyonlu otitis media ve sekretuar otitis mediadır. Bugünkü bilgilerimize göre EOM, akut otitis media (AOM) ile kronik otitis media (KOM) arasında yer alan bir geçiş şeklidir (13). üç haftaya kadar olan dönem akut, üç hafta – üç ay arası subakut, üç aydan sonraki dönem ise kronik olarak değerlendirilir.

EOM, çocukluk çağında AOM'den sonra en sık karşılaşılan kulak hastalığıdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 6-12 yaş grubu çocuklarda insidansı %22 dir (15). Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda prevalansı %11 ile %19 arasındadır (13, 16).

Başta akut otitis media (AOM) olmak üzere pek çok nedenle orta kulakta sıvı toplanabilmektedir. Enfeksiyonun yanında, barotravmalar, östaki borusundan kaynaklanan problemler (nazofarenks kanserleri ve bunların tedavisinde kullanılan radyoterapi neticesinde), immun bozukluklar, allerji, çeşitli biyokimyasal bozukluklar da orta kulakta effüzyon toplanmasına neden olmaktadır.

Pestalazzo ve ark. (17), effüzyonun oluşmasındaki risk faktörlerini önem derecesine göre şöyle sıralamışlardır:

Birincil derecede önemli risk faktörleri:

- 1- Üst solunum yolları infeksiyonları
- 2- Mevsimler (Özellikle sonbahar ve ilkbahar arası)
- 3- Adenoid hipertrofisi
- 4- Yetersiz antibiyotik tedavisi
- 5- Konjenital malformasyonlar ve ırk

Rastlantısal ve ikincil risk faktörleri:

- 1- Ana, baba ve kardeşlerin üst solunum yolu enfeksiyonu
- 2- Yaşanan bölge iklimi ve yaşanan ev
- 3- Çocukta allerji hikayesi
- 4- Evin kalabalık olması
- 5- Nem derecesi
- 6- Genel ve lokal immunité defektleri

Doğum ve büyüme koşulları ile ilişkili risk faktörleri:

- 1- Amnion suyunda mekonyumun varlığı
- 2- Uzun doğum eylemi
- 3- Prematüre doğanlar
- 4- Vücut ağırlığının normalden düşük olması
- 5- Anne sütü ile beslenmenin erken bırakılması
- 6- Erkenden kreşe verilme

AOM ataklarının varlığında EOM riski 11.9 kat artar (18). Aynı çalışmaya göre risk, anaokulu ya da kreşe gidenlerde 2.56 kat, erkek çocuklarda kızlara göre 2.17 kat, kış aylarında 1.99 kat fazla olmaktadır. Eskimolar ve Amerikalı yerlilerle siyah çocuklara nazaran beyaz Amerikalılarda daha sık izlenir (14). Irk farklılıkları kafa tabanı ve östaki tüpündeki genetik ve anatomik farklılıklara bağlanabilir (14). Genetik faktörler üzerinde de durulmuştur. Rekürren EOM olan çocukların anne baba ve kardeşlerinde benzerlik saptanmıştır (19). Üst solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE) olan çocuklarda, olmayanlara göre 6-7 kat daha fazla orta kulak effüzyonu ile karşılaşmaktadır (1). Effüzyonlu otitis media olgularının %77'sinde ÜSYE de olaya eşlik etmektedir (20).

Östaki borusunun nazofarengeal ağzının deneysel olarak tıkanması orta kulakta effüzyon toplanmasına neden olur (13). Ex vacuo hipotezi Politzer (21) tarafından ortaya atılmış ve küçük çocuklarda östaki tübünün iyi gelişmemiş olmasına bağlı olarak tuba disfonksiyonu oluşması esasına dayandırılmıştır. Benzer tezle Holborow (22), östaki tübü disfonksiyonunun tübün çocukluk döneminden erişkin dönemine geçmeden önceki durumundan kaynaklandığını, bu nedenle bu dönüşümün gerçekleştiği 7. yaştan itibaren effüzyonlu otitis mediada spontan rezolüsyon geliştiğini ifade etmiştir. Östaki borusu uzun bir zaman süresince basınç dengeleme görevini yerine getiremezse orta kulakta gazların absorpsiyonuna bağlı olarak negatif basınç oluşturarak steril transudaya neden olur (21). Östaki borusunun disfonksiyonu iki şekilde görülür; mekanik tıkanma ya da fonksiyonel tıkanma. Mekanik tıkanmalar mukozal hastalık nedeniyle intrensek olabildiği gibi, nazofarenks tümörü ya da adenoid hipertrofisi nedeniyle ekstrensek

de olabilir. İntrensek olarak mekanik tıkanıklık yapan en yaygın sebep allerji ya da enfeksiyonlara bağlı enflamasyondur (23, 24). Östaki fonksiyonları üst solunum yolu enfeksiyonlarında önemli ölçüde bozulmaktadır (24, 25). Östaki tüpünün en sık görülen disfonksiyonu bu şekildedir (26). Ancak halen tartışma konusu olan bir konu, östaki disfonksiyonunun EOM'nın sonucu mu yoksa sebebi mi olduğudur (27).

Mastoidin yetersiz pnömatizasyonu diğer bir etken olarak ileri sürölmüştür. Kronik EOM'larda mastoid hava hücreleri küçük ya da nonpnömatizedir (13). Bazı yazarlar EOM nın prognozunu belirleyen en önemli faktörün mastoid pnömatizasyonu olduğunu öne sürmektedirler (13). İster herediter olarak küçük olsun, isterse çocukluk çağında geçirilmiş enfeksiyonlara bağlı olarak gelişmemiş olsun, mastoid hücre sisteminin büyüklüğü EOM prognozu ile doğru orantılıdır (13). Küçük yaşta enfeksiyon geçirmeye başlamış ya da ciddi enfeksiyon geçirmiş kişilerde oluşan enfeksiyon ve enflamasyonun sonucunda mastoid küçük kalır. Bu da prognozu olumsuz yönde etkiler. Diğer bir teoriye göre orta kulak için dinamik bir gaz ve basınç tamponu olarak görev yapan mastoidin küçük olması EOM'nın prognozunu olumsuz yönde etkilemektedir. Mastoidin küçük olmasının yanında mastoid mukozadaki değişikliklerin de nüks eden inatçı EOM'larda rol oynadığı düşünölmüştür (13). Bu düşünöncede olanlar, mukozadaki infeksiyonun gaz değişimini engelleyerek CO₂ düzeyinin artmasına sebep olduğunu ve ayrıca gelişen mukozal reaksiyon neticesinde geçiş yollarının tıkanması ile mastoidde biriken effüzyonun dışarı atılmadığını ileri sürmektedirler.

Üzerinde durulan diğer bir etmen surfaktan eksikliğidir. Yüzey geriliminin azalması üstaki borusundaki mukosilier aktivitenin kolaylaşmasına neden olur. Bu tezden hareket eden otörler, yüzey gerilimini azaltan surfaktanın azalması ya da yokluğunun yüzey gerilimini artırarak, mukosilier aktiviteyi bozacağını ve EOM gelişimine yol açacağını ileri sürmüşlerdir (28, 29, 30). Surfaktan eksikliğine bakterilerden salgılanan proteolitik enzim aktivitesi de neden olabilmektedir (14).

Adenoid dokunun EOM için risk faktörü olup olmaması konusunda tam bir fikir birliği olmamasına rağmen (13) EOM'lı çocuklarda adenoid dokunun normalden daha büyük olduğu bilinmektedir (31). Adenoid doku sık sık enfekte olarak çocuk yaşlarda büyük sorunlar ortaya çıkarır. Bazı yazarlar adenoid dokunun bakteriyal odak olduğunu, devamlı bir enfeksiyon kaynağı oluşturarak EOM riskini arttırdığını düşünmüşlerdir (32). Adenoid dokunun, doğrudan üstaki borusunun ağzını tıkayarak, orta kulak ve üstaki borusunun lenfatik drenajını engelleyerek, üstaki borusu ağzında enflamasyonun yanı sıra reflüye neden olup orta kulağa nazofarenksten bakteri geçmesine yol açarak neticede üstaki fonksiyonunu bozup EOM oluşumuna sebep olduğu ileri sürülmüştür (19, 33, 34, 35, 36). Ancak buna rağmen adenoidektomi geçirmiş çocuklarda da %30 oranında orta kulak effüzyonu saptandığı belirtilmiş ve adenoidektominin inatçı EOM'yi engelleyemeyeceği üzerinde durulmuştur (37). Adenoidektomi sonrası yapılan çalışmalarda adenoidin varlığı veya yokluğu ile üstaki borusundaki mukus akışının değişmediği gösterilmiştir (38).

Önceden geçirilmiş AOM atakları sırasında kullanılan tedavinin EOM gelişimi üzerindeki etkisi pek çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir. Bugün

kabul edilen görüş, AOM tedavisinde kullanılan antibiyotiğin yanlış seçilmesi ve yanlış kullanılması halinde EOM riskinin arttığı şeklindedir (13). Bu durum ya akut bir enfeksiyonun rezolüsyonunun tamamlanmaması ya da süpürasyona sebep olan organizmaların virülansında bir değişme sonucu olduğunu düşündürür (14). Bir diğer varsayım da antibiyotiklerin kulakta lokal IgM üretimine engel olmasıdır (30).

EOM'da allerjinin rolü üzerinde de durulmuştur. EOM geçiren çocukların %35'inde allerjik rinit bulunmuştur (39). Yapılan çeşitli çalışmalarda adenoid dokularda bol miktarda mast hücrelerinin tespit edilmiş olması ve EOM'lı çocuklarda atopi yönünden aile hikayesi pozitifliğinin olması, özellikle Tip 1 ve Tip 3 immunolojik reaksiyonların EOM patogenezinde rol oynayabileceğini akla getirmiştir (39, 40, 41, 42, 43). Allerjinin, EOM'da; orta kulağın bir şok organ görevi görmesi, östaki borusunun enflamatuar ödemi, burnun enflamatuar ödemi ve bakteri bulaşık allerjik nazofarengeal sekresyonların orta kulak boşluğuna aspirasyonu gibi mekanizmalarla rol oynadığı savunulmuştur (44). Ancak EOM'da IgE seviyelerinin her zaman uyum göstermemesi bu konuda soru işaretlerini akla getirmektedir (21, 30, 45, 46). EOM'da orta kulak eksudasında IgE miktarının 12 defa daha yüksek olduğunun Phillips ve arkadaşlarınca (47) gösterilmiş olmasına rağmen, diğer çalışmalar allerjinin rolünü desteklememiştir (46). Effüzyonlu otitis mediada bir faktör olarak allerjinin rolü, düşündürücü bulgular olmasına rağmen henüz ispat edilememiştir.

Anne sütünde mevcut antikorlar nedeniyle otitis media açısından anne sütü almayan ya da erken kesilen çocuklar daha fazla risk altında olabilmektedir (48, 49)

Kraniyofasiyal anomaliler de EOM için önemli bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmada Down sendromu ve yarık damaklı olguların tamamının yaşamın ilk 3 yılında AOM geçirdikleri ve bunların tamamına yakın bölümünün EOM'a dönüştüğü gösterilmiştir (13).

Bilindiği gibi normalde orta kulak boşluğunda sıvı birikimi olmaz. Bu durumu sağlayan faktörlerden birisi orta kulağı döşeyen mukozanın özel yapısıdır. Respiratuar epitelin devamı kabul edilen, değişik yapı, sayı ve aktivitede sekretuar hücreler içeren psödostrafiye kolumnar silyalı bir mukoza orta kulağı döşemektedir (50, 51, 52). Bu silyalı yapı üstaki ağzına doğru devamlı ve aktif bir hareket halindedir. Bu hareketliliği, mukozadaki sekretuar yapılardan salgılanan mukus sağlar (53, 54, 55). Eğer bu mukus fazla miktarda oluşur ve viskozitesi artarsa ters etki ederek silyer hareketi bozar (56). EOM'da orta kulakta goblet hücrelerinde artış, vasküler dilatasyon, subepitelyal iltihabi hücre birikimi ve hücre metaplazisi vardır (33). Orta kulakta effüzyonun viskozitesi arttıkça goblet hücre sayısı da artmaktadır (57).

Orta kulak mukozası aynı zamanda organı korumaya yönelik çeşitli immunolojik mekanizmalara sahiptir. Bu savunma mekanizması mukoza tarafından salgılanan immunglobulin ve lizozim gibi antibakteriyel enzimlerdir (58). Lizozomların sitokimyasal belirleyicisi asit fosfatazdır (14). Bu immun mekanizma orta kulağı viral ve bakterial enfeksiyonlardan korur (59). Lokal mukozal immun sistemde başlıca rol alan IgA'dır. Orta kulak effüzyonlarında özellikle virüslere spesifik IgA antikor aktiviteleri gözlenmiştir. (60).

Östrojen seviyesinin yüksek olduğu hormonal disfonksiyon veya hipotroidi de üstaki borusu fonksiyonunda değişiklik yaparak SOM'a sebep olabilir (40).

Orta kulak effüzyonlarında bakteriyostatik ve virus inhibe edici maddelerin varlığı Siirala ve Lalikainen tarafından gösterilmiştir (3). İmmunohistokimyasal çalışmalarla orta kulak effüzyonunda IgA, IgG ve IgM yanında immunkompleksler ve kompleman komponentleri tespit edilmiştir (61). Bakteri üretilmeyen effüzyonlarda % 23 oranında fagosit saptanmışken, bu oran bakteri üretilen effüzyonlarda % 37 olarak bulunmuştur (62, 63)

Orta kulak effüzyonunun biyokimyasal komponenti içinde laktat dehidrogenaz, alkalen fosfataz, asit fosfataz, lizozim, hyaluronik asit, laktoferrin ve histamin yer alır (4, 61, 64, 65, 66, 67). Hyaluronik asitin konsantrasyonu arttıkça sedimentasyon hızı süratle düşer, viskozitesi hızla yükselir ve buna bağlı olarak da su tutma kapasitesi anormal derecede artar (4). Özellikle prostaglandin E ve F olmak üzere arasıdonik asit metabolitleri ve lökotrienlerin de EOM patogenezinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (33).

Sitokinlerin otitis mediadaki enflamasyonda rol oynadığını düşünen Yellon ve ark.(68) çalışmalarında orta kulak effüzyonunda %58 interlökin 1 β , %83 interlökin-6, %61 interferon γ bulmuşlar ve yüksek oranda (%37) tümör nekrozis faktör α tespitinin otitis medianın kronikleşmesinde bir faktör olabileceğini belirtmişlerdir.

Orta kulak effüzyonlarının bulaşım olmaksızın elde edilmesiyle birlikte orta kulak materyalinden bakteri ve virus üretilmesine gayret edilmiş ve çeşitli

çalışmalar yapılmıştır. 1970 li yıllardan önce orta kulak effüzyonlarının bakteriyal açıdan steril olduğuna dair düşünceler ağırlıktayken (12, 69), daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda bu sınıfta bakteri mevcudiyeti saptanmıştır (58, 64).

Bir grup çalışmada da viral etiolojiyi destekler sonuçlar elde edilmiştir (12). Viral etyoloji üzerinde durulmuş ve özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda orta kulak effüzyonlarından virüslara ait inklüzyon cisimcikleri tespit edilmiştir (70). SOM'da orta kulak effüzyonunda ve nazofarenksde en çok bulunan virüsün respiratuvar sinsityal virüs (RSV) olduğunu belirten yayının yanısıra (71), yapılan bir başka çalışmada özellikle human rinovirüs (HRV) olmak üzere, RSV ve humancoronavirüs'un bakterilerle birlikte ya da yalnız olarak EOM'da saptandığı belirtilmiştir (72). Son yıllarda yapılan çalışmalarda EOM'da virüs izolasyon oranı %28'e kadar yükselmiştir(13).

Effüzyonlu otitis mediada orta kulak effüzyonunda değişik oranlarda olmak üzere en sık streptokokkus pnömoni, hemofilus influenza, moraksella kataralis, daha az olarak da stafilokokkus aureus, psödomonas aeroginosa, α streptokok, stafilokokkus epidermitis ve A grubu β hemolitik streptokoklar, peptostreptokokkus intermedius, propionibakterium aknes üretilmiştir (73, 74, 75). Virüs ve bakterilerin yanısıra mycoplazma ve özellikle genç infantlarda klamidyaların da etyolojide rol oynayacağı vurgulanmıştır (76). İsveç, Finlandiya ve Amerika Birleşik Devletlerinde en sık saptanan etken streptokokkus pnömoni iken hemofilus influenza ikinci sıklıkta izlenen patojen olmuştur. ABD'nin aksine İskandinavya ülkelerinde A grubu β hemolitik streptokoklar önemli derecede saptanmıştır (76). Stafilokokkus

aureus ve gram (-) enterik basiller çocuk ve yetişkinlerde seyrek iken yenidoğanda daha sık etken olabilmektedir (76). Kültürlerde bakteri üretilme oranı %15 ile %76 arasındadır (64, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83).

Bakteriyolojik çalışmalar nazofarenks ile EOM'larda izole edilen bakteri florasının hemen hemen birbirinin aynı olduğunu göstermiştir (13, 14, 84, 85). Nazofarenksteki bakterial kolonizasyon ile orta kulak effüzyonunda tespit edilen bakteriler %60-90 oranında benzerdir (21, 86, 87). Nazofarenks, orta kulakta enfeksiyon yapan mikroorganizmaların rezervuarı olarak değerlendirilmiştir (88, 89, 90).

Bakteri saptanmasında transport zamanı ve metodoloji önemlidir. Uygun metodoloji ve kısa sürede, uygun şekilde materyallerin transportu ile üretim daha sağlıklı ve doğru olmaktadır (91).

Effüzyonlar kronikleştikçe bakteri saptama şansı azalmaktadır. Bu kulaklarda enfeksiyon gerilemiş; hümmoral ve hüccresel immünite yerleşmiştir. Yapılan iki çalışma bunu destekler özelliktedir (92, 93). Bir çalışmada enfeksiyon mukoid hale döndükçe bakteri saptama olasılığının azaldığı gösterilmişken (92), diğer bir çalışmada da effüzyonlarda bakteri saptama yüzdesi azalırken IgG, IgA ve lizozim oranının arttığı gösterilerek ters orantı vurgulanmıştır (93).

Bakteri üretimi yapılamayan orta kulak effüzyonları steril kabul edilmemelidir. Bu görüşü savunan otörler kronik effüzyonlarda tekrarlayan antibiyotik tedavileri nedeniyle veya giderek artan enzimlerin etkisiyle üreme olmadığını söylemektedirler. Örneğın yapılan bir çalışmada, kültürle %52 oranında bakteri üretilebilmişken, yaymada bakteri saptama oranının %77 olduğu

görülmüştür (93). Bu ve benzeri çalışmalardan, standart kültür yöntemleri ile saptanamayan ancak var olan patojenlerin varlığından söz edilebilir (13).

EOM'da orta kulak effüzyonlarında negatif kültürler hakkında son yıllarda ileri sürülen bir görüş akut enfeksiyona neden olan ajanların ataklar arasında L formlarına yani duvarsız formlarına dönüştükleri bu nedenle standart kültür yöntemleri ile üretilmediğidir (94). EOM tedavisinde kullanılan duvara etkili antibiyotikler uygun olmayan doz ve sürede kullanılırsa, effüzyonlarda bulunan lizozim ve benzeri enzimlerin etkisiyle bakterilerin ana formlarından proplast ya da sferoblastlara dönüşümüne sebep olmakta (95), oluşan bu L formlar orta kulaktaki hiperozmolar ortamda canlılıklarını sürdürebilmektedir ve orta kulak mukozası için sürekli bir irritasyon sebebi olmaktadır (13).

EOM'da orta kulak effüzyonlarından kültür yapıldığı zaman sadece %20-30 hastada pozitif sonuç alınabilirken, bu effüzyonlarda enfeksiyon etiolojisini gösteren gram boyalı lökositlerin gözlenmesi konvansiyonel kültür metodlarının EOM daki patolojiyi saptamada yetersiz kaldığını düşündürmektedir (9).

PCR ile bakteri DNA'sının saptanması EOM da mikroorganizmaların bilinenden daha yüksek oranda mevcudiyetini göstermiştir. Hotomi ve ark (96) kültür sonuçları negatif olan 20 örnekten 13'ünde bakteri mevcudiyetini göstermiştir. Jero ve ark (97), kültürle %11 olarak tespit edilebilen streptokokkus pnömoni'nin aynı örneklerde PCR çalışması ile % 45 olduğunu göstermişlerdir. Post ve ark. (98) yaptıkları çalışmada moraksella kataralis, hemofilus influenza ve streptokokkus pnömoni'yi değerlendirmişler ve kültürle %28.9 oranında üreme saptanmışken; PCR ile tespit edilen bakteri oranını % 77.3 yayınlamışlardır.

Böylece PCR çalışması ile mikroorganizmaların bilinenden daha yüksek oranda mevcudiyeti saptanmıştır.

Son yıllarda yapılan bir kısım PCR çalışmalarında yüksek oranda hemofilus influenza, moraksella kataralis, streptokokkus pnömoni ve alloiokokkus otitis EOM da orta kulak effüzyonunda saptanmıştır (9, 10, 11). Bu yüksek oranlar, EOM nın etiolojisinde baş rolü enfeksiyöz ajanların oynadığını düşündürmektedir.

Hendolin ve ark (9), 25 orta kulak effüzyonunda yaptıkları çalışmada kültürde 4 moraksella kataralis, 2 streptokokkus pnömoni, 2 hemofilus influenza olmak üzere toplam 8 olguda (%32) enfektif ajan üretilebilmişken, aynı örneklerde yapılan PCR çalışmasında 5 olguda kültürde izole edilememiş alloiokokkus otitis olmak üzere toplam 21 olguda (%84) etken patojen izole etmişlerdir.

Dış kulak yolunun mikrobiyolojik florasına bakıldığında %80 aeroblar, %3 anaeroblar ve %17 aeroblar ve anaeroblar birlikte bulunmuş, aeroblardan en sık saptananların stafilokokkus epidermidis, alfa hemolitik streptokoklar ve psödomonas aeruginosa, anaeroblardan ise peptokokkus sp ve proprionibacterium akne olduğu belirtilmiştir (99).

ALLOİOKOKKUS OTİTİDİS

İlk kez Faden ve Dryja tarafından (5), kronik otitis medialı bir çocukta timpanosentez sıvısından izole edilen alloiokokkus otitidis, düşük guanin (G) ve sitosin (C) içeren bir bakteridir. Bakteri, sıklıkla diplokok ve tetrakok görünümünde olan büyük gram (+) koktur. Katalaz pozitif olması organizmanın diğer aerokok ve streptokoklardan ayrılmasını sağlar (6, 8). Alloiokokkus otitidis zaman zaman

gözlenen intrasellüler lokalizasyonu sırasında patojendir (9). Zorunlu aerobdur(100). İkili gruplar ve kümeler halinde bulunur.

Çeşitli kültürlerde üretilmeye çalışılmıştır. A. otitidis'i ilk tanımlayan Faden ve Dryja (5), kültür metoduyla 320 örnekten 16'sında (%5) bu patojeni saptamışlardır. Miller ve ark. (8) yaptıkları çalışmada A. otitidis'i tavşan kanlı beyin kalp infüzyon agarında (HIA-RB) anaerobik atmosferde üretemezken, aerobik atmosferde üretebilmişler ve A. otitidis'in herhangi bir atmosferde, kan olmaksızın üretilmediğini not etmişlerdir.

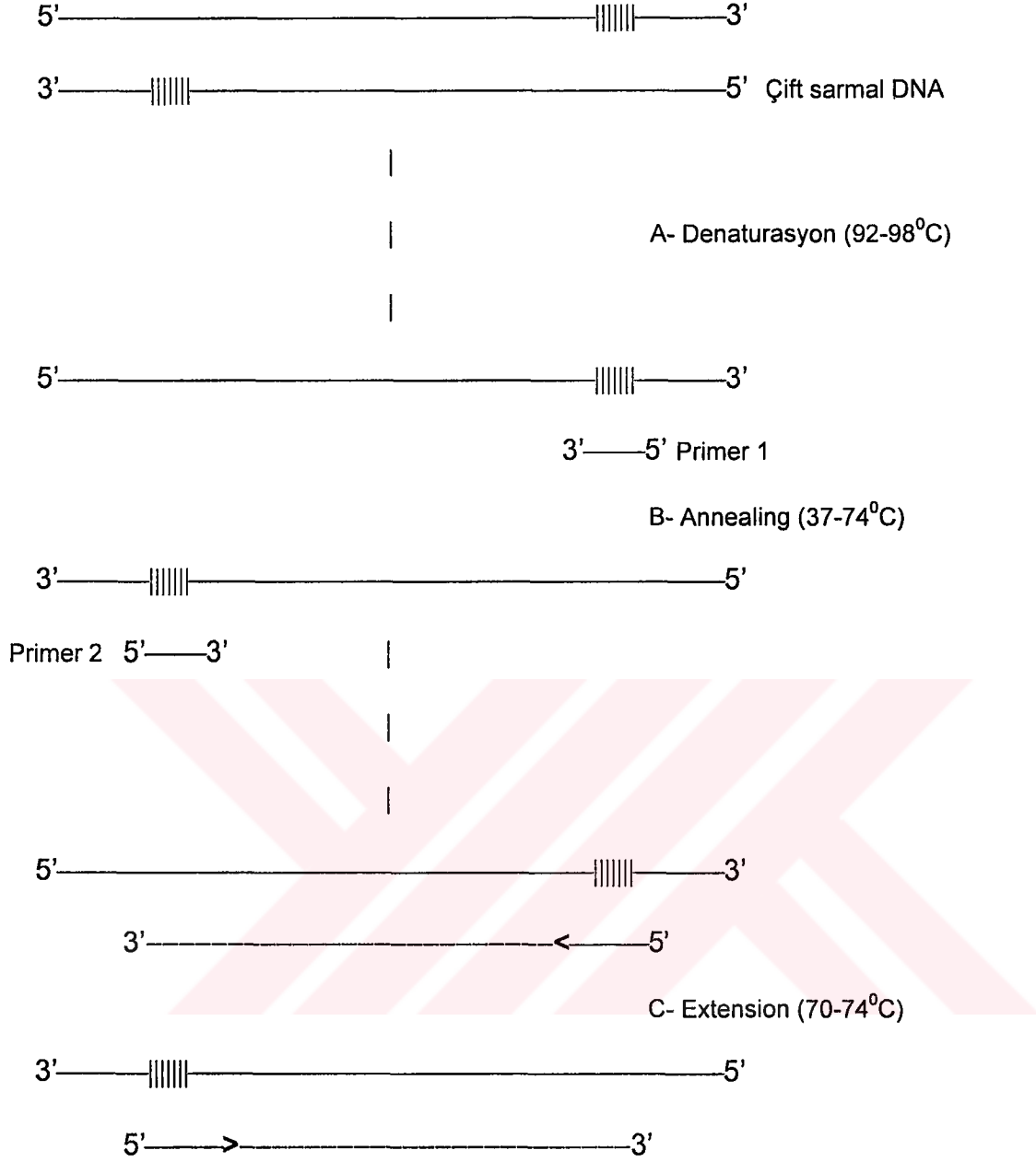
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (Polymerase Chain Reaction, PCR)

İlk defa 1985 yılında Kary Mullis tarafından tanımlanan PCR, DNA polimeraz enzimi kullanılarak özgül nükleik asit segmentinin in vitro koşullarda arka arkaya defalarca sentez edilmesidir (101). İlk PCR uygulamalarında kullanılan eşerişya koli DNA polimeraz I enziminin ısıya dayanıksız olması nedeniyle ortaya çıkan denaturasyon problemi *Thermus aquaticus*'dan (taq) ısıya dayanıklı DNA polimeraz elde edilmesi ile aşılmış ve böylece reaksiyon tüpüne başlangıçta konulan bir DNA polimeraz enzimi ile milyonlarca DNA molekülü elde edilebilir hale gelinmiştir (101, 102).

PCR teknolojisinde birbirini izleyen üç işlem vardır (şekil 1). Bunlar sırasıyla denaturasyon (çift sarmal DNA'nın tek sarmal haline gelmesi), annealing (primerlerin hedef DNA'ya bağlanması) ve extension (primerlere 3' ucundan itibaren taq DNA polimeraz aracılığıyla nükleotid eklenmesi) dur. Denaturasyonda çift sarmallı hedef DNA'nın iki iplikçığı birbirinden ayrılır ki bu 92 ila 98⁰C arasında

gerçekleşir. Annealing'de tek iplikçik haline getirilen hedef DNA moleküllerindeki özgül bölgeye primerlerin bağlanmasıyla renaturasyon (tekrar çift sarmal DNA oluşumu) gerçekleşir. Extension da ise DNA polimeraz enzimi tarafından primerlerin 3' ucuna yeni nükleotidler eklenir ki, bu işlem 70 ila 74⁰C arasında gerçekleşir. Bu seri işlemle hedef DNA'nın amplifikasyonu gerçekleştirilmekte ve her siklus sonunda başlangıçta ortamda bulunan DNA sayısında 2 kat artış olmaktadır. Böylece 20 siklus sonunda bir kalıp molekülden yaklaşık 2²⁰ kadar DNA elde edilmektedir (101, 102).

PCR teknolojisi gerekli önlemler alınmadan uygulandığında önemli hatalara yol açabilmektedir. Bunlardan biri olan kontaminasyon, örneklerin birbirine karışması ya da bir önceki amplifikasyon ürününün yeni amplifikasyon tüpüne karışmasıyla olabilmektedir. Amplifikasyon ürünü ile oluşacak olan kontaminasyonu elimine etmek için urasil N-glikosilaz (UNG) enziminin kullanılması, kısa dalgalı ultraviyole (UV) ışınları ile muamele ve amplifiye edilen DNA'nın fotokimyasal modifikasyonu gibi işlemler uygulanmaktadır (101).



Şekil 1

PCR teknolojisinde bulunan üç aşamanın şematik gösterilişi

Amplifikasyon ürününün gösterilmesi çeşitli yöntemlerle olmaktadır. Bunlar;

- 1- Etidyum bromid ile boyanan amplifikasyon ürünü çift sarmal DNA'nın UV ışını altında incelenmesi
- 2- Reverse dot blot hybridization (iki ayrı hücreden gelen tek sarmal nükleik asidlerin birbiriyle birleşmesi)
- 3- Floresan boya ile işaretli primerler kullanılarak amplifikasyon ürününün gösterilmesi
- 4- İşaretli probalar ile hibridizasyon yapılarak amplifikasyon ürününün gösterilmesi.

Etidyum bromid ile boyanan amplifikasyon ürünü çift sarmal DNA'nın UV ışını altında incelenmesi yoluyla PCR uygulamasından sonra bir miktar amplifikasyon ürünü, içinde etidyum bromid bulunan agarozda elektroforeze tabi tutulmakta; burada etidyum bromid DNA'ya bağlanarak UV ile floresan vermektedir. Aynı jel içinde örneğe yakın bir yerde "DNA size marker" da (DNA'nın büyüklüğünü ölçmeye yarayan göstergeç) elektroforeze sokulmaktadır. Bu DNA size markerları faj DNA'larının reaksiyon enzimleriyle farklı uzunluklarda kesilmesi ile elde edilmişlerdir. Her bir parçanın baz sayısı bilinmektedir. Bunlar elektroforezde farklı mesafelere yürümektedir. Baz sayısına göre agarozda farklı yerlerde bantlar oluşturmaktadırlar. Belli süre sonra jel UV altında incelenir. Örnekten elde edilen DNA bandı, kendi hizasındaki marker DNA bandı ile karşılaştırılır. Eğer bu bant, amplifikasyonu hedeflenen DNA segmenti ile aynı büyüklükte ise özgül amplifikasyon sağlanmış demektir (101).

Bakteriyolojide uygulanımı yanında virolojide, mikolojide, parazitolojide ve antimikrobiale direncin saptanmasında da PCR tekniği kullanılmakta ve bu konuda çalışmalar halen devam etmektedir (101).

PCR uygulamasının bir modifikasyonu olan multiplex PCR yönteminde farklı mikroorganizmalar için spesifik olan primer çiftler aynı reaksiyon tüpüne konulmaktadır. Böylece örnekte bulunabilecek birden fazla mikroorganizmaya ait genetik materyalin amplifikasyonu (koamplifikasyon) gerçekleştirilebilmektedir (102).

“ Multipl PCR” yönteminin diğer bir uygulama şeklinde örneklere bulunabilecek mikroorganizmaların tamamını amplifiye edebilmek için 16SrRNA gen bölgesine özgül bir çift ortak primer kullanılmaktadır. Bu reaksiyon sonucu oluşan banda göre ilk aşamada örnekte patojen mikroorganizmanın olup olmadığına karar verilmektedir. Bundan sonraki aşamada ise spesifik primerler yardımıyla etken mikroorganizmanın idantifikasyonu yapılmaktadır (9).

MATERYAL VE METOD

Çalışma, Malatya İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalına aralık 1999 – mayıs 2000 tarihleri arasında müracaat eden, otitis media'nın akut semptomlarını içermeyen, medikal tedaviye cevap vermeyen kronik EOM tanısı almış çocuklara uygulanan parasentez sırasında alınan orta kulak effüzyonu ve eş zamanlı alınan nazofarenks sürüntüsü ve dış kulak yolu sürüntülerinde yapıldı.

Otuziki çocuktan toplam ellidört kulaktan materyal alındı. Çocuklar iki ila onüç yaş (ortalama yaş: 7.3) arasındaydı. Çocukların yirmiyedisi erkek, beşi kız idi. Polikliniğimize başvuran olgularımıza otoskopiye ilaveten timpanometri ve yapılabilenlere tonal odyometri (yaşının küçük olması nedeniyle bazı çocuklarda tonal odyometri yapılamadı) yapıldı. Medikal tedavi verilen çocuklar kontrole çağırıldığında otoskopik muayenesi, timpanometri ve odyometrik tetkikleri yenilerek otoskopik muayenelerinde EOM görünümü devam eden, timpanometrilere inatçı B tipi timpanogram örneği gösteren çocuklara timpanostomi ve tüp endikasyonu konuldu (Tablo 1).

Genel anestezi altında öncelikle dış kulak yolu ve nazofarenksden eküvyon yardımıyla sürüntü alınarak kurumasını önlemek için içerisinde 0.5 ml izotonik sodyum klorür bulunan steril tüplere ayrı ayrı konuldu. Takiben dış kulak yolu önce batikon ve daha sonra serum fizyolojik ile yıkandı. Ön-alt ya da arka-alt kadrana parasentez bıçağı ile miringotomi yapıldıktan sonra Juhn TYM-Tap Middle Ear Fluid Aspirator/Collector (Xomed Surgical Products, Jacksonville, Florida, USA) aleti kullanılarak (Resim 1) orta kulak effüzyonu aseptik şartlarda aspire edilip

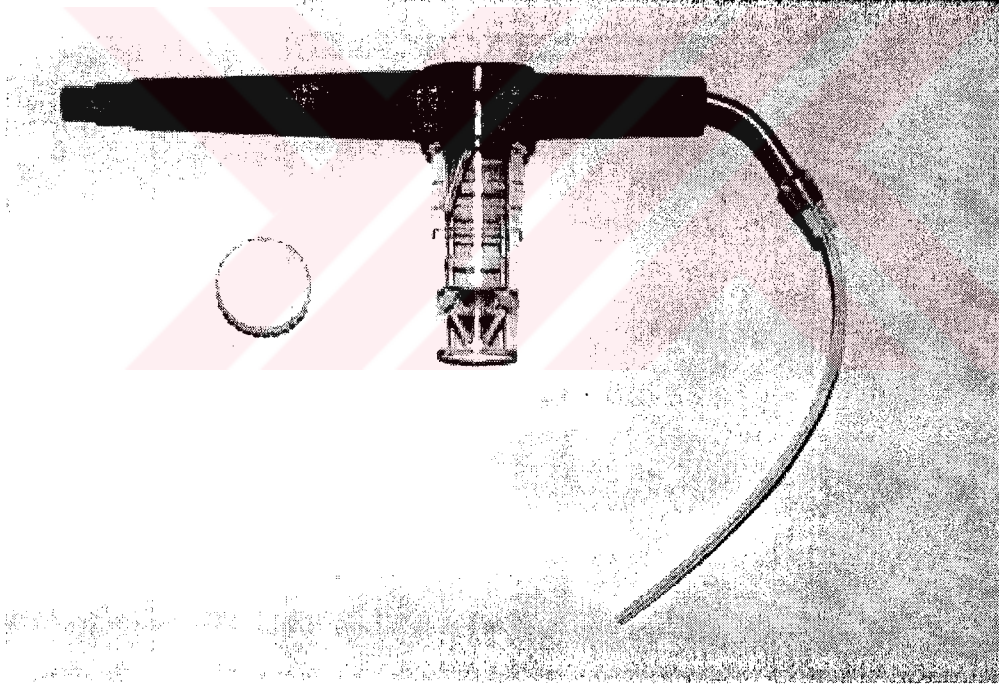
otoklavda 121⁰C de 15 dakikada sterilize edilmiş 1.5 ml'lik kapaklı epandorf tüpleri içerisine konuldu. Tüpler bir saati aşmayacak sürede mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı.

Adı Soyadı	Yaşı, Cinsiyeti	Sağ orta kulak effüzyonu	Sol orta kulak effüzyonu	Nazofarenks	Sağ Timpanometri	Sol timpanometri	Sağ odyometri (Hava yolu / Kemik Yolu)	Sol odyometri (Hava yolu / Kemik Yolu)	Süresi	Daha önce Parasentez Öyküsü	Son bir ay İçinde Antibiyotik Kullanımı
CA	7 E	+		+	-400	-65	-	-	1 yıl	-	+
AD	6 E	+		+	-400	-200	48/5	27/2	2 yıl	-	+
SE	8 K	+	+	+	-400	-400	-	-	1 yıl	-	+
OA	6 E	+		+	-400	-275	40/12	27/8	4 ay	-	+
MT	7 E	+	+	+	-400	-400	-	-	3 yıl	2 yıl önce	+
YÇ	7 E	+		+	-400	-200	-	-	1 yıl	-	+
SC	7 E	+	+	+	-400	-400	58/7	45/7	2 yıl	-	+
ÜCD	3 E	+	+	+	-295	-230	-	-	6 ay	-	+
BÖ	6 K	+	+	+	-360	-350	-	-	1 yıl	-	+
FÖ	12 E	+	+	+	-10	-400	-	-	2 yıl	-	+
FK	2 E	+	+	+	-260	-200	-	-	1 yıl	-	+
MS	7 K	+	+	+	-295	-400	-	-	4 ay	-	+
ND	6 E	+		+	-400	-290	32/0	13/0	2 yıl	-	+
OK	6 E	+	+	+	-400	-400	-	-	1 yıl	-	+
BM	6 E	+	+	+	-400	-400	25/0	32/0	1 yıl	-	+
MB	12 E	+	+	+	-400	-400	27/0	42/2	4 ay	-	+
YCB	6 E	+	+	+	-320	-400	-	-	3 ay	-	+
MÇ	6 E	+		+	-400	-200	-	-	6 ay	-	+
FA	7 E	+	+	+	-400	-400	30/0	35/5	3 yıl	1 yıl önce	+
KK	6 E	+	+	+	-400	-400	-	-	2 yıl	-	+
RD	4 E	+	+	+	-400	-400	-	-	6 ay	-	+
ES	5 E	+		+	-400	-200	-	-	8 ay	-	+

DT	6 E	+	+	+	-400	-400	43/5	45/5	1 yıl	-	+
AU	11 K	+	+	+	-400	-400	35/5	17/0	4 yıl	-	+
OÜ	11 E	+	+	+	-400	-400	50/15	43/13	4 yıl	4 yıl önce	+
YÇ	6 E	+		+	-400	-100	-	-	6 ay	-	+
UD	6 E	+	+	+	-400	-400	-	-	6 ay	-	+
DE	13 E	+	+	+	-400	-400	42/0	37/0	3 yıl	-	+
HY	11 K	+		+	-300	-100	27/7	25/7	4 yıl	-	+
BK	8 E	+	+	+	-290	-400	40/2	20/0	2 yıl	-	+
BA	10 E	+		+	-400	-200	48/7	25/7	6 yıl	4 yıl önce	+
ÜA	11 E	+	+	+	-400	-400	40/2	40/2	4 ay	-	+

Tablo 1

Çalışma Kapsamına aldığımız olgularımız



Resim 1

Juhn TYM-Tap Middle Ear Fluid Aspirator/Collector

Kültür

Dış kulak yolu yolu ve nazofarenksten alınan sürüntü örnekleri serum fizyolojik içerisinde, orta kulaktan alınan effüzyon ise epandorf tüpleri içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Örnekler kanlı, çikolatamsı ve eozin metilen blue (EMB) besi yerlerine tek koloni ekim yöntemiyle inoküle edildi. Kalan örnekler PCR çalışmaları için -20°C ye konuldu. Kanlı ve çikolatamsı besiyerleri %5-10 CO_2 'li ortamda, EMB besiyeri ise aerobik koşullarda 18-24 saat inkubasyona bırakıldı. Üreme saptanan plaklardaki M. kataralis, H. İnfluenza ve S. pnömoni şüpheli kolonilerin konvansiyonel biyokimyasal identifikasyon yöntemleri ve yarı otomotize sceptor (BBL) sistemlerinden yararlanılarak tanımlanmaları yapıldı (103).

Multiplex PCR

I – Yöntemin standardizasyonu

A – Bakteri suşları: H. İnfluenza (İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji anabilimdalı kültür koleksiyonundan sağlanmıştır), M. kataralis (klinik izolat) ve S. Pnömoni (klinik izolat) saf kültürlerinden bakteri süspansiyonları hazırlandı. Her bakterinin 10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 , 10^1 yoğunlukları ayarlandı. Bu yoğunluklardan DNA izolasyonuna geçildi.

B – DNA izolasyonu: Her bir bakteri yoğunluğundan 250µl alınarak 10 dakika kaynatıldı. Sonra -20°C de en az bir saat bekletildi. Buradan alınan tüpler 37°C 'de 1-2 dakika tutularak örneklerin çözünmesi sağlandı. Buz içine yerleştirilen örnekler hafifçe santrifüj ($14.000 \times g$ de 1-2 saniye) edildi. Bundan bir mikrolitre örnek alınarak amplifikasyonda kullanıldı (9).

II – Klinik örnekler: Orta kulak effüzyonu karıştırıldıktan sonra 250 µl alınıp DNA izolasyonunda kullanıldı. Eküvyonla alınan ve içerisinde SF bulunan tüplere yerleştirilen nazofarenks ve dış kulak yolu örnekleri önce karıştırıldı. Sonra, eküvyon tüpün iç çeperine iyice bastırılarak içindeki bakterilerin sıvıya geçmesi sağlandı. Eküvyonlar atıldı. Kalan sıvılardan 250µl alınarak DNA izolasyonu yapıldı. Klinik örneklerden DNA izolasyonunda da kaynatma yöntemi uygulandı (9).

PCR primerleri:

Hendolin ve arkadaşlarının (9) tarif ettikleri primerler ve amplifikasyon koşulları uygulandı. Şekil 2'de primerlerin lokalizasyonu ve her bir bakteri için amplifikasyon ürününün büyüklüğü şematize edilmiştir (9).

Ortak primer (R₁) : 5'-CTA CGC ATT TCA CCG CTA CAC-3'

A. otitidis primeri (R₂) : 5'-GGG GAA GAA CAC GGA TAG GA-3'

H. influenza primeri (R₃) : 5'-CGT ATT ATC GGA AGA TGA AAG TGC-3'

M. kataralis primeri (R₄) : 5'-CCC ATA AGC CCT GAC GTT AC-3'

S. pnömoni primeri (R₅) : 5'-AAG GTG CAC TTG CAT CAC TAC C-3'

Amplifikasyon miksi;

Her bir DNA izolasyon ürününden 1 µl alınarak 50 µl'lik amplifikasyon miksi içine konuldu. Amplifikasyon miksi içerisinde 80 pmol R₂, 70 pmol R₃, 10 pmol R₄, 10 pmol R₅, 20 pmol R₁ yanısıra 200 µM dört deoksiribonükleozid trifosfat miksi,

1.5 mM MgCl₂, 3 U Taq DNA polimeraz, %0.1 Trizon x-100, 0.1mg/ml bovin serum albumin, 10 mM Tris-HCl ve 50 mM KCl bulunmaktadır.

Amplifikasyon koşulları;

- a – 94 °C'de 3 dakika denaturasyon
- b – 94 °C'de 30 saniye denaturasyon
66 °C'de 45 saniye annealing
72 °C'de 1 dakika extension
- c - 72 °C'de 5 dakika son extension

Tüm bu aşamalar thermal cyclers'de tamamlandı.

b aşaması 38 kez tekrar edildi.

Amplifikasyon sonucunun gözlenmesi;

Amplifikasyon ürünü brom fenol mavisi içerisinde ¼ oranında seyreltildi. Bu karışımın 6 µl'si, içinde etidyum bromür bulunan %3'lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. UV ışık altında DNA size marker (pGEM DNA size marker) ve kontroller (pozitif ve negatif) yardımıyla oluşan bantların değerlendirilmesi yapıldı.

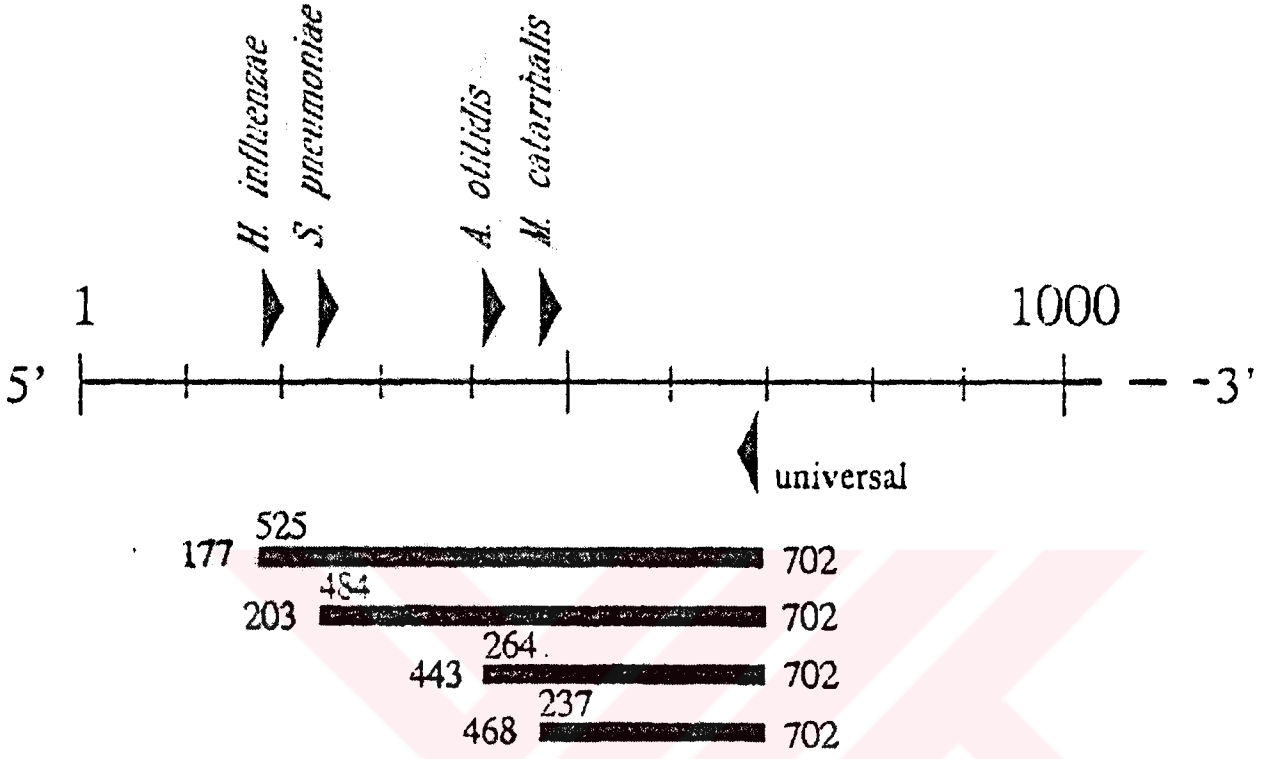
Kontroller;

a – Pozitif kontrol: H. influenza, M kataralis ve S pnömoni standart bakteri suşlarından 10⁵ cfu/ml deneylerde pozitif kontrol olarak kullanıldı

b – Negatif kontrol: Distile su negatif kontrol olarak kullanıldı (101, 102)

İstatistiksel değerlendirme;

Olguların istatistiksel değerlendirilmesi SPSS programında Fisher'in kesin x² testi'ne göre (104) yapıldı.



Şekil 2

Primerlerin lokalizasyonu ve her bir bakteri için amplifikasyon ürününün büyüklüğü

BULGULAR

Toplam otuziki olgumuzdan çalışma yapılabilen yirmiyedi olgumuzun onbirinin (% 40.74) nazofarenks kültürlerinde M. kataralis, üçünde (%11.11) S. pnömoni ürerken ondördünde (%51.85) üreme olmamıştır. Olgularımızın birinde S. pnömoni ile birlikte M. kataralis üremiştir (Tablo 2).

Olgularımızdan alınan toplam elli altı adet dış kulak yolu sürüntülerinin kırkaltısında çalışma yapılabilmiş, yapılan kültür çalışması sonucunda hiçbirinde üreme olmamıştır (%0) (Tablo 2).

Olgularımızdan alınan toplam ellidört orta kulak effüzyonlarının kültür çalışması sonucunda üç olgumuzda (%5.56) M. kataralis ürerken diğer olgularımızda bir üreme saptanamadı (Tablo2).

Örneklere yapılan PCR çalışmasında nazofarenks örneklerinde toplam yirmiyedi hastamızdan dördünde (%14.81) A. otitidis tespit edilirken altısında (%22.22) S. pnömoni, ikisinde (%7.41) H. influenza ve dokuzunda da (%33.33) M. kataralis saptandı. Bir olgumuzda A. otitidisle birlikte S. pnömoni saptanırken bir olgumuzda ise A. otitidis ile birlikte S. pnömoni ve H. influenza, bir olgumuzda da A. otitidis, S. pnömoni ve M. kataralis birlikte saptanmış, bir olgumuzda M. kataralis, A. otitidis ile birlikte, diğer bir olgumuzda ise M. kataralis, S. pnömoni ile birlikte saptandı.

Toplam ellidört orta kulak effüzyonunun on tanesinde (%18.52) A. otitidis saptanırken, yedi örnekte (%12.96) H. influenza, iki örnekte (%3.70) S. pnömoni ve dört örnekte ise (%7.41) M. kataralis izlendi. Bu olguların birinde S. pnömoni

ve M. kataralis birlikte, iki olguda A. otitidis H.influenza ile birlikte iken diğeri bir olguda ise M. kataralis, S. pnömoni ve H. influenza bir arada saptandı.

Toplam kırkaltı dış kulak yolu sürüntüsünün PCR çalışmasında ise iki dışkulak yolunda (%4.35) A. otitidis saptandıırken kırkdört kulakta (%95.65) patojen saptanamadı (Tablo 2).

Adı Soyadı	Sağ orta kulak effüzyonu	Sol orta kulak effüzyonu	Sağ Dış Kulak Yolu	Sol Dış Kulak Yolu	Nazofarenks
CA *	-		-		-
**	-		-		-
AD *	-		-		-
**	-		-		-
SE *	-	-	-	-	M.kataralis
**	-	-	-	-	M.kataralis
OA *	-		-		-
**	-		-		-
MT *	-	-	-	-	-
**	-	-	-	-	-
YÇ *	-		-		A. otitidis, S.pnömoni
**	-		-		S.pnömoni
SC *	H. influenza	-	-	-	A. otitidis, S.pnömoni, M.kataralis
**	-	-	-	-	M.kataralis
ÜCD *	-	-	-	-	-
**	-	-	-	-	-
BÖ *	-	-	-	-	M.kataralis, A. otitidis
**	-	-	-	-	M.kataralis
FÖ *	-	H. influenza	-	-	M.kataralis
**	-	-	-	-	M.kataralis
FK *	A. otitidis	-	-	-	S.pnömoni
**	-	-	-	-	S.pnömoni
MS *	H.influenza, A. otitidis	H. influenza	-	-	-
**	-	-	-	-	-
ND *	-		-		M.kataralis
**	-		-		M.kataralis
OK *	-	-	-	-	-
**	-	-	-	-	-
BM *	-	-	-	-	A. otitidis, S.pnömoni, H.influenza

**	M.kataralis	M.kataralis	-	-	M.kataralis
MB *	-	-	-	-	-
**	-	-	-	-	-
YCB *	-	-	-	-	S.pnömoni, M.kataralis
**	-	-	-	-	M.kataralis
MÇ *	S.pnömoni, M.kataralis		-		S.pnömoni
**	M.kataralis		-		S.pnömoni, M.kataralis
FA *	-	-	-	A. otitidis	M.kataralis
**	-	-	-	-	M.kataralis
KK *	-	-	-	-	H.influenza
**	-	-	-	-	-
RD *	H.influenza	H.influenza, A. otitidis	-	A. otitidis	-
**	-	-	-	-	-
ES *	-		-		M.kataralis
**	-		-		M.kataralis
DT *	M.kataralis, S.pnömoni, H.influenza	-	-	-	-
**	-	-	-	-	-
AU *	A. otitidis	A. otitidis	***	***	***
**	-	-	***	***	***
OÜ *	-	-	-	-	-
**	-	-	-	-	-
YÇ *	-		-		M.kataralis
**	-		-		M.kataralis
UD *	-	-	-	-	-
**	-	-	-	-	-
DE *	M.kataralis	M.kataralis	-	-	-
**	-	-	-	-	-
HY *	A. otitidis		***		***
**	-		***		***
BK *	-	A. otitidis	***	***	***
**	-	-	***	***	***
BA *	A.otitidis		***		***
**	-		***		***
ÜA *	A. otitidis	A. otitidis	***	***	***
**	-	-	***	***	***

Tablo 2

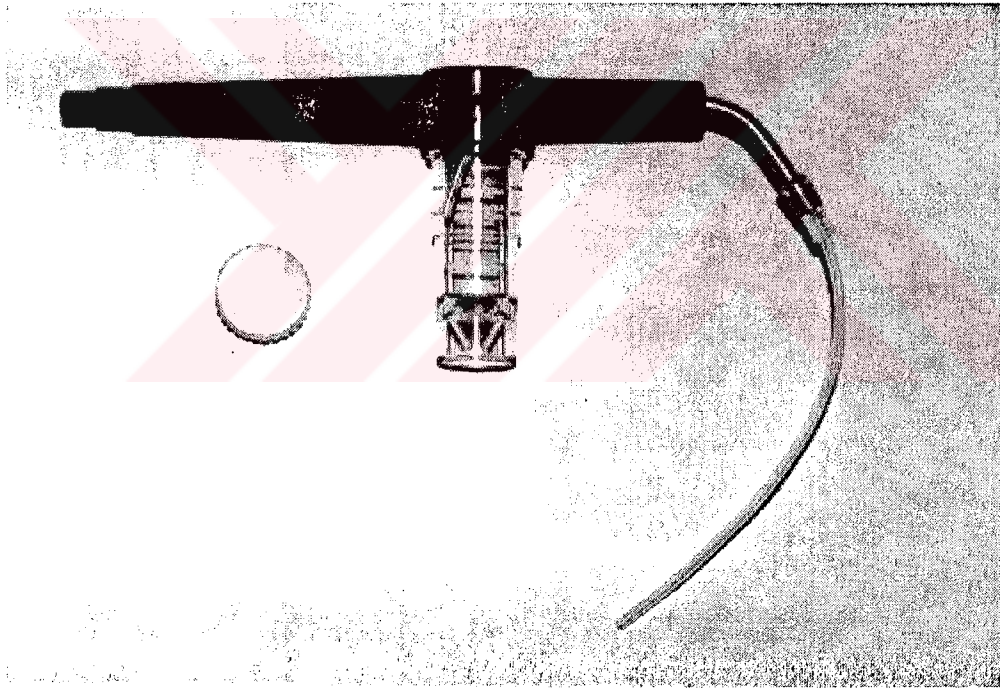
*PCR sonuçlarımız, **Kültür sonuçlarımız,
***Çeşitli nedenlerle PCR ve kültür çalışması yapılamayan örnekler

Örneklerin PCR ve kültür çalışmaları sonuçları

DT	6 E	+	+	+	-400	-400	43/5	45/5	1 yıl	-	+
AU	11 K	+	+	+	-400	-400	35/5	17/0	4 yıl	-	+
OÜ	11 E	+	+	+	-400	-400	50/15	43/13	4 yıl	4 yıl önce	+
YÇ	6 E	+		+	-400	-100	-	-	6 ay	-	+
UD	6 E	+	+	+	-400	-400	-	-	6 ay	-	+
DE	13 E	+	+	+	-400	-400	42/0	37/0	3 yıl	-	+
HY	11 K	+		+	-300	-100	27/7	25/7	4 yıl	-	+
BK	8 E	+	+	+	-290	-400	40/2	20/0	2 yıl	-	+
BA	10 E	+		+	-400	-200	48/7	25/7	6 yıl	4 yıl önce	+
ÜA	11 E	+	+	+	-400	-400	40/2	40/2	4 ay	-	+

Tablo 1

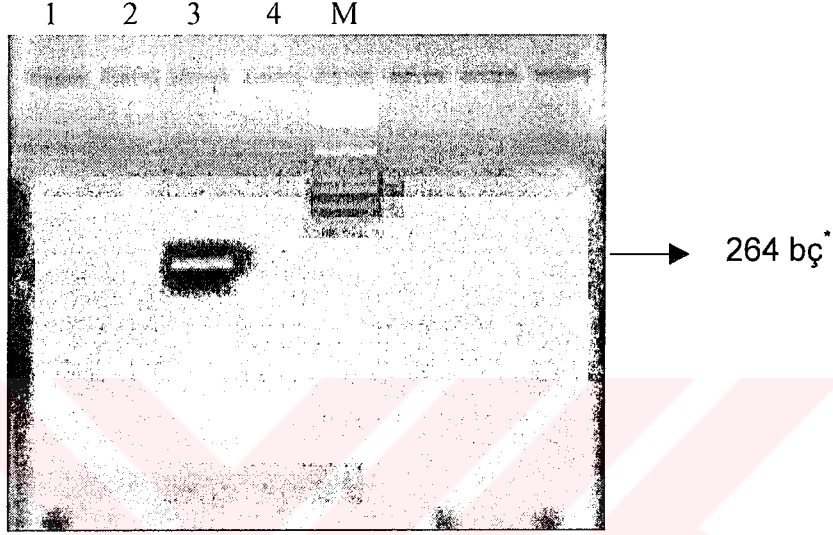
Çalışma Kapsamına aldığımız olgularımız



Resim 1

Juhn TYM-Tap Middle Ear Fluid Aspirator/Collector

Resim 2,3,4,5,6,7 ve 8 de PCR çalışmamızın sonuçları sunulmaktadır.



Resim 2

* Baz çifti

M: pGEM " DNA size marker"

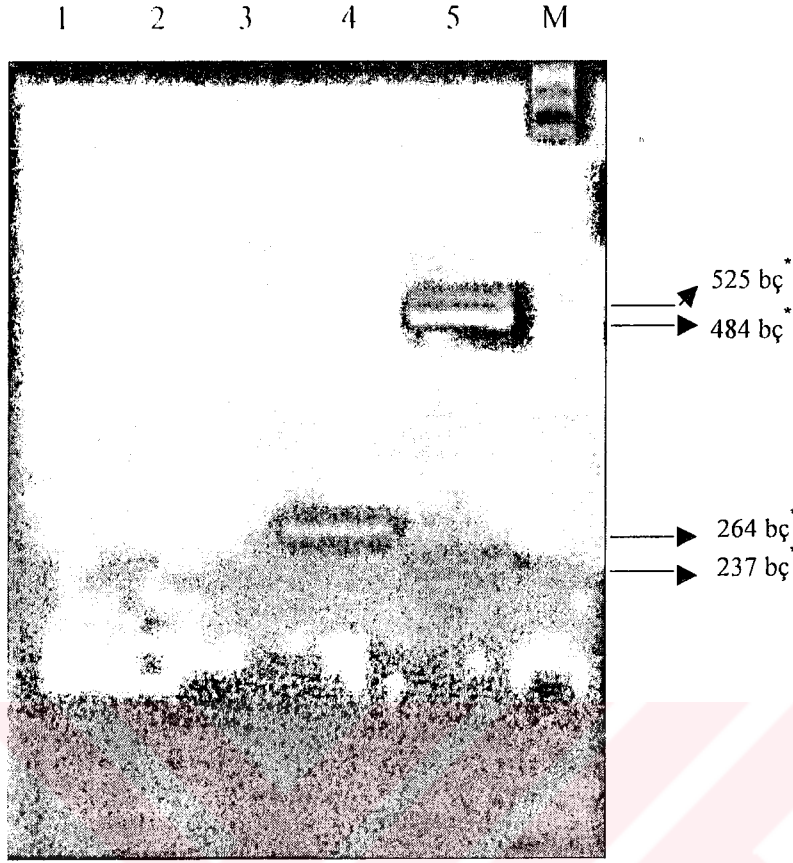
Markerdaki bant büyüklükleri;
2645, 1605, 1198, 676, 517, 460, 369, 350, 222, 179,
126, 75, 65, 51, 36

1 ve 2 nolu klinik örnek; negatif

3 nolu klinik örnek; A. otitidis

4; negatif kontrol

M; DNA size marker



Resim 3

* Baz çifti

M: pGEM "DNA size marker"

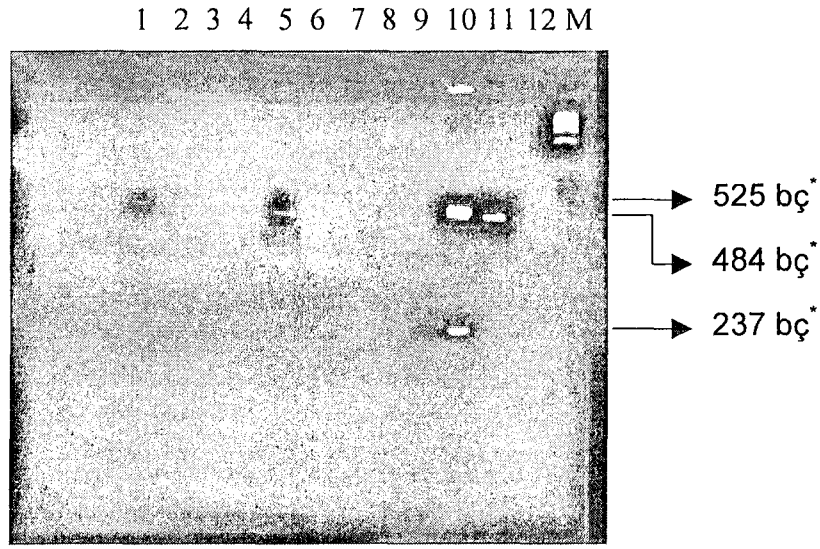
Markerdaki bant büyüklükleri;
2645, 1605, 1198, 676, 517, 460, 369, 350, 222, 179,
126, 75, 65, 51, 36

1, 2, 3 nolu klinik örnekler; negatif

4 nolu klinik örnek; A. otitidis

5; pozitif kontrol (H. influenza, S. pnömoni, M. kataralis)

M; DNA size marker



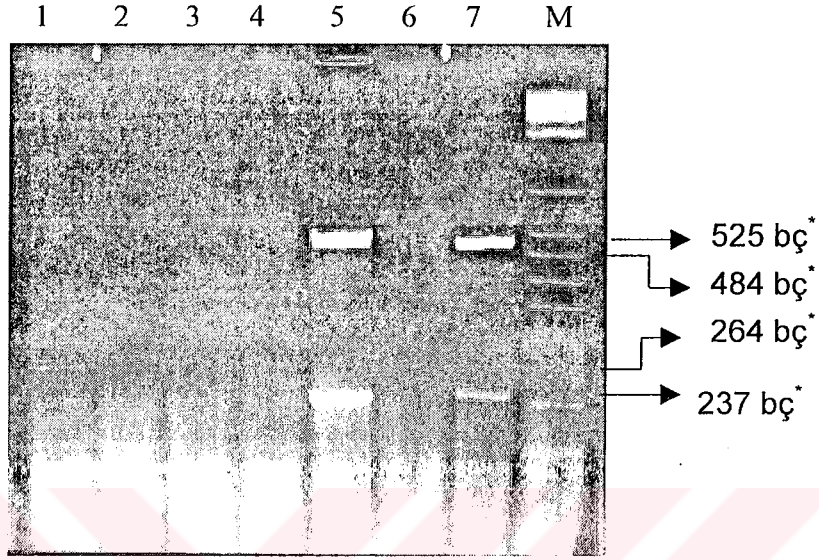
Resim 4

* Baz çifti

M: pGEM "DNA size marker"

Markerdaki bant büyüklükleri;
2645, 1605, 1198, 676, 517, 460, 369, 350, 222, 179,
126, 75, 65, 51, 36

1 nolu klinik örnek; H.influenza
2, 3, 4 nolu klinik örnekler; negatif
5 nolu klinik örnek; S.pnömoni
6, 7, 8 nolu klinik örnekler; negatif
9 nolu klinik örnek; M.kataralis
10; pozitif kontrol (H.influenza, S.pnömoni, M.kataralis)
11 nolu klinik örnek; S.pnömoni
12; negatif kontrol
M; DNA size marker



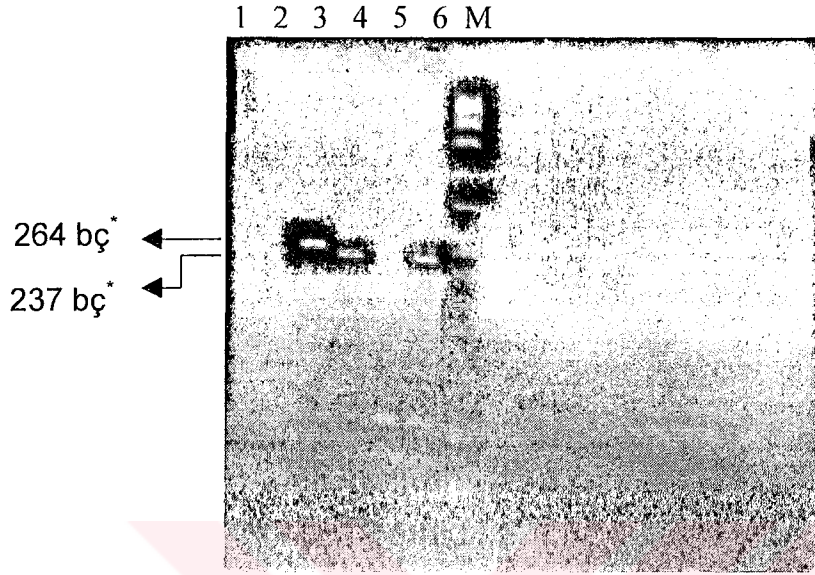
Resim 5

* Baz çifti

M: pGEM "DNA size marker"

Markerdaki bant büyüklükleri;
2645, 1605, 1198, 676, 517, 460, 369, 350, 222, 179,
126, 75, 65, 51, 36

1 nolu klinik örnek; A. otitidis
2, 3, 4 nolu klinik örnekler; negatif
5 nolu klinik örnek; H.influenza, S.pnömoni, M.kataralis
6; negatif kontrol
7; pozitif kontrol (H.influenza, S.pnömoni, M.kataralis)
M; DNA size marker



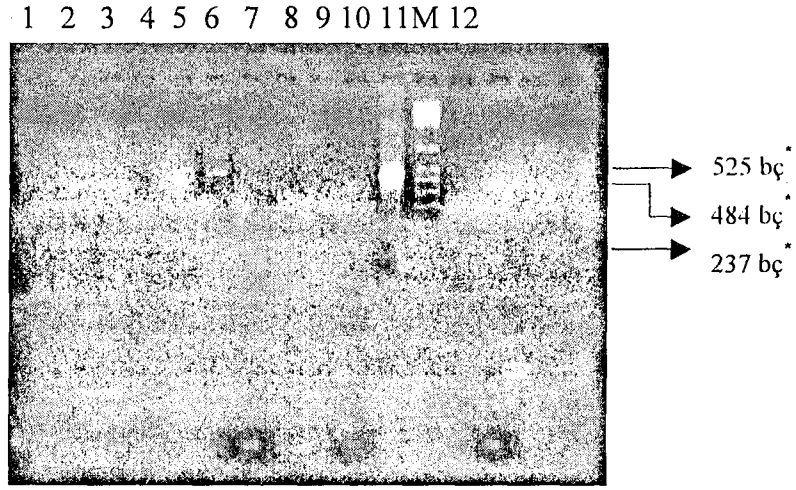
Resim 6

* Baz çifti

M: pGEM "DNA size marker"

Markerdaki bant büyüklükleri;
2645, 1605, 1198, 676, 517, 460, 369, 350, 222, 179,
126, 75, 65, 51, 36

1, 2 nolu klinik örnekler; negatif
3 nolu klinik örnek; A. otitidis
4 nolu klinik örnek; M.kataralis
5 nolu klinik örnek; negatif
6 nolu klinik örnek; M.kataralis
M; DNA size marker



Resim 7

* Baz çifti

M: pGEM “ DNA size marker”

Markerdaki bant büyüklükleri;
2645, 1605, 1198, 676, 517, 460, 369, 350, 222, 179,
126, 75, 65, 51, 36

1-5 nolu klinik örnekler; negatif

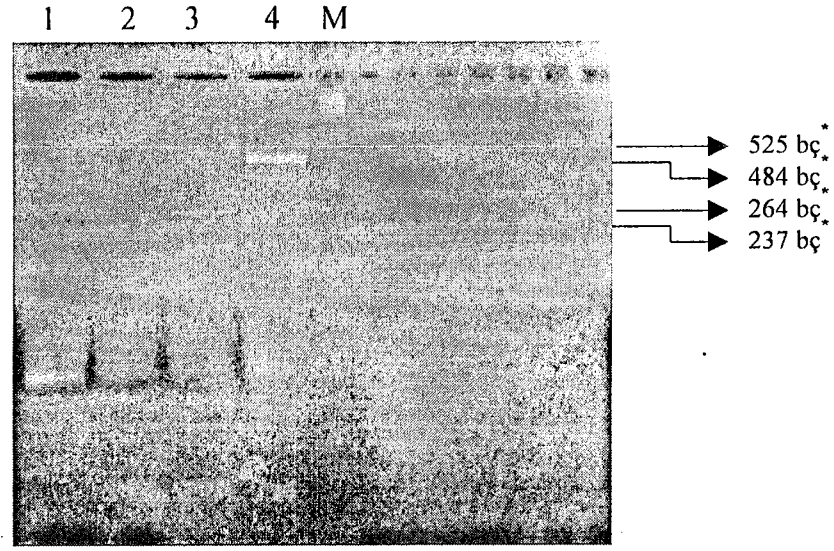
6 nolu klinik örnek; H.influenza

7-10 nolu klinik örnekler; negatif

11; pozitif kontrol (H.influenza, S.pnömoni, M.kataralis)

12; negatif kontrol

M; DNA size marker



Resim 8

* Baz çifti

M: pGEM "DNA size marker"

Markerdaki bant büyüklükleri;
2645, 1605, 1198, 676, 517, 460, 369, 350, 222, 179,
126, 75, 65, 51, 36

1, 2 nolu klinik örnekler; negatif

3 nolu klinik örnek; A. otitidis

4; pozitif kontrol (H.influenza, S.pnömoni, M.kataralis)

M; DNA size marker

Bu veriler doğrultusunda kültür ve PCR sonuçlarımızı karşılaştırdığımız zaman A. otitidis, S. pnömoni, M. kataralis ve H. influenza açısından değerlendirdiğimizde nazofareks kültürlerinin onüçünde (%48.15) ondört patojen üremişken PCR çalışmasında ondört olguda (%51.85) yirmibir patojen saptanmıştır. Ondört olguda (%51.85) kültürde üreme olmazken, onüç olguda (%48.15) PCR ile etken saptanamamıştır (Tablo 3).

NAZOFARENKS	Kültür		PCR	
	+	-	+	-
A. otitidis	0	27	4	23
S. pnömoni	3	24	6	21
H. influenza	0	27	2	25
M. kataralis	11	16	9	18

Tablo 3

Nazofarenks örneklerinin kültür ve PCR sonuçları

Orta kulak effüzyonlarını değerlendirdiğimizde ise toplam ellidört adet orta kulak effüzyonunun kültürel çalışması sonucunda üç hastada (%5.56) kültür pozitif sonuç alınmışken aynı örneklerin PCR çalışması sonucunda onsekiz örnekte (%33.33) yirmiüç patojen saptanmıştır. ellibir olgumuzda (%94.44) kültür ile üreme saptanamamışken, PCR ile otuzaltı (%66.67) olgumuzda patojen saptanamadı (Tablo 4).

Orta kulak ffüzyonu	Kültür		PCR	
	+	-	+	-
A. otitidis	0	54	10	44
S. pnömoni	0	54	2	52
H. influenza	0	54	7	47
M. kataralis	3	51	4	50

Tablo 4

Orta kulak effüzyonlarının kültür ve PCR sonuçları

Dış kulak yolu sürüntülerini dikkate aldığımızda ise toplam kırkaltı örnekten hiçbirinde (%0) kültürde üreme olmazken iki olgumuzda (%4.35) PCR çalışmasıyla A. otitidis gözlenmiştir (Tablo 5).

Dış kulak yolu	Kültür		PCR	
	+	-	+	-
A. otitidis	0	46	2	44
S. pnömoni	0	46	0	46
H. influenza	0	46	0	46
M. kataralis	0	46	0	46

Tablo 5

Dış kulak yolu sürüntülerinin kültür ve PCR sonuçları

Fisher'in kesin χ^2 testi (104) ile verilerin istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. Orta kulak sonuçları açısından PCR yöntemi ve kültür yöntemi karşılaştırıldığında sonuç PCR lehine istatistiksel olarak anlamlı çıktı ($P=0.0002$, $P<0.05$). Nazofarenks ve dış kulak yolu sonuçları değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak önemli bir fark gözlemlenmedi (Tablo 6).

	PCR		KÜLTÜR	
	+	-	+	-
Orta kulak	18	36	3	51
Nazofarenks	14	13	13	14
Dış kulak yolu	2	44	0	46

Tablo 6

Olgularımızın PCR ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

Saptanan mikroorganizmalar açısından değerlendirme yapıldığında ise, orta kulakta A. otitidis'in PCR ile bulunmasının kültürde üretilmesine oranla istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($P=0.0006$, $P<0.05$). H. influenza değerlendirildiğinde ise, PCR ile saptama oranının kültürdekine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu gözlemlendi ($P=0,006$, $P<0.05$). Orta kulakta saptanan diğer patojenler için ise istatistiksel olarak PCR'ın kültüre göre bir üstünlüğü gözlemlenemedi ($P>0.05$) (Tablo 4).

Dış kulak yolunda ise patojenlerin saptanmasında, PCR ve kültür yöntemlerinin birbirine istatistiksel olarak üstün olmadıkları görüldü ($P>0.05$) (Tablo 5).

Nazofarenks sonuçlarımız dikkate alındığında ise, sadece A. otitidis'in saptanmasında PCR'ın kültüre göre istatistiksel olarak üstün olduğu ($P=0.055$, $P<0.05$), diğer patojenlerin saptanmasında ise her iki yöntemin birbirine bir üstünlüğünün olmadığı ($P>0.05$) görüldü (Tablo 3).

Saptanan mikroorganizmalar birbirleriyle karşılaştırıldığında ise orta kulakta saptanan patojenlerden sadece A. otitidis'in S. pnömoni'ye oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek oranda bulunduğu ($P=0.01$, $P<0.05$), diğer ikili karşılaştırmalarda ise patojenlerin birbirlerine üstünlüklerinin olmadıkları ($P>0.05$) görüldü (Tablo 4).

Benzer ikili karşılaştırma nazofarenks için yapıldığında ise sadece M. kataralis'in, H. influenza'ya oranla anlamlı oranda fazla saptandığı ($P=0.01$, $p<0.05$), diğer ikili karşılaştırmalarda ise, anlamlı bir fark olmadığı ($P>0,05$) görüldü (Tablo 3).

Dış kulak yolunda saptanan mikroorganizmalar karşılaştırıldığında ise, birbirlerine istatistiksel olarak anlamlı üstünlüklerinin olmadığı görüldü ($P>0.05$), (Tablo 5).



TARTIŞMA

Genel ve lokal infeksiyon belirti ve bulguları olmaksızın sağlam kulak zarı arkasında sıvı toplanması ile karakterize bir otitis media tipi olan effüzyonlu otitis media (EOM), çocuklarda saptanan işitme kayıplarının en sık nedenidir. Özellikle işitsel eğitimin çok fazla önem kazandığı çocukluk çağında işitme kaybının en sık nedeni olması, EOM'nın önemini daha da arttırmaktadır.

Orta kulakta effüzyon toplanma nedenleri olarak üstaki disfonksiyonlarının, barotravmanın, mastoid havalanma yetersizliklerinin, immun bozuklukların, allerjinin ve biyokimyasal bozuklukların yanısıra enfeksiyonun da üzerinde durulmuş ve çeşitli çalışmalar yapılmıştır (21, 58, 64, 73 – 84) .

Çocuğun çevreyle iletişimini sağlamasında en önemli fonksiyonlardan biri olan işitmenin yeterli olabilmesi için bu fonksiyonu engelleyen faktörlerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Effüzyonun oluşmasında ileri sürülen teorilerden birinde bakteriler suçlandığına göre effüzyonun etkin tedavisi için mikrobiyolojisinin ortaya konulması ve buna göre de tedavinin planlanması gerekmektedir.

Bilindiği gibi yıllardan beri süregelen çalışmalarda başlangıçta kültür çalışmaları ile (73, 76, 77, 78, 80, 81, 83, 84, 105) ve 1985 yılında PCR teknolojisinin gelişmesiyle DNA çalışmaları da yapılarak (9, 10, 106) çocukluk çağının önemli bir sağlık problemi olan EOM'larda patojeni saptamaya yönelik araştırmalar yapılmıştır. Özellikle PCR çalışmalarında effüzyonlarda yüksek oranlarda bakteri varlığı gösterilmiştir (98, 106).

1970'li yılların öncesinde steril olarak kabul edilen EOM'lı hastaların orta kulak effüzyonlarında (OKE) bakteri mevcudiyeti, materyal alım tekniklerinin ve

kültür yöntemlerinin gelişmesi ile gösterilmeye başlanmıştır. OKE'lerinde gösterilebilen major mikrobiyolojik ajanlar S. pnömoni, H. influenza ve M. kataralis olmuştur. Bizim çalışmamızda ellidört orta kulak effüzyonundan kültür yöntemiyle üçünde (%5.56) sadece M. kataralis üretilmiştir. Literatüre baktığımız zaman Bluestone ve ark. (77) ve Stenfors ve ark. (80), olgularının %30'unda, Diamond ve ark. (77), olgularının %47'sinde, Sriwardhana ve ark. (78), olgularının %24'ünde, Healy ve ark. (81), olgularının %45'inde, Calhoun ve ark. (105), olgularının %20 sinde, Watson ve ark. (107), olgularının %36'sında bakteri izole ettiklerini yayınlamışlardır. Bu literatürleri incelediğimizde, kültürle üretilen mikroorganizmaların değişen oran ve sıralarda olmak üzere H. influenza, S. pnömoni ve M. kataralis olduğunu görmekteyiz. Bazı literatürlerde yazarlar en sık olarak hatta %50'ye varan oranlarda H. influenza'yı saptadıklarını belirtirken (77, 78, 105, 107), bazı yazarlar S. pnömoni'yi daha fazla oranda saptadıklarını rapor etmişlerdir (81). Biz ise OKE'lerinde sadece 3 olgumuzda kültürle M. kataralis saptamışken, S. pnömoni ve H. influenza saptayamadık.

Ataoğlu ve ark. (94) yaptıkları çalışmada EOM'larda negatif kültür sonuçlarının nedenini sorgulamışlardır. Bazı otörlerin patojenlerin üretilmesinde kültür metodlarının önemini belirtmelerine karşın (86), Ataoğlu ve ark. (94) antibiyotiklerin ve lizozimlerin bakterinin L-formuna dönüşümüne sebep oldukları ve bu nedenle kültürde üretilemedikleri fikriyle çalışma yapmışlar ve neticede EOM'da bakterilerin L-formlarının önemli rol oynadıkları sonucuna varmışlardır.

Kültür yöntemlerini karşılaştırdığımızda, literatürde %20 ila %47 arasında kültürde bakteri ürettiklerini bildiren yayınlardan farklı bir yöntem uygulamadığımızı gözlemledik.

Olgularımızı antibiyotik kullanımı açısından sorguladığımızda, tamamının operasyondan önceki bir aylık süre içerisinde antibiyotik kullandıklarını öğrendik. Bizim düşüncemize göre kültürde bakteri üretim oranımızın %5.56 gibi düşük bir yüzdede olmasının sebebi, olgularımızın tamamının operasyon öncesinde en az on günlük olmak üzere antibiyotik kullanmış olmalarıdır.

1985 yılında Mullis tarafından PCR'in tanımlanmasını takiben her alanda olduğu gibi Kulak Burun Boğaz alanında da çalışmalar yapılmış ve kültürle saptanabilen bakteri oranının çok üzerinde PCR ile olumlu sonuçlar alındığı rapor edilmiştir; Hotomi ve ark (96), kültürde üreme saptayamadıkları 20 örneğin %65'inde, Post ve ark. (98) ise kültürle %29 bakteri üretebildikleri örneklerin % 77 sinde PCR ile bakteri saptadıklarını, Hendolin ve ark. (9) ise kültürde %32 olan oranın PCR ile %84'e yükseldiğini yayımladılar. Benzer bir çalışmada Jero ve ark. (97) S. pnömoni'yi çalışmışlar ve kültürde %11 olarak buldukları mikroorganizmanın PCR çalışması ile %45 oranında gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda kültürle OKE'larında %5.56 oranında bakteri üretebilmişken, aynı örneklerde yaptığımız PCR çalışmasında ise %33.3 oranında bakteri saptadık. Verilerin Fisher'in kesin χ^2 testine göre istatistiksel analizi yapıldığında anlamlı ($P=0.0002$, $P<0.05$) olarak bulunmuştur. Bu sonucumuz bize, literatürle uyumlu olarak polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin kültür yöntemine göre orta

kulak effüzyonlarında mikrobiyolojik etken saptamada anlamlı derecede üstün olduğunu göstermiştir.

PCR ile orta kulak effüzyonlarında saptadığımız patojenlere baktığımızda ellidört olgunun onsekizinde toplam yirmiüç patojen olduğu görülmektedir (Tablo 2). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak bizde olgularımızda en fazla oranda yeni bir patojen olan *Alloiokokkus otitidis*'i (%18.52) saptadık. Bu patojenin yanısıra *H. influenza*, *M. kataralis* ve *S. pnömoni* sırasıyla %12.96, %7.41 ve %3.7 oranlarında orta kulak effüzyonlarında saptadık. Literatürle karşılaştırdığımızda *A. otitidis* dışındaki patojenlerin bulunma oranlarının değişken olduğu görülmektedir. Hendolin ve ark. (9) olgularının %52'sinde *H. influenza*, %16'sında *M. kataralis* ve %8'inde *S. pnömoni*'yi saptamışlardır. Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık *S. pnömoni*, ikinci olarak da *H. influenza* saptanırken (76), bizim çalışmamızda ve Hendolin ve ark'nın (9) çalışmasında bu üç patojen içerisinde en sık *H. influenza* izlenirken, ikinci sıklıkla *M. kataralis* ve en az olarak da *S. pnömoni* saptanmıştır. Araştırmaların ayrı coğrafyalarda yaşayan olgularda yapılmış olması bu farklılıklara neden olabilir.

Farklı coğrafyaların yanı sıra olguların yaşlarının da bu oranlardaki farklılıklara sebep olabileceği düşünülebilir. Diğer çalışmalarda olguların yaşları ile bir bağlantı kurulduğunu göremedik. Bizim çalışmamızda olgularımızdan *A. otitidis* saptananların yaş ortalamalarının 8, *M. kataralis* ve *H. influenza* saptananların yaklaşık 7 ve *S. pnömoni* saptananların ise 5.5 olduğunu gördük. Bu tamamen rastlantısal olabileceği gibi, yaş grupları değiştikçe saptanan patojenlerin de

değişebileceğini düşündürebilir. Yapılacak çalışmalarda saptanan patojenlerin yaş gruplarına göre dağılımının incelenmesi bu konuya açıklık getirebilir.

Faden ve Dryja'nın (5) kronik effüzyonlu otitis medialı 320 olgunun %5'inde timpanosentez sıvısında ilk kez, aerokoklara ve streptokoklara görünüm olarak yakın, büyük gram pozitif kok olan *A. otitidis*'i tariflemesinden sonra sınırlı sayıda da olsa bu konuda çalışmalar yapılmıştır. 1992 yılında Aguirre ve ark'nın yaptıkları çalışmada (6) bu mikroorganizmanın yapısı ortaya konulmaya çalışılmış ve guanin ve sitozin'den fakir, katalaz pozitif ve oksidaz negatif bir bakteri olduğu ve 45°C üzerindeki şartlarda veya anaerobik ortamda üremediği belirtilmiştir. 1992 yılında Aguirre ve ark'larının (7) *A. otitidis*'i saptayabilmek için PCR araştırma testi geliştirmeye yönelik çalışmaları ve 1996 yılında Miller ve ark'larının (8) *A. otitidis*'in nasıl bir atmosferik ortamda üretilebileceğine yönelik çalışmalarından sonra klinik serilerde bu mikroorganizmayı da içine alan ve EOM'lı vakalarda orta kulak effüzyonlarının bakteriyolojisini inceleyen çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu anlamda ilk çalışma 1997 yılında Hendolin ve ark'ları (9) tarafından yapılmış ve *A. otitidis*, *H. influenza*, *M. kataralis* ve *S. pnömoni*'yi içine aldıkları 25 olguluk çalışmalarının %32 sinde kültür metoduyla bu patojenlerden biri saptanabilmişken PCR yönteminin uygulanmasıyla bu oranın % 84'e çıktığı gözlemlenmiştir. *A. otitidis* açısından değerlendirdiğimizde ise, kültürde saptanamamışken PCR ile %20 olguda saptandığını görmekteyiz. Bu çalışmada görülme sıklığı açısından değerlendirdiğimizde %52 ile *H. influenza*'nın *A. otitidis*'in önünde yer aldığını, *M. kataralis* ve *S. pnömoni*'nin %16 ve %8 lik oranlarla diğer sıraları paylaştıklarını görmekteyiz.

Klinik örneklerle ilgili rastladığımız ikinci çalışma 1999 yılında Hendolin ve ark'ları tarafından (10) altmışyedi olguda yapılmıştır. %85.1 olguda PCR ile pozitif sonuç alınmış ve bu pozitif olguların %46.3'ünün A. otitidis, %37.3'ünün M. kataralis, %20.9'unun S. pnömoni ve %17.9'unda H. influenza olduğu rapor edilmiştir.

Bu konuda bildirilen son çalışma ise 1999 yılında Beswick ve ark (11) tarafından yapılmış ve otitis medialı olguların %50'sinde A. otitidis in saptandığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda orta kulak effüzyonlarında PCR yöntemi ile tüm olgularda en sık oranda %18.52 yüzdesiyle A. otitidis'i saptadık. PCR pozitif olgular dikkate alındığında ise bu olguların %43.5 gibi nerdeyse yarıya yakın kısmının A. otitidis olduğunu görmekteyiz. Sonuçlarımız literatürle uyumludur.

Çalışmamızın diğer bir yönü ise bu dört bakteriyal patojenin ne oranda nazofarenkste saptanabileceğini görerek bu patojenlerin olası rezervuarı araştırmaktır. Bilindiği gibi %60-90 oranında nazofarenksdeki bakteriyal kolonizasyon ile orta kulak effüzyonlarındaki bakteriler benzerdir (86, 87). Calary ve ark (75) çalışmalarında orta kulak effüzyonlarında %14.3 M. kataralis, %16,7 H. influenza ve % 13.8 S. pnömoni saptarken nazofarenks kültürlerinde bu oranların sırasıyla %29.9, %21 ve %32.8 olduğunu saptamışlardır. Benzer çalışmalarda da orta kulak effüzyonlarında olduğu gibi nazofarenks florasında da bakterilerin çoğunluğunu bu ajanların oluşturduğu gözlenmiş ve bu sonuçlardan yola çıkılarak orta kulak effüzyonlarında saptanan bakterilerin rezervuarının nazofarenks olabileceği savunulmuştur (82, 84, 88, 108, 109). Kontrol grubu ve kronik tonsilliti

olgular ile EOM'lı olguların ayrı ayrı nazofarenkslerindeki bakteriyolojik florayı araştıran iki çalışmada (108, 109) EOM'lı hastaların nazofarenkslerinde saptanan S. pnömoni, H. influenza ve M. kataralis yüzdelerinin kronik tonsillitli olgular ile kontrol grubuna oranla önemli ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 7).

Patojenler	EOM %	KT* %	K** %
S. pnömoni (108)	21.6	13.5	10.8
S. pnömoni (109)	23.3	11.8	13.6
H. influenza (108)	37.8	24.3	16.2
H. influenza (109)	37.2	23.5	18.2
M. kataralis (109)	11.6	5.9	4.5

Tablo 7

*kronik tonsillit, ** kontrol

Nazofarenks kültürleri sonuçlarının EOM'lı, kronik tonsillitli olgular ile kontrol grubunun karşılaştırılması

Araştırmamızda nazofarenks örneklerinin %48.15'inde çalışma kapsamına alınan dört patojenden biri veya birkaçı saptadık. Bu oranları bakteri bazında ele aldığımızda ise %14.8 A. otitidis, %22.2 S. pnömoni, %7.4 H. influenza ve %33.3 M. kataralis saptandığını görmekteyiz. Literatürde nazofarenks florasında A. otitidis'e yönelik çalışmaya rastlamadık. Diğer patojenler için nazofarenksin rezervuar yapı olduğuna yönelik tezler dikkate alındığında aynı tezden hareketle araştırmamızda %14.8 oranında A. otitidis'in saptanması nazofarenksin bu bakteri

açısından da rezervuar olabileceğini düşündürebilir. Ancak konunun henüz tartışmaya açık ve üzerinde çalışılması gereken bir alan olduğu görüşünderiz.

Hernekadar sterilite şartlarına uyularak dış kulak yolu gerekli solüsyonlarla irriqe edilse de A. otitidis ve diğer üç patojen için dış kulak yolundan ekim olabilir mi düşüncesinden hareketle dış kulak yolu sürüntülerini de araştırdık. Toplam kırkaltı adet dış kulak yolu örneklerinden sadece ikisinde A. otitidis saptanırken diğer patojenlerin hiçbirini saptanmadı. Literatür taradığımızda ise bu dört patojenden hiçbirinin dış kulak yolu florasında saptanamadığını, S. epidermitis, Difteroidler, S. aureus, P. Aroginoza, Proteus, Klebsiella, E. Koli'nin ve diğer patojenlerin değişik oranlarda bulunduğunu gördük (99, 110, 111, 112).

İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte %4.35 oranında A. otitidis saptamamız, acaba dış kulak yolundan bu patojenin ekimi olabilir mi sorusunu akla getirebilir. Bu konuda başka çalışma olmaması ve bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonucun istatistiksel olarak yetersiz olması nedeniyle bu alanda da yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

SONUÇ

Effüzyonlu otitis media'larda orta kulak effüzyonlarını özellikle A. otitidis olmak üzere H. influenza, S. pnömoni ve M. kataralis açısından değerlendirmek ve bu mikroorganizmaların primer rezervuar olarak nazofarenks ve dış kulak yolu florasında ne denli mevcut olduğunu saptamak amacıyla otuziki hastadan alınan örneklerden çalışmaya dahil edilen toplam yirmiyedi nazofarenks sürüntüsü, kırkaltı dışkulak yolu sürüntüsü ve ellidört orta kulak effüzyonu önce kültür yöntemiyle daha sonra da PCR yöntemiyle değerlendirildi. Kültür ile OKE'da %5.56, Nazofarenks sürüntüsünde %48.15 oranında yukarıdaki patojenlerden en az birini saptadık. Dış kulak yolu sürüntülerinde bu oran %0 idi. Saptanan patojenlerden hiçbirisi A. otitidis değildi. Aynı örneklerde PCR çalışması ile orta kulak effüzyonlarında %33.3 olguda bakterilerden en az birini saptadık. %18.5 oranıyla en fazla saptanan A. otitidis oldu. Nazofarenkste %14.8'i A. otitidis olmak üzere %48.1 olguda en az bir patojen saptandı. Dış kulak yolunda ise %4.5 olguda sadece A. otitidis saptanırken %95.5 olguda çalışma kapsamına alınan patojenlere rastlanmadı.

Çalışma sonucu elde edilen veriler, OKE'larındaki bakteriyal patojeniteyi saptamada PCR'in istatistiksel olarak kültür yöntemine üstünlüğünü ($P=0.0002$), A. otitidis'in EOM'larda önemli derecede etkili olduğunu ve bu patojenin rezervuarının nazofarenks ve dış kulak yolu florası olabileceğini göstermiştir.

ÖZET

Effüzyonlu otitis media (EOM), genel ve lokal infeksiyon belirti ve bulguları olmaksızın sağlam kulak zarı arkasında sıvı toplanması ile karakterize otitis media tipi olup çocuklarda işitme kaybının en önemli sebebidir. Barotravmalar, östaki disfonksiyonları, mastoid havalanma yetersizliği, immun bozukluklar, allerji gibi nedenlerin yanı sıra enfeksiyonlar da orta kulakta effüzyon toplanmasına sebep olabilirler. Bakteriyolojik ajanlardan H. influenza, S. pnömoni ve M. kataralis'in yanısıra son yıllarda A. otitidis'in rolü üzerinde durulmaktadır. Çalışmamızda A. otitidis'i orta kulak effüzyonlarında %18.5 oranında, nazofarenkste %14.8 oranında ve dış kulak yolunda %4.5 oranında saptadık. Sonuçlarımız konuyla ilgili literatürü doğrulayarak A. otitidis'in EOM patogenezesinde önemli ölçüde rolü olabileceğini göstermesi yanı sıra rezervuarının da nazofarenks ve dış kulak yolu florası olabileceğini göstermiştir. Elde ettiğimiz bir diğer sonuç da EOM'larda bakteriyolojik patojeniteyi tespitite PCR yönteminin kültür yöntemine göre istatistiksel olarak üstün olmasıdır (P=0.0002).

REFERANSLAR

- 1- Tos M, Poulsen G, Borch J: Etiologic Factors in Secretory Otitis. Arch Otolaryngol 1979, 105:582-588
- 2- Senturia BH: Classification of Middle Ear Effusions. Ann Otol, 1970, 79:358-370
- 3- Ergin NT: Seröz Otitis Media'lı Hastalarda Nötrofil Kemotaksisi ve Orta Kulak Materyalinin Kemotaksise olan etkisinin incelenmesi. Uzmanlık tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı, Ankara, 1992
- 4- Şehitoğlu MA: Seröz Otitis Medianın patogenezinde Hyaluronik Asidin rolünün incelenmesi, Doçentlik tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı, Ankara, 1982
- 5- Faden H, Dryjia D: Recovery of a unique organism in human middle ear fluid and its possible role in chronic otitis media. J Clin Microbiol. 1989; 27: 2488-2491
- 6- Aguirre M, Collins MD: Phylogenetic analysis of *Alloiococcus otitidis* gen. Nov., sp. Nov., an organism from human middle ear fluid, Int J System Bacteriol, 1992, 42: 79-83
- 7- Aguirre M, Collins MD: Development of Polymerase chain reaction-probe test for identification of *Alloiococcus otitidis*. J Clin Microbiol, 1992, 30(8): 2177-2180
- 8- Miller PH, Facklam RR, Miller JM: Atmospheric growth requirements for *alloiococcus* species and related gram positive cocci. J Clin Microbiol. 1996, 34(4): 1027-1028

- 9- Hendolin PH, Markkanen A, Ylikoski J, Wahlfors JJ: Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(11): 2854-2858
- 10- Handolin PH, Karhainen U, Himi T, Markkanen A, Ylikoski J: High incidence of *Alloiooccus otitidis* in otitis media with effusion, *Pediatr Infect Dis J*, 1999, 18(10): 860-865
- 11- Beswick AJ, Lawley B, Fraise AP, Pahor AL, Brown NL: Detection of *alloiococcus otitidis* in mixed bacterial population from middle-ear effusion of patients with otitis media. *The Lancet*, 1999, 354: 386-389
- 12- Hoşal N: Seröz Otitis Media'nın etyolojisi üzerine çalışmalar. Doçentlik tezi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. K.B.B. Anabilim Dalı, Ankara, 1966
- 13- Akyıldız N: Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 1998, pp: 275-325
- 14- Ada M: Seröz Otitis Media'da cerrahi tedavi. Uzmanlık tezi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi K.B.B. Anabilim Dalı, İstanbul, 1991
- 15- Casselbrant ML: Otitis media in the united state. In *Acute and Secretory Otitis Media*, ed J.Sade,(Amsterdam Kugler Publication). 1986
- 16- Demireller A: İlkokul öncesi çocuklarda seröz otitis media insidansı. Uzmanlık tezi, Ankara Üniversitesi KBB Anabilim Dalı, Ankara, 1985
- 17- Pestalozza G, Romaglioni M, Tessitore E: Incidence and Risk Factors of Acute Otitis Media and Otitis Media With Effusion In Children of Different Age Groups. *Adv Otorhinolaryngol*. 1988;40:47-56

- 18- Alho OP, Oja H, Koivu M, Sorri M: Risk factors for chronic otitis media with effusion in infancy. Each acute otitis media episode induces a high but transient risk. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1995;121(8):839-43.
- 19- Teele DW, Klein JO, Rosner BA: Epidemiology of otitis media in children. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl 1980, 89:5-6
- 20- Aydoğan B: Plain roentgographic chances of the paranasal sinuses in cases with and without otitis media with effusion. Ann med sciences, 1996, 5:84
- 21- Koçak MH: Effüzyonlu otitis media da allerjinin rolü. Uzmanlık tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı, Bursa, 1994
- 22- Holborow C: Eustachian Tubal Function. Changes in Anatomy and Function With Age and the Relationship of These Changes to Aural Pathology. Arch Otolaryng 1970, 92:624-626
- 23- Ackerman MN, Freidman RA, Doyle WJ, Bluestone CD, Feriman P: Antigen-induced Eustachian Tube Obstruction: An Intranasal Provocative Challenge Test. J Allergy Clin Immunol 1984, 73:604-609
- 24- Brooks DN: Middle Ear Effusion in Children. J Otolaryngol 1976, 5: 453-458
- 25- Bluestone CD, Paradise JI, Beery QC: Physiology of The Eustachian Tube in The Pathogenesis and Management of Middle Ear Effusion. Laryngoscope, 1972, 82:1654-1670
- 26- Gates GA, Avery CA, Cooper JC Jr, Prihoda TJ: Chronic secretory otitis media: effects of surgical management. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl. 1989;138:2-32.

- 27- Takahashi H, Hayashi M, Sato H, Honjo I: Primary deficits in eustachian tube function in patients with otitis media with effusion. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1989; 115:581-584
- 28- Jung TT, Juhn SK, Michael AF: Localization of prostaglandin-forming cyclooxygenase in middle ear and external canal tissue. Otolaryngol Head Neck Surg 1983; 91:187-192
- 29- Yamanaka N, Kobayashi K, Katauro A, Kuroki Y, Akino T: Implication of surfactan apoprotein in otitis media with effusion. Ann otol rhinol laryngol. 1991, 100:835-840
- 30- Maw AR: Otitis media with effusion. Scott-Browns Otolaryngology. Pediatric Otolaryngology vol:6.ed. John NG Evans, pp:159-172. Butterworths 1987
- 31- Maw AR: Age and adenoid size in relation to adenoidectomy in otitis media with effusion. Am J Otolaryngol. 1985, 6:245-248
- 32- Linder TE, Marder H, Munzinger J: Role of adenoids in the pathogenesis of otitis media: A bacteriologic and immunohistochemical analysis, Ann Otol Rhinol Laryngol, 1997, 106:619-623
- 33- Paparella MM, Junk TK, Goycoolea MV: Otitis media with effusion. In paparella MM. Shumrick DA (eds): Otolaryngology. Third Ed. WB Saunders Company, Philadelphia 1991. Pp1317-1341
- 34- Değer K, Savaş İ, Etaner R, Kayhan V, Korkmaz , Özbek İ, Uluğ T: Seröz otitis mediada sinüzit insidansı. Türk otolaringoloji arşivi. 1990, 29:154-155
- 35- Fujita A, Takahashi H, Honjo I: Etiological role of adenoids upon otitis media with effusion. Acta otolaryngol Suppl 1988; 454:210-213

- 36- Roydhouse N: Adenoidectomy for otitis media with mucoid effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1980; 89:312-315
- 37- Maw AR: Speller DCE. Are the tonsils and adenoids a reservoir of infection in otitis media with effusion (glue ear)?. *Clin Otolaryngol*. 1985, 10:265-269
- 38- Sade J, Halevy A, Hadas E: Clearance of middle ear effusion and middle ear pressure. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1976; 85(Suppl 25):58-62
- 39- Bernstein JM: The Role of IgE Mediated Hypersensitivity In The Development of Otitis Media With Effusion. *Otolaryngol Clin North Am* 1992, 25:197-211
- 40- Maw AR: Otitis media with effusion (glue ear). In Kerr AG (ed). *Scott-Brown's Otolaryngology*. Fifth Ed. Butterworths, London 1987, pp 159-176
- 41- Palva T, Taşkinen E, Lehtinen T, Ramsay H, Björkstén F, Hackman P: Mast Cells and Histamine in Adenoid Tissue and Middle Ear. *Acta otolaryngol(Stockh)* 1991, 111:349-353
- 42- Takahashi M, Kanai N, Watanabe A, Oshima O, Ryan AF: Lymphocyte Subsets in Immune-mediated Otitis Media With Effusion. *Eur Arch Otolaryngol* 1992, 249:24-27
- 43- Trotsky M: Immunology For The Otolaryngic Allergist. *Otolaryngol Clin North Am* 1992, 25:151-162
- 44- Bluestone CD: Eustachian tube functions and allergy in otitis media. *Pediatrics* 1978, 61(5) 753-760

- 45- Collins MP, Church MK, Bakshi KN, Osborne J: Adenoid Histamine and Its Possible Relationship to Secretory Otitis Media. *J. Laryngol otol.* 1985, 99:685-691
- 46- Mills R, Brain C: A history of acute suppurative otitis media and allergic symptomatology in children with chronic secretory otitis media and controls. *Clin Otolaryngol.* 1985, 10:303-306
- 47- Phillips MJ, Knight NJ, Manning H, Abbot AL, Tripp WG: IgE and Secretory otitis media. *The lancet*, 1974, 2: 1176-1178
- 48- Harsten G, Prellner K, Heldrup J, Kalm O, Kornfalt R: Recurrent acute otitis media. A prospective study of children during the first three years of life. *Acta otolaryngol* 1989; 107:111-119
- 49- Özsoylu Ş: Anne sütünün enfeksiyonlardan koruyucu etkisi. *Yeni tip dergisi* 1990, 4(7):171-175
- 50- Paparella MM: Pathogenesis of Middle Ear Effusions. *Ann oto* 1976 suppl 25:63-65
- 51- Lim DJ, Shimada T: Secretory activity of normal middle ear epithelium. Scanning and Transmission electron microscopic observations. *Ann otol.* 1971, 80:319,329
- 52- Tos M: Pathogenesis and pathology of chronic secretory otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1980; 89: 91-97
- 53- Bak-Petersen K, Tos M: The mucous glands in chronic secretory otitis media. *Acta Otolaryngol*, 1971, 72:14-27

- 54- Bak-Petersen K, Tos M: Density of Mucous Glands in Various Chronic Middle Ear Diseases. *Acta otolaryng* 1973, 75: 273-274
- 55- Bernstein JM, Hayes ER: Middle ear mucosa in health and disease. *Arch Otolaryngol*. 1971, 94: 30-35
- 56- Sade j, Eliezer N, Silberberg A, Nevo AC: The Role of Mucus in Transport by cilia. *Am Rev Res Dis*. 1970, 102: 48-52
- 57- Majima Y, Jin CS, Takeuchi K, Hamaguchi Y, Sakakura Y, Juhn SK: Rheological properties of middle ear mucus in relation to goblet cell population in cat. *Acta otolaryngol Suppl* 1991, 483: 11-16
- 58- Liu YS, Lim DJ, Lang RW, Birck HG: Chronic middle ear effusions: Immunological and bacteriological investigations. *Arch otolaryngol*. 1975; 101: 278-286
- 59- Bernstein J, Tsutsumi H, Ogra PL: The middle ear mucosal immune system in otitis media with effusion. *Am. J Otolaryngol*. 1985, 6: 162-168
- 60- Ogra PL, Bernstein JM, Yurchak AM, Coppola PR, Tomasi TB: Characteristics of secretory immune system in human middle ear: Implications in otitis media. *J. Immunol* 1974, 112: 488-495
- 61- Juhn SK: Panel discussion: Pathogenesis of Otitis Media. *Studies on Middle Ear Effusions. Laryngoscope*. 1982, 92: 287-291
- 62- Borge P: Atopy and Secretory Otitis Media. Immunological studies and responses to topical corticosteroid therapy. *J. Laryngol otol*. 1983, 97: 117-129
- 63- Goycoolea MM, Paparella MM, Juhn SK, Carpenter AM: Cells involved in the middle ear defence system. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1980, 89: 121-128

- 64- Miller MB, Koltai P, Hetherington SV: Bacterial antigens and neutrophil granule proteins in middle ear effusions. Arch otolaryngol Head Neck Surg 1990, 116: 335-337
- 65- Bernstein JM, Okazaki T, Reisman RE: Prostaglandins in Middle Ear Effusion. Arch otolaryngol. 1976, 102: 257-258
- 66- Jackson RT: Pharmacological mechanisms in the eustachian tube. Ann otol 1971, 80: 313-318
- 67- Junk TTK: Prostaglandins, leukotriens and other arachidonic acid metabolites in the pathogenesis of otitis media. Laryngoscope, 1988, 98: 980-993
- 68- Yellon RF, Doyle WJ, Whiteside TL, Diven WF, March AR, Fireman P: Cytokines, immunoglobulins and bacterial pathogens in middle ear effusions. Arch otolaryngol Head Neck Surg. 1995, 121: 865-869
- 69- Harcourt MFL, Brown LCAK: Hydrotyimpanum (Secretory otitis media). Arch Otolaryngol. 1953. 57: 12-21
- 70- Gökçe A: Effüzyonlu otitis medialı vakalarda adenoid vegetasyonun ince yapı düzeyinde incelenmesi. Uzmanlık tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı, Adana, 1994
- 71- Klein BS, Dollete FR, Yolken RH: The role of respiratory syncytial virus and other viral pathogens in acute otitis media. J. pediatr 1982, 101: 16-20
- 72- Pitkaranta A, Jero J, Arruda E, Virolainen A, Hayden FG: Polymerase chain reaction-based detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus in otitis media with effusion. J. pediatr. 1998, 133: 390-394

- 73- Bluestone CD, Stephenson SJ, Martin LM: Ten year review of otitis media pathogens. *Pediatr infect Dis J.* 1992, 11: 7-11
- 74- Fulghum RS, Daniel HJ, Yarborough JG: Anaerobic bacteria in otitis media. *Ann otol.* 1977, 86: 196-203
- 75- Clary RA, Bahadori RS, Muntz HR, Lusk RP: Bacteria in the middle ear and nasopharynx during tympanostomy tube insertion. *Am J Otolaryngol.* 1998, 19(5): 301-304
- 76- Klein JO: Microbiology and antimicrobial treatment of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 1981; 90(3 Pt 3):30-36
- 77- Diamond C, Siison PR, Kearns AM, Ingham HR: Bacteriology of chronic otitis media with effusion. *J Laryngol Otol.* 1989, 103: 369-371
- 78- Sriwardhana KB, Howard AJ, Dunkin KT: Bacteriology of otitis media with effusion. *J laryngol Otol.* 1989, 103: 253-256
- 79- Bunse T, Hildman H, Zan W, Opferkuch W: A bacteriological study of otitis media with effusion. Concurrent coagulase-negative staphylococcal infections in the middle ear. *Arch Otolaryngol.* 1987, 243: 387-391
- 80- Stanford LE, Raisanen S: Occurrence of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in otitis media with effusion. *Clin Otolaryngol.* 1992, 17: 195-199
- 81- Healy GB, Teele DW: The Microbiology of Chronic Middle Ear Effusions In Children. *Laryngoscope.* 1977, 87(9 Pt 1):1472-1478.
- 82- Kamme C, Nilsson N: Secretory otitis media: Microbiology of the middle ear and the nasopharynx. *Scand J Inf Dis.* 1984, 16: 291-296

- 83- Bluestone CD: Modern management of otitis media. *Ped Clin North Am.* 1989, 36: 1371-1387
- 84- Hemlin C, Brauner A, Carenfelt C, Wretlind B: Nasopharyngeal flora in otitis media with effusion. *Acta otolaryngol (Stockh).* 1991, 111: 556-561
- 85- Mills R, Uttley AH, McIntyre MF: A bacteriological study of middle ear and upper respiratory tract in children with chronic secretory otitis media. *Clin Otolaryngol.* 1985, 10: 335-341
- 86- Hemlin C, Brauner A, Carenfelt C, Wrentlin B: Test-retest reliability of the nasopharyngeal culture in children. *APMIS,* 1989, 97: 887-890
- 87- Kurono Y, Mogi G: Otitis media with effusion and the nasopharynx. *Acta Otolaryngol Suppl* 1988, 454: 214-217
- 88- Stenforde L, Raisanen S: The bacterial flora of the nasopharynx with special reference to middle ear pathogens. *Acta Otolaryngol(stockh),* 1989, 108: 122-125
- 89- Freijd A, Bygdeman S, Rynnel-Dagöö B: The Nasopharyngeal Microflora of Otitis-prone Children with Emphasis on *H. Influenzae*. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1984, 97: 117-126
- 90- Prellner K, Christensen P, Hovelius B, Rosen C: Nasopharyngeal Carriage of Bacteria in Otitis-prone and Non-otitis-prone Children in Day-care Centres. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1984, 98: 343-350
- 91- Hemlin C, Brauner A, Carenfelt C, Wretlind B: Nasopharyngeal culture with quantitative analysis of pathogens in chronic otitis media with effusion. *APMIS,* 1989, 97: 606-610

- 92- Giebink GS, Mills EL, Huff JS, Edelman CK, Weber ML, Juhn SK, Quie PG: The Microbiology of Serous and Mucoïd Otitis Media. *Pediatrics*, 1979, 63: 915-919
- 93- Liu YS, Lim DJ, Lang RW, Birek HG: Chronic middle ear effusions. *Arch Otolaryngol*. 1975, 101: 278-286
- 94- Ataoğlu H, Goksu N, Kemalolu YK, Bengisun S, Ozbilen S: Preliminary Report on L-Forms: Possible Role in the infectious origin of secretory otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1994, 103: 434-438
- 95- Feingold DS: Biology and Pathogenicity of Microbial Spheroblasts and L-Forms. *New Eng J Med*. 1969, 281: 1159-1170
- 96- Hotomi M, Tabata T, Kakiuchi H, Kunimoto M: Detection of Haemophilus influenzae in middle ear of otitis media with effusion by polymerase chain reaction. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1993 Aug;27(2):119-26.
- 97- Jero J, Virolainen A, Salo P, Leinonen M, Eskola J, Karma P: PCR assay for detecting streptococcus pneumoniae in the middle ear of children with otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1996; 116: 288-92
- 98- Post JC, Preston RA, Aul JJ, Larkins-Pettigrew , Rydquist-White J, Anderson KW, et al: Molecular analysis of Bacterial pathogens in otitis media with effusion. *JAMA*, 1995, 273(20): 24-31
- 99- Brook I: Microbiological studies of the bacterial flora of the external auditory canal in children. *Acta Otolaryngol*, 1981: 91: 285-287
- 100- Ruoff KL: Leuconostoc, pediococcus, stomatococcus, and miscellaneous gram-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA,

- Tenover FC, Robert HY eds. Manual of clinical microbiology, sixth edition, Washington DC, ASM press, 1995, pp: 315-323
- 101- Durmaz R: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisi ve mikrobiyolojide kullanımı. Mikrobiyol Bül 1995, 29: 304-320
- 102- Persing DH: In vitro nucleic acid implication technique. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic molecular Microbiology. Washington DC: ASM Press, 1993: 51-70
- 103- Koneman EW, Allen SD, Jonda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr. WC: Diagnostic microbiology. Fifth edition. Philadelphia, 1997; 76-106
- 104- Daniel WW: Biostatistics: A foundation for analysis in the health science. John Wiley & Sons, Newyork 1987, pp:531-555
- 105- Calhoun KH, Norris WB, Hokanson JA, Stierberg CM, Quinn FB: Bacteriology of middle ear effusions. Southern Med J. 1988, 81: 332-336
- 106- Liederman EM, Post JC, Aul JJ, Sirko DA, White GJ, Buchman CA, Ehrlich GD: Analysis of adult otitis media: Polymerase chain reaction versus culture for bacteria and viruses. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1998, 107: 10-16
- 107- Watson P, Voss L, Barber C, Aickin R, Bremner D, Lennon D: The microbiology of chronic otitis media with effusion in a group of Auckland children. New Zealand Med J. 1996, 109: 182-184
- 108- Fujimori I, Kikushima K, Goto R, Hisamatsu K, Murakami Y, Yamada T: Investigation of the nasopharyngeal bacterial flora in children with otitis media with effusion. ORL. 1996, 58: 147-150

- 109- Fujimori I, Hisamatsu K, Kikushima K, Goto R, Murakami Y, Yamada T: The nasopharyngeal bacterial flora in children with otitis media with effusion. *Eur Arch Otolaryngol* 1996, 253: 260-263
- 110- Ostfeld E, Rubinstein E, Gazit E, Smetana Z: Effect of systemic antibiotics on the microbial flora of the external ear canal in hospitalized children. *Pediatrics*; 1977; 60: 364-366
- 111- Salit IE, Miller B, Wigmore M, Smith JA: Bacterial flora of the external canal in diabetics and non-diabetics. *Laryngoscope*. 1982; 92: 672-673
- 112- Campos A, Arias A, Betancor L, Rodriguez C, Hernandez AM, Aguado DL, Sierra A: Study of common aerobic flora of human cerumen. *J Laryngol Otol*. 1998; 112: 613-616